

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Sezónní variabilita potenciálních markerů dlouhověkosti
včel**

Bakalářská práce

Jakub Hájek

Obor studia: Živočišná produkce

Vedoucí práce: Jaroslav Havlík doc. Ing. Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Molekulární ukazatele dlouhověkosti včel" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14.7.2020

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval Doc. Jaroslavu Havlíkovi Ing. Ph.D. za jeho trpělivost a cenné rady při tvorbě této práce, dále MvDr. Martinu Kamlerovi z VÚVč. v Dole, bez kterého bych nebyl schopen získat téměř třetinu odebíraných včel a také za jeho odborné rady. Též chci poděkovat ing. Seatbyeol Lee za její pomoc při zpracování vzorků a práci s laboratorní technikou. Také bych chtěl poděkovat prof. Ing. Karlu Voříškovi CSc. za dovolení odebírat včely v jeho úlech. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat rodině bez jejíž podpory by tato práce vůbec nemohla vzniknout.

Sezónní variabilita potenciálních markerů dlouhověkosti včel

Souhrn

Dlouhověkost včelích dělnic je zajímavou vlastností včel druhu *Apis mellifera*. V průběhu roku se včelstvu vyskytují dva druhy včelích dělnic, krátkověké a dlouhověké. Krátkověké mají mimo jiné za úkol zajistit rychlý jarní rozvoj a přísun zásob na zimu, zatímco dlouhověké včely jsou zárukou přežití včelstva přes zimu a výchovy první jarní generace po zimním slunovratu.

Cílem této práce byla analýza včel pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR) a zjištění, zda by některá ze zkoumaných látek mohla být markerem dlouhověkosti včel. Byla vyhodnocena koncentrace deseti látek ve včelích tělech v průběhu roku a to glukózy, fruktózy, trehalózy, cholinu, O-fosfocholinu, prolinu, alaninu, valinu, leucinu a izoleucinu.

Včely byly odebírány ze šesti úlů (na třech stanovištích po dvou včelstvech) do 50ml zkumavek Falcon. Z každého úlu byly každý měsíc odebrány dva vzorky. Celkem bylo takto odebráno 132 vzorků včel.

Polovina včel byla ihned zamrazena a druhá byla zaklíčkována po dobu 24 hodin za přístupu k 1:1 roztoku sacharózy. Z každého vzorku bylo vybráno 5 včel. Těla hmyzu byla po rozmrazení zbavena trávicího traktu a dekapitována. Následně byla rozemleta a extrahována v MeOH, rozpuštěna ve vodě a po centrifugaci analyzována na spektrometru Bruker 500 MHz s pomocí pulzní sekvence 1d noesy. Spektra byla procesována v programu Topspin 3.7 (Fourierova transformace, úprava fáze, baseline, referencování TSP na 0,00 ppm). Alignment a binning (0,01 ppm) byly provedeny v programu Mestrenova 12.3.03 a sloučeniny byly dále kvantifikovány pomocí programu Chenomx NMR Suite 8.3. Statistické zpracování bylo provedeno v Microsoft Excel 2016 a v IBM SPSS statistics 25.

Výsledky odhalily několik potenciálních markerů dlouhověkosti včel. Konkrétně koncentrace trehalózy, která byla v letních měsících na hodnotách 0,2 mg/včelu, v zimních měsících klesla k 0,15 mg/včelu a v některých případech až k 0,1 mg/včelu. Cholin a o-fosfocholin vykazovaly oproti sobě opačný trend během roku. Cholin se v aktivních měsících vyskytoval ve včelích tělech v koncentraci 0,05 mg/včelu, zatímco v klidových měsících jeho koncentrace stoupla k 0,1 mg/včelu. Oproti tomu hladina O-fosfocholinu se v aktivním období pohybovala na hodnotách okolo 0,08 mg/včelu a v klidovém období roku klesla až na 0,02 mg/včelu. Koncentrace aminokyselin s rozvětveným řetězcem, které byly zkoumány (valin, leucin a izoleucin), vykazovala během roku podobný průběh. Od března do října se jejich koncentrace v tělech včel pohybovala okolo 0,02 mg/včelu a během zimních měsíců roku stoupla někdy až k 0,11 mg/včelu. Zajímavé je také zjištění, že letní včely mají horší schopnost udržet ve svých tělech cukry než zimní včely.

Klíčová slova: včely, NMR, metabolomika, dlouhověkost

Seasonal variation of potential honey bee longevity markers

Summary

Longevity of honeybee workers is interesting characteristic of *Apis mellifera* species. Two kinds of worker bees can be found in the hive during the year. Short-lived bees and long-lived bees. The task of short-lived bees besides other things is to ensure quick spring development and gathering of food stores for winter. Long-lived generation on the other hand has to keep the colony alive during the winter and raise the first generation of new bees after winter solstice.

The goal of this work was analysis of bees using the nuclear magnetic resonation (NMR) as well as exploring if any of the examined substances might be considered logevity marker. Concetration of ten substances during the course of the year in honeybee bodies was studied namely glucose, fructose, trehalose, choline, o-phosphocholine, proline, alanine, valine leucine and isoleucine.

Bee samples originated from 6 hives (from 3 locations 2 hives per location). Samples weere kept in 50ml falcon tubes. Two samples were taken from each hive every month in total 132 samples was taken.

Half of the bees was frozen imediately. The other half was left at the cage with access to 1:1 sugar solution for 24 hours. Five bees was selected from each sample. After defrosting bodyes of insects were deguted and decapitated. Bodies were then groud up and extracted in MeOH. They were dissolved in water and analyzed on spectrometer Bruker 500 MHz (with pulsion sequence 1d noesy) after centrifugation. Data was processed in softwares Topspin 3.7 (fourier tranformation, phase correction, baseline correction, refrencing TSP to 0,00ppm). Alignment and binning (0,01 ppm) were carried out in Mestrenova 12.3.03 and compounds were then quantified with Chenomx NMR Suit 8.3 program. Statistical processing was carried out in programs Microsoft excel 2016 and in SPSS statistics 25.

Results showed several potential markers of bee longevity. In particular concentration of trehalose witch was at 0,2mg per bee in summer months. The concentration dropped in winter months to 0,1mg per bee. Choline and o-phosphocholine showed opposite trends to each other. Choline was in active months of bee year present in concentrations around 0,05 mg per bee. During the resting period of the bee year choline concentration climbed to 0,1mg per bee. O-phophocholine showed opposite trend. It's concentration during summer was around 0,08mg per bee and dropped during the winter too 0,02mg per bee. Concentrations of valine, leucine and isoleucine were similar during the whole year. They were around 0,02 mg per bee during summer months and they have risen to 0,1 mg per bee in the winter. Also interesting is better winter bee ability of holding suger levels in their bodies higher then summer bees.

Keywords: honeybees, NMR, metabolomycs, longevity

Obsah

1	Úvod	11
2	Cíl práce	12
3	Literární rešerše	13
3.1	Historie včelařství a jeho význam pro vývoj lidstva	13
3.1.1	Včely v prehistorii	13
3.1.2	Lovci medu v paleolitu	13
3.1.3	Starověké včelaření	14
3.1.4	Včelařství středověku	15
3.1.5	Včelařská revoluce.....	18
3.2	Včelařský rok	19
3.2.1	Podletí	20
3.2.2	Podzim	20
3.2.3	Zima	20
3.2.4	Předjaří	20
3.2.5	Jaro	21
3.2.6	Časné léto	21
3.2.7	Vrcholné léto	21
3.3	Význam včelařství v současném zemědělství	21
3.3.1	Ve světě	22
3.3.2	V České republice	23
3.4	Úbytky včel a včelí nemoci.....	23
3.4.1	Vliv přezimování na ztráty včelstev	24
3.4.2	Colony collapse disorder (syndrom zhroucení včelstev).....	24
3.4.3	Varroáza	24
3.4.4	Mor včelího plodu	25
3.4.5	Hniloba včelího plodu.....	25
3.4.6	Nosematóza.....	25
3.4.7	Zvápenatění včelího plodu	26
3.4.8	Nenakažlivé nemoci	26
3.4.9	Stres včelstev	26
3.5	Dlouhověkost včel	27
3.5.1	Vitellogenin	28
3.5.2	Juvenilní hormon	28
3.6	NMR analýza	28
3.6.1	princip.....	28
3.6.2	NMR spektroskopie	29
3.6.3	Využití	29

3.6.4	NMR analýza hmyzu	29
4	Metodika	31
4.1	Odběry.....	31
4.2	Příprava vzorků k analýze	32
4.3	NMR analýza	33
4.4	Statistická analýza.....	33
5	Výsledky a Diskuze	34
5.1	Sezónní dynamika vybraných látek ve včelách	34
5.1.1	Sacharidy	34
5.1.2	Cholin a <i>O</i> -fosfocholin	35
5.1.3	Aminokyseliny	36
5.2	Koncentrace cukrů v závislosti na rychlosti zmrazení.....	41
6	Závěr.....	43
7	Literatura	44
8	Samostatné přílohy	I

1 Úvod

Téma této diplomové práce jsem si vybral, protože jsem sám aktivním včelařem a tento obor mě mimořádně zajímá. Ke včelaření jsem se dostal v roce 2014 po smrti svého dědy, po kterém jsem zdědil několik úlů. Analýza s pomocí nukleární magnetická rezonance (NMR) byla pro mě novým oborem a prostřednictvím ní jsem poprvé "přičichl k opravdové" vědecké práci.

NMR je metoda využitelná v zobrazování. Často se využívá v medicíně pro zobrazování tělních tkání. Pomocí NMR spektroskopie lze také zjistit složení sloučenin porovnáním se známými spektry předem změřených látek. NMR má několik výhod v porovnání s ostatními metodami. Například je neinvazivní, data lze získat rychle a vypovídají o velkém množství metabolitů ve vzorku najednou, také příprava vzorku není příliš náročná.

Včela medonosná (*Apis mellifera*) je eusociální druh blanokřídlého hmyzu, chovem kterého se zabývá většina moderních včelařů a na výzkum kterého byla zaměřena i tato práce. Včela medonosná vytváří kolonie s jedinou pohlavně dospělou samicí (matkou), tisíci až desetitisíci pohlavně nevyvinutých samic (dělnic) a v sezóně se stovkami haploidních samců (trubců). Včely se mezi sebou dorozumívají feromony nebo komplexními tanci. V přírodě si včely staví svá hnízda z vosku v dutinách, které nejlépe odpovídají jejich požadavkům. Při chovu člověkem jsou včelstva umisťována do převážně dřevěných úlů, které obsahují dřevěné rámy se základy plástů (mezistěnami), které jsou přímo ze včelího vosku nebo z plastu.

Včelařství má dle mého názoru mnohem blíže k symbióze než chov jiných hospodářských zvířat. Jednak včely nevyžadují po člověku každodenní péči, jako obstarání potravy a vody, čištění výběhu a podobně. Také je práce se včelstvy silně sezónní. Nutné práce vykonávané ve včelstvu se řídí ročním obdobím a počasím. Včelař včelám zajišťuje vhodnou dutinu k obývání, chrání je proti přirozeným nepřítelům, předchází a léčí včelí nemoci. Včelám na oplátku odebírá med, který však nahrazuje zakrmením cukrem. Také od včel získává sekundární včelí produkty jako je vosk, propolis, mateří kašička a někdy i včelí jed. Nejdůležitější přínos pro společnost, který si na první pohled málo lidí uvědomuje je opylovací činnost včel. Bez jejich práce by se snížil výnos z mnoha pěstovaných plodin.

Dlouhověkost včel je zajímavou vlastností včel. Délka života dělnic se mění dle ročního období. Krátkověké včely se začínají rodit z vajíček nakladených po zimním slunovratu. Mají za úkol neúnavně pracovat, zajistit rychlý jarní rozvoj včelstva, participují při rojení a mají za úkol nasbírat dostatečné množství zásob na zimu. Dožívají se v průměru 6-8 týdnů. Naproti tomu dlouhověká generace včel se rodí od vrcholného léta do poloviny podzimu a dožívá se až devíti měsíců. Má zpožděné dospívání a jejím úkolem je zjistit přežití kolonie v zimě a vychování první generace krátkověkých včel. Chemický princip rozlišení dlouhověkých a krátkověkých včel není zcela vysvětlen a právě na to je zaměřena tato práce. V práci bylo analyzováno 132 vzorků na 10 látek, které mohou být potenciálními markery dlouhověkosti včel.

2 Cíl práce

Stanovit rozdíly v metabolismu včel v průběhu roku s pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR) se speciálním zaměřením na rozdíly mezi zimní a jarní generací. Zimní včely vykazují až desetinásobnou délku života a musí zajistit přežití kolonie přes kritické období.

Hypotéza: NMR je metoda schopná detekovat metabolity spojené s regulací drah dlouhověkosti a některé z těchto látek vykazují charakteristickou dynamiku v průběhu roku nezávisle na stanovišti.

3 Literární rešerše

3.1 Historie včelařství a jeho význam pro vývoj lidstva

3.1.1 Včely v prehistorii

Včely se na naší planetě vyvinuly o mnoho dříve než člověk. Jejich zrod je datován před 80 mil. lety společně s objevením nektarodárných rostlin. To lze doložit nálezem včely zalité v jantaru z New Jersey. (Michener and Grimaldit, 1988)

Vědci však v roce 1995 objevili v Arizonském Petrified Forest National Park více než 100 zkamenělých hnízd podobných těm včelím či vosím. Jejich stáří určili na 220 mil. let. To by znamenalo nejen, že se včely vyvinuly o 140 milionů let dříve, ale také, že se tak stalo nezávisle na nektarodárných rostlinách, možná dokonce, že včely napomohly jejich vzniku. Ve hnízdech se však bohužel nenalézal žádný zkamenělý hmyz. (*Reseachers Say Bees' Nests May Be 200 Million Years Old - Los Angeles Times*, 1995)

3.1.2 Lovci medu v paleolitu

Už od počátku lidské existence se člověk setkával s med produkujícími včelami v přírodě. Nejdříve to však nebyl druh nám neznámější včela medonosná (*Apis mellifera*), ale jiné včely rodu *Apis* nebo bezžihadlé včely rodu *Meliponini*. Člověk se naučil vybírat včelám hnízda a ta při tom ničil. Důkaz o tom lze nalézt například na nástěnné malbě z Pavoučí jeskyně ve Španělsku datované 10 000 let př.n.l (obrázek 1). Zhruba v tomto období poslední doby ledové se odštěpil druh včely medonosné od včely východní patrně díky geografické izolaci. (Crane, 2000)



Obrázek 1: Jeskynní malba lovce medu z Pavoučí jeskyně blízko Valencie (Španělsko)

3.1.3 Starověké včelaření

S přechodem člověka k usadlému způsobu života a zemědělství, jako hlavnímu zdroji potravy, vznikly vhodné podmínky pro vznik včelařství. Právě včelařství začalo, když se lidé naučili dbát o budoucnost rojů a kolonií včel. Zjistili, jak na ně dohlížet a pečovat o ně. Včelstva byla usazována do úlu rozličné konstrukce, dle lokálních zdrojů a tradic.

V kolébce civilizace, Mezopotámii, byla včelstva usazována do prázdných keramických nádob už zhruba 5000 let př.n.l. Je možné, že první úly vznikly samovolným usazením divokých rojů v takových nádobách. (Campbell and Crane, 1984)

Ve starověkém Egyptě se včelařilo už nejpozději 2400 let př.n.l.. Důkazy o tom lze nalézt na hrobkách, monumentech a chrámech. Podle Egyptské mytologie se včely zrodily tak, že bůh Ra plakal a jeho slzy se změnilly ve včely, které vytvořili první plást. Včela byla znakem vládce Egypta během první dynastie okolo roku 3200 př.n.l. Egypťané používali válcové úly z hlíny nebo keramiky z přístupem zezadu. Med se tehdy hojně využíval jako sladidlo, oběť bohům nebo jako přísada do opojného nápoje. Z medu se také pekly medové dorty. Svě uplatnění našel v této době i vosk, který se získával z odebraných plástů. Vyráběli se z něj svíčky a používal se dokonce i při depilaci. Technologicky nejdůležitější využití vosku bylo při výrobě ztracených forem pro odlévání bronzu. Ve starověkém Egyptě je zdokumentováno první kočování se včelstvy. Kočovalo se plavidly po řece Nilu. Egypťané museli být velice úspěšní, protože Ramesse III mohl roku 1180 př.n.l. obětovat nilskému božstvu 14 tun medu. (*Egyptian Beekeeping*, 2011)

V Řecku bylo odhaleno 26 nalezišť starověkých hliněných úlů. Včelařství zde bylo také na vysoké úrovni, což lze doložit nejen nálezy úlů, ale také kuřáků či lisů na med a jiného včelařského vybavení. Včelařství bylo velmi ceněné a o jeho správné vykonávání se starali včelařští mistři (majitelé zlatých prstenů s vyobrazeními včelařského života). Řekové vnímali med nejen jako důležitou potravinu, ale také jako lék. Řecké kuchařky byly plné receptů na dorty i masitá jídla s přísadou medu. Euripidés, v pátém století př.n.l., popisuje mísení syra s medem pro výrobu tvarohového dortu. Aspekty života včel a včelařství také podrobně zaznamenal Aristoteles. Včela byla symbolem bohyně Artemis. (Crane, 1992)

Římské včelaření popisuje několik starověkých autorů. například Varro, Virgilius, Columella, Plinyus, Aelian a Palladius. Varro píše o tom, jak správně vykuřovat a prohlédnout včelstvo. Jak vyčistit a přemísťovat úl, jak získávat med, ale i jak krmit včely nebo jak usazovat roj. Collumela vysvětluje správnou konstrukci proutěné košnice a její usazení na včelnici. Virgilius, jeden z největších římských básníků, zase zapsal dělbu práce včel v úle. Římané využívali med jako oběť bohům a hojně také při vaření. Včelaření v Římské říši vzkvétalo. (Kritsky, 2017)

Archeolog Amihai Mazar odhalil v ruinách starého města Rehov třicet úlů ze slámy a nepálené hlíny. úly byly nalezeny pečlivě uspořádány. Celá včelnice pak mohla obsahovat až 100 úlů. To dokládá, že i ve starověkém Izraeli bylo včelařství velmi rozvinuto. (Crane, 1992)

Ve starověké Číně se také včelařilo. Chována zde byla včela východní, převážně v dřevěných bednách. To popisuje Fan Li ve své knize "Zlatá pravidla obchodního úspěchu".(Campbell and Crane, 1984)

V lesích severní Evropy byla divoká včelstva v kmenech stromů obhospodařována už zhruba od roku 2000 př.n.l. První úly zde byly pravděpodobně opracované kmeny padlých

stromů postavené přímo. Tak vznikly primitivní kláty. Korek a jiné typy kůry byli také využívány k výrobě úlů. Dalším častým druhem úlu byli slaměné, proutěné či rákosové koše tzv. košnice. (Crane, 1992)

3.1.4 Včelařství středověku

Počátek středověku se datuje k pádu Západořímské říše roku 476. I když nejsou známy žádné ilustrace včelařství z raného středověku, lze předpokládat, že včelařství dále vzkvétalo. Důkaz o výrobě medoviny nalézáme v epické básni o Beowulfovi z osmého století. Karel Veliký nařídil, že všechny dvory musí provozovat včelařství a dvě třetiny získaného medu se musí odevzdat koruně. V zákonech z doby krále Alfréda (Anglie 885-899) se uvádí, že zloděj včel má být postižen nejvyššími pokutami. (Kritsky, 2017)

Med a vosk byly důležitými obchodními artikly. Podle dohody z Wedmoru, která ukončila vikinské nájezdy do Anglie, se ustanovil obchod mezi Anglií a Norskem. Ryby a kožešiny putovaly do Anglie a zpátky vlna, slad, pšenice a med. Včelařství také souběžně vzkvétalo podél řeky Dněpru (dnešní Bělorusko a Ukrajina) díky poptávce po medu a vosku. Zejména vosk se v té době používal jako lepidlo, vodotěsný tmel, pojivo pigmentů do barev a ve slévání pomocí ztracené formy. (Kritsky, 2017)

Košnicové úly se také občas využívaly jako zbraň. Dle legendy svatá Gobnait (Abigail), jeptiška z Irska sedmého století, odehnala zloděje dobytka tak, že zatřásla včelím úlem a vypustila tak na zloděje rozžručené včely. Při obléhání Chestru roku 908 angličtí obránci prolomili dánsko-norské obléhání tak, že házeli úly plné včel přes městské hradby. Když roku 1066 Vilém Dobyvatel dobyl Anglii, přikázal sčítání všech držav v anglických zemích. Toto sčítání zahrnovalo i počet včelařů a jejich úlů. Ukázalo se například, že každé 3 z deseti držav v Essexu včelařily. Každá měla průměrně 4 až 5 úlů a celkově bylo v Essexu 601 úlů. (Kritsky, 2017)

Produkce Anglických včelařů nebyla zanedbatelná. Podle účetní knihy z Beaulieuského opatství v Hampshiru roku 1270 vyprodukovalo opatství 155 liber vosku a 1782 liber medu. Neuvádí se z kolika úlů bylo toto množství získáno, ale odhady ukazují na počet kolem tří set. Mniši si tehdy více cenili vosku než medu, protože ho používali při bohoslužbách, na výrobu svíček nebo k zapečetění sudů. Ve 13. století byl cukr 50x dražší než med, dnes je med 8x dražší než cukr. (Kritsky, 2017)

Lesní včelaření tzv. brtnictví bylo ve středověku rozšířeno zejména ve střední a východní Evropě. Brtníci zvětšovali dutiny stromů aby napomohli růstu divokých kolonií včel které v nich našli a to přirozeně vedlo k vytváření nových dutin ve snaze nalákat do nich vyrojené včely. K vytvoření brti si včelař vybral vzrostlý rovný strom, pokud možno s už existující malou dutinou. Za použití žebříku či lan se k dutině dostal a okolo ní vyřezal obdélníkový otvor. Ten pak dále prohloubil dlátem. Když byl brtník s dutinou hotov zakryl ji prknem s malým otvorem a opatřeným znakem vlastníka. Aby se předešlo vyloupení medvědem či člověkem, byly brtě hloubeny ve výšce 5 až 25 metrů. Pokud byl strom dost velký, mohl brtník vyhloubit do jednoho kmene 2 až 3 dutiny a tím vlastně vytvořil stromovou včelnicí. Běžné bylo odříznutí koruny stromu, aby se zamezilo zlomení kmene v oslabených místech. K vytváření brtí se volilo několik druhů stromů nejvíce však duby a

borovice. Po smrti stromu bylo možné brť od zbytku kmenu odříznout a umístit na včelnici s podobnými úly. Takové úly se nazývají kláty. (Crane, 1992)

Včelnice později lidé začali zřizovat blízko svých obydlí. Poznali totiž, že včely létají na rostliny pěstované na zemědělské půdě a kolem lidských obydlí se tak nacházejí cenné zdroje včelí pastvy. Způsob včelařství se tedy změnil z lesního na tzv. rolnické včelaření. Rolnickým včelařům se říkalo včelníci. Včelaření už nebylo hlavním zdrojem obživy chovatele, ale to neznamená, že by nebylo úspěšné. Prameny hovoří o tom, že roku 1123 bylo mnoho medu v zemědělských krajinách a málo v lesnatých. Husitské války v 15. století u nás způsobily krátkodobý úpadek včelaření, ale posléze se včelařství znovu rozvíjí, mimo jiné se začíná včelařit v dřevěných bednách z prken. Vosk je velmi žádaným artiklem pro řemeslníky a církve. Med se využívá například na výrobu perníků, ale produkce medoviny klesá. (Voda, 2009)

Včely a Včelařství do hloubky popisuje několik středověkých textů. Jedním z nich je Geoponika, byzantská sbírka o zemědělství. Konkrétně její třináctý a patnáctý svazek. V díle jsou včely velmi vyzdvihovány: "Včela je nejmoudřejší a nejdůvtipnější ze všech zvířat a nejvíce se blíží člověku v inteligenci. Její práce je vskutku božská k nejvyššímu prospěchu lidstva. Její společenský život připomíná ta nejlépe spravovaná města...". O včelí matce se zde píše jako o králi, který vládne úlu. Další kapitoly dávají rady jak správně včelařit. Jaká je správná konstrukce úlu, jak udržet včely v úle nebo jak úly správně přepravovat. Geoponika dále radí vybírat med z úlu třikrát v roce, v květnu, v létě a naposledy v říjnu. Klade důraz na to, aby včelař nevybral všechny zásoby, ale ponechal včelám desetinu během prvních dvou medobraní a dvě třetiny při posledním. V knize také nalezneme popis nejlepšího druhu medu "Měl by být průsvitný a světle žlutý barvou, hladký na dotyk, vytažen zůstává v dlouhé šňůře. Stoupá do špičky a klesá pomalu, je hustý a má mít dobré aroma". (Dalby, 2011)

Bestiáře, knihy, popisující zvířata jak reálná tak fiktivní, jsou také cenným zdrojem informací o středověkých znalostech včel. Ve Worksopském bestiáři z Anglie kolem roku 1185 se nachází ilustrace včelaře, který vypouští roj včel do košnice. Aberdeenský bestiář z dvanáctého století obsahuje obrázek včelnice se třemi proutěnými košnicemi. V Bodleianském bestiáři (1220-1250) můžeme nalezt důkaz o tom, že středověcí včelaři toho o včelách mnoho věděli. Píše se: „Včela (apes) se takto nazývají, neboť se rodí bez nohou (pedibus). Později jim narostou jak nohy, tak křídla". Dále text popisuje, jak si včely staví své „hrady“ z vosku a že „utíkají před kouřem“. Nicméně autor také uvádí, že se včely líhnou z červů, rozkládajících maso dobytka a z mršin koní vylétají sršni. (Kritsky, 2017)

Ilustrované rukopisy nám také mohou poskytnout náhled do vývoje ochranného oděvu včelařů. Rukopis *Flemish Psalter* (1320-1330) ukazuje včelaře s jednoduchým závojem, v podstatě jen kusem látky přes hlavu. Holkhamský rukopis obsahuje ilustraci včelaře s dobře ušitou kápí. Rawlinskův rukopis zobrazuje včelaře z poloviny patnáctého století v oblečení, které se takřka vyrovná dnešnímu včelařskému vybavení. (Kritsky, 2017)

Zatímco se středověké včelaření rozvíjelo v Evropě ani včelaři ve východním středomoří nezaháleli. Včelařilo se zde podobně jako v antice. Úly byly nadále vodorovné, vyrobené s hlíny a stavěné na sebe. Důkazy z vykopávek datované do křížáckého období (1095-1291) svědčí o tom, že včelařství se provozovalo za použití vodorovných válců z hlíny a slámy nebo velkých džbánů jako úlů. Tyto byly vršeny na sebe nebo zapuštěny do zdi. (Crane, 1992)

Většina záznamů o včelaření pochází z Evropy, ale včelařství se rozvinulo nezávisle v několika částech světa. To lze připisovat výskytu různých druhů včel. Jedním z nich je včela obrovská (*Apis dorsata*), která se vyskytuje v Asii. Je dvakrát větší než naše včela medonosná a staví si jeden velký plást, který visí z větví velkých stromů nebo skalních převisů. První důkaz o jejích kontaktu s člověkem lze nálezt na mezolitických skalních malbách ze střední Indie, které vyobrazují sběrače medu jak vylézají na stromy za plásty včely obrovské. Takový sběr je dodnes provozován například v Nepálu. (Crane, 2000)

Pravé včelařství se v Asii rozvinulo v souvislosti se včelou východní (*Apis cerana*). Ta podobně jako včela medonosná sídlí v dutinách, avšak je o něco menší a produkuje méně medu. A dalším rozdílem je například to, že trubčí buňky jsou stejně velké jako dělničí buňky včely medonosné. První konkrétní zmínky o včelaření v Číně se datují do třetího století našeho letopočtu. Popisují jak přilákat roj. Dřevěná bedna s malým vstupním otvorem má být natřena včelím voskem. Během rojení se má do ní chytit několik včel, které mají být posléze vypuštěny a úl se pak postupně zaplní včelami. (Kritsky, 2017)

Čínské znalosti včelaření se dále prohlubují během následujícího tisíciletí. Je zřejmé, že čínští včelaři si byli vědomi včelích kast, rozuměli rojení a věděli jak sjednocovat a dělit včelstva. Za mongolské nadvlády, roku 1273, vznikla kniha *Zásady zemědělství a hedvábnictví*, která obsahuje kapitulu o včelách. Úl popisuje jako „malý dům“ nebo pletený kulový koš. Také v ní lze najít popis prací, které by měl včelař provádět během roku. Například dělení včelstva pokud včelař zjistí, že je dostatečně silné s více než jedním „králem“. Tato včelařská kapitola byla sepsána o dvě stě let dříve než podobná vznikla v Evropě a je důležitým zdrojem informací o čínském včelařství, neboť se bohužel nedochovaly žádné archeologické nálezy ani ilustrace. (Kritsky, 2017)

O včelaření ve středověké Koreji a Japonsku víme ještě méně. Sběr medu od divokých včel byl v Koreji praktikován nejpozději v prvním století našeho letopočtu. Nevíme však, zda se tehdy už vyskytovalo i pravé včelařství. To lze doložit až v polovině šestého století, kdy se odtud včelařství pravděpodobně rozšířilo do Japonska. Včelaři ve Vietnamu chovali svá včelstva v košnicích a bedněných úlech již v devátém století n.l. Na reliéfu v chrámu Angkor Wat v Kambodži z roku 1000 se nachází včelstva usazená v úlech z kmenů, beden a hlíny. (Kritsky, 2017)

Je pravděpodobné, že včelařství se nezávisle na Číně rozvinulo v Indii. V Rājatarangini, historickém textu z roku 1148, se lze dočíst, že sběr medu od divokých včel byl provozován v Kašmíru již od „pradávná“. Na Evu Crane zapůsobily podobnosti mezi tradičním řeckým včelařením a včelařením v Indii a vyslovila teorii, že členové armády Alexandra Velikého, kteří zůstali v Indii, zde mohli zavést vodorovné hliněné úly ze středomoří. Relativně pozdní rozvoj včelařství v Asii lze přikládat výskytu jiných přírodních sladidel než medu, zejména cukrové třtiny a maltózy, která se vyráběla kvašením naklíčené rýže nebo ječmene. (Crane, 2000)

I Mayové ve střední Americe se naučili pracovat se včelami. Včelařství se zde pravděpodobně rozvinulo, podobně jako v Evropě, ze sběru medu divokých včel, který se postupně vyvinul v lesní včelaření. První důkazy o mayských úlech se datují mezi roky 300 př.n.l. až 250 n.l. Mayové včelařili s bezžihadlymi včelami rodu *Meliponini* v horizontálních úlech z kmenů uzavřených dřevěnými či kamennými disky. Dřevo zkoušku času nevydrželo, ale je zdokumentováno 12 nalezišť těchto disků. Na ostrově Conzumel u poloostrova Yucatán

byl nalezen hliněný kuřák ve tvaru Mayského včelího boha Ah Mucan Cab. Tento nález je datovaný asi do roku 1400 n.l. Mayové požívali med jako obětinu, přísadu do nápojů nebo jako obchodní artikl s Aztéky. Tančili rituální tance během roku, aby bohové dopřáli květiny včelám a pomohli jim v jejich práci. (Crane, 1992)

Na rozdíl od včely medonosné mayská včela *Melipona beecheii* nestaví svá hnízda pouze z vosku, ale z cerumenu, což je vosk smísený s rostlinnými pryskyřicemi. Také svůj med neukládají v plástech, ale v kulatých "medových hrnečcích" z cerumenu, které jsou větší než plodové buňky. Důležitým dokladem o mayském včelaření je Madridský kodex, vytvořen kolem roku 1400. Na jeho posledních deseti stranách jsou popsány podrobnosti o včelaření Mayů. Například ilustrace úlů z kmenů stromů, medobraní a božstev spojených se včelařením. (Kritsky, 2017)

3.1.5 Včelařská revoluce

Třicetiletá válka (1618-1648) zasadila včelařství v Evropě citelnou ránu. Úpadek včelařství lze připsat na vrub úbytku obyvatelstva, rozpadu řemeslnických cechů, ale také zákazu placení dávek a poplatků voskem. Takřka zaniká lesní včelaření. (Voda, 2009)

Další důležitou událostí ve světě včelaření bylo rozšíření včel do nového světa. Roku 1622 byla včelstva včely medonosné poprvé dovezena do Severní Ameriky z Anglie. Včely postupně přešli lidský postup přes americký kontinent a američtí indiáni jim říkali „moucha bílého muže“. Roku 1688 byly včely dovezeny z Francie na Guadalupe v Karibiku. Do Austrálie se včely dostaly roku 1822 a na Nový Zéland roku 1839. Na západním pobřeží Severní Ameriky byly včely vysazeny až v padesátých letech 19. století. (Kritsky, 2017)

V Evropě se o obnovu a rozkvět včelaření zasloužili až panovníci osvícenského absolutismu. Pruský král Fridrich II Veliký roku 1752 nařídil zemědělců za odměnu, i pod hrozbou trestu, chov včel. Celolánici měli mít 4 včelstva, pololánici 3 a domkáři jedno. V Rakousku a i v našich zemích byly podporovány spíše včelařské velkochovy. (Voda, 2009)

8.4.1775 vydala Marie Terezie včelařský patent pro Dolní Rakousy a Moravu. Morava měla silnou včelařskou tradici a vždy zde byly dobré podmínky pro včelaření. Patent tvořilo 16 bodů. První se týkaly výuky včelařství. Zřízena je škola ve Vídni a také školy pobočné v Brně a Novém městě u Vídne. Výuka byla bezplatně přístupná. V dalších bodech se například píše, že včelařství bude „na věčné časy“ od veškerých poplatků a daní osvobozeno. Devátý a desátý bod upravuje kočování se včelstvy. Čtrnáctý bod dovoluje včelaři pronásledovat roj, až 24 hodin po vyrojení, na cizím pozemku či majetku. Patnáctý bod zakazuje ničení úlů pod hrozbou pokuty dvakrát vyšší než bude vyčíslená škoda. Poslední bod pak upravuje trestní právo. (Voda, 2009)

Podobný patent vydala Marie Terezie také pro Čechy a to na Pražském hradě 30.8.1776. Uvádí snahu prospět zemi rozvojem chovu včel. Na rozdíl od moravského patentu zdůrazňuje význam včel pro obživu obyvatelstva. Poddaným má být umožněno získat první úl vrchností. (Voda, 2009)

Období průmyslové revoluce se vyznačuje mnoha objevy a vynálezy a ani včelařství v tomto ohledu nezůstalo stranou. Angličan sir George Wheler popsal roku 1682 proutěné úly používané v Řecku. Tyto se o rozevíraly směrem nahoru a pod víkem byly položeny dřevěné

tyče mírně konvexního tvaru na něž včely stavěly plásty. Díky tvaru úlu včely nepřipevňovali plásty ke stěnám a šlo tak o první známý rozebíratelný úl. (Crane, 1992)

Roku 1717 Vaillant z Francie popsál, že nektar vzniká v rostlinách, do té doby se mělo za to, že padá z nebe. Včelí vosk byl také přesně popsán němcem Hornbostelem jako výměšek včelích žláz. Slovinec Antonín Janša jako první roku 1771 popsál páření matky s trubcem. Francis Huber vynalezl roku 1792 takzvaný listový úl, který sestával z rámků spojených k sobě panty tak, že se daly od sebe rozevírat. Takový úl byl výborný pro studium včelstva, ale dosti nepraktický pro včelaření. (Crane, 1992)

Ukrajinský včelař Petr Prokopovič byl prvním, kdo začal vyrábět úly na komerční úrovni. Kolem roku 1806 vyrobil asi 10 000 úlů své konstrukce. Úl měl 3 svislé sekce, ve kterých byly umístěné rámky. Do úlu byl přístup zezadu, ale včely nadále upevňovaly své dílo ke vnitřku úlu a rámky k sobě, takže rozebírání díla nebylo vůbec jednoduché. Tento problém se podařilo vyřešit, a ustanovit tak významný milník ve včelaření, až roku 1851. (Bill Mares, 2018)

Pastor Lorenzo Langstroth z Pensylvánie se o hmyz zajímal již od mládí. Když u svého přítele včelaře uviděl skleněnou kouli se včelstvem, hned si domů přivezl dva bedněné úly se včelstvy. Pořídil si Huberův listový úl a mnoho včelařské literatury. V jedné z nich si poznamenal pasáž „rámky s jejich obsahem mohou být zvednuty díky správné mezeře zanechané mezi nimi". Langstroth prohloubil zářezy v úlu na kterých jsou položeny rámky a vytvořil tak mezi víkem a rámky mezeru asi 3/8 palce (1 cm). Pod víko pak položil sklo a mohl včely pozorovat bez jejich vyrušení. (Crane, 1992)

Na podzim roku 1851 píše Lorenzo ve svém deníku „Uvažoval jsem, jako už mnohokrát, jak bych se mohl zbavit nutnosti odřezávání plástů od zni úlu,..., takřka očividný nápad, použít stejnou mezeru jako pod víkem, mi přišel na mysl". Langstroth svůj nápad ihned vyzkoušel a zjistil, že včely mezeru respektují a pokud jsou rámky patřičně vzdáleny od stěn a sebe navzájem, nepřipevňují je včely k sobě. Jeden z největších objevů včelařství, tzv. včelí mezera, byl na světě. (Crane, 2000)

Němec Johanness Mehring roku 1857 zkonstruoval první matrici na výrobu mezistěn (voskové pláty pro základ plástů). V době bouřlivého včelařského rozvoje můžeme nalézt i českou stopu. Franz von Hrushka o jehož národnosti se vedou spory mezi Čechy a Rakušany roku 1865 sestrojil první medomet (zařízení na získání medu). Rámky s plásty tak mohly být tzv. vytočeny bez znehodnocení včelího díla což ušetřilo včelám mnoho práce a včelařům spoustu medu. Dalším významným vynálezem byl kuřák Mosese Quinbyho, který je takřka stejný jako ty, které používáme dnes. (Bill Mares, 2018)

Z těchto objevů "včelařské revoluce" těží včelaři po celém světě dodnes. Od té doby se včelařství výrazně posunupříklad ve šlechtění (inseminace matek) nebo v unifikaci rámkových měř a zdokonalení úlů. Nicméně moderní včelaření se na mnoha místech zásadně neliší od toho praktikovaného v druhé polovině 19. století.

3.2 Včelařský rok

Včelstva se ve svém rozvoji řídí stavem přírody a proto je nelze mechanicky ošetřovat každý rok stejně. Včelařský rok není tak pevně vázaný na rok kalendářní, ale na fenologický kalendář a biologické zákonitosti. Vývoj ve včelstvu postupuje společně se změnami v okolní

vegetaci, proto rozlišujeme tzv. vůdčí včelařské rostliny. Jejich rozkvět indikuje začátek jednotlivých období včelařského roku. Včelařský rok lze dělit dvěma způsoby. Obě dělení začínají v podletí (období regenerace). První dále pokračuje včelařským podzimem, zimou, předjařím, následuje jaro, časné léto a končí plným létem. Druhé dělení zahrnuje období regenerace, vegetačního klidu, období růstu, produkce a reprodukce. Zde popíšeme včelařský rok podle prvního dělení, protože je srozumitelnější v souvislosti s kalendářním rokem. (Brown, 2010)

3.2.1 Podletí

Období je charakteristické zejména žněmi. Hlavní snůšky nektaru se již nevyskytují. Pro včely významné rostliny jsou slunečnice, podruhé kvetoucí jetele a starček. Při vhodných podmínkách mohou včely sbírat medovici z jedlí. Včely vychovávají zimní dlouhověkou generaci a vyhánějí trubce z úlu. Podletí je prvním obdobím včelařského roku, protože včelař připravuje svá včelstva na zimování a příští produkční rok. Úkolem včelaře je po posledním medobraní zakrmit včelstva dostatečným množstvím cukerných zásob. Také je nutné z úlu odstranit staré tmavé plásty a vytavovat z nich vosk. Je nutné provést prohlídku včelstev a případně nutnosti je spojit nebo měnit matky. (Veselý, 2013)

3.2.2 Podzim

Začátek včelařského podzimu indikuje rozkvět ocúnů. Nastupuje chladnější počasí, tak se včely stahují do chumáče, uprostřed kterého je stále méně plodu. Včelstva přestávají plodovat v říjnu, ale některá až na začátku listopadu. Přerušování plodování dává ideální příležitost včelaři k přeléčení proti varroóze, protože jinak by mohli roztoči přežít ošetření v zavíčkovaném plodu. Zpravidla se léčí dvakrát fumigací a jednou aerosolem. Je také nutné včelstva řádně uteplit, ale zároveň zachovat přísun čerstvého vzduchu do úlu. (Veselý, 2013)

3.2.3 Zima

Včelařská zima je období klidu. Včelstva přečkávají tuto dobu v zimním chumáči, který tvoří několik vrstev včel shluklých kolem matky. Po zimním slunovratu matka začíná omezeně klást a nastává tak obměna zimní generace včel za mladou. Včely také čekají na první prolet, který probíhá za vhodného počasí (12°C a více). Ten je důležitý zejména proto, že si při něm mohou včely vyprázdnit výkalový vak. Včelař musí zejména zajistit včelám klid, ochránit je například před vniknutím hlodavců do úlu a do úlu nezasahovat, pokud to není nezbytně nutné. Je také potřeba sbírat zimní měl kvůli povinnému vyšetření. Je ideální období pro vzdělávání a přípravu na další sezónu. (Veselý, 2013)

3.2.4 Předjaří

Začátek tohoto období signalizuje rozkvět olše lepkavé. Do včelstev začíná proudit první pyl a nektar. Zatím přínos nepokryje spotřebu a včelstvo tak dále spotřebovává zimní zásoby a proto může hrozit, že bude trpět hladověním. Významnými rostlinami jsou pro včely v tomto období olše, vrby či lísky, které poskytují dostatek prvního pylu. Dále kvetou šafrány, sněženky nebo sasanky. Dochází k hromadným proletům včel. Matka začíná souvisle klást a

dochází k intenzivní výměně zimní dlouhověké generace včel za letní krátkověkou. Nejdůležitějším zásahem včelaře je v tuto dobu jarní prohlídka. Provádí se když teplota ve stínu dosahuje alespoň 10°C. Je třeba zjistit sílu včelstva, množství plodu a zásob. Včelstvo potřebuje mít alespoň 5kg zásob. (Veselý, 2013)

3.2.5 Jaro

Včelařské jaro přináší rozkvět třešně ptačí. Následuje kvetení ovocných stromů, které je první hlavní snůškou a včelstva si tak mohou začít tvořit první medné zásoby. Matka silně klade a včelstva sílí. Dostavuje se stavební pud, který je třeba využít včasným rozšířením včelstev. To nám také pomůže zabránit rojení včelstev, které je pro včelaře nežádoucí, protože svá včelstva zpravidla rozmnožuje pomocí oddělků. Po snůšce z ovocných stromů následuje snůška z řepky ozimé, která je v našich podmínkách hlavní snůškou roku. Včelaři také posilují a vyrovnávají včelstva, tak aby byla připravena na snůšky a aby u nich bylo možné provést kontrolu užitkovosti. Začíná kočování se včelstvy. (Přidal a Čermák, 2005)

3.2.6 Časné léto

Vůdčí rostlinou časného léta je trnovník akát. Včelstva jsou v plné síle a pokud nebyla včas rozšířena, vyrojí se. Pokud včelař nezamezil rojení protirojovými opatřeními, která jsou v zásadě preventivní, má za úkol sbírat roje. Výhodou rojů je, že mají silně vyvinutý stavební pud a lze je tak využít k vystavování mezistěn. Včely začínají v tomto období víčkovat svoje medné zásoby, což znamená, že med je zralý a můžeme ho vytáčet. O správné zralosti se lze přesvědčit jednoduchým refraktometrem nebo trhnutím plástem ve vodorovné poloze, přičemž med nesmí vykapávat ven. Časné léto je ideální období pro chov matek. (Přidal a Čermák, 2005)

3.2.7 Vrcholné léto

Rozkvétá lípa malolistá, která signalizuje plné léto. Snůšku poskytuje mák, hořčice nebo svazenka. Největší snůšku dávají lesy v podobě medovice. Vrcholí všechny práce zaměřené na produkci medu. Kočuje se včelstvy za polními plodinami i medovicí. V období snůšky se projevuje shromažďovací pud. Včely se uklidní a nejeví známky rojivosti. Jsou plně zaměstnány sběrem nektaru nebo medovice a jejich zpracováním. Pokračuje stavba nových plástů. Posledním medobraním končí včelařský rok. Následné zakrmení včelstev již spadá do podletí. (Veselý, 2013)

3.3 Význam včelařství v současném zemědělství

Včely plní z hospodářského hlediska dvě hlavní role. Tou hlavní, nicméně často opomíjenou, je jejich opylovací činnost. Druhou je tvorba včelích produktů zejména medu, druhotně pak vosku, propolisu, mateří kašičky a včelího jedu. Opylování je přenos pylových zrn z prašníku na pestík v květech. *„Vliv dobrého opylení se u hmyzozsnných plodin projevuje ve vyšším počtu nasazených semen, někdy se zvyšuje hmotnost tisíce semen, u*

plodonosných plodin-kultur se zvyšuje sklizeň co do kvantity i kvality, zvyšuje se podíl nejlepších jakostních tříd ve sklizni.“ (Veselý et al., 2003).

3.3.1 Ve světě

Opylovací činnost za úplatu je v některých zemích velice rozšířená a lukrativní. Například do Kalifornie je v době květu mandloní (leden) přisunuto kvůli opylování více než 65% (1,5 milionu) všech včelstev z USA. Na každý akr (0,404 ha) mandloní při tom připadají 2 včelstva. Asi 100 00 včelstev se ročně přesouvá do Maine pro opylení borůvek (*Honey Bee Program - Bees, Beekeeping & Protecting Pollinators - Managing Bees for Pollination*, no date). Mnoho včelstev se také přisouvá k ovocným stromům. To má dobrý důvod. Odhady hovoří, že včelí opylování ročně zvýší hodnotu úrody rostlin o 15 miliard dolarů pouze v USA. Včelaři za práci svých včel dostanou v Americe dobře zapláceno. V roce 2018 to bylo průměrně 190 dolarů za jedno přisunuté včelstvo, včelař však musí zajistit, aby jím přisunuté včelstvo mělo dostatečnou sílu. (*Bee Culture*, 2018)

Největší velmocí včelaření je Čína se sedmi miliony včelstev na 140 tisících včelnic. V Číně se nevčelaří pouze se včelou medonosnou ale také s její příbuznou včelou východní, která je v Číně původním druhem. Zavčelení je tu pouze 0,73 včelstev na km². Výjimečné místo má Čína v produkci mateří kašičky. Získá se zde 95% světové produkce tohoto včelího produktu a to zejména proto, že včelstva jsou na produkci mateří kašičky cíleně šlechtěna a její produkce bývá hlavním cílem včelaře. (Zheng, Wei and Hu, 2011)

Světová produkce medu je 1,85 milionu tun (2018). Největšími producenty medu jsou Čína s 474 tisíci tun, následuje Evropská unie (161 tis. tun), Turecko (104 tis. tun) a USA (81 tis. tun). EU není v produkci medu soběstačná navzdory tomu, že je domovem 600 000 včelařů se 17 miliony včelstev. V roce 2017 byla průměrná cena dovozového medu ze zemí mimo EU 2,06 eura za kg. Oproti tomu med vyvezený z EU mimo stál 5,87 eura za kg. (*FAOSTAT*, 2020)

Včelího vosku se na planetě ročně vyprodukuje 69 633 tun (2018). Největším producentem je Indie (22 550). Dalšími významnými producenty jsou Etiopie (5 244), Argentina (4 950), Turecko (4 052) a Jižní Korea (4 018). (*FAOSTAT*, 2020)

Podle Organizace pro výživu a zemědělství bylo v roce 2018 na světě 92 291 583 včelstev. Ceny medu na světě značně kolísají. Nejnižší je v USA (477 dolarů/tunu). Nejvyšší je naopak ve Švýcarsku (18 125 dolarů/tunu). Podobně je tomu s cenami vosku, pohybují se od 2 500 dolarů za tunu (Egypt) po 7 500 (Španělsko). (*FAOSTAT*, 2020)

Včely však nemají pouze význam ekonomický, ale také nenahraditelný význam ekologický. V EU je přínos chovu včel pro společnost vyčíslen na 14,2 miliardy eur. Včely se podílejí na opylování divoce rostoucích rostlin. Mnoho hmyzosubných rostlin je na opylování včelami přímo závislých. Včely tak zvyšují biodiverzitu v krajině a zabraňují převládnutí větrosných rostlin. Mohou také sloužit jako bioindikátor prostředí, neboť těžké kovy (olovo, mangan, měď) se ukládají ve včelích produktech. (Potts *et al.*, 2010)

Včely dokonce mohou pomoci v kriminalistice, lze je totiž naučit vyhledávat pach konkrétních látek např. výbušnin nebo drog.

3.3.2 V České republice

U nás je včelařství velmi dobře rozvinuté a výborně organizované. Český svaz včelařů sdružuje převážnou část včelařů. Zajišťuje evidenci, prevenci před chorobami a všestranně pomáhá rozvoji včelařství. K září 2018 bylo u nás 62 736 včelařů, kteří obhospodařovali 740 314 včelstev. To dokazuje zajímavý trend v ČR, který najdeme jen málokdy ve světě. Totiž že u nás převládají hobby včelaři s počtem pod 3 úly nad profesionály a poloprofesionály. Včelařů s počtem nad 100 včelstev bylo v roce 2018 u nás pouze 231. (*Portál eAGRI - resortní portál Ministerstva zemědělství*, 2020)

Význam včelařství si uvědomuje i vláda ČR a podporuje ho jak finančně tak legislativně. V roce 2018 bylo přidělena od ministerstva zemědělství dotace na počet včelstev 94 684 732 korun. I Evropská unie podporuje naše včelaře. Pro rok 2018 byla pro včelařské odvětví určena částka 2,5 milionu eur a to zejména na: boj proti varroáze, úhradu nákladů na rozборы medu, obnovu včelstev a technickou pomoc a na vzdělávací činnost. ('Situční a výhledová zpráva včely 2019', 2019)

Bohužel u nás není výrazněji zavedeno přisouvání včel k opylení hospodářských plodin za úplatu. K hospodářským plodinám se tak kočuje většinou pouze kvůli dobré snůšce a potažmo tak za produkcí medu. Evidováno je 14 268 přísunů včelstev k plodinám a 19 853 přísunů do lesu za účelem sběru medovice. ('Situční a výhledová zpráva včely 2019', 2019)

Produkce medu v ČR není zanedbatelná v roce 2018 činila bezmála 9 tisíc tun. Spotřeba medu v ČR je 1 kg na osobu. Přitom nejsme soběstační. Dovezeno bylo v roce 2017 celkem 3178 tun medu přitom vyvezeno bylo pouze 1 540 tun. Nejvíce se k nám dováží z Ukrajiny (942 tun), Slovenska (379 tun) a Uruguaye (298 tun). Největším odběratelem je Německo (588 tun). Cena medu u nás činí zhruba 200 Kč za kg. (European Commission, 2017)

Výroba včelího vosku je u nás dlouhodobým problémem včelařů. U nás se ho vyrobí okolo 300 tun (*FAOSTAT*, 2020). V jeho produkci nejsme soběstační a tak se ho mnoho dováží a vznikají podmínky pro pančování vosku nežádoucími příměsími, například parafinem. Problém je, že na mezistěnách s příměsími včely nerady staví své dílo a když ho vystaví tak se může v horku zborit, protože náhražky vosku mají zpravidla nižší teplotu tání.

3.4 Úbytky včel a včelí nemoci

V nedávné době se objevily zprávy o vymírání včel. Faktem je, že podle dat z Organizace pro výživu a zemědělství OSN počet včelstev každým rokem roste v roce 2000 to bylo 69 mil. v roce 2010 79 mil. včelstev a v roce 2018 87 mil. (*FAOSTAT*, 2020). Není tedy důvod k panice. To ale neznamená, že se moderní včelaření nepotýká s problémy spojenými se zdravím včel. Úhyny včelstev jsou běžnou součástí přírody a jakkoliv se jim včelař snaží zabránit, někdy jim nepředěje.

Nejběžněji včely hynou během zimy, kdy žijí pouze ze zásob, matka neploduje (do slunovratu) nebo ploduje pouze omezeně (do předjaří). V zimě se zpravidla projeví veškeré chyby, které včelař udělal v předchozím roce. Zejména je nutné předějit nedostatku zásob, opotřebením dlouhověkých zimních včel nebo vyměnit včas nekvalitní matku. Ačkoliv u nás jsou zimní ztráty relativně nízké, od 6 do 20% včelstev dle roku, jinde situace není tak dobrá.

V USA zaznamenali včelaři v zimě 2007/2008 ztráty dokonce 36%. V té době byl na Floridě poprvé popsán nový fenomén a to CCD (Colony collapse disorder). (vanEngelsdorp *et al.*, 2009)

3.4.1 Vliv přezimování na ztráty včelstev

Zima je klíčovým obdobím v životě kolonie včel a je přirozené, že v tomto období dochází ke ztrátám včelstev. Je důležité aby ve včelstvu bylo co nejméně kleštíků včelích. Proto se provádí před zimou v ČR tři ošetření, která mají za úkol tohoto docílit. Je dobré aby vyzimovala co nejsilnější včelstva. Klíčový je v tomto ohledu dostatečný počet dlouhověkových včel, které se rodí od konce července až do září a mají pozastavený hormonální vývoj. Je nutné aby se tyto včely na podzim moc nezatěžovaly, proto je potřeba tomu přizpůsobit zootechniku (např. zakrmit po posledním medobraní). Dlouhověké včely mají za úkol přečkat v úle celou zimu a vychovat první generaci včel v předjaří. Nedostatek dlouhověkových včel může mít za následek zhroucení včelstev CCD. (Veselý, 2013)

3.4.2 Colony collapse disorder (syndrom zhroucení včelstev)

Tento jev byl poprvé popsán v zimě mezi lety 2007 a 2008. Typické pro něj je, že úl je zcela prázdný nebo pouze s hrstkou dělnic a matkou, ale jinak se zdá být vše v pořádku. Včelstvo mělo před zhroucením dostatek zásob a dokonce se v něm často nachází plod. Vyšlo najevo, že CCD postihlo 50 až 90% amerických včelstev. Následoval usilovný výzkum, který měl za cíl najít příčinu. Výsledkem bylo nalezení viru akutní paralýzy nalezeného u 96% zhroucených kolonií. (vanEngelsdorp *et al.*, 2009)

Jinými teoriemi vzniku tohoto jevu jsou: vliv pesticidů, změny klimatu, přemožení parazitických roztočů či snad dokonce signál mobilních telefonů. Nic z toho se však spolehlivě neprokázalo. Syndrom už není izolován pouze v Severní Americe, ale objevil se již i v Evropě a to v Polsku, Německu nebo Španělsku. Za 6 let existence fenoménu mu padlo za oběť mnoho z 10 milionů ztracených včelstev, což je skoro dvojnásobek běžných ztrát. (vanEngelsdorp *et al.*, 2009)

3.4.3 Varroáza

Varroáza je infekční onemocnění způsobené roztočem kleštík včelí (*Varroa destructor*). Původně pochází z Asie, kde parazituje na místní včele východní. Dnes je rozšířen po celém světě kromě Austrálie. K nám byl zavlečen v roce 1978. Napadá zejména plod, ale i dospělé včely. Množí se v zavíčkovaných buňkách včelího plodu, kde se živí zásobními látkami larvy. Včely se pak často rodí s poškozenou anatomií (syndrom deformovaných křídel) nebo je zkrácena jejich délka života. (Shimanuki and Knox, 2000)

S varroázou se bojuje v průběhu celého roku. Na začátku roku včelař sleduje spad měli, dokonce ji povinně posílá na vyšetření a podle výsledku se rozhodne, zda bude nutnoprístupit k nátěru plodu brzy na jaře. Varroázu lze tlumit vyřezáváním trubčích plástů na které se díky delšímu trubčímu vývoji kleštici rádi uchylují. Po medobraní se používá kyselina mravenčí, která se odpařuje do úlu. Na podzim se pak provádí fumigace a ošetření aerosolem za použití akaricidů. V České republice je boj s varroázou veskrze úspěšný, k tomu dopomáhá legislativa, která ukládá včelařům povinnost léčení a diagnostiky měli, ale také dobrá

organizovanost včelařů a spolupráce s Výzkumným ústavem včelařským v Dole. (Veselý, 2013)

3.4.4 Mor včelího plodu

Mor včelího plodu je onemocnění, které přináší včelařům noční můry. Je to bakteriální onemocnění způsobené bakterií *Paenibacillus larvae larvae*. Šíří se velmi odolnými spory, které vydrží v půdě i desítky let. K jeho šíření přispívá špatná hygiena v úle zaviněná zpravidla včelařem. Nemoc je rozšířená po celém světě a u nás se jí díky radikálnímu potlačování daří držet na minimu. Jak už název napovídá, nemoc napadá včelí larvy. Ty se nakazí s potravou. Spory vyklíčí v žaludku larvy a bakterie začnou rozkládat tkáně a larva hyne na celkovou sepsi. Zbytky larvy pak na dně buňky vysychají a tvoří takzvaný příškvár, který se snaží uklidit dělnice, dospělé včely sice bakterie nenapadá, ale mohou přenášet spory a šířit tak nákazu dál. Mezi včelstvy se pak nemoc může šířit vyloupením slabého nemocného včelstva. (Veselý, 2013)

Mor se dá léčit antibiotiky což je u nás legislativně zakázáno a vzhledem k vysokému zavčelení krajiny by takové léčení mohlo být neefektivní. Při propuknutí nákazy se vymezi ohnisko a ochranné pásmo v němž se nařídí prohlídka všech včelstev. Žádná včelstva se nesmí z ohniska ani ochranného pásma vyvážet. Všechna nakažená včelstva musí být zlikvidována (spálena) a to včetně úlu a nářadí, které přišlo do styku s nakaženým včelstvem. Vše nehořlavé je nutno vydesinfikovat a následně provést asanaci včelnice. Po provedení opatření se čeká jeden rok a provede se další vyšetření všech úlů v ochranném pásmu, pakliže je výsledek negativní nákaza se prohlásí za zaniklou. (Veselý, 2013)

3.4.5 Hniloba včelího plodu

Bakteriální onemocnění, které vyvolává několik druhů bakterií, zejména *Milissococcus pluton* a *Paenibacillus alvei*. Hniloba se vyskytuje po celém světě. U nás je ojedinělá díky radikálním potlačování ohnisek v okolních zemích je nakaženo až 10% včelstev. Bakterie se dostávají s potravou do žaludku včelí larvy, kde se množí a vyplní celý žaludek. Nemocné larvy hynou ještě před zavíčkovaním. Pokud nejsou čističkami odstraněny tak se změní v příškvár na spodu buňky. Bakterie je životaschopná minimálně tři roky. Z přeživších larev se líhnou malé včely. Hniloba propuká hlavně v chladných měsících roku, zejména na jaře. Vrcholí v květnu a červnu. Při vypuknutí nákazy se zřídí ohniskové a ochranné pásmo. Nakažené včelstvo se likviduje a prohlíží se včelstva v ochranném pásmu. Úly a rámky se vyžehnou dohněda a před dalším použitím dvakrát vydezinfikují. (Shimanuki and Knox, 2000)

3.4.6 Nosematóza

Je nejrozšířenější nemocí dospělých včel. Vyvolává jí prvoci *Nosema apis* a *Nosema carenae*. U nás je prvkem pravděpodobně napadeno asi 50% včelstev. Poprvé byl zjištěn v roce 1857 ve včelích výkalech. Včela se nakazí spory z potravy. Do včelstva se může nákaza zavléct prostřednictvím loupeže nebo zalétlých nakažených včel. Může ji také šířit sám včelař spojováním včelstev nebo přidáváním nakažených plástů. Nosematózu silně ovlivňuje teplota. Nejlépe se nemoc rozvíjí při 30-35°C, čím více teplota klesá nebo roste, tím

se více inhibuje množení prvoka. Pokud je teplota 37°C po dobu 10ti dnů včela se vyléčí. Nosema narušuje střevní stěnu včel a brání efektivnímu trávení hlavně bílkovin. Včely předčasně stárnou, nedokonale stravují glycidy a to může, zejména v zimním období, způsobit přeplnění výkalového vaku a kálení v úle (úplavici). Nejlepším opatřením proti nosemě je správná zootechnika chovu. Silná včelstva, která si snadno drží tepelnou regulaci jsou méně náchylná. Účinný lék je antibiotiku fumagilin, ale používání antibiotik je při chovu včel v EU zakázáno. Pomáhá také kyselina mravenčí. (Veselý, 2013)

3.4.7 Zvápenatění včelího plodu

Zvápenatění působí houbová plíseň *Ascosphaera apis*. V Evropě je tato nemoc známá od 50-tých let 20. století. V Severní Americe se objevila roku 1968. Larva se nakazí výtrusy nebo myceliem s potravou. Ty vyklíčí v zadní části střeva a vyrostou do dlouhých vláken. Mycelium proroste až na povrch larvy a tam případně tvoří plodnice. Spory jsou velmi odolné a mohou být infekční i 15 let. Dlouho vydrží v medu, vosku a pylu. Ačkoliv včelstvo často obsahuje zárodky ne vždy nemoc propukne. Často se zwápenatění projeví společně s virovým onemocněním nebo při zasažení pesticidy. Nakažené plásty se odstraňují a pálí a vydezinfikuje se úl a pracovní pomůcky. Velmi úspěšné je léčení deskami s kyselinou mravenčí (Formidol). (Shimanuki and Knox, 2000)

3.4.8 Nenakažlivé nemoci

Většinu nenakažlivých nemocí včel a jejich plodu lze připsat na vrub včelaři. Jedná se o hynutí plodu hladem, zimou nebo přehřátím, průjem a zácpu včel. Dobrymi zootechnickými zásadami je možné těmto nemocem předejít. Důležité je zajistit včelám dostatek zásob (hlad), nerozšiřovat úl příliš brzy (zima). Vyvarovat se neodbornému uzavírání včelstev (přehřátí). Nedopustit aby včely zimovaly na melecitózním medu nebo medovici (průjem). Průjem včel (úplavice) se projevuje zejména v zimním období, kdy se včely dlouho nemohou prolétnout, venkovní teplota nestoupne nad 12°C. Způsobuje ho přeplnění výkalového vaku včel, který může v toto období tvořit až polovinu hmotnosti včely. Příčinou je těžce stravitelná potrava, zejména minerální zbytky z medovicového a melecitózního medu. (Veselý, 2013)

3.4.9 Stres včelstev

Včely čelí v moderním světě mnoha stresorům. Na jedné straně jsou to virové, bakteriální a parazitární nemoci. Na straně druhé jsou to změny v prostředí. Rostlinná diverzita v krajině klesla a s ní i různorodost včelí pastvy. Včely jsou také vystaveny koktejlů chemických látek, které jsou používány v intenzivním zemědělství. Naštěstí již včelstva nehynou v souvislosti s postřiky, jak tomu bylo za minulého režimu. Nicméně se stále používá mnoho postřiků rizikových pro včely a ty pokud jedince nezahubí, snižují jeho odolnost a dlouhověkost a tím ohrožují zdraví celého včelstva. Další významnou roli hraje změna klimatu. V minulých suchých letech se zkrátilo snůškové období. Rostliny odkvetly dříve a podletí se tak posunulo ze srpna již do července. To má za následek dřívější nástup generace dlouhověkých včel, které tak musejí přežít delší dobu a také jsou delší dobu vystavovány ostatním stresorům. V neposlední řadě je třeba zmínit výživu včelstev. Prokázalo se, že různorodá a bohatá pylová výživa zvyšuje imunitu včel a na úrovni včelstev zlepšuje

rezistenci vůči nosematóze a varroáze. Oproti tomu nedostatečná výživa způsobuje energetický stres a snižuje odolnost vůči nemocem. (Huang, 2012)

Naším úkolem je co nejvíce zmírnit tlaky, které na včely působí. V tomto boji nejsme zdaleka bezmocní. Včelaři si mohou kromě povinných léčebných opatření osvojit i jiné preventivní a léčebné techniky k tlumení nemocí. Zvláštní pozornost je nutné věnovat varroáze, která je vektorem mnoha dalších nemocí. Důležité je dodržovat správné zootechnické zásady. Například včas zakrmit včelstva v podletí aby se zbytečně neupracovala dlouhověká generace včel nebo nevytáčet všechn med ze včelstva aby nedošlo hladovění (energetickému stresu). Pomoci mohou zemědělci, ale i široká veřejnost. Utváření biopásů mezi poli či vysazování nektarodárných a pyloidárných rostlin obohatí včelí pastvu stejně jako upuštění od sekání anglických trávníků. (Mayack and Naug, 2009)

3.5 Dlouhověkost včel

Dlouhověkost je zásadní včelí vlastností. Liší se u všech tří včelích kast. Nejkratší dobu žijí trubci (6 týdnů) a pokud se jim podaří spářit, zemřou krátce poté. Nejdelší život mají včelí matky. Dožívají se až pěti let, ale než k tomu dojde, je matka většinou vyměněna a to buď včelařem a nebo samotnými včelami při tzv. tiché výměně. Nejzajímavější dlouhověkost však pozorujeme u dělnic, neboť se u nich velmi liší. V zásadě lze rozlišit dva druhy dělnic dle dlouhověkosti. Krátkověké včely se rodí od zimního slunovratu až po ukončení matčina kladení na podzim a dožívají se 6-8 týdnů. Mají za úkol pilně pracovat v úle a mimo něj. Musí nasbírat dostatek zásob aby včelstvo přežilo období vegetačního klidu. (Veselý, 2013)

Dlouhověké včely se rodí pouze od vrcholného léta do poloviny podzimu a dožívají se až devíti měsíců. Zpočátku v úle moc nepracují. Jejich chvíle přijde v zimě, kdy musí po slunovratu začít zahřívát střed sezení včelstev z 22°C na 35°C aby se mohl plod, z vajíček, která matka začala klást, zdárně vyvíjet. Plod také musí krmit ze zásob ve svém těle. Dvě včelí dělnice dokáží ze svých zásob vychovat jednu mladušku, což postačí k přežití a rozvoji včelstva na jaře. Je důležité aby se dlouhověkých včel v úle nacházel dostatek, v zimě to má být alespoň 10 000, což odpovídá 1kg včel. (Přidal a Čermák, 2005)

Biochemické rozdíly mezi dlouhověkými a krátkověkými včelami nejsou zcela vysvětleny a zaměřím se na ně dále v této práci. Je však známo několik okolností které život včel prodlužují. Je to jednak potrava, včely krmené pylem se dožívají vyššího věku než včely krmené pylovými náhražkami. Dále včely, které jsou krmeny mateří kašičkou žijí déle než ty, které ji v potravě nepřijímají. Jinými okolnostmi, které snižující délku života včel, jsou nemoci. Nosematóza i varroáza mohou významně snížit život včely, což je zejména u dlouhověkých včel a matek velký problém. Dlouhověkost včel také může ovlivňovat produkce plodového feromonu (brood pheromone) jehož přítomnost zkracuje život včel. Vliv má také nadmořská výška. Při pokusu ve výšce 970 m včely přežily 138 dní a ve výšce 200 m pouze 73 dní. (Shimanuki and Knox, 2000)

Jaký je rozdíl mezi vývojem dělnice a včelí matky? Obě kasty mohou být vychovány ze stejného oplozeného vajíčka. Rozdíl je v potravě, kterou obdrží mladá larvička. První 3 dny jsou larvičky krmeny podobnou kašičkou, ale poté jsou larvy určené k vývoji matky krmeny speciální mateří kašičkou. Ta podpoří růst nové matky, která je pak mateří kašičkou krmena i po vylíhnutí z kukly a po celý svůj život. Larvy budoucích matek mají rozdílnou metylaci

DNA než dělničí larvy což může být hlavním důvodem rozdělení obou fenotypů. Zajímavé také je, že vývoj včelí matky trvá pouze 17 dnů, zatímco vývoj dělnice 21 dnů a trubce dokonce 24. To jen ilustruje důležitost matky a jejího co nejrychlejšího vývoje. Matka má ve svém těle vyšší koncentraci vitellogeninu, juvenilního hormonu a inzulinu. (Yang *et al.*, 2017)

Mateří kašička je složená z vody 63,5%, proteinů 14,2%, cukrů 14,5% a popelovin 1,4%. Čínský tým vedený Wenchao Yangem provedl pokus prodloužení, života včel pomocí krmiva s mateří kašičkou. Po 72 dní drželi včely v laboratoři a poskytovali jim různou potravu a to cukerný roztok, řepkový pyl v cukerném roztoku a mateří kašičku v poměru 2,4 a 16% v cukerném roztoku. Nejkratší délku života vykazovaly včely krmené pouze cukrem, všechny zemřely do 25 dne po začátku pokusu. Včely které měly i řepkový pyl v průměru žily o pět dnů déle. Nejdelší život vykazovaly včely krmené 4% mateří kašičkou. Do 40 dne se jich dožilo více jak 80%. Do konce pokusu se jich dožilo 25%. Následovaly včely krmené 16% kašičkou a pak ty krmené 2% kašičkou. (Yang *et al.*, 2017)

3.5.1 Vitellogenin

Vitellogenin je prekurzorový protein vaječného žloutku, který u včel najdeme v hemolymfě. Je prekurzorem lipoproteinů a fosfoproteinů a tvoří většinu vaječného žloutku. Vitellogenin chrání dělnice ve včelstvu před oxidačním stresem a prokazatelně podporuje včelí dlouhověkost. Včely tento protein ukládají v tukovém tělisku v zadečku a v hlavičce. Včelí matky syntetizují vitellogenin a dlouhověké dělnice ho mají v těle velké množství. Množství vitellogeninu je nejvyšší ve vylíhnutých jedincích a postupně klesá. Bylo prokázáno, že přítomnost otevřeného plodu ve včelstvu množství vitellogeninu snižuje. (Barchuk, Bitondi and Simões, 2002)

3.5.2 Juvenilní hormon

Juvenilní hormon patří do skupiny seskviterpenů, které můžeme najít v hmyzí říši. Reguluje mnoho fyziologických pochodů hmyzu a pravděpodobně působí jako antagonist vitellogeninu. JH zajišťuje růst larev a brání jejich předčasné metamorfóze. Skládá se s hormonu, které jsou vylučovány žlázami v mozku včelí larvy. Koncentrace juvenilního hormonu postupně klesá a způsobí tak nejdříve zakuklení larvy a později i líhnutí dospělé včely. Množství JH pak zase nějakou dobu roste (asi do 15 dne), kdy se včely stávají strážkyněmi úlu a vysoká koncentrace JH je spojována s jejich agresivitou. (Barchuk, Bitondi and Simões, 2002)

3.6 NMR analýza

3.6.1 princip

NMR (nukleární magnetická rezonance) je fyzikální jev, který je využitelný k pozorování interakcí atomových jader v molekule. Běžně má atom různě pohybující se částice, pokud ho však umístíme do magnetického pole, dojde ke srovnání magnetických momentů. Následně můžeme aplikovat druhé magnetické pole kolmé k předchozímu, k tomu se využívají vysokofrekvenční magnetická pole. Volbou velikosti pole se pak dá určit, které

atomy jsou v rezonanci. Přiblížením cívkou do blízkosti magnetického momentu se v ní generuje napětí a to lze změřit. (*Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy - Frank A. Bovey, Peter A. Mirau, H. S. Gutowsky, 1988*)

3.6.2 NMR spektroskopie

NMR se často kombinuje se spektroskopii jako způsob získání informací o vzorku díky rezonanci molekul. Přináší detailní kvantitativní informace o molekulách v roztoku nebo v pevné fázi. Při spektroskopii získáme spektrum tvořené z vrcholů (peaků), které nám umožní určit množství látky ve vzorku. Citlivost měření závisí na síle magnetického pole aplikovaného na vzorek. (*Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy - Frank A. Bovey, Peter A. Mirau, H. S. Gutowsky, 1988*)

3.6.3 Využití

NMR je technologie široce využitelná v medicíně. Nejznámějším využitím magnetické rezonance je zobrazování tělních tkání. Lze zde ale také využít NMR spektroskopii. Dalším oborem kde se NMR využívá, je chemie. Pomocí ní lze zjistit složení sloučenin. Toho dosáhneme porovnáním frekvencí ze získaného spektra se známými frekvencemi předem změřených látek. (*Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy - Frank A. Bovey, Peter A. Mirau, H. S. Gutowsky, 1988*)

3.6.4 NMR analýza hmyzu

NMR je nadějnou metodou i ve výzkumu hmyzu. Lze ji využít k získání informací o těle hmyzu bez usmrcení zkoumaného jedince nebo k analýze látek v hmyzu obsažených.

Mezinárodní tým, vedený Chitcholem Phalarakshem z Thajska, zkoumal hemolymfu larev a kukel lišajů druhu *Manduca sexta*. Hemolymfa prochází mnoha změnami při vývoji larev a kukel hmyzu. Pro výzkum byly vybrány larvy pěti postupných vývojových stádií a dále kukly od prvního do čtvrtého dne zakuklení a znovu desátého dne. Hemolymfa byla odebrána (400–700 μ l) naříznutím břišní části jedince, který byl předem umrtven. Vzorky byly následně analyzovány pomocí NMR spektroskopie. Získaná spektra potvrdily, že hemolymfa nezůstává stejná v průběhu vývoje larev a kukel. Například koncentrace alaninu vzrostla o 300% z třetí do páté fáze vývoje larev a znovu klesla o 50% v kuklách. Další významné změny byly pozorovány v koncentraci glutamátu, lysinu a mnoha organických kyselin. (Phalaraksh *et al.*, 2008)

Německý tým pod vedením Franze Schillinga zase pomocí NMR mikroskopie zkoumal složení těla lýkožrouta smrkového na živých exemplářích. Zaměřili se hlavně na množství tuku a vody v tělech kůrovců. Brouci byli vychováni v laboratoři. Jejich znehybnění bylo dosaženo snížením teploty na 2 °C. Pro analýzu byli umístěni do zkumavek a zafixováni v nich byli skleněnými tyčinkami. Po testu byly výsledky měření tuků a vody porovnány s výsledky z konvenčních analytických metod. Dále bylo několik brouků vystaveno kontrolovanému letu po dobu dvaceti hodin. Tito jedinci byli následně znovu analyzováni. Z výsledků bylo možné vyčíst jaké množství vody a tuků brouci letem spotřebovali. NMR analýza je neinvazivní a nedestruktivní metodou proto bylo možné opakovat měření na živých exemplářích což jiné konvenční metody neumožňují. (Schilling *et al.*, 2012)

Další výzkum byl proveden v Číně a zabývá se metabolomikou hemolymfy larev martináče pajasanového (*Samia cynthia*) v závislosti na konzumaci 1-deoxynojirimycinu (DNJ). Vědci zkoumali, zda má DNJ vliv na metabolismus cukrů a jeho toxicitu pro martináče. Byly zkoumány změny v hemolymfě larev po ústním podání DNJ a morušového latexu. Morušové listy produkují latex, který je přirozenou obranou před housenkami. Na rozdíl od Bource morušového (*Bombyx mori*), na kterého latex nepůsobí, jsou housenky Martináče pajasanového na latex citlivé. Pokud byly larvy nakrmeny pouze 5 μ l morušového latexu dvě pětiny z nich zemřely a zbytek byl citelně pozastaven ve vývoji. Naproti tomu když byly nakrmeny DNJ nebo jeho směsí s latexem, žádná larva nezemřela a morfologie larev byla stejná jako těch z kontrolní skupiny. Následně byly odebrány vzorky hemolymfy, aby mohly být analyzovány v NMR. Vědci se zaměřili ve spektrech na důležité látky metabolismu (leucine, valine, alanine, lysin, trehalózu a další). Pozorovali mnoho změn v hemolymfě larev po jejich nakrmení latexem nebo DNJ. Z výsledků vyplynulo, že DNJ, který se přirozeně v latexu vyskytuje je netoxický a za toxicitu latexu odpovídá jiný dosud neidentifikovaný faktor. (Deng *et al.*, 2015)

4 Metodika

Experiment byl založen na analýze včel odebraných ze tří stanovišť. Včely byly skladovány v mrazáku při teplotě -80°C . Před analýzou byla těla včel zbavena trávicího traktu. Poté byly vzorky analyzovány v nukleární magnetické rezonanci. Získaná spektra byla zpracována pomocí softwaru a výsledky byly upraveny do grafů a interpretovány.

4.1 Odběry

Odběry včel probíhaly od března roku 2018 do února 2019. Včely byly vybírány vždy z horního nástavku a krajních plástů, tak aby došlo co největšímu omezení přítomnosti mladých včel ve vzorcích. Odběry vzorků probíhaly na třech stanovištích (Hoštice, Sukorady a ČZU). Každý měsíc byl proveden odběr na stanovištích, přičemž z každého stanoviště byly vybrány 2 úly. Z každého úlu byly vždy odebrány 2 vzorky s přibližně dvaceti včelami. Odebrány byly do plastových zkumavek Falcon 50ml. Jeden byl do několika desítek minut zamrazen v konvenčním mrazáku a druhý byl ponechán ve speciálním kelímku s mezistěnou s přístupem k cukernému roztoku (sacharóza:voda, 1:1), včely byly v uzavřené prostoru ponechány, aby byl zajištěn stejný obsah jejich trávicího traktu a hlavně aby se homogenizoval obsah jejich hemolymfy a předešlo se tak vlivům jejich bezprostřední potravy na výsledek vzorku. Z každého měsíce tak mělo být získáno vždy 12 vzorků.

Stanoviště Hoštice se nachází v okrese Praha-východ na pravém břehu řeky Vltavy v nadmořské výšce 270 metrů. Jeho majitelem je Výzkumný ústav včelařský v Dole. K odběrům byly vybrány úly čísel 28 a 30. O odběry na stanovišti se staral MvDr. Martin Kamler převážně sám.

Staviště Sukorady nalezneme v okrese Mladá Boleslav ve stejnojmenné vesnici asi 10km východně od Mladé Boleslavi v nadmořské výšce 230 metrů. V blízkosti stanoviště teče říčka Klenice. Vlastníkem stanoviště a úlů jsem já, Jakub Hájek. K odběrům byly vybrány úly čísel 3 a 4. Všechny odběry na stanovišti jsem provedl vlastnoručně.

Poslední stanoviště se nacházelo na České zemědělské univerzitě v Praze. Včelín byl umístěn na pokusném pozemku univerzity v nadmořské výšce 280 metrů. Vlastníkem úlů je prof. ing. Karel Voříšek, Csc. Tímto mu děkuji za možnost odebírat jeho včely ať už s jeho pomocí nebo samostatně. K odběrům byla vybrána včelstva čísel 1 a 2. Na stanovišti se podařilo provést odběry ve všech dvanácti měsících

Uchování vzorků bylo zajištěno nejprve v konvenčních mrazácích (VÚVč Dol, Sukorady, kolej ČZU) při -18°C . Následně byly vzorky převezeny do mrazáku na ČZU, kde byly zkumavky se včelami skladovány při teplotě -80°C . Transport mezi mrazáky byl proveden pomocí polystyrenového izolačního boxu s chladícím médiem, tak aby nedošlo ke zvýšení teploty vzorku nad 0°C .

Na označování zkumavek se vzorky a následně informací o vzorcích v počítači byl vytvořen speciální čtyřmístný kód. První číslo je pořadí odběru tedy 01 = březen a 12 = únor. Následuje počáteční písmeno stanoviště (H, S nebo U). Další část tvoří číslo úlu a poslední písmeno označuje vzorek buď ihned zamrazený (U) nebo vzorek vyláčených včel (D). Celý kód pak například vypadá 02-S-4-U, což značí druhý odběr (dubnový) ze Sukorad z úlu číslo 4 a vzorek byl ihned zamrazen.

4.2 Příprava vzorků k analýze

Celkem bylo k analýze připraveno 132 vzorků. Nejprve byly zváženy plastové 15ml Falcon zkumavky. Poté bylo v laboratoři připraveno několik vzorků včel a ponecháno k roztátí při pokojové teplotě. Z každého vzorku bylo vybráno 5 včel, které byly skalpelem dekapitovány. Dále se pomocí pinzety odstranily trávicí trakty včel, které se umístily do Eppendorf zkumavek. Zbylých 5 včelích těl bylo umístěno do předem navážených 15ml Falcon zkumavek a zváženo aby bylo možné zjistit hmotnost vzorku. Následně byly vzorky znovu zmrazeny v -80°C .

Po vyjmutí vzorků z mrazáku byly postupně přesunuty do 20ml kádinky a bylo přidáno 5ml metanolu (Avantor Performance Materials, Polsko). Následně byla těla včel rozemleta za pomoci přístroje ultra-turrax homogenizer (IKA, Německo). Mezi vzorky byla mlecí hlavice dvakrát vymyta metanolem, aby nedošlo k vzájemné kontaminaci vzorků. Po namletí byl obsah kádinky přelit zpět do 15ml Falcon zkumavky.

K dokonalému smísení vzorku dopomohlo několik kroků. Začalo se vířivým mícháním na přístroji vortex IKA MS 3 basic (IKA, Německo) po dobu jedné minuty. Následně byly vzorky ponořeny na 5 minut do ultrazvukové lázně Ultrasonic cleaner set, WUC-AO3H (Witeg, Německo). Poté byly vzorky odstředěny v odstředivce Rotanta 460 R (Hettich, Německo) při 4 600 otáčkách po dobu deseti minut. Byly zváženy nové 15ml Falcon zkumavky a byla do nich přepipetována pipetami 100-1000 μl (VWR, Česká republika) odstředěná tekutina (supernatant). Posléze byly vzorky odpařeny proudem dusíku po dobu zhruba 1 hodiny při teplotě 45°C aby bylo docíleno odpaření metanolu.

Vysušený vzorek byl zvážen a bylo k němu přidáno 3ml destilované vody. Následně byl vzorek 1 minutu promíchán na vortexu a na 3 minuty umístěn do ultrazvukové lázně. 540 μl vzorku bylo přesunuto pipetou do 2ml Eppendorf zkumavky. Pipetou 20-200 μl (VWR, Česká republika) bylo do vzorku přidáno 60 μl fosfátového NMR pufru (1,5 M K_2HPO_4 a NaH_2PO_4 při pH 7,4 s 5mM TSP a 0,2% NaN_3 v D_2O) a vše opět vortexováno a odstředěno v odstředivce Micro star 17 (VWR, Německo). Z toho bylo 600 μl přesunuto z Eppendorf zkumavky do speciálních NMR kyvet a vzorky byly připraveny k analýze. Odstředěný sediment v 15ml Falcon zkumavkách a zbytek supernatantu byly pro případ nutnosti opakovaného měření uloženy v lednici na České zemědělské univerzitě.



Obrázek 2: Odstranění trávicího traktu včely



Obrázek 3: Mletí včel a extrakce v metanolu

4.3 NMR analýza

NMR měření byla provedena ve spektrometru Bruker Avance III (Bruker Corp., Německo) vybaveném 5mm PA BBO 500S1 BBF-H-D-O5 Z SP sondou s cívkami ze Z gradientem, pracující na vysoké frekvenci (^1H NMR) 500,23 MHz při teplotě 298K. ^1H NMR spektra byla zaměřena pomocí pulzní sekvence 1d noesy se supresí vody. Parametry spekter byly nastaveny takto: počet skenů byl 128, šířka spektra byla nastavena na 13 ppm, akviziční čas 4 vteřiny, směšovací čas 0,1 sekundy, relaxační prodleva 1 vteřina. Bylo získáno 64 000 datových bodů. Všechny vzorky byly automaticky měřeny v softwaru Topspin 3.7 pl7 (Bruker, Německo). Následovalo zpracování v softwaru Topspin. Každé ze 132 spekter bylo upraveno manuálně a to tak, aby byl peak pufru nastaven na počáteční bod 0,00. Následovala korekce baseline pro spektra a fázování spekter. Posléze byl proveden binning spekter v programu Mestrenova 12. 3. 03 (Mestrelab Research, Španělsko) se šířkou jednoho binu 0,01 ppm. Byla odstraněna oblast vody (4,6-4,7 ppm). Pro profilování spekter byl využit program Chenomx NMR Suit 8.3 (Chenomx Inc., Kanada). Bylo zvoleno 10 látek (trehalóza, glukóza, fruktóza, choline, o-fosfocholine, proline, alanine, valine, leucine a isoleucine.) k identifikaci v knihovně programu a profilováno k zjištění jejich koncentrace ve vzorcích a to konkrétně glukóza, fruktóza, trehalóza.

4.4 Statistická analýza

Nejprve byla provedena transformace dat do programu Microsoft Excel 2016 (Microsoft, USA). Zde byla upravena a byly k nim přidány informace o skupinách. Následně byla data převedena do souboru SPSS statistics ver. 25 (IBM Corp., USA). Tato data byla poté zpracována do grafů.



Obrázek 4: Spektrometr Bruker Avance III

5 Výsledky a Diskuze

Látky v průběhu roku vykazovaly změny v koncentracích. Výsledkem měření je tabulka koncentrací látek vztažená na mg na včelu, která je obsažena v příloze, V následující části jsou tyto hodnoty zpracovány do přehledných grafů, z kterých lze vyčíst změny v průběhu sezóny.

5.1 Sezónní dynamika vybraných látek ve včelách

Pro tato hodnocení byly vybrány odběry včel vystavených po dobu 24h roztoku sacharózy 1:1 na základě předpokladu, že obsah jejich trávicího traktu a především hemolymfy bude homogenizován a tak se předejde vlivům bezprostředně přijaté potravy na výsledky měření.

5.1.1 Sacharidy

Glukóza měla při prvním odběru nízkou koncentraci na všech stanovištích, která se při dalších odběrech zvyšovala. Zejména na stanovišti ČZU se vyskytl v květnu vysoký peak koncentrace až 2,3mg/včelu, poté na stanovišti koncentrace klesá, aby posléze zase stoupla v říjnu a zůstala zhruba na 1,5mg/včelu až do posledního odběru v únoru. Na stanovišti v Hošticích nastal peak glukózy v červenci a srpnu (až 1,8 mg/včelu) což mohlo způsobit zakrmení cukerným roztokem. V září zde koncentrace klesla, načež začala stoupat během října do listopadu. Na stanovišti v Sukoradech se koncentrace glukózy během roku moc neměnila a zůstávala v rozmezí od 0,4-1 mg/včelu. Koncentrace glukózy ve vylučném včelím těle v průběhu roku jsou v grafu 1. Glukóza je nejjednodušší cukr vůbec. Včely ji získávají z nektaru rostlin a ukládají si ji jako jednu z hlavních složek medu. Slouží jim jako zdroj energie pro buňky jejich metabolismu. Je tak zásadní pro správný chod života v úle. Hmyz si také ukládá do svého těla zásoby glykogenu, které mohou být v případě potřeby přeměňovány na glukózu. Glukóza poskytuje 1670kJ využitelné energie na 100g (Chefurka, Horie and Robinson, 1970).

Fruktóza prakticky kopírovala křivku výskytu glukózy v tělech včel. Vyskytovaly se zde stejné peaky a trendy. Za zmínku stojí květnový peak úlů ČZU, 2,4 mg/včelu a také vrchol Hoštické křivky v srpnu, 2 mg/včelu. Změny v koncentraci fruktózy během roku v tělech vylučných včel se nacházejí v grafu 2. Fruktóza je monosacharid, který má v medu druhé nejvyšší zastoupení hned po glukóze a to 38%. Fruktóza je důležitým zdrojem energie hmyzu. Včely získávají fruktózu z nektaru rostlin (Ashford, Smith and Douglas, 2000).

Potrava včel je nejdříve zadržována v medném váčku, ze kterého se v podstatě neabsorbují a poté přechází přes česlo do střeva, kde se živiny absorbují skrze střevní stěnu. Transport glukózy a fruktózy do hemolymfy probíhá především pasivně neboť v hemolymfě je množství těchto cukrů velice nízké. Trehalóza se do hemolymfy dostává především z tukového tělíska, které provádí konverzi tohoto cukru z glukózy. V porovnání s jinými druhy hmyzu má včelí potrava jiné složení. Včely využívají karbohydráty jako palivo k letu, ale nemají velké množství rezervního glykogenu, proto potřebují včely zdroje ze střeva pro let na dlouhou vzdálenost.(Crailsheim, 1988)

Trehalóza vykazovala stejný trend u všech tří stanovišť. Během měsíců roku, kdy jsou včely aktivní, se držela na vyšší koncentraci okolo 0,2 mg/včelu a klidových měsících roku koncentrace trehalózy ve včelích tělech klesla k 0,15 někdy až k 0,1 mg na včelu. Aby byl tento celoroční trend lépe patrný, byl vypracován graf 11, který zprůměrovává všechna stanoviště do jedné křivky. Změny koncentrace trehalózy v průběhu roku u vyláčených včel na jednotlivých stanovištích jsou zobrazeny v grafu 3. Množství trehalózy by mohlo být potenciálním markerem dlouhověkých včel, ale mohlo by se také jednat pouze snížení způsobené nižší metabolickou aktivitou během klidových měsíců roku.

Trehalóza je neredukující disacharid tvořený dvěma molekulami glukózy obsažený v hemolymfě hmyzu. Syntéza trehalózy probíhá v tukovém tělisku, které je hmyzím analogem jater a tukové tkáně. Koncentrace trehalózy v hemolymfě bývá obvykle 1-2% (w/v). Trehalóza je syntetizována z glukózy a UTP (hmyzího ekvivalentu ATP). Trehalóza je hlavním cukrem hemolymfy hmyzu a je využívána jako zásobní látka, která je v případě potřeby pomocí enzymu trehalázy rychle přeměněna na glukózu a využita jako palivo pro buněčný metabolismus například pro letací svaly (Becker *et al.*, 1996).

Byla provedena studie (Blatt and Roces, 2001), která se zaměřila na vliv hladiny cukrů v hemolymfě včel v závislosti na jejich metabolické aktivitě. Včelám byl umožněn přístup k cukernému roztoku (15%, 30% a 50%). Po nakrmení byla změřena metabolická aktivita včel, rychlost vyprazdňování medného včáčku a množství cukrů v jejich hemolymfě. Byly změřeny včely s různou metabolickou aktivitou. Výsledkem bylo, že nezávisle na koncentraci poskytnutého cukerného roztoku byly hodnoty trehalózy, glukózy a fruktózy konstantní pro metabolické aktivity od 0 do 45 ml CO₂h⁻¹. Při vyšší metabolické aktivitě množství trehalózy kleslo a zároveň množství glukózy a fruktózy stoupl (vyjma včel krmených 15% cukerným roztokem). To bylo pravděpodobně způsobeno limitovanou kapacitou konverze glukózy na trehalózu v tukovém tělisku včel (vypočítáno na 92,4 μg glukózy/min) a zároveň při snížené koncentraci cukerného roztoku (15%) nedostačovalo množství cukru transportovaného z medného včáčku do střeva včel, což dohromady vedlo ke snížení cukrů v hemolymfě včel při metabolické aktivitě vyšší než 5 ml CO₂h⁻¹. (Blatt and Roces, 2001)

5.1.2 Cholin a *O*-fosfocholin

Koncentrace cholinu zůstává po dobu aktivity včel poměrně nízká (okolo 0,05 mg/včelu) až na květnový peak na ČZU (0,1 mg/včelu). Jeho koncentrace se zvedá s nástupem klidového období včelařského roku, kdy se pohybuje okolo 0,1 mg/včelu. Rozdíly v koncentraci cholinu během roku jsou v grafu 4. Cholin je analogem vitamínů a slouží jako živina. Nepostradatelný je například ve struktuře fosfolipidů. Z cholinu také vzniká acetylcholin, který je nenahraditelným neurotransmiterem. Cholin je zvláště důležitý v larválních stádiích hmyzu, kdy je nutný pro správný růst jedince. Mnoho druhů hmyzu bez přístupu k cholinu úplně přestane růst. Dále je důležitý k rozmnožování hmyzu např. moucha domácí bez přísunu cholinu vůbec nenaklade vajíčka. Cholin lze z části ne však úplně nahradit jinými sloučeninami (Bridges, 1972).

Acetylcholin je nepostradatelný neurotransmitter v nervové soustavě hmyzu. Díky farmakologii acetylcholinových receptorů hmyzu je nervový systém častým cílem insekticidů, které ač neškodné pro obratlovce, jejichž nervový systém se znatelně liší mají často fatální

vliv na bezobratlé. Mezi takové látky se řadí i neonicotinoidy, které nejenže mohou měnit chování včel, ale také mohou mít vliv na vývoj včel. Potrava plodu produkovaná dělnicemi (krmičkami) obsahuje malé množství acetylcholinu, které je nutné pro správný larvální rozvoj. Neonicotinoidy snižují množství acetylcholinu v potravě plodu, zmenšují velikost podjazykových žláz a vedou k vývojovým vadám ve včelstvu. (Grünwald and Siefert, 2019)

O-fosfocholin vykazuje opačný trend než cholin. To jest, že jeho koncentrace jsou během aktivního včelího období vysoké (okolo 0,06 mg/včelu), před klidovým obdobím dokonce stouply až k 0,08mg/včelu. V zimním období však koncentrace *o*-fosfocholinu klesne až k 0,02 mg/včelu. Abychom tento trend názorně zachytily, tak byl vypracován graf 12, který zprůměrovává všechna stanoviště do jedné křivky. Změny v koncentracích *O*-fosfocholinu naleznete v grafu 5. *O*-fosfocholin je mezičlánkem v syntéze fosfatidylcholinu ve tkáních. *O*-fosfocholin lze najít například v lecitinu. *O*-fosfocholin se vyskytuje například ve slepičích vejcích, ale také ve vajíčkách hmyzu (Kent, 1997).

Změny v cholinu a *O*-fosfocholinu by mohly být markery dlouhověkosti včel, neboť jejich koncentrace v aktivním a klidovém období včelařského roku vykazovala výrazně odlišný antagonistický průběh.

5.1.3 Aminokyseliny

Prolin

Koncentrace prolinu byla na počátku (březen) relativně nízká (asi 0,1 mg/včelu). Následně množství prolinu stoupl na všech třech stanovištích, nejdříve v Hošticích v dubnu až na 0,18mg/včelu. Následně na všech stanovištích koncentrace oscilovala kolem 0,15mg/včelu. V zimě koncentrace prolinu znovu klesla k 0,1 mg/včelu nicméně nejdříve na ČZU a až v únoru v Sukoradech. Změny v koncentracích prolinu během roku lze vyčíst v grafu 6. Pro prolin byl vypracován také graf 13, který zachycuje průměr koncentrací ze všech stanovišť. Prolin je proteinogenní nepolární aminokyselinou. Proto je neslučitelný s některými strukturami proteinů, ale za to se vyskytuje v β -otáčkách právě kvůli jeho nepolárnosti. Prolin se spotřebovává hlavně při činnosti, např. při letu neboť je důležitou součástí Krebsova cyklu, kde je zoxidován za vzniku alaninu (Bursell, 1981).

Proline je dominantní aminokyselinou v hemolymfě včel i mnoha dalších druhů hmyzu (moucha tse-tse, *Pachnoda sinuata* nebo *Phormia regina*). Včelí trubci mají ve své hemolymfě větší koncentrace prolinu než dělnice a proline se u nich více využívá v oxidačním metabolismu i mimo let. Při pokusu s podáváním prolinu včelám před letem či před odpočinkem se ukázalo, že hodnoty prolinu po letu se výrazně snížily. Zároveň hladiny ostatních aminokyselin zůstávají konstantní, což vylučuje změnu objemu hemolymfy včel. Prolin se tak při letu nepochybně spotřebovává. Jeho podáním se však nezvýšila efektivita letu včel. (Micheu, Crailsheim and Leonhard, 2000)

I když prolin vykazoval mírný pokles během klidových měsíců roku, není dostatečně výrazný, aby bylo možné prolin považovat za marker dlouhověkosti včel.

Alanin

Koncentrace alaninu během roku se na všech třech stanovištích výrazně lišila. Zatímco v Hošticích oscilovala okolo 0,04 mg na včelu, na stanovišti ČZU lze pozorovat výrazné peaky v květnu a prosinci (0,08mg/včelu). Výrazné změny byly také na stanovišti Sukorady,

kde byla v březnu koncentrace pouze 0,02 mg/včelu, v květnu stoupla na 0,05 mg/včelu aby posléze klesla k 0,02mg/včelu. Následovaly dva peaky v listopadu a lednu kdy koncentrace stoupla až na 0,08 mg/včelu. Lze tedy předpokládat, že koncentrace alaninu je závislá na stanovišti a nelze jí přiřazovat vztah s dlouhověkostí. Změny v alaninu jsou v grafu 7. Alanin je neesenciální nepolární aminokyselinou, ze které se tvoří proteiny. Je meziproduktem mnoha metabolických drah a umožňuje svalům získávat energii z aminokyselin. Podílí se na dopravě amoniaku ze svalů a na glycidovém cyklu (Luíza and Squillace, 2015).

Aminokyseliny s rozvětveným řetězcem

Všechny zkoumané aminokyseliny s rozvětveným řetězcem (valin, leucin a izoleucin) vykazovaly stejné průběhy křivek. U všech lze nalézt peak v květnu u včelstev z ČZU. Jinak se koncentrace všech těchto látek držela od března až do října okolo 0,02mg/včelu. V zimních měsících lze pozorovat nárůst těchto aminokyselin. Za zmínku stojí listopadový a lednový peak ze Sukorad (leucine až 0,11 mg/včelu) a prosincový peak z ČZU. Změny ve valinu v průběhu roku lze nalézt v grafu číslo 8. Změny v koncentraci leucinu ve včelím těle lze vyčíst z grafu 9. Změny v koncentraci izoleucinu v tělech vyláčených včel během roku najdeme v grafu 10. Byl také vypracován graf 14, který znázorňuje změny koncentrace leucinu v průměru všech stanovišť.

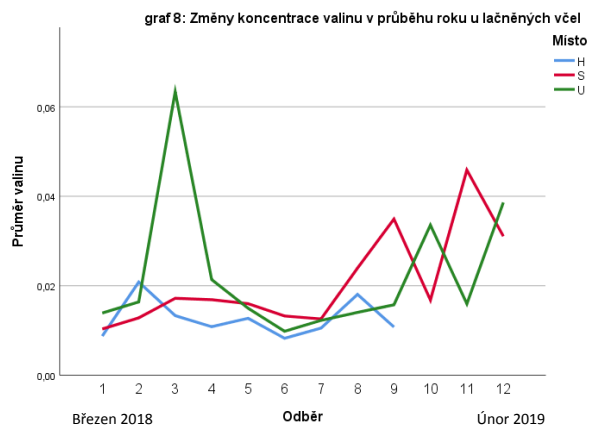
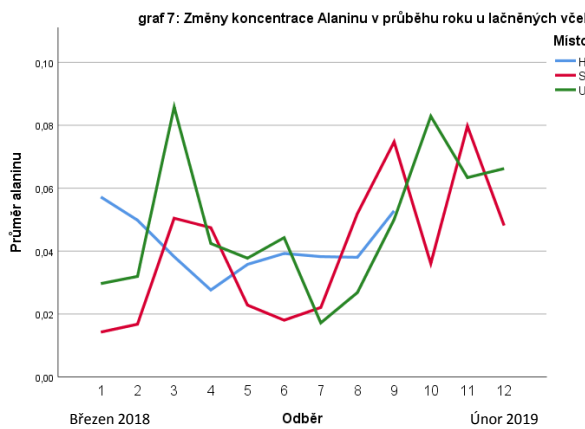
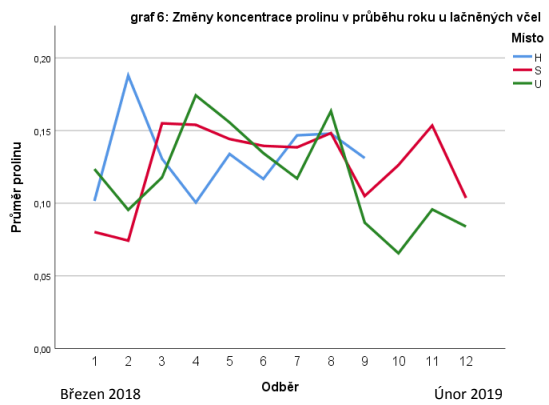
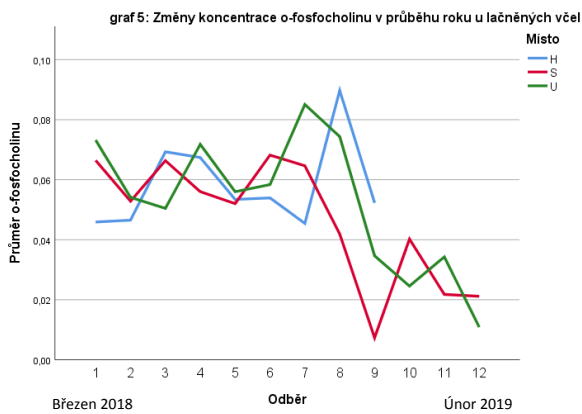
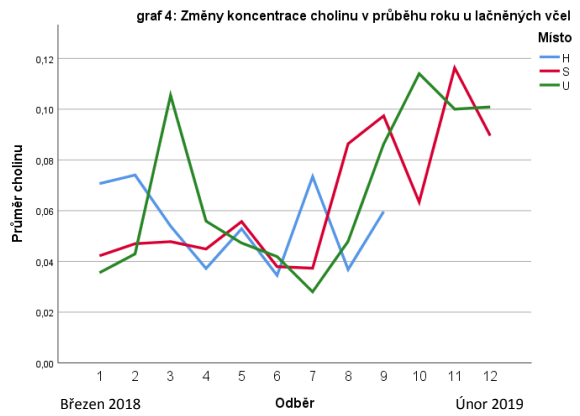
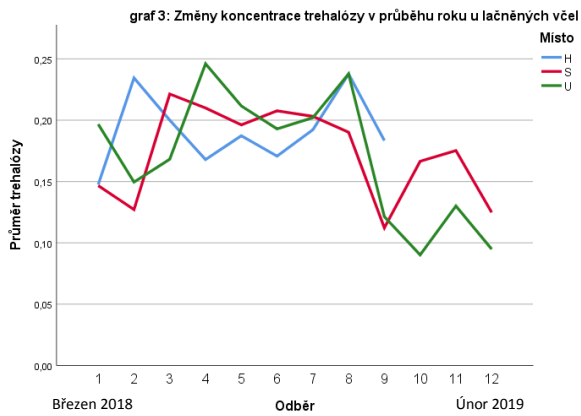
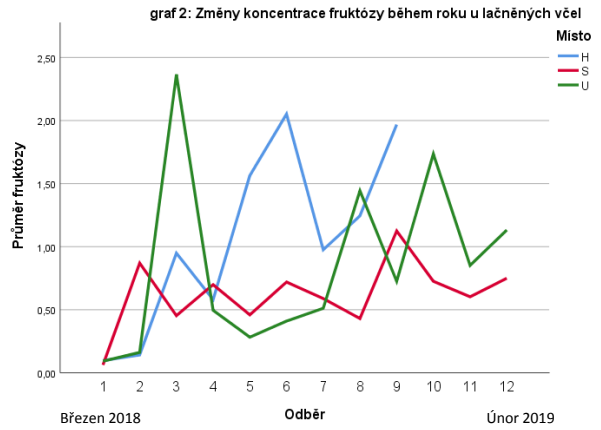
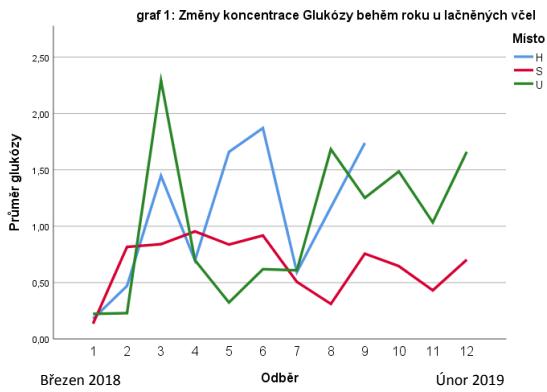
Valin je esenciální aminokyselinou s nepolárním řetězcem. Má hydrofobní charakter a vyskytuje se tak nejvíce uvnitř proteinů. Často bývá využíván například v kulturistice ve směsi aminokyselin s rozvětveným řetězcem tzv. BCAA. Valin je odbouráván ve svalech tukové tkáni, ledvinách a mozku, kde slouží jako zdroj energie (Helms, Aragon and Fitschen, 2014).

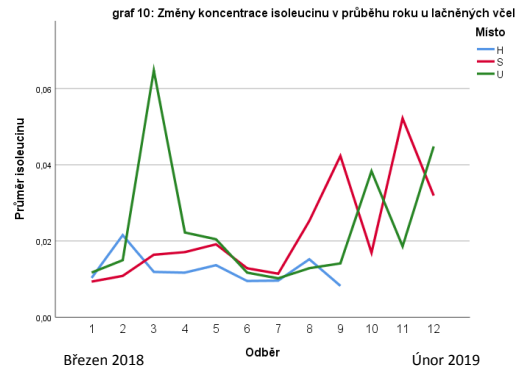
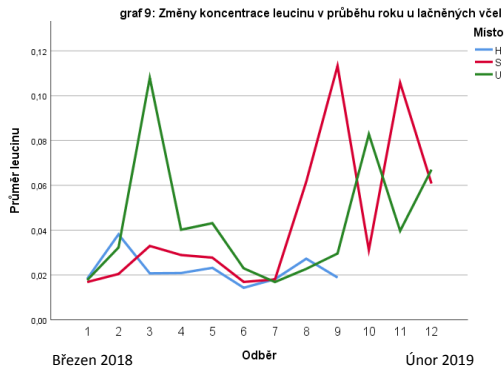
Leucin je také esenciální proteinogenní aminokyselinou. Společně s valinem a izoleucinem tvoří skupinu aminokyselin s rozvětveným řetězcem. Tvoří hydrofobní interakce. Leucin je ve stravě označován jako E641, zvýrazňuje chuť a vůni. Zvyšuje syntézu proteinů ve svalech a tak je hlavní složkou kulturistických přípravků BCAA. Dokáže regulovat příjem potravy neboť působí na hypotalamus a také umí pomoci při cukrovce 2. typu (Helms, Aragon and Fitschen, 2014).

Izoleucin stejně jako valin a leucin esenciální proteinogenní aminokyselina s rozvětveným řetězcem. Je glykogenickou i ketogenní aminokyselinou. Je spojován s rezistencí k inzulinu a u diabetických zvířat v laboratoři ho najdeme více (Lynch and Adams, 2014).

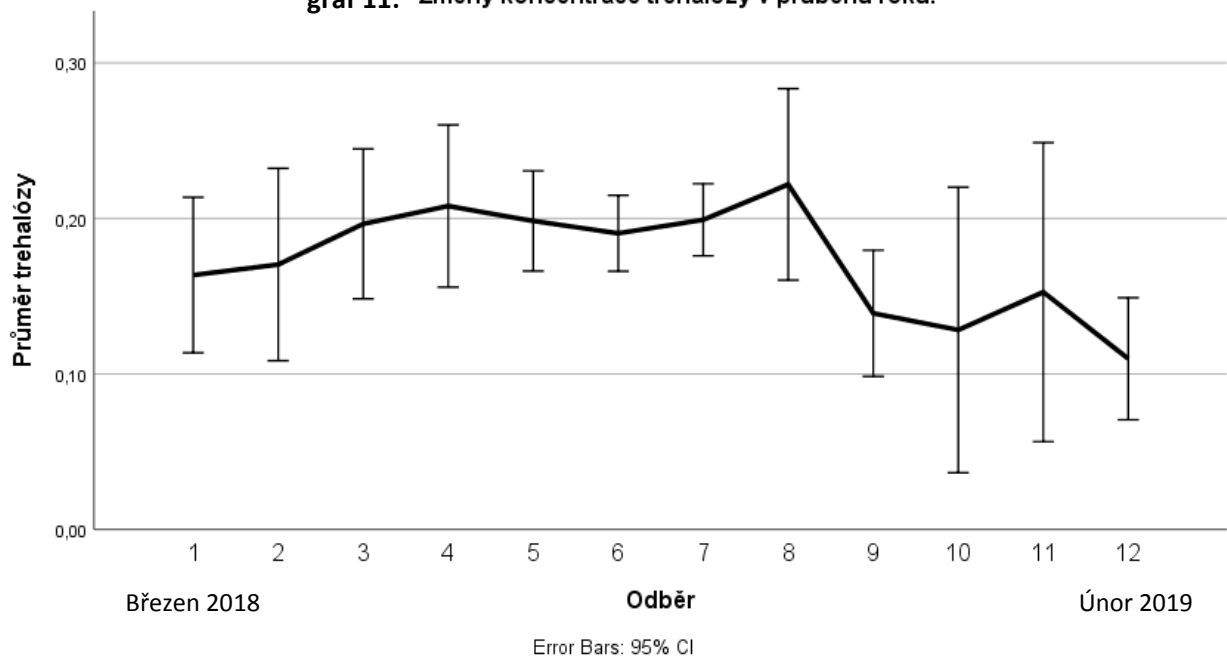
Všechny aminokyseliny s rozvětveným řetězcem vykazovaly nárůst koncentrace v klidových měsících roku a mohli by tak být markery dlouhověkých včel. Nicméně je nutné zohlednit květnový peak všech těchto látek na stanovišti ČZU. Zatím není známo, čím byl způsoben.

Na stanovišti ČZU se výrazný květnový peak vyskytl u několika látek (glukóza, fruktóza, alanin, valin, leucin a izoleucin). Nepodařilo se vysvětlit čím je tento peak způsoben. Lze předpokládat, že se může jednat o vliv některých neobvyklých zdrojů stravy, kterých se uvnitř a v okolí areálu ČZU včelám dostává nebo se může jednat o vliv odlišné zootechniky chovu včel na školní včelnicí.

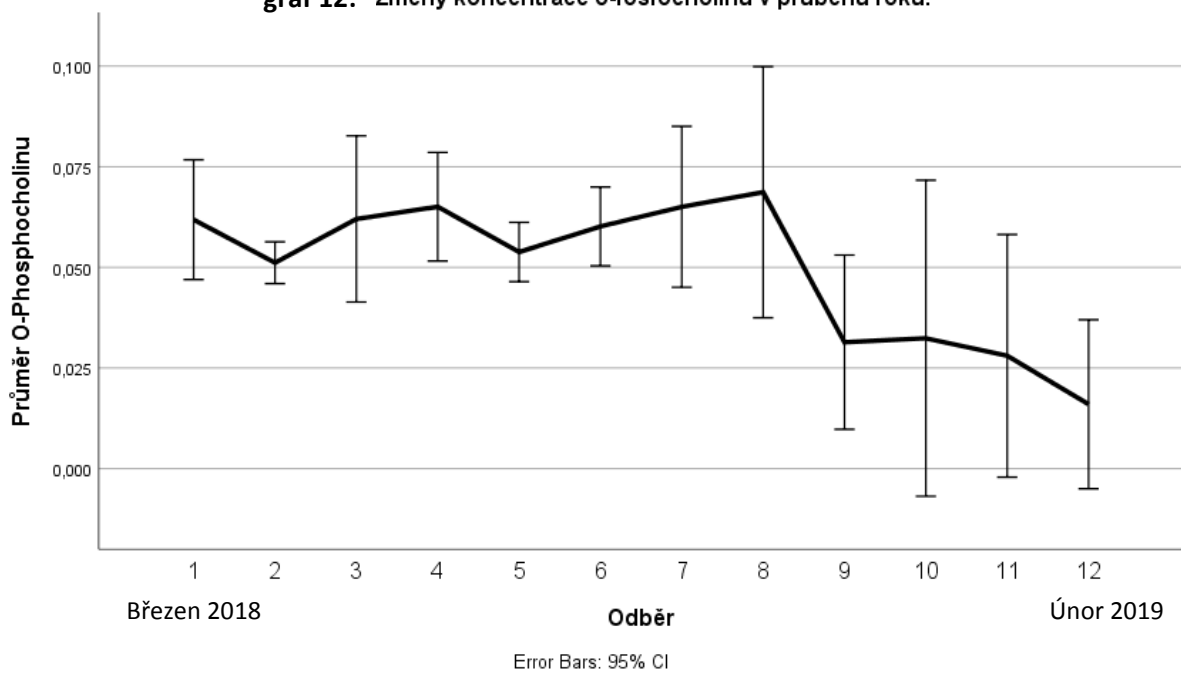




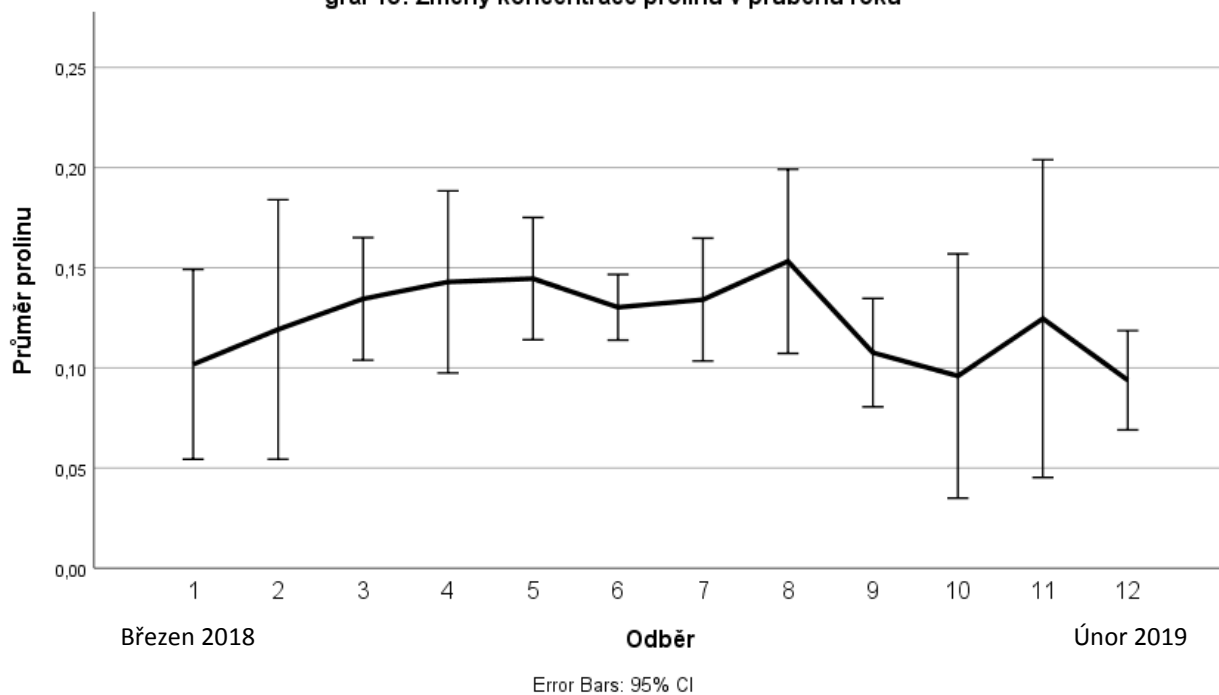
graf 11: Změny koncentrace trehalózy v průběhu roku.



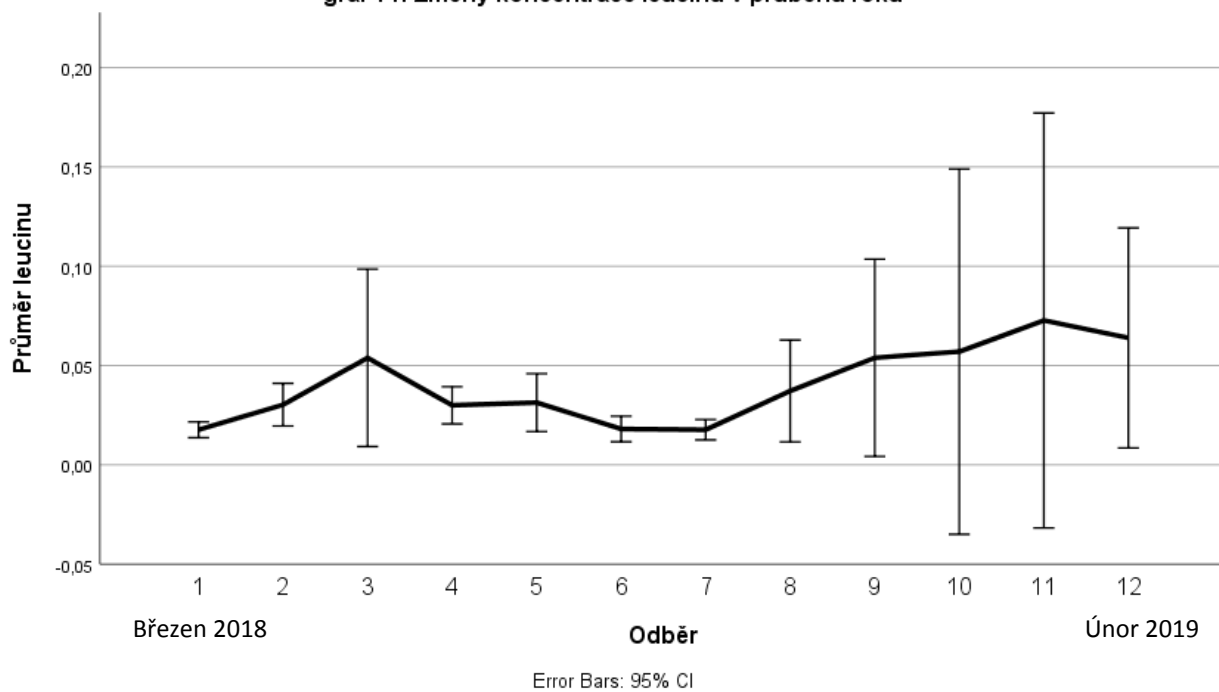
graf 12: Změny koncentrace o-fosfocholinu v průběhu roku.



graf 13: Změny koncentrace prolinu v průběhu roku

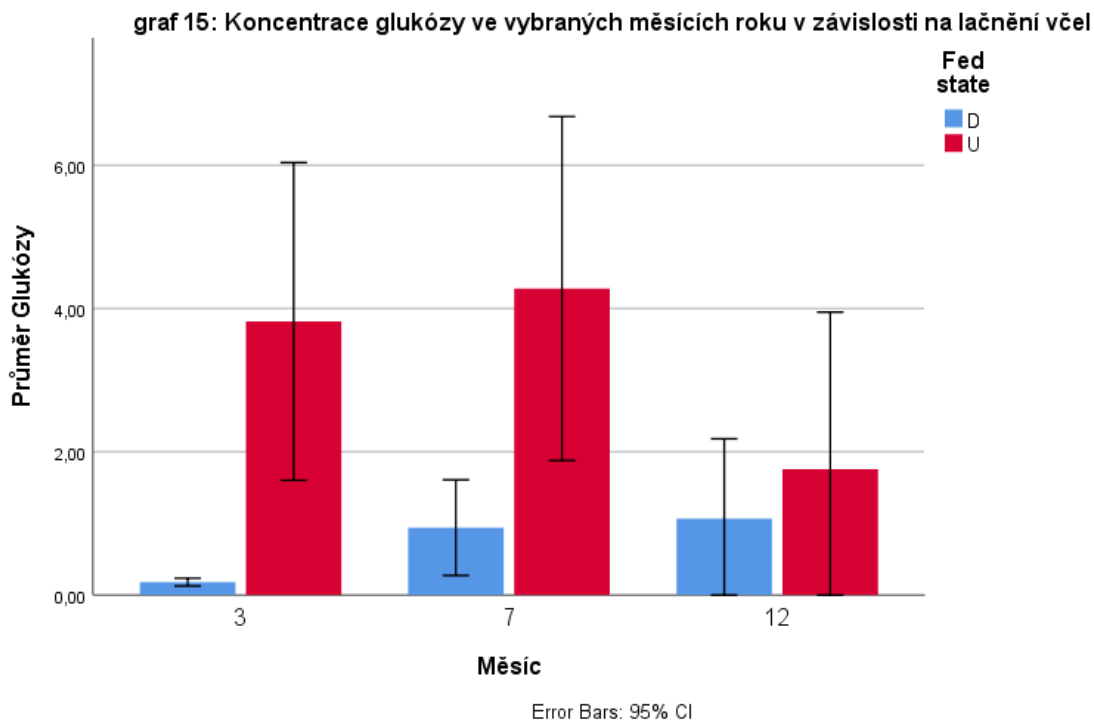


graf 14: Změny koncentrace leucinu v průběhu roku

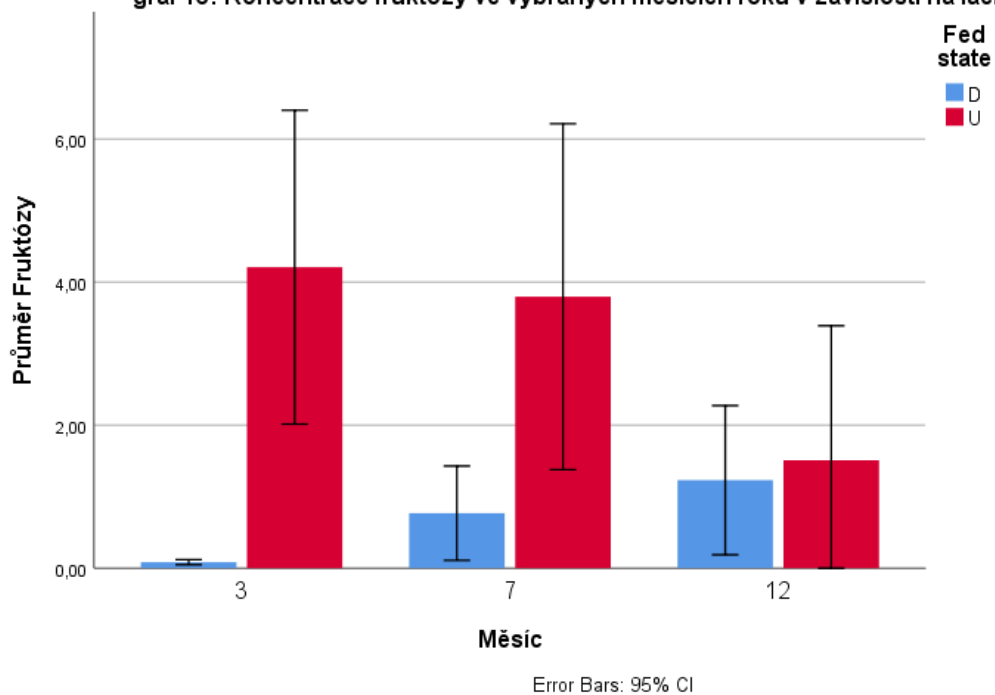


5.2 Koncentrace cukrů v závislosti na rychlosti zmrazení

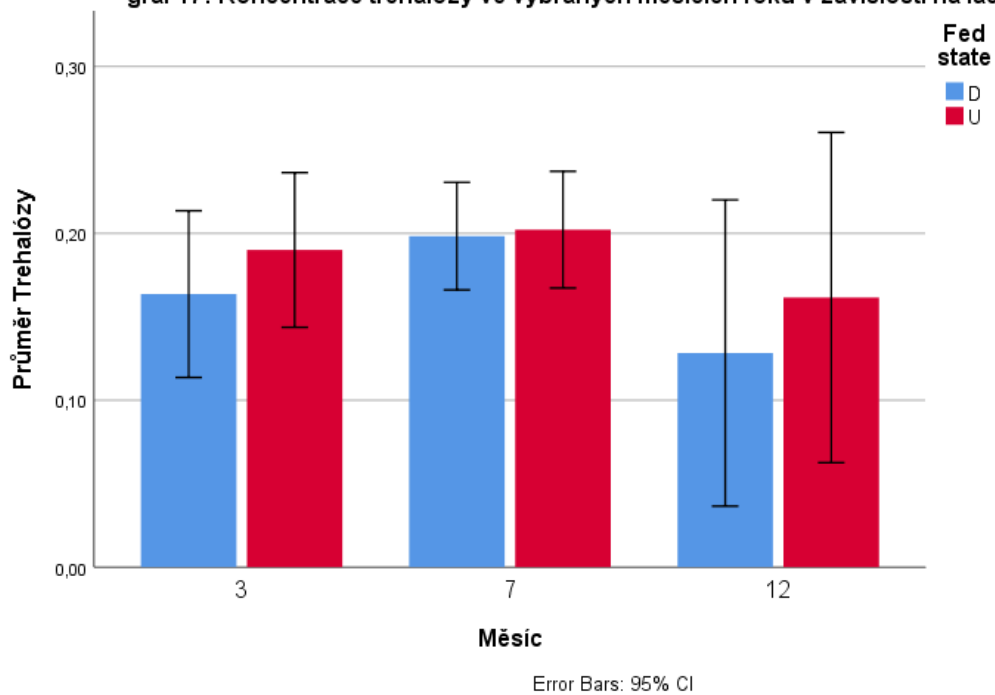
Pro experimentální účely byly včely drženy po dobu 24 hodin za přístupu k roztoku sacharózy v poměru 1:1. Následující grafy zobrazují vliv zadržení včel na koncentraci cukrů ve včelím těle. A to koncentrace glukózy (graf 15), fruktózy (graf 16), trehalózy (graf 17) ve vybraných 3 měsících roku (březnu, červenci a prosinci). Lze předpokládat, že včely sacharózu téměř neodebírají, protože se hodnoty glukózy a fruktózy ve včelím těle nezvyšovaly, naopak se výrazně snižovaly. Je vidět, že věznění včel má velký vliv na koncentraci glukózy a fruktózy ve včelím těle, přičemž největší pokles (téměř k 0) vykazovaly březnové včely. V běžných klíckových experimentech a krmení včel se všechny cukry v hemolymfě zvyšují. Nejvíce cukrů si udržely prosincové včely navzdory tomu, že měly nejnižší počáteční hladinu zkoumaných cukrů v těle. To může poukazovat na lepší hospodaření zimní generace včel se zásobami a být tak potenciálním markerem dlouhověkých včel. Koncentrace trehalózy nebyla zadržením včel výrazněji ovlivněna, což potvrzuje, že se jedná o hlavní výživový cukr v hemolymfě včel, který musí včely ve svém těle udržet na stálé úrovni. (Woodring *et al.*, 1993)



graf 16: Koncentrace fruktózy ve vybraných měsících roku v závislosti na lačnění včel



graf 17: Koncentrace trehalózy ve vybraných měsících roku v závislosti na lačnění včel



6 Závěr

V této práci bylo pomocí nukleární magnetické rezonance zanalyzováno 132 vzorků včel ze tří stanovišť odebíraných po dobu dvanácti měsíců. Hodnoty látek získané z naměřených spekter byly uspořádány do tabulky, kterou lze nalézt v příloze. Dále byly výsledky pro lepší přehlednost zpracovány do grafů.

Analyzováno bylo 10 látek (glukóza, fruktóza, trehalóza, cholin, o-fosfocholin, prolin, alanin, valin, leucin a izoleucin). Několik z nich vykazovalo patrné změny během roku a mohou tak být označeny za potenciální markery dlouhověkosti včel. Je však nutný podrobnější výzkum, který by potvrdil tyto výsledky. Látky, které se ukázaly být potenciálními markery dlouhověkosti, jsou:

- Trehalóza, která byla v aktivních měsících roku na hladině 0,2 mg/včelu a v klidových měsících roku klesla na 0,15 mg/včelu i až k 0,1 mg/včelu. Trehalóza je hlavním cukrem v hemolymfě včel a lze předpokládat, že se její koncentrace snižuje kvůli snížené metabolické aktivitě včel.
- Cholin, jež se vyskytoval v aktivních měsících roku v nižších koncentracích okolo 0,05 mg/včelu, načež se jeho koncentrace v klidových měsících roku zvýšila k 0,1 mg/včelu.
- O-fosfocholin vykazoval opačný trend než cholin, ale s ještě výraznějšími změnami mezi letní a zimní generací včel. Během aktivního období jeho hladiny dosahovaly až 0,08 mg/včelu načež v zimním období klesly na 0,02 mg/včelu.
- Valin, Leucine a Izoleucin jsou aminokyseliny s rozvětveným řetězcem, které vykazovaly stejné výsledky během roku. Od března do října se jejich koncentrace v tělech včel pohybovala okolo 0,02mg/včelu a během zimních měsíců roku stoupla někdy až k 0,11mg/včelu. Nicméně se u těchto látek nejvíce projevil květnový peak na stanovišti ČZU, který u valinu a izoleucinu převýšil hodnoty z klidového období roku.
- Lepší hospodaření s cukernými zásobami může být také potenciálním markerem dlouhověkých včel, neboť zimní generace včel zadržaná po dobu 24 hodin v klínce za přístupu k roztoku sacharózy si udržela více cukrů v hemolymfě než letní generace.

Získané poznatky by mohly pomoci k porozumění rozdílů mezi dlouhověkou a krátkou generací včel. Analyzováno bylo však pouze 10 látek v průběhu jednoho roku. Trendy těchto látek je nutné potvrdit v dlouhodobějším časovém horizontu.

Ukázalo se, že nukleární magnetická rezonance je účinnou metodou v analýze včel a spektra získaná díky této práci mohou pomoci při dalších analýzách stejně jako zbylé vzorky odebraných včel.

7 Literatura

2018 Almond Pollination Market Outlook: Demand, Supply, and Contracts / Bee Culture (no date). Available at: <https://www.bee-culture.com/2018-almond-pollination-market-outlook-demand-supply-contracts/> (Accessed: 12 March 2020).

20180826 BHS VHC A History of Beekeeping with Bill Mares - YouTube (2018). Available at: https://www.youtube.com/watch?v=BO_vUNJNKOk&t=1574s (Accessed: 12 March 2020).

Ashford, D. A., Smith, W. A. and Douglas, A. E. (2000) 'Living on a high sugar diet: The fate of sucrose ingested by a phloem-feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*', *Journal of Insect Physiology*, 46(3), pp. 335–341. doi: 10.1016/S0022-1910(99)00186-9.

Barchuk, A. R., Bitondi, M. M. G. and Simões, Z. L. P. (2002) 'Effects of juvenile hormone and ecdysone on the timing of vitellogenin appearance in hemolymph of queen and worker pupae of *Apis mellifera*', *Journal of Insect Science*. Oxford University Press (OUP), 2(1), pp. 1–8. doi: 10.1673/031.002.0101.

Becker, A. *et al.* (1996) 'The regulation of trehalose metabolism in insects', *Experientia*. Springer, pp. 433–439. doi: 10.1007/BF01919312.

Blatt, J. and Roces, F. (2001) 'Haemolymph sugar levels in foraging honeybees (*Apis mellifera carnica*): Dependence on metabolic rate and in vivo measurement of maximal rates of trehalose synthesis', *Journal of Experimental Biology*, 204(15), pp. 2709–2716.

Bridges, R. G. (1972) 'Choline Metabolism in Insects', *Advances in Insect Physiology*, 9(C), pp. 51–110. doi: 10.1016/S0065-2806(08)60275-1.

Brown, R. (2010) 'Beekeeping: a seasonal guide.', *Beekeeping: a seasonal guide*. B.T. Batsford Ltd.

Bursell, E. (1981) 'The Role of Proline in Energy Metabolism', in *Energy Metabolism in Insects*. Boston, MA: Springer US, pp. 135–154. doi: 10.1007/978-1-4615-9221-1_5.

Campbell, S. and Crane, E. (1984) 'The Archaeology of Beekeeping', *Garden History*. doi: 10.2307/1586797.

Chefurka, W., Horie, Y. and Robinson, J. R. (1970) 'Contribution of the pentose cycle to glucose metabolism by insects', *Comparative Biochemistry And Physiology*, 37(2), pp. 143–165. doi: 10.1016/0010-406X(70)90541-4.

Crailsheim, K. (1988) 'Intestinal transport of sugars in the honeybee (*Apis mellifera* L.)', *Journal of Insect Physiology*, 34(9), pp. 839–845. doi: 10.1016/0022-1910(88)90117-5.

Crane, E. (1992) *THE WORLDS BEEKEEPING-PAST AND PRESENT*. Taylor & Francis Ltd

Crane, E. (2000) 'The world history of beekeeping and honey hunting', *Choice Reviews Online*. doi: 10.5860/choice.37-5083.

Dalby, A. (2011) *Geoponika*. Prospect Books.

Deng, M. J. *et al.* (2015) 'A1 H-NMR based study on hemolymph metabolomics in *Eri*

silkworm after oral administration of 1-deoxynojirimycin', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0131696.

Egyptian Beekeeping (2011). Available at: https://pcela.rs/Egyptian_Beekeeping_1.htm (Accessed: 12 March 2020).

European Commission (2017) 'EU Honey Market', *Agriculture and Rural Development*, p. 27. Available at: https://ec.europa.eu/agriculture/sites/agriculture/files/honey/market-presentation-honey_en.pdf.

FAOSTAT (no date). Available at: <http://www.fao.org/faostat/en/?#data/QL> (Accessed: 12 March 2020).

Grünewald, B. and Siefert, P. (no date) 'insects Acetylcholine and Its Receptors in Honeybees: Involvement in Development and Impairments by Neonicotinoids'. doi: 10.3390/insects10120420.

Helms, E. R., Aragon, A. A. and Fitschen, P. J. (2014) 'Evidence-based recommendations for natural bodybuilding contest preparation: Nutrition and supplementation', *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. BioMed Central Ltd., pp. 1–20. doi: 10.1186/1550-2783-11-20.

Honey Bee Program - Bees, Beekeeping & Protecting Pollinators - Managing Bees for Pollination (no date). Available at: <https://bees.caes.uga.edu/bees-beekeeping-pollination/pollination/pollination-managing-bees-for-pollination.html> (Accessed: 12 March 2020).

Huang, Z. (2012) 'Pollen nutrition affects honey bee stress resistance', *Terrestrial Arthropod Reviews*. doi: 10.1163/187498312x639568.

Kent, C. (1997) 'CTP:Phosphocholine cytidyltransferase', *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism*, pp. 79–90. doi: 10.1016/S0005-2760(97)00112-4.

Kritsky, G. (2017) 'Beekeeping from Antiquity Through the Middle Ages', *Annual Review of Entomology*. doi: 10.1146/annurev-ento-031616-035115.

Luíza, A. and Squillace, A. (no date) *UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE BIOLOGIA*.

Lynch, C. J. and Adams, S. H. (2014) 'Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance', *Nature Reviews Endocrinology*. Nature Publishing Group, pp. 723–736. doi: 10.1038/nrendo.2014.171.

Mayack, C. and Naug, D. (2009) 'Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection', *Journal of Invertebrate Pathology*. doi: 10.1016/j.jip.2008.12.001.

Michener, C. D. and Grimaldit, D. A. (1988) *The oldest fossil bee: Apoid history, evolutionary stasis, and antiquity of social behavior (Meliponinae/singless bees/Aplidae/Cretaceous pollinators/amber)*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.

Micheu, S., Crailsheim, K. and Leonhard, B. (2000) 'Importance of proline and other amino

acids during honeybee flight (*Apis mellifera carnica* POLLMANN)', *Amino Acids*. Springer Wien, 18(2), pp. 157–175. doi: 10.1007/s007260050014.

Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy - Frank A. Bovey, Peter A. Mirau, H. S. Gutowsky - *Knihy Google* (1988). Available at: https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=htY0BX3aMNwC&oi=fnd&pg=PP1&dq=nuclear+magnetic+resonance&ots=mfigQKJ94-&sig=qnP--1hiw-jHVH8_k9ySgBKS6Io&redir_esc=y#v=onepage&q=nuclear+magnetic+resonance&f=false (Accessed: 13 March 2020).

Phalaraksh, C. *et al.* (2008) 'A metabonomic analysis of insect development: 1H-NMR spectroscopic characterization of changes in the composition of the haemolymph of larvae and pupae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*', *ScienceAsia*. doi: 10.2306/scienceasia1513-1874.2008.34.279.

Portál eAGRI - resortní portál Ministerstva zemědělství (no date). Available at: <http://eagri.cz/public/web/mze> (Accessed: 12 March 2020).

Potts, S. G. *et al.* (2010) 'Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe', *Journal of Apicultural Research*, 49(1), pp. 15–22. doi: 10.3896/IBRA.1.49.1.02.

Přidal, A. and Čermák, K. (2005) *Včelařství*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita.

Reseachers Say Bees' Nests May Be 200 Million Years Old - *Los Angeles Times* (no date). Available at: <https://www.latimes.com/archives/la-xpm-1995-06-18-mn-14551-story.html> (Accessed: 11 March 2020).

Schilling, F. *et al.* (2012) 'Non-invasive lipid measurement in living insects using NMR microscopy', *Journal of Experimental Biology*. doi: 10.1242/jeb.071209.

Shimanuki, H. and Knox, D. a (2000) 'Diagnosis of Honey Bee Diseases', *Agriculture*, (690), p. 61pp.

'Situční a výhledová zpráva včely 2019' (2019).

vanEngelsdorp, D. *et al.* (2009) 'Colony collapse disorder: A descriptive study', *PLoS ONE*. Edited by J. Brown, 4(8), p. e6481. doi: 10.1371/journal.pone.0006481.

Veselý, V. (2013) *Včelařství*. 3rd edn. Praha: Brázda.

Voda, J. (2009) 'Právní úprava včelařství (Legal regulations of beekeeping)'.

Woodring, J. *et al.* (1993) 'Studies on blood sugar homeostasis in the honeybee (*Apis mellifera*, L.)', *Journal of Insect Physiology*, 39(1), pp. 89–97. doi: 10.1016/0022-1910(93)90022-J.

Yang, W. *et al.* (2017) 'Longevity extension of worker honey bees (*Apis mellifera*) by royal jelly: Optimal dose and active ingredient', *PeerJ*. doi: 10.7717/peerj.3118.

Zheng, H.-Q., Wei, W.-T. and Hu, F.-L. (2011) 'Beekeeping Industry In China', *Bee World*. doi: 10.1080/0005772x.2011.11417406.

8 Samostatné přílohy

Tabulka koncentrací látek vztažená na .mg na včelu

	místo	odběr	měsíc	lačnění	období	Alanine	Choline	Fructose	Glucose	Isoleucine	Leucine	O-Phosphocholine	Proline	Trehalose	Valine
001_01_H_28_U	H	1	3	U	Spring	0,0431	0,0346	1,5183	1,1604	0,0029	0,0047	0,0364	0,0742	0,1106	0,0039
002_01_H_28_D	H	1	3	D	Spring	0,0526	0,0650	0,0505	0,1587	0,0080	0,0172	0,0456	0,0634	0,1090	0,0090
003_01_H_30_U	H	1	3	U	Spring	0,0352	0,0507	5,5292	3,0957	0,0060	0,0114	0,0795	0,1141	0,1936	0,0065
004_01_H_30_D	H	1	3	D	Spring	0,0618	0,0764	0,1434	0,2003	0,0126	0,0194	0,0462	0,1397	0,1859	0,0085
005_01_S_3_U	S	1	3	U	Spring	0,0330	0,0284	5,6683	5,7254	0,0047	0,0057	0,0645	0,1128	0,1773	0,0064
006_01_S_3_D	S	1	3	D	Spring	0,0109	0,0461	0,0653	0,0912	0,0108	0,0181	0,0747	0,0965	0,1712	0,0111
007_01_S_4_U	S	1	3	U	Spring	0,0163	0,0307	2,4767	2,8084	0,0056	0,0100	0,0727	0,1357	0,2084	0,0072
008_01_S_4_D	S	1	3	D	Spring	0,0176	0,0383	0,0592	0,1802	0,0079	0,0156	0,0582	0,0639	0,1221	0,0096
009_01_U_1_U	U	1	3	U	Spring	0,0200	0,0187	3,2376	3,1913	0,0083	0,0068	0,0663	0,1440	0,2103	0,0115
010_01_U_1_D	U	1	3	D	Spring	0,0193	0,0296	0,0888	0,2098	0,0098	0,0121	0,0786	0,0741	0,1527	0,0132
011_01_U_2	U	1	3	U	Spring	0,0317	0,0181	6,8148	6,9302	0,0046	0,0084	0,0961	0,1440	0,2401	0,0090
012_01_U_2_D	U	1	3	D	Spring	0,0400	0,0415	0,0949	0,2368	0,0136	0,0233	0,0678	0,1729	0,2407	0,0146
013_02_H_28_U	H	2	4	U	Spring	0,0270	0,0458	4,7726	4,8752	0,0079	0,0108	0,0702	0,1151	0,1853	0,0071
014_02_H_28_D	H	2	4	D	Spring	0,0485	0,0589	0,1356	0,6121	0,0203	0,0313	0,0436	0,1926	0,2362	0,0149
015_02_H_30_U	H	2	4	U	Spring	0,0445	0,0673	4,9133	3,8333	0,0184	0,0189	0,0554	0,1242	0,1796	0,0190
016_02_H_30_D	H	2	4	D	Spring	0,0512	0,0892	0,1476	0,3284	0,0228	0,0449	0,0495	0,1831	0,2326	0,0268
017_02_S_3_U	S	2	4	U	Spring	0,0270	0,0435	5,2375	5,8153	0,0105	0,0126	0,0749	0,1617	0,2366	0,0198
018_02_S_3_D	S	2	4	D	Spring	0,0148	0,0479	1,6434	1,5207	0,0077	0,0172	0,0559	0,1120	0,1678	0,0123
019_02_S_4_U	S	2	4	U	Spring	0,0427	0,0406	2,8067	3,1783	0,0087	0,0133	0,0546	0,1434	0,1980	0,0113
020_02_S_4_D	S	2	4	D	Spring	0,0187	0,0460	0,0954	0,1129	0,0140	0,0237	0,0498	0,0366	0,0864	0,0134
021_02_U_1_U	U	2	4	U	Spring	0,0380	0,0276	5,7853	6,1712	0,0065	0,0000	0,0796	0,1281	0,2078	0,0000
022_02_U_1_D	U	2	4	D	Spring	0,0206	0,0370	0,1679	0,1086	0,0103	0,0257	0,0574	0,0675	0,1249	0,0172
023_02_U_2_U	U	2	4	U	Spring	0,0339	0,0272	7,7513	8,0112	0,0065	0,0150	0,1083	0,1310	0,2393	0,0098
024_02_U_2_D	U	2	4	D	Spring	0,0433	0,0490	0,1560	0,3497	0,0196	0,0388	0,0509	0,1234	0,1743	0,0156
025_03_H_28_U	H	3	5	U	Spring	0,0732	0,0509	12,0610	11,2755	0,0121	0,0219	0,2355	0,1521	0,3877	0,0178

	místo	odběr	měsíc	lačnění	období	Alanine	Choline	Fructose	Glucose	Isoleucine	Leucine	O-Phosphocholine	Proline	Trehalose	Valine
026_03_H_28_D	H	3	5	D	Spring	0,0279	0,0460	0,6585	1,0083	0,0143	0,0233	0,0614	0,1119	0,1733	0,0167
027_03_H_30_U	H	3	5	U	Spring	0,0468	0,0464	5,2159	6,8280	0,0122	0,0204	0,0850	0,1781	0,2631	0,0126
028_03_H_30_D	H	3	5	D	Spring	0,0486	0,0619	1,2385	1,8861	0,0095	0,0181	0,0772	0,1494	0,2266	0,0099
029_03_S_3_U	S	3	5	U	Spring	0,0521	0,0335	1,2677	1,2664	0,0121	0,0219	0,0692	0,1406	0,2099	0,0121
030_03_S_3_D	S	3	5	D	Spring	0,0502	0,0495	0,7002	0,9962	0,0177	0,0409	0,0786	0,1496	0,2281	0,0157
031_03_S_4_U	S	3	5	U	Spring	0,0386	0,0238	7,5104	8,5635	0,0068	0,0097	0,1494	0,1260	0,2754	0,0087
032_03_S_4_D	S	3	5	D	Spring	0,0507	0,0461	0,2061	0,6852	0,0151	0,0250	0,0541	0,1604	0,2145	0,0187
033_03_U_1_U	U	3	5	U	Spring	0,1236	0,0864	5,2286	7,4920	0,0628	0,1242	0,0443	0,2274	0,2718	0,0707
034_03_U_1_D	U	3	5	D	Spring	0,0840	0,1006	2,5187	2,4621	0,0644	0,1056	0,0739	0,1498	0,2237	0,0606
035_03_U_2_U	U	3	5	U	Spring	0,1011	0,0841	2,4286	2,8610	0,0433	0,0722	0,0304	0,2371	0,2675	0,0455
036_03_U_2_D	U	3	5	D	Spring	0,0876	0,1103	2,2124	2,1212	0,0651	0,1102	0,0270	0,0857	0,1127	0,0662
037_04_H_28_U	H	4	6	U	Summer	0,0187	0,0239	5,1883	5,2187	0,0101	0,0105	0,1225	0,1469	0,2695	0,0104
038_04_H_28_D	H	4	6	D	Summer	0,0236	0,0369	0,6017	0,5811	0,0095	0,0215	0,0738	0,0896	0,1634	0,0107
039_04_H_30_U	H	4	6	U	Summer	0,0146	0,0209	0,3841	0,5105	0,0126	0,0174	0,0512	0,1230	0,1742	0,0113
040_04_H_30_D	H	4	6	D	Summer	0,0317	0,0375	0,5593	0,8115	0,0139	0,0202	0,0610	0,1115	0,1724	0,0110
041_04_S_3_U	S	4	6	U	Summer	0,0346	0,0230	10,2293	9,9478	0,0068	0,0124	0,1270	0,1276	0,2546	0,0074
042_04_S_3_D	S	4	6	D	Summer	0,0433	0,0414	0,9760	1,0881	0,0177	0,0288	0,0504	0,1262	0,1767	0,0144
043_04_S_4_U	S	4	6	U	Summer	0,0292	0,0278	7,6218	8,3513	0,0092	0,0192	0,1376	0,1721	0,3097	0,0142
044_04_S_4_D	S	4	6	D	Summer	0,0516	0,0484	0,4211	0,8197	0,0165	0,0290	0,0616	0,1817	0,2433	0,0194
045_04_U_1_U	U	4	6	U	Summer	0,0329	0,0238	5,2864	5,4898	0,0098	0,0152	0,0671	0,1240	0,1912	0,0109
046_04_U_1_D	U	4	6	D	Summer	0,0255	0,0500	0,5768	0,8131	0,0192	0,0372	0,0574	0,1442	0,2015	0,0182
047_04_U_2_U	U	4	6	U	Summer	0,0333	0,0265	4,0111	3,9441	0,0066	0,0083	0,0597	0,0860	0,1457	0,0086
048_04_U_2_D	U	4	6	D	Summer	0,0593	0,0618	0,4139	0,5850	0,0252	0,0432	0,0862	0,2043	0,2905	0,0246
049_05_H_28_U	H	5	7	U	Summer	0,0213	0,0441	1,1650	1,5083	0,0091	0,0151	0,0656	0,1332	0,1989	0,0093
050_05_H_28_D	H	5	7	D	Summer	0,0300	0,0415	1,6115	1,7955	0,0104	0,0168	0,0475	0,1022	0,1497	0,0082
051_05_H_30_U	H	5	7	U	Summer	0,0195	0,0231	7,2848	7,6003	0,0063	0,0088	0,0892	0,1313	0,2205	0,0076
052_05_H_30_D	H	5	7	D	Summer	0,0416	0,0642	1,5160	1,5223	0,0169	0,0296	0,0594	0,1655	0,2249	0,0172
053_05_S_3_U	S	5	7	U	Summer	0,0427	0,0334	5,4620	5,8371	0,0115	0,0200	0,1006	0,1338	0,2345	0,0069

	místo	odběr	měsíc	lačnění	období	Alanine	Choline	Fructose	Glucose	Isoleucine	Leucine	O-Phosphocholine	Proline	Trehalose	Valine
054_05_S_3_D	S	5	7	D	Summer	0,0242	0,0643	0,3148	0,5606	0,0210	0,0244	0,0609	0,1240	0,1849	0,0166
055_05_S_4_U	S	5	7	U	Summer	0,0340	0,0199	4,0182	4,9998	0,0087	0,0102	0,0807	0,0911	0,1718	0,0069
056_05_S_4_D	S	5	7	D	Summer	0,0215	0,0471	0,6036	1,1146	0,0173	0,0311	0,0431	0,1643	0,2075	0,0154
057_05_U_1_U	U	5	7	U	Summer	0,0422	0,0390	1,7709	2,3530	0,0152	0,0272	0,0607	0,1725	0,2332	0,0106
058_05_U_1_D	U	5	7	D	Summer	0,0444	0,0545	0,2895	0,4127	0,0273	0,0577	0,0570	0,1773	0,2343	0,0203
059_05_U_2_U	U	5	7	U	Summer	0,0275	0,0213	3,0687	3,3678	0,0079	0,0127	0,0640	0,0905	0,1545	0,0057
060_05_U_2_D	U	5	7	D	Summer	0,0310	0,0400	0,2753	0,2348	0,0136	0,0285	0,0550	0,1339	0,1889	0,0097
061_06_H_28_U	H	6	8	U	Summer	0,0510	0,0261	1,5312	1,6044	0,0126	0,0124	0,0736	0,1465	0,2201	0,0152
062_06_H_28_D	H	6	8	D	Summer	0,0451	0,0382	2,0991	1,9401	0,0095	0,0126	0,0545	0,1168	0,1713	0,0085
063_06_H_30_U	H	6	8	U	Summer	0,0625	0,0270	2,1649	2,5389	0,0113	0,0105	0,0659	0,1369	0,2028	0,0124
064_06_H_30_D	H	6	8	D	Summer	0,0334	0,0309	2,0036	1,8012	0,0095	0,0160	0,0533	0,1167	0,1701	0,0080
065_06_S_3_U	S	6	8	U	Summer	0,0276	0,0295	4,3173	4,3935	0,0121	0,0216	0,1279	0,1209	0,2487	0,0151
066_06_S_3_D	S	6	8	D	Summer	0,0207	0,0437	0,5277	0,9963	0,0139	0,0195	0,0786	0,1522	0,2308	0,0163
067_06_S_4_U	S	6	8	U	Summer	0,0291	0,0268	3,1879	3,9058	0,0071	0,0117	0,0694	0,1015	0,1709	0,0089
068_06_S_4_D	S	6	8	D	Summer	0,0154	0,0322	0,9118	0,8396	0,0117	0,0143	0,0578	0,1267	0,1845	0,0101
069_06_U_1_U	U	6	8	U	Summer	0,0477	0,0354	0,8535	1,1476	0,0121	0,0203	0,0811	0,1464	0,2275	0,0099
070_06_U_1_D	U	6	8	D	Summer	0,0447	0,0377	0,3471	0,5696	0,0080	0,0163	0,0600	0,1218	0,1818	0,0052
071_06_U_2_U	U	6	8	U	Summer	0,0436	0,0369	1,6309	2,0418	0,0118	0,0208	0,0701	0,1523	0,2224	0,0106
072_06_U_2_D	U	6	8	D	Summer	0,0438	0,0461	0,4728	0,6686	0,0154	0,0296	0,0568	0,1472	0,2040	0,0144
073_07_H_28_U	H	7	9	U	Fall	0,0151	0,0569	0,8976	0,8221	0,0072	0,0101	0,0357	0,0916	0,1273	0,0066
074_07_H_28_D	H	7	9	D	Fall	0,0272	0,0586	0,9014	0,5332	0,0071	0,0126	0,0467	0,1226	0,1693	0,0090
075_07_H_30_U	H	7	9	U	Fall	0,0230	0,0506	0,2923	0,4119	0,0110	0,0190	0,0466	0,1302	0,1768	0,0097
076_07_H_30_D	H	7	9	D	Fall	0,0493	0,0883	1,0493	0,6524	0,0121	0,0236	0,0442	0,1709	0,2151	0,0120
077_07_S_3_U	S	7	9	U	Fall	0,0438	0,0395	1,2589	1,2589	0,0103	0,0165	0,0768	0,1602	0,2370	0,0115
078_07_S_3_D	S	7	9	D	Fall	0,0174	0,0324	0,6927	0,5211	0,0093	0,0157	0,0635	0,1218	0,1852	0,0117
079_07_S_4_U	S	7	9	U	Fall	0,0228	0,0192	5,5376	6,0942	0,0089	0,0079	0,0806	0,1319	0,2126	0,0128
080_07_S_4_D	S	7	9	D	Fall	0,0267	0,0422	0,4843	0,4919	0,0135	0,0203	0,0658	0,1552	0,2210	0,0135
081_07_U_1_U	U	7	9	U	Fall	0,0411	0,0213	0,9125	0,9785	0,0055	0,0065	0,0854	0,1000	0,1854	0,0065

	místo	odběr	měsíc	lačnění	období	Alanine	Choline	Fructose	Glucose	Isoleucine	Leucine	O-Phosphocholine	Proline	Trehalose	Valine
082_07_U_1_D	U	7	9	D	Fall	0,0113	0,0202	0,3651	0,4779	0,0081	0,0120	0,0960	0,0887	0,1847	0,0105
083_07_U_2_U	U	7	9	U	Fall	0,0279	0,0272	0,9445	1,0170	0,0099	0,0160	0,0757	0,1449	0,2206	0,0111
084_07_U_2_D	U	7	9	D	Fall	0,0231	0,0359	0,6577	0,7402	0,0123	0,0217	0,0741	0,1453	0,2194	0,0140
085_08_H_28_U	H	8	10	U	Fall	0,0501	0,0330	3,2615	3,3194	0,0061	0,0094	0,0864	0,1174	0,2038	0,0133
086_08_H_28_D	H	8	10	D	Fall	0,0316	0,0244	2,2601	1,9866	0,0068	0,0129	0,0956	0,0971	0,1927	0,0114
087_08_H_30_U	H	8	10	U	Fall	0,0601	0,0282	4,5278	4,8277	0,0075	0,0144	0,0761	0,1169	0,1930	0,0100
088_08_H_30_D	H	8	10	D	Fall	0,0444	0,0493	0,2294	0,3478	0,0236	0,0416	0,0840	0,1987	0,2827	0,0247
089_08_S_3_U	S	8	10	U	Fall	0,0276	0,0336	9,1814	8,9835	0,0084	0,0123	0,1160	0,1505	0,2666	0,0127
090_08_S_3_D	S	8	10	D	Fall	0,0658	0,1018	0,6646	0,2459	0,0265	0,0812	0,0106	0,1153	0,1259	0,0229
091_08_S_4_U	S	8	10	U	Fall	0,1064	0,1047	1,3334	1,5674	0,0423	0,0863	0,0856	0,1978	0,2834	0,0390
092_08_S_4_D	S	8	10	D	Fall	0,0381	0,0710	0,1961	0,3761	0,0240	0,0421	0,0732	0,1813	0,2545	0,0249
093_08_U_1_U	U	8	10	U	Fall	0,0339	0,0361	3,5812	4,0180	0,0073	0,0153	0,0875	0,1371	0,2245	0,0082
094_08_U_1_D	U	8	10	D	Fall	0,0266	0,0426	0,3300	0,5624	0,0119	0,0217	0,0750	0,1321	0,2071	0,0132
095_08_U_2_U	U	8	10	U	Fall	0,0587	0,0564	4,2448	4,6636	0,0113	0,0216	0,0864	0,1325	0,2189	0,0132
096_08_U_2_D	U	8	10	D	Fall	0,0271	0,0533	2,5560	2,8014	0,0139	0,0238	0,0737	0,1946	0,2683	0,0149
097_09_H_28_U	H	9	11	U	Fall	0,0455	0,0490	3,9060	4,1109	0,0057	0,0194	0,0740	0,1766	0,2506	0,0095
098_09_H_28_D	H	9	11	D	Fall	0,0469	0,0504	2,2625	1,9075	0,0085	0,0178	0,0529	0,1073	0,1602	0,0098
099_09_H_30_U	H	9	11	U	Fall	0,0713	0,0662	0,9998	1,3260	0,0098	0,0183	0,0307	0,1089	0,1396	0,0110
100_09_H_30_D	H	9	11	D	Fall	0,0586	0,0689	1,6739	1,5682	0,0080	0,0199	0,0517	0,1550	0,2066	0,0118
101_09_S_3_U	S	9	11	U	Fall	0,0876	0,0945	3,6105	1,7607	0,0167	0,0576	0,0254	0,1275	0,1529	0,0335
102_09_S_3_D	S	9	11	D	Fall	0,0778	0,1024	1,3537	0,8938	0,0474	0,1293	0,0059	0,1127	0,1186	0,0396
103_09_S_4_U	S	9	11	U	Fall	0,0669	0,0766	4,5575	4,1783	0,0218	0,0450	0,0295	0,1413	0,1708	0,0205
104_09_S_4_D	S	9	11	D	Fall	0,0717	0,0924	0,8955	0,6191	0,0372	0,0973	0,0087	0,0971	0,1058	0,0303
105_09_U_1_U	U	9	11	U	Fall	0,1017	0,0893	5,2204	5,3078	0,0137	0,0319	0,0455	0,0569	0,1024	0,0155
106_09_U_1_D	U	9	11	D	Fall	0,0598	0,0890	0,9207	1,3465	0,0142	0,0291	0,0289	0,0804	0,1093	0,0183
107_09_U_2_U	U	9	11	U	Fall	0,0772	0,1118	1,1851	1,4072	0,0400	0,0939	0,0103	0,0955	0,1057	0,0358
108_09_U_2_D	U	9	11	D	Fall	0,0403	0,0834	0,5305	1,1571	0,0141	0,0301	0,0404	0,0930	0,1334	0,0132
109_10_S_3_U	S	10	12	U	Winter	0,0682	0,0947	3,2753	3,8194	0,0370	0,0791	0,0283	0,1797	0,2079	0,0323

	místo	odběr	měsíc	lačnění	období	Alanine	Choline	Fructose	Glucose	Isoleucine	Leucine	O-Phosphocholine	Proline	Trehalose	Valine
110_10_S_3_D	S	10	12	D	Winter	0,0233	0,0510	0,5145	0,6042	0,0103	0,0123	0,0639	0,1454	0,2093	0,0127
111_10_S_4_U	S	10	12	U	Winter	0,0501	0,0498	0,7919	1,1401	0,0105	0,0168	0,0691	0,1531	0,2222	0,0123
112_10_S_4_D	S	10	12	D	Winter	0,0488	0,0758	0,9363	0,6881	0,0236	0,0500	0,0166	0,1071	0,1237	0,0209
113_10_U_1_U	U	10	12	U	Winter	0,0517	0,0975	1,0091	1,1051	0,0158	0,0341	0,0328	0,0785	0,1112	0,0176
114_10_U_1_D	U	10	12	D	Winter	0,0989	0,1185	1,4330	0,8678	0,0625	0,1405	0,0093	0,0651	0,0744	0,0540
115_10_U_2_U	U	10	12	U	Winter	0,0273	0,0594	0,9547	0,9638	0,0034	0,0074	0,0574	0,0473	0,1047	0,0040
116_10_U_2_D	U	10	12	D	Winter	0,0669	0,1095	2,0364	2,1032	0,0141	0,0252	0,0398	0,0661	0,1059	0,0132
117_11_S_3_U	S	11	1	U	Winter	0,0714	0,0747	2,8053	2,7040	0,0199	0,0401	0,0350	0,1757	0,2107	0,0199
118_11_S_3_D	S	11	1	D	Winter	0,0547	0,0898	0,2801	0,1795	0,0212	0,0409	0,0119	0,1267	0,1386	0,0207
119_11_S_4_U	S	11	1	U	Winter	0,0609	0,0699	1,1124	1,2715	0,0153	0,0268	0,0700	0,1765	0,2465	0,0175
120_11_S_4_D	S	11	1	D	Winter	0,1048	0,1427	0,9251	0,6833	0,0832	0,1706	0,0316	0,1803	0,2119	0,0710
121_11_U_1_U	U	11	1	U	Winter	0,0904	0,0914	1,4789	1,3850	0,0362	0,0649	0,0128	0,0373	0,0501	0,0291
122_11_U_1_D	U	11	1	D	Winter	0,0725	0,0748	1,1287	1,6155	0,0169	0,0311	0,0533	0,1324	0,1857	0,0148
123_11_U_2_U	U	11	1	U	Winter	0,0262	0,0530	1,0952	1,4551	0,0052	0,0094	0,0625	0,1101	0,1726	0,0049
124_11_U_2_D	U	11	1	D	Winter	0,0542	0,1252	0,5736	0,4529	0,0203	0,0482	0,0153	0,0591	0,0744	0,0171
125_12_S_3_U	S	12	2	U	Winter	0,0538	0,0812	3,7296	3,4315	0,0244	0,0629	0,0166	0,2037	0,2203	0,0255
126_12_S_3_D	S	12	2	D	Winter	0,0253	0,0753	0,6463	0,8061	0,0132	0,0223	0,0343	0,1116	0,1459	0,0154
127_12_S_4_U	S	12	2	U	Winter	0,0861	0,1026	0,3092	0,1485	0,0463	0,0905	0,0075	0,0817	0,0892	0,0438
128_12_S_4_D	S	12	2	D	Winter	0,0709	0,1038	0,8522	0,6006	0,0506	0,0993	0,0080	0,0958	0,1038	0,0467
129_12_U_1_U	U	12	2	U	Winter	0,0735	0,0907	0,7964	1,3986	0,0723	0,1410	0,0071	0,0951	0,1022	0,0639
130_12_U_1_D	U	12	2	D	Winter	0,0538	0,0731	1,4772	1,7693	0,0274	0,0492	0,0168	0,0736	0,0904	0,0244
131_12_U_2_U	U	12	2	U	Winter	0,0391	0,0584	1,8509	2,4504	0,0068	0,0131	0,0878	0,1403	0,2281	0,0071
132_12_U_2_D	U	12	2	D	Winter	0,0787	0,1287	0,7869	1,5499	0,0622	0,0848	0,0049	0,0943	0,0993	0,0528