

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Studium sezónních vlivů na základní
fyziologické parametry včely medonosné (*Apis
mellifera*)**

Diplomová práce

Bc. Daniela Prušáková

Školitelka: RNDr. Radmila Čapková Frydrychová, Ph.D.

České Budějovice 2022

Prušáková, D., 2022: Studium sezónních vlivů na základní fyziologické parametry včely medonosné (*Apis mellifera*). [Study of seasonal effects on the physiology of honey bee (*Apis mellifera*). Mgr. Thesis, in Czech] – 68 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

The effect of the season on the basic physiological parameters of the honey bee was examined in this thesis. Attention was focused on the fat body as the center of all metabolic processes. Its morphology, nutrient content, and gene expression were compared between nurses, foragers and winter bees.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne 11. dubna 2022

.....
Daniela Prušáková

Poděkování

V první řadě patří největší poděkování mé školitelce RNDr. Radmile Čapkové Frydrychové, Ph.D., a to nejen za její cenné rady a kritické připomínky, ale především za její vždy vlídný přístup, ochotu a motivaci. Dále děkuji i ostatním členům naší laboratoře, zejména Míše za pomoc při zavádění protokolů pro barvení preparátů a také Mildovi za zpracování dat diferenciální exprese. Za odborné konzultace a technologický dozor velice děkuji RNDr. Zdeňce Svobodové, Ph.D. a Mgr. Janu Černému. V neposlední řadě bych ráda vyjádřila obrovské díky mým nejbližším za podporu po celou dobu mého studia, zvláštní poděkování pak patří mému dědovi.

Obsah

1	Úvod	1
1.1	Včela jako sociální hmyz	1
1.2	Fyziologie včelstva	2
1.2.1	Faktory ovlivňující rychlost stárnutí včel	4
1.3	Změny doprovázející přechod mezi fenotypy	6
1.3.1	Vitelogenin a juvenilní hormon	7
1.3.2	Tukové těleso	8
1.3.3	Hypofaryngeální žlázy	10
1.3.4	Telomeráza	10
1.3.5	Signální dráhy související s dlouhověkostí	10
2	Cíl práce	14
3	Metody	15
3.1	Sběr vzorků	15
3.2	Preparáty tukového tělesa včel pro světelnou a fluorescenční mikroskopii	15
3.2.1	Oil Red O	15
3.2.2	Sudan Black B	16
3.2.3	Akridinová oranž	16
3.3	Preparáty tukového tělesa včel pro transmisní elektronovou mikroskopii (TEM)	17
3.4	Měření množství a koncentrace živin v tukovém tělesu včel	18
3.4.1	Měření volných cukrů	18
3.4.2	Měření glykogenu	19
3.4.3	Měření lipidů	20
3.4.4	Měření bílkovin	21
3.5	Měření koncentrace živin v hemolymfě	21
3.5.1	Měření volných cukrů	22
3.5.2	Měření lipidů	22
3.5.3	Měření bílkovin	22
3.6	Statistické zpracování výsledků	23
3.7	Izolace RNA	23
3.8	Porovnání exprese	23
4	Výsledky	25
4.1	Porovnání velikosti buněk tukového tělesa a jejich morfologie	25
4.2	Porovnání hmotnosti tukového tělesa a množství a koncentrace živin v tukovém tělese	32
4.3	Porovnání koncentrace živin v hemolymfě	36
4.4	Porovnání exprese genů tukového tělesa	37
5	Diskuze	45
6	Závěr	51

7	Reference	52
8	Příloha	62

1 Úvod

1.1 Včela jako sociální hmyz

Včela medonosná (*Apis mellifera*) je jedním z nejznámějších zástupců eusociálního hmyzu. Eusociální společenství jsou definována několika charakteristikami: přítomnost alespoň dvou překrývajících se generací, rozdělení na reprodukční (královskou) kastu čítající pouze jednoho či několik jedinců a početnou nereprodukční (dělnickou) kastu, a na konec organizovanost a spolupráce jedinců ve prospěch celku. Eusociální organizace umožňuje dané skupině jedinců v rámci daného společenství vykonávat specifické činnosti, jako jsou péče o plod, ochrana před predátory nebo zajišťování potravy a celkově tedy efektivně zajistit optimální podmínky pro život celé kolonie (Beshers a Fewell, 2001; Canciani et al., 2019). Výsledné chování celku přitom není ovládáno žádnou kontrolní autoritou, ale vzniká ze spolupráce a komunikace všech jedinců mezi sebou, jedná se o tzv. decentralizovanou kontrolu na bázi negativních zpětných smyček (Seeley, 1995). Ačkoliv nejproslulejší eusociální druhy patří k zástupcům blanokřídlého hmyzu (včely, mravenci) či k termitům, eusociální organismy jsou známy i u dalších živočišných taxonů, jako jsou na příklad hlodavci z čeledi rypošovitých (Jarvis, 1981).

Jedním z fenoménů eusociálního hmyzu jsou až dramatické nárůsty pozorované v délce života příslušníků reprodukčních kast v porovnání s těmi nereprodukčními. U některých druhů termitů se králové a královny mohou dožít desítky let, a to v porovnání s jejich dělníky či vojáky, kteří žijí v řádech měsíců či několik málo let. Podobné nárůsty jsou pozorovány u královen některých druhů mravenců (Keller, 1998). U včely medonosné se královny mohou dožít až šesti let, kdežto dělnice žijí v řádu několika týdnů (u letní generace dělnic) či několika měsíců (u zimní generace dělnic). Obecně se tedy ukazuje, že u eusociálního hmyzu neplatí jinde běžně pozorované pravidlo, že čím více potomků, tím kratší život rodičů – tedy fenomén zvaný „cost of reproduction“. Nadto je u eusociálního hmyzu pozorována určitá plasticita v míře stárnutí, a to vždy s ohledem na potřeby dané kolonie. To celkově naznačuje, že si eusociální hmyz vyvinul zcela mimořádný mechanismus, díky kterému se vypořádává se stárnutím a posouvá mantinely našeho obecného chápání procesu stárnutí a jeho regulace (Keller a Jemielity, 2006; Blacher et al., 2017; Kennedy et al., 2021). S ohledem na toto je eusociální hmyz využíván jako modelový organismus pro studium stárnutí.

1.2 Fyziologie včelstva

Včelí společenství cítá během jara a léta, tedy období největší aktivity včel, až 50 000 jedinců. Počet zahrnuje jedinou královnu, dále řádově desítky tisíc dělnic a až tisíc trubců. Královna navíc intenzivně klade nová vajíčka, každý den zhruba 1000-2000 vajíček, z nichž se líhnou noví jedinci. Samci zvaní trubci vznikají z neoplozeného vajíčka a jejich výhradní povinnost spočívá v oplodnění královen, poté hynou, případně jsou z úlu vyhnáni a přes zimu se v něm nevyskytují (Page a Peng, 2001; Döke et al., 2019). Včelí dělnice zabezpečují péči o královnu a správný chod celé včelí kolonie. Vznikají z oplozených vajíček, jsou to dcery jedné matky ale různých otců, což vyplývá ze způsobu oplodnění včelí královny. Oplodnění královny se odehrává na tzv. snubních letech probíhajících zhruba týden po vylíhnutí dané královny. Královna učiní v průběhu svého života jeden až dva snubní lety, přičemž je oplozena přibližně deseti až dvanácti trubci z úlů z přilehlého okolí (Koeniger a Koeniger, 2007; Abou-Shaara et al., 2021). Spermie si ukládá do semenného váčku, kde jsou zachovány po celý její život. Díky tomu je královna schopna kontrolovat uvolňování spermií z tohoto váčku a určit, zda naklade oplozená či neoplozená vajíčka (Ratnieks a Keller, 1998). Ve výsledku některé rozdílné alely od rozdílných otců jsou příčinou určitých rozdílných vlastností dělnic. Některé včely reagují hbitě na podněty okolí, jiné jsou na podněty méně citlivé, čímž je docíleno adekvátní míry odezvy včelstva jako celku s ohledem na intenzitu daného stimulu bez potřeby řídicí entity (Seeley, 1995).

Dorozumívání v úlu je zprostředkováno pomocí feromonů. Obecně lze feromon definovat jako chemickou substanci sloužící ke komunikaci mezi jedinci téhož druhu. Tyto látky jsou šířeny buďto přímým kontaktem mezi jednotlivými včelami, způsobem zvaným trofolaxe (při předávání potravy z úst do úst), anebo vzduchem. Hlavním smyslovým orgánem přijímající většinu signálů v temnotě úlu je pár tykadél na hlavě, těmi jsou včely schopny vnímat právě pachy, vibrace, teplotu či vlhkost. A naproti tomu, až ve stádiu létavky, která se vyskytuje většinu času mimo temnotu úlu shánějíc potravu, se stává zrak nepostradatelným orientačním orgánem (Seeley, 1995; Bortolotti et al., 2014).

Vyvíjející se včelí larvy (včelí plod) jsou krmeny a zahřívány mladými včelami, tzv. mladuškami, které se zdržují během svých prvních tří týdnů života výhradně v úlu. Pečují primárně o plod a královnu. Ke kastovní diferenciaci neboli k vývoji jednotlivých včelích kast, v průběhu larválního vývoje. Larvy dělnic a trubců jsou krmeny omezeným množstvím mateří kašičky, a to pouze první tři dny vývoje, pak jsou krmeny kaší ze směsi pylu a medu. Naproti tomu larva královny je krmena mateří kašičkou po celou dobu svého vývoje, posléze i po celý

svůj dospělý život a dorůstá tak dvojnásobné velikosti oproti včelím dělnicím. Mateří kašička, stejně jako směs pylu a medu, je produkována hypofaryngeálními žlázami mladušek a poté podávána larvám. Mateří kašička je sice nutričně bohatší, ovšem onen rozhodující faktor není dán přítomností nějaké speciální komponenty v mateří kašičce, která by byla zodpovědná za kastovní diferenciaci, ale spočívá to především v kvantitě podávané potravy. Ta spouští u larvy celou kaskádu dějů, založených především na epigentických změnách, které právě proces kastovní diferenciaci iniciují a volivňují na příklad geny podílející se na reprodukci či morfologických rysech. Vývoj dělnice trvá 21 dní, vývoj trubce 24 dní a vývoj královny pouhých 16 dní (Page a Peng, 2001; Lyko et al., 2010; Slater et al., 2020; Wang et al., 2020). Mladušky mohou navíc mimo přísunu potravy regulovat i teplotu v okolí plodu, která se pohybuje v rozmezí 32-36 °C, ta může mít dopad na chování dospělé včely. Včely odchované při vyšší teplotě totiž dosahují v dospělosti nižší tělesné hmotnosti, rychleji přechází do stádia létavek a žijí kratší dobu než včely odchované nižších teplotách. To zároveň akcentuje vliv ročního období na životnost včely rozebraný níže (Becher et al., 2009; Szentgyörgyi et al., 2018).

Starší včely, zvané létavky, zajišťují potravu a další suroviny pro celé společenstvo, což je nektar, ze kterého zahuštěním vzniká med, ten je pro včely a zejména pro létavky zdrojem glycidů. Dále je zajišťován pyl, jenž je oproti létavkám preferován jako potrava mladuškami. Pyl je primárním zdrojem bílkovin, bohatě zastoupených mikroživin, částečně také lipidů. Konkrétní obsah nutrientů se liší dle druhu rostlin. Dále se pak v úlu vyskytují zásoby vody, regulující mikroklima v úlu, a propolis mající stavební a desinfekční funkci (Brodshneider a Crailsheim, 2010; Wright et al., 2018).

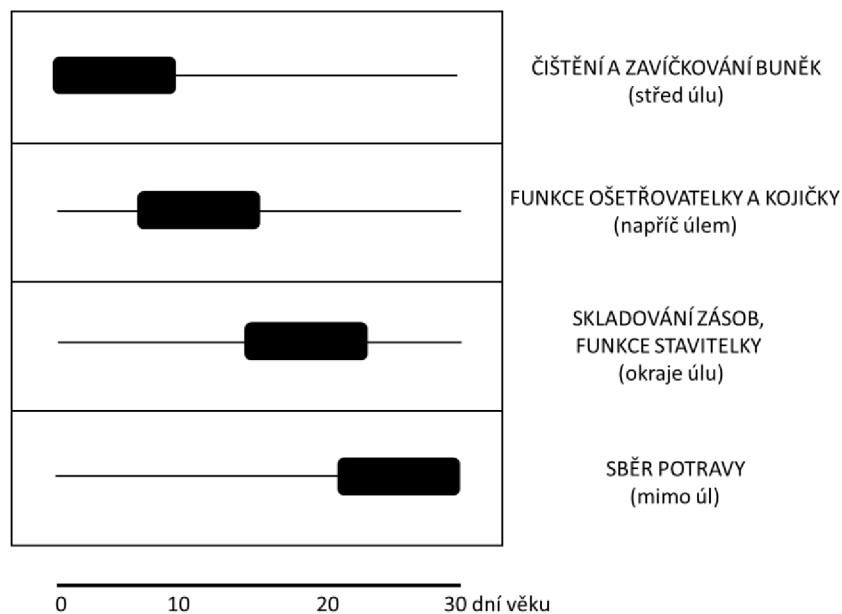
Přechod dělnice od činností v úlu k venkovním činnostem je klíčovým milníkem v životě včely a je spojen se změnami nejen jejího chování, ale i morfologie, genové exprese, hormonální sekrece a podobně. Na příklad, dochází k poklesu tělesné hmotnosti spojeného s degradací především tukových zásob v tukovém tělese a značnému úbytku proteinů hemolymfy. Další změny zahrnují nárůst obsahu vody v těle a glykogenu v létacích svalech či až stonásobné zvýšení úrovně metabolismu. Veškerou energii pak létavka investuje do namáhavých letů za potravou na úkor syntézy nových proteinů (Panzenböck a Crailsheim, 1997; Amdam a Omholt, 2002; Roberts a Elekonich, 2005; Toth a Robinson, 2005; Seehuus et al., 2013). Létavky jsou schopny učinit 3-10 výletů za potravou denně ve vzdálenosti několik kilometrů od úlu, s tím, že hyne zhruba po 10 dnech od svého přechodu z mladušky (Abou-Shaara, 2014). To je částečně zapříčiněno intenzivní svalovou prací létacích svalů, které

generují obrovské množství kyslíkových radikálů poškozující organismus, a které nejsou eliminovány antioxidační mechanismy (Margotta et al., 2018). Nicméně, regulace délky života létavky je sofistikovaná a do značné míry ovlivněná nastavením dané kolonie, feromonální komunikací a v první řadě hormonálním řízením (Huang a Robinson, 1996; Sullivan et al., 2000; Amdam et al., 2004; Pankiw et al., 2004; Eyer et al., 2017).

Během zimních měsíců aktivita v úlu klesá. Sice se značně prodlužuje délka života včelích dělnic řádově z pár týdnů na několik měsíců, avšak celkový počet jedinců uvnitř úlu se redukuje, a to zhruba až o 30 %. Ani plod, ani trubci se totiž v úlu nevyskytují (Döke et al., 2015). Hlavním úkolem včelích dělnic v průběhu zimy je udržení optimální teploty v úlu pomocí vibrování jejich létacích svalů. Naproti tomu úkolem královny je vhodně načasovat kladení nového plodu pro nadcházející jaro, tak aby nedošlo k předčasnému vyčerpání zásob v úlu plodem ještě před rozkvetem, ale zároveň byla zachována kontinuita včelstva a byly úspěšně opylovány první jarní květy. Na toto načasování má pravděpodobně vliv zejména rostoucí venkovní teplota s nastupujícím jarem, částečně také vnitřní hodiny královny. Ta jako jediná v úlu, vzhledem k délce svého života, vykazuje cirkaanuální rytmus (Nürnberger et al., 2018). Péče o tento plod pro novou sezónu je pak zajištěna zimními včelami, po jeho přeměně v dospělce vykonávají zimní včely funkci létavek a roční kruh života v úlu se uzavírá.

1.2.1 Faktory ovlivňující rychlost stárnutí včel

Vyjma již výše zmíněné kastovní diferenciace, ovlivňuje rychlost stárnutí dělnic sociální kontext dané kolonie. Ten spočívá v momentálním stavu včelstva a jeho potřebách, jmenovitě množství plodu, snůšky a přítomnosti královny. Za běžných podmínek je jediným úkolem královny kladení vajíček, zatímco včelí dělnice musí plnit celou řadu jiných rozličných povinností. Dělnice vykazují věkový polyetismus, jinými slovy rozdělení specifických činností na základě stáří doprovázené změnami na nejen behaviorální, ale i fyziologické úrovni (Obr. 1). Během prvního týdne svého života včelí dělnice čistí a zavíčkují buňky plástů, během dalšího týdne krmí plod a starají se o královnu, třetí týden zajišťují stavbu plástů či skladování zásob a zhruba od čtvrtého týdne vylétávají jako létavky ven z úlu pro potravu (Seeley, 1982; Elekonich a Roberts, 2005; Johnson, 2010). Nicméně toto schéma dělby práce není striktně dané a uvedené věkové rozmezí pro dané činnosti je spíše orientační. Dělnice totiž vykonávají přednostně činnosti, které jsou v danou chvíli pro včelstvo kritické, na příklad nedostatek zásob pylu a medu v úlu iniciuje dřívější přechod mladých včel v létavky (Schulz et al., 1998). A tak v závislosti na aktuálních potřebách včelstva může toto schéma, a tím i rychlost stárnutí dělnic, nabrat rychlejší či pomalejší spád nebo dokonce i zpětný chod (Huang a Robinson, 1996).



Obr. 1: Věkový polyetismus u včelích dělnic, zjednodušeno dle Elekonich a Roberts, 2005.

Se sociálním kontextem kolonie souvisí feromonová signalizace uvnitř úlu. Dvěma hlavními zástupci mající vliv na rychlost stárnutí dělnic jsou feromon matky a feromon plodu. Feromon matky produkovaný mandibulárními žlázami primárně inhibuje vývoj vaječnicků u včelích dělnic, tudíž jejich reprodukční schopnost (Hoover et al., 2003). Zároveň ale brzdí přechod mladušky v létavku pravděpodobně pro zajištění dostatečně velké družiny mladušek pečujících právě o královnu (Keeling et al., 2003). Navíc platí, že s jejím přibývajícím věkem, případně při nemoci, u královny klesá míra produkce tohoto feromonu. Klesne-li jeho množství pod určitou úroveň, vychovají dělnice královnu novou, toto se obvykle děje jedenkrát za tři roky (Bortolotti et al., 2014). Mandibulární feromon královny má na stárnutí dělnic tlumící efekt. Včelí plod se spolu se včelí královnou vyskytuje v centru úlu, proto jsou pod působením mandibulárního feromonu královny zejména mladé včely zprostředkující čištění a zavíčkování buněk s vajíčky dohromady s ošetřovatelkami a kojičkami. S dalšími nově rodícími se včelami jsou ale tyto včely postupně vytlačovány směrem k periferiím úlu a dostávají se z dosahu působení mandibulárního feromonu, což má za příčinu přeměnu v létavku (Pankiw, 2004; Alaux et al., 2010). Feromon včelího plodu, jehož složení se mění se stářím plodu, informuje krmičky a létavky o aktuálních vyživovacích potřebách plodu. Jak již bylo řečeno, mandibulární feromon královny, tak feromon včelího plodu ovlivňují rychlost stárnutí dělnic. Není-li přítomen v úlu žádný plod, což simuluje podmínky v zimě, kdy královna neklade nová vajíčka, dochází ke zpomalení stárnutí dělnic (Le Conte et al., 1994; Amdam et al., 2009). Stejně je tomu při relativně velkých koncentracích feromonu plodu, kdy je potřeba více

ošetřovatelek a krmiček pro vyvíjející se plod. Naopak při relativně vysokých dávkách feromonu nastává urychlení stárnutí dělnic. Výsledný efekt feromonu plodu a mandibulárního feromonu se odvíjí od měnícího se koncentračního gradientu napříč úlem.

Do konceptu feromonálního působení na rychlost stárnutí dělnic zasahuje střídání ročních období (Fukuda a Sekiguchi, 1959; Koubová et al., 2021). V mírném podnebném pásmu lze pozorovat během roku dvě odlišné generace včelích dělnic. První z nich je krátkověká letní generace, líhnoucí se na přelomu pozdní zimy a brzkého jara, vykazující věkový polyetismus, s průměrnou délkou života pouhé čtyři až šest týdnů. Druhou z nich je zimní generace, objevující se s nastupující zimní sezónou, obvykle na konci léta, jejíž délka života činí šest až osm měsíců (Free a Spencer-Booth, 1959). Tato dlouhověká generace má zaručit přežití včelstva do další sezóny a pracovní činnosti jsou zde rovnoměrně rozdělené mezi každou dělnici bez ohledu na její věk. Drtivá většina včel se během zimy podílí za pomoci vibrace létacích svalů na udržení konstantní teploty v úlu, která se pohybuje v rozmezí od 20 °C do 35 °C. Efektivita zachování optimální teploty je podpořena utvořením pevného chomáče, přičemž platí, že včely uvnitř chomáče vykonávají nejintenzivnější svalovou práci, směrem k povrchu chomáče intenzita zároveň spolu s teplotou klesá (Stabentheiner et al., 2003). Včely se s dlouhověkým fenotypem nerodí, jedná se spíše o pozvolnou adaptaci na přicházející nepříznivé vnější podmínky a nepřítomnost nového plodu, který by tuto původní generaci nahradil. Jak se dny zkracují, intenzita dopadajícího světla ubývá a teplota klesá, přirozené zdroje potravy ubývají. Četnost letů pro potravu je proto náležitě snížena až zcela omezena při poklesu venkovní teploty zhruba na 10 °C. Rozhodujícím faktorem pro přežití kolonie je tedy dostatečné množství zásob medu a pylu uvnitř úlu vytvořené během jarních a letních měsíců (Mattila a Otis, 2007; Abou-Shaara et al., 2017; Norrström et al., 2021). Podobně jako u přeměny mladušek do stádia létavek je tento přechod doprovázen změnou několika známých markerů rozebraných níže (Fluri et al., 1982; Döke et al., 2015; Hopkins et al., 2021).

1.3 Změny doprovázející přechod mezi fenotypy

V průběhu celé sezóny se ve včelstvu objevují celkem 3 hlavní fenotypy dělnic s odlišným fyziologickým nastavením, těmi jsou mladušky, létavky a dlouhověké zimní včely. Na první pohled jsou mladušky odlišitelné od létavek díky světlejší kutikule. Navíc první dny života mladušky ještě neumějí létat a vyskytují se převážně na rámcích s plodem ve středu úlu v blízkosti královny. Oproti nim jsou létavky drobnější, jejich kutikula je tmavší a na nohách mívají často rousky s pylem. Jsou-li přítomny zrovna v úlu, vyskytují se spíše na okrajových

rámčích se zásobami. V porovnání s oběma fenotypy jsou pak zimní včely největší. Detailnější srovnání mladušek k létavkám, z pohledu anatomicko-morfologického, molekulárního a biochemického je rozebráno dále v textu.

1.3.1 Vitelogenin a juvenilní hormon

Stárnutí včel podléhá kontrole vitelogeninu a juvenilního hormonu (Huang et al., 1991; Guidugli et al., 2005; Eyer et al., 2017).

Vitelogenin je glykolipoprotein ovlivňující u včel řadu parametrů. Ačkoliv se jedná o prekurzor žloutkového proteinu podílejícího se obecně na oogenezi živočichů (a ve stejném smyslu funguje i u včelí královny), je u včel produkován i sterilními včelími dělnicemi jejich tukovým tělesem. Vitelogenin u dělnic ovlivňuje přeměnu mladušek v létavky, nebo také odolnost vůči oxidativnímu stresu a imunitu (Seehuus et al., 2006). Funguje totiž rovněž jako přenašeč iontů zinku a jeho hladina pozitivně koreluje s počtem hemocytů, tedy buňkami imunitního systému hmyzu (Amdam et al., 2004, Aurori et al., 2014). Je také schopen rozpoznávat antigenní struktury patogenu (PAMPs) a vázat se na ně (Li et al., 2009). Celkově tedy přispívá k lepší imunitní odezvě na patogen. Navíc rozeznává poškozené hostitelské buňky, váže se na ně a chrání je před kyslíkovými radikály (Havukainen et al., 2013). U včelích královen dosahuje vitelogenin vysokých hladin po celý její život. Vysoké hladiny jsou taktéž u mladušek a i zimních včel s vrcholem během prosince a ledna. U létavek je jeho hladina nedetekovatelná už 4 dny po přechodu ze stádia mladušky. V souladu s těmito pozorováními bývá vitelogenin rovněž nazýván protein mladosti (Amdam a Omholt, 2002; Amdam et al., 2004; Seehuus et al., 2006; Harwood et al., 2017). Vitelogenin je rovněž přítomen ve včelím jedu, kde dosahuje svého maxima během října. To naznačuje, že vitelogenin u včelích dělnic nesouvisí jen s regulací polyetismu, ale patrně plní mnohem více rozličných funkcí (Nelson et al., 2007; Park et al., 2018; Kodrík et al., 2022).

Opačný trend vykazuje juvenilní hormon, jehož působení na včelí dělnice je převážně gerontogenní. Na rozdíl od vitelogeninu totiž potlačuje imunitní reakce či odolnost proti oxidativnímu stresu, ovlivňuje rychlost přechodu mladušky v létavku a podílí se na determinaci kasty během larválního vývoje (Sullivan et al., 2000). Na druhou stranu vysoká hladina juvenilního hormonu v larválním stádiu je klíčovým předurčujícím faktorem pro vývoj v královskou kasty (Rachinsky et al., 1990). Hormon je syntetizován párovými žlázami *corpora allata* v mozku a jeho primární úlohou obecně u hmyzu je řízení přeměny larvy v dospělce. Avšak na rozdíl od ostatních zástupců hmyzu jeho hladina roste s přibývajícím věkem včely,

nejvyšších hladin tak dosahuje u létavek. Vzhledem k tomu, že má juvenilní hormon pozitivní vliv na kognitivní schopnosti jedince, je tento nárůst u létavek pohybujících se ve venkovním neznámém prostředí logický. Stejně tak jsou jeho hladiny vyšší u nově vylíhlých královen, které musejí podstoupit snubní lety, poté je u nich ale celoživotně hladina juvenilního hormonu nízká (Corona et al., 2007; Hartfelder a Emlen, 2012; Bomtorin et al., 2014). Zimní dlouhověká generace dělnic vykazuje hladinu tohoto hormonu nízkou, která je pod inhibičním působením vysokých hladin vitelogeninu. Výjimkou je období na konci zimy, kdy se objevuje v úlu nový plod, v tu dobu koncentrace juvenilního hormonu u zimních včel stoupá a dosahuje obdobných hladin jako u létavek (Fluri et al., 1982).

Tyto dvě látky jsou součástí negativní zpětné smyčky, kdy přítomnost jednoho potlačuje syntézu toho druhého (Pinto et al., 2000).

1.3.2 Tukové těleso

Příkladem rozdílu na anatomicko-morfologické úrovni včelích dělnic je tukové těleso. Tukové těleso je bělavá tenká vrstva buněk umístěná v abdomenu pod kutikulou, místy prostoupená pojivovou tkání a větvemi trachey, a která je přímo omývána hemolymfou. Obecně tukové těleso sestává z několika typů buněk, avšak dominantní zastoupení mají trofocyty a oenocyty (Hilde et al., 1985).

Trofocyty jsou mezodermálního původu, nepravidelného tvaru s nepravidelným jádrem obklopeným prstencem organel. Hojně zastoupené je hrubé endoplazmatické retikulum přímo nasedající na jádro, dále se zde nachází Golgiho aparát, zakulacené či až protáhlé mitochondrie, lysosomy, peroxisomy a četná multivesikulární tělíska. Primárně buňka slouží jako sklad tuků, sacharidů a proteinů vstřebaných z hemolymfy. Zastoupení skladovaných živin v tukovém tělese včely se liší dle kasty, sociálního statusu včely a sezóny (Paes-de-Oliveira et al., 2008; Roma et al., 2010; Koubová et al., 2021). Tuky jsou skladovány ve větších vakuolách nebo drobných kapénkách, nejčastěji ve formě triglyceridů. Proteiny se jeví jako drobná tmavá granula různých tvarů. Sacharidy ve formě depozit zásobního glykogenu jsou pak volně v cytoplazmě, z něj jsou v případě potřeby odštěpovány molekuly glukózy, které jsou zde transformovány na trehalózu. Tento disacharid je pak uvolňován do hemolymfy jako hlavní zdroj energie (Blatt a Roces, 2001; Skowronek et al., 2021).

Druhým typem buněk je o něco menší, pravidelně kulatý oenocyt s centrálně umístěným jádrem ektodermálního původu. Jeho nápadným rysem, pokud jde o ultrastrukturu, je dobře vyvinuté hladké endoplazmatické retikulum, což naznačuje jeho významný podíl na zpracování

lipidů a lipoproteinů. Dále se podílí na produkci včelího vosku a antimikrobiálních peptidů, nebo také na detoxikačních procesech. Mimo řady dalších podstatných funkcí je tukové těleso i hlavním místem syntézy hormonů a jiných důležitých působků a zejména pak vitelogeninu, který je odsud uvolňován do hemolymfy (Paes-de-Oliveira et al., 2008; Arrese a Soulages, 2010; Ilyasov et al., 2012; Azeez et al., 2014).

Rozmístění buněk tukového tělesa v rámci abdomenu není náhodné. Platí, že u královny na sebe buňky těsně nasedají, naproti tomu u dělnic lze pozorovat četné mezibuněčné prostory. To se jeví jako důsledek přizpůsobení se k intenzivní látkové výměně mezi hemolymfou a tukovým tělesem vlivem zrychleného metabolismu u krátkověkých dělnic oproti dlouhověké královně. Co se týče jejich počtu, zatímco u včelích dělnic jsou v dospělosti oba typy buněk tukového tělesa celkově zastoupené zhruba ve stejném poměru. U včelí královny je situace odlišná, oenocyty jsou zastoupené hojněji (Roma et al., 2010). Její trofocyty zároveň dosahují vůbec největších velikostí z celé říše hmyzu a v nich uložené zásoby živin nabývají v porovnání s dělnicemi nejvyšších koncentrací, navíc jsou místem syntézy vitelogeninu podporující její plodnost. V rámci abdomenu se největší trofocyty vyskytují zejména v blízkosti ostie, jakožto centra cirkulačního systému umožňující rychlou distribuci z nich uvolněných látek do celého těla (Strachecka et al., 2021).

Přímý kontakt tukového tělesa s hemolymfou tak zaručuje přímý vliv látek v ní obsažených. Co se týče sociálního statusu včelí dělnice a jejich porovnání, zřejmě největší dopad na tukové těleso má juvenilní hormon. Největšího objemu dosahují buňky tukového tělesa ve fázi mladušky, zhruba druhý až třetí týden po vylíhnutí. Poté jejich objem klesá, což se spojuje s přechodem do stádia létavky, nárůstem titru juvenilního hormonu a vysokou potřebou energie pro let uloženou právě v buňkách tukového tělesa (Paes-de-Oliveira et al., 2008).

V tukovém tělese byly pozorovány také sezónní odlišnosti, kdy s nastupujícím zimním obdobím dochází k nárůstu celkové hmotnosti tukového tělesa. To souvisí s hypertrofií tukových buněk způsobenou větším množstvím některých skladovaných živin v tukovém tělese během zimních měsíců, konkrétně cukrů a proteinů. Současně také vlivem endoreduplikace jejich genomové DNA, narůstá ploidie buněk, která je doprovázená vyšší aktivitou telomerázy v porovnání s letními včelami. Polyploidie pravděpodobně značí snahu o maximální efektivitu metabolických pochodů v tukovém tělese, která je během zimních měsíců zásadní (Koubová et al., 2021).

Jelikož se tedy jedná o ústředí většiny metabolických dějů mající vliv na fungování celého organismu, je role tukového tělesa zásadní pro přežití organismu za nepříznivých podmínek a rovněž poskytuje velkou výpovědní hodnotu o stavu celého organismu (Haunerland a Shirk, 1995; Azeez et al., 2014).

1.3.3 Hypofaryngeální žlázy

Dalším známým příkladem změn mezi fenotypy jsou hypofaryngeální žlázy. Ty využívají mladušky k zajištění potravy pro včelí plod. Jedná se o párový orgán umístěný po stranách hlavy, který umožňuje mladuškám natrávit pyl díky přítomným enzymům a poté vzniklou kašičkou krmit včelí larvičky a královnu (Snodgrass a Morse, 1956). Létavky mají za běžných podmínek tento orgán zakrnělý, jelikož nejsou vystaveny působení feromonu plodu. Pod jeho působením dochází totiž ke stimulaci hypofaryngeálních žláz a konzumaci většího množství pylu jakožto zdroje bohatého na proteiny, což má za příčinu nejen lepší nutriční status mladušky oproti létavce, ale i dostatek stavebních kamenů pro syntézu vitelogeninu (Le Conte et al., 1995; Döke et al., 2015). U zimních včel jsou hypofaryngeální žlázy zprvu zachovány, ovšem pravděpodobně z jiného důvodu než u mladušek, uplatňují se u nich totiž převážně jako sklad proteinů. Nicméně po nakrmení nově nakladeného plodu pro nastávající sezónu, zhruba od února dále, tyto žlázy degenerují a jejich hmotnost je srovnatelná s tou u létavek (Fluri et al., 1982).

1.3.4 Telomeráza

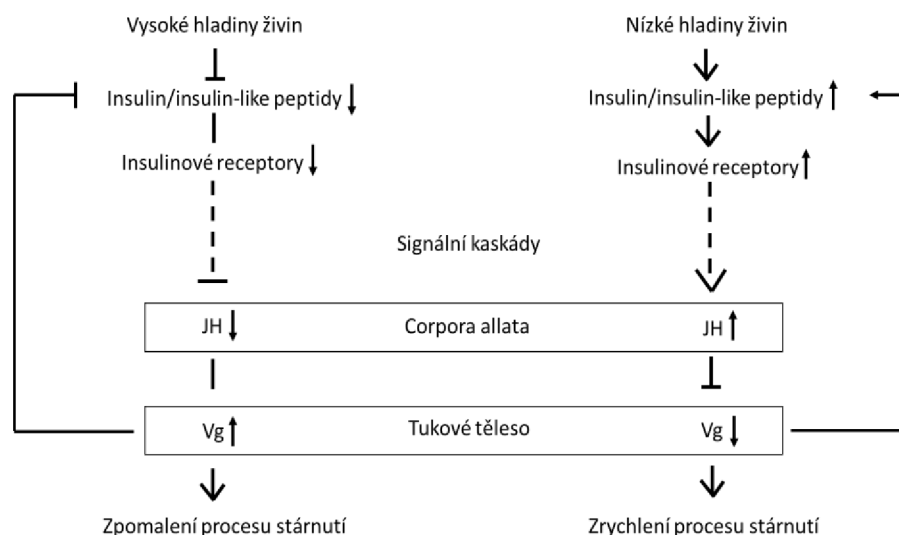
Mezi zástupce změn na molekulárně biologické úrovni mezi jednotlivými včelími kastami patří také rozdílná aktivita telomerázy. Aktivita telomerázy a tím délka telomer je obecně limitujícím faktorem pro životnost buňky, protože při zkrácení telomerické délky na určitý limit se buňka přestává dělit, případně podstupuje apoptózu. Aktivita telomerázy je tak těsně spjata s regeneračním potenciálem organismu (Hayflick, 1965; Bernadotte et al., 2016).

U včel byla vysoká aktivita telomerázy zjištěna právě u královny, což by mohlo být v souladu právě s její dlouhověkostí. U dělnic byla zvýšená aktivita telomerázy pozorována pouze v buňkách tukového tělesa zimních dělnic, kde však vyšší aktivita telomerázy pravděpodobně koreluje s vyšší úrovní endoreplikace (Koubová et al., 2021).

1.3.5 Signální dráhy související s dlouhověkostí

Předpokládá se, že významnou roli v rychlosti stárnutí včel mají také některé buněčné signální dráhy související s hladinou živin. Jedná se především o insulinovou dráhu, zkrácené

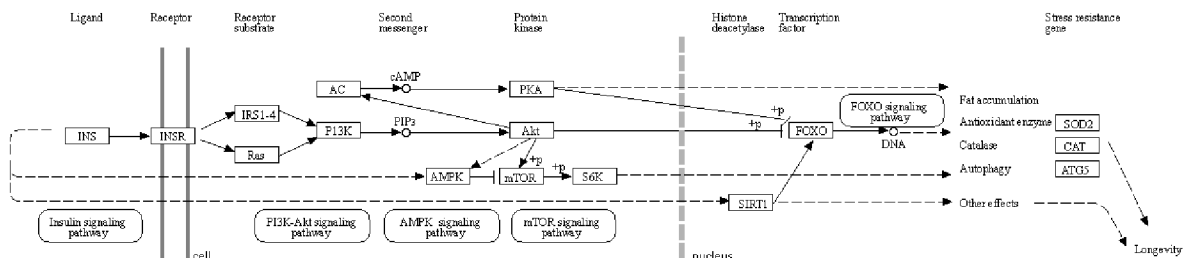
IIS (insulin/ insulin-like signalling). Tato dráha je evolučně velmi zakonzervovaná, její aktivita se odvíjí primárně od nutričního stavu organismu a reguluje rychlost jeho růstu a velikost nebo také plodnost. Role ve stárnutí je navíc zdůrazněna díky její úzké souvislosti s hladinami juvenilního hormonu, potažmo i vitelogeninu, což je shrnuto na Obr. 2 (Corona et al., 2007; Partridge et al., 2011).



Obr. 2: Schéma efektu IIS na stárnutí včely zahrnující vitelogenin a juvenilní hormon, převzato a zjednodušeno z publikace Corona et al., 2007. Dobrý nutriční status (dráha vlevo) vykazují včeli královny, mladušky a zimní včely, což má za následek zpomalení stárnutí v různé míře prostřednictvím snížené aktivity dráhy IIS, nízké hladiny JH (juvenilního hormonu) a vysoké hladiny Vg (vitelogeninu) zpětnovazebně inhibující IIS. Naproti tomu létavky vykazují nízké celkové hladiny živin a jejich nutriční status je v porovnání s první zmíněnou skupinou horší. Aktivní IIS stimuluje prostřednictvím dalších účastníků se signálních kaskád (podrobněji dále) sekreci JH. Vysoké hladiny JH inhibují syntézu Vg, což má za následek jeho nízké hladiny zpětnovazebně stimulující IIS.

Naváže-li se insulin (INS) na insulinový receptor (INSR), spouští se signální kaskáda uvnitř buňky zahrnující aktivaci fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K) pomocí substrátů INSR (IRS1-4 a Ras). PI3K fosforyluje a tedy aktivuje proteinovou kinázu B (Akt), která je poté schopna fosforylovat čili naopak deaktivovat rodinu transkripčních faktorů FOXO (forkhead box). Pokud jde o dlouhověkost, aktivita FOXO je žádoucí, tyto proteiny totiž regulují transkripci genů souvisejících s antioxidantními mechanismy (enzym superoxid dismutáza, SOD; kataláza, CAT), opravou poškozené DNA nebo třeba autofagií (ATG5). Autofagie je katabolický proces, při němž jsou za účasti lysosomů degradovány intracelulární komponenty pro účel zachování rovnováhy vnitřního prostředí buňky. Jedná se většinou o komponenty poškozené nebo již nepotřebné. Dále fosforylovaná Akt může rovněž nepřímo aktivovat

serin/threoninovou kinázu TOR (target of rapamycin), která se spolu s IIS ve výsledku podílí zejména na míře produkce juvenilního hormonu, pak také na regulaci autofágie či syntézy nových proteinů prostřednictvím S6 kinázy (S6k). Avšak zatímco aktivita IIS odráží především množství glukózy v organismu, aktivita TOR dráhy je přímo úměrná na množství aminokyselin v organismu. Platí, že nadměrná stimulace IIS a TOR dráhy v dospělosti je příčinou rychlejšího procesu stárnutí. 5' AMP-aktivovaná proteinová kináza (AMPK) je naopak schopna inhibovat aktivitu TOR, a to v případě poklesu hladiny adenosintrifosfátu (ATP) pod určitou mez (resp. nárůstu adenosinmonofosfátu, AMP), čímž se podílí na zpomalení procesu stárnutí (Apfeld et al., 2004; Reznick et al., 2007; Salminen a Kaarniranta, 2012; Hansen et al., 2018; Korb et al., 2021). Stejně tak se na tomto procesu podílí rodina histonových deacetyláz zvaná sirtuiny (silent information regulator, SIRT), která zajišťuje stabilitu genomu a jejíž aktivita se odvíjí od hladin NAD⁺ (Rascón et al., 2012). Vyšší hladiny AMP a NAD⁺ následované nejspíše i vyšší aktivitou AMPK a sirtuinů u zimních včel v porovnání s letními by pravděpodobně mohly částečně vysvětlovat jejich dlouhověký fenotyp (Lee et al., 2022). Celá kaskáda a její zmíněné komponenty jsou schématicky znázorněny na Obr. 3 níže.



Obr. 3: Signální dráhy související s dlouhověkostí zahrnující IIS, PI3K-Akt, AMPK a TOR. Snížená aktivita ISS, PI3K-Akt a TOR má za následek aktivaci transkripčních faktorů rodiny FOXO, které se podílejí na expresi genů zahrnutých v ochraně proti oxidačnímu stresu, odpovědi na poškození DNA, autofágii a jiné. Naopak zvýšená aktivita AMPK inhibuje mTOR. Převzato a upraveno dle KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

Významnost těchto drah potvrzuje fakt, že je kasta determinována během larválního vývoje včely na základě množství podávané výživy. Příkladem jsou zvýšené exprese některých proteinů, které jsou součástí IIS u larev dobře živěné královny oproti larvám dělnic (Wheeler et al., 2006). V dospělosti na druhou stranu vykazují starší královny nižší exprese těchto proteinů oproti létavkám. Mimo kastovní diferenciace se obě zmíněné dráhy dále podílí na fenotypu včelích dělnic. Vyšší exprese genů IIS je pozorována u létavek v porovnání

s bohatě živenými mladuškami. Současně umělé podání insulinu způsobí dřívější přechod mladušky v létavku. Naopak inhibice dráhy TOR má za efekt pozdější přechod (Ament et al., 2008; Mott a Breed, 2012). Relativně vyšší naměřené hladiny zásob živin v tukovém tělese u zimních dělnic v porovnání s letními jsou předpokladem pro nižší aktivitu IIS právě u dlouhověkých zimních včel po vzoru mladušek (Koubová et al., 2021).

2 Cíl práce

Cílem práce bylo sledovat změny tukového tělesa v průběhu roku, a to pomocí několika vybraných parametrů, jako jsou cytologické a nutriční změny a změny na úrovni transkripce.

3 Metody

3.1 Sběr vzorků

Odběr vzorků byl započat v březnu roku 2021 a finální odběr byl proveden v únoru 2022 z úlů Entomologického ústavu Biologického centra v Českých Budějovicích (48°58'31.924"N, 14°26'44.671"E; 390 m). Na začátku každého měsíce bylo náhodně odebráno vždy z téhož úlu přibližně 40 včelích dělnic a v období od dubna do září i zhruba 40 mladušek. Během měsíců listopadu, prosince a ledna bylo navíc zohledněno místo odběru včel, a sice včely z periferií úlu a včely z jádra zimního chomáče, a to pouze pro stanovení hmotnosti tukových těles a hladiny živin. Část z odebraných včel pak byla vždy ihned zpracována na histologické preparáty za současného odběru hemolymfy a druhá část byla zamražena a zpracována později dle následující příslušné metody.

3.2 Preparáty tukového tělesa včel pro světelnou a fluorescenční mikroskopii

Na každý preparát tukového tělesa bylo vypitváno v Ringerově roztoku (viz Příloha) tukové těleso z 3-4 uspaných jedinců. Získaná tkáň byla ihned uložena do fixačního roztoku 10 % formalinu a za stálého třepání fixována v barvicí misce přes noc při pokojové teplotě. Následující kroky se liší dle použitého typu barvení, nicméně závěrečný krok montování tkáně na podložní sklíčko byl opět shodný. Na montovací médium bylo použito 1x PBS (viz Příloha) a glycerol (Sigma) v poměru 4:6. Tkáň byla rozvrstvena za pomoci pinzety a tenké wolframové jehly a překryta krycím sklíčkem, které bylo připevněno lakem. Hotový preparát byl pozorován pod světelným mikroskopem (Motic BA 310 LED Digital) se zabudovanou kamerou a v případě preparátů barvených akridinovou oranží byl využíván fluorescenční mikroskop (Zeiss Axioplan 2 microscope), na kterém byly snímky pořízeny CCD kamerou (F-view, Soft Imaging System GmbH, Münster, Germany) v černo-bílém rozlišení a následně obarveny a spojeny v programu Adobe Photoshop CS4. Při pozorování preparátů tukového tělesa pod mikroskopy byly rovněž zaznamenávány rozměry buněk a jejich jader, naměřené hodnoty byly poté statisticky vyhodnoceny (viz dále).

3.2.1 Oil Red O

K obarvení triglyceridů a neutrálních lipidů bylo využito barviva Oil Red O (Ramírez-Zacarias et al., 1992). Po fixaci byl roztok formalinu odsán a nahrazen 60 % roztokem isopropanolu, ve kterém byla tuková tkáň ponechána po dobu 5 minut. Dále byl tento roztok opět odsán a nahrazen čerstvě přefiltrovaným pracovním roztokem barviva Oil Red O, který byl namíchán v poměru 3 díly zásobního roztoku Oil Red O ku 2 dílům destilované vody.

Zásobní roztok sestává z 0,5 g Sudan IV (Roth) v 50 ml 100 % isopropanolu. Tkáň se za stálého třepání barvila 20 minut. Po uplynutí časového limitu bylo barvivo odsáto a tkáň 3x promyta destilovanou vodou, poté byl do barvicí misky nanesen Hematoxylin (Roth) pro obarvení jader, který působil po dobu 5 minut a následovně byla tkáň znovu 3x promyta destilovanou vodou od přebytečného barviva. Finálním krokem bylo půlminutové promytí tukového tělesa v roztoku kyselého ethanolu (1 ml 35 % HCl/ 100 ml 70 % EtOH), ten byl pak zcela odsán a nahrazen destilovanou vodou, odkud byla nakonec tkáň přenesena na podložní sklíčko s montovacím médiem.

3.2.2 Sudan Black B

Pro vizualizaci nejen neutrálních, ale i polárních lipidů a také lipofuscinu, jakožto pigmentu hromadícího se v senescentních buňkách, bylo využito barviva Sudan Black B, zkráceně SBB (Evangelou a Gorgoulis, 2017). Po fixaci byla tkáň nejprve propláchnuta destilovanou vodou, následně k ní byl nanesen přefiltrovaný roztok SBB (0,7 g SBB/ 100 ml 70 % ethanolu; Penta chemicals) a hned vzápětí odstraněn. Tkáň byla znovu propláchnuta destilovanou vodou a poté byla odbarvována od přebytečného barviva za stálého míchání v roztoku 50 % ethanolu po dobu 40 minut. Následujícím krokem bylo nanesení Nuclear Fast Red (Roth) pro obarvení jader s půlhodinovým působením a závěrem byla tkáň naposledy propláchnuta destilovanou vodou a montována na sklíčko.

3.2.3 Akridinová oranž

Dalším použitým barvivem byla akridinová oranž (AO). Tohoto fluorescenčního barviva lze využít mimo jiné k detekci lysosomů. Vlivem jejich nízkého pH vytvářeného činností protonové pumpy dochází k nadměrné akumulaci AO uvnitř těchto organel. Důsledkem vysokých koncentrací je pak tvorba dimerů molekul AO a ty, na rozdíl od monomerů emitující zelené světlo, emitují oranžové či červené záření (Zelenin, 1999). Nejprve byla fixovaná tkáň dostatečně propláchnuta destilovanou vodou od zbytků fixáže a poté k ní byl nanesen čerstvý pracovní roztok akridinové oranže, který obsahoval zásobní roztok akridinové oranže s koncentrovanou kyselinou octovou a destilovanou vodou v poměru 1:0,5:50. Zásobní roztok se skládá z 50 mg akridinové oranže (Roth) rozpuštěné v 10 ml destilované vody, ten lze uchovávat v mrazáku. Barvení roztokem akridinové oranže trvalo 2 minuty, pak byl odsán a tkáň byla promyta destilovanou vodou a montována na sklíčko. Při pozorování preparátu pod fluorescenčním mikroskopem bylo nejprve využito excitace světlem o vlnové délce

502 nm a následné emise při 525 nm (zelená emise), poté excitace světlem o vlnové délce 460 nm a emise při 650 nm (červená emise).

3.3 Preparáty tukového tělesa včel pro transmisní elektronovou mikroskopii (TEM)

Pro podrobnější pohled na ultrastrukturu buněk tukového tělesa byly připraveny preparáty pro TEM. Nejprve byla v Ringerově roztoku vypitvána tuková tělesa vždy z 2 až 3 uspaných včel (červnové mladušky a létavky, lednové zimní včely). Získaná tkáň byla ihned uložena do fixačního roztoku 2,5 % glutaraldehydu v 0,2 M PBS (viz Příloha) a fixována minimálně 48 hodin při 4 °C. Pro snazší následovnou manipulaci byly tkáně po fixaci zalaty 2 % agaru. Po zatuhnutí byl ke tkáním přidán vypírací roztok (0,1 M fosfátový pufr s 4 % glukózou, pH 7,4), tak aby byly zcela ponořené a po dobu 3 x 15 minut byly třepány na třepáče. Na konci byl vypírací roztok odsán a nahrazen postfixačním 4 % roztokem OsO₄ v 0,1 M fosfátovém pufru, tkáň v něm byla ponechána 2 hodiny. Následovalo opětovné trojnásobné promytí tkáně ve vypíracím roztoku vždy po dobu 15 minut. Pak byly vzorky odvodněny vzestupnou acetonovou řadou (30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % a 100 % aceton), přičemž v každém roztoku byly třepány také 15 minut.

Poté přišlo na řadu postupné prosycování vzorků epoxidovou pryskyřicí (EPON, tvrdost medium, viz Příloha). Nejprve byl vzorek na 1 hodinu umístěn do směsi pryskyřice a acetonu v poměru 2:1, pak v poměru 1:1, 2:1 a na konec do čisté pryskyřice na celých 24 hodin, navíc pro její lepší pronikání do tkání byl závěrečný krok prováděn v exsikátoru. Následující den byly tkáně umístěné do silikonových formiček, zalaty čistou epoxidovou pryskyřicí a vloženy na 48 hodin do termostatu pro zatuhnutí.

Po zatuhnutí byly bločky vyjmuty ze silikonové formy a připraveny trimováním (pro zmenšení plochy řezu) ostrou žiletkou ke krájení. Potřebné ultratenké řezy byly zhotoveny na ultramikrotomu (Leica EM UC6) s diamantovými noži (Diatome Ltd., Nidau, Švýcarsko). Řezy byly za pomoci řasy umístěné na měděné podložní síťky (průměr 3,05 mm; Electron Microscopy Sciences) a druhý den kontrastovány.

Pro kontrastování bylo nejprve využito uranyl acetátu (0,3 M v 50 % metanolu, viz Příloha), který byl v jednotlivých kapkách nanesen stříkačkou na parafilm umístěný v uzavíratelné neprůhledné krabičce a do těchto kapek byly pak pinzetou nakladeny řezy na síťkách tkání dolů. Pomocí buničiny namočené v ethanolu byla vytvořena v krabičce ethanolová atmosféra a řezy v ní byly ponechané ve tmě po dobu 30 minut. Po uplynutí intervalu byly síťky za užití pinzety razantně propláchnuty v Petriho miskách s 30 % ethanolem

a usušeny na filtračním papíře. Následně byly do skleněných Petriho misek s parafilmem naneseny kapky 1 mM lead citrátu (viz Příloha) o objemu 20 μ l, do kterých byly nakladeny síťky s řezy opět tkání dolů. Navíc byla v misce vytvořena atmosféra se sníženým obsahem CO₂ s využitím několika granulí NaOH zalitých trochou vody. Tkáně byly ponechané působení lead citrátu ve tmavém prostředí po dobu 20 minut. Po uplynutí intervalu byly síťky za užití pinzety propláchnuty v destilované vodě a volně usušeny na filtračním papíře.

Před samotným pozorováním na elektronovém mikroskopu byly preparáty pokryty tenkou vrstvou uhlíku pro jejich lepší odolnost proti působení elektronů s využitím napařovacího přístroje JEOL JEE 4C. Nakonec byly získané takto zpracované preparáty pozorovány pod transmisioním elektronovým mikroskopem JEOL JEM-1010 (JEOL, Tokio, Japonsko) a snímky byly pořízeny pomocí CCD kamery Sis MegaView III (EMSYS, Münster, Německo).

3.4 Měření množství a koncentrace živin v tukovém tělesu včel

Výchozí kroky pro měření cukrů, bílkovin, lipidů i glykogenu byly vždy totožné. Pro stanovení jak absolutního (μ g živin), tak relativního množství živin (μ g živin vztažený na mg tukového tělesa) u zimních včel byly použity vzorky odebrané v prosinci a lednu (rozlišené na core a periphery), u mladušek a létavek to byly vzorky z června a července. Vypitvaná tuková tkáň z každého jedince byla nejprve zvážena na analytických vahách (M124Ai, BEL Engineering). Získané údaje o hmotnosti byly poté rovněž porovnávány. Tuková tělesa byla následovně rozsonikována jehlovým sonikátorem (150 V/T ultrasonic homogenizer, BioLogics Inc.) ve 200 μ l 70 % ethanolu a centrifugována (Centrifuge 5424 R, Eppendorf) při 10 000 g na 5 minut při 4 °C. Supernatant byl přenesen do čisté zkumavky a vysušen ve vakuovém koncentrátoru (Concentrator 5301, Eppendorf) po dobu 2 hodin při 45 °C, nakonec byl uschován v mrazáku při -20 °C a stejně tak pelet. Konečné spektrofotometrické stanovení bylo provedeno na ELISA readeru (ELISA reader, Spectra Max 340 PC, Molecular Devices, USA).

3.4.1 Měření volných cukrů

Pro stanovení cukrů redukujících i neredukujících byl využit výchozí protokol dle Carol et al., 1956. Volné cukry se po zahřátí s použitou kyselinou sírovou hydrolyzují a hned poté dochází k dehydrataci za vzniku furfuralu, ten reaguje s anthronem za vzniku barevné sloučeniny (Carol et al., 1956; Laurentin a Edwards, 2003). Odparek z vysušeného supernatantu byl nejprve rozpuštěn v 320 μ l destilované vody, pro stanovení cukrů bylo následovně využito

pouze 40 µl vzorku, zbývající objem byl znovu zamražen a uchován pro případné opakování metody. Ke každému vzorku bylo posléze přidáno 230 µl čerstvě připraveného anthronového reagens (150 mg anthronu/100 ml 72 % kyseliny sírové), stejně tak k blanku, který místo vzorku obsahoval 40 µl čisté destilované vody, a ke vzorkům standardu, které ve 40 µl obsahovaly různé množství glukózy (Tab. I). Veškeré vzorky byly důkladně promíchány a inkubovány 8 minut při 100 °C. Finálním krokem bylo přenesení 200 µl takto zpracovaného vzorku do jamek mikrotitrační destičky (Gama) a výsledek měřen spolu se standardem na ELISA readeru při 620 nm.

Tab. I. Použitý standard glukózy pro stanovení cukrů.

Pořadí vzorku	Obsah glukózy (µg) ve 40 µl
1.	14,40
2.	7,20
3.	3,60
4.	1,80
5.	0,90
6.	0,45

3.4.2 Měření glykogenu

Výchozím protokolem byl postup uvedený v publikaci Ohtsu et al., 1992. Princip metody tkví v působení horkého louhu na testovanou tkáň a následném působení ethanolu, při kterém dochází k vysrážení glykogenu. Poté je vysrážený glykogen hydrolyzován roztokem Na₂SO₄ a stanoven jako redukující cukr za pomoci anthronového činidla (Seifter et al., 1950; Ohtsu et al., 1992). Ze supernatantu získaném při stanovování bílkovin popsaném výše bylo odebráno 20 µl vzorku, v případě blanku opět 20 µl destilované vody, a k němu přidáno 130 µl 30 % hydroxidem draselným, výsledný roztok zvortexován a 15 minut inkubován při 100 °C. Následovala centrifugace 15 minut na 14 000 g při 4 °C, 50 µl supernatantu bylo přeneseno do čisté zkumavky a smícháno s 25 µl síranu sodného za důkladného promíchání. Poté bylo přidáno 150 µl 95 % ethanolu, znovu dobře promícháno a vzorek byl ponechán na ledu po dobu 30 minut za občasného promíchání. Dalším krokem byla centrifugace při 4 000 g a 4 °C po dobu 20 minut, supernatant posléze odstraněn, sediment rozmíchán ve 100 µl 70 % ethanolu a následovala znovu centrifugace za stejných podmínek, poté byl supernatant odstraněn již zcela. Sediment byl rozpuštěn v 80 µl destilované vody a pro finální stanovení glykogenu bylo

z tohoto objemu odebráno 40 µl, stejně tak ze vzorků standardu (Tab. I), a k němu přidáno 230 µl čerstvě připraveného anthronového reagens (150 mg anthronu/100 ml 72 % kyseliny sírové) a promícháno. Vzorek byl nakonec inkubován 8 minut při 100 °C, pak ochlazen a 200 µl přepipetováno do jamek mikrotitrační destičky (Gama), výsledné hodnoty z ELISA readeru byly stanoveny při 620 nm.

3.4.3 Měření lipidů

Mechanismus reakce pro stanovení lipidů ze vzorku spočívá v reakci nenasycené mastné kyseliny s kyselinou sírovou za vzniku karbonylových iontů. Vanilín pak reaguje s kyselinou fosforečnou a dochází k tvorbě esterů kyseliny fosforečné. Tyto estery reagují s karbonylovými ionty za současného vzniku barevného komplexu (Zöllner a Kirch, 1962; Knight et al., 1972). Pro stanovení byl použit pelet získaný při stanovování bílkovin. Ten byl rozpuštěn ve 200 µl směsi chloroform/methanol v poměru 2:1 a rozsonikován jehlovým sonikátorem. Získaný homogenát byl centrifugován 5 minut při 10 000 g a 4 °C, supernatant přenesen do čisté zkumavky a vysušen ve vakuovém koncentrátoru, pelet vyhozen. K odparku vzorků a i ke vzorkům standardu obsahující kyselinu olejovou (Tab. II) bylo přidáno 100 µl koncentrované kyseliny sírové, vzorky byly důkladně zvortexovány a přeneseny do čistých skleněných zkumavek, blank tudíž obsahoval pouze 100 µl čisté kyseliny sírové. Dalším krokem bylo povaření obsahu zkumavek po dobu 10 minut při 100 °C, obsah byl poté ochlazen a do každé zkumavky byl přidán 1 ml vanilinového reagens (viz Příloha). Získaná směs byla prudce promíchána a poté odstáta na 30 minut. Finálním krokem bylo přenesení 200 µl vzorku do jamek mikrotitrační destičky (Gama) a výsledné hodnoty měřeny na ELISA readeru při 546 nm.

Tab. II: Použitý standard kyseliny olejové pro stanovení lipidů.

Pořadí vzorku	Obsah kyseliny olejové (µg) v odparku
1.	0,282
2.	0,565
3.	1,412
4.	2,825
5.	5,650
6.	14,125
7.	28,250
8.	56,500

3.4.4 Měření bílkovin

Výchozí metodou bylo stanovení pomocí bicinchoninové kyseliny (BCA) uvedené v publikaci Stoscheck, 1990. BCA totiž tvoří v alkalickém prostředí komplex s měďnými ionty za vzniku fialového zbarvení. Měďnaté ionty ve vzorku vázané s proteinem peptidickou vazbou se pak v alkalickém prostředí redukují právě na mědné. Sytost barevného produktu je přímo úměrná koncentraci proteinů (Stoschck, 1999). Pro stanovení byl použit pelet, ten byl zprvu rozsonikován jehlovým sonikátorem ve 200 μl 0,2 M Tris-HCl (pH 7,8) a homogenát centrifugován na 5 minut při 10 000 g a 4 °C. Po stočení byl oddělen supernatant od peletu, supernatant byl později využit pro stanovení právě bílkovin a také glykogenu, pelet pro měření lipidů. Z celkového objemu supernatantu bylo odebráno pouze 50 μl vzorku, v případě blanku bylo vzato 50 μl destilované vody a v případě standardu 50 μl roztoku BSA/Tris příslušného ředění (Tab. III), a smícháno s 1 ml reakční směsí roztoků A (BCA) a B ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) z komerčně dodávaného kitu (Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit; Sigma-Aldrich) v poměru 50:1. Takto smíchané vzorky byly inkubovány 30 minut při 60 °C a poté bylo 200 μl nanášeno do jamek mikrotitrační destičky (Gama) a měřeno na ELISA readeru při vlnové délce 562 nm.

Tab. III: Použitý standard BSA/Tris pro stanovení bílkovin.

Pořadí vzorku	Obsah BSA (μg) v 50 μl
1.	1
2.	5
3.	10
4.	15
5.	20
6.	50

3.5 Měření koncentrace živin v hemolymfě

Po stanovení živin v tukovém tělese vyvstala otázka, zda se stejné hladiny zrcadlí rovněž v hemolymfě. Pro stanovení hladiny živin u zimních včel byly použity, stejně jako u předchozího stanovení živin z tukového tělesa, vzorky odebrané v prosinci a lednu (rozlišené na core a periphery), u mladušek a létavek to byly vzorky z června a července. Hemolymfa byla odebírána uspaným včelám za pomoci jehly a tenké skleněné kapiláry. Nejprve byl proveden vpich jehlou mezi segmenty abdomenu včely a poté za užití kapiláry nasána hemolymfa.

Jednalo se vždy o směsný vzorek hemolymfy, objem odebraný z jedné včely činil vždy minimálně 1 μl , přičemž hemolymfa byla odebraná z 10-15 včel za skupinu. Po celou dobu byla odebíraná hemolymfa uchovávaná na ledu, aby bylo zabráněno melanizaci, po dokončení byla rychle stočena a zamrazena v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro stanovení živin v hemolymfě bylo postupováno obdobně jako u stanovení živin z tukového tělesa, principy metod se nelišily. Vyhodnocení probíhalo rovněž na ELISA readeru (ELISA reader, Spectra Max 340 PC, Molecular Devices, USA). Pro každou skupinu vzorků byla analýza prováděna v triplikátech.

3.5.1 Měření volných cukrů

K 230 μl čerstvě připraveného anthronového reagens (150 mg anthronu/100 ml 72 % kyseliny sírové) byl přidán vždy 1 μl hemolymfy, v případě blanku byl použit 1 μl destilované vody. Poté byly vzorky promíchány a inkubovány v termobločku 8 minut při $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakonec bylo 200 μl vzorku přeneseno do jamek mikrotitrační destičky (Gama) a výsledek měřen spolu se standardem (dle Tab. I výše) při vlnové délce 620 nm.

3.5.2 Měření lipidů

Ke 100 μl koncentrované kyseliny sírové byl přidán vždy 1 μl hemolymfy, vzorky byly důkladně zvortexovány, blank tudíž obsahoval pouze 100 μl čisté kyseliny sírové. Standardy byly připraveny totožně s postupem a tabulkou (Tab. II) uvedenými výše. Dalším krokem bylo povareň obsahu zkumavek po dobu 10 minut při $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, obsah byl poté ochlazen a do každé zkumavky byl přidán 1 ml vanilinového reagens. Získaná směs byla prudce promíchána a poté ponechána inkubaci při pokojové teplotě na dobu 30 minut. Finálním krokem bylo přenesení 200 μl vzorku do jamek mikrotitrační destičky (Gama) a výsledné hodnoty měřeny na ELISA readeru při 546 nm.

3.5.3 Měření bílkovin

Nejprve byl připraven 1 ml reakční směsi roztoků A (BCA) a B ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{ H}_2\text{O}$) komerčně dodávaného kitu (Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit; Sigma-Aldrich) v poměru 50:1 a k němu bylo přidáno 49 μl 0,2 M Tris-HCl (pH 7,8) s 1 μl hemolymfy. Takto smíchané a důkladně promíchané vzorky byly inkubovány 30 minut při $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se standardy bylo nakládáno totožně jako je uvedeno výše (hodnoty dle Tab. III). Poté bylo 200 μl nanášeno do jamek mikrotitrační destičky (Gama) a měřeno na ELISA readeru při 562 nm.

3.6 Statistické zpracování výsledků

Výsledné hodnoty byly zpracovány v programu GraphPad Software verze Prism 4 za využití statistické analýzy jednocestná ANOVA s Tukeyho post-testem pro porovnání hmotností tukových těles, hladin živin v tukovém tělese a hemolyfě a pak dvoucestná ANOVA s Bonferroniho post-testem při porovnávání rozměrů buněk a jejich jader z tukového tělesa.

3.7 Izolace RNA

RNA byla izolována z tukového tělesa 10 mladušek (červen), 10 létavek (červen) a 10 zimních včel (leden) pomocí kitu Hybrid-R (Gene All) dle příložených instrukcí výrobce. Stručně, tukové těleso bylo nejprve pitvané v Ringerovo roztoku a poté rovnou ukládáno do 500 μ l RiboEX roztoku každé zvlášť a v něm zhomogenizováno tloučkem. Vzorky byly inkubovány při pokojové teplotě po dobu 5 minut, po uplynutí intervalu k nim bylo přidáno vždy 100 μ l chloroformu, vzorky byly promíchány a znovu inkubovány při pokojové teplotě po dobu 2 minut. Následovala centrifugace při 12 000 g a 4 °C na 15 minut, horní fáze byla pak přenesena do čisté zkumavky a k ní přidáno 500 μ l RB1 roztoku, přičemž 700 μ l získaného roztoku bylo přeneseno na kolonku s filtrem a proběhla centrifugace při 10 000 g na 30 sekund při pokojové teplotě. Tekutina ve sběrné zkumavce byla vylita, na kolonku bylo nanášeno 500 μ l SW1 a znovu proběhla centrifugace při 10 000 g na 30 sekund při pokojové teplotě, získaná tekutina ve sběrné zkumavce vylita. Na kolonku bylo nanášeno 72 μ l DNase mixu (70 μ l DRB roztoku a 2 μ l RNase-free DNase, Omega) a proběhla inkubace při pokojové teplotě po dobu 10 minut. Následovalo promytí 500 μ l SW1 s centrifugací při 10 000 g a pokojové teplotě na 30 sekund, tekutina ve sběrné zkumavce byla vylita, pak bylo na kolonku nanášeno 500 μ l RNW roztoku, vzorky centrifugovány za stejných podmínek hned dvakrát. Finálním krokem bylo napipetování 75 μ l vody (nuclease-free) do středu membrány, inkubace 1 minutu a centrifugace na 12 000 g a 2 minuty při pokojové teplotě. Množství a čistota získané RNA bylo změřeno na nanodropu (Nanodrop 2000, Thermo Scientific).

3.8 Porovnání exprese

Pro porovnání exprese genů z tukového tělesa byla vyizolovaná RNA sekvenována metodou QuantSeq 3 od Lexogenu na platformě Illumina NextSeq 500 na vědeckém ústavu Ceitec v Brně. Ze získaných dat byla pak provedena analýza DEG Mgr. Vratislavem Peškou, Ph.D. z Biofyzikálního ústavu AV ČR v Brně. Ve zkratce, hrubá NGS data byla předzpracována v programu Trimmomatic (verze 0.40), v němž byly odstraněny adaptorové sekvence a nekvalitní konce RNA readů. Následovalo mapování single-end readů na genom

GCF_003254395.2_Amel_HAv3.1_genomic.gtf pomocí programu STAR (verze 2.7.10a), ten indexuje výsledný soubor včetně duplikátů a multimapping readů. Namapované ready byly spočítány v programu RSEM (verze 1.3.3). Kvantifikace včetně normalizace, porovnání každé skupiny s každou a statistické zhodnocení (p hodnota) za užití Wald testu s následovnou korekcí vícenásobného testování (FDR = false discovery rate) byly provedeny v balíčku DESeq2 (verze 3.14) pro program R Studio (verze 4.1.1).

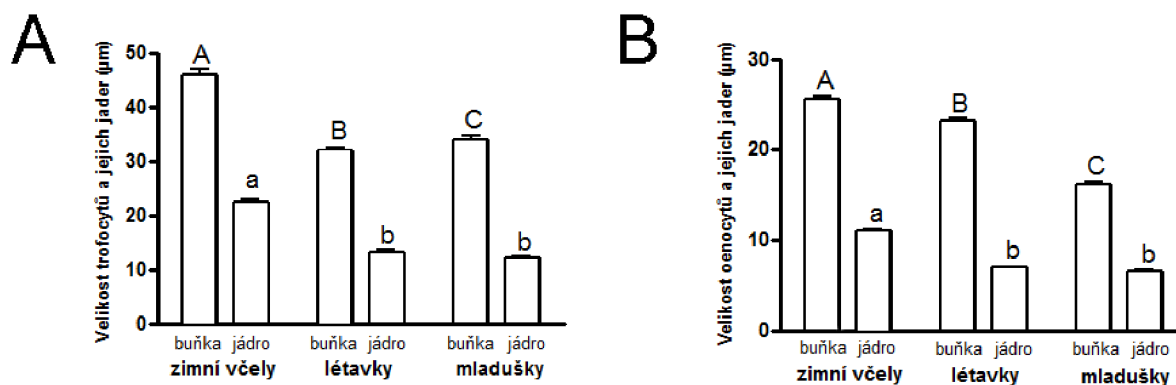
Pro snadnější interpretaci dat a jejich vizualizaci byla poté ještě provedena analýza hlavních komponent, neboli PCA (principal analysis component). Bylo znova využito programu R Studio, data (počet RNA readů) bylo potřeba transformovat užitím VST (variance-stabilizing transformation) pomocí DESeq2. Analýza byla provedena nejprve pro 500 nejodlišněji exprimovaných genů. Poté na základě získaných fotek tukového tělesa z mikroskopů pouze pro geny související s lysosomy (https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?ame04142) a také s dlouhověkostí (https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?ame04213), ty byly manuálně vyfiltrované dle databáze KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) specificky pro *A. mellifera*.

4 Výsledky

4.1 Porovnání velikosti buněk tukového tělesa a jejich morfologie

Struktura tukového tělesa byla porovnána mezi mladuškami, létavkami a zimními včelami. Jmenovitě šlo o velikost buněk (Obr. 4), jejich celkový vzhled (Obr. 5 a 6) a pak také jejich podrobnější struktura (Obr. 7-11).

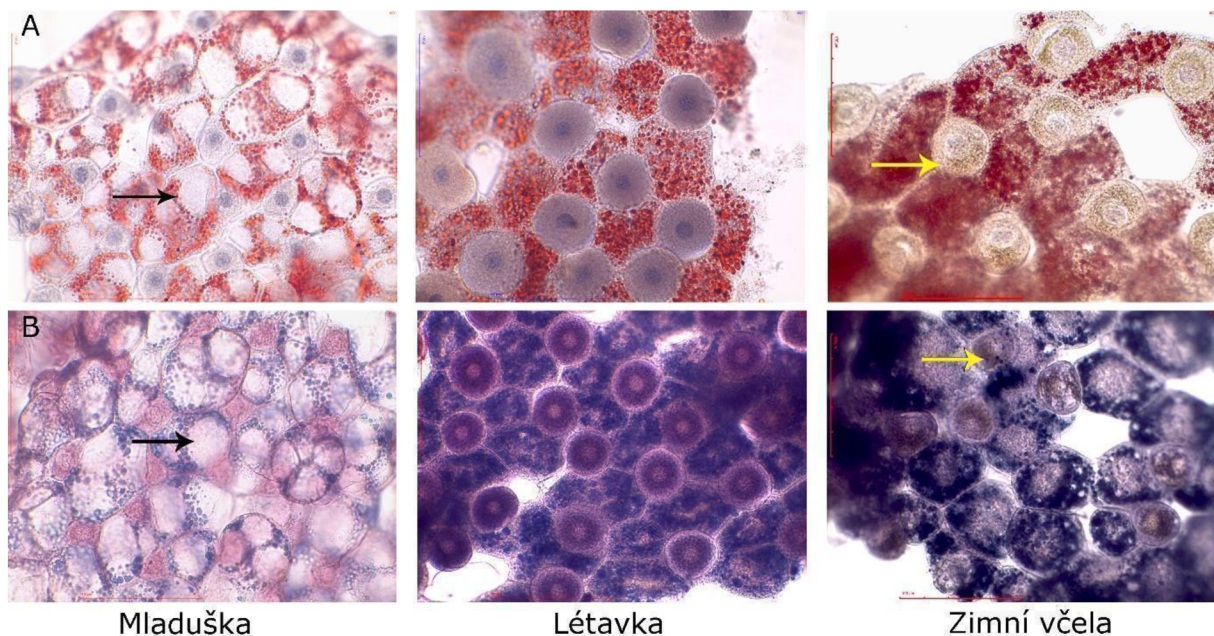
Největšího průměru dosahovaly jak trofocyty ($46,02 \mu\text{m} \pm 0,78 \mu\text{m}$) a jejich jádra ($22,49 \mu\text{m} \pm 0,39 \mu\text{m}$), tak i oenocyty ($25,61 \mu\text{m} \pm 0,36 \mu\text{m}$) a jejich jádra ($11,05 \mu\text{m} \pm 0,11$) u včel zimních. Co se týče dodatečného porovnání oenocytů, tak nejmenší velikosti byly u mladušek ($16,20 \mu\text{m} \pm 0,23 \mu\text{m}$), velikosti u létavek byly kolem ($23,17 \mu\text{m} \pm 0,34 \mu\text{m}$). U trofocytů byla pak zaznamenána nejmenší velikost u létavek ($31,96 \mu\text{m} \pm 0,56 \mu\text{m}$), velikost oenocytů u létavek byla $23,17 \mu\text{m} (\pm 0,34 \mu\text{m})$ (Obr. 4). Při zohlednění procentuálního poměru průměrů buněk a jader zabírají jádra trofocytů u létavek 41,6 %, u mladušek 35,9 % z celkového průměru buňky, při přechodu mladušky v létavku tedy dochází k drobnému zmenšení buňky bez současného smrštění jádra. Naopak u oenocytů zabírá u letních včel jádro pouze 30,08 % z celkového průměru buňky, zatímco u mladušek 40,74 %, což značí expanzi celkového průměru buňky bez současného zvětšení jejího jádra.



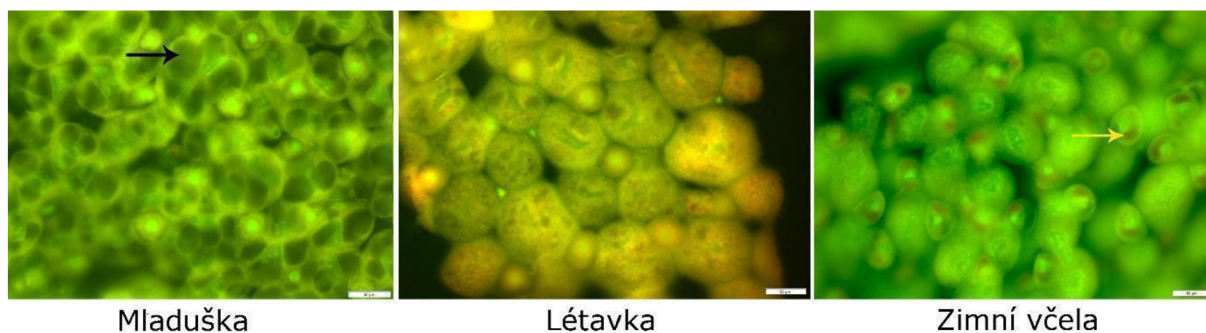
Obr. 4: Porovnání velikosti buněk tukového tělesa a jejich jader. Trofocyty (A). Oenocyty (B). Využita statistická analýza dvoucestná ANOVA s Bonferroniho post-testem, $n = 100$, sloupce symbolizují průměr \pm SEM. Identická písmena nad sloupci označují statisticky nesignifikantní rozdíly, odlišná písmena označují statisticky signifikantní rozdíly mezi skupinami (velká písmena pro buňky, malá písmena pro jádra). Podrobné statistické výsledky jsou v příloze (Tab. VII a VIII).

Celkově tedy, pro tukové těleso mladušek jsou charakteristické drobnější oenocyty, které navíc nejsou zcela pravidelně kulaté a jádro zdánlivě vyplňuje větší objem buňky. Trofocyty obsahují několik vakuolárních vesikul, díky čemuž se jeví tyto buňky naopak

objemnější, zbývající obsah buňky vyplňují tukové kapénky, pod kterými je schované jádro. Oba typy buněk na sebe navzájem pevně nasedají, a tak zde mezibuněčné prostory nejsou tolik patrné, na rozdíl od létavek. U tukového tělesa létavek jsou oenocyty větší, pravidelně kulaté a jádro se naopak jeví menší. V trofocytech se vakuolární vesikuly již nevyskytují a buňky vypadají menší. Tukové těleso zimních dělnic má stejně jako to létavek také nápadné mezibuněčné prostory. Trofocyty se jeví jako zcela největší, obsazené tukovými kapénkami s projasněním v oblasti výskytu relativně velkého jádra. Oenocyty jsou velké, pravidelné kulaté, podobné jako u létavek. Avšak odlišným a nejnápadnějším rysem jsou nažloutlé (pokud barveno Oil Red O), nahnědlé (pokud barveno SBB) anebo červené (v případě barvení AO) struktury obklopující jádro oenocytu, naznačující přítomnost lipofuscinu (Obr. 5 a 6).

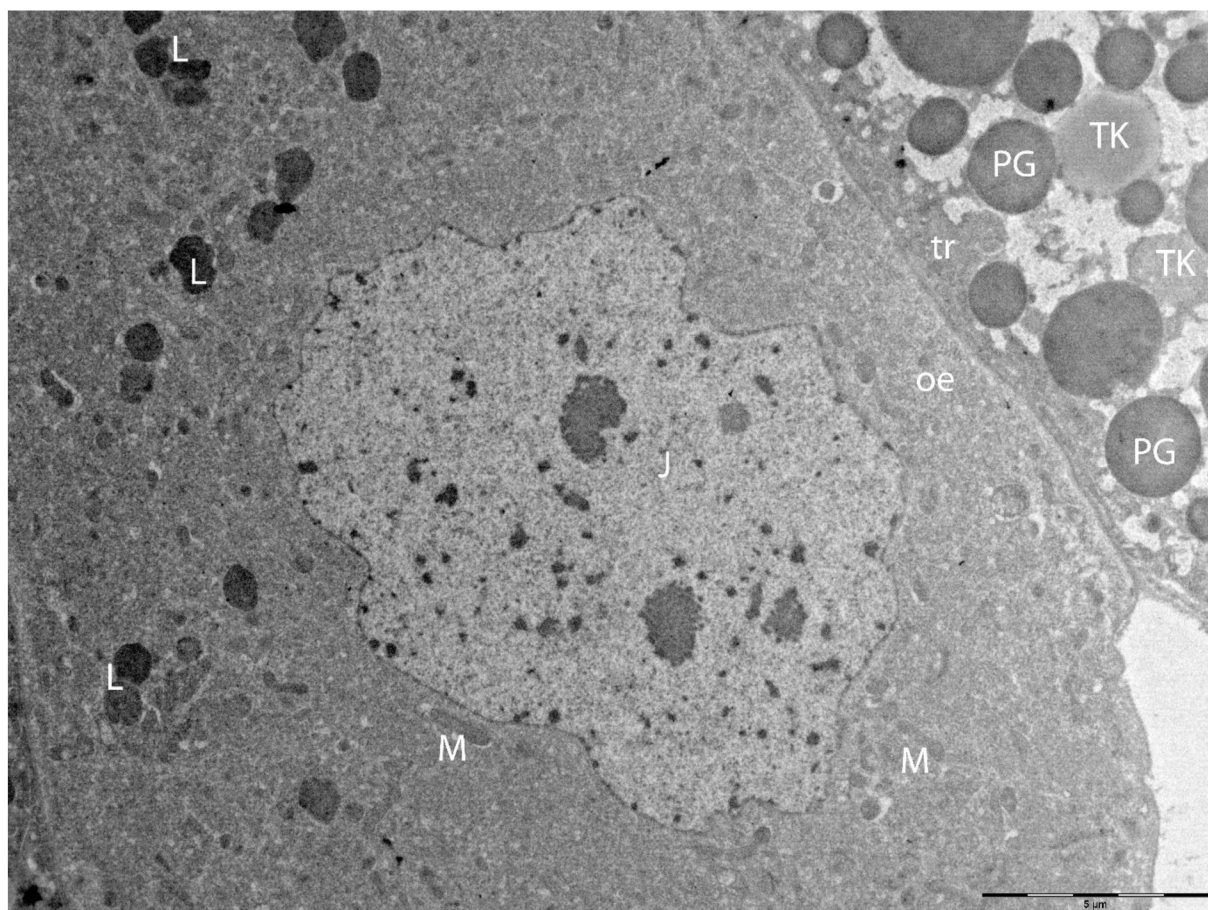


Obr. 5: Preparáty tukového tělesa barvené Oil Red O s hematoxylinem (A) a SBB (B). Žlutou šipkou jsou označeny granule lipofuscinu u zimních včel, černou šipkou vakuolární vesikuly u mladušek. Měřítko symbolizuje 100 μm .

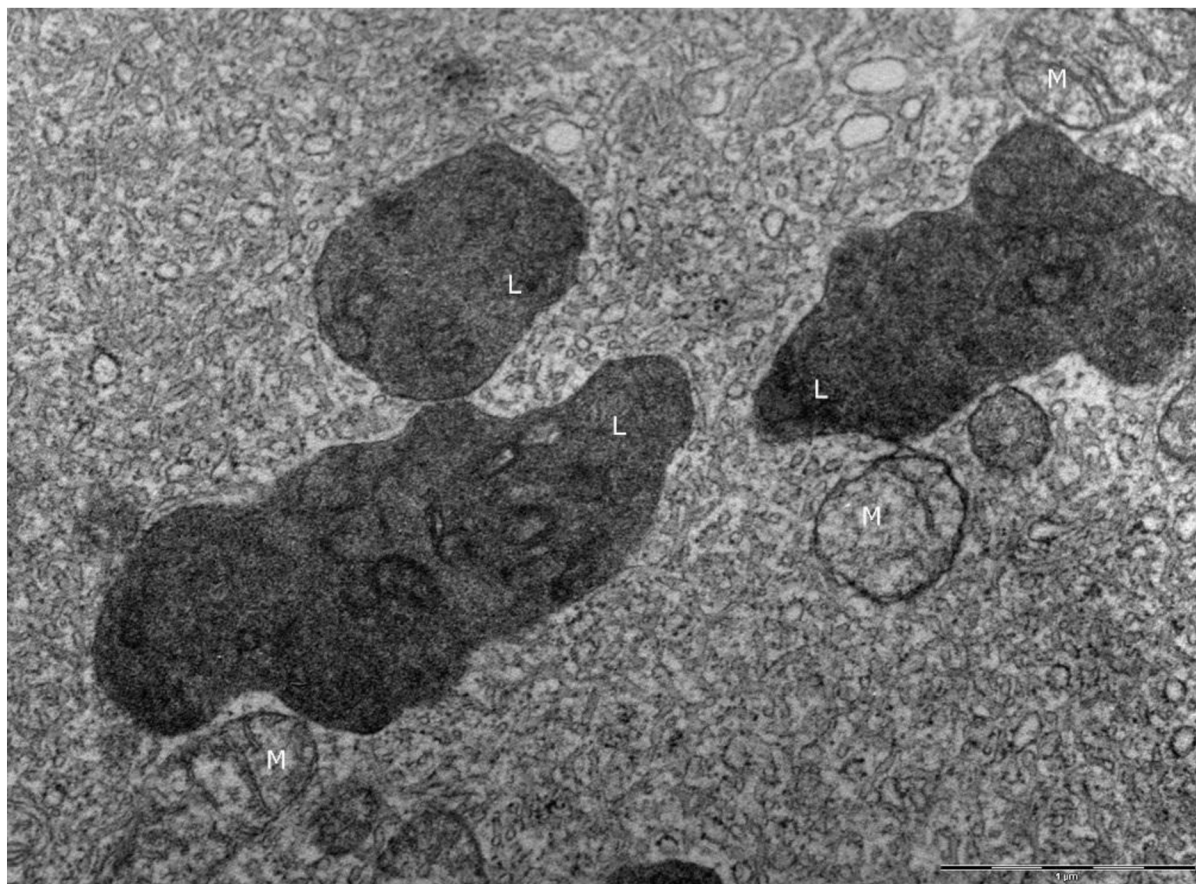


Obr. 6: Preparáty tukového tělesa z fluorescenčního mikroskopu barvené akridinovou oranží. Žlutou šipkou jsou označeny granule lipofuscinu u zimních včel, černou šipkou vakuolární vesikuly u mladušek. Měřítka symbolizuje 50 μm .

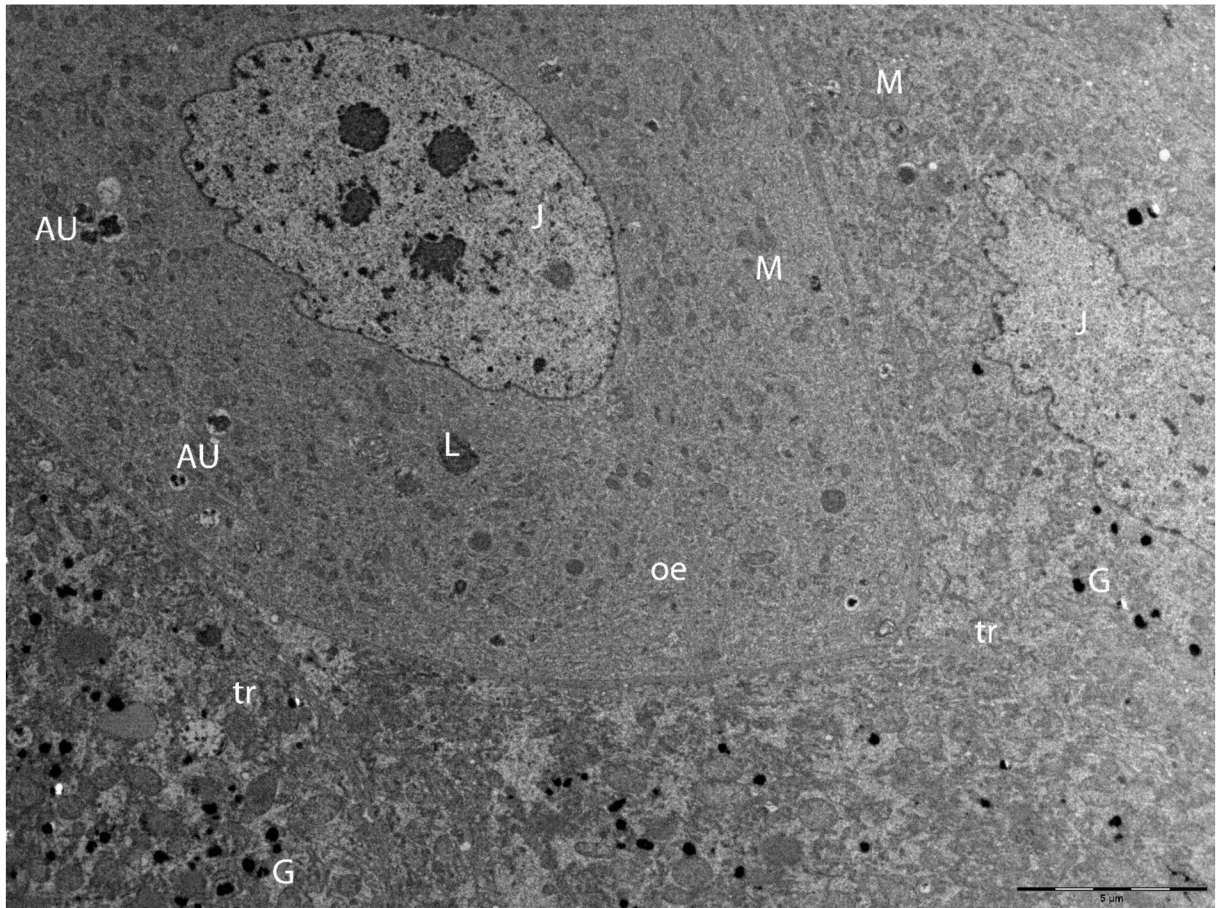
Pro srovnání ultrastruktury a především potvrzení přítomnosti granul lipofuscinu u zimních včel byly jednotlivé vzorky tukových těles dále podrobeny transmisní elektronové mikroskopii (Obr. 7-11). V souladu s předešlým pozorováním oenocyty zimních včel, na rozdíl od mladušek a létavek, obsahovaly velké množství pigmentových, patrně lipofuscinových granul, které v takovém množství u mladušek ani létavek pozorovány nebyly (Obr. 7 a 8). Dalším rozdílem mezi fenotypy bylo velké množství proteinových granul a tukových kapének v trofocytech u zimních včel (Obr. 7). U buněk trofocytů létavek jsou nápadná černá nepravidelná granula bez ohraničení a potom také u buněk oenocytů několik autofagických vakuol v různých stádiích procesu autofágie s teprve formujícím se lipofuscinem (Obr. 9 a 10). U trofocytů mladušek jsou zachyceny blíže vakuolární vesikuly zaplňující většinu objemu buňky (Obr. 11).



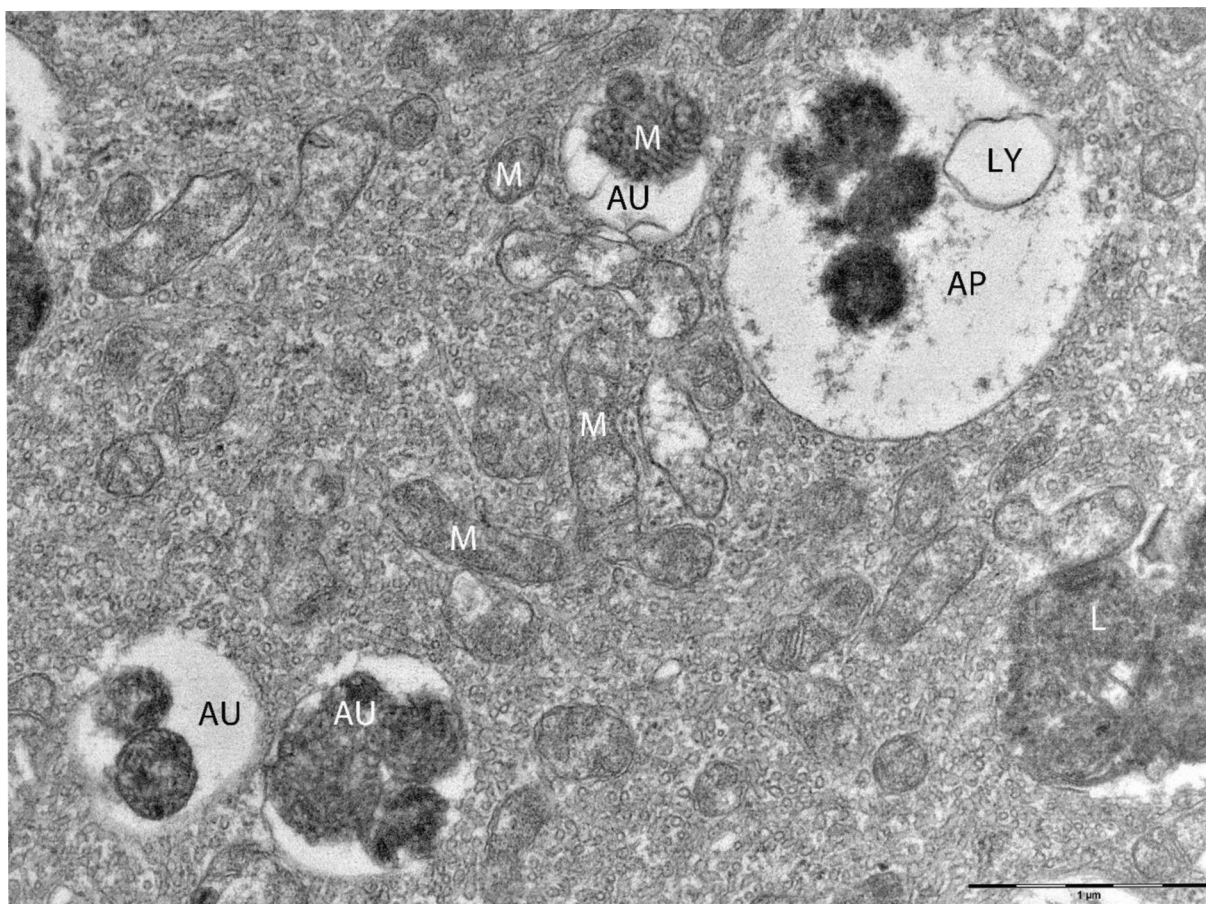
Obr. 7: Ultrastruktura tukových buněk zimní včely pomocí TEM. Granule lipofuscinu (L) v blízkosti jádra (J) a četné mitochondrie (M) uvnitř oenocytu (oe) zimní včely. Trofocyt (tr) obsahuje velké množství tmavých kulatých granulí proteinů (PG) a světlejších tukových kapének (TK). Měřítka symbolizuje 5 µm.



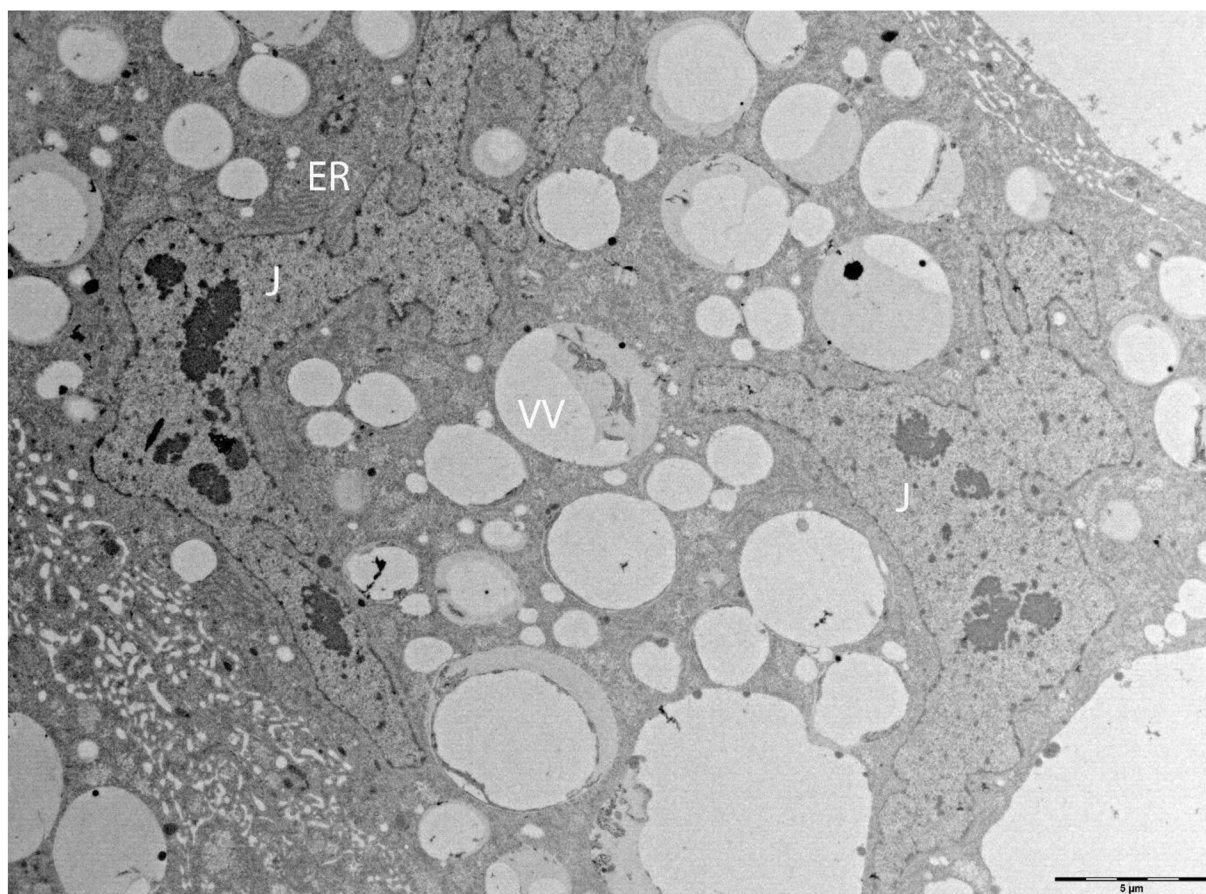
Obr. 8: Detail lipofuscinových granul (L) ohraničených dvojitou lysosomální membránou s přilehlými mitochondriemi (M) v oenocytu zimní včely. Měřítka symbolizuje 1 μm .



Obr. 9: Ultrastruktura tukových buněk u létavky. Oenocyt (oe) se zakulaceným jádrem (J) obklopený trofocyty (tr) obsahující jádro (J) nepravidelného tvaru u létavky. Jádra obsahují nápadná tmavá jadérka a heterochromatin. V oenocytu je přítomno hned několik autofagických vakuol (AU) obsahující tmavý degradovaný materiál, formující se lipofuscin (L) a lze také rozpoznat drobné oválné mitochondrie (M). V trofocytech jsou nejvíce nápadná černá drobná granula (G). Měřítko symbolizuje 5 µm.



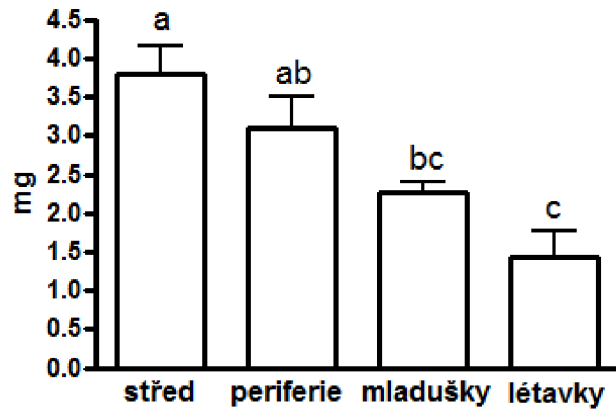
Obr. 10: Detail autofagických vakuol (AU) uvnitř oenocytu létavky. Lze pozorovat fúzi autofagosomu (AP) obsahující tmavé degradované struktury s lysosomem (LY), dále formující se lipofuscin (L) a četné mitochondrie (M). Měřítko symbolizuje 1 μm .



Obr. 11: Ultrastruktura trofocytu mladušky. Jádro (J) trofocytu mladušky obsahující tmavá jádérka a chromatin, s přiléhajícím endoplasmatickým retikulem (ER), obklopené velkým množstvím různě velikých světlých vakuolárních vesikul (VV). Měřítka symbolizuje 5 μm .

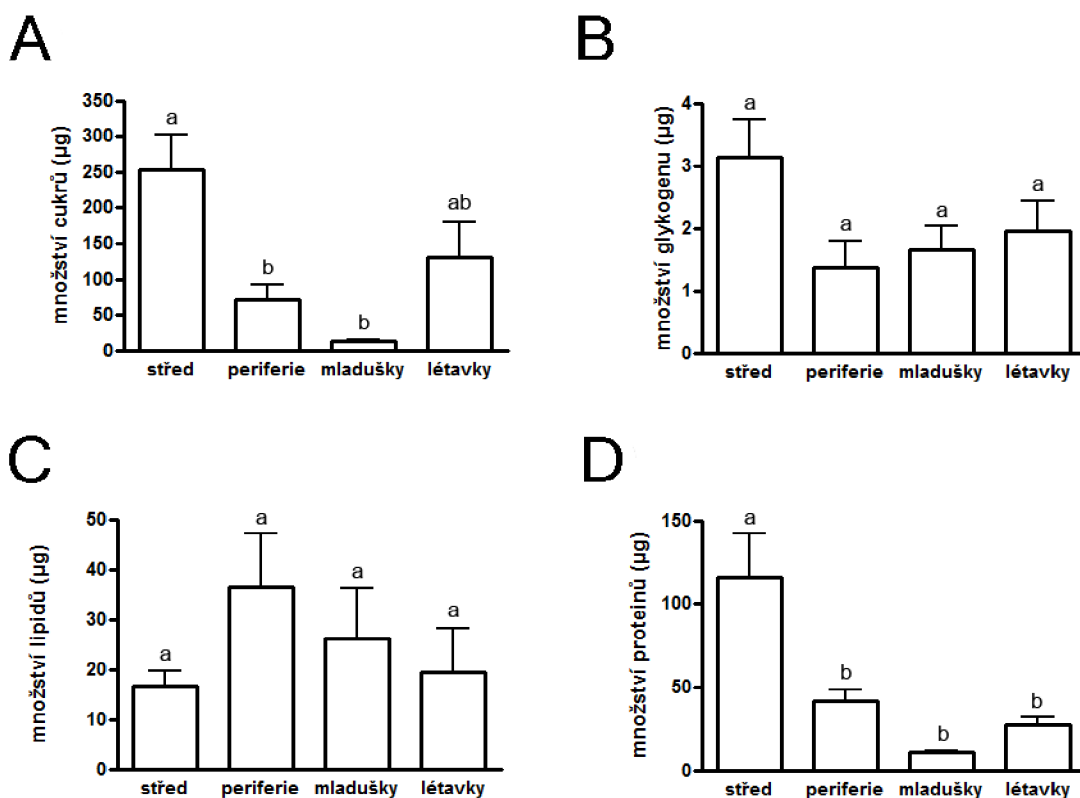
4.2 Porovnání hmotnosti tukového tělesa a množství a koncentrace živin v tukovém tělese

Nejvyšší hodnoty hmotnosti tukového tělesa byly zaznamenány u zimních včel vyskytujících se ve středu zimního chomáče ($3,79 \mu\text{g} \pm 0,35 \mu\text{g}$), oproti nim byl zaznamenán zhruba 20 %, avšak nesignifikantní, pokles hmotnosti tukového tělesa u včel pocházejících z periferie ($3,10 \mu\text{g} \pm 0,37 \mu\text{g}$). Nižší hmotnost byla poté zaznamenána u mladušek ($2,26 \mu\text{g} \pm 0,13 \mu\text{g}$) a zcela nejnižší na konec u létavek ($1,43 \mu\text{g} \pm 0,31 \mu\text{g}$). Jsou-li celkově porovnány průměrné hodnoty za zimu (bez ohledu na včely odebírané ze středu či periferie zimního chomáče) a léto (bez ohledu, zda se jedná o mladušky či létavky), dochází v zimě zhruba k 80 % nárůstu hmotnosti tukového tělesa (Obr. 12).



Obr. 12: Změny v hmotnosti tukového tělesa (mg) mezi zimními včelami (střed a periferie zimního chomáče), mladuškami a létavkami. S využitím statistické analýzy jednocestná ANOVA s Tukeyho post-testem ($n = 100$), sloupce symbolizují průměr \pm SEM. Identická písmena nad sloupci označují statisticky nesignifikantní rozdíly, odlišná písmena označují statisticky signifikantní rozdíly mezi skupinami. Podrobné statistické výsledky jsou v příloze (Tab. X).

Dále bylo porovnáno celkové množství živin (Obr. 13) a také jejich koncentrace (Obr. 14) v tukovém tělese (cukry, glykogen, lipidy, proteiny) a v hemolymfě (cukry, lipidy, proteiny; Obr. 15). Zde se ve většině případů ukázalo jako důležité zohlednit místo odběru zimních včel, jelikož byly pozorovány signifikantní rozdíly mezi včelami ze středu a z periferie zimního chomáče.

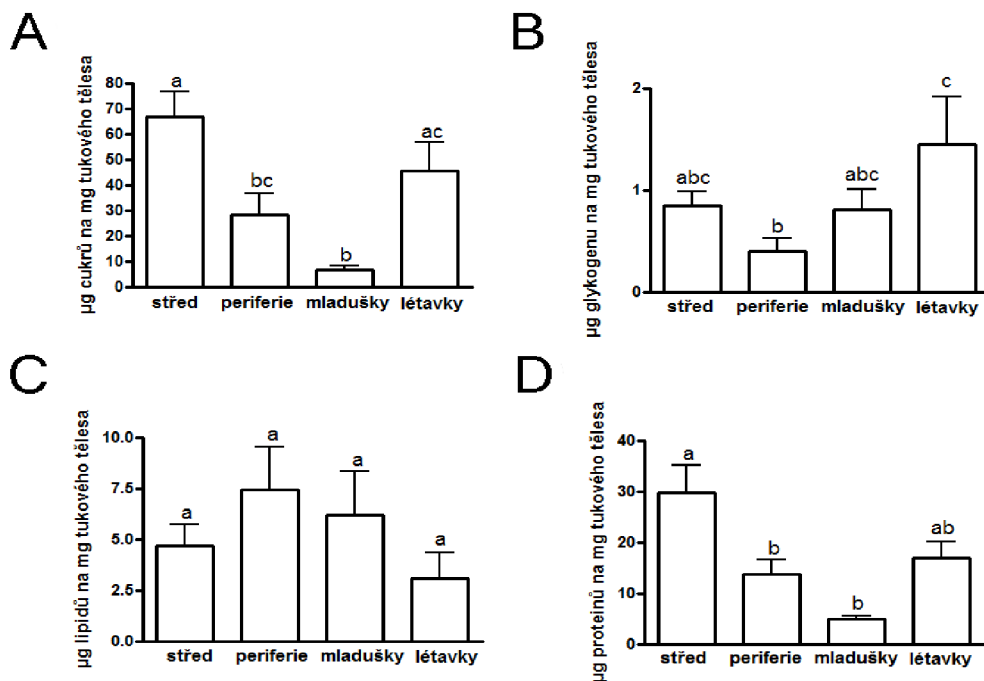


Obr. 13: Porovnání množství živin (µg) v tukovém tělese mezi zimními včelami (střed a periferie), mladuškami a létavkami: cukry (A), glykogen (B), lipidy (C), proteiny (D). Sloupce symbolizují průměr ± SEM, použita jednocestná ANOVA a Tukeyho post-test (n = 10). Identická písmena nad sloupci grafu označují statisticky nesignifikantní rozdíly, odlišná písmena označují statisticky signifikantní rozdíly mezi skupinami. Podrobné výsledky statistického testu jsou v příloze (Tab. XI – XIV).

Při porovnání celkového množství živin průměrně na včelu dosahovaly jednoznačně nejvyšších hladin cukry, jejichž množství se pohybovalo v řádech až stovek mikrogramů. Největší množství cukrů bylo naměřeno v tukovém tělese zimních včel ze středu chomáče (252,99 µg ± 46,22 µg), zhruba dvakrát nižší pak u létavek (130,76 µg ± 45,83 µg) a také 3,5krát nižší u včel z periferie chomáče (71,60 µg ± 18,98 µg). Vůbec nejnižší množství bylo pak naměřeno u mladušek (13,42 µg ± 2,39 µg). Porovnání naměřeného množství glykogenu nepřineslo signifikantní rozdíly, stejně tak porovnání množství lipidů. Signifikantně nejvyšší množství proteinů je uloženo v tukovém tělese zimních včel ze středu chomáče (115,63 µg ± 25,53 µg), zhruba třikrát nižší množství u včel z periferie chomáče (38,33 µg ± 6,60 µg), podobně nízké u létavek (27,32 µg ± 4,55 µg) a zcela nejnižší u mladušek (10,81 µg ± 0,91 µg).

Co se týče koncentrace živin v tukovém tělese, trend mezi porovnávanými skupinami je podobný. U cukrů se koncentrace pohybovaly v řádech desítek, přičemž největší koncentrace

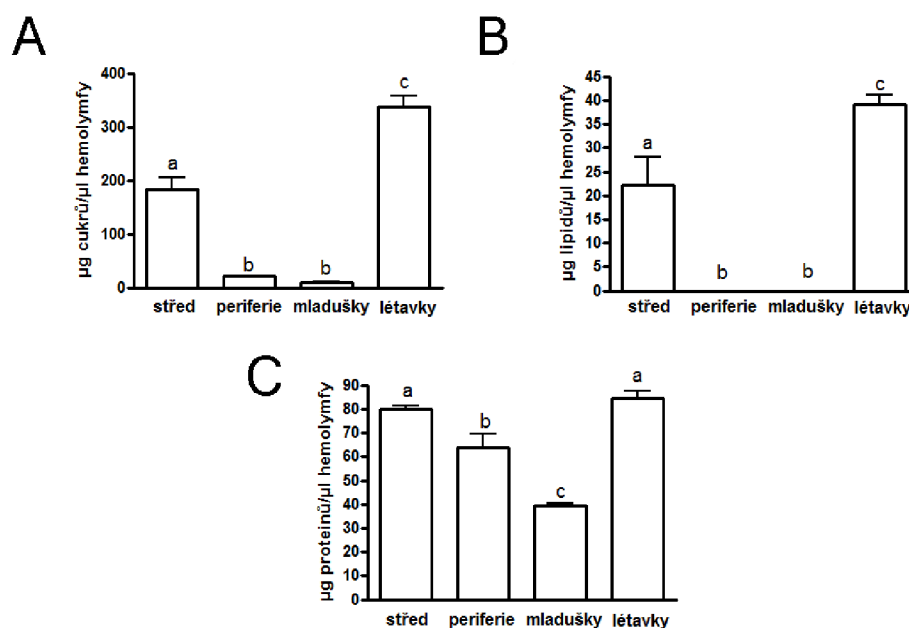
byly zaznamenány u zimních včel ze středu chomáče (66,58 $\mu\text{g}/\text{mg}$ tukového tělesa \pm 9,47 $\mu\text{g}/\text{mg}$) a zhruba 2,4krát menší koncentrace byly u zimních včel z periferií (28,26 $\mu\text{g}/\text{mg}$ tukového tělesa \pm 7,80 $\mu\text{g}/\text{mg}$). Vysoké koncentrace byly taktéž u létavek (45,47 $\mu\text{g}/\text{mg}$ tukového tělesa \pm 10,56 $\mu\text{g}/\text{mg}$) v porovnání s mladuškami (6,52 $\mu\text{g}/\text{mg}$ tukového tělesa \pm 1,53 $\mu\text{g}/\text{mg}$), jejichž koncentrace byly téměř sedmkrát nižší. U koncentrace glykogenu nebyly pozorované signifikantní rozdíly mimo porovnání nejnižších koncentrací u zimních včel z periferie s nejvyššími koncentracemi u létavek, což je jako jediné v rozporu s výsledky množství živin. Celkově dosahoval ale glykogen nízkých hodnot v porovnání s ostatními živinami a zřídka přesahoval hodnotu 1 μg na mg tukového tělesa. Koncentrace lipidů nevykazovaly ani zde signifikantní rozdíly mezi jednotlivými skupinami. Co se týče proteinů, nejvyšší koncentrace proteinů byly zaznamenány u zimních včel ze středu chomáče (29,75 $\mu\text{g}/\text{mg}$ tukového tělesa \pm 5,12 $\mu\text{g}/\text{mg}$), což byly zhruba dvakrát vyšší hodnoty oproti včelám z periferie (13,75 $\mu\text{g}/\text{mg}$ tukového tělesa \pm 2,67 $\mu\text{g}/\text{mg}$). Druhých nejvyšších hodnot dosahovaly létavky (16,98 $\mu\text{g}/\text{mg}$ tukového tělesa \pm 2,98 $\mu\text{g}/\text{mg}$), tedy 2,4krát vyšší hodnoty oproti mladuškám se zcela nejnižšími hodnotami (4,93 $\mu\text{g}/\text{mg}$ tukového tělesa \pm 0,48 $\mu\text{g}/\text{mg}$).



Obr. 14: Porovnání koncentrací živin v tukovém tělese (μg živin na 1 mg tukového tělesa) mezi zimními včelami (střed a periferie), mladuškami a létavkami: cukry (A), glykogen (B), lipidy (C), proteiny (D). Sloupce symbolizují průměr \pm SEM, použita jednocestná ANOVA a Tukeyho post-test ($n = 10$). Identická písmena nad sloupci grafu označují statisticky nesignifikantní rozdíly, odlišná písmena označují statisticky signifikantní rozdíly mezi skupinami. Podrobné výsledky statistického testu jsou v příloze (Tab. XV – XVIII).

4.3 Porovnání koncentrace živin v hemolymfě

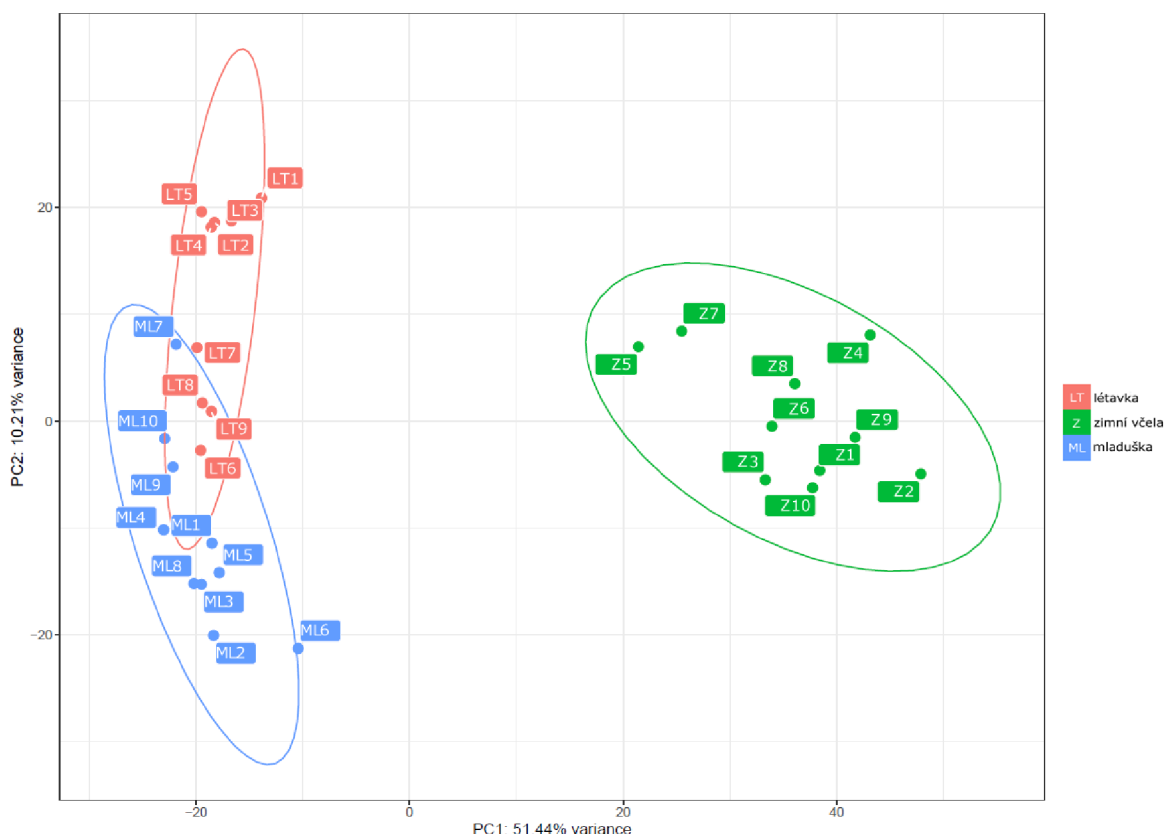
Nejvyšší hladiny cukrů byly naměřené u létavek (337,57 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ hemolymfy \pm 16,01), které vykazaly zhruba 33násobek hodnot mladušek (10,27 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ hemolymfy \pm 0,44). Vysoké hladiny cukrů byly zjištěny také včely ze středu zimního chomáče (182,85 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ hemolymfy \pm 18,45 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), které byly až devětkrát vyšší v porovnání s těmi z periferie chomáče (20,44 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ hemolymfy \pm 0,85 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Co se týče lipidů a jejich obsahu v hemolymfě, nejvyšší hodnoty byly naměřené u létavek (39,19 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ hemolymfy \pm 1,52 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), signifikantně nižší hodnoty pak vykazovaly zimní včely ze středu (22,15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ hemolymfy \pm 4,90 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) a nedetekovatelné hodnoty byly pak u včel z periferie a mladušek. Nejvyšších hladin proteinů nabývala hemolymfa jak u zimních včel ze středu chomáče (80,01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ hemolymfy \pm 1,10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), tak u létavek (84,27 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ hemolymfy \pm 2,60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Signifikantně nižších hladin dosahovaly proteiny v hemolymfě včel z periferie (63,90 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ hemolymfy \pm 4,75 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) a zcela nejnižších nakonec u mladušek (39,58 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ hemolymfy \pm 0,72 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).



Obr. 15: Koncentrace živin v hemolymfě. Koncentrace cukrů (A), lipidů (B) a proteinů (C) živin v hemolymfě (μg na $1 \mu\text{l}$ hemolymfy) mezi zimními včelami (střed a periferie), mladuškami a létavkami. Sloupce symbolizují průměr \pm SEM, použita jednocestná ANOVA a Tukeyho post-test, $n = 3$ (chemické opakování; 1 vzorek = 10-15 včel). Identická písmena nad sloupci grafu označují statisticky nesignifikantní rozdíly, odlišná písmena označují statisticky signifikantní rozdíly mezi skupinami. Podrobné výsledky analýzy jsou v příloze (Tab. XIX – XXI).

4.4 Porovnání exprese genů tukového tělesa

Výsledky analýzy hlavních komponent jsou zobrazeny na Obr. 16-18. Lze vidět vzorky uspořádané do shluků zastupující vždy jednotlivé skupiny naznačující, že mladušky, létavky a zimní včely mohou být odlišeny na základě genové exprese v tukovém tělese a má tedy smysl je porovnávat. První dvě hlavní komponenty (PC1 a PC2) vyjadřují vždy největší procento celkové variance mezi vzorky, ostatní komponenty vysvětlující nižší procento variance zahrnuté nejsou.



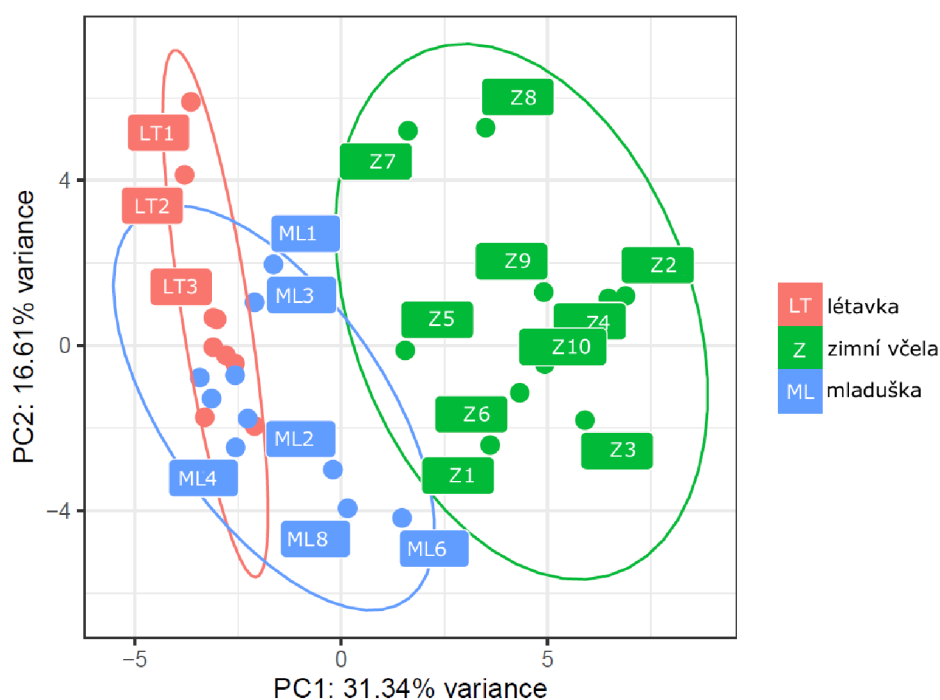
Obr. 16: PCA pro 500 nejodlišněji exprimovaných genů (z celkového počtu 12 319 genů) vysvětlující 61,65 % celkové variance dat. Osa x (PC1) vysvětluje 51,44 % variance a osa y (PC2) 10,21 % variance mezi skupinami (mladuška – ML, modrá; létavka – LT, červená; zimní včela – Z, zelená). Vzorky symbolizují tečky tukových těles (resp. jedince) zastupující danou skupinu.

V prvním případě (Obr. 16), který se týká celkové exprese genů v tukovém tělese jsou v rámci PC1 k pěti nejodlišněji exprimovanými genům (shrnutí v Tab. IV), které přispívají k celkové varianci skupin, tyto anotované proteiny: Mast Cell Degranulating Peptide (1,25 %), Apamin (1,22 %), Pupal cuticle protein (1,16 %), Melittin (1,04 %) a Abaecin precursor (0,99 %). V rámci PC2 pak Acyl-CoA delta (11) desaturase (0,49 %), blíže nespecifikované proteiny LOC113219377 (0,42 %), LOC113219383 (0,39 %), LOC113219341 (0,38 %) a nakonec Major royal jelly protein 1 (0,34 %). Z Obr. 16 je patrné, že zimní včely lze zcela jasně odlišit

od mladušek i létavek na základě rozdílů z PC1. Naproti tomu dle PC2 by se daly zhruba rozlišit mladušky od létavek, ale od nich zimní včely nikoliv.

Tab. IV: Seznam top 5 proteinů s největším procentuálním podílem variance v rámci PC1 a PC2. Znázornění signifikantně odlišné (FDR <0,05) exprese pro danou porovnávanou dvojici: létavky x zimní včely (a), mladušky x zimní včely (b), létavky x mladušky (c).

protein	podíl na varianci dle PC1 (%)	podíl na varianci dle PC2 (%)
mast cell degranulating peptide ^{a, b}	1,2487	0,0117
apamin ^{a, b}	1,2230	0,0156
pupal cuticle protein ^{a, b, c}	1,1625	0,0309
melittin ^{a, b}	1,0423	0,0409
abaecin precursor ^{a, b}	0,9891	0,0238
acyl-CoA Delta (11) desaturase ^{a, b, c}	0,0017	0,4484
LOC113219377	0,0031	0,4224
LOC113219383	0,0000	0,3931
LOC113219341	0,0001	0,3756
Major royal jelly protein1 ^a	0,0080	0,3440



Obr. 17: PCA pro geny související s lysosomy (celkem 82 nalezených genů dle KEGG databáze) vysvětlující 47,95 % celkové variance dat. Osa x (PC1) vysvětluje 31,34 % variance a osa y (PC2) 16,61 % variance mezi skupinami (mladuška – ML, modrá; létavka – LT, červená; zimní včela – Z, zelená). Vzoroky symbolizují tečky tukových těles (resp. jedince) zastupující danou skupinu.

V druhém případě (Obr. 17), zahrnujícím pouze geny související s lysosomy, přispívají nejvíce k varianci PC1 proteiny Hyaluronidase precursor (15,06 %), Sphingomyelin Phosphodiesterase (7,30 %), protein Malvolio (7,24 %), Glucosylceramidase 4 (6,66 %) a Heparan-alpha-glucoaminide N-acetyltransferase (5,05 %). V rámci PC2 jsou to pak Lysosomal aspartic protease (8,13 %), NPC intracellular cholesterol transporter 2 homolog a (6,78 %), AP-3 complex subunit mu-1 (6,69 %), Sensory neuron membrane protein 1 (5,14 %) a Alpha-N-acetylgalactosaminidase (4,83 %).

U genů, které souvisí s lysosomy, porovnáním diferenciální exprese mezi testovanými fenotypy (Tab. IV) bylo zjištěno, že létavky vzhledem k zimním včelám mají 13 signifikantně snížených genů (z jejich celkově 47 snížených genů) a 5 signifikantně zvýšených genů (z jejich celkově 35 zvýšených genů), a naopak zimní včely při porovnání s létavkami mají 13 signifikantně zvýšených genů (z celkově jejich 47 zvýšených genů) a 5 signifikantně snížených genů (z jejich celkově 35 snížených genů). Naopak zimní včely mají v porovnání s mladuškami menší počet diferenciálně snížených genů, tzn. u mladušek dochází k vyšší aktivaci genů spjatých s biologií lysosomů, což lze vidět i při porovnání mladušek s létavkami (Tab. V). Kompletní seznam anotovaných proteinů, jejich zařazení dle KEGG databáze a procentuální příspěvek k varianci je zahrnut níže (Tab. V). Na základě PC1 variancí v expresi jsou zimní včely zhruba odlišitelné od mladušek a létavek, přičemž většina vzorků mladušek se prolíná s vzorky létavek (např. ML3 a ML4), ale některé se prolínají i s vzorky zimních včel (ML6 a ML8). V rámci PC2 od sebe jednotlivé skupiny odlišit nelze.

Tab. V: Celkové porovnání exprese genů pro lysosomy napříč skupinami (fenotypy). ↓ = geny se sníženou expresí, ↑ = geny se zvýšenou expresí. Uvedené počty se vztahují vždy k prvnímu fenotypu z porovnávané dvojice. Je uveden vždy počet signifikantně diferenciálně exprimovaných genů (FDR <0,05) ku všem sníženým, resp. zvýšeným genům.

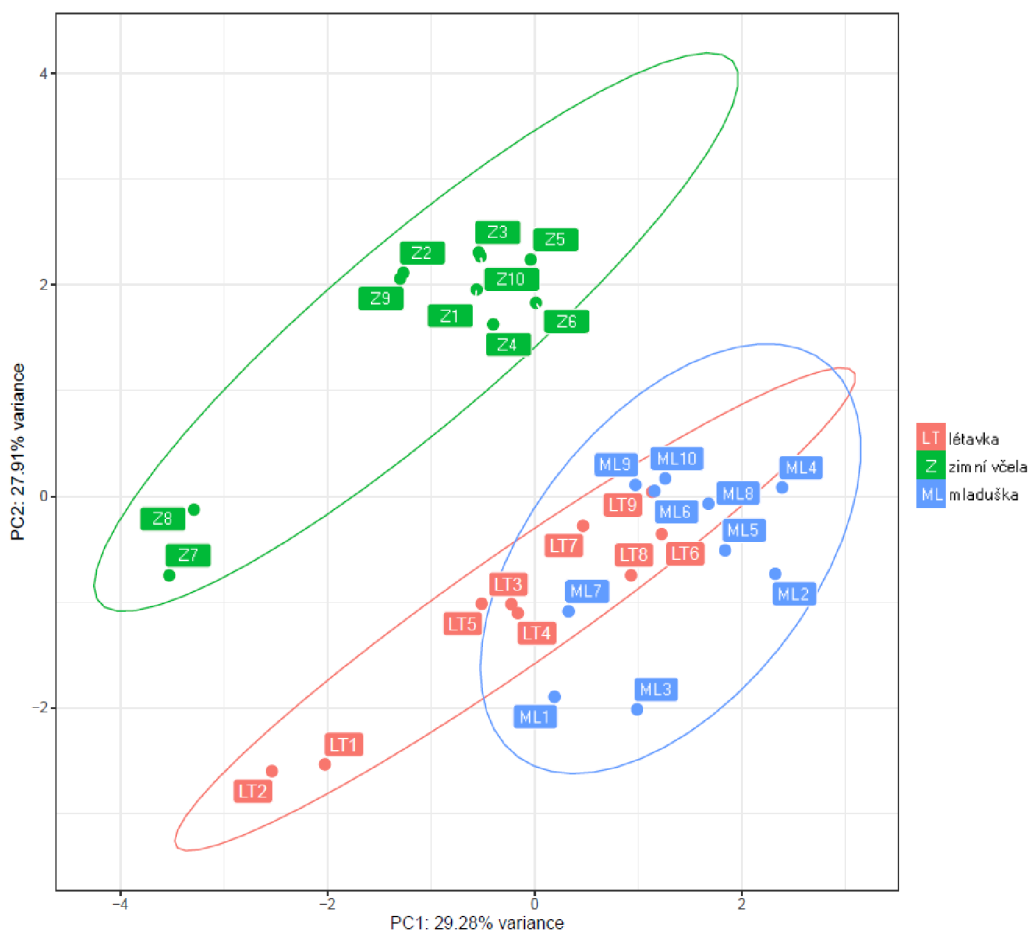
	↓ sig (vše)	↑ sig (vše)
létavky x zimní včely	13 (47)	5 (35)
mladušky x zimní včely	5 (39)	6 (43)
létavky x mladušky	4 (57)	1 (25)

Tab. VI: Seznam všech exprimovaných proteinů související s lysosomy, jejich zařazení dle KEGG databáze a procentuální příspěvek k varianci. Znázornění signifikatně odlišné (FDR <0,05) exprese pro danou porovnávanou dvojici: létavky x zimní včely (a), mladušky x zimní včely (b), létavky x mladušky (c).

zařazení	protein	podíl na varianci dle PC1 (%)	podíl na varianci dle PC2 (%)
Kyselé hydrolázy: glykosidázy	hyaluronidase precursor ^{a, b}	15,0605	0,0410
	putative glucosylceramidase 4 ^a	6,6575	1,8035
	beta-hexosaminidase subunit beta ^{a, b}	3,4259	0,0499
	alpha-N-acetylglucosaminidase ^c	1,5189	0,6224
	chitooligosaccharidolytic beta-N-acetylglucosaminidase	0,8700	0,0274
	lysosomal alpha-mannosidase	0,6390	1,1459
	beta-galactosidase	0,4941	0,1385
	glucosylceramidase-like	0,3845	1,8672
	beta-glucuronidase ^{b, c}	0,2505	0,2030
	lysosomal alpha-glucosidase	0,0918	2,4905
	alpha-N-acetylgalactosaminidase ^a	0,0279	4,8265
	alpha-L-fucosidase	0,0238	0,0016
beta-mannosidase	0,0002	0,1350	
Kyselé hydrolázy: sfingomyelinázy	sphingomyelin phosphodiesterase isoform X1 ^{a, b}	7,2984	1,0127
Sekundární proteiny membrány lysosomů	protein Malvolio isoform X1 ^{a, b}	7,2357	3,8446
	heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase ^{a, b}	5,0525	0,8410
	putative inorganic phosphate cotransporter ^{a, b}	2,8385	1,2145
	sialomucin core protein 24 ^a	2,5224	0,0882
	NPC intracellular cholesterol transporter 2 ^{a, b}	2,2404	2,0050
	MD-2-related lipid-recognition protein	2,2343	4,1222
	NPC intracellular cholesterol transporter 2 homolog a	1,7909	6,7797
	putative inorganic phosphate cotransporter ^b	1,7330	2,1369
	uncharacterized protein LOC724468 ^a	1,6281	0,0319
	NPC intracellular cholesterol transporter 1 homolog 1b	1,1776	0,0034
	sialin ^c	1,0107	4,5473
	NPC intracellular cholesterol transporter 2 homolog a	0,9470	0,1706
	lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha factor homolog ^{a, c}	0,6299	1,1500
	lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha factor homolog	0,2053	0,0849
	sialin	0,1254	1,4375
	heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase	0,1180	0,3300
	NPC intracellular cholesterol transporter 1	0,0962	1,5714
NPC intracellular cholesterol transporter 1	0,0180	0,2393	

	battenin	0,0018	0,0242
Kyselé hydrolyzy: proteazy	cathepsin L1 ^a	4,2295	0,1551
	putative cysteine proteinase CG12163 ^a	3,5200	0,0359
	lysosomal aspartic protease ^a	1,2377	8,1277
	cathepsin L1	0,9055	0,0120
	cathepsin O	0,7408	1,2814
Kyselé hydrolyzy: sulfataazy	arylsulfatase B ^{a, c}	3,7332	3,9871
	arylsulfatase B ^{a, b}	2,8180	2,5558
	arylsulfatase B	0,9030	0,1120
	iduronate 2-sulfatase	0,3751	0,1160
	N-sulphoglucosamine sulphohydrolase	0,2995	0,0218
	arylsulfatase B	0,0915	0,2104
	N-acetylglucosamine-6-sulfatase	0,0410	0,0079
Prim�rn� proteiny membrány lysosom�	sensory neuron membrane protein 1 ^a	3,5054	5,1379
	uncharacterized protein LOC412694	0,6579	1,0094
	CD63 antigen	0,2983	0,4244
	Tspan 6 (tetraspanin 6)	0,1009	3,0946
	lysosome-associated membrane glycoprotein 1	0,0263	2,3396
Regulace kysel�ho pH	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a	1,3991	0,0912
	V-type proton ATPase subunit H	0,3427	3,2594
	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a	0,2565	1,0477
	V-type proton ATPase 21 kDa proteolipid subunit	0,2428	0,8483
	V-type proton ATPase subunit d	0,0235	2,8662
	dmX-like protein 2	0,0120	0,2588
	uncharacterized protein LOC725661	0,0118	0,0372
	WD repeat-containing protein 7	0,0105	0,1022
Kyselé hydrolyzy: lipazy	lipase 3	1,3318	0,0005
	lipase 1 ^a	0,9181	0,1891
	lipase 3 ^b	0,5424	0,0009
	group XV phospholipase A2	0,1227	0,0706
	lysosomal acid lipase/cholesteryl ester hydrolase isoform X2	0,0599	0,1985
Kyselé hydrolyzy: nukleazy	deoxyribonuclease-2-alpha	0,8892	0,1403
Transport syntetizovan�ch enzym� do lysosomu	ADP-ribosylation factor-binding protein GGA3	0,3598	0,1704
	AP-1 complex subunit gamma-1	0,3056	3,7816
	N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase subunits alpha/beta	0,1762	0,0304
	Vha16	0,1720	0,0171
	AP-3 complex subunit beta-2	0,1024	0,3973
	AP-3 complex subunit mu-1	0,1010	6,6927
	AP-1 complex subunit mu-1	0,0939	0,6537
	cation-independent mannose-6-phosphate receptor	0,0848	0,1030
	AP-3 complex subunit sigma-2	0,0412	0,1138

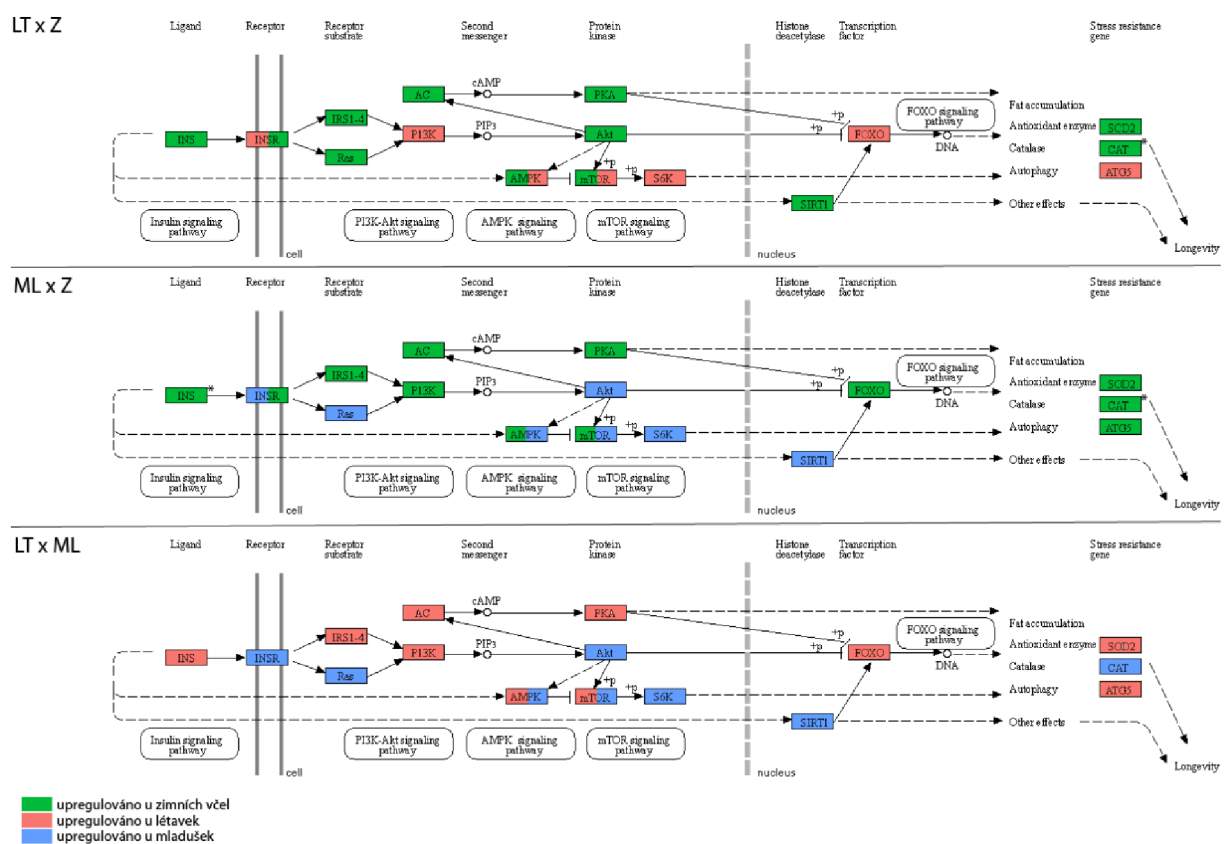
	AP-1 complex subunit beta-1	0,0315	0,5448
	AP-3 complex subunit delta-1	0,0218	0,0915
	clathrin heavy chain	0,0216	0,1918
	AP-1 complex subunit sigma-2	0,0005	1,1553
Kyselé hydrolázy: fosfatázy	prostatic acid phosphatase	0,2385	0,3565
Ostatní enzymy a aktivátory	formylglycine-generating enzyme	0,0991	0,0006
	palmitoyl-protein thioesterase 1	0,0960	0,4829
	lysosomal thioesterase PPT2 homolog	0,0401	1,5770
	prosaposin	0,0185	0,9123



Obr. 18: PCA pro geny související s dlouhověkostí (celkem 26 nalezených genů dle KEGG databáze) vysvětlující 57,19 % celkové variance dat. Osa x (PC1) vysvětluje 29,28 % variance a osa y (PC2) 27,91 % variance mezi skupinami (mladuška – ML, modrá; létavka – LT, červená; zimní včela – Z, zelená). Vzorky symbolizují tečky tukových těles (resp. jedince) zastupující danou skupinu.

U poslední PCA pro geny, které jsou součástí signálních drah související s dlouhověkostí (Obr. 18) přispívají k varianci v rámci PC1 největším podílem proteiny Adenylate cyclase type 6 (31,11 %), Insulin-like peptide 2 (18,23 %), Superoxide

dismutase 2 (5,46 %), Insulin-like peptide receptor 2 (4,24 %) a Insulin-like peptide receptor (4,07 %). V rámci PC2 jsou to Catalase (48,48 %), 5'-AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha-2 (11,67 %), nespecifikovaný protein LOC551512 (7,11 %), Insulin-like peptide receptor (6,35 %) a Insulin-like peptide 2 (3,88 %). Všechny proteiny, jejich rozdělení na pro a proti dlouhověkosti (viz kapitola 1.3.5) a příspěvek k varianci je zahrnut v tabulce níže (Tab. VII), včetně celkového znázornění diferenciální exprese v rámci dané dráhy. Byly také porovnány jednotlivě všechny tři skupiny mezi sebou a výsledek znázorněn (Obr. 19). Zde se z pohledu PC1 se mladušky, létavky i zimní včely vcelku prolínají, nicméně z pohledu PC2 jsou rozlišitelné alespoň zimní včely od mladušek a létavek s výjimkou vzorků Z7 a Z8.



Obr. 19: Diferenciální exprese jednotlivých genů zobrazená v kontextu signální dráhy dlouhověkosti dle KEGG databáze. Porovnání každé skupiny s každou (Z = zimní včely, LT = létavky, ML = mladušky), barevné znázornění relativně vyšší exprese pro danou skupinu (zelená = upregulováno u zimních včel, růžová = upregulováno u létavek, modrá = upregulováno u mladušek), kombinace obou barev značí různou expresi podjednotek daného proteinu). Hvězdičkou (*) vyznačena signifikantně (FDR <0,05) vyšší exprese.

Tab. VII: Seznam všech exprimovaných proteinů související s dlouhověkostí a jejich procentuální příspěvek k varianci. Znázornění signifikantně odlišné (FDR <0,05) exprese pro danou porovnávanou dvojici: létavky x zimní včely (a), mladušky x zimní včely (b), létavky x mladušky (c).

protein	podíl na varianci dle PC1 (%)	podíl na varianci dle PC2 (%)
adenylate cyclase type 6	31,1104	3,5855
insulin-like peptide 2 ^b	18,2335	3,8818
insulin-like peptide receptor 2	4,2443	0,7253
insulin-like peptide receptor	4,0732	6,3476
ras-like protein 1	3,9262	0,1309
cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit	3,3540	2,7278
regulatory-associated protein of mTOR	2,8151	0,0000
RAC serine/threonine-protein kinase	2,0998	0,5185
adenylate cyclase type 3	1,8028	0,1246
adenylate cyclase type 2	0,9750	0,6061
adenylate cyclase type 9	0,9376	0,1642
phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha	0,9008	1,3379
phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta	0,8893	2,5409
adenylate cyclase type 8-like	0,7089	1,3181
insulin receptor substrate 1-B	0,4924	0,0512
serine/threonine-protein kinase mTOR	0,3332	0,0002
uncharacterized protein LOC551512	0,0025	7,1058
ribosomal protein S6 kinase beta-1	3,9577	1,3113
superoxide dismutase 2	5,4580	0,6943
5'-AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha-2	3,8950	11,6697
autophagy protein 5	2,8396	1,5066
NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-1	2,7407	0,1883
catalase ^{a, b}	2,0159	48,4770
forkhead box protein O	1,3464	0,1493
5'-AMP-activated protein kinase subunit beta-2	0,8474	2,2019
uncharacterized protein LOC724442	0,0004	2,6349

5 Diskuze

Uvnitř kolonií včely medonosné existují těsné sociální vazby, díky kterým někdy bývá včelstvo označováno jako superorganismus. Každá včela supluje jednu buňku specializovanou ke specifickým úkonům a dohromady vytvářejí součinně fungující soustavu. Je proto obtížné sledovat vliv pouze jednoho faktoru, který kolonii ovlivňuje, vzhledem k vysoké míře její komplexnosti a schopnosti se stejně tak součinně a dynamicky přizpůsobovat celé řadě podnětů (Seeley, 1995).

V této práci byla pozornost směřována na faktor environmentální, respektive vliv sezóny na tukové těleso včelí dělnice. Je známo, že se během roku vyskytují v úlu dvě generace dělnic, letní krátkověká a zimní dlouhověká, které se mezi sebou liší hned v několika parametrech (Fluri et al., 1982; Döke et al., 2015; Kešnerová et al., 2020; Dostálková et al., 2021; Lee et al., 2022). Zatímco ta letní se rozděluje na dva hlavní fenotypy, kterými jsou mladušky a létavky, vykazující věkový polyetismus a tedy plnící mnoho rozličných úkolů, úkon té zimní generace spočívá pouze v přežití v teple úlu od podzimu do nadcházejícího jara (Amdam a Omholt, 2002; Döke et al., 2015). Určitým předpokladem v této práci bylo, že zimní včely budou kombinací obou letních fenotypů, zčásti mladušek a zčásti létavek. Podobnost zimních včel s mladuškami totiž spočívá v tom, že se obě skupiny zdržují výhradně v úlu, také v jejich relativně vysokých hladinách vitelogeninu a naopak nízkých hladinách juvenilního hormonu (Huang a Robinson, 1994; Amdam et al., 2004; Harwood et al., 2017). Na druhou stranu je zde jistá podobnost zimních včel s létavkami, co se týče jejich velkého zatížení létacích svalů, ať už je to pro samotný let nebo pro generování tepla (Harrison a Fewell, 2002; Stabentheiner et al., 2003). Na základě publikovaných studií se předpokládá, že vliv sezóny je zprostředkovaný zejména nepřítomností plodu a jeho feromonu (Amdam et al., 2009; Eyer et al., 2017; Feliciano-Cardona et al., 2020), dále také sníženou dostupností pylu a nektaru z venkovních zdrojů (Matilla a Otis, 2007), a to vlivem teploty a fotoperiody (Knoll et al., 2020). Od tohoto působení se pak odvíjí změny hned v několika již zmíněných parametrech doprovázejících dlouhověkost včelích dělnic.

Primárně jsme vycházeli z výsledků získaných naší laboratoří v Koubová et al. (2021), kde byla pozornost zaměřena na tukové těleso a sezónní proměnlivost jeho parametrů, s tím, že byla snaha výsledky této práce rozšířit o další poznatky. Souhrnně, byla mou diplomovou prací potvrzena celkově vyšší hmotnost tukového tělesa u zimních včel v porovnání s letními, s tím, že nesignifikantní rozdíly byly pozorovány ve srovnání mezi středem a periferií zimních včel a stejně tak mezi létavkami a mladuškami. Ve shodě s předcházející studií byl pozorován větší

obsah buněk i jader zimních včel v porovnání s letními včelami. Stejně byly zaznamenány signifikantní rozdíly zejména v koncentraci cukrů, částečně i proteinů v tukovém tělese a žádné rozdíly nebyly v koncentraci lipidů.

Při srovnání mladušek a létavek byly pozorovány statisticky signifikantní rozdíly v případě stanovení živin, což je pochopitelné vzhledem k rozdílné metabolické aktivitě daných včel odvíjející se od jejich stylu života. Mladušky se zdržují pouze uvnitř úlu, starají se o skladování zásob nektaru i pylu a krmí plod a královnu nutričně bohatou kašičkou. Relativně nejnižší koncentrace živin právě v hemolymfě mladušek ukazují, že mobilizace zásobních živin je u nich minimální, což je vcelku logické. Překvapivé jsou naopak výsledky hladiny živin v tukovém tělese mladušek, které byly relativně nízké. Na vině může být odběr mladušek příliš nízkého věku, které si ještě nestihly vytvořit dostatečné zásoby nebo že veškeré živiny jsou u mladušek ihned zpracovávány hypofaryngeálními žlázami (Münch a Amdam, 2010), případně že byly mladušky ve věku, kdy už probíhá příprava v přechod na létavku (Crailsheim et al., 1992; Amdam a Omholt, 2002). Přechod z mladušky v létavku je spojen s celkovým rychlým úbytkem zásobních živin (zejména tuku) a naopak upřednostnění rychle dostupných zdrojů energie pro let (Sacktor, 1970; Toth a Robinson, 2005). To dokládá pozorovaná koncentrace cukrů v hemolymfě, která u létavek dosahuje asi 33násobně vyšších hladin v porovnání s mladuškami. Dále i relativně vysoká koncentrace lipidů v jejich hemolymfě pravděpodobně ukazuje na degradaci tukových zásob, to vše odpovídá dřívějšímu pozorování v práci Ament et al. (2011). Hemolymfa létavek dosahuje nejvyšších hladin proteinů, což nasvědčuje, že proteiny mohou sloužit jako energetický substrát pro létací svaly, a je v souladu s pozorováním v práci Micheu et al. (2000), a to navzdory tomu, že létavky konzumují mnohem nižší množství pylu, který je zdrojem proteinů, a také vykazují mnohem nižší hladiny glykolipoproteinu vitelogeninu (Crailsheim et al., 1992; Toth et al., 2005). Koncentrace živin v tukovém tělese létavek je pak zhruba podobná s tou u zimních včel, jedinou odlišností je vyšší koncentrace glykogenu u létavek v porovnání se zimními včelami z periferie. Ačkoliv obecně platí, že včely upřednostňují cukry jakožto hlavní zdroj energie a hladiny glykogenu jsou u nich nízké (Hrassnigg a Crailsheim, 2005), s čímž souhlasí i naše výsledky, lze sledovat relativně nejvyšší akumulaci glykogenu u mladých létavek, s jejich přibývajícím věkem naopak množství glykogenu klesá. To může být způsobeno nižší schopností starých včel glykogen syntetizovat (Neukirch, 1982). V zimních měsících pak včely neustále cirkulují v zimním chomáči, přičemž ty v jeho středu vykonávají nejintenzivnější svalovou práci. Výsledky této práce ukazují, že právě u těchto aktivních včel dosahují koncentrace živin v hemolymfě srovnatelně vysokých

hodnot jako u létavek, což koresponduje s výsledky z publikace Kodrík et al. (2022). Vysílené včelí dělnice se pak přesouvají k periferiím chomáče, aby opět zregenerovaly a načerpaly energii ze zásob v úlu, kterou spálily, což lze vidět i na našich výsledcích týkajících se koncentrací živin v tukovém tělese. Při porovnání včel z periferie s těmi ze středu chomáče u nich zásoby živin dosahují signifikantně nižších hladin. Panzenbock a Crailsheim (1996) ovšem zaznamenali trend opačný, a sice takový, že včely z periferie dosahují vyšších hladin glykogenu než včely ze středu. Dlužno dodat, že k rozlišování různých skupin včelích dělnic, ať letních či zimních, dle jejich dělby práce se pojí určité riziko správného odběru vzorků k analýze. Představa o rozdělení činností v úlu na základě stáří dělnic je spíše teoretická a v praxi se rozdíly mezi mladuškou a létavkou mohou snadno smývat (Huang a Robinson, 1996). Stejně tak mohou být zaměnitelné vzorky zimních včel vzhledem k jejich neustále se měnící pozici v rámci chomáče, přičemž přesuny včel se dějí nezávisle na sobě a nejsou nikterak synchronizované (Stabentheiner et al., 2003). Navíc každý vnější zásah do úlu v zimní sezóně, kdy je počet včelích dělnic oproti létu značně redukován, může být pro včelstvo fatální. Pravděpodobně přesnější výsledky by poskytlo odebrání včelích dělnic až na základě dlouhodobějšího pozorování jejich konání, to je ale hůře prakticky proveditelné.

Co se týče vzhledu tukového tělesa, byly zde zaznamenány jeho výrazné proměny nejen v rámci vývoje sezóny (léto a zima), ale také v rámci vývoje jedince (mladuška a létavka). V nedávno publikované práci Strachecka et al. (2021) bylo navíc zjištěno, že se tukové těleso liší i v závislosti na lokalizaci v rámci abdomenu, což v mé práci zohledněno nebylo. Přesto mé výsledky ukazují, že buňky tukového tělesa svou strukturou dobře odrážejí momentální stav a potřeby organismu. Jedním z hlavních rysů, který zde byl pozorován, byla akumulace lipofuscinu v oenocytech zimních včel. Lipofuscin je nedegradovatelný pigment uvnitř lysosomů skládající se z oxidovaných proteinů, lipidů či kovů (Höhn a Grune, 2013). Lysosomy jsou organely ohraničené dvojitou membránou, vyznačující se nízkým pH a obsahující několik desítek hydrolytických enzymů, které jsou syntetizovány na hrubém endoplasmatickém retikulu a jejich transport je zprostředkován Golgiho aparátem. Jsou zodpovědné za degradaci a recyklaci makromolekul, případně celých organel, čímž se významně podílí na energetické homeostáze buňky (Mony et al., 2016). Množství lipofuscinu v buňce, nedělí-li se tato buňka dále, se zvyšuje s přibývajícím věkem organismu a rovněž při zvýšeném oxidačním stresu, a proto bývá akumulace lipofuscinu označována za znak senescence. Nadměrná akumulace lipofuscinu v buňce má pravděpodobně negativní vliv na její funkce (Brunk a Terman, 2002). Zvyšující se akumulaci s přibývajícím věkem včel dosvědčují výsledky práce Hsieh a Hsu

(2011), kteří pozorovali četnější lipofuscinová granula v tukovém tělese starých včelích královen v porovnání s mladými královnami. Vysoká kumulace lipofuscinu byla také zaznamenána v hypofaryngeálních žlázách starých létavek, která souvisí s funkčním poklesem této žlázy. Naproti tomu u mladušek bylo jeho množství minimální (Münch et al., 2013). Relativně největší nahromadění lipofuscinu bylo v oenocytech tukového tělesa u zimních dělnic, což tedy patrně souvisí s jejich relativně nejvyšším věkem. Počátky formování lipofuscinových granul byly pak zachyceny rovněž v buňkách oenocytů létavek, u nichž bylo zaznamenáno několik autolysosomů. Autolysosomy vznikají splynutím autofagosomu, který obsahuje fagocytovaný materiál intracelulárního původu s lysosomem. Jedná se nejčastěji o poškozené orgány, například mitochondrie (Obr.10). Ke stimulaci autofagických procesů dochází při zvýšeném působení oxidačního stresu anebo hladovění (He a Kliensky, 2009; Jung et al., 2019), které lze předpokládat u létavek vzhledem k jejich vyšším energetickým nárokům (Amdam a Omholt, 2003; Margotta et al., 2018). Zimní včely se vyznačovaly také četnými proteinovými granulemi v buňkách trofocytů, přičemž abundance těchto proteinových granul by odpovídala vysokým hladinám proteinů v tukovém tělese, které jsem sledovala, zejména u včel ze středu chomáče, a taky všeobecně známou skutečností, že u zimních včel v jejich tukovém tělese dochází k extrémním nárůstům syntézy vitelogeninu (Koubova et al. 2021). Dalším význačným rysem byla drobná tmavá granula v cytoplazmě trofocytů létavek, pravděpodobně se jedná o zrna glykogenu (Chen et al., 2015), avšak může se jednat i o depozita pigmentu melaninu (Wall a Meleka, 1985). Přítomnost glykogenu v tukovém tělese právě u létavek by ovšem korespondovala se zmíněnou studií Neukirch (1982) a s výsledky mé práce. Význačným rysem v trofocytech mladušek byly vakuolární vesikuly. Jak naznačuje dostupná literatura, mohlo by se jednat o pozůstatky z larválního stádia včely s trávicí a skladovací funkcí. Vzhledem k tomu, že barvení na lipidy s obsahem těchto struktur nereagovalo, mohl by být jejich obsah tvořen například proteiny anebo tyrosinem (Roma et al., 2010; Skowronek et al., 2021). Tato aminokyselina je složkou mateří kašičky a jedná se o prekurzor biogenního aminu dopaminu, který ovlivňuje funkci nervové soustavy. U včel má vliv na plodnost či chování, a tak se významně podílí na sociální organizaci včelí kolonie (Sasaki et al., 2020; Sasaki a Watanabe, 2022).

Posledním aspektem, kterým se tato práce zabývala, byly změny v tukovém tělese na úrovni transkripce. Výsledná vizualizace dat z RNA exprese s užitím PCA ukazuje, že celkový transkripční profil zimních včel se jednoznačně odlišuje od transkripčního profilu mladušek a létavek. To je v rozporu s výsledky práce Bresnahan et al. (2021), kde byla zjištěna větší

podobnost genové exprese v tukovém tělese mladušek s expresí v tukovém tělese zimních včel a létavky se odlišovaly, ovšem důvod tohoto nesouladu je těžko specifikovat. Nicméně podíváme-li se na výsledky v mojí práci blíže, největší podíl na odlišnosti zimních včel od mladušek a létavek mají některé složky včelího jedu (Mast Cell Degranulating Peptide, Apamin a Melittin), dále protein podílející se na vzniku a udržování kutikuly (Pupal Cuticle Protein – PCP), a nakonec prekurzor antibakteriálního peptidu zvaný Abaecin (Casteels et al., 1990; Soares et al., 2007). Jak naznačují dostupné publikace týkající se včelího jedu, jeho složení se mění v závislosti na kastě, věku včely a sezóně. U včelích dělnic ale všeobecně platí, že je největší sekreční aktivita jedové žlázy pozorována kolem 16. dne života, kdy se včela pomalu připravuje na přechod v létavku pohybující se v prostředí mimo úl, kde je funkční žihadlové ústrojí k obraně potřeba (Danneels et al., 2015; Abd El-Wahed et al., 2019). Tudíž se dá zde odlišná exprese zimních včel předpokládat. Stejně tak lze očekávat odlišnou expresi antibakteriálních peptidů dle výsledků práce Dostálková et al. (2021), kde pozorovali robustnější imunitní odpověď zimních včel na přítomnost patogena bakteriálního původu v porovnání s letními včelami. A na konec PCP, ten je složkou kutikuly hmyzu nejen ve fázi kukly, jak název napovídá, ale jeho exprese je detekovatelná i v dospělosti (Soares et al., 2007). V práci Li a Denlinger (2009) zaznamenali zvýšené množství PCP zároveň s nástupem diapauzy u komára rodu *Culex* a poukázali na možnou souvislost silnější kutikuly s větší odolností vůči stresu během tohoto nepříznivého období, což naznačuje určitou podobnost s podmínkami, se kterými se potýká i zimní včela (Van Nerum a Buelens, 1997). Na základě snímků z transmisního elektronového mikroskopu jsme se rozhodli pro následnou analýzu exprese zaměřit na geny zahrnuté do fungování lysosomů. PCA těchto genů poskytla také rozlišení zimních včel od létavek a mladušek v rámci PC1. Největší podíl na této varianci měly glykosidázy hydrolyzující sacharidy, dále sekundární proteiny tvořící membránu lysosomů a také sfingomyelináza štěpící sfingomyelin, který se nachází v buněčných membránách (Tab. VI). Při vzájemném porovnání exprese (Tab. V) mezi skupinami jsem zjistila, že aktivita genů spjatých s biologií lysosomů je nejvíce podpořená u mladušek, poté u zimních včel a nejméně u létavek. Lze diskutovat o tom, do jaké míry zvýšená aktivita lysosomů u zimních včel, alespoň v porovnání s létavkami, přispívá ke zvýšené přítomnosti lipofuscinu u těchto včel. Relativně nejvyšší aktivita lysosomálních genů u mladušek by mohla být vysvětlena studií Raikhel (1986), která naznačuje, že se lysosomy svou činností podílí také na regulaci hladin vitelogeninu jeho degradací. A tak by zvýšená exprese lysosomálních genů u mladušek mohla souviset s přípravou na přechod v létavku (Harwood et al., 2017). Další PCA byla zaměřena na geny, které jsou součástí tzv. dráhy dlouhověkosti. Ta poskytla odlišení transkripčního profilu

zimních včel (až na dvě výjimky) v rámci PC2, na které měla jednoznačně největší procentuální podíl kataláza (48,477 %), jejíž diferenciální exprese byla navíc potvrzena jako signifikantní. Vyšší aktivitu katalázy u zimní populace včel v porovnání s letní sledovali i v práci Orčić et al. (2017). Kataláza je enzym přeměňující peroxid vodíku (kyslíkový radikál), vznikající jako vedlejší produkt při oxidačních reakcích (např. oxidace mastných kyselin) na vodu a kyslík, čímž ochraňuje buňku před působením oxidačního stresu. Pokud převáží produkce kyslíkových radikálů nad jejich degradací, dochází k narušení normálních buněčných funkcí zejména vlivem poškození proteinů a jejich katalytické aktivity, dále poškození nukleových kyselin nebo lipidů, které jsou součástí membrán, což může mít za následek až buněčnou smrt (Nikolić et al., 2015). Vyšší exprese katalázy u zimních včel v porovnání s létavkami zcela jistě přispívá k dlouhodobému zimnímu fenotypu (Weirich et al., 2002; Cutler, 2005; Korayem et al., 2012). Lze předpokládat, že zimní včely dokážou zvýšenou aktivitou katalázy lépe reagovat na hromadící se lipofuscin v buňkách oenocytů (Obr. 8). Lipofuscin totiž činí lysosomy vzhledem ke svému vysokému obsahu kovů citlivější na působení oxidačního stresu. Dojde-li ke styku peroxidu vodíku, který do lysosomu může volně difundovat, se železnatým iontem, je výsledným produktem této tzv. Fentonovy reakce vysoce aktivní hydroxylový radikál. Ten může až destabilizovat membránu lysosomu a může dojít k úniku obsažených hydroláz, které buňku nenávratně poškodí (Kurz et al., 2008). Nicméně, celkové znázornění exprese dráhy dlouhověkosti jinak nepřineslo signifikantní a jednoznačné výsledky. Je ovšem nutné poznamenat, že k výsledkům RNA exprese je potřeba přistupovat obezřetně. Platí totiž, že změny na úrovni transkripce ještě nemusejí znamenat změny na úrovni proteinů (Vogel a Marcotte, 2012). Avšak tato data mohou posloužit jako základ pro další výzkum, jelikož mohou nastínit, jakým směrem se ubírat, a na co se dále zaměřit.

6 Závěr

Tato práce potvrdila, že tukové těleso je dynamicky se proměňující tkáň, která věrně odráží stav organismu. Tukové těleso ovlivňuje celkový nutriční stav včely, její hormonální rovnováhu či rychlost stárnutí a nabývá na důležitosti s nastupující zimní sezónou. Na základě různých parametrů tukového tělesa je možno odlišit tři hlavní fenotypy dělnic: mladušky, létavky a zimní včely. Výsledky potvrdily, že tukové těleso má větší rozměry v zimních měsících, s tím, že navzdory dlouhověkému fenotypu zimních včel, buňky tukového tělesa zimních včel nesou znaky senescence (přítomnost lipofuscinu) a že celkově ultrastruktura buněk a obsah živin tukového tělesa se liší s každým fenotypem a je doplněna změnami na úrovni exprese genů.

7 Reference

- Abd El-Wahed, A. A., Khalifa, S. A. M., Sheikh, B. Y., Farag, M. A., Saeed, A., Larik, F. A., Koca-Caliskan, U., AlAjmi, M. F., Hassan, M., Wahabi, H. A., Hegazy, M. -E. F., Algethami, A. F., Büttner, S., El-Seedi, H. R. (2019). *Bee Venom Composition: From Chemistry to Biological Activity*. Elsevier, s. 459-484.
- Abou-Shaara, H. F. (2014). The foraging behaviour of honey bees, *Apis mellifera*: a review. *Veterinárni Medicína*, 59(1), s. 1-10.
- Abou-Shaara, H. F., Owayss, A. A., Ibrahim, Y. Y., Basuny, N. K. (2017). A review of impacts of temperature and relative humidity on various activities of honey bees. *Insectes Sociaux*, 64(4), s. 455-463.
- Abou-Shaara, H. F., Adgaba, N., Al-Ghamdi, A. A. (2021). Current knowledge about behaviors of honey bee queens with highlighting of the importance future studies. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 82(1).
- Alaux, C., Maisonnasse, A., Le Conte, Y. (2010). Pheromones in a Superorganism. In *Pheromones*, Elsevier, s. 401-423.
- Amdam, G. V., a, Omholt, S. W. (2003). The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis. *Journal of Theoretical Biology*, 223(4), s. 451-464.
- Amdam, G. V., a Omholt, S. W. (2002). The Regulatory Anatomy of Honeybee Lifespan. *Journal of Theoretical Biology*, 216(2), s. 209-228.
- Amdam, G. V., Rueppell, O., Fondrk, M. K., Page, R. E., Nelson, C. M. (2009). The nurse's load: Early-life exposure to brood-rearing affects behavior and lifespan in honey bees (*Apis mellifera*). *Experimental Gerontology*, 44(6-7), s. 467-471.
- Amdam, G. V., Simões, Z. L. P., Hagen, A., Norberg, K., Schröder, K., Mikkelsen, Ø., Kirkwood, T. B. L., Omholt, S. W. (2004). Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Experimental Gerontology*, 39(5), s. 767-773.
- Ament, S. A., Corona, M., Pollock, H. S., Robinson, G. E. (2008). Insulin signaling is involved in the regulation of worker division of labor in honey bee colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(11), s. 4226-4231.
- Ament, S. A., Chan, Q. W., Wheeler, M. M., Nixon, S. E., Johnson, S. P., Rodriguez-Zas, S. L., Foster, L. J., Robinson, G. E. (2011). Mechanisms of stable lipid loss in a social insect. *Journal of Experimental Biology*, 214(22), s. 3808-3821.
- Apfeld, J., O'Connor, G., McDonagh, T., DiStefano, P. S., Curtis, R. (2004). The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans*. *Genes & Development*, 18(24), s. 3004-3009.
- Arrese, E. L., a Soulages, J. L. (2010). Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. *Annual Review of Entomology*, 55(1), s. 207-225.
- Aurori, C. M., Buttstedt, A., Dezmiorean, D. S., Mărghitaş, L. A., Moritz, R. F. A., Erler, S. (2014). What Is the Main Driver of Ageing in Long-Lived Winter Honeybees: Antioxidant

- Enzymes, Innate Immunity, or Vitellogenin?. *The Journals of Gerontology: Series A*, 69(6), s. 633-639.
- Azeez, O. I., Meintjes, R., Chamunorwa, J. P. (2014). Fat body, fat pad and adipose tissues in invertebrates and vertebrates: the nexus. *Lipids in Health and Disease*, 13(1).
- Becher, M. A., Scharpenberg, H., Moritz, R. F. A. (2009). Pupal developmental temperature and behavioral specialization of honeybee workers (*Apis mellifera* L.). *Journal of Comparative Physiology A*, 195(7), s. 673-679.
- Bernadotte, A., Mikhelson, V. M., Spivak, I. M. (2016). Markers of cellular senescence. Telomere shortening as a marker of cellular senescence. *Aging*, 8(1), s. 3-11.
- Beshers, S. N., a Fewell, J. H. (2001). Models of Division of Labor in Social Insect. *Annual Review of Entomology*, 46(1), s. 413-440.
- Blacher, P., Huggins, T. J., Bourke, A. F. G. (2017). Evolution of ageing, costs of reproduction and the fecundity–longevity trade-off in eusocial insects. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1858).
- Bomtorin, A. D., Mackert, A., Rosa, G. C. C., Moda, L. M., Martins, J. R., Bitondi, M. M. G., Hartfelder, K., Simões, Z. L. P., Korb, J. (2014). Juvenile Hormone Biosynthesis Gene Expression in the corpora allata of Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Female Castes. *PLoS ONE*, 9(1).
- Brunk, U. T., s Terman, A. (2002). Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function12 1Guest Editor. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(5), s. 611-619.
- Canciani, M., Arnellos, A., Moreno, A. (2019). Revising the Superorganism: An Organizational Approach to Complex Eusociality. *Frontiers in Psychology*, 10.
- Casteels, P., Ampe, C., Riviere, L., Damme, J., Elicone, C., Fleming, M., Jacobs, F., Tempst, P. (1990). Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *European Journal of Biochemistry*, 187(2), s. 381-386.
- Corona, M., Velarde, R. A., Remolina, S., Moran-Lauter, A., Wang, Y., Hughes, K. A., Robinson, G. E. (2007). Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(17), s. 7128-7133.
- Crailsheim, K., Schneider, L. H. W., Hrassnigg, N., Bühlmann, G., Brosch, U., Gmeinbauer, R., Schöffmann, B. (1992). Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): Dependence on individual age and function. *Journal of Insect Physiology*, 38(6), s. 409-419.
- Cutler, R. G. (2005). Oxidative Stress and Aging: Catalase Is a Longevity Determinant Enzyme. *Rejuvenation Research*, 8(3), s. 138-140.
- Danneels, E., Van Vaerenbergh, M., Debyser, G., Devreese, B., de Graaf, D. (2015). Honeybee Venom Proteome Profile of Queens and Winter Bees as Determined by a Mass Spectrometric Approach. *Toxins*, 7(11), s. 4468-4483.

- Döke, M. A., Frazier, M., Grozinger, C. M. (2015). Overwintering honey bees: biology and management. *Current Opinion in Insect Science*, 10, s. 185-193.
- Döke, M. A., McGrady, C. M., Otieno, M., Grozinger, C. M., Frazier, M. (2019). Colony Size, Rather Than Geographic Origin of Stocks, Predicts Overwintering Success in Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) in the Northeastern United States. *Journal of Economic Entomology*, 112(2), s. 525-533.
- Dostálková, S., Dobeš, P., Kunc, M., Hurychová, J., Škrabišová, M., Petřivalský, M., Titěra, D., Havlík, J., Hyršl, P., Danihlík, J. (2021). Winter honeybee (*Apis mellifera*) populations show greater potential to induce immune response than summer ones after immune stimuli. *Journal of Experimental Biology*, 224(3).
- Elekonich, M. M., a Roberts, S. P. (2005). Honey bees as a model for understanding mechanisms of life history transitions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 141(4), s. 362-371.
- Evangelou, K., a Gorgoulis, V. G. (2017). Sudan Black B, The Specific Histochemical Stain for Lipofuscin: A Novel Method to Detect Senescent Cells. In M. A. Nikiforov (Ed.), *Oncogene-Induced Senescence*, Springer New York, s. 111-119.
- Eyer, M., Dainat, B., Neumann, P., Dietemann, V. (2017). Social regulation of ageing by young workers in the honey bee, *Apis mellifera*. *Experimental Gerontology*, 87, s. 84-91.
- Feliciano-Cardona, S., Döke, M. A., Aleman, J., Agosto-Rivera, J. L., Grozinger, C. M., Giray, T. (2020). Honey Bees in the Tropics Show Winter Bee-Like Longevity in Response to Seasonal Dearth and Brood Reduction. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8.
- Fluri, P., Lüscher, M., Wille, H., Gerig, L. (1982). Changes in weight of the pharyngeal gland and haemolymph titres of juvenile hormone, protein and vitellogenin in worker honey bees. *Journal of Insect Physiology*, 28(1), s. 61-68.
- Free, J. B., a Spencer-Booth, Y. (1959). The Longevity of Worker Honey Bees (*Apis mellifera*). *Proceedings of the Royal Entomological Society of London. Series A, General Entomology*, 34(10-12), s. 141-150.
- Fukuda, H., a Sekiguchi, K. (1966). Seasonal Change of the Honeybee Worker Longevity in Sapporo, North Japan, with Notes on Some Factors Affecting the Life-Span. *Japanese Journal of Ecology*, 16(5), s. 206-212.
- Guidugli, K. R., Nascimento, A. M., Amdam, G. V., Barchuk, A. R., Omholt, S., Simões, Z. L. P., Hartfelder, K. (2005). Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. *FEBS Letters*, 579(22), s. 4961-4965.
- Hansen, M., Rubinsztein, D. C., Walker, D. W. (2018). Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(9), s. 579-593.
- Harrison, J. F., a Fewell, J. H. (2002). Environmental and genetic influences on flight metabolic rate in the honey bee, *Apis mellifera*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 133(2), s. 323-333.
- Hartfelder, K., a Emlen, D. J. (2012). Endocrine Control of Insect Polyphenism. In *Insect Endocrinology*, Elsevier, s. 464-522.

- Harwood, G. P., Ihle, K. E., Salmela (nee Havukainen), H., & Amdam, G. V. (2017). Regulation of Honeybee Worker (*Apis mellifera*) Life Histories by Vitellogenin. In *Hormones, Brain and Behavior*, Elsevier, s. 403-420.
- Hauerland, N. H., a Shirk, P. D. (1995). Regional and Functional Differentiation in the Insect Fact Body. *Annual Review of Entomology*, 40(1), s. 121-145.
- Havukainen, H., Münch, D., Baumann, A., Zhong, S., Halskau, Ø., Krogsgaard, M., Amdam, G. V. (2013). Vitellogenin Recognizes Cell Damage through Membrane Binding and Shields Living Cells from Reactive Oxygen Species. *Journal of Biological Chemistry*, 288(39), s. 28369-28381.
- Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 37(3), s. 614-636.
- He, C., a Klionsky, D. J. (2009). Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annual Review of Genetics*, 43(1), s. 67-93.
- Hilde, R. A. E. S., Jacobs, F., Mastyn, E. (1985). A preliminary qualitative and quantitative study of the microscopic structure of the dorsal fat body in adult honeybees (*Apis mellifera* L.), including a technique for the preparation of whole sections. *Apidologie*, 16(3), s. 275-290.
- Höhn, A., a Grune, T. (2013). Lipofuscin: formation, effects and role of macroautophagy. *Redox Biology*, 1(1), s. 140-144.
- Hoover, S. E. R., Keeling, C. I., Winston, M. L., Slessor, K. N. (2003). The effect of queen pheromones on worker honey bee ovary development. *Naturwissenschaften*, 90(10), s. 477-480.
- Hopkins, B. K., Chakrabarti, P., Lucas, H. M., Sagili, R. R., Sheppard, W. S., Johnson, R. (2021). Impacts of Different Winter Storage Conditions on the Physiology of Diutinus Honey Bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, 114(1), s. 409-414.
- Hsieh, Y. -S., a Hsu, C. -Y. (2011). The changes of age-related molecules in the trophocytes and fat cells of queen honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 42(6), s. 728-739.
- Huang, Z. -Y., a Robinson, G. E. (1996). Regulation of honey bee division of labor by colony age demography. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 39(3), s. 147-158.
- Huang, Z. -Y., Robinson, G. E., Tobe, S. S., Yagi, K. J., Strambi, C., Strambi, A., Stay, B. (1991). Hormonal regulation of behavioural development in the honey bee is based on changes in the rate of juvenile hormone biosynthesis. *Journal of Insect Physiology*, 37(10), s. 733-741.
- Chen, R. J., Zhang, G., Garfield, S. H., Shi, Y. -J., Chen, K. G., Robey, P. G., Leapman, R. D., Lako, M. (2015). Variations in Glycogen Synthesis in Human Pluripotent Stem Cells with Altered Pluripotent States. *PLOS ONE*, 10(11).
- Ilyasov, R., Gaifullina, L., Saltykova, E., Poskryakov, A., Nikolenko, A. (2012). Review of the Expression of Antimicrobial Peptide Defensin in Honey Bees *Apis Mellifera* L. *Journal of Apicultural Science*, 56(1).
- Jarvis, J. U. M. (1981). Eusociality in a Mammal: Cooperative Breeding in Naked Mole-Rat Colonies. *Science*, 212(4494), s. 571-573.

- Johnson, B. R. (2010). Division of labor in honeybees: form, function, and proximate mechanisms. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 64(3), s. 305-316.
- Jung, M., Choi, H., Mun, J. Y. (2019). The autophagy research in electron microscopy. *Applied Microscopy*, 49(1).
- Keeling, C. I., Slessor, K. N., Higo, H. A., Winston, M. L. (2003). New components of the honey bee (*Apis mellifera* L.) queen retinue pheromone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(8), s. 4486-4491.
- Keller, L. (1998). Queen lifespan and colony characteristics in ants and termites. *Insectes Sociaux*, 45(3), s. 235-246.
- Keller, L., a Jemielity, S. (2006). Social insects as a model to study the molecular basis of ageing. *Experimental Gerontology*, 41(6), s. 553-556.
- Kennedy, A., Herman, J., Rueppell, O. (2021). Reproductive activation in honeybee (*Apis mellifera*) workers protects against abiotic and biotic stress. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 376(1823).
- Kešnerová, L., Emery, O., Troilo, M., Liberti, J., Erkosar, B., Engel, P. (2020). Gut microbiota structure differs between honeybees in winter and summer. *The ISME Journal*, 14(3), s. 801-814.
- Knight, J. A., Anderson, S., Rawle, J. M. (1972). Chemical Basis of the Sulfo-phospho-vanillin Reaction for Estimating Total Serum Lipids. *Clinical Chemistry*, 18(3), s. 199-202.
- Knoll, S., Pinna, W., Varcasia, A., Scala, A., Cappai, M. G. (2020). The honey bee (*Apis mellifera* L., 1758) and the seasonal adaptation of productions. Highlights on summer to winter transition and back to summer metabolic activity. A review. *Livestock Science*, 235.
- Kodrík, D., Krišťufek, V., Svobodová, Z. (2022). Bee year: Basic physiological strategies to cope with seasonality. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 264.
- Koeniger, N., a Koeniger, G. (2007). Mating flight duration of *Apis mellifera* queens: As short as possible, as long as necessary. *Apidologie*, 38(6), s. 606-611.
- Korandová, M., a Frydrychová, R. Č. (2016). Activity of telomerase and telomeric length in *Apis mellifera*. *Chromosoma*, 125(3), s. 405-411.
- Korb, J., Meusemann, K., Aumer, D., Bernadou, A., Elsner, D., Feldmeyer, B., Foitzik, S., Heinze, J., Libbrecht, R., Lin, S., Majoe, M., Monroy Kuhn, J. M., Nehring, V., Negroni, M. A., Paxton, R. J., Séguret, A. C., Stoldt, M., Flatt, T. (2021). Comparative transcriptomic analysis of the mechanisms underpinning ageing and fecundity in social insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 376(1823).
- Koubová, J., Sábová, M., Brejcha, M., Kodrík, D., Čapková Frydrychová, R. (2021). Seasonality in telomerase activity in relation to cell size, DNA replication, and nutrients in the fat body of *Apis mellifera*. *Scientific Reports*, 11(1).

- Kurz, T., Terman, A., Gustafsson, B., Brunk, U. T. (2008). Lysosomes and oxidative stress in aging and apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1780(11), s. 1291-1303.
- Laurentin, A., a Edwards, C. A. (2003). A microtiter modification of the anthrone-sulfuric acid colorimetric assay for glucose-based carbohydrates. *Analytical Biochemistry*, 315(1), s. 143-145.
- Le Conte, Y., Sreng, L., Trouiller, J. (1994). The recognition of larvae by worker honeybees. *Naturwissenschaften*, 81(10), s. 462-465.
- Le Conte, Y., Sreng, L., Poitout, S. H. (1995). Brood Pheromone Can Modulate the Feeding Behavior of *Apis mellifera* Workers (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, 88(4), s. 798-804.
- Lee, S., Kalcic, F., Duarte, I. F., Titera, D., Kamler, M., Mrna, P., Hyrs, P., Danihlik, J., Dobes, P., Kunc, M., Pudlo, A., Havlik, J. (2022). ¹H NMR Profiling of Honey Bee Bodies Revealed Metabolic Differences between Summer and Winter Bees. *Insects*, 13(2).
- Li, A., a Denlinger, D. L. (2009). Pupal Cuticle Protein Is Abundant During Early Adult Diapause in the Mosquito *Culex pipiens*. *Journal of Medical Entomology*, 46(6), s. 1382-1386.
- Li, Z., Zhang, S., Zhang, J., Liu, M., Liu, Z. (2009). Vitellogenin is a cidal factor capable of killing bacteria via interaction with lipopolysaccharide and lipoteichoic acid. *Molecular Immunology*, 46(16), s. 3232-3239.
- L. W. Ratnieks, F., a Keller, L. (1998). Queen Control of Egg Fertilization in the Honey Bee. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 44(1), s. 57-61.
- Lyko, F., Foret, S., Kucharski, R., Wolf, S., Falckenhayn, C., Maleszka, R., Keller, L. (2010). The Honey Bee Epigenomes: Differential Methylation of Brain DNA in Queens and Workers. *PLoS Biology*, 8(11).
- Margotta, J. W., Roberts, S. P., Elekonich, M. M. (2018). Effects of flight activity and age on oxidative damage in the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Experimental Biology*, 221(14).
- Mattila, H. R., a Otis, G. W. (2007). Dwindling pollen resources trigger the transition to broodless populations of long-lived honeybees each autumn. *Ecological Entomology*, 32(5), s. 496-505.
- Micheu, S., Crailsheim, K., Leonhard, B. (2000). Importance of proline and other amino acids during honeybee flight. *Amino Acids*, 18(2), s. 157-175.
- Mony, V. K., Benjamin, S., O'Rourke, E. J. (2016). A lysosome-centered view of nutrient homeostasis. *Autophagy*, 12(4), s. 619-631.
- Mott, C., a Breed, M. (2012). Insulin Modifies Honeybee Worker Behavior. *Insects*, 3(4), s. 1084-1092.
- Bortolotti L, Costa C. Chemical Communication in the Honey Bee Society. In: Mucignat-Caretta C, editor. Neurobiology of Chemical Communication. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2014. Chapter 5.

- Münch, D., Amdam, G. V., Wolschin, F. (2008). Ageing in a eusocial insect: molecular and physiological characteristics of life span plasticity in the honey bee. *Functional Ecology*, 22(3), s. 407-421.
- Münch, D., a Amdam, G. V. (2010). The curious case of aging plasticity in honey bees. *FEBS Letters*, 584(12), s. 2496-2503.
- Münch, D., Kreibich, C. D., Amdam, G. V. (2013). Aging and its modulation in a long-lived worker caste of the honey bee. *Journal of Experimental Biology*, 216(9), s. 1638-1649.
- Nelson, C. M., Ihle, K. E., Fondrk, M. K., Page, R. E., Amdam, G. V., Chittka, L. (2007). The Gene vitellogenin Has Multiple Coordinating Effects on Social Organization. *PLoS Biology*, 5(3).
- Neukirch, A. (1982). Dependence of the life span of the honeybee (*Apis mellifica*) upon flight performance and energy consumption. *Journal of Comparative Physiology B*, 146(1), s. 35-40.
- Nikolić, T. V., Purać, J., Orčić, S., Kojić, D., Vujanović, D., Stanimirović, Z., Gržetić, I., Ilijević, K., Šikoparija, B., Blagojević, D. P. (2015). Environmental Effects On Superoxide Dismutase and Catalase Activity and Expression In Honey Bee. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 90(4), s. 181-194.
- Norrström, N., Niklasson, M., Leidenberger, S., Khan, K. A. (2021). Winter weight loss of different subspecies of honey bee *Apis mellifera* colonies (Linnaeus, 1758) in southwestern Sweden. *PLoS ONE*, 16(10).
- Nürnberger, F., Härtel, S., Steffan-Dewenter, I. (2018). The influence of temperature and photoperiod on the timing of brood onset in hibernating honey bee colonies. *PeerJ*, 6.
- Orčić, S., Nikolić, T., Purać, J., Šikoparija, B., Blagojević, D. P., Vukašinović, E., Plavša, N., Stevanović, J., Kojić, D. (2017). Seasonal variation in the activity of selected antioxidant enzymes and malondialdehyde level in worker honey bees. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 165(2-3), s. 120-128.
- Paes-de-Oliveira, V. T., Poiani, S. B., Antonialli, W. F., da Cruz-Landim, C. (2008). Morphometric changes on honeybee *Apis mellifera* L. workers fat body cells after juvenile hormone topic application at emergence. *Micron*, 39(4), s. 426-430.
- Page, R. E., a Peng, C. Y. -S. (2001). Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental Gerontology*, 36(4-6), s. 695-711.
- Pankiw, T. (2004). Cued in: honey bee pheromones as information flow and collective decision-making. *Apidologie*, 35(2), s. 217-226.
- Pankiw, T., Roman, R., Sagili, R. R., Zhu-Salzman, K. (2004). Pheromone-modulated behavioral suites influence colony growth in the honey bee (*Apis mellifera*). *Naturwissenschaften*, 91(12), s. 575-578.
- Panzenböck, U., a Crailsheim, K. (1997). Glycogen in honeybee queens, workers and drones (*Apis mellifera carnica* Pollm.). *Journal of Insect Physiology*, 43(2), s. 155-165.

- Park, H. G., Lee, K. S., Kim, B. Y., Yoon, H. J., Choi, Y. S., Lee, K. Y., Wan, H., Li, J., Jin, B. R. (2018). Honeybee (*Apis cerana*) vitellogenin acts as an antimicrobial and antioxidant agent in the body and venom. *Developmental & Comparative Immunology*, 85, s. 51-60.
- Partridge, L., Alic, N., Bjedov, I., Piper, M. D. W. (2011). Ageing in *Drosophila*: The role of the insulin/Igf and TOR signalling network. *Experimental Gerontology*, 46(5), s. 376-381.
- Pinto, L. Z., Bitondi, M. M. G., Simões, Z. L. P. (2000). Inhibition of vitellogenin synthesis in *Apis mellifera* workers by a juvenile hormone analogue, pyriproxyfen. *Journal of Insect Physiology*, 46(2), s. 153-160.
- Rachinsky, A., Strambi, C., Strambi, A., Hartfelder, K. (1990). Caste and metamorphosis: Hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. *General and Comparative Endocrinology*, 79(1), s. 31-38.
- Raikhel, A. S. (1986). Role of lysosomes in regulating of vitellogenin secretion in the mosquito fat body. *Journal of Insect Physiology*, 32(7), s. 597-604.
- Ramírez-Zacarias, J. L., Castro-Muñozledo, F., Kuri-Harcuch, W. (1992). Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with oil red O. *Histochemistry*, 97(6), s. 493-497.
- Rascón, B., Hubbard, B. P., Sinclair, D. A., Amdam, G. V. (2012). The lifespan extension effects of resveratrol are conserved in the honey bee and may be driven by a mechanism related to caloric restriction. *Aging*, 4(7), s. 499-508.
- Reznick, R. M., Zong, H., Li, J., Morino, K., Moore, I. K., Yu, H. J., Liu, Z. -X., Dong, J., Mustard, K. J., Hawley, S. A., Befroy, D., Pypaert, M., Hardie, D. G., Young, L. H., Shulman, G. I. (2007). Aging-Associated Reductions in AMP-Activated Protein Kinase Activity and Mitochondrial Biogenesis. *Cell Metabolism*, 5(2), s. 151-156.
- Roberts, S. P., a Elekonich, M. M. (2005). Muscle biochemistry and the ontogeny of flight capacity during behavioral development in the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Experimental Biology*, 208(22), s. 4193-4198.
- Roma, G. C., Bueno, O. C., Camargo-Mathias, M. I. (2010). Morpho-physiological analysis of the insect fat body: A review. *Micron*, 41(5), s. 395-401.
- Sacktor, B. (1970). Regulation of Intermediary Metabolism, with Special Reference to the Control Mechanisms in Insect Flight Muscle. *Elsevier*, s. 267-347.
- Salminen, A., a Kaarniranta, K. (2012). AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network. *Ageing Research Reviews*, 11(2), s. 230-241.
- Sasaki, K., Harada, M., Rueppell, O. (2020). Dopamine production in the brain is associated with caste-specific morphology and behavior in an artificial intermediate honey bee caste. *PLoS ONE*, 15(12).
- Sasaki, K., a Watanabe, T. (2022). Sex-Specific Regulatory Systems for Dopamine Production in the Honey Bee. *Insects*, 13(2).

- Seehuus, S. -C., Norberg, K., Gimsa, U., Krekling, T., Amdam, G. V. (2006). Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(4), s. 962-967.
- Seehuus, S. -C., Taylor, S., Petersen, K., Aamodt, R. M., Englert, C. (2013). Somatic Maintenance Resources in the Honeybee Worker Fat Body Are Distributed to Withstand the Most Life-Threatening Challenges at Each Life Stage. *PLoS ONE*, 8(8).
- Seeley, T. D. (1982). Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 11(4), s. 287-293.
- Seeley, T. D. *The Wisdom of the Hive: The Social Physiology of Honey Bee Colonies*. (Harvard University Press, 1995).
- Seifter, S., Dayton, S., Novic, B., Muntwyler, E. The estimation of glycogen with the anthrone reagent. *Arch. Biochem*, 25, s. 191-200.
- Schulz, D. J., Huang, Z. -Y., Robinson, G. E. (1998). Effects of colony food shortage on behavioral development in honey bees. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 42(5), s. 295-303.
- Slater, G. P., Yocum, G. D., Bowsher, J. H. (2020). Diet quantity influences caste determination in honeybees (*Apis mellifera*). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 287(1927).
- Snodgrass, R. E., a Morse, R. A. (1956). *Anatomy of the Honey Bee* (1st ed.). Cornell University Press.
- Soares, M. P. M., Elias-Neto, M., Simões, Z. L. P., Bitondi, M. M. G. (2007). A cuticle protein gene in the honeybee: Expression during development and in relation to the ecdysteroid titer. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(12), s. 1272-1282.
- Stabentheiner, A., Pressl, H., Papst, T., Hrasnigg, N., Crailsheim, K. (2003). Endothermic heat production in honeybee winter clusters. *Journal of Experimental Biology*, 206(2), s. 353-358.
- Strachecka, A., Olszewski, K., Kuszewska, K., Chobotow, J., Wójcik, Ł., Paleolog, J., Woyciechowski, M. (2021). Segmentation of the subcuticular fat body in *Apis mellifera* females with different reproductive potentials. *Scientific Reports*, 11(1).
- Sullivan, J. P., Jassim, O., Fahrbach, S. E., Robinson, G. E. (2000). Juvenile Hormone Paces Behavioral Development in the Adult Worker Honey Bee. *Hormones and Behavior*, 37(1), s. 1-14.
- Szentgyörgyi, H., Czekońska, K., Tofilski, A. (2018). Honey bees are larger and live longer after developing at low temperature. *Journal of Thermal Biology*, 78, s. 219-226.
- Toth, A. L., a Robinson, G. E. (2005). Worker nutrition and division of labour in honeybees. *Animal Behaviour*, 69(2), s. 427-435.
- van Dooremalen, C., Gerritsen, L., Cornelissen, B., van der Steen, J. J. M., van Langevelde, F., Blacquièrre, T., Feldlaufer, M. F. (2012). Winter Survival of Individual Honey Bees and Honey Bee Colonies Depends on Level of *Varroa destructor* Infestation. *PLoS ONE*, 7(4).

- Van Nerum, K., a Buelens, H. (1997). Hypoxia-Controlled Winter Metabolism in Honeybees (*Apis mellifera*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 117(4), s. 445-455.
- Vogel, C., a Marcotte, E. M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, 13(4), s. 227-232.
- Wall, D. A., a Meleka, I. (1985). An unusual lysosome compartment involved in vitellogenin endocytosis by *Xenopus* oocytes. *The Journal of Cell Biology*, 101(5), s. 1651-1664.
- Wang, H., Liu, Z., Wang, Y., Ma, L., Zhang, W., Xu, B. (2020). Genome-Wide Differential DNA Methylation in Reproductive, Morphological, and Visual System Differences Between Queen Bee and Worker Bee (*Apis mellifera*). *Frontiers in Genetics*, 11.
- Weirich, G. F., Collins, A. M., Williams, V. P. (2002). Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*, 33(1), s. 3-14.
- Wheeler, D. E., Buck, N., Evans, J. D. (2006). Expression of insulin pathway genes during the period of caste determination in the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, 15(5), s. 597-602.
- Wright, G. A., Nicolson, S. W., Shafir, S. (2018). *Nutritional Physiology and Ecology of Honey Bees. Annual Review of Entomology*, 63(1), s. 327-344.
- Zelenin, A. V. (1999). Acridine Orange as a Probe for Cell and Molecular Biology. In *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity*, s. 117-135. Elsevier.
- Zöllner, N. a Kirsch, K. (1962). Über die quantitative Bestimmung von Lipoiden (Mikromethode) mittels der vielen natürlichen Lipoiden (allen bekannten Plasmalipoiden) gemeinsamen Sulfophosphovanillin-Reaktion. *Zeitschrift für Die Gesamte Experimentelle Medizin*, 135(6), s. 545-561.

8 Příloha

Příloha zahrnuje složení použitých roztoků, jenž nebylo zmíněno v metodické části. Výsledky statistických analýz extrahované z programu GraphPad Prism jsou přiložené v tabulkách dále (Tab. VIII – XXI).

Složení použitých roztoků:

10x PBS, pH 7,4 - 80 g NaCl

2 g KCl

2,4 g KH_2PO_4

14,4 g Na_2HPO_4

Doplnit destilovanou vodou na 800 ml, upravit pH na 7,4 a až poté dolít vodou na 1 l, autoklávovat.

Ze zásobního roztoku 10x PBS pak připravit 1x PBS (100 ml 10x PBS + 900 ml destilované vody).

Ringerův roztok - 7,5 g NaCl

0,1 g KCl

0,2 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

0,4 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$

0,2 g NaHCO_3

Vše rozpustit v 1 l destilované vody a autoklávovat.

Fixační médium pro TEM (2,5 % glutaraldehyd v 0,2 M PBS) -

30 ml 8 % zásobního roztoku glutaraldehydu

50 ml 0,2M PBS

20 ml H_2O

Pryskyřice EPON (medium) - 20 ml EPON

16 ml DDSA

8 ml NMA

	1,3 ml 3 % BDMA
Uranyl acetát -	2,6 g uranylu
	20 ml 50 % ethanolu
	Dokonale rozpustit, získaný 0,3 M roztok přefiltrovat přes filtrační papír a uchovávat v tmavé nádobě v lednici.
Lead citrát -	0,02 až 0,04 g citrátu olovnatého
	20 ml převařené vody
	Dokonale rozpustit. Až poté přidat 0,2 ml 10 N NaOH (40 g NaOH v 10 ml destilované vody) a promíchat.
	Uchovávat v tmavé nádobě v lednici, před použitím stočit v centrifuze (10 000 otáček za minutu, 10 minut).
	Trvanlivost roztoku maximálně 3 týdny.
Vanilinové reagens -	1,98 g vanilinu
	668 ml kyseliny fosforečné (p. a.)
	Zahřát na 60 °C, zchladit a doplnit destilovanou vodou na 1 l.
	Před použitím nechat minimálně týden stát v temnu a chladu.
	Uchovávat v lednici.

Tab. VIII: Výsledky testů dvoucestná ANOVA a Bonferroniho post-test, porovnání průměru oenocytů a jejich jader.

Two-way ANOVA

Source of Variation	P value	Df	F
Interaction	P<0.0001	2	111,6
Column Factor	P<0.0001	2	454,5
Row Factor	P<0.0001	1	5132

Bonferroni posttests			
	Difference	95 % CI of diff.	P value
zima vs. léto			
buňka	-2,44	-3.301 to -1.579	P<0.001
jádro	-4,08	-4.941 to -3.219	P<0.001
zima vs. mladuška			
buňka	-9,41	-10.27 to -8.549	P<0.001
jádro	-4,45	-5.311 to -3.589	P<0.001
léto vs. mladuška			
buňka	-6,97	-7.831 to -6.109	P<0.001
jádro	-0,37	-1.231 to 0.4910	P > 0.05

Tab. IX: Výsledky testů dvoucestná ANOVA a Bonferroniho post-test, porovnání průměru trofocytů a jejich jader.

Two-way ANOVA

Source of Variation	P value	Df	F
Interaction	P<0.0001	2	10,3
Column Factor	P<0.0001	2	292,7
Row Factor	P<0.0001	1	2312

Bonferroni posttests			
	Difference	95 % CI of diff.	P value
zima vs. léto			
buňka	-14,06	-16.09 to -12.03	P<0.001
jádro	-9,19	-11.22 to -7.156	P<0.001
zima vs. mladuška			
buňka	-12,01	-14.04 to -9.976	P<0.001
jádro	-10,26	-12.29 to -8.226	P<0.001
léto vs. mladuška			
buňka	2,05	0.01556 to 4.084	P < 0.05
jádro	-1,07	-3.104 to 0.9644	P > 0.05

Tab. X: Výsledky Tukeyho post-testu, porovnání hmotnosti tukového tělesa.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	P value	95 % CI of diff
jádro vs periferie	0,6900	P > 0.05	-0.5330 to 1.913

jádro vs mladušky	1,530	P < 0.01	0.3070 to 2.753
jádro vs létavky	2,357	P < 0.001	1.100 to 3.613
periferie vs mladušky	0,8400	P > 0.05	-0.3830 to 2.063
periferie vs létavky	1,667	P < 0.01	0.4101 to 2.923
mladušky vs létavky	0,8267	P > 0.05	-0.4299 to 2.083

Tab. XI: Výsledky Tukeyho post-testu, porovnání množství cukrů v tukovém tělese.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	P value	95 % CI of diff
střed vs periferie	181,4	P < 0.01	45.07 to 317.7
střed vs mladušky	239,6	P < 0.001	103.3 to 375.9
střed vs létavky	122,2	P > 0.05	-14.08 to 258.5
periferie vs mladušky	58,18	P > 0.05	-78.14 to 194.5
periferie vs létavky	-59,16	P > 0.05	-195.5 to 77.16
mladušky vs létavky	-117,3	P > 0.05	-253.7 to 18.98

Tab. XII: Výsledky Tukeyho post-testu, porovnání množství glykogenu v tukovém tělese.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	P value	95 % CI of diff
střed vs periferie	1,760	P > 0.05	-0.08584 to 3.606
střed vs mladušky	1,476	P > 0.05	-0.3704 to 3.322
střed vs létavky	1,181	P > 0.05	-0.6647 to 3.027
periferie vs mladušky	-0,2845	P > 0.05	-2.131 to 1.561
periferie vs létavky	-0,5789	P > 0.05	-2.425 to 1.267
mladušky vs létavky	-0,2943	P > 0.05	-2.140 to 1.552

Tab. XIII: Výsledky Tukeyho post-testu, porovnání množství lipidů v tukovém tělese.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	P value	95 % CI of diff
střed vs periferie	-19,69	P > 0.05	-51.86 to 12.48
střed vs mladušky	-9,381	P > 0.05	-42.54 to 23.78
střed vs létavky	-2,720	P > 0.05	-35.88 to 30.44
periferie vs mladušky	10,31	P > 0.05	-22.85 to 43.47
periferie vs létavky	16,97	P > 0.05	-16.19 to 50.13
mladušky vs létavky	6,661	P > 0.05	-27.46 to 40.78

Tab. XIV: Výsledky Tukeyho post-testu, porovnání množství proteinů v tukovém tělese.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	P value	95 % CI of diff
střed vs periferie	74,06	P < 0.01	16.76 to 131.4
střed vs mladušky	104,8	P < 0.001	49.04 to 160.6
střed vs létavky	88,30	P < 0.01	29.15 to 147.5
periferie vs mladušky	30,76	P > 0.05	-26.54 to 88.06
periferie vs létavky	14,24	P > 0.05	-46.35 to 74.84
mladušky vs létavky	-16,51	P > 0.05	-75.67 to 42.64

Tab. XV: Výsledky Tukeyho post-testu, porovnání koncentrace cukrů v tukovém tělese.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	P value	95 % CI of diff
jádro vs periferie	38,31	P < 0.05	6.493 to 70.13
jádro vs mladušky	60,05	P < 0.001	28.23 to 91.87
jádro vs létavky	21,11	P > 0.05	-11.58 to 53.80
periferie vs mladušky	21,74	P > 0.05	-10.08 to 53.56
periferie vs létavky	-17,20	P > 0.05	-49.90 to 15.49

mladušky vs létavky	-38,94	P < 0.05	-71.63 to -6.250
---------------------	--------	----------	------------------

Tab. XVI: Výsledky Tukeyho post-testu, porovnání koncentrace glykogenu v tukovém tělese.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	P value	95 % CI of diff
jádro vs periferie	0,4502	P > 0.05	-0.5842 to 1.485
jádro vs mladušky	0,03597	P > 0.05	-0.9985 to 1.070
jádro vs létavky	-0,6076	P > 0.05	-1.642 to 0.4268
periferie vs mladušky	-0,4142	P > 0.05	-1.449 to 0.6202
periferie vs létavky	-1,058	P < 0.05	-2.092 to -0.02334
mladušky vs létavky	-0,6436	P > 0.05	-1.678 to 0.3909

Tab. XVII: Výsledky Tukeyho post-testu, porovnání koncentrace lipidů v tukovém tělese.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	P value	95 % CI of diff
jádro vs periferie	-2,730	P > 0.05	-9.153 to 3.693
jádro vs mladušky	-1,512	P > 0.05	-7.935 to 4.911
jádro vs létavky	1,597	P > 0.05	-5.621 to 8.816
periferie vs mladušky	1,217	P > 0.05	-5.372 to 7.807
periferie vs létavky	4,327	P > 0.05	-3.041 to 11.69
mladušky vs létavky	3,110	P > 0.05	-4.258 to 10.48

Tab. XVIII: Výsledky Tukeyho post-testu, porovnání koncentrace proteinů v tukovém tělese.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	P value	95 % CI of diff
jádro vs periferie	16,00	P < 0.05	3.015 to 28.98
jádro vs mladušky	24,82	P < 0.001	11.84 to 37.81
jádro vs létavky	12,78	P > 0.05	-0.9973 to 26.55
periferie vs mladušky	8,823	P > 0.05	-4.162 to 21.81
periferie vs létavky	-3,224	P > 0.05	-17.00 to 10.55
mladušky vs létavky	-12,05	P > 0.05	-25.82 to 1.725

Tab. XIX: Výsledky Tukeyho post-testu, porovnání hladin cukrů v hemolymfě.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	P value	95 % CI of diff
jádro vs periferie	162,4	P < 0.001	94.60 to 230.2
jádro vs mladušky	172,6	P < 0.001	104.8 to 240.4
jádro vs létavky	-154,7	P < 0.001	-222.5 to -86.91
periferie vs mladušky	10,18	P > 0.05	-57.63 to 77.98
periferie vs létavky	-317,1	P < 0.001	-384.9 to -249.3
mladušky vs létavky	-327,3	P < 0.001	-395.1 to -259.5

Tab. XX: Výsledky Tukeyho post-testu, porovnání hladin lipidů v hemolymfě.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	P value	95 % CI of diff
jádro vs periferie	22,15	P < 0.01	7.928 to 36.37
jádro vs mladušky	22,15	P < 0.01	7.928 to 36.37
jádro vs létavky	-17,04	P < 0.05	-31.26 to -2.814
periferie vs mladušky	0,0000	P > 0.05	-14.22 to 14.22
periferie vs létavky	-39,19	P < 0.001	-53.41 to -24.96
mladušky vs létavky	-39,19	P < 0.001	-53.41 to -24.96

Tab. XXI: Výsledky Tukeyho post-testu, porovnání hladin proteinů v hemolymfě.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	P value	95 % CI of diff
jádro vs periferie	16,18	P < 0.05	0.7176 to 31.64
jádro vs mladušky	40,50	P < 0.001	25.03 to 55.96
jádro vs létavky	-4,187	P > 0.05	-19.65 to 11.28
periferie vs mladušky	24,32	P < 0.01	8.853 to 39.78
periferie vs létavky	-20,37	P < 0.05	-35.83 to -4.905
mladušky vs létavky	-44,68	P < 0.001	-60.15 to -29.22