

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Sezónní změny mikrobioty trávicího traktu včely
medonosné**

Diplomová práce

**Autor práce: Bc. Dominika Schmidtová
Obor studia: Kvalita a zpracování zemědělských produktů**

Vedoucí práce: Ing. Zuzana Hroncová, Ph.D.

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Sezónní změny mikrobioty trávicího traktu včely medonosné" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Zuzaně Hroncové, Ph.D., která byla školitelem mé práce, za její cenné rady, odborné vedení a čas, který mi věnovala. Díky patří také mému příteli a rodině, která mi byla po celou dobu velkou oporou.

Sezónní změny mikrobioty trávicího traktu včely medonosné

Souhrn

Včela medonosná (*Apis mellifera*) je jedním z nejdůležitějších opylovačů světa, kteří vytvářejí nepostradatelnou složku jak v zemědělské produkci, tak i v globálním ekosystému. V posledních letech byl však zaznamenán veliký pokles tohoto hmyzího druhu. Vina je přisuzována několika stresovým faktorům, mezi které patří například působení chemických látek, ztráta původních stanovišť nebo potravy a kontakt s různými parazity či patogeny. Při snaze pomoci včelímu organismu byla několikrát zkoumána včelí imunita. Při zkoumání byly odhaleny souvislosti i se střevními mikroorganismy. Zastoupení jednotlivých bakterií se však na základě ročního období mění. Stejně tak je podle měsíčního cyklu ovlivněna délka života. Rozlišujeme včely letní (krátkověké) a včely zimní (dlouhověké). Hlavním cílem této diplomové práce bylo porovnat včely, které žijí krátkodobě i dlouhodobě a pocházejí ze stejného stanoviště. Porovnávání se zakládalo na identifikaci bakteriálního spektra a kvantifikaci vybraných skupin bakterií.

V rámci naší studie byly odebrány vzorky včel v měsíčních časových intervalech v rámci jednoho roku ze čtyř lokalit České republiky (Dol, Postřižín, Hoštice, Ústrašice). Z odebraných včel byly získány celé trávicí trakty, na jejichž zpracování byly použity dvě molekulárně genetické metody. Vybrané bakteriální skupiny (*Firmicutes*, *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria*) byly kvantifikovány pomocí qRT-PCR s použitím specifických primerů. Pro identifikace vybraných druhů bakterií byla použita elektroforéza v gradientovém denaturačním gelu (DGGE). Následně byla data statisticky vyhodnocena pomocí IBM SPSS Statistics 24.

Zjištěná kvantifikace vybraných bakteriálních skupin byla během celého roku ze všech odběrových míst velice variabilní. Nejméně hojnou skupinu tvořil bakteriální kmen *Actinobacteria*, naopak největší množství bylo v zastoupení kmene *Gammaproteobacteria*. Ve vzorcích byli identifikováni tři zástupci proteobakterií (*Frischella perrara*, *Snodgrassella alvi*, *Bartonella apis*), tři druhy laktobacilů (*L. apis*, *L. melliventris*, *L. mellis*) a jeden představitel aktinobakterií (*Bifidobacterium asteroides*).

Klíčová slova: letní včely, zimní včely, mikrobiota, DGGE, qPCR

Seasonal trends in microbiota of the digestive tract of honey bees

Summary

The western honey bee (*Apis mellifera*) is one of the most important pollinators in the world, creating an indispensable component in both the agricultural production and the global ecosystem. However, a large decline in the insect species population has been reported in recent years. The blame is attributed to several stress factors, including chemical exposure, loss of native habitats or food sources as well as contacts with various parasites or pathogens.

In an effort to help bee organisms, the function of the bees' immunity system has been examined in several studies. Depending on the protection of the bees, we also observe the connection with intestinal microorganisms. However, the proportion of individual bacteria varies based on the season. Similarly, their length of life is affected by the monthly cycle. We distinguish summer (short-living) and winter (long-living) bees. The main aim of this thesis is to compare short-living and long-living bees from the same habitat based on the identification of the bacterial spectrum and the quantification of selected groups of bacteria.

In our study, bees were collected in four localities within the area of the Czech Republic (Dol, Postržín, Hoštice, Ústrašice) on a monthly basis. The whole digestive tract was obtained from the dissection of the collected bees, and two molecular genetic methods were used to evaluate them. Selected bacterial groups (*Firmicutes*, *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria*) were quantified by qRT-PCR using specific primers. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was used to identify selected bacterial strains. Subsequently, the data were statistically evaluated using IBM SPSS Statistics 24.

The quantification of selected bacterial groups was very variable from the evaluated locations throughout the year. The least abundant group was the *Actinobacteria* strain, and the largest amount was represented by the *Gammaproteobacteria* strain. Three representatives of *Proteobacteria* (*Frischella perrara*, *Snodgrassella alvi*, *Bartonella apis*), along with three types of *Lactobacillus* (*L. apis*, *L. melliventris*, *L. mellis*) and a single representative of *Actinobacteria* (*Bifidobacterium asteroides*) were identified in the samples.

Keywords: summer bees, winter bees, microbiota, DGGE, qPCR

Obsah

1	Úvod	8
2	Vědecká hypotéza a cíl práce	9
2.1	Hypotéza	9
2.2	Cíl práce	9
3	Literární rešerše	10
3.1	Včela medonosná	10
3.1.1	Zimní vs. letní včely	11
3.2	Anatomie a morfologie včely medonosné	13
3.2.1	Trávicí trakt	15
3.3	Imunita včel	16
3.3.1	Vnitřní imunitní systém	17
3.3.1.1	Buněčná imunita	17
3.3.1.2	Humorální imunita	18
3.3.2	Sociální imunita	20
3.3.2.1	Grooming	21
3.3.2.2	Hygienické chování	23
3.3.2.3	Termoregulace	23
3.3.2.4	Využití antimikrobiálních látek z prostředí	24
3.3.3	Externí fyzikální bariéry	25
3.3.3.1	Peritrofická membrána	25
3.3.3.2	Kutikula	26
3.4	Mikrobiota trávicího traktu včel	27
3.4.1	Mikrobiota jako prevence proti včelím nemocem	31
3.4.2	Faktory ovlivňující mikrobiotu včel	33
3.4.2.1	Vliv prostředí a stanoviště	34
3.4.2.2	Vliv stravy	35
3.4.2.3	Vliv chemických látek	37
4	Materiál a metody	40
4.1	Příprava vzorků	40
4.2	Izolace DNA	41
4.3	Elektroforéza v gradientovém denaturačním gelu (DGGE)	41
4.4	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qRT-PCR)	43
4.5	Statistická analýza	43
5	Výsledky	44

6	Diskuze	51
7	Závěr	55
8	Seznam literatury	56
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	72
10	Seznam obrázků a tabulek	73
	10.1 Seznam obrázků	73
	10.2 Seznam tabulek	74

1 Úvod

Rod včela (*Apis*) sahá svým původem do několika zemí světa. Včely pocházejí například z Evropy, západní Asie, Severní Ameriky a Afriky. Přesný geografický původ pro včelu medonosnou (*Apis mellifera*) však nebyl dosud přesně určen, ale s velkou pravděpodobností je prvotním místem právě Afrika. Odtud se včela medonosná šířila dále na evropský a asijský kontinent (Daníhlík et al. 2017; Mullen & Durden 2019). Před více než 4 000 lety byla včela medonosná poprvé domestikována a začala se využívat pro výrobu medu a vosku. Dnes jsou včely klíčovým prvkem v celosvětové produkci potravin. Tento druh je významným opylovačem mnoha rozmanitých rostlin a plodin, včetně ovoce a zeleniny. Proto včely tvoří nepostradatelnou složku jak v zemědělské produkci, tak i v globálním ekosystému.

V posledních letech zaznamenala populace včely medonosné prudký pokles následkem několika četných faktorů. Zvýšená úmrtnost či syndrom zhroucení včelstev je přisuzován parazitickým roztočům, patogenům, pesticidům, ale také změně původního prostředí, čímž je například včelám odebrán prvotní přísun potravy. Těmito faktory je snižována imunitní funkce každého včelího jedince, což ve výsledku přináší fatální následky (Kwong & Moran 2016). Za prevenci v boji proti včelím nemocem můžeme považovat střevní mikrobiotu, skládající se z devíti základních bakteriálních druhů. Ty částečně chrání včelí tělo před vnějšími faktory. Můžeme o nich tedy říct, že jdou ruku v ruce s obranným systémem včel. Pokud selhává jedna polovina, nahrazuje ji ta druhá a naopak.

2 Vědecká hypotéza a cíl práce

2.1 Hypotéza

Hypotézou je, že se mikrobiota včel mění v závislosti na ročním období.

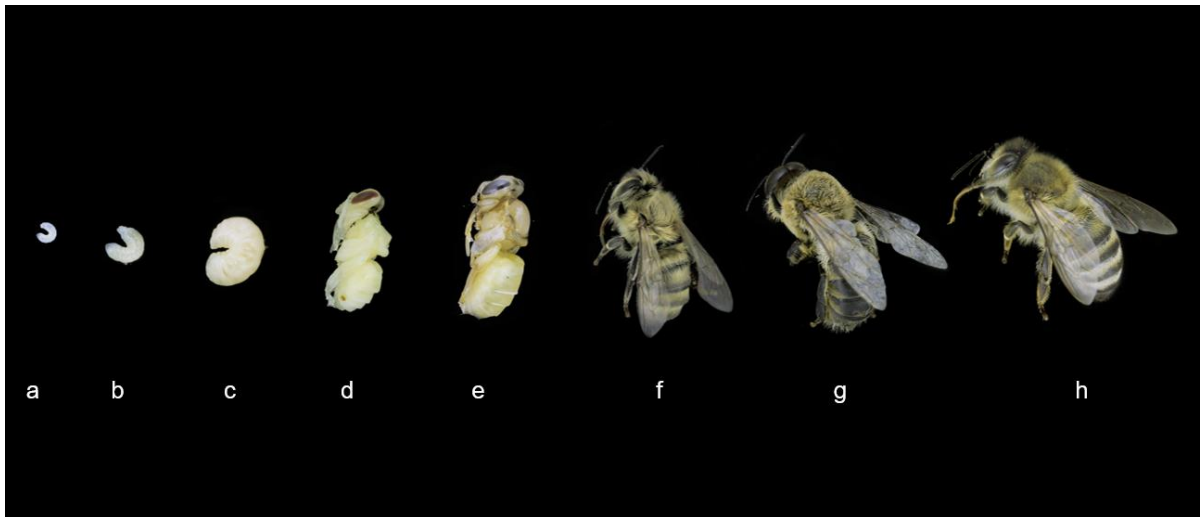
2.2 Cíl práce

Cílem této diplomové práce je porovnat krátkodobě a dlouhodobě žijící včely pocházející ze stejného stanoviště na základě identifikace bakteriálního spektra a kvantifikace vybraných skupin bakterií.

3 Literární rešerše

3.1 Včela medonosná

Včela medonosná se řadí mezi nejvýznamnější zástupce opylovačů nejen v Evropě, ale i ve světě (Garibaldi et al. 2013). V roce 1758 pojmenoval Carl Linné, zakladatel botanické a zoologické systematické nomenklatury, včelu medonosnou latinským názvem *Apis mellifera*. Včely ztělesňují hmyz s proměnou dokonalou (Obr. 1). Jedná se o kolonii, která je rozdělena podle jednotlivých kast na matku, několik dělnic a trubců. Matka je ve včelstvu vždy pouze jedna. Je vybavena reprodukčními orgány, které jsou během jejího života plně využity k reprodukci nových jedinců (Wojciechowski et al. 2018). Během jejího života se pouze jedenkrát účastní tzv. snubního letu, při kterém je oplodněna několika včelími samci najednou. Oplozená vajíčka jsou pak následně v průběhu životního cyklu matky v hnízdě kladena. Z oplozených vajíček vznikají pouze dělnice, nebo v případě nepřítomnosti nebo ztráty matky může vzniknout matka nová. Na rozdíl od matek není u dělnic reprodukční orgán vyvinut, a je proto vyloučeno, aby dělnice kladly vajíčka. O veškeré reprodukci v kolonii rozhoduje jen matka (Mattila et al. 2001; Danihlák et al. 2017).



Obrázek 1: Vývoj včely medonosné (hmyz s proměnou dokonalou): a) jednodenní larva, b) třídenní larva, c) šestidenní larva, d) bílá kukla, e) černá kukla, f) mladuška, g) trubec, h) včela létavka (Hroncova et al. 2015).

Nakladená vajíčka mohou být i neoplozená. V takovém případě se z nich vylíhnou pouze samci, označovaní jako trubci. O tom, zda se z oplozeného vajíčka vylíhne dělnice či matka, rozhoduje přísun larvální výživy. Pokud byly larvy po celou dobu krmeny mateří

kašičkou, z nově vzniklého jedince se stává matka. Dělnicím je poskytnuta mateří kašička jen v prvních dnech larválního života a později jsou krmeny pouze medem a nektarem (Mattila et al. 2001).

Včela medonosná funguje jako společenský superorganismus, v němž dělnice, královna a trubci vykonávají různé úkoly v rámci kolonie, na nichž je včelstvo závislé. Genetické komponenty silně ovlivňují chování včel, včetně obranného chování, hledání a shromažďování potravy nebo rojení (Bahreini & Currie 2015). Způsob chování je rozdílný i v závislosti na věku včely. Mladé dělnice, označované jako mladušky, tvořící přibližně 2/3 počtu dělnic, vykonávají svou práci jen uvnitř hnízda. I zde je zpravidla práce rozdělena mezi včely podle stáří. Nejmladší včely zastávají nejprve funkci čističek buněk, později se z nich stanou krmičky, kdy krmí odvíčkováný plod (Anderson et al. 2016). Po tomto období se přesouvají blíže k česlu, což je výstupní otvor hnízda. Zde se uplatňují nejprve jako stavitelky a později přejímají a zpracovávají potravu. Další funkcí v pořadí je víčkování plodu a poté vynášení odpadků, například uhynulých včel či různých zbytků. Poslední vykonávanou prací mladušek je stráž u vstupu do hnízda. Takové včely jsou nazývány strážkyněmi. Zhruba po 20 dnech se z mladušek stávají létavky, včely, které vyhledávají a sbírají potravu. Létavky se dále dělí na pátračky, včely, které potravu vyhledávají a předávají o nalezených místech informace sběratelkám. Ty mají za úkol sběr pylu, nektaru, vody a propolisu a přenos těchto zdrojů do hnízda (Döke et al. 2015; Danihlák et al. 2017). To, jakou činnost budou ve výsledku včely skutečně vykonávat, mohou ovlivnit sezónní proměnné faktory, jako například množství nektaru a pylu v okolí, počasí nebo energetický stav kolonie (Kuszevska et al. 2017).

Rozdíl mezi jednotlivými kastami není jen ve vykonávané funkci, ale také například v délce života. Dělnice mají životaschopnost ovlivněnou geografickou polohou a sezónou. Letní včely neboli krátkověké se dožívají pouhých 20–35 dní, zatímco zimní včely vynikají svojí dlouhověkostí, neboť jsou schopné dožít se až do 7 měsíců (Döke et al. 2015). Delšího života, než mají zimní včely, dosahuje pouze matka, která se může dožít až 8 let (100krát více než dělnice) (Mattila et al. 2001).

3.1.1 Zimní vs. letní včely

Včely medonosné žijí v různých klimatických oblastech rozšířených po celém světě. Čelí tak různým výzvám, neboť různorodost geografických poloh způsobuje teplotní výkyvy během celého roku. V mírných oblastech, kde se pravidelně střídá roční období, je zima pro včely tou největší výzvou. Včela medonosná je jedním z mála druhů hmyzu, který je schopen přežít zimní období, aniž by jeho organismus přešel do zimního spánku. Tělo včel se během

tohoto období přizpůsobuje natolik, že se přeměňuje fyziologický i behaviorální stav (Döke et al. 2015).

V mírném podnebí začínají včely reprodukovat nové potomky již na konci zimního období, pokud se teplota vzduchu pohybuje stabilně kolem 4 °C. Reprodukční období vrcholí v jarních měsících až do začátku léta. V létě se chov zpomalí a na podzim je zcela přerušeno. Dělnice, které jsou chovány v průběhu od pozdní zimy do konce léta, jsou obvykle krátkověké a podílejí se převážně na výchově a krmení nově přichozích plodů. Jarní včely mají průměrnou délku života 30–40 dní, zatímco letní včely, které intenzivně pracují v období, kdy je zapotřebí opylovat nejvíce květů, vykazují sníženou průměrnou životnost na 23–30 dní (Mattila et al. 2001; Genersch et al. 2010). Dělnicím, které se objevují až po letních měsících, hrozí, že mohou zemřít ještě před zimou, ale mnoho z nich nejméně jeden měsíc přežije. Takové včely jsou označovány jako zimní a mají prokazatelně vyšší životaschopnost ve srovnání s jejich letními protějšky (Nouvian et al. 2018). Průměrná délka života zimních včel je vyšší než 100 dní. V průběhu zimování dochází ke změnám v chování a fyziologii jednotlivých včel. Snižuje se individuální aktivita, aby docházelo k úsporám energie, která je zásadní pro tvorbu tzv. zimního chomáče, díky kterému udržují dělnice teplotu hnízda (viz níže). Pro přežití včelí kolonie je také nesmírně důležité, aby se v zimě zvýšila zásoba živin. Sesbíraný pyl slouží během zimování jako zdroj bílkovin a tuků a nektar je využíván jako zdroj sacharidů (Nicolson 2011). Zimní včely během mrazivých měsíců téměř neopouštějí úl. Veškerá přijatá strava je proto zadržována v zadní části trávicího traktu, kdy se konečník zvětšuje do maximálních rozměrů. Veškerý odpadní materiál je z těla odveden až na jaře, kdy teplota okolí klesne na přijatelnou hodnotu. Proto u zimních včel pozorujeme i snížený příjem potravy (Gaggia et al. 2018).

Dlouhověkost ovlivňuje i několik dalších faktorů. Například studie Amdam et al (2009) uvádí, že dělnice, které déle zastávají funkci opečovávatelky, mají delší život než včely, které tuto funkci přenechávají ostatním včelám dříve (Amdam et al. 2009). Přejod z mladušek na létavky zpomaluje uvolňovaný feromon létavek, tzv. ethyloléát, který udržuje včely delší čas v úlu (Leoncini et al. 2004). Během zimy dochází k poklesu dostupných zdrojů potravy, což v kombinaci s kratšími a chladnějšími dny vede ke snížení intenzity krmení v koloniích. To zapříčiňuje, že i létavky zůstávají v hnízdě a svou produkcí hormonu částečně zpomalují vývoj mladušek (Döke et al. 2015). Pro zimní včely je také typické, že se zastavuje reprodukční proces, což je dáno nižší hladinou juvenilního hormonu (JH). Studie Mattila et al. (2001) uvádí, že míra biosyntézy JH klesá od počátku října do poloviny listopadu, nejnižší úroveň dosahuje v polovině ledna a poté prudce roste, zejména v únoru a březnu (Mattila et al. 2001).

3.2 Anatomie a morfologie včely medonosné

Včela medonosná patří do kmene členovců (*Arthropoda*). Její tělo je článkované a rozdělené na tři základní části, které jsou mezi sebou propojeny stopkami, kterými je umožňována větší pohyblivost. První částí je hlava (*caput*), která vznikla srůstem šesti článků. Hlava je hypognátní (zploštělá ve směru podélné osy těla) a má trojúhelníkovitý tvar (Vesely 2003). Při pohledu na hlavu zepředu nalézáme nejprve pevný čelní štítek, na který se napojuje horní pysk kryjící mohutná kusadla (*mandibulae*), která včela využívá především při vybíhání z buňky nebo při zpracování pylu a vosku, sběru propolisu a také na svoji obranu. Na čelní štítek navazuje čelo s tykadly, díky kterým včela vnímá nejenom smyslové vjemy, ale také teplotu, vlhkost a koncentraci CO₂. Díky Johnstonovu orgánu nacházejícím se v ohybu tykadla může včela cítit i tlak a vibrace z vnějšího prostředí. Tento orgán rovněž zastupuje sluch a slouží i jako orgán pro koordinaci letu. Oproti dělnicím mají trubci mnohonásobně vyšší počet tykadlových receptorů, neboť jej uplatňují při sledování matky během snubních letů (Daníhlík et al. 2017). Vršek hlavy tvoří temeno a směrem dozadu navazuje týl. Na temeni hlavy se nacházejí pro včelu dominantní složené oči, mezi nimiž jsou tři jednoduchá očka, která nemají schopnost akomodace. Včela jimi reaguje na změny intenzity světla. Pod týlním otvorem nacházíme složený sosák (*proboscis*), představující lízavě sací ústrojí. Primárně je sosák používán k nasávání nektaru, vody a medu, ale také ke krmení plodu a slouží k předávání potravy mezi včelami (trofolaxe). Týlem je hlava spojena stopkou s další částí těla – hrudí. Stopkou tak prochází hltan, nervy, aorta, vzdušnice a vývody hlavových žláz (Lampeitl 1996; Vesely 2003).

Druhou tělní část představuje hrud' (*thorax*), kterou tvoří srůst tří hrudních a jednoho zadečkového článku. Hrud' můžeme rozdělit do dalších čtyř částí: předohrud', středohrud', zadohrud' a bedra. Na hrudi se nacházejí dva páry křídel a tři páry končetin umístěných v jednotlivých částech. Z předohrudí vybíhá přední pár končetin se specializovaným aparátem pro čištění tykadel. Středohrud' nese první pár křídel a druhý pár končetin s trnem pro vypichování pylových rousek z pylového košíčku. Zadohrud' je místo pro druhý pár křídel a zadní pár končetin, kde se nachází pylový košíček (*corbicula*) pro sběr tzv. pylových rousků (Lampeitl 1996; Daníhlík et al. 2017). Na všech párech končetin jsou pylové kartáčky, kterými včela zachytává pyl. Ten je pak zvlhčován malým množstvím nektaru z medného váčku a sekretem pyskových žláz. Takto upravená pylová rouska je transportována do pylového košíčku (Corby-Harris et al. 2014). Na hrudi se dále nacházejí křídla. Ta jsou pro všechny zástupce z řádu blanokřídlých (*Hymenoptera*), kam patří i včela medonosná, důležitou součástí

(Mullen & Durden 2019). Vznikla vychlípěním vnější kutikuly a jejich kostru tvoří několik žilek, které drží křídla napnutá a prostupuje jimi hemolymfa, nervy a vzdušnice. Protože je chůze pro včelu velice energeticky náročná, je tento hmyz z velké části závislý na pohybu křídel, jenž je zajišťován letovými svaly vyplňujícími téměř celou hrudní dutinu (Daníhlík et al. 2017). Frekvence pohybu pak může dosahovat až 25 kmitů za sekundu (25 Hz) (Lampeitl 1996). Kromě svého přemísťování z místa na místo slouží tento letový aparát i pro udržování konstantní teploty hnízda a pro rozptýlení feromonu.

Třetí část tvoří zadeček (*abdomen*) s původním článkováním těla. Protože je v zadečku uložena většina vnitřních orgánů, které je potřeba dostatečně chránit, je jeho povrch tvořen pevnou kutikulou. Kutikula je převážně složena z pevných chitinových plátků, skleritů. Sklerity vyplňující hřbetní stranu nazýváme tergity a břišní stranu tvoří sternity. Dělnice má na svém těle viditelný stejný počet tergítů i skleritů (6), trubci mají 8 skleritů a 7 tergítů. Zbytek článků je zanořen do žihadlové komory (Vesely 2003; Daníhlík et al. 2017).

Žihadlo vzniklo přeměnou kladélka, což je orgán pro kladení vajíček. K tomuto účelu ho využívá jen matka. Dělnice ho používají pro svoji obranu a trubcům zcela chybí. Žihadlový aparát tvoří složitou soustavu, která je tvořena jedovým kanálkem, což je vnitřní žlábek spojený se štětinkami, žihadlovým obloukem s chitinovými destičkami, pochvou, svaly a žlázami. Na konci štětinek se nachází vratizoubky, kterými se po bodnutí do měkké tkáně žihadlo zachytí. Dělnice mají obvykle 7–12 vratizoubků a matka pouze 3. Na vrcholku celého aparátu se nachází jedový žlábek. Zde se hromadí vytvořený včelí jed produkovaný jedovou žlázou. Během bodnutí pak dochází k současnému vstříknutí včelího jedu do rány (Daníhlík et al. 2017). Včelí jed představuje komplexní směs proteinů, peptidů a malých organických molekul. Obsahuje také fosfolipázy a hyaluronidázy, které mohou být například pro člověka nebezpečné, neboť mohou vyvolat alergickou reakci. Velký podíl v sušině zaujímá peptid melittin, který činí membrány velmi náchylné k napadení fosfolipázami. Melittin také způsobuje bolest, zvyšuje průtok kapilární krve a spouští lýzu červených krvinek. Další složkou včelího jedu je neurotoxin, zvaný apamin (Mullen & Durden 2019).

Součástí včelího těla je i soustava žlázová. Ta je u včel značně rozvinutá a složitá. Nikdy se nestane, že by každá z kast včelího společenství měla vyvinuté všechny žlázy. Hltanovou žlázu, kterou je produkována mateří kašička, mají například jen dělnice. Tato žláza je velice nerovnoměrná. Tvoří se pouze mladuškám, které přijímají dostatek glycidové a bílkovinné stravy. Její produkce vrcholí mezi 6.–10. dnem života včely a poté postupně zaprahne. Zimním včelám se během přezimování její aktivita zcela zastaví a objeví se až na jaře (Vesely 2003). Důležitou součástí výměšku hltanové žlázy je enzym invertáza, kterým je štěpena sacharóza na

glukózu a fruktózu (Daníhlík et al. 2017). Dalšími hlavovými žlázami jsou žláza kusadlová a pysková. Kusadlová žláza u matek vylučuje feromon matky, tzv. mateří látku, a dělnicím slouží hlavně k rozpuštění vosku a propolisu při jejich zpracování. Pysková žláza je využívána k rozmáčení tuhé potravy, čímž pomáhá potravu snáze přijímat. Na zadečku se nacházejí voskové žlázy produkující vosk. Tyto žlázy jsou opět typické jen pro dělnice a matkám i trubcům zcela chybí. Na posledním zadečkovém tergitu nalézáme vonnou (Nasanovovu) žlázu, jež produkuje vonný sekret skládající se z geraniolu, kyseliny geraniové, citralu, nerolu a formesolu. Jedná se o typický feromon, který včely používají pro značkování zdrojů potravy (Vesely 2003).

Další soustavou, jež tvoří vnitřní prostředí včely medonosné, je soustava dýchací. Tu oproti savčí tvoří systém vzdušnic (*tracheae*), kterými jsou jednotlivé tkáně těla přímo okysličovány kyslíkem. Přenos dýchacích plynů tak není závislý na hemolymfě. Hemolymfa je hmyzí „krev“, která slouží k přenosu živin a produktů metabolismu. Obsahuje několik speciálních buněk, hemocytů, s různými funkcemi. Oběhová soustava je u včel otevřená a tvořená srdcem s pěti komorami, aortou a krátkými slepě zakončenými cévami. Zplodiny metabolismu jsou z těla vylučovány Malpighickými trubicemi ústícími do začátku tenkého střeva v oblasti pyloru (Daníhlík et al. 2017).

3.2.1 Trávicí trakt

Základní struktura trávicího traktu je pro všechny hmyz velice podobná. Trávicí orgány začínají ústním otvorem a pokračují přes hltan a dlouhý jícen až do střeva žláz (Lampeitl 1996). Střevo se dělí na tři základní části: přední, střední a zadní (Obr. 2).



Obrázek 2: Trávicí trakt včely medonosné (Engel et al. 2015)

Přední část tvoří medný váček, ve kterém se prvotně fermentuje nektar na med, který je zde dočasně uchováván (Chapman 2013; Engel & Moran 2013). Mezi medný váček a střední

část střeva vstupuje česlo, které je složeno ze čtyř chlopní s chloupky. Česlem jsou vychytávány pevné částice z medného vaku, které jsou tvarovány do tzv. bolusů. Jeho funkce je zároveň jednou ze složek imunity včelstva, neboť chlopněmi jsou vychytávány a s výkaly vylučovány i patogeny vstupující do přední části střeva (Daníhlik et al. 2017).

Přední a střední část pochází z embryonálního ektodermu a po celé své délce je lemována exoskeletem složeným z chitinu a kutikulárních glykoproteinů. Tento exoskelet odděluje lumen střeva od epidermálních buněk (Moran 2015). Chitin je také důležitou složkou peritropické matrice, která je dále složena z glykosaminoglykanů, glykoproteinů a bílkovin a pokrývá vnitřní stěnu střední části střeva (das Dores Teixeira et al. 2015). Chitin zde zaujímá funkci pro zlepšení trávení a částečně chrání střevní epitel před mechanickým poškozením, toxickými látkami a případnými patogeny (Moussian 2013).

Střední část představuje žaludek (*proventriculus*), který vytváří primární místo pro trávení a vstřebávání živin z potravy. Tato část postrádá exoskeletární výstelku a oproti zbylým částem je tvořena z endodermálních buněk (Chapman 2013; Engel & Moran 2013).

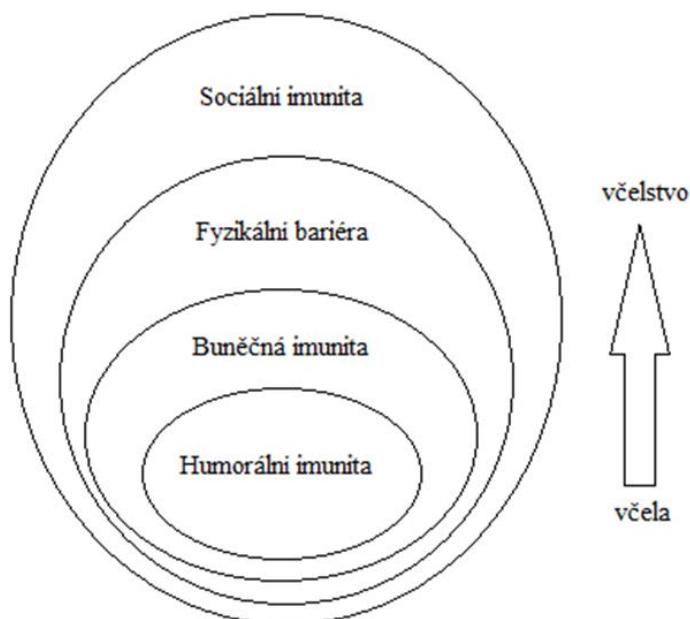
Zadní část střeva je rozdělena na vrátník (*pylorus*), tenké střevo (*ileum*) a výkalový vak neboli konečník (*rectum*) (Goncalves et al. 2017). Tenké střevo tvoří úzká trubice, která má šest podélných invaginací (vnitřní vchlípený úsek střeva do dalšího oddílu střeva) (Moran 2015). V konečníku se hromadí výkaly před samotným vyprázdněním a společně s análním otvorem zakončují trávicí trakt.

Vylučovacími orgány jsou Malpighické trubice, které jsou umístěny na přední straně zadní části střeva. Tyto trubice se rozprostírají do dutiny těla a absorbují zbytky, jako je například kyselina močová. Zadní část střeva obsahuje tedy jak zbytky z potravy, tak i dusíkaté zbytky. Tato směs odpadních látek tvoří jiné nutriční prostředí pro bakterie včelích střev než pro střevní bakterie zvířat, u kterých jsou tyto dva odpadní produkty oddělovány. Zadní část slouží k resorpci vody a iontů, což přirozeně udržuje osmotickou rovnováhu vnitřního prostředí včel. V mnohých případech zde může probíhat i sekundární absorpce živin (Chapman 2013; Engel & Moran 2013).

3.3 Imunita včel

Stejně jako u všech živých organismů i medonosné včely mají svou vlastní imunitní obranu (Giuffrè et al. 2017). Ta se skládá ze dvou základních úrovní. První imunitní linií tvoří fyzikální bariéry. Druhou linií obrany je vrozená imunita včel, která se rozděluje na imunitu buněčnou a humorální. (Antúnez et al. 2009; Daníhlik et al. 2016). Kromě individuální včelí

imunity rozpoznáváme i tzv. sociální imunitu (Obr. 3), která je založena na spolupráci celého včelstva, tedy na kolektivní obranyschopnosti organismů (Giuffre et al. 2017).



Obrázek 3: Imunitní systém včely medonosné (Daníhlík et al. 2017).

U včel byly identifikovány různé patogeny včetně virů (např. virus deformovaných křídel), bakterií (např. *Paenibacillus larvae* a *Melissococcus plutonius* způsobující mor a hnilobu včelího plodu), hub (např. *Nosema apis*, *N. ceranae* a *Ascospaera apis*), roztočů (*Varroa destructor*, *V. jacobsoni*) a trypanosomatidy (*Lotmaria passim*), které mají při proniknutí negativní přínos pro celou včelí kolonii (Ribière et al. 2018).

3.3.1 Vnitřní imunitní systém

Druhou obrannou linii včel představuje vnitřní imunitní systém, rozdělující se na buněčnou a humorální imunitu. V obou případech se jedná o imunitu vrozenou a včela ji využívá především ke své obraně (Antúnez et al. 2009).

3.3.1.1 Buněčná imunita

Buněčná imunita je zprostředkována speciálními krevními buňkami, hemocyty, které cirkulují v hemolymfě nebo jsou součástí různých tkání včelího těla (Gábor et al. 2017). Tvorba krevních buněk začíná již během vývojového stádia plodu a v dospělosti včel jsou tyto buňky doplňovány pomocí buněčného dělení, tzv. mitózy (Hystad et al. 2017). Hemocyty hmyzu jsou klasifikovány na základě jejich morfologických a funkčních charakteristik. Mezi pět

nejdůležitějších patří: granulocyty, plazmatocyty, sferulocyty, oenocyty a prohemocyty. Pokud tyto buňky zaznamenají patogen, rozmnoží se a dochází k procesům, kterými jsou ničeny cizí, nežádoucí nebo patogenní částice. Každý typ buněk je charakteristický pro určitý imunitní proces. Granulocyty mají sklony k fagocytóze, což je proces, při kterém jsou ničeny pouze malé částice, jako jsou bakterie nebo kvasinky (Gábor et al. 2017). Větší částice nebo větší množství malých částic pohromadě je většinou likvidováno procesy označovanými jako nodulace nebo enkapsulace. Během enkapsulace dochází k zapouzdřování invazivních patogenů (Eleftherianos et al. 2009; Degrandi-Hoffman & Chen 2015; Negri et al. 2015) a do tohoto procesu jsou převážně zapojovány plazmatocyty (Richardson et al. 2018). Nodulace i enkapsulace jsou dva velmi podobně fungující obranné procesy, kterými jsou nežádoucí částice ničeny, tzv. degranulovány (Obr. 4) (Dubovskiy et al. 2016).



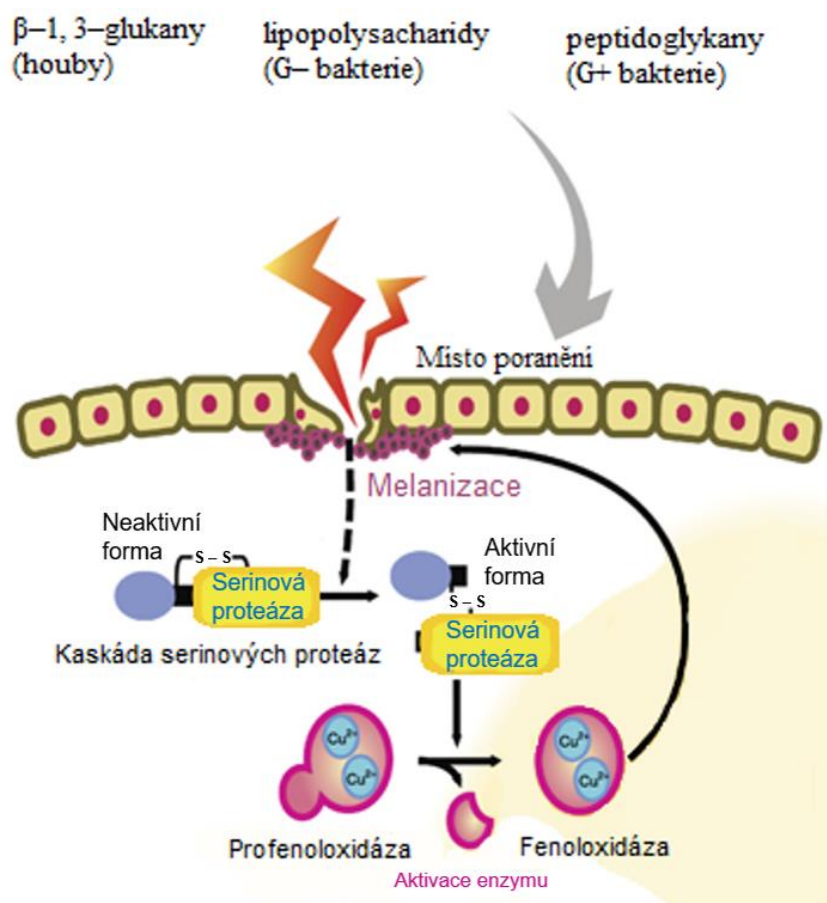
Obrázek 4: Hemocytová adheze, rozšíření a degranulace během enkapsulace parazitů (Dubovskiy et al. 2016).

3.3.1.2 Humorální imunita

Humorální neboli látková imunita je tvořena aktivními molekulami, které vyvolávají specifickou reakci imunitního systému. Těmito látkami se rozumí především lektiny (aglutininy), enzym fenoloxidáza a antimikrobiální peptidy, které jsou tvořeny zejména v tukovém tělese nebo v hemocytech (krevní buňky) (Evans et al. 2006).

Lektiny jsou glykoproteiny, které jsou známy aglutinací (shlukování) bakterií, prvoků a parazitů díky přítomnosti určitých polysacharidů na povrchu těchto cizích buněk. Díky této schopnosti jsou pojmenovány jako aglutininy. Tyto látky slouží jako protilátky a usnadňují následující obranné procesy, jako je enkapsulace nebo profenoloxidázová aktivace (Gupta 2001).

Profenoloxidáza je proenzym fenoloxidázy, která je základní složkou fenoloxidové kaskády. Jedná se o velice složitý sled reakcí, kdy neaktivní forma enzymu je aktivována externími složkami mikroorganismů, jako jsou β -1, 3-glukany (houby), lipopolysacharidy (G^- bakterie) a peptidoglykany (G^+ bakterie). Tyto sloučeniny dají pokyn endogenním serinovým proteázám, které aktivují zmíněný enzym (Obr. 5) (Eleftherianos & Revenis 2011; Coaglio et al. 2018). Během tohoto procesu vznikají cenné meziprodukty, difenoly a chinony, které mohou poškodit mikroorganismy či parazity na základě jejich toxicity. Chinony jsou dále polymerizovány na žádaný nerozpustný melanin (Daníhlík et al. 2016). Melanin je hnědočerný pigment, který má stejně jako meziprodukty fenoloxidázové kaskády cytotoxickou aktivitu vůči mikroorganismům a omezuje invazi mikrobiálních patogenů. Primárně se však uplatňuje v procesu tzv. melanizace, kdy se hromadí v místě poranění, čímž napomáhá k hojení ran nebo slouží jako bariéra a zabraňuje rozšíření infekce (Eleftherianos & Revenis 2011).



Obrázek 5: Aktivace enzymu fenoloxidázy pomocí endogenních serinových proteáz. Fenoloxidovou kaskádou vzniká melanizace (Nam et al. 2012).

Antimikrobiální peptidy jsou klíčovou složkou vrozené imunity včel, která přispívá v roli proti napadení patogeny. Z chemického hlediska se jedná o krátké peptidy, jež jsou uvolňovány během bakteriální, houbové či protozoální infekce. Jejich povrch je tvořen kladně nabitými náboji. To jim umožňuje se navázat na povrch záporně nabitých bakteriálních membrán a následně jim zamezit růst a množení. Tyto látky poškozují mikrobiální buňky perforací membrán a inhibují složení proteinů (Daníhlík et al. 2016). Přímo v hemolymfě včely medonosné se nacházejí čtyři hlavní peptidy: abaecin, apidaecin, defensin a hymenoptaecin. Další antimikrobiální peptidy můžeme nalézt v mateří kašičce (jelleiny, royalisin) nebo včelím jedu (apamin, melittin). Každý z těchto peptidů může upřednostňovat jeden druh mikrobů. Například royalisin je účinný proti grampozitivním bakteriím, včetně *P. larvae*, který je původcem včelího moru (Daníhlík et al. 2016). Stejně tak i defensin a jelleiny jsou aktivní především vůči grampozitivním bakteriím (Bucekova et al. 2017; Cornara et al. 2017). Naopak apidaecin působí proti gramnegativním bakteriím, kam patří například *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumonia*, *Salmonella typhimurium* (Chen et al. 2017). Další může mít zvýšenou aktivitu jak vůči pozitivním, tak i vůči negativním bakteriím. Takovým peptidem je abaecin (Shen et al. 2010).

Antimikrobiální peptidy v mateří kašičce a včelím jedu přinášejí pravděpodobně protizánětlivé, antibakteriální a antioxidantní účinky těchto včelích produktů, které jsou v dnešní době často využívány ve farmaceutickém, kosmetickém i potravinářském průmyslu (Ramanathan et al. 2018).

3.3.2 Sociální imunita

Společenský hmyz, kam patří i rod *Apis mellifera*, může vykazovat tzv. sociální imunitu. Tou se rozumí kolektivní obrana včelstva, například před parazity a patogeny (Giuffre et al. 2017). Včela jako jednotlivec dokáže vykonávat pouze malý zlomek věcí, avšak spojí-li se dohromady několik takových jedinců, vytvoří společné seskupení, které bude dostatečně silné k tomu, aby se potlačilo šíření parazitů a patogenů. Například dělnice likvidují ze svého úlu dospělé jedince a plody, které jsou nemocné nebo parazitované. V takovém případě hovoříme o společenském hygienickém chování. Pokud jsou dospělci nakaženi parazity a umírají mimo úl, můžeme to považovat za jeden z projevů sociální imunity (Evans & Spivak 2010).

Dalším typem kolektivní obrany může být termoregulační chování, kterým včely vytváří společnou sociální horečku, během které stoupne teplota prostředí natolik, že se to fatálně

projeví na potogenech citlivých na vyšší teploty. Tímto způsobem se například zbavují parazitické houby *Ascosphaera apis*, která primárně napadá včelí larvy (Simone-Finstrom et al. 2014).

Včely vyjma skupinového chování v úlu shromažďují rostlinné pryskyřice (propolis), kterými vyplňují včelí hnízdo, aby nedocházelo ke ztrátám vody, a také tím vytvářejí antimikrobiální a antivirové bariéry (Simone et al. 2009; Simone-Finstrom & Spivak 2010). Některé sloučeniny, jako je kyselina p-kumarová, zvyšují imunitní geny (Mao et al. 2013). Jiné sloučeniny mohou omezit růst populací *Varroa*, protože mají typické vlastnosti proti roztočům (Degrandi-Hoffman & Chen 2015). K tomu, aby včely vykonávaly ochranu správně, využívají důležitých instinktů, ale ve většině případů mají imunitní reakce již vrozené (Giuffre et al. 2017).

3.3.2.1 Grooming

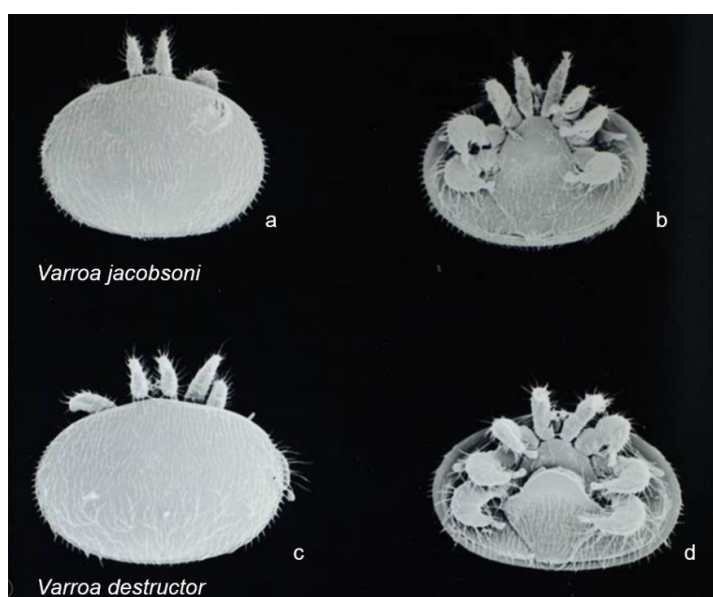
Grooming je jedním z několika obranných mechanismů, které používají včely proti roztočům rodu kleštík (*Varroa*) (Bahreini & Currie 2015; Giuffre et al. 2017). Jde o chování, které umožňuje včelám vyčistit svůj povrch těla. Tato činnost souvisí se schopností hmyzu vnímat podněty ze svého prostředí (Zhukovskaya et al. 2013). Parazitíční roztoči vysílají podněty, které jsou přijímány mechanickými receptory či chemoreceptory včel. Tyto receptory aktivují obranné mechanismy, jako je právě grooming, čímž odstraňují roztoče ze svého těla (Hamiduzzaman et al. 2017). Také feromon, který vypuzuje včelí královna ze svých mandibulárních žláz, ovlivňuje tento ochranný čistící proces (Bahreini & Currie 2015).

Grooming se u včel medonosných může dělit na dvě kategorie: autogrooming a allogrooming. Pod pojmem autogrooming si můžeme představit péči o vlastní tělo. Touto činností si včela může z vlastního těla odstraňovat zejména ektoparazity, ale také prach a pylová zrna (Boecking & Spivak 1999). Používá k tomu především ústa, kusadla (*mandibulae*) a první dva páry končetin (Danka & Villa 2003). Čištění povrchu těla začíná u tykadel a úst. Ta jsou čištěna pomocí prvních párů končetin. První pár končetin je naopak čištěn tykadly a druhým párem končetin, který je následně čištěn třetím párem. Zadní končetiny se nakonec čistí mezi sebou tak, aby částice prachu nebo zrna pylu byly umístěny do pylového koše, který má včela umístěný na holenní kosti třetího páru končetin (Pritchard 2016).

Pokud není včela dostatečně silná k tomu, aby se ubránila sama před parazitem, začne třást svým tělem a zahájí tzv. groomingový tanec, kterým přiláká další včely z kolonie (Ruttner & Hänel 1992). V případě, kdy si včela přiláká pomoc ostatních včel z hnízda, je zahájen proces allogrooming. Tato činnost znamená, že se na obraně proti roztoči napadající tělo včely podílí

více než jedna včela. Jde tedy o společenskou aktivitu, kdy několik úlových včel jedná společně (Pritchard 2016). V 60–100 % případů je roztoč z hostitele vypuzen a v 50–60 % je roztoč usmrčen. Groomingové chování je vázané na věk včely. Autogrooming a groomingový tanec je typický spíše pro mladušky a allogrooming provádějí více dospělé dělnice, které společně pomáhají čistit mladé včely. Výjimku tvoří trubci, kteří neprovozují vlastní autogrooming ani se nepodílí na společném allogroomingu (Rath 1999).

Mezi nejznámější druhy kleštíků (*Varroa*) patří kleštík zhoubný (*V. destructor*) a kleštík včelí (*V. jacobsoni*) (Obr. 6). Jedná se o velmi rozšířeného parazita včel, který pro své potřeby získává živiny z včelích plodů a těl dospělců. Do nedávna veškeré studie zabývající se tímto motivem prohlašovaly, že tento parazitický roztoč se přichycuje na vnější povrch těla včel, propichuje intersegmentální břišní stěnu a živí se včelí hemolymfou, čímž ochuzuje včelu o potřebné živiny a může tak způsobit invazi sekundárních patogenů (Pritchard 2016; Hamiduzzaman et al. 2017). Současná studie Ramsey et al. (2019) však nově zjistila, že hlavním poškozením není ztráta hemolymfy, nýbrž tělesného tkáňového tuku, který je primárně roztoči konzumován (Ramsey et al. 2019). Tato problematika se netýká pouze včelích dospělců, ale i včelích plodů, které bývají v rámci roztočí reprodukce také napadeni. U postižených plodů byl pozorován nižší obsah proteinů, zvýšená hladina volných aminokyselin a ve výsledku měli všichni vyvinutí jedinci nižší hmotnost oproti nenapadeným. Vše naznačuje tomu, že kleštici způsobují inhibici proteinové syntézy (Aronstein et al. 2012; Degrandi-Hoffman & Chen 2015).



Obrázek 6: Rozdíl mezi kleštíky: a) Kleštík včelí (*V. jacobsoni*) pohled zezadu; b) Kleštík včelí (*V. jacobsoni*) pohled na ventrální stranu; c) Kleštík zhoubný (*V. destructor*) pohled zezadu; d) Kleštík zhoubný (*V. destructor*) pohled na ventrální stranu (Dietemann et al. 2013).

Studie Kirrane et al. (2012) rovněž vyhodnotila, že také věk a reprodukční stav roztočů může být jedním z faktorů, který ovlivňuje obrannou činnost včel, protože došla k výsledkům, že samice, která primárně nakladla vajíčka, měla větší rezistenci vůči včelí obraně než dceřiní parazité, kteří se vylíhli až společně s mladuškou. Proto se včely, které jsou napadeny dceřinými roztoči, léčí daleko rychleji než včely, u kterých tato nákaza vypukla (Kirrane et al. 2012). Tento jev může být posuzován na základě nepřímého měření rozpadu roztočů včelích klastrů nebo se přímo hodnotí chování včel a kvantifikují se poškození roztočů. Roztoč, který byl napaden, má nejčastěji zmrzačené končetiny či dokonce celý zadeček s končetinami (*idiosoma*). Typ poraněné části těla a velikost poškození je vysoce variabilní (Bahreini & Currie 2015).

Grooming byl poprvé sledován u Východních včel (*Apis cerana*), které dlouhodobě a naprosto přirozeně odolávají napadení infekčnímu onemocnění varoázy způsobené kleštíky. Západní včela *A. mellifera* vyjadřuje taktéž péči proti těmto roztočům, avšak v menší míře než její asijský protějšek (Pritchard 2016).

3.3.2.2 Hygienické chování

Hygienické chování se striktně týká schopnosti kolonií zmírňovat choroby odstraněním nemocných nebo mrtvých jedinců z kolonie před tím, než se nemoc dostane do fáze, kdy by mohla infikovat další jedince nebo kdy by škůdci mohli začít svoji reprodukci (Giuffre et al. 2017; Gerds et al. 2018; Leclercq et al. 2018). Pokud včely zaznamenají možnou příčinu, odkryjí zavíčkovanou buňku, kde se postižený plod nachází, a následně celý obsah odstraní. Toto chování je dědičně získané a poskytuje jistou prevenci před škůdci a vzniklými chorobami, jako je například mor včelího plodu, zvápenatění včelího plodu, varoáza a virus deformovaných křídel (Toufailia et al., 2018).

3.3.2.3 Termoregulace

Udržování teploty úlu je zásadní pro zdraví a přežití kolonie, zejména pokud jde o vývoj larev a kukel. Pro správný vývoj plodu se optimální teplota zejména v místě plodiště pohybuje okolo 32–36 °C. Tato teplota není po celý rok konstantní, je udržována převážně v období plodování. Na většině míst světa, která včely medonosné obývají, se střídá roční období, a dochází tak k letním i zimním extrémním teplotám. Proto musejí být včelí kolonie přizpůsobivé, aby byly schopné přežít tyto teplotní výkyvy. Vzhledem k těmto faktorům má termoregulace u včel veliký význam (Jones & Oldroyd 2006).

V zimě, kdy je reprodukce včelstva nejmenší, teplota hnízda klesá. Pokud by došlo k poklesu pod optimální teplotu, mohlo by to mít negativní dopad na celé včelstvo. V několika studiích bylo například zaznamenáno, že v takových případech dochází k poškození mozku a křídel, a také byly pozorovány abnormality v chování (Tautz et al. 2003; Groh et al. 2004). Nikdy proto nesmí teplota včelstva klesnout natolik, aby ohrozila existenci kolonie.

Teplota včelstva je ve velké míře závislá na teplotě prostředí. Pokud dojde k poklesu vnější teploty pod 10 °C, včely vytvářejí speciálně termoregulační seskupení, tzv. chomáč. Během shlukování dochází k vibracím letových svalů včel, čímž se produkuje teplo. Včely, které jsou na vnější straně chomáče, teplo neprodukují, pouze ho přijímají, aby neprochladly. Svým postavením vytváří totiž důležitý izolační obal. Díky této povrchové vrstvě se teplota uvnitř jádra pohybuje kolem 33 °C a na povrchu mezi 6–12 °C (Döke et al. 2015). Naopak, pokud je potřeba teplotu úlu snížit, dělnice obývající vstupy do hnízda jsou schopné velmi účinně větrat pomocí křídel, kterými kmitají (Simone-Finstrom et al. 2014). Termoregulace v některých případech napomáhá také při obraně proti parazitům, konkrétně proti houbě *Ascospaera apis*, která je citlivá na teplotní výkyvy. Tato parazitická houba je původcem larvální choroby, při níž dochází ke zvápenatění včelího plodu. Houba se šíří pomocí spór, které jsou požívány včelími larvami, v jejichž střevech klíčí. Aby vznikla zmíněná nemoc, musela by teplota larev klesnout na 30 °C. Po vystavení spóry včely okamžitě kolektivně zvyšují teplotu na hřebenech včelích plodů. Vytváří tzv. sociální horečku, která efektivně zabraňuje klíčení parazitické houby (Starks et al. 2000). Studie Simone-Finstrom et al. (2014) také upozorňuje na to, že teplotní horečka je zejména ovlivněna okolními teplotními podmínkami, a pro její vznik je potřeba dostatečné množství přijatého nektaru. Touto studií bylo prokázáno, že s vyšším příjmem sacharózy se po 12 hodinách zvedne teplota zhruba o 2 °C. K tomu, aby bylo dosaženo požadované teploty v úlu, je zapotřebí, aby včely pracovaly na termoregulaci společně (Simone-Finstrom et al. 2014).

3.3.2.4 Využití antimikrobiálních látek z prostředí

Jednou z forem sociální imunity včelích kolonií je sběr antimikrobiálních látek z prostředí. Těmito látkami se rozumí rostlinné pryskyřice, které jsou včelami sbírány a využívány ve včelím úlu jako propolis (Simone-Finstrom et al. 2017). Úlové včely, které jsou přizpůsobeny ke zpracování takto nasbíraných látek, zpracovávají pryskyřice tak, že k nim přidávají pyl, vosk a enzymy (např. β -glukosidáza). Vzniklá pryskyřičná látka je známá svou antimikrobiální aktivitou proti řadě bakteriálních, houbových, virových i lidských patogenů (Sforcin 2016). Včelí kolonie shromažďují pryskyřice z několika rostlinných zdrojů, ačkoliv

pravděpodobně existuje zdrojová věrnost pro jednotlivé včely (Wilson et al. 2013). Proto, aby byla zesílena antimikrobiální aktivita, pryskyřičné zdroje jsou včelami míchány a utvářejí tak extrémně složitou směs, proti které mají náchylní parazité a patogeny potíže se svým rozvojem rezistence. Studie Drescher et al. (2014) zaznamenala, že i když některé zdroje jedné pryskyřice mohou být účinné proti jednomu typu parazitu nebo patogenu, pokud jsou zdroje smíšené, mají celkově mnohem vyšší účinnost (Drescher et al. 2014). Sesbírané pryskyřičné látky používají včely ve formě propolisu k vyhlazení vnitřních stěn svého hnízda, utěsnění otvorů ve svých plástvech tak, aby byla udržována teplota i vlhkost vnitřního prostředí, a také tuto látku využívají k pokrytí mrtvých vetřelců, kteří zemřeli uvnitř úlu, a zabraňují tak jejich rozkladu (Toreti et al. 2013). Propolis také ochraňuje kolonii před nemocemi právě kvůli své antiseptické účinnosti a antimikrobiálním vlastnostem (Salatino et al. 2005). Podle důkazů studie Niu et al. (2011) může propolis bohatý na flavonoidy a fenolické sloučeniny snížit účinky mykotoxinů produkovaných houbami, například druhem *Aspergillus* (Niu et al. 2011). Další studie, Simone et al. (2009), která se zabývala touto tematikou, potvrdila, že s rostoucím množstvím propolisu ve včelím hnízdě se bakteriální zátěž snižuje (Simone et al. 2009). Studie Borba et al. (2015) na toto téma navázala a zjistila, že zvyšujícím příjmem pryskyřic dochází i ke snížení energetických nákladů spojených s udržováním účinného imunitního systému. Konkrétně dochází ke snížení genů pro antimikrobiální peptidy abaecin a hymenoptaecin (Borba et al. 2015). Imunitní systém je totiž nejnákladnějším fyziologickým systémem hmyzu. Zvýšená imunitní reakce může vést ke snížení produktivity kolonie medonosných včel. Proto u včel pozorujeme behaviorální mechanismy sociální imunity, které snižují aktivaci individuálního imunitního systému proti nežádoucím mikroorganismům (Simone-Finstrom et al. 2017).

3.3.3 Externí fyzikální bariéry

Fyzikální bariéry jsou první obrannou linií včel, která zabraňuje vstupu infekčním zástupcům do tělní dutiny. Tyto fyzikální bariéry zahrnují exoskeletovou kutikulu a peritrofickou membránu, která lemuje trávicí trakt (Antúnez et al. 2009).

3.3.3.1 Peritrofická membrána

Epitelovou tkáň střední části střeva lemuje tzv. peritrofická membrána, která znesnadňuje průnik nežádoucím patogenům skrz stěnu střeva do trávicího traktu. Její základní stavební jednotkou je polysacharid chitin, který je tvořen N-acetyl-D-glukosaminem. Dále membránu tvoří sekretované glykoproteiny. Peritrofická membrána je u včely přítomna od

samého začátku vývoje larvy a s věkem přibývá na objemu. Tato membrána je součástí fyzikální bariéry sloužící prvotně pro ochranu včel. Pokud je však včelí larva napadena samotným parazitem, membrána není dostatečně silná k tomu, aby zamezila vstupu cizopasníkům. Například patogenní grampozitivní tyčinkovitá bakterie *P. larvae* má vyvinuté enzymatické chitinázy, které postupně degradují polysacharidovou membránu. V takovém případě začne včela využívat obranné mechanismy z dalších linií (Garcia-Gonzalez & Genersch 2013).

3.3.3.2 Kutikula

Celý povrch těla pokrývá vícevrstvá struktura, zvaná kutikula (Elias-Neto et al. 2009). Tento nebuněčný obal vznikl vchlípením ektodermu a tvoří vnější kostru těla včel, tzv. exoskelet. Kutikula je svým složením stejná jako peritrofická membrána na povrchu střeva. Nejvíce je zastoupena chitinem, který je dále zpevněn sklerotizací, což je proces, při kterém se ukládají vzájemně prokřížené bílkoviny, a inkrustací – ukládání anorganických látek (Andersen et al. 1996). Kutikula představuje velice odolnou vnější vrstvu, která není rozpustná ve vodě ani v organických rozpouštědlech. U včel se tvoří dvojí typ kutikuly. Na povrchu nacházíme pevné a velice tvrdé plátky, které jsou označovány jako sklerity. Naopak blanka, která tyto plátky propojuje, intersegmentální membrána, je měkká a dostatečně pružná k tomu, aby umožňovala roztažnost zadečku, jehož velikost je ovlivněna obsahem či velikostí orgánů (Daníhlík et al. 2017).

Exoskeletová kutikula je produkována pokožkou (epidermis), která ji tvoří, a dokonce i vyživuje. Celkem rozlišujeme tři vrstvy kutikuly. Vnější a nejvíce odolnou vrstvu představuje epikutikula, která obsahuje lipoproteinový komplex zvaný kutikulín. Tato vrstva neobsahuje žádný pigment, proto je bezbarvá. Oproti tomu druhá vrstva, exokutikula, je pigmentovaná v závislosti na obsahu pigmentu melaninu. Třetí vrstva, endokutikula, se objevuje v místech intersegmentálních membrán. Je stejně jako vnější vrstva bezbarvá (Elias-Neto et al. 2009).

Kutikula plní řadu funkcí. Kromě toho, že udržuje tvar těla, chrání vnitřní orgány, je sídlem smyslových orgánů a upínají se na ni svaly, tvoří první bariéru imunity jedince tím, že podobně jako peritrofická membrána zamezuje průniku patogenů. Také je zodpovědná za ztráty či vnikání vody do těla (Daníhlík et al. 2017).

3.4 Mikrobiota trávicího traktu včel

Specializovaná střevní mikrobiota včel medonosných je velice podobná té savčí, neboť obě jsou složeny z fakultativně anaerobních či mikroaerofilních bakterií, které jsou přizpůsobeny k určitému soužití s hostiteli. Včelí mikrobiota je v porovnání se savčí jednodušší, neboť ve střevním prostředí dominuje pouze devět bakteriálních druhů se shodnou 16S rRNA s >96 % (Moran et al. 2012).

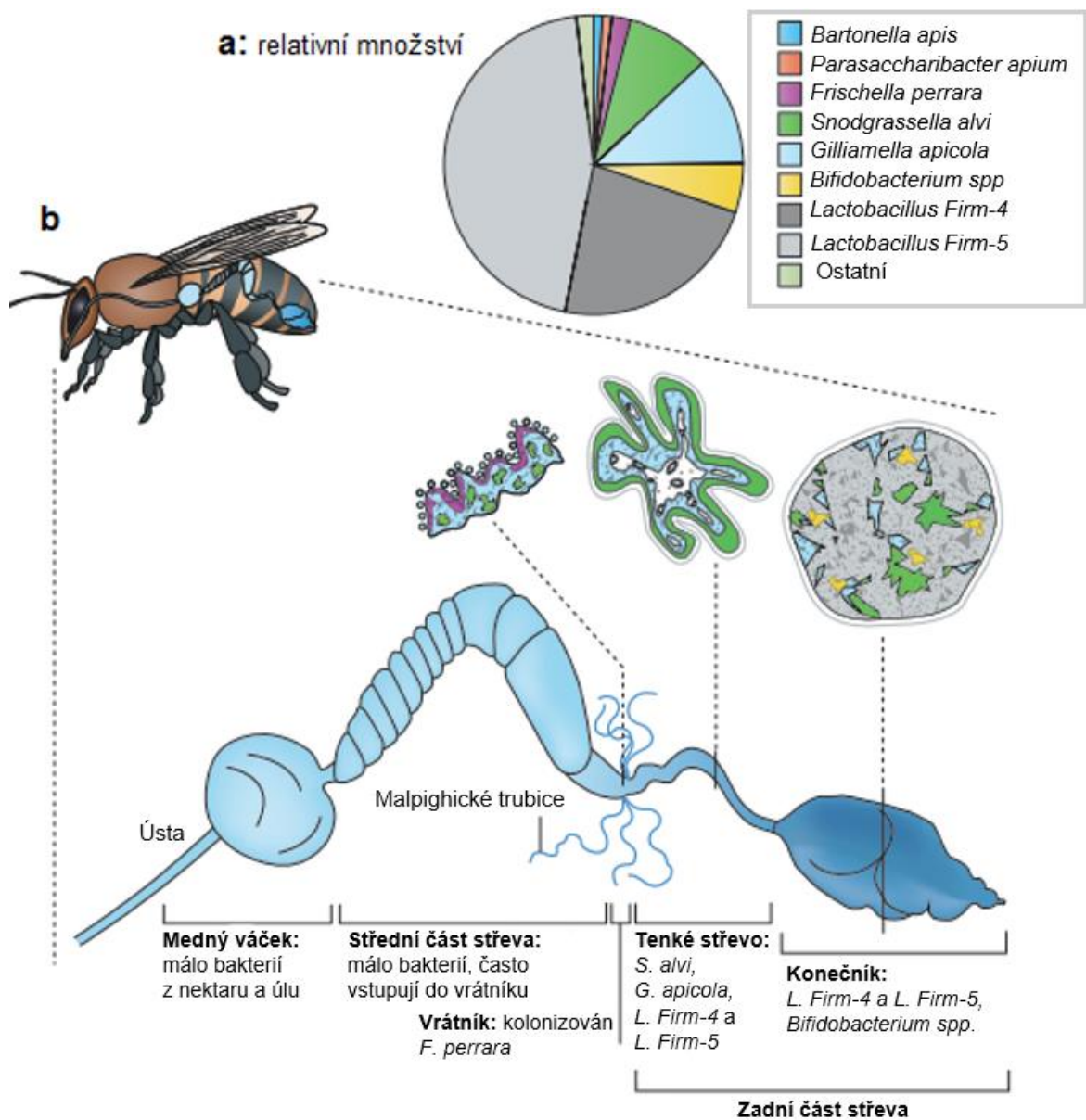
Pět hlavních fylogenetických skupin bakterií je všudypřítomných u všech druhů včel po celém světě, a dokonce se mohou vyskytovat i u příbuzných včelích druhů, jako je například čmelák (*Bombus spp.*) Dvěma hojně zastoupenými gramnegativními druhy jsou bakterie *Snodgrassella alvi* a *Gilliamella apicola*, zástupci kmene *Proteobacteria* (Kwong & Moran 2013). Mezi grampozitivní bakterie patří dva druhy kmene *Firmicutes* označované jako *Lactobacillus Firm-4* a *Lactobacillus Firm-5* (Martinson et al. 2011). Značně se vyskytuje i zástupce kmene *Actinobacteria*, *Bifidobacterium aseroides* (Raymann et al. 2017). Dalšími, méně početnými a také méně převládajícími fylotypy jsou *Frischella perrara*, *Bartonella apis*, *Parasaccharibacter apium* (*Apha2.2*) a skupina označená jako *Alpha2.1*. Tito zástupci kmene *Proteobacteria* se nacházejí pouze na určitých místech ve střevě nebo se vyskytují mimo trávicí trakt, v prostředí úlu. Proto je jejich četnost ve srovnání s hlavními bakteriálními druhy nižší a u některých druhů včel mohou zcela chybět. Tyto čtyři druhy bakterií společně s hlavními fylogenetickými skupinami tvoří základní střevní mikrobiotu včel (Tab. 1) (Kwong & Moran 2016; Raymann & Moran 2018).

Tabulka 1: Střevní mikrobiota včel medonosných. Prvních osm je dominantních klastrů v zadní části střeva dospělých dělnic (Moran 2015).

Druhy bakterií	Další označení	Bakteriální třída (kmen)	Primární umístění	Hostitel
<i>Gilliamella apicola</i>	<i>Gamma1</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	Střední část, tenké střevo	<i>Apis spp.</i> , <i>Bombus spp.</i>
<i>Frischella perrara</i>	<i>Gamma2</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	Žaludek, tenké střevo	<i>A. mellifera</i>
<i>Snodgrassella alvi</i>	<i>Beta</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	Tenké střevo	<i>Apis spp.</i> , <i>Bombus spp.</i>
<i>Lactobacillus mellis</i> , <i>L. mellifer</i>	<i>Firm-4</i>	<i>Firmicutes</i>	Konečník	<i>Apis spp.</i> , <i>Bombus spp.</i>
<i>Lactobacillus helsingborgensis</i> , <i>L. melliventris</i> , <i>L. kimbladii</i>	<i>Firm-5</i>	<i>Firmicutes</i>	Tenké střevo, konečník	<i>Apis spp.</i> , <i>Bombus spp.</i>
<i>Bifidobacterium asteroides</i> , <i>B. actinocoloniiforme</i> , <i>B. bohemicum</i>	<i>Bifido</i>	<i>Actinobacteria</i>	Konečník	<i>Apis spp.</i> , <i>Bombus spp.</i>
<i>Alpha2.1</i>	<i>Bartonellaceae</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	Působící různě	<i>A. mellifera</i>
<i>Parasaccharibacter apium</i>	<i>Alpha2.2</i> , <i>Acetobacteraceae</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	Střeva larev, medný váček, nektar, med, úl	<i>Apis spp.</i> , <i>Bombus spp.</i>
<i>Lactobacillus kunkeei</i>		<i>Firmicutes</i>	Střeva larev, medný váček, nektar, med, úl	<i>Apis spp.</i> , <i>Bombus spp.</i>

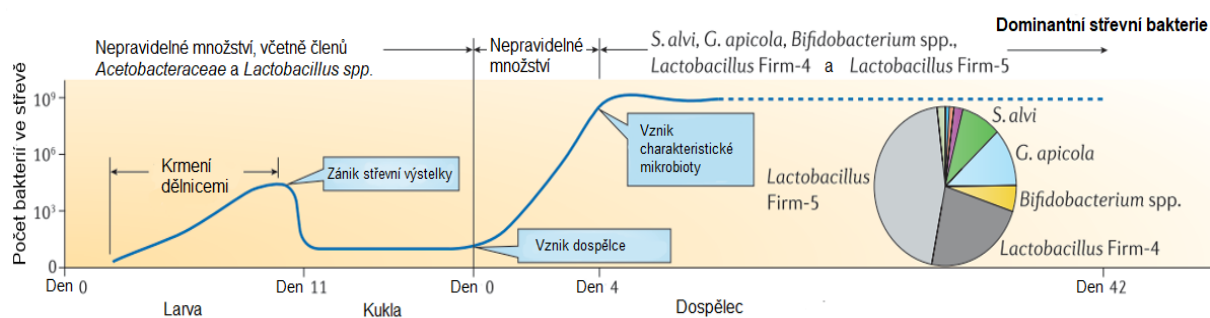
Jak už bylo zmíněno, každý druh má své vysoce specializované místo ve střevě. Jen málo bakterií se nachází v přední části střeva, konkrétně v medném váčku, který je využíván pro skladování a přepravu nektaru, pro krmení larev a produkci medu (Martinson et al. 2012). Malý počet bakterií se většinou skládá z druhů, jako jsou například *Lactobacillus kunkeei* a *Parasaccharibacter apium*, pro které je typické osídlování nektaru a úlu a nevadí jim atmosférické koncentrace kyslíku (Kwong et al. 2017). Ani střední část střeva netvoří mnoho zástupců bakterií. Tuto část tvoří žaludek a je využívána pro trávení a vstřebávání potravy, tudíž neposkytuje stabilní substrát pro kolonizaci bakterií (Raymann & Moran 2018). Největší bakteriální zastoupení se nachází až v zadní části střeva. Zde kolonizuje 10^8 – 10^9 bakteriálních buněk, které tvoří >99 % celkového počtu bakterií (Martinson et al. 2012). Zadní část je

rozdělena do dvou oddělených oblastí, tenké střevo a konečník. V tenkém střevu dominují hlavní gramnegativní fylotypy proteobakterií: *Snodgrassella alvi* a *Gilliamella apicola*. Společně tyto bakterie zasahují až do vrátníku (*pylorus*), který dominantně osídluje proteobakterie *Frischella perrata* (Engel et al. 2015). Konečník je místo, ve kterém se nacházejí grampozitivní bakterie: *Lactobacillus Firm-4* a *Lactobacillus Firm-5* a také zástupce bifidobakterií *Bifidobacterium asteroides*. Oba druhy laktobacilů mohou být nalezeny také v lumenu tenkého střeva, nejvíce se však vyskytují v rektální oblasti (Obr. 7) (Martinson et al. 2012).



Obrázek 7: Složení a prostorové uspořádání bakteriálních společenstev ve střevě včel (Kwong & Moran 2016).

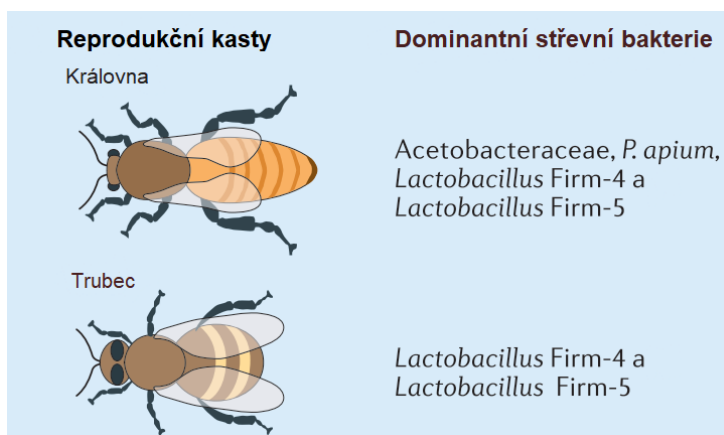
Přenos bakteriálních druhů probíhá u včel prostřednictvím sociálních interakcí mezi hostiteli (Martinson et al. 2012; Powell et al. 2014). Nové včelí larvy nemají přirozeně žádné bakteriální zastoupení, jsou ale krmeny dělnicemi (nejprve mateří kašičkou, potom medem, nektarem a pylem) během celého vývoje. Tento druh sociální interakce je označován jako trofalaxe, díky které získávají včelí larvy důležité mikrobiotické zástupce, například kmeny *Firmicutes* (zástupci laktobacilů) a *Proteobacteria* (zástupci gammaproteobakterií) (Hroncova et al. 2015). Jaké bude bakteriální složení či jejich množství, záleží zejména na stavu kolonie a způsobu stravování. Během metamorfózy, kdy se z larev stávají kukly a poté dospělé včely, zaniká dosavadní střevní výstelka a společně s ní zaniká i získaná mikrobiota. Proto čerstvě vylíhlé včely střevní komunitu téměř postrádají nebo vykazují pouze malé množství, kterému dominují pouze bakterie z prostředí. Avšak již třetí den včelí střevo osídluje $>10^7$ bakterií z charakteristických druhů střevní mikrobioty a tenké střevo i konečník začínají vykazovat „normální“ bakteriální složení. Až těsně před prvním vylétnutím, zhruba 6.–8. den, získává včela kompletní množství střevních bakterií (Obr. 8). Dospělé dělnice mají relativně stabilní soubor bakteriálních druhů ve střevě. Nicméně i zde se setkáváme s rozdílnými podíly. Tento rozdíl může být dán věkem, geografickou oblastí, ve které se společenstvo nachází, sezónními posuny nebo vykonávanou funkcí v rámci jedné kolonie (Kwong & Moran 2016; Raymann & Moran 2018).



Obrázek 8: Vývoj včelí střevní mikrobioty od larválního období po dospělé (Kwong & Moran 2016).

Kromě četných dělnic se ve včelím hnízdě nachází i jedna královna a několik včelích samců, zvaných trubci, kteří mají bakteriální sestavu oproti dělnicím odlišnou. Střeva včelí královny mají typické zastoupení bakterií z čeledi *Acetobacteraceae*, která zahrnuje *Parasacchaaribacter apium* a *Apha2.1*. Rozdílné zastoupení bakteriálních linií je způsobeno jedinečnou fyziologií a odlišnou stravou královen, které se živí výhradně mateří kašičkou.

Trubci mají složení střevní mikrobioty podobné jako dělnice, jen je zde zaznamenána vyšší četnost *Lactobacillus spp.* z kmene *Firmicutes* (Obr. 9) (Hroncova et al. 2015; Kapheim et al. 2015).

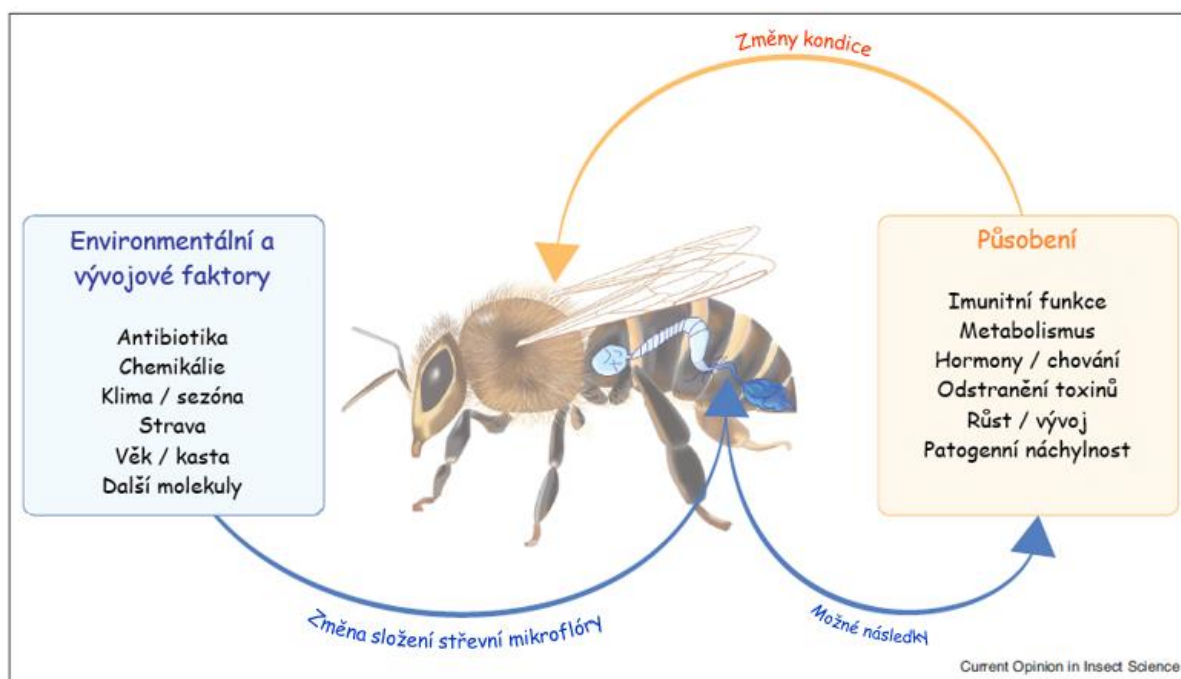


Obrázek 9: Dominantní bakteriální druhy osídlující trávicí trakt včelí královny a trubců (Kwong & Moran 2016).

Vznik symbiotických bakteriálních linií nemusí být závislý pouze na výkonu trofalaxe, tedy péči o plod, nebo vzájemném krmení. Dalším způsobem, jak získávají včely potřebnou mikrobiotu je pomocí fekálně-orální cesty. Tou se přenáší především bakterie jako *Snodgrassella alvi*, *Gilliamella apicola* nebo *Frischella perrara*. Další členové střevní komunity mohou být získáváni kontaktem se složkami z úlu, které byly v nedávném kontaktu se živými včelami (Powell et al. 2014b; Kwong & Moran 2016).

3.4.1 Mikrobiota jako prevence proti včelím nemocem

V posledních letech, kdy bylo zaznamenáno vysoké množství úmrtnosti včel, se ukazuje, že střevní mikrobiota má nezanedbatelný vliv na obranyschopnost tohoto sociálního hmyzu. V důsledku toho, že jsou včely vystavovány stresovým situacím (např. ztráta přirozených stanovišť a potravy, kontakt s chemickými látkami a antibiotiky), se postupně mění jejich imunitní funkce, metabolismus a také jejich střevní mikrobiota, která je pro včely tak důležitá (Obr. 10). Mikroorganismy ve střevech mohou svým hostitelům přispět například tím, že jim pomáhají při trávení potravy a detoxikaci škodlivých látek, zajišťují esenciální živiny a částečně chrání včely před možnými patogeny a parazity, což je úkon, kterým je regulován vývoj a imunita jedince (Engel & Moran 2013; Kwong & Moran 2016).



Obrázek 10: Vystavení stresovým faktorům a jejich dopad na včelu medonosnou (Raymann & Moran 2018).

Pro včelu medonosnou je typická střevní mikrobiota skládající se z devíti fylogenetických skupin. Kromě těchto symbiotických linií se včela setkává i s nežádoucími mikroorganismy, které se konkretizují na trávicí trakt hostitele. Sem se řadí převážně bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*, včetně *Hafnia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* a *Serratia*. Jedná se o patogeny, které zapříčiňují úhyn mnoha včel (Tab. 2). Infikované včely často opouštějí úl, aby zemřely mimo své hnízdo, a nedocházelo tak k rozšíření patogenů. Proto jsou na tyto nežádoucí mikroorganismy více náchylné zimní včely, které během zimy neopouští úl (Burritt et al. 2016).

Tabulka 1: Pokusy demonstrující úlohu mikrobiomu v ochraně včel proti patogenům (Raymann & Moran 2018).

Patogen	Hostitel	Způsob infekce	Ochrana
<i>Paenibacillus larvae</i>	<i>Apis mellifera</i>	Příjem potravou	Směs BMK
<i>Lotmaria passim</i>	<i>Apis mellifera</i>	Příjem potravou	<i>Snodgrassella</i>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Apis mellifera</i>	Příjem potravou	Celá komunita
<i>Escherichia coli</i>	<i>Apis mellifera</i>	Injekčně	<i>S. alvi</i> a <i>G. apicola</i>

Jakou ochrannou roli skutečně přináší střevní mikrobiom, zkoumalo několik vědeckých studií. Jednou z nich byla studie Kwong et al. (2017), která zkoumala bakterii *E. coli*, způsobující infekci hemolymfy včel. Včely, které měly kompletní mikrobiální střevní sestavu, odstranily z hemolymfy více nežádoucích bakterií, a dokonce u nich bylo prokázáno větší množství antimikrobiálního peptidu apidaecinu (Kwong et al. 2017). Studie Emery et al. (2017) prováděla pokusy s gastrointestinální bakterií vrátníku *Frischella perrara*, která je pravděpodobně zodpovědná za tvorbu fenotypového „strupu“. Je možné, že tvorba tohoto tmavě zbarveného útvaru, který vytváří tenký pruh ve vrátníku, je výsledkem melanizační reakce hostitele. Melanizace i tvorba antimikrobiálního peptidu je jednou z odpovědí humorálního imunitního systému (Emery et al. 2017). Přestože se většina studií zaměřuje na dospělé dělnice, existují studie, které zkoumaly potenciální interakce střevních mikrobiomů s larválními patogeny. Těmi nejčastějšími jsou *Paenibacillus larvae*, způsobující onemocnění mor včelího plodu, a *Melissococcus plutonius*, který dává vzniknout nákaze nazývané hniloba včelího plodu. Studie Forsgren et al. (2010) konstatovala, že fylotypy *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, bakterie mléčného kvašení (BMK), vykazují silné inhibiční účinky na růst *P. larvae* a mohou do jisté míry zabránit rozvoji příznaků onemocnění moru včelího plodu u infikovaných larev včel medonosných (Forsgren et al. 2010). Stejně tak i studie Burritt et al. (2016) potvrdila pozitivní účinky BMK proti *M. plutonius* (Burritt et al. 2016).

3.4.2 Faktory ovlivňující mikrobiotu včel

Stejně jako všechna zvířata má i včela medonosná různorodou komunitu mikroorganismů, označovanou jako mikrobiom. Ten je mnohdy zodpovědný za aktivitu včel, neboť právě symbiotické mikroorganismy jsou klíčovým faktorem ovlivňujícím zdraví hostitele (Engel et al. 2016). Zvláště střevní mikrobiota hraje důležitou roli v metabolismu, imunitní funkci, růstu a vývoji, ale také v ochraně proti nežádoucím patogenům (Raymann & Moran 2018). Avšak od roku 2006 zaznamenáváme, že kolonie včel medonosných trpí vysokou úmrtností. Zdá se, že zhoršení zdraví včel pramení z několika příčin, včetně chemických toxinů a špatné výživy, což může být důsledkem ztráty původního prostředí či stanoviště. Dalším klíčovým faktorem může být pohyb virových, bakteriálních a eukaryotických patogenů mezi jednotlivými zástupci rodu *Apis*, které u včel vyvolávají závažná onemocnění. (Kwong & Moran 2016).

3.4.2.1 Vliv prostředí a stanoviště

Nedávné ztráty včelích kolonií v celosvětovém měřítku vyžadují jak hlubší pochopení patogenních a vzájemných složek mikrobiálních společenstev tohoto ekologicky a ekonomicky důležitého opylovače, tak je i zapotřebí najít konkrétní souvislosti mezi prostředím a mikrobiální komunitou, která hraje důležitou roli ve zdraví včel. Nedávná studie Jones et al. (2018) prováděla pokusy na 36 včelích koloniích, které byly chovány ve dvou odlišných typech krajiny po dobu 6 týdnů. Prvním typem krajiny bylo pole řepky olejné (*Brassica napus*) a druhým typem byla krajina, která se nacházela v dostatečné vzdálenosti od zmíněné rostliny. Testovalo se tedy na krajinných typech, nikoliv mezi jednotlivými lokalitami. Střevní mikrobiota dospělých včel ze zkoumaných kolonií byla pak charakterizována a porovnáována na základě části sekvence genu 16S rRNA. Konkrétně bylo zjištěno, že některé taxony patřící k dominantním členům včelí střevní mikroflóry jsou rozdílně zastoupeny u včel, které byly odebrány z úlů v blízkosti polí s řepkou olejnou, a u včel, které k této plodině měly delší vzdálenost. Nižší podíl mikrobiálního zastoupení měl u dospělých včel osídlujících řepku olejnou zejména rod *Bartonella apis* ze skupiny bakterií Alfaproteobakterie. Tento druh má více jak 95% sekvenční podobnost rRNA s jinými druhy rodu *Bartonella*, které jsou skupinou savčích patogenů přenášených krevsajícími členovci (Kesnerova et al. 2016; Jones et al. 2018). Dále *B. apis* kóduje geny, které se mohou podílet na degradaci sekundárních rostlinných metabolitů (Segers et al. 2017). Oproti tomuto zjištění taxony řadící se do stejné třídy jako *B. apis* (Alfaproteobakterie) měly své zastoupení větší u včel na řepce než u včel ve velké vzdálenosti od ní. Stejně tomu tak bylo i se zástupcem *Alpha2.1*, který se vyskytuje převážně ve střevech dospělých včel, ale také v nektaru, pylu, materiálech tvořící úl a ve včelích larvách. Zastoupení *Alpha2.2* bylo nízké v celkovém společenstvu dělnic, neboť tato bakterie je specifická hlavně pro mladé úlové včely, které krmí plody mateří kašičkou. Tyto taxony také vykazují pozitivní vliv na přežití larev včel medonosných (Corby-Harris et al. 2014). Celkově tyto výsledky naznačují, že prostředí, kterému jsou včely vystaveny, včetně ekologických rozdílů mezi jednotlivými lokalitami, může ovlivnit jejich mikrobiální komunitu, zejména relativní hojnost některých klíčových taxonů. Zároveň tato studie uvádí, že budoucí laboratorní výzkumy jsou nezbytné pro pochopení toho, co konkrétně ovlivňuje tyto rozdíly (Jones et al. 2018).

3.4.2.2 Vliv stravy

Substráty střevních bakterií pocházejí převážně ze stravy hostitele. Proto složení a metabolická aktivita střevní mikroflóry je v první řadě ovlivněna příjmem potravy (Ley et al. 2008; Conlon & Bird 2015). Přenos mikrobů je usnadněn specializovanými sociálními kontakty mezi hostitelskými jednotlivci, což podporuje udržování mikrobiálních seskupení. Díky specializovanému chování, jako je přenos potravy mezi členy komunity, si včela zachovává svoji střevní mikrobiotu. Tyto úzké sociální kontakty pomáhají přenášet užitečné mikroby mezi členy včelích kolonií (Koch et al. 2013; Powell et al. 2014b). Společenský kontakt usnadní rozšiřování nejen prospěšných mikrobů, ale bohužel i těch patogenních (Engel et al. 2016). Po požití potravy včelou za účelem výživy následuje velice složitý proces trávení. K tomu, aby byla všechna přijatá potrava zpracována, je zapotřebí využití trávicích enzymů, které se obvykle tvoří ve střední části střeva a v mnoha případech jsou obsaženy i ve slinách. V hlavě se nacházejí hypofaryngeální žlázy, které jsou charakteristické pro rod *Apis*. Tyto specializované žlázy mají funkci sekreční a podílejí se na zpracování a distribuci výživy včelích kolonií. Vytváří například enzym β -glukosidázu, který usnadňuje přeměnu květového nektaru na med (Costa & Cruz-Landim 2005). Létavky (dospělé dělnice) shromažďují květový nektar jako hlavní zdroj sacharidů kolonie, kdežto pyl jim slouží jako zdroj rozmanitých sacharidů, aminokyselin, lipidů a vitaminů (Ricigliano et al. 2017).

Stejně jako u savců nebo termitů většinou substrátů zpracovávaných včelí mikroflórou jsou nestravitelné sloučeniny, které procházejí skrz trávicí trakt až do zadní části střeva, kde se nachází nejvíce bakterií. Takové sloučeniny zahrnují rostlinné metabolity z rozpadu pylu, jako jsou například ω -hydroxykyseliny, fenolamidy a flavonoidní glykosidy (Kesnerová et al. 2017). Pyl se nejprve tráví ve střední části střeva, konkrétně v žaludku, kde je hladina bakterií poměrně nízká (Cane & Roulston 2000). Zde hostitel vstřebává přístupné sloučeniny z pylu, jako jsou jednoduché sacharidy (glukóza nebo fruktóza) a aminokyseliny (Crailsheim 1990). Nestrávené pylové zbytky vstupují dále do zadní části střeva, kde je hustota bakterií daleko vyšší. Tyto bakterie se tak dostávají do styku například s nukleosidy, karboxylovými kyselinami (citrát, malát a fumarát) a aromatickými sloučeninami. Zadní konečník pak osídlují tři nejdůležitější druhy bakterií *Firm-5*, *Firm-4* a *Bifidobacterium asteroides*. Jedná se o bakterie, které metabolizují hlavní složky z pylové stravy, včetně flavonoidů, fenolamidů a ω -hydroxykyselin. Metabolická aktivita mikrobioty vede k akumulaci fermentačních produktů a meziproductů degradací aromatických sloučenin. Kromě toho se zdá, že střevní symbiont *Bifidobacterium asteroides* zvyšuje produkci několika hostitelských metabolitů, jako jsou deriváty mladistvých

hormonů a prostaglandinů, které mají klíčové funkce v imunitě a fyziologii včel (Kesnerova et al. 2017).

Včela medonosná přijímá stravu bohatou na sacharidy. Aby mohlo dojít k hydrolýze glykosidických vazeb těchto komplexních sloučenin, je včelí organismus navíc vybaven hypofaryngeálními žlázami, jejichž produkcí jsou enzymatické glykosidové hydrolázy (Takewaki et al. 1980; Nishimoto et al. 2001). Létavky mají na svých končetinách ochlupení, na které se jim zachycují po přeletu nad květy pylová zrna. Takto zachycený pyl si dospělé dělnice před vletem do úlu upraví tak, že k sesbíranému množství přidají obsah medného vaku a svých žláz a vytvoří tzv. pylové rousky. Pyl, který je takto upraven, vytváří konzervační prostředí s minimálním počtem bakterií. Navíc včely medonosné preferují konzumaci pouze čerstvě sesbíraného pylu (Anderson et al. 2014; Carroll et al. 2017). Glukóza a leucin, přední složky pylu, jsou absorbovány v předních dvou třetinách přední části střeva hostitele, což naznačuje, že zde probíhá konečná fáze trávení pylu. Na základě vědeckých analýz byly aktivní sacharidové enzymy kódovány včelí střevní mikroflórou a byly přiřazeny k bakteriálním kmenům *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Gammaproteobacteria* (Engel & Moran 2013). Metabolismus sacharidů střevní mikroflóry zahrnuje množství glykosidových hydroláz (β -glukosidáza a β -galaktosidáza), které mohou působit synergicky s hostiteli nebo s trávicími enzymy k uvolnění mono, di a oligosacharidů (Zheng et al. 2016). Například β -glukosidáza, která má pozitivní vztah s hladinami enzymů β -xylosidáza, β -fukosidáza a β -arabinosidáza, je zásadně produkována hypofaryngeálními žlázami a během krmení se vylučuje do úst, odkud je následně s potravou přemístěna až do střední části střeva. Tyto výsledky naznačují, že včelí β -glukosidáza rozštěpí další koncové monosacharidy, včetně xylózy, fukózy a arabinózy, které jsou toxické pro včely medonosné (Ricigliano et al. 2017). Kromě trávení sacharidů mohou jmenované enzymy hydrolyzovat i β -lykosidy. Rostlinné fenolické glykosidy jsou převážně potravinové složky obsahující glukózu, galaktózu, xylózu, arabinózu a zbytky manózy (Pyrzyska & Biesaga 2009). Střevní mikrobiom může být považována za samostatný orgán s vlastním metabolismem, schopným zpracovávat nestravitelné potraviny a produkovat látky, které prospívají hostiteli. Je možné, že synergismus mezi hostitelskými a mikrobiálními sacharolytickými procesy může získat energii z jinak nestravitelných nebo toxických sacharidů ve formě bakteriálních fermentačních produktů, jako jsou mastné kyseliny s krátkými řetězci. Taková funkce může být významná během zimního období, kdy nestrávený pyl zůstává v konečníku po mnoho měsíců (Ricigliano et al. 2017).

Střevní bakterie také tvarují fyzikálně–chemické podmínky ve střevě, snižují pH a hladinu kyslíku. Periferní rezidentní bakterie díky spotřebě kyslíku vytvářejí anoxické

prostředí (bez kyslíku), které je nezbytně nutné pro mikrobiální aktivitu. Kromě toho střevní bakterie produkují mastné kyseliny s krátkými řetězci, přičemž hlavními metabolity jsou acetát, laktát, sukcinát a propionát, stejně jako ve střevech člověka a jiných zvířat (Zheng et al. 2017). Aktivní fermentací těchto kyselin dochází k poklesu pH. Zvláště v tenkém střevu a v konečniku, kde se hromadí nejvíce bakterií, jsou hodnoty pH nejnižší (Besten et al. 2013). Studie Zheng et al. (2017) zkoumala jednotlivé složení metabolitů vzniklých fermentací mastných kyselin s krátkými řetězci a zjistila, že v tenkém střevu a v konečniku je převládajícím fermentačním produktem acetát, který stejně tak převládá i v lidském střevu (Zheng et al. 2017). Prokázalo se, že acetát zvyšuje funkci střevní epiteliální bariéry (Fukuda et al. 2011). V tenkém střevu byl zaznamenán i nálezy kyseliny galakturonové, což je hlavní složka pektinu. Tento nálezy naznačuje, že pomocí střevních bakterií dochází k degradaci tohoto polysacharidu a potvrzuje se tak přítomnost genů kódujících enzymy, které se zaměřují na polysacharidy pylových stěn (Engel et al. 2012; Zheng et al. 2017). Vysoká konzistence ve střevní mikrobiotě naznačuje, že existuje vzájemný vztah mezi hostitelem a alespoň některými druhy mikrobiální komunity. Studie Kakumanu et al. (2016) potvrdila, že střevní mikrobiota má užitečnou roli ve výživě a trávení (Kakumanu et al. 2016).

3.4.2.3 Vliv chemických látek

Během posledních několika desetiletí byl zaznamenán výrazný pokles včel a jejich kolonií. K tomuto poklesu přispívá mnoho faktorů, avšak největší hrozba je přisuzována patogenům a chemickým látkám, kterými jsou zejména pesticidy (Kakumanu et al. 2016). Do skupiny pesticidů se řadí i speciální skupina neonikotinoidů. Tyto látky se používají od počátku 90. let a jsou nyní nejrozšířenější třídou insekticidů na světě. Univerzální neurotoxikační látky se nejčastěji používají pro ochranu mladých rostlin proti bylinožravému hmyzu. V pylu a nektaru ošetřených plodin se však mohou objevit detekovatelné zbytky těchto látek, které mohou mít pro opylovače subletální účinky (Balfour et al. 2017). Masová úmrtnost medonosných včel nastala ve Francii v 90. letech 20. stol., kdy došlo k zavedení dvou zemědělských insekticidů: imidaklopridu a fipronilu. Imidakloprid je neonikotinoidní pesticid, který narušuje nervový systém hmyzu tím, že působí na receptory nikotinového acetylcholinu. Fipronil je insekticid na bázi fenylyl-pyrazolu, který působí na receptory kyseliny gama-aminomáselné (GABA) (Matsuda et al. 2001; Law & Lightstone 2008). Ze studie Holder et al. (2018) však vyplývá, že imidakloprid není schopen způsobit masovou úmrtnost včel, neboť neonikotinoidní zbytky, které se zachytí v nektaru a pylu včel, představují pouze stopové množství, které nepřináší takovou hrozbu. Oproti tomu účinky fipronilu jsou vážné, neboť

právě tato látka je jednou z největších příčin masového vymírání včel (Holder et al. 2018).

Vedle možných přímo působících faktorů na včely mohou i nepřímé účinky pesticidů způsobovat změnu základních střevních mikrobiálních komunit a symbiontů, které jsou důležité pro zdraví včel medonosných (např. imunitní systém). Primárním cílem studie Kakumanu et al. (2016) bylo zjistit změnu střevní mikroflóry u včel vystavených běžně používaným pesticidům: kumafos, tau-fluvalinát a chlorothalonil. Celkově byly *Firmicutes*, *Actinobacteria* a *Proteobacteria* dominantními bakteriálními kmeny včel medonosných. Přítomny byly zejména bakterie patřící k čeledi *Lactobacillaceae*, *Bifidobacteriaceae* a ke třídě *Gammaproteobacteria*. Výsledky této studie naznačují, že pesticidy, jako je chlorothalonil, mají potenciál měnit střevní mikroflóru a její funkci. S použitím pesticidů byl zaznamenán relativní úbytek několika taxonů. Například u kolonií, kterým byla aplikovaná dávka pesticidu chlorothalonilu, byl pozorován pokles čeledi *Lactobacillaceae* ve srovnání s koloniemi, které nepřišly do kontaktu s chemickou látkou. Naopak čeledi *Enterobacteriaceae* a *Caulobacteraceae* vykazovaly relativní zvýšení související s chlorothalonilem ve srovnání s pesticidem tau-fluvalinátem (Kakumanu et al. 2016). Změny ve struktuře bakteriální komunity mohou měnit expresi genu a fungování komunity, a tak mohou mít následky na činnost, fyziologii a chování včel medonosných (Engel & Moran 2013). Chlorothalonil byl dříve znám jako běžně používaný fungicid v úlech a včelstvech (Zhu et al. 2014). Včely, které byly krmeny pylem obsahujícím chlorothalonil, se jevily trojnásobně náchylnějšími k infekci *Nosema* (Pettis et al. 2012).

Problémy se škůdci a chorobami majícími negativní dopad na včely dovedly včelaře k používání akaricidů (pesticidy, určené k hubení roztočů), jako jsou kumafos (organofosfát) a tau-fluvalinát (pyrethroid) spolu s několika léky (Johnson et al. 2013). Studie Mullin et al. (2010) identifikovala několik reziduí pesticidů aplikovaných včelaři i pěstiteli do včelích úlů (Mullin et al. 2010). Je tedy nutné určit potenciální vliv těchto běžně používaných chemických látek na včely a související střevní symbionty a vysvětlit otázku, zda opravdu mají nežádoucí vedlejší účinky na včelí kolonie (Johnson et al. 2010). Včely medonosné, včetně svých bakteriálních symbiontů, jsou rovněž vystaveny pesticidům, aplikovaným na zemědělské půdy. Tato studie prováděla pokusy na polích s řepkou olejnou, která byla zasetá v zimě. V zimě dochází k největšímu znečištění vod, proto tato studie dospěla k závěru, že pole s řepkou olejnou obsahují více pesticidů, oproti jiným studiím, které se zaměřují na podobnou tematiku (Kakumanu et al. 2016). Dokonce i studie Balfour et al. (2017) ukázala, že i nízké koncentrace neonikotinoidů mají negativní dopad ovlivňující kontaminaci pylu, medu a přírůstek hmotnosti kolonie (Balfour et al. 2017). Vystavení pesticidům se ukázalo být smrtelné dokonce i při

nízkých dávkách, může to totiž vést k paralýze, respiračnímu selhání a úmrtnosti cílových (např. roztočů) i necílových (např. včel medonosných) jedinců. Pesticidy mohou rovněž snížit imunokompetenci medonosných včel, což ovlivňuje celkové zdraví kolonie (Frost et al. 2013; Johnson et al. 2010; Staveley et al. 2014).

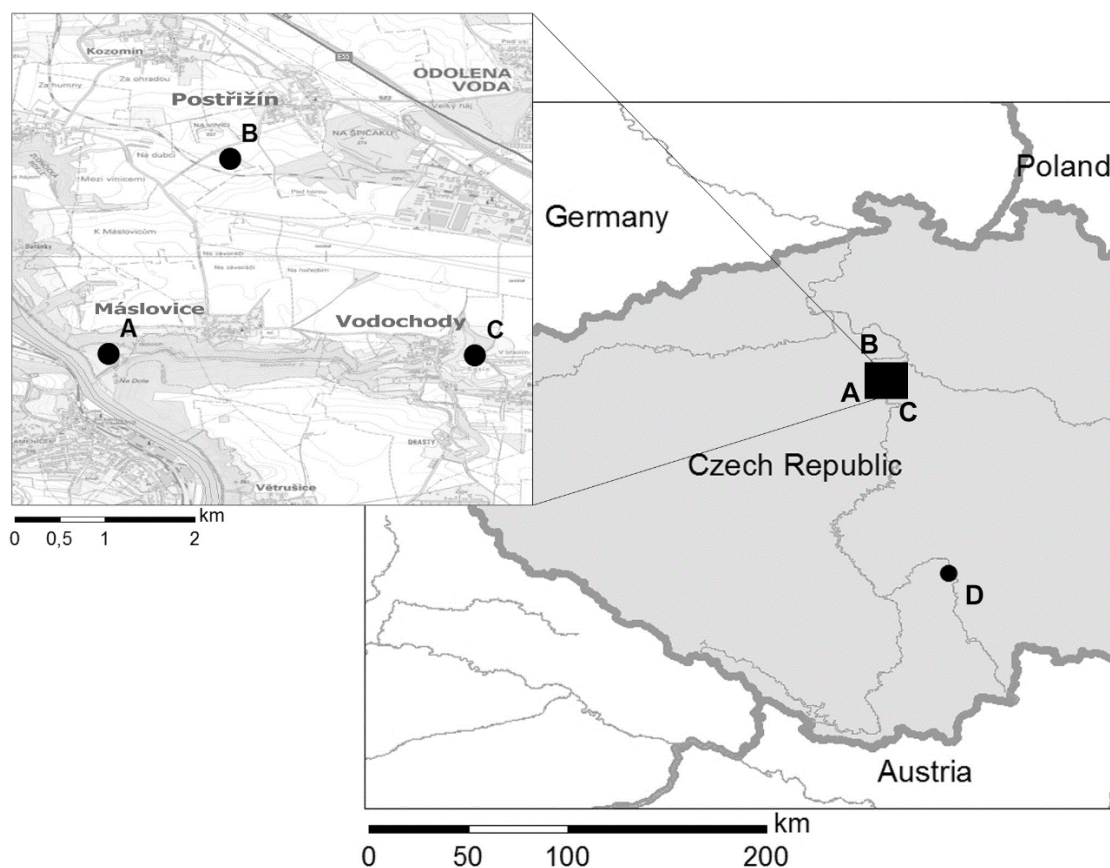
Závažnost působících neonikotinoidů je řešena i Evropskou unií. Ta už v roce 2013 částečně zakázala použití zejména tří účinných látek na ochranu rostlin: klothianidiu, thiamethoxam a imidakloprid, které napadají nervový systém hmyzu. Od minulého roku, po zveřejnění v Úředním věstníku EU, kdy proběhlo hlasování všech členských zemí, jsou tyto tři pesticidy zakázány úplně. Účinná látka fipronil byla v loňském roce též přezkoumána, neboť společnost BASF Agro BV zažádala o zrušení prováděcího nařízení Komise (EU) č. 781/2013 ze dne 14. srpna 2013, kterým se zakazuje použití a prodej osiva ošetřeného přípravky na ochranu rostlin obsahujícími uvedenou účinnou látku (Úř. věst. 2013, L 219, s. 22). Rozhodnutí dopadlo bohužel ve prospěch společnosti BASF, avšak hlavním důvodem byl špatný postup Evropské komise.

4 Materiál a metody

Vzorky včel byly odebrány v měsíčních časových intervalech v rámci jednoho roku ze čtyř lokalit České republiky. Na jejich zpracování byly následně použity dvě molekulárně genetické metody. Vybrané bakteriální skupiny byly kvantifikovány pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qRT-PCR) a pro identifikaci bakteriálního spektra byla použita elektroforéza v gradientovém denaturačním gelu (DGGE). Následně byla data statisticky vyhodnocena.

4.1 Příprava vzorků

Během jednoho roku (2/2013-2/2014) byly každý měsíc odebrány včely medonosné (*Apis mellifera*) ve třech opakováních (tři úly) ze čtyř lokalit České republiky. Třemi lokalitami ležícími ve Středočeském kraji byly: Dol (50°12'22" s. š., 14°22'2" v. d.), Postřizín (50°13'59" s. š., 14°23'12" v. d.) a Hoštice (50°12'8" s. š., 14°24'24" v. d.). Čtvrtým místem, kde se prováděl odběr včel, bylo město Ústrašice (49°20'25" s. š., 14°41'4" v. d.), nacházející se v Jihočeském kraji (Obr. 11).



Obrázek 11: Mapa znázorňující původ vzorků včel (Hroncova et al. 2015).

Příprava jednoho smíšeného vzorku spočívala v pitvě 10 odebraných včel, ze kterých se získaly celé trávicí trakty (medný váček, žaludek, vrátník, tenké střevo, výkalový vak), které byly následně rozrušeny, a do připravené kolony obsahující homogenizující sterilní kuličky byl navážen vzorek v množství 100–150 mg.

Z každé lokality bylo z celkového množství včel získáno 41 fekálních vzorků, tj. celkem ze čtyř lokalit 164 vzorků.

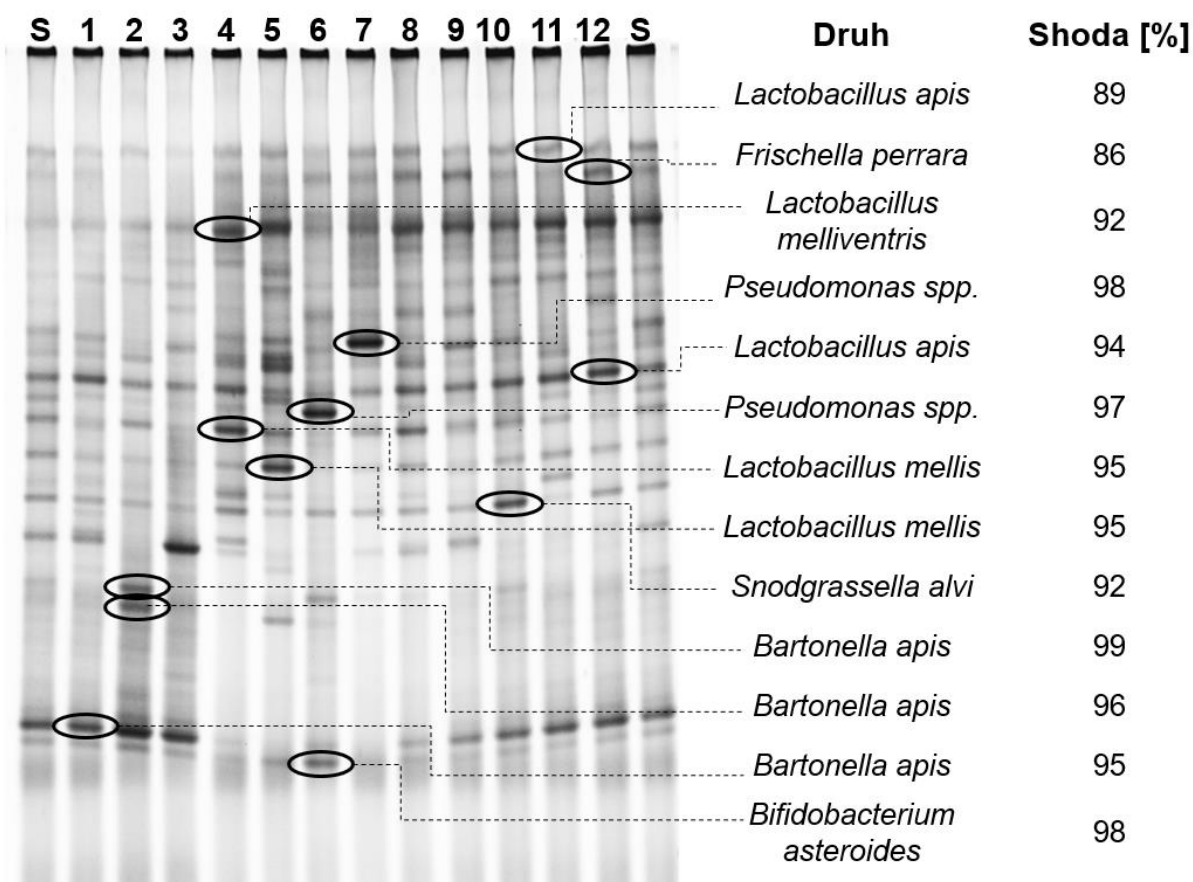
4.2 Izolace DNA

K izolaci veškeré bakteriální DNA ze vzorků trávicího traktu včel byl použit ZR Fecal DNA MiniPrep kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA). Izolace proběhla dle protokolu výrobce. Vzorky byly nadávkovány na kolonu a následně lyzovány pomocí pufru a homogenizujících sterilních kuliček bez přídavku organických denaturantů a proteináz. Poté byla DNA izolována a purifikována prostřednictvím Fast–Spin kolony.

4.3 Elektroforéza v gradientovém denaturačním gelu (DGGE)

Pro analýzu bylo použitých 12 vzorků, kde jeden je směsí trávicích traktů včel odebraných ze všech stanovišť v jednom měsíci.

Pomocí univerzálních bakteriálních primerů 338GC (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCG CCG CCG CAC TCC TAC GGG AGG GAG GAG- 3') a RP534 (5'-AAT ACC GCG GCT GCT GG- 3') amplifikujících variabilní oblast genu pro 16S rRNA (200bp), byla namnožena bakteriální DNA dle PCR programu s následujícími kroky: denaturace (5 min 95 °C), 34 cyklů (30 s 95 °C, 20 s 61 °C, 40 s 72 °C) a finální elongace (5 min 72 °C) (Muyzer et al. 1993). Pro kontrolu byla zařazena agarozová elektroforéza (30 min 100 V) s 1,5% agarem. Poté následovala analýza PCR produktů pomocí elektroforézy v gradientovém denaturačním gelu (DGGE) s denaturační silou v rozmezí 35–60 % podle Mrázek et al. (2008). Pro minimalizování chyb při srovnávání dvou gelů byl po stranách gelu umístěn standard, obsahující směs PCR produktů. DGGE gely byly zpracovány v BioNumerics 6.6 software (AppliedMaths, Sint-Martens-Latem, Belgium) s nastavením dle Hroncova et al. (2015). Následně byly vytipovány bandy zájmu (Obr. 12), které byly sterilním skalpelem z polyakrylamidového gelu vyříznuty. V dalších krocích bylo postupováno dle Konopaskova (2017), kde bylo použito 5 µl roztoku pro amplifikaci a následnou identifikaci bakteriálních druhů použitím primerů FP341 a RP534 dle PCR programu.



Obrázek 11: Polyakrylamidový gel zobrazující 12 směsných vzorků trávicích traktů včel se standardy (S) umístěnými po stranách gelu. Jeden vzorek je směsí vzorků odebraných ze všech stanovišť v jednom měsíci (1–leden, 2–únor,...). Zakroužkované jsou vyřezané bandy zájmu s nejvyšší možnou shodou 16S rRNA (%) s V3 regionem bakteriálních druhů v databázi GenBank.

Konečné PCR produkty byly přečištěny pomocí QIAquick PCR Purification Kitu (Qiagen) dle pokynů výrobce. Připravené vzorky byly na závěr poslány na komerční sekvenování (SeqMe). Výsledné sekvence byly porovnány s V3 regionem bakteriálních druhů v databázi GenBank (NCBI) použitím BLAST algoritmu a následně byly bakteriální druhy identifikovány.

4.4 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qRT–PCR)

Kvantifikace vybraných bakteriálních skupin (*Gammaproteobacteria*, *Firmicutes* a *Actinobacteria*) ve všech 164 vzorcích proběhla pomocí mx3005 termocykleru (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Pro všechny zmíněné bakteriální kmeny byly použity specifické primery (Tab. 3) (de Gregoris et al. 2011).

Tabulka 3: Použité specifické primerové páry (de Gregoris et al. 2011).

Cílová skupina	Název	Sekvence
<i>Gammaproteobacteria</i>	1080 γ F	TCGTCAGCTCGTGTYGTGA
	γ 1202R	CGTAAGGGCCATGATG
<i>Firmicutes</i>	928F–Firm	TGAAACTYAAAGGAATTGACG
	1040FirmR	ACCATGCACCACCTGTC
<i>Actinobacteria</i>	Act920F3	TACGGCCGCAAGGCTA
	Act1200R	TCRTCCCCACCTTCCTCCG

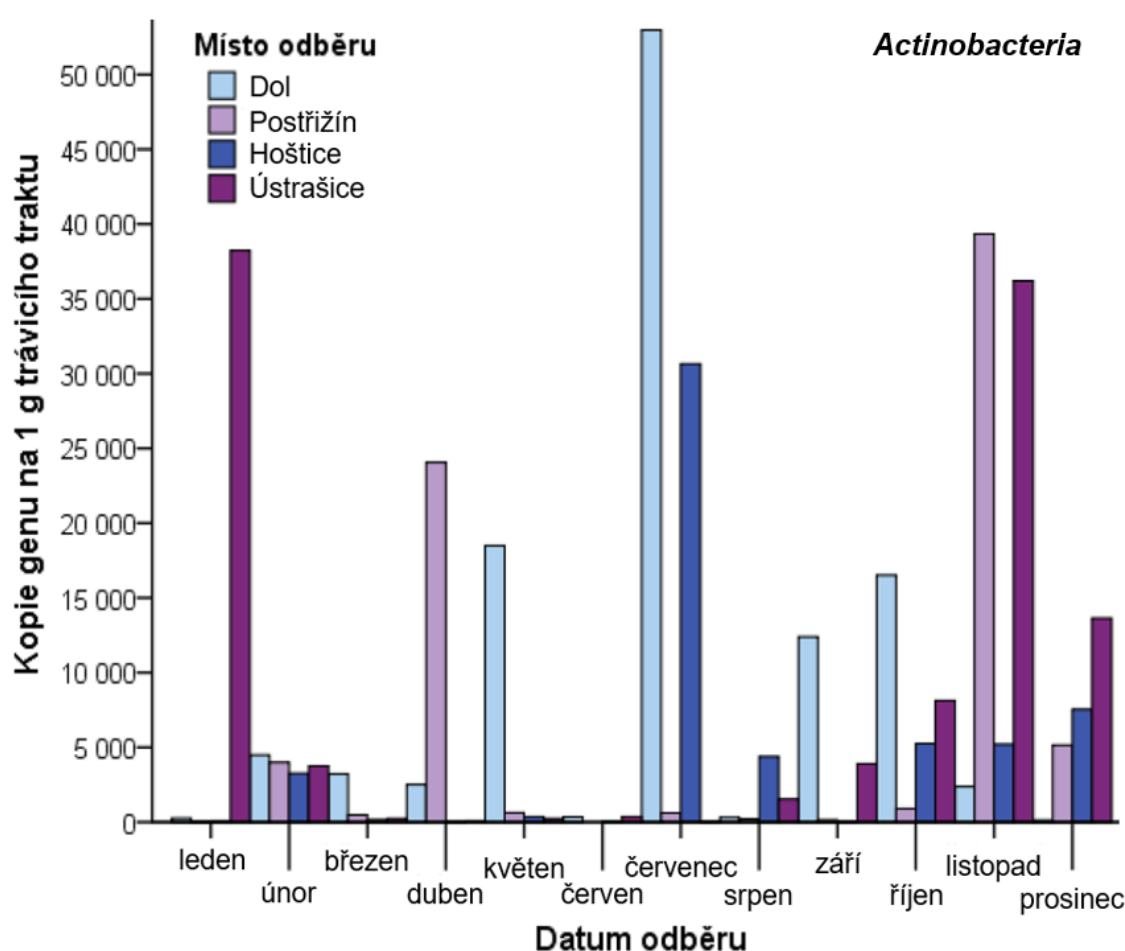
4.5 Statistická analýza

Data byla statisticky vyhodnocena pomocí IBM SPSS Statistics 24 (IBM, Armonk, NY, USA). Pomocí stejného programu byla data graficky zobrazena a byly sestrojeny sloupcové a krabicové grafy tzv. boxploty, které zobrazují množství (kopie 16S rRNA genu na gram trávicího traktu včely) vybraných skupin bakterií v trávicím traktu včely medonosné odebíraných v pravidelných měsíčních intervalech.

5 Výsledky

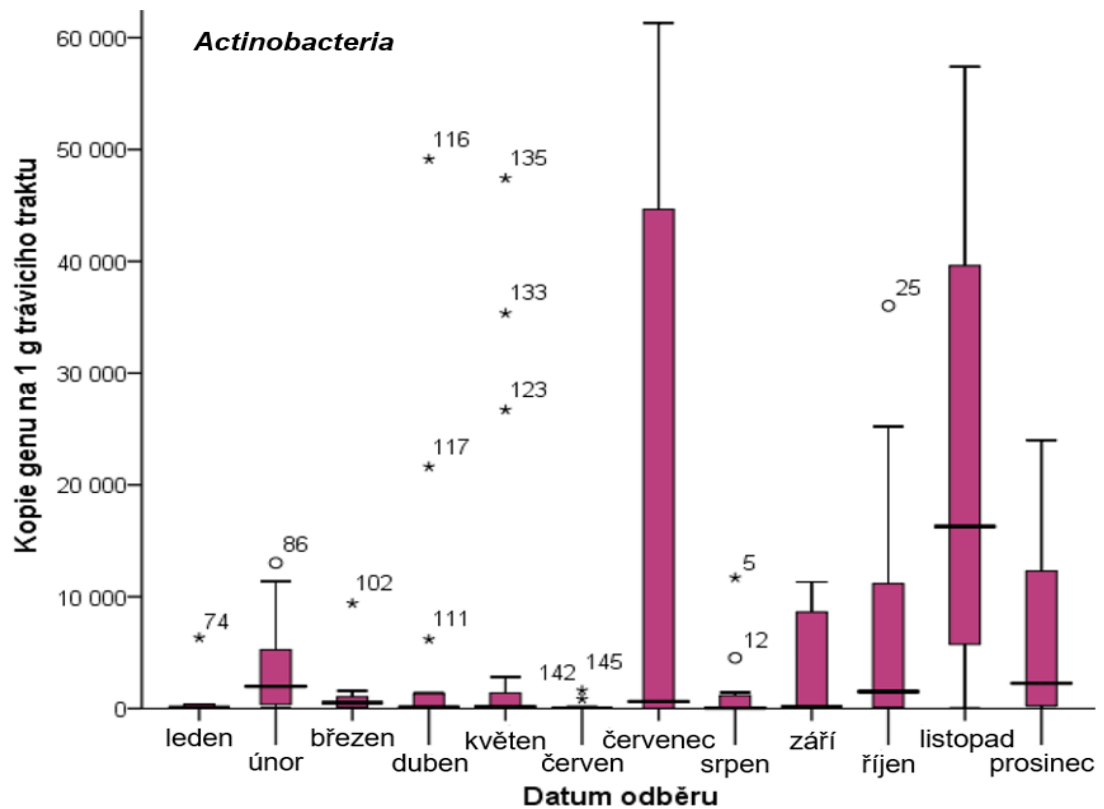
Cílem této diplomové práce bylo porovnat krátkodobě a dlouhodobě žijící včely pocházející ze stejného stanoviště na základě identifikace bakteriálního spektra a kvantifikace vybraných skupin bakterií. Včely byly získány v měsíčních intervalech během jednoho roku ze čtyř lokalit České republiky (Dol, Postřižín, Hoštice a Ústrašice). Ve vzorcích byli identifikováni tři zástupci proteobakterií (*Frischella perrara*, *Snodgrassella alvi* a *Bartonella apis*), tři druhy laktobacilů (*L. apis*, *L. melliventris* a *L. mellis*), jeden představitel aktinobakterií (*Bifidobacterium asteroides*) a *Pseudomonas spp.* Kvantifikovány byly *Actinobacteria*, *Gammaproteobacteria* a *Firmicutes*.

Mezi vybranými bakteriálními skupinami představovaly aktinobakterie svým obsahem v jednotlivých měsících a lokalitách nejméně hojnou skupinu, která byla v závislosti na odběrovém místě velice variabilní (Obr. 13). Nejvyšší nález aktinobakterií byl v Dole. V červenci byl obsah vyšší 50 000 kopií genu na 1 g trávicího traktu, následovaly měsíce květen a září. Postřižín dosáhl vyšších hodnot pouze v dubnu a listopadu, neboť v ostatních měsících byl obsah aktinobakterií pro tuto lokalitu minimální. Například v lednu, březnu, květnu, červnu, červenci, srpnu a září byl jejich obsah velice blízký k nule. Hoštice nedosahovaly v žádném z měsíců nejvyšší obsah. Ústrašice byly dominantní v lednu a prosinci.



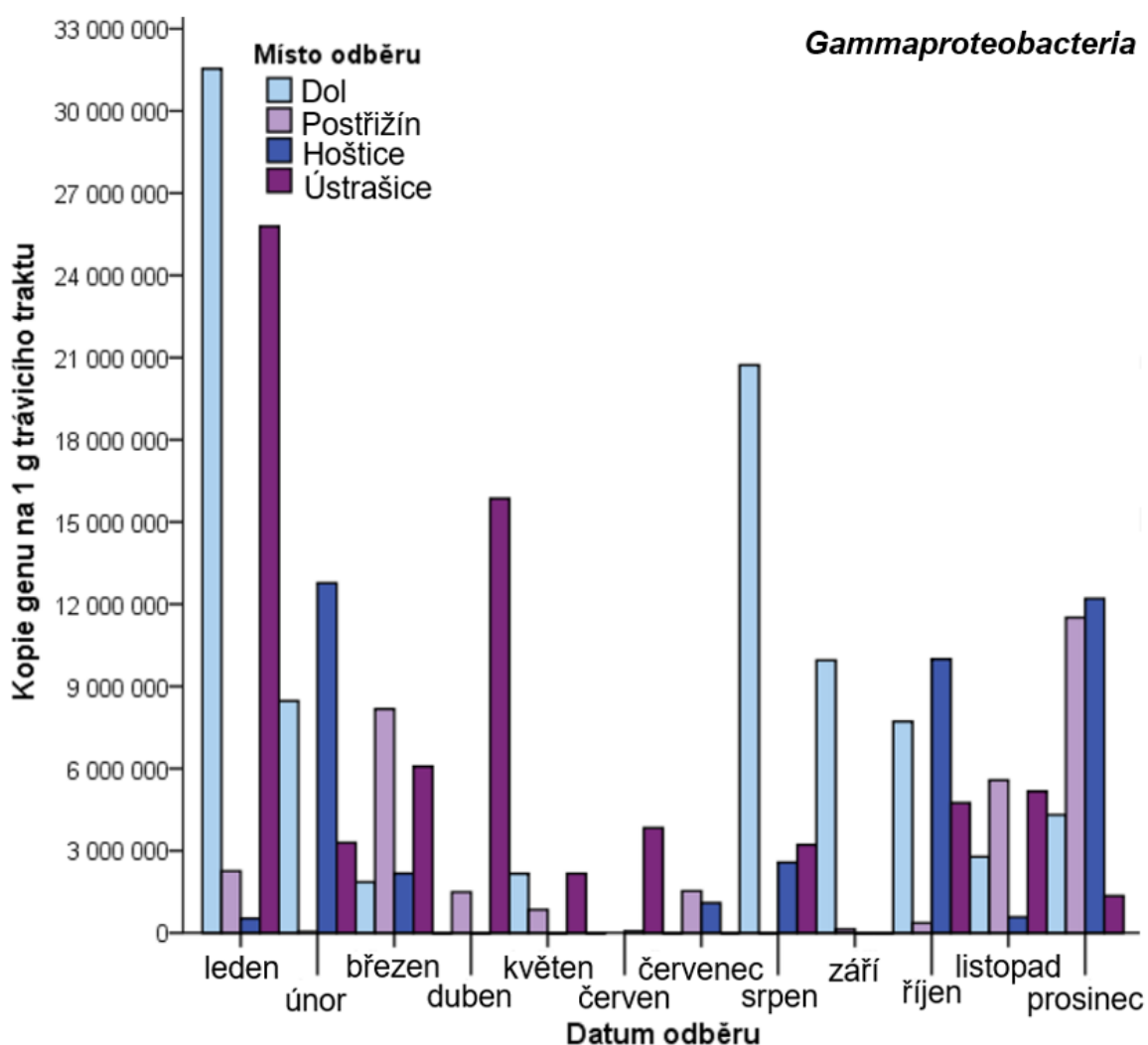
Obrázek 13: Boxplot (krabicový graf) zobrazuje množství (kopie 16S rRNA genu na gram trávicího traktu) aktinobakterií v trávicím traktu včely medonosné odebíraných v pravidelných měsíčních intervalech ve čtyřech českých lokalitách.

Obsah celkových aktinobakterií nezávisle na geografickém umístění se v rámci měsíců lišil (Obr. 14). Aktinobakterie se nejvíce vyskytovaly v červenci a listopadu, kdy byla zároveň i nejvyšší variabilita v jejich množství. Oproti tomu v měsících lednu a červnu byl jejich výskyt minimální. Téměř ve všech měsících, kromě února, října, listopadu a prosince, dosahoval medián nízké úrovně pohybující se kolem nuly.



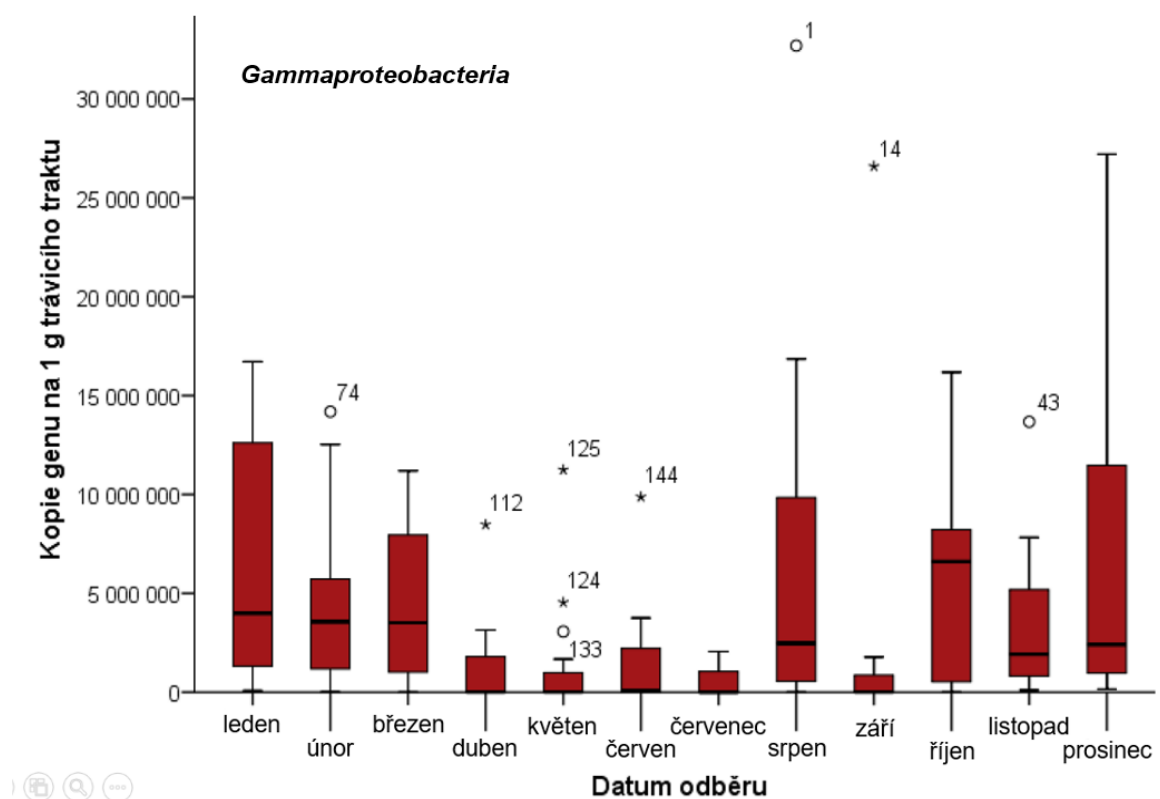
Obrázek 14: Boxplot (krabicový graf) zobrazuje množství (kopie 16S rRNA genu na gram trávicího traktu) aktinobakterií v trávicím traktu včely medonosné odebíraných v pravidelných měsíčních intervalech.

Bakteriální skupina *Gammaproteobacteria* (Obr. 15) byla v některých regionech dominantní, v jiných minoritní nebo nedošlo k její kvantifikaci vůbec. Při identifikaci bakterií bylo zjištěno, že nejvyšších hodnot dosahovala lokalita Dol v lednu, srpnu a září. V květnu byly výsledky shodné s Ústrašicemi. Postřižín dominoval v březnu, červenci a také v listopadu. U Hoštic byl největší nález v únoru a poté až v říjnu a v prosinci. Ústrašice převládaly svým množstvím zjištěných gammaproteobakterií v dubnu a červnu.



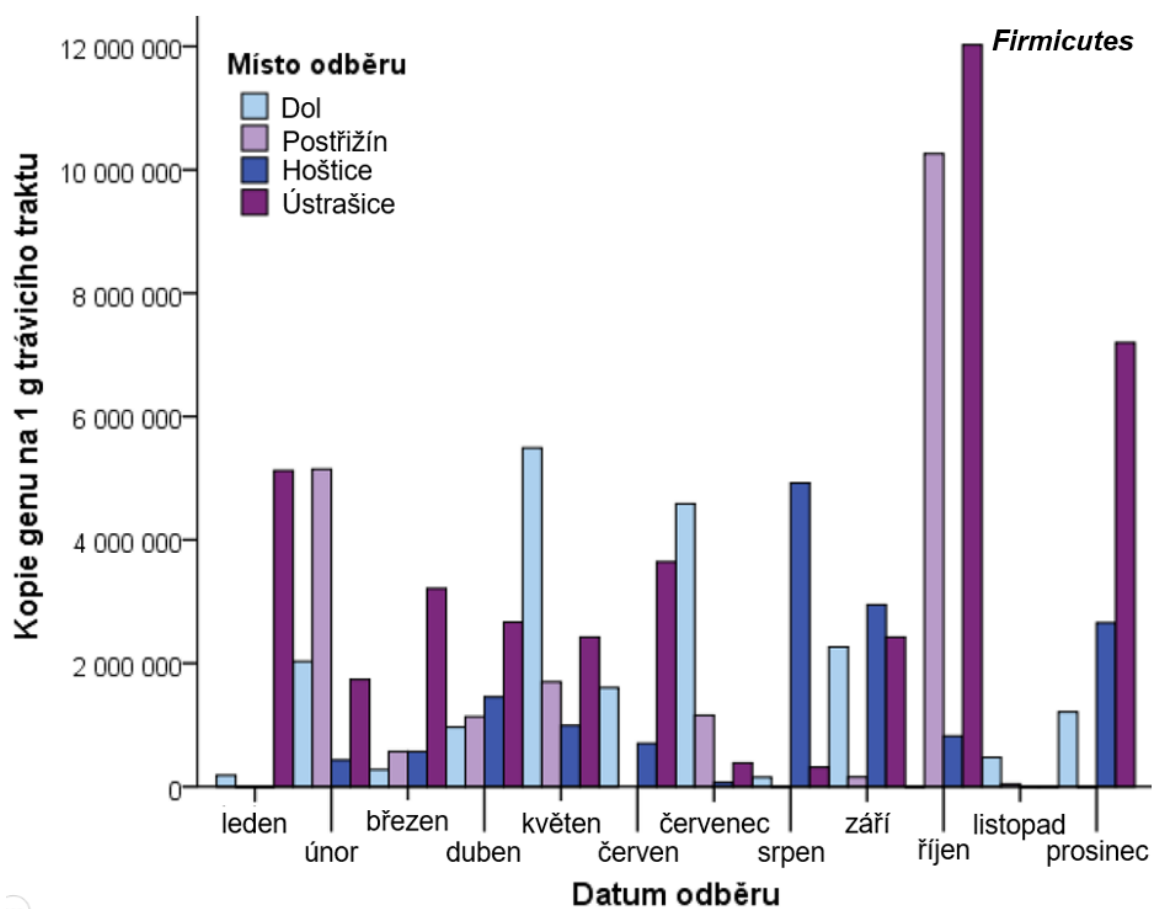
Obrázek 15: Boxplot (krabicový graf) zobrazuje množství (kopie 16S rRNA genu na gram trávicího traktu) gammaproteobakterií v trávicím traktu včely medonosné odebíraných v pravidelných měsíčních intervalech ve čtyřech českých lokalitách.

Bez závislosti na místech odběru tvořily gammaproteobakterie (Obr. 16) v měsících lednu, srpnu i říjnu velice podobné množství pohybující se kolem 17 000 000 kopií genu na 1 g trávicího traktu. Tato množství se stala zároveň druhými nejvyššími, jež byla překročena pouze v prosinci, který dosahoval téměř 27 000 000 kopií genu na 1 g trávicího traktu. U všech čtyř zmíněných měsíců byla celkově i vysoká variabilita. Střední zastoupení této bakterie bylo v měsících únoru, o něco větší v březnu a srovnatelné v listopadu. Nejmenší počet zjištěných gammaproteobakterií byl v květnu, červenci a září. V dubnu, květnu, červnu, červenci a září dosahoval medián velmi nízké úrovně blízké nule. Největší rozdíl mezi vzorky byl v prosinci.



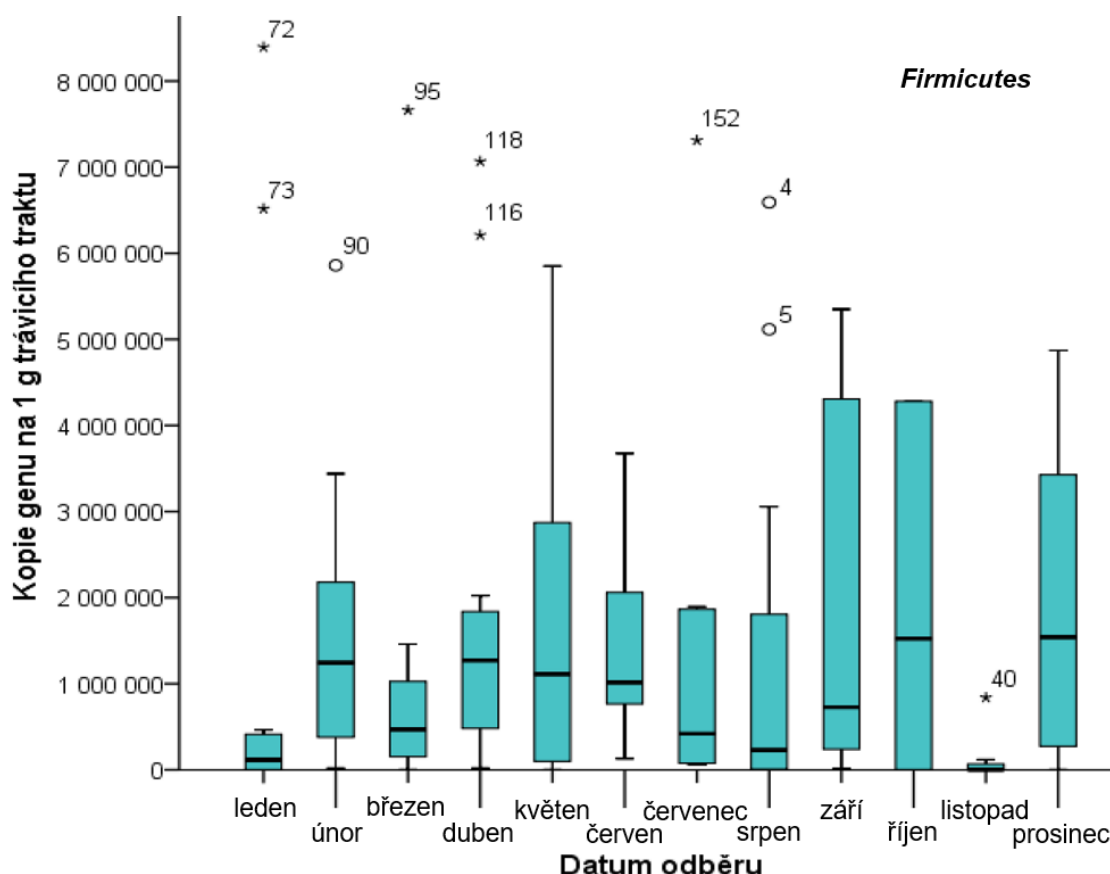
Obrázek 16: Boxplot (krabicový graf) zobrazuje množství (kopie 16S rRNA genu na gram trávicího traktu) gammaproteobakterií v trávicím traktu včely medonosné odebíraných v pravidelných měsíčních intervalech.

Bakterie druhu *Firmicutes* tvořily v trávicím traktu další hojnou skupinu (Obr. 17). Nejvyšší množství bylo zjištěno v Ústrašicích v říjnu, kdy bylo naměřeno 12 000 000 kopií genu na 1 g trávicího traktu. Ústrašice převládaly dále v lednu, březnu, dubnu, červnu a prosinci. Postřižín byl hned po Ústrašicích nejvíce dominantní v měsíci říjnu a poté v únoru, kdy sice převyšoval ostatní odběrová místa, ale svým množstvím tvořil zhruba o polovinu menší hodnotu než v říjnu. Dalším odběrovým místem byl Dol, který dosáhl nejvyšších hodnot v listopadu, květnu a červenci. Hoštice převládaly v srpnu a září.



Obrázek 17: Boxplot (krabicový graf) zobrazuje množství (kopie 16S rRNA genu na gram trávicího traktu) firmikutů v trávicím traktu včely medonosné odebíraných v pravidelných měsíčních intervalech ve čtyřech českých lokalitách.

Třetí skupinu bakterií tvořily firmikuty (Obr. 18), které maximálním zastoupením představovaly 6 000 000 kopií genu na 1 g trávicího traktu. Toho množství bylo dosaženo v květnu. Dalšími v pořadí byly měsíce září, prosinec a říjen. Nejméně byly firmikuty kvalifikovány v listopadu, kde se jejich obsah blížil k nule.



Obrázek 18: Boxplot (krabicový graf) zobrazuje množství (kopie 16S rRNA genu na gram trávicího traktu) firmikutů v trávicím traktu včely medonosné odebíraných v pravidelných měsíčních intervalech.

Zjištěná kvantifikace vybraných bakteriálních skupin byla během celého roku ze všech odběrových míst velice variabilní. Nejméně hojnou skupinu tvořil bakteriální druh aktinobakterií, naopak největší množství bylo v zastoupení gammaproteobakterií.

6 Diskuze

Bakteriální spektrum ve vzorcích trávicího traktu včely medonosné bylo variabilní a rozsáhlé. Celkový obsah kopií genu na 1 g trávicího traktu v jednom případě přesahoval hodnotu 30 000 000. Střevní mikrobiota, která byla pro tuto práci identifikována z trávicího traktu testovaných včel odebraných v pravidelných měsíčních intervalech během celého roku ze 4 geografických lokalit, se skládala ze stejných druhů hlavních bakterií. Tyto bakterie byly dříve popsány jako typické složky střevního mikrobiomu (Engel et al. 2013a; Kwong & Moran 2016). Je pozoruhodné, že tato specifická bakteriální komunita je zachována mezi populacemi včel na různých kontinentech a v různých klimatických podmínkách (D'Alvise et al. 2018).

Jak už bylo popsáno v literární rešerši, střevní mikrobiom je složen z devíti základních skupin bakterií. Mezi těmito druhy však tři skupiny zcela dominují. Jedná se o kmeny *Gammaproteobacteria*, *Firmicutes* a *Actinobacteria* (Lee et al. 2015). Tato dominanta byla důvodem pro výběr bakteriálních skupin, které byly kvantifikovány metodou qPCR.

Z výsledků můžeme konstatovat, že nejhojnější skupinu bakterií tvořily v každém měsíci v závislosti na ročním období gammaproteobakterie. Nejvíce zástupců této skupiny bakterií bylo nalezeno v prosinci, kdy počet dosahoval téměř 27 000 000 kopií genu na 1 g trávicího traktu, a následně v lednu. Poté se počet postupně snižoval, během období od května do července bylo jejich množství minimální. V srpnu nastal zlom a naměřené množství bylo podobné jako v zimních měsících, okolo 17 000 000 kopií na 1 g trávicího traktu. Podle těchto výsledků je výrazné, že gammaproteobakterie převládaly více u zimních včel. Jedná se o skupinu bakterií složenou ze dvou významných zástupců. Jedním z nich je *Frischella perrara*, která byla díky provedené analýze DGGE z našich vzorků trávicích traktů včel identifikována. Tato bakterie byla izolována ze včel, avšak není zařazována do hlavního jádra střevních bakterií, neboť u některých včel může chybět (Engel et al. 2013b). Pokud se však ve střevní mikrobiotě objeví, získává tím včela zvýšenou imunitní funkci. Jedná se totiž o bakteriální druh, který kolonizuje vymezenou část ve střevě. Řeč je o vrátníku, který tvoří hranici mezi žaludkem a tenkým střevem v těsné blízkosti Malpighických trubic (Goncalves et al. 2017). Zde vytváří tzv. fenotypový „strup“, tenký, tmavě zbarvený pruh, jenž je výsledkem melanizační reakce hostitele. Podle studie Emery et al. (2017) považujeme bakterii *F. perrara* za včelího symbionta způsobujícího silnou imunitní aktivaci, která může být důležitá pro zdraví včel (Emery et al. 2017). Druhým představitelem této skupiny je *Gilliamela apicola*. V našich vzorcích nebyl tento druh bakterie bohužel identifikován, přesto se jedná o numericky dominantní střevní druh, který je schopen degradovat a zpracovávat různé sacharidy, jako je například pektin vyskytující

se ve stěnách pylových buněk (Kwong et al. 2014; Moran 2015). Kromě toho je tento druh bakterie také schopen degradace monosacharidových jednotek, které by jinak byly pro včelu toxické (Zheng et al. 2016).

Další kvantifikovanou skupinou byly *Firmicutes*, představující obsáhlou řadu střevních bakterií. Tento kmen se zařazuje mezi 5 hlavních skupin tvořících střevní mikrobiotu včely. Ze zjištěných výsledků tvořily firmikuty celkem stabilní skupinu ve všech měsících. Nejhojnějšího počtu dosahovaly v květnu a září. Výjimku tvořily pouze v lednu, kdy byl jejich počet menší než 1 000 000 a v listopadu, kdy se množství blížilo spíše nule. Tyto odchylky mohly vzniknout chybným měřením. Dotyčná skupina je složena z *Lactobacillus spp.* a pro včelu je velice důležitá, neboť její zástupci se řadí do velké skupiny bakterií mléčného kvašení. Sem je zařazeno celkem 13 druhů bakterií, které mají v trávicím traktu včely probiotické účinky (Piccart et al. 2016). Pozitivní účinek zmíněné bakteriální komunity byl prokázán například u včelích larev při inhibici bakterií *Paenibacillus larvae*, který způsobuje onemocnění zvané mor včelího plodu (Forsgren et al. 2010; Vasquez et al. 2012). Ve studii Baffoni et al. (2016) bylo po experimentálním provedení zjištěno, že s výskytem těchto bakterií se snižuje hladina *Nosema ceranae*. Jedná se o houbový kmen *Microsporidia*, intracelulárních jednobuněčných parazitů tvořící spory, kterými způsobují střevní onemocnění včel (Baffoni et al. 2016). Účinek firmikutů je zřejmě způsoben kyselinou mléčnou, kterou laktobacily vytvářejí jako konečný produkt fermentace. Jedná se tedy o fermentativní, mikroaerofilní, grampozitivní a kataláza negativní druhy bakterií, které se vyskytují v různém prostředí bohatém na sacharidy, jako jsou například materiály rostlinného původu nebo trávicí trakt (Syed Yaacob et al. 2018). Studie Olofsson & Vasquez (2008) uvedla celkem devět zástupců z kmene *Firmicutes*. Jsou jimi *Lactobacillus kunkeei*, *L. apinorum*, *L. mellifer*, *L. mellis*, *L. melliventris*, *L. kimbladii*, *L. helsingborgensis*, *L. kullabergensis* a *L. apis*. V našich vzorcích trávicích traktů včel byly pomocí DGGE identifikovány *L. mellis* (Firm-4) a *L. melliventris* (Firm-5), který byl jako vůbec prvně izolovaným laktobacilem z trávicího traktu včely medonosné (Olofsson & Vasquez 2008; Olofsson et al. 2014). Také *L. apis* (Firm-5) popsány Killer et al. (2014). Jedná se opět o homofermentativního zástupce produkující kyselinu mléčnou z D–glukózy. Jeho růst probíhá za anaerobních či mikroaerofilních podmínek a byly u něho potvrzeny antagonistické účinky vůči působení patogenu *P. larvae* (Killer et al. 2014). Stejně jako všichni ostatní zástupci firmikutů má *L. apis* charakteristické probiotické pozitivní vlastnosti, kterých podle našeho zjištění mohou včely využívat během celého roku. Laktobacily byly z našich pokusů nalezeny jak u letních, tak u zimních včel. Podobné výsledky předložila i studie Rangberg et al. (2015), kdy byl navíc potvrzen největší nález *L. kunkeei* u letních včel. Dominance však postupem roku

klesala, až u zimních včel tento druh zcela chyběl (Rangberg et al. 2015). Podobná sezónní distribuce *L. kunkeei* byla dříve pozorována u švédských i amerických včel (Vasquez et al. 2009). *L. kunkeei* je včelou získáván opylováním různých druhů květín a druhotně osídluje kromě konečníku především medný váček (Corby-Harris et al. 2014; Moran 2015). To vysvětluje, proč v obou sledovaných studiích byl průběh analogický. Nejmenší počet *L. kukeei* byl na začátku jara, kdy včely začínají vylétávat po zimě pro první sběr nektaru a pylu. Tento počet s přibývajícími měsíci úměrně narostl s vyšším výskytem dělnic létavek. Znamená to tedy, že zvýšená aktivita létavek v kolonii a větší dostupnost květín přináší vyšší počet probiotické bakterie *L. kunkeei*. Bohužel v naší práci tento druh nebyl ze vzorků trávicích traktů včel identifikován. Kromě tohoto zástupce byly ostatní druhy *Lactobacillus spp.*, vyskytující se v konečníku, příp. v tenkém střevě (*Firm-5*), zjištěny u zimních včel (Rangberg et al. 2015). Střeva včely medonosné jsou během zimního období nejvíce zastoupena bakteriemi, které se vážou na zadní část střeva. Tuto skutečnost odůvodňuje studie Martinson et al. (2012) tak, že během zimy, kdy včely téměř neopouštějí úl, nedochází k vyprazdňování trávicího traktu. Je proto zřejmé, že většina střevního objemu je nahromaděna do výkalového vaku, který je mnohonásobně zvětšen. „Zadržené“ bakterie se mohou dále reprodukovat, čímž se může zvyšovat ochrana včelího hostitele (Martinson et al. 2012; D'Alvise et al. 2018). I studie Hroncova et al. (2014) uvádí, že trávicí trakt zimních včel obsahuje více anaerobních bakterií, než je tomu u včel letních, pravděpodobně proto, že se včely během zimy nesetkávají s pastvou a nemají přísun mikroorganismů z květů rostlin.

Mezi bakterie mléčného kvašení se zařazuje i námi třetí kvantifikovaná skupina *Actinobacteria*. Oproti ostatním bakteriálním řadám vyjadřoval tento kmen nejméně hojnou skupinu, což je škoda, protože stejně jako laktobacily jsou bifidobakterie považovány za prospěšné bakterie, které mají probiotické účinky a hlavní uplatnění při prevenci gastrointestinálních infekcí a nemocí (Baffoni et al. 2016). Z našich vzorků bylo zřejmé, že s příchodem roku byl počet nepatrný, až od poloviny léta množství vzrostlo. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny v červenci a až do prosince se držely nad hodnotou 10 000. Výjimkou byl pouze srpen, který nabyl podprůměrných hodnot vůči předešlému i následujícímu měsíci. Metodou DGGE byl identifikován jeden z nejhlavnějších zástupců kmene, *Bifidobacterium asteroides*, jejímž hostitelem jsou jak savci (Turroni et al. 2018), tak hmyz (Olofsson & Vasquez 2008). Všechny druhy bifidobakterií jsou kataláza negativní, pouze zástupce *B. asteroides* je kataláza pozitivní. Je schopen růstu i v přítomnosti kyslíku, neboť si zachovává kapacitu pro aerobní dýchání (Bottacini et al. 2012). Dalšími zástupci bifidobakterií, kteří však nebyli z našich vzorků identifikováni, jsou *B. coryneforme*, *B. indicum*. Všechny druhy symbioticky osídlují

převážně konečník. Proto pro ně platí stejná hypotéza související s nahromaděním potravy do zadní části střeva během zimních měsíců (Olofsson & Vasquez 2008; Martinson et al. 2012).

Metodou DGGE byly i mimo jiné zjištěné další tři druhy bakterií. Dva z nich *Snodgrassella alvi* a *Bartonella apis* (*Proteobacteria*) osídlují přirozeně trávicí trakt včel (Kwong & Moran 2013) a třetím byl překvapivě rod *Pseudomonas spp.* Jeho výskyt může být způsoben vodou, protože zástupci tohoto rodu jsou obecně hojní v environmentálních zdrojích sladkovodních vod a mohou se díky svým oportunistickým metabolickým schopnostem a odolnosti objevit i v trávicím traktu včel (D'Alvise et al. 2018).

Podle výsledků našeho zkoumání trávicích traktů včely medonosné jsme nezjistili žádné výrazné podobnosti mezi úly na jednom stanovišti, vs. mezi stanovišti. Ke stejným výsledkům se dopracovaly i další studie (Hroncova et al. 2015; Jones et al. 2018). Celkově tyto výsledky naznačují, že prostředí, kterému jsou včely vystaveny, včetně environmentálních rozdílů mezi jednotlivými lokalitami, může ovlivnit jejich mikrobiální složení, zejména relativní hojnost některých klíčových taxonů (Jones et al. 2018).

7 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo porovnat včely letní a zimní, které pocházejí ze stejného stanoviště. Porovnávání se zakládalo na identifikaci bakteriálního spektra a kvantifikaci vybraných skupin bakterií (*Gammaproteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*).

Námi identifikovaní jedinci představují přirozenou součást trávicího traktu včely medonosné a je velice složité určit, zda byl vyšší výskyt konkrétně u letních nebo zimních včel. Avšak hypotéza této diplomové práce, že se mikrobiota včel mění v závislosti na ročním období, byla potvrzena. Podle našich výsledků můžeme konstatovat, že kmen *Gammaproteobacteria*, tvořící přirozenou část trávicího traktu včely medonosné, byl více kvantifikován u vzorků, odebíraných během zimních měsíců. Metodou qPCR bylo tedy zjištěno, že tyto bakterie svým počtem více dominovaly u zimních včel. K podobným výsledkům jsme dospěli i u kmene *Actinobacteria*, jehož zástupci jsou převážně striktně anaerobní (výjimkou je *Bifidobacterium asteroides*), a stejně jako gammaproteobakterie tvoří přirozené gastrointestinální prostředí. Jejich počet byl výrazný od léta do zimy. Nejmenší výkyvy byly zaznamenány u kmene *Firmicutes*. Tato skupina bakterií působila po celý rok téměř stabilně. Její zástupci *Lactobacillus spp.* pocházejí převážně z květů rostlin. Ve vzorcích byly identifikovány tři druhy bakterií mléčného kvašení (*Lactobacillus apis*, *L. mellis* a *L. melliventris*), které v trávicím traktu osídlují zadní část střeva. Z našich výsledků je zřejmé, že se jejich množství během celého roku nijak zásadně neměnilo. Je téměř škoda, že v tomto případě nebyly výsledky zřetelnější, protože laktobacily svými prospěšnými vlastnostmi mohou podpořit zdraví včelího hostitele. Neboť v nedávných letech byl zaznamenán vyšší úbytek včelích kolonií.

Předmětem dalšího zkoumání, by mohly být další skupiny bakterií z jádra mikrobioty, kde by se porovnával jejich výskyt v období, kdy je včela v kondici a v období, během kterého je včela nejvíce oslabena či napadána nemocemi. Následně by se dávka potenciálně probiotických bakterií mohla včelám pravidelně suplementovat, čímž by se mohlo částečně zabránit dalšímu úmrtí včelích kolonií.

8 Seznam literatury

- Amdam GV, Rueppell O, Fondrk MK, Page RE, Nelson CM. 2009. The nurse's load: Early-life exposure to brood-rearing affects behavior and lifespan in honey bees (*Apis mellifera*). *Experimental Gerontology* **44**:467–471.
- Andersen S, Peter MG, Roepstorff P. 1996. Cuticular Sclerotization in Insects. *Biochemistry and Molecular Biology* **113**:689–705.
- Anderson KE, Carroll MJ, Sheehan T, Mott BM, Maes P, Corby-Harris V. 2014. Hive-stored pollen of honey bees: Many lines of evidence are consistent with pollen preservation, not nutrient conversion. *Molecular Ecology* **23**:5904–5917.
- Anderson KE, Rodrigues PAP, Mott BM, Maes P, Corby-Harris V. 2016. Ecological Succession in the Honey Bee Gut: Shift in *Lactobacillus* Strain Dominance During Early Adult Development. *Microbial Ecology* **71**:1008–1019.
- Antúnez K, Martín-Hernández R, Prieto L, Meana A, Zunino P, Higes M. 2009. Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (*Microsporidia*). *Environmental Microbiology* **11**:2284–2290.
- Aronstein KA, Saldivar E, Vega R, Westmiller S, Douglas AE. 2012. How *Varroa* Parasitism Affects the Immunological and Nutritional Status of the Honey Bee, *Apis mellifera*. *Insects* **3**:601–615.
- Baffoni L, Gaggia F, Alberoni D, Cabbri R, Nanetti A, Biavati B, Di Gioia D. 2016. Effect of dietary supplementation of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains in *Apis mellifera* L. against *Nosema ceranae*. *Beneficial Microbes* **7**:45–51.
- Bahreini R, Currie RW. 2015. The effect of queen pheromone status on *Varroa* mite removal from honey bee colonies with different grooming ability. *Experimental and Applied Acarology* **66**:383–397.

- Balfour N, Toufaily H Al, Scandian L, Jesse M, Carreck N, Ratnieks F. 2017. A landscape scale study of the net effect of proximity to a neonicotinoid-treated crop on honey bee and bumble bee colonies. *Environmental science & technology* **51**:10825–10833.
- Besten G, Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud D-J, Bakker BM. 2013. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of lipid research* **54**:2325–2340.
- Boecking O, Spivak M. 1999. Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* **30**:141–158.
- Borba RS, Klyczek KK, Mogen KL, Spivak M. 2015. Seasonal benefits of a natural propolis envelope to honey bee immunity and colony health. *Journal of Experimental Biology* **218**:3689–3699.
- Bottacini F et al. 2012. *Bifidobacterium asteroides* PRL2011 Genome Analysis Reveals Clues for Colonization of the Insect Gut. *PLoS ONE* (e44229) DOI: 10.1371/journal.pone.0044229.
- Bucekova M, Juricova V, Monton E, Martinotti S, Ranzato E, Majtan J. 2017. Microwave processing of honey negatively affects honey antibacterial activity by inactivation of bee-derived glucose oxidase and defensin-1. *Food Chemistry* **240**:1131–1136.
- Burritt NL, Foss NJ, Neeno-Eckwall EC, Church JO, Hilger AM, Hildebrand JA, Warshauer DM, Perna NT, Burritt JB. 2016. Sepsis and hemocyte loss in honey bees (*Apis mellifera*) Infected with *Serratia marcescens* strain sicaria. *PLoS ONE* (e0167752) DOI: 10.1371/journal.pone.0167752.
- Cane JH, Roulston TH. 2000. Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Systematics and Evolution* **222**:187–209.
- Carroll MJ, Brown N, Goodall C, Downs AM, Sheenan TH, Anderson KE. 2017. Honey bees preferentially consume freshly-stored pollen. *PLoS ONE* (e0175933) DOI: 10.1371/journal.pone.0175933.

- Chapman RF. 2013. The Insects: Structure and Function. Page (Simpson SJ, Douglas AE, editors) Fifth edit. Cambridge University Press, Cambridge.
- Chen X, Li J, Sun H, Li S, Chen T, Liu G, Dyson P. 2017. High-level heterologous production and Functional Secretion by recombinant *Pichia pastoris* of the shortest proline-rich antibacterial honeybee peptide Apidaecin. *Scientific Reports* **7**:14543.
- Coaglio AL, Ferreira MAND, Lima W d S, Pereira CA d. J. 2018. Identification of a phenoloxidase- and melanin-dependent defence mechanism in *Achatina fulica* infected with *Angiostrongylus vasorum*. *Parasites & vectors* **11**:113.
- Conlon MA, Bird AR. 2015. The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. *Nutrients* **7**:17–44.
- Corby-Harris V, Maes P, Anderson KE. 2014. The bacterial communities associated with honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *PLoS ONE* (e95056) DOI: 10.1371/journal.pone.0095056.
- Cornara L, Biagi M, Xiao J, Burlando B. 2017. Therapeutic Properties of Bioactive Compounds from Different Honey bee Products. *Frontiers in pharmacology* **8**:412.
- Costa RAC, Cruz-Landim C. 2005. Hydrolases in the hypopharyngeal glands of workers of *Scaptotrigona postica* and *Apis mellifera* (*Hymenoptera, Apinae*). *Genetics and Molecular Research* **4**:616–623.
- Crailsheim K. 1990. The protein balance of the honey bee worker. *Apidologie* **21**:417–429.
- D’Alvise P, Böhme F, Codrea MC, Seitz A, Nahnsen S, Binzer M, Rosenkranz P, Hasselmann M. 2018. The impact of winter feed type on intestinal microbiota and parasites in honey bees. *Apidologie* **49**:252–264.
- Danihlik J, Aronstein K, Petřivalský M. 2016. Antimicrobial peptides: a key component of honey bee innate immunity. *Journal of Apicultural Research* **54**:123–136.

- Danihlik J, Dlouhá S, Dostalová S, Kabat M, Hroncova Z, Petrivalsky M, Prymas L. 2017. II. svazek Včelařství. Pracovní společnosti nástavkových včelařů CZ, z. s., Praha.
- Danka RG, Villa JD. 2003. Autogrooming by resistant honey bees challenged with individual tracheal mites. *Apidologie* **34**:591–596.
- das Dores Teixeira A, Marques-Araújo S, Zanuncio JC, Serrão JE. 2015. Peritrophic membrane origin in adult bees (*Hymenoptera*): Immunolocalization. *Micron* **68**:91–97.
- Degrandi-Hoffman G, Chen Y. 2015. Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. *Current Opinion in Insect Science* **10**:170–176.
- Dietemann V et al. 2013. Standard methods for *Varroa* research. *Journal of Apicultural Research* **52**:1–54.
- Döke MA, Frazier M, Grozinger CM. 2015. Overwintering honey bees: biology and management. *Current Opinion in Insect Science* **10**:185–193.
- Drescher N, Wallace HM, Katouli M, Massaro CF, Leonhardt SD. 2014. Diversity matters: how bees benefit from different resin sources. *Oecologia* **176**:943–953.
- Dubovskiy IM, Kryukova NA, Glupov V V., Ratcliffe NA. 2016. Encapsulation and nodulation in insects. *Survival Journal* **13**:229–246.
- Eleftherianos I, Revenis C. 2011. Role and Importance of Phenoloxidase in Insect Hemostasis. *Journal of Innate Immunity* **3**:28–33.
- Eleftherianos I, Xu M, Yadi H, Ffrench-Constant RH, Reynolds SE. 2009. Plasmatocyte-spreading peptide (PSP) plays a central role in insect cellular immune defenses against bacterial infection. *Journal of Experimental Biology* **212**:1840–1848.
- Elias-Neto M, Soares MPM, Bitondi MG. 2009. Changes in integument structure during the imaginal molt of the honey bee. *Apidologie* **40**:29–39.

Emery O, Schmidt K, Engel P. 2017. Immune system stimulation by the gut symbiont *Frischella perrara* in the honey bee (*Apis mellifera*). *Molecular ecology* **26**:2576–2590.

Engel P, Bartlett KD, Moran A. 2015. The Bacterium *Frischella perrara* Causes Scab Formation in the Gut of its Honey bee Host. *MBio* (e00193-15) DOI: 10.1128/mBio.00193-15.

Engel P, James RR, Koga R, Kwong WK, McFrederick QS, Moran NA. 2013a. Standard methods for research on *Apis mellifera* gut symbionts. *Journal of Apicultural Research* **52**:1–24.

Engel P, Kwong WK, McFrederick Q, Anderson KE, Barribeau SM, Chandler JA, Cornman RS, Dainat J, de Miranda JR, Doublet V. 2016. The bee microbiome: impact on bee health and model for evolution and ecology of host-microbe interactions. *MBio* (e02164-15) DOI: 10.1128/mBio.02164-15.

Engel P, Kwong WK, Moran NA. 2013b. *Frischella perrara* gen. nov., sp. nov., a gammaproteobacterium isolated from the gut of the honey bee, *Apis mellifera*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63**:3646–3651.

Engel P, Martinson VG, Moran NA. 2012. Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**:11002–11007.

Engel P, Moran NA. 2013. The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews* **37**:699–735.

Evans JD, Aronstein KA, Chen Y, Hetru C, Imler JL, Jiang H, Kanost M, Thompson GJ, Zou Z, Hultmark D. 2006. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect molecular biology* **15**:645–656.

Evans JD, Spivak M. 2010. Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**:S62–S72.

- Forsgren E, Olofsson TC, Vásquez A, Fries I. 2010. Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus larvae* in honey bee larvae. *Apidologie* **41**:99–108.
- Frost EH, Shutler D, Hillier NK. 2013. Effects of fluvalinate on honey bee learning, memory, responsiveness to sucrose, and survival. *Journal of Experimental Biology* **216**:2931–2938.
- Fukuda S et al. 2011. *Bifidobacteria* can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* **469**:543–549.
- Gabor E, Cinege G, Csordás G, Török T, Folkl-Medzihradzky K, Darula Z, Andó I, Kurucz É. 2017. Hemolactin expression reveals functional heterogeneity in honey bee (*Apis mellifera*) hemocytes. *Developmental & Comparative Immunology* **76**:403–411.
- Gaggia F, Baffoni L, Alberoni D. 2018. Probiotics for Honey bees' Health. *Probiotics and Prebiotics in Animal Health and Food Safety*:219–245.
- Garcia-Gonzalez E, Genersch E. 2013. Honey bee larval peritrophic matrix degradation during infection with *Paenibacillus larvae*, the aetiological agent of American foulbrood of honey bees, is a key step in pathogenesis. *Environmental Microbiology* **15**:2894–2901.
- Garibaldi LA, Steffan-dewenter I, Winfree R, Aizen MA, Bommarco R, Cunningham SA, Kremen C, Carvalheiro LG. 2013. Wild Pollinators Enhance Fruit Set of Crops Regardless of Honey Bee Abundance. *Science* **339**:1608–1611.
- Genersch E et al. 2010. Original article The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie* **41**:332–352.
- Gerdt J, Dewar RL, Simone-Finstrom M, Edwards T, Angove M. 2018. Hygienic behaviour selection via freeze-killed honey bee brood not associated with chalkbrood resistance in eastern Australia. *PLoS ONE* (e0203969) DOI: 10.1371/journal.pone.0203969.
- Giuffrè C, Lubkin SR, Tarpay DR. 2017. Automated assay and differential model of western honey bee (*Apis mellifera*) autogrooming using digital image processing. *Computers and Electronics in Agriculture* **135**:338–344.

Goncalves GW, Fernandes MK, Santana CW, Martins GF, Zanuncio JC, Serrau JE. 2017. Post-embryonic changes in the hindgut of honey bee *Apis mellifera* workers: Morphology, cuticle deposition, apoptosis, and cell proliferation. *Developmental Biology* **431**:194–204.

Groh C, Tautz J, Rössler W. 2004. Synaptic organization in the adult honey bee brain is influenced by brood-temperature control during pupal development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**:4268–4273.

Gupta AP. 2001. Immunology of Invertebrates: Humoral. *Encyclopedia of life sciences*:1–6.

Hamiduzzaman MM, Emsen B, Hunt GJ, Subramanyam S, Williams CE, Tsuruda JM, Guzman-Novoa E. 2017. Differential Gene Expression Associated with Honey Bee Grooming Behavior in Response to *Varroa* Mites. *Behavior Genetics* **47**:335–344.

Holder PJ, Jones A, Tyler CR, Cresswell JE. 2018. Fipronil pesticide is the prime suspect in historical mass mortalities of honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **115**:13033–13038.

Hroncova Z, Dobes P, Havlik J, Hyrsil P, Kamler M. 2015. *Včelařství*. 68 (150): 194–195.

Hroncova Z, Havlik J, Killer J, Dosekocil I, Tyl J, Kamler M, Titera D, Hakl J, Mrazek J, Bunesova V, Rada V. 2015. Variation in Honey Bee Gut Microbial Diversity Affected by Ontogenetic Stage, Age and Geographic Location. *PLoS ONE* (e0118707) DOI: 10.1371/journal.pone.0118707.

Hroncova Z, Havlik J, Killer J, Kamler M. 2014. *Včelařství*. 67 (148): 7–9.

Hystad EM, Salmela H, Amdam GV, Münch D. 2017. Hemocyte-mediated phagocytosis differs between honey bee (*Apis mellifera*) worker castes. *PLoS ONE* (e0184108) DOI: 10.1371/journal.pone.0184108.

Johnson RM, Dahlgren L, Siegfried BD, Ellis MD. 2013. Acaricide, Fungicide and Drug Interactions in Honey Bees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE* (e54092) DOI: 10.1371/journal.pone.0054092.

- Johnson RM, Ellis MD, Mullin CA, Frazier M. 2010. Pesticides and honey bee toxicity – USA. *Apidologie* **41**:312–331.
- Jones JC, Fruciano C, Hildebrand F, Toufalilia H Al, Balfour NJ, Bork P, Engel P, Ratnieks FL, Hughes WOH. 2018. Gut microbiota composition is associated with environmental landscape in honey bees. *Ecology and evolution* **1**:441–451.
- Jones JC, Oldroyd BP. 2006. Nest Thermoregulation in Social Insects. *Advances in insect physiology* **33**:153–191.
- Kakumanu ML, Reeves AM, Anderson TD, Rodrigues RR, Williams MA. 2016. Honey Bee Gut Microbiome Is Altered by In-Hive Pesticide Exposures. *Frontiers in microbiology* **7**:1255.
- Kapheim KM, Rao VD, Yeoman CJ, Wilson BA, White BA, Goldenfeld N, Robinson GE. 2015. Caste-Specific Differences in Hindgut Microbial Communities of Honey Bees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE* (e0123911) DOI: 10.1371/journal.pone.0123911.
- Kesnerova L, Mars RAT, Ellegaard KM, Troilo M, Sauer U, Engel P. 2017. Disentangling metabolic functions of bacteria in the honey bee gut. *PLOS Biology* (e2003467) DOI: 10.1371/journal.pbio.2003467.
- Kesnerova L, Moritz R, Engel P. 2016. *Bartonella apis* sp. nov., a honey bee gut symbiont of the class *Alphaproteobacteria*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **66**:414–421.
- Killer J, Dubna S, Sedlacek I, Svec P. 2014. *Lactobacillus apis* sp. nov., from the stomach of honeybees (*Apis mellifera*), having an in vitro inhibitory effect on the causative agents of American and European foulbrood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64**:152–157.
- Kirrane MJ, de Guzman LI, Rinderer TE, Frake AM, Wagnitz J, Whelan PM. 2012. Age and reproductive status of adult *Varroa* mites affect grooming success of honey bees. *Experimental and Applied Acarology* **58**:423–430.

- Koch H, Abrol DP, Li J, Schmid-Hempel P. 2013. Diversity and evolutionary patterns of bacterial gut associates of corbiculate bees. *Molecular Ecology* **22**:2028–2044.
- Konopaskova K. 2017. Identifikace a kvantifikace vybraných skupin bakterií v medu s různým geografickým původem [MSc. Thesis]. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha.
- Kuszevska K, Miler K, Rojek W, Woyciechowski M. 2017. Honeybee workers with higher reproductive potential live longer lives. *Experimental Gerontology* **98**:8–12.
- Kwong WK, Engel P, Koch H, Moran NA. 2014. Genomics and host specialization of honey bee and bumble bee gut symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**:11509–11514.
- Kwong WK, Mancenido AL, Moran NA. 2017. Immune system stimulation by the native gut microbiota of honey bees. *Royal Society open science* **4**:170003.
- Kwong WK, Moran NA. 2013. Cultivation and characterization of the gut symbionts of honey bees and bumble bees: description of *Snodgrassella alvi* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Neisseriaceae* of the *Betaproteobacteria*, and *Gilliamella apicola* gen. nov., sp. nov., *Orbales*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **63**:2008–2018.
- Kwong WK, Moran NA. 2016. Gut microbial communities of social bees. *Nature Reviews Microbiology* **14**:374–384.
- Lampeitl F. 1996. Chováme včely: úvod do včelaření. Blesk, Ostrava.
- Law RJ, Lightstone FC. 2008. Gaba receptor insecticide non-competitive antagonists may bind at allosteric modulator sites. *International Journal of Neuroscience* **118**:705–734.
- Leclercq G, Francis F, Gengler N, Blacquièrre T. 2018. Bioassays to Quantify Hygienic Behavior in Honey Bee (*Apis Mellifera L.*) Colonies: A Review. *Journal of Apicultural Research* **57**:663–673.

- Lee FJ, Rusch DB, Stewart FJ, Mattila HR, Newton ILG. 2015. Saccharide breakdown and fermentation by the honey bee gut microbiome. *Environmental Microbiology* **17**:796–815.
- Leoncini I, Le Conte Y, Costagliola G, Plettner E, Toth AL, Wang M, Huang Z, Becard JM, Crauser D, Slessor KN, Robinson GE. 2004. Regulation of behavioral maturation by a primer pheromone produced by adult worker honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**:17559–17564.
- Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh PJ, Ramey RR, Bircher JS, Schlegel ML, Tucker TA, Schrenzel MD, Knight R. 2008. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* **320**:1647–1651.
- Mao W, Schuler MA, Berenbaum MR. 2013. Honey constituents up-regulate detoxification and immunity genes in the western honey bee *Apis mellifera*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**:8842–8846.
- Martinson VG, Danforth BN, Minckley RL, Rueppell O, Tingek S, Moran NA. 2011. A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Molecular Ecology* **20**:619–628.
- Martinson VG, Moy J, Moran NA. 2012. Establishment of Characteristic Gut Bacteria during Development of the Honey bee Worker. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**:2830–2840.
- Matsuda K, Buckingham SD, Kleier D, Rauh JJ, Grauso M, Sattelle DB. 2001. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in pharmacological sciences* **22**:573–580.
- Mattila HR, Harris JL, Otis GW. 2001. Timing of production of winter bees in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Insectes Sociaux* **48**:88–93.
- Moran NA. 2015. Genomics of the honey bee microbiome. *Current Opinion in Insect Science* **10**:22–28.

- Moran NA, Hansen AK, Powell JE, Sabree ZL. 2012. Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees. PLoS ONE (e36393) DOI: 10.1371/journal.pone.0036393.
- Moussian B. 2013. The apical plasma membrane of chitin-synthesizing epithelia. Insect science **20**:139–146.
- Mullen GR, Durden LA. 2019. Medical and veterinary entomology. 3rd edition. Elsevier, San Diego, CA.
- Mullin CA, Frazier M, Frazier JL, Ashcraft S, Simonds R, VanEngelsdorp D, Pettis JS. 2010. High Levels of Miticides and Agrochemicals in North American Apiaries: Implications for Honey Bee Health. PLoS ONE (e9754) DOI: 10.1371/journal.pone.0009754.
- Nam HJ, Jang IH, You H, Lee KA, Lee WJ. 2012. Genetic evidence of a redox-dependent systemic wound response via Haya protease-phenoloxidase system in *Drosophila*. EMBO Journal **31**:1253–1265.
- Negri P, Maggi M, Ramirez L, Szawarski N, Feudis L De, Lamattina L, Eguaras M. 2015. Cellular immunity in *Apis mellifera*: studying hemocytes brings light about bees skills to confront threats. Apidologie **47**:379–388.
- Nicolson SW. 2011. Bee food: the chemistry and nutritional value of nectar, pollen and mixtures of the two. African Zoology **46**:197–204.
- Nishimoto M, Kubota M, Tsuji M, Mori H, Kimura A, Matsui H, Chiba S. 2001. Purification and Substrate Specificity of Honey bee, *Apis mellifera* L., α -Glucosidase III. Bioscience, biotechnology, and biochemistry **65**:1610–1616.
- Niu G, Johnson RM, Berenbaum MR. 2011. Original article Toxicity of mycotoxins to honey bees and its amelioration by propolis. Apidologie **42**:79–87.

Nouvian M, Deisig N, Reinhard J, Giurfa M. 2018. Seasonality, alarm pheromone and serotonin: insights on the neurobiology of honey bee defence from winter bees. *Biology letters* **14**:20180337.

Olofsson TC, Alsterfjord M, Nilson B, Butler E, Vasquez A. 2014. *Lactobacillus apinorum* sp. nov., *Lactobacillus mellifer* sp. nov., *Lactobacillus mellis* sp. nov., *Lactobacillus melliventris* sp. nov., *Lactobacillus kimbladii* sp. nov., *Lactobacillus helsingborgensis* sp. nov. and *Lactobacillus kullabergensis* sp. nov., isol. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64**:3109–3119.

Olofsson TC, Vásquez A. 2008. Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honey bee *Apis mellifera*. *Current Microbiology* **57**:356–363.

Pettis JS, vanEngelsdorp D, Johnson J, Dively G. 2012. Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen Nosema. *Naturwissenschaften* **99**:153–158.

Piccart K, Vasquez A, Piepers S, De Vliegher S, Olofsson TC. 2016. Short communication: Lactic acid bacteria from the honey bee inhibit the in vitro growth of mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science* **99**:2940–2944.

Powell JE, Martinson VG, Urban-Mead K, Moran NA. 2014a. Routes of acquisition of the gut microbiota of *Apis mellifera*. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**:7378–7387.

Powell JE, Martinson VG, Urban-Mead K, Moran NA. 2014b. Routes of Acquisition of the Gut Microbiota of the Honey Bee *Apis mellifera*. *Appl Environ Microbiol* **80**:7378–87.

Pritchard DJ. 2016. Grooming by honey bees as a component of varroa resistant behavior. *Journal of Apicultural Research* **55**:38–48.

Pyrzynska K, Biesaga M. 2009. Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **28**:893–902.

- Ramanathan ANKG, Nair AJ, Suguna VS. 2018. A review on Royal Jelly proteins and peptides. *Journal of Functional Foods* **44**:255–264.
- Ramsey SD et al. 2019. *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**:1792–1801.
- Rangberg A, Mathiesen G, Amdam G V., Diep DB. 2015. The paratransgenic potential of *Lactobacillus kunkeei* in the honey bee *Apis mellifera*. *Beneficial Microbes* **6**:513–523.
- Rath W. 1999. Co-adaptation of *Apis cerana* Fabr. and *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* **30**:97–110.
- Raymann K, Moran NA. 2018. The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. *Current Opinion in Insect Science* **26**:97–104.
- Raymann K, Shaffer Z, Moran NA. 2017. Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honey bees. *PLoS Biology* (e2001861) DOI: 10.1371/journal.pbio.2001861.
- Ribière C, Hegarty C, Stephenson H, Whelan P, O’Toole PW. 2018. Gut and Whole-Body Microbiota of the Honey Bee Separate Thriving and Non-thriving Hives. *Microbial Ecology*:1–11.
- Richardson RT, Ballinger MN, Qian F, Christman JW, Johnson RM. 2018. Morphological and functional characterization of honey bee, *Apis mellifera*, hemocyte cell communities. *Apidologie* **49**:397–410.
- Ricigliano VA, Fitz W, Copeland DC, Mott BM, Maes P, Floyd AS, Dockstader A, Anderson KE. 2017. The impact of pollen consumption on honey bee (*Apis mellifera*) digestive physiology and carbohydrate metabolism. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **96**:1–14.
- Ruttner F, H nel H. 1992. Active defense against *Varroa* mites in a Carniolan strain of honey bee (*Apis mellifera carnica* Pollmann). *Apidologie* **23**:173–187.

Salatino A, Teixeira EW, Negri G, Message D. 2005. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2**:33–38.

Segers FH, Kesnerova L, Kosoy M, Engel P. 2017. Genomic changes associated with the evolutionary transition of an insect gut symbiont into a blood-borne pathogen. *The ISME Journal* **11**:1232–1244.

Sforcin JM. 2016. Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. *Phytotherapy research* **30**:894–905.

Shen X, Ye G, Cheng X, Yu C, Altosaar I, Hu C. 2010. Characterization of an abaecin-like antimicrobial peptide identified from a *Pteromalus puparum* cDNA clone. *Journal of Invertebrate Pathology* **105**:24–29.

Simone-Finstrom M, Borba RS, Wilson M, Spivak M. 2017. Propolis Counteracts Some Threats to Honey Bee Health. *Insects* **8**:46.

Simone-Finstrom M, Foo B, Tarpy DR, Starks PT. 2014. Impact of Food Availability, Pathogen Exposure, and Genetic Diversity on Thermoregulation in Honey Bees (*Apis mellifera*). *Journal of insect behavior* **27**:527–539.

Simone-Finstrom M, Spivak M. 2010. Review article Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie* **41**:295–311.

Simone M, Evans JD, Spivak M. 2009. Resin Collection and Social Immunity in Honey Bees. *Evolution: International Journal of Organic Evolution* **63**:3016–3022.

Starks PT, Blackie CA, Seeley TD. 2000. Fever in honeybee colonies. *Naturwissenschaften* **87**:229–231.

Staveley JP, Law SA, Fairbrother A, Menzie CA. 2014. A Causal Analysis of Observed Declines in Managed Honey Bees (*Apis mellifera*). *Human and Ecological Risk Assessment* **20**:566–591.

Syed Yaacob SN, Huyop F, Kamarulzaman R, Ibrahim R, Wahab RA. 2018. Identification of *Lactobacillus spp.* and *Fructobacillus spp.* isolated from fresh *Heterotrigona itama* honey and their antagonistic activities against clinical pathogenic bacteria. *Journal of Apicultural Research* **57**:395–405.

Takewaki S, Chiba S, Kimura A, Matsui H, Koike Y. 1980. Purification and Properties of α -Glucosidases of the Honey Bee *Apis mellifera L.* *Agricultural and Biological Chemistry* **44**:731–740.

Tautz J, Maier S, Groh C, Rössler W, Brockmann A. 2003. Behavioral performance in adult honey bees is influenced by the temperature experienced during their pupal development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**:7343–7347.

Toreti VC, Sato HH, Pastore GM, Park YK. 2013. Recent Progress of Propolis for Its Biological and Chemical Compositions and Its Botanical Origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2013**:13.

Turrone F, Milani C, Duranti S, Mahony J, van Sinderen D, Ventura M. 2018. Glycan Utilization and Cross-Feeding Activities by Bifidobacteria. *Trends in Microbiology* **26**:339–350.

Vasquez A, Forsgren E, Fries I, Paxton RJ, Flaberg E, Szekely L, Olofsson TC. 2012. Symbionts as Major Modulators of Insect Health: Lactic Acid Bacteria and Honeybees. *PLoS ONE* (e33188) DOI: 10.1371/journal.pone.0033188.

Vasquez A, Olofsson TC, Sammataro D. 2009. A scientific note on the lactic acid bacterial flora in honeybees in the USA – A comparison with bees from Sweden. *Apidologie* **40**:26–28.

Vesely V. 2003. *Včelařství. Brázda, Praha.*

Wilson MB, Spivak M, Hegeman AD, Rendahl A, Cohen JD. 2013. Metabolomics Reveals the Origins of Antimicrobial Plant Resins Collected by Honey Bees. *PLoS ONE* (e77512) DOI: 10.1371/journal.pone.0077512.

Wojciechowski M, Lowe R, Maleszka J, Conn D, Maleszka R, Hurd PJ. 2018. Phenotypically distinct female castes in honey bees are defined by alternative chromatin states during larval development. *Genome Research* **28**:1532–1542.

Zheng H, Nishida A, Kwong WK, Koch H, Engel P, Steele MI, Moran NA. 2016. Metabolism of Toxic Sugars by Strains of the Bee Gut Symbiont *Gilliamella apicola*. *MBio* **7**:1–9.

Zheng H, Powell JE, Steele MI, Dietrich C, Moran NA. 2017. Honey bee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**:4775–4780.

Zhu W, Schmehl DR, Mullin CA, Frazier JL. 2014. Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae. *PLoS ONE* (e77547) DOI: 10.1371/journal.pone.0077547.

Zhukovskaya M, Yanagawa A, Forschler B. 2013. Grooming Behavior as a Mechanism of Insect Disease Defense. *Insects* **4**:609–630.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

Act	<i>Actinobacteria</i>
BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)	Vyhledává podobnosti mezi biologickými sekvencemi
CO ₂	Oxid uhličitý
DGGE	Elektroforéza v gradientovém denaturačním gelu
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
Firm	<i>Firmicutes</i>
FP341 (Forward primer 341)	Základní primer 341
GABA	Gama-aminomáselná kyselina
Gamma	<i>Gammaproteobacteria</i>
JH	Juvenilní hormon
NCBI (National Center for Biotechnology Information)	Národní centrum pro biotechnologické informace
qRT-PCR, qPCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RP534 (Reverse Primer 534)	Reverzní primer 534
rRNA	Ribozomální ribonukleová kyselina
<i>spp.</i>	druhy

10 Seznam obrázků a tabulek

10.1 Seznam obrázků

Obrázek 1: Vývoj včely medonosné (hmyz s proměnou dokonalou).

Obrázek 2: Trávicí trakt včely medonosné.

Obrázek 3: Imunitní systém včely medonosné.

Obrázek 4: Hemocytová adheze, rozšíření a degranulace během enkapsulace parazitů.

Obrázek 5: Aktivace enzymu fenoloxidázy pomocí endogenních serinových proteáz.

Obrázek 6: Rozdíl mezi kleštíky: Kleštík včelí (*V. jacobsoni*), Kleštík zhoubný (*V. destructor*).

Obrázek 7: Složení a prostorové uspořádání bakteriálních společenstev ve střevě včel.

Obrázek 8: Vývoj včelí střevní mikrobioty od larválního období po dospělé.

Obrázek 9: Dominantní bakteriální druhy osídlující trávicí trakt včelí královny a trubců.

Obrázek 10: Vystavení stresovým faktorům a jejich dopad na včelu medonosnou.

Obrázek 11: Mapa znázorňující původ vzorků včel.

Obrázek 12: Polyakrylamidový gel zobrazující vybrané vzorky trávicích traktů včel.

Obrázek 13: Boxplot zobrazuje množství aktinobakterií v trávicím traktu včely medonosné odebíraných v pravidelných měsíčních intervalech ve čtyřech českých lokalitách.

Obrázek 14: Boxplot zobrazuje množství aktinobakterií v trávicím traktu včely medonosné odebíraných v pravidelných měsíčních intervalech.

Obrázek 15: Boxplot zobrazuje množství gammaproteobakterií v trávicím traktu včely medonosné odebíraných v pravidelných měsíčních intervalech ve čtyřech českých lokalitách.

Obrázek 16: Boxplot zobrazuje množství gammaproteobakterií v trávicím traktu včely medonosné odebíraných v pravidelných měsíčních int

Obrázek 17: Boxplot zobrazuje množství firmikutů v trávicím traktu včely medonosné odebíraných v pravidelných měsíčních intervalech ve čtyřech českých lokalitách.

Obrázek 18: Boxplot zobrazuje množství firmikutů v trávicím traktu včely medonosné odebíraných v pravidelných měsíčních intervalech.

10.2 Seznam tabulek

Tabulka 1: Střevní mikrobiota včel medonosných.

Tabulka 2: Pokusy demonstrující úlohu mikrobiomu v ochraně včel proti patogenům.

Tabulka 3: Použité specifické primerové páry.