

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Juvenilní hormon a jeho funkce v dlouhověkosti včel

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Eliška Moravcová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jiří Danihlák, PhD.
Rok:	2022

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 8.5.2022

.....
Podpis autora

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Eliška Moravcová
Název práce	Juvenilní hormon a jeho funkce v dlouhověkosti včel
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Jiří Danihlák, PhD.
Rok obhajoby	2022

Abstrakt

Juvenilní hormon je lipofilní seskviterpenoidní látka, která se podílí na metamorfóze, rozmnožování, polymorfismu a tvorbě kast ve včelstvu. Ovlivňuje syntézu vitellogeninu v tukovém tělese a má vliv na dlouhověkost včel. Nejvyšší hladiny juvenilního hormonu byly zaznamenány u létavek, pak u mladušek a nejmenší hodnoty u matky. V průběhu roku se ve včelstvu vystřídají dvě generace dělnic, krátkověké letní včely a dlouhověké zimní včely. Letní generace včel má v hemolymfě vyšší hladinu juvenilního hormonu a nižší hladinu vitellogeninu oproti zimní generaci včel.

Juvenilní hormon lze stanovit imunochemicky metodou ELISA, radioimunoanalýzou, kapalinovou a plynovou chromatografií. Tato práce se zabývá optimalizací metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s ionizací elektrosprejem a hmotnostním analyzátozem doby letu (UHPLC–ESI–QTOF) pro stanovení juvenilního hormonu III.

V teoretické části práce je zpracována literární rešerše o poznacích juvenilního hormonu a dlouhověkosti včel. V Experimentální části se optimalizovala metoda UHPLC–ESI–QTOF pro stanovení juvenilního hormonu III. Byla změřena hmotnostní spektra po přímém nástřiku standardu juvenilního hormonu III do hmotnostního spektrometru. Experimentální hmotnostní spektra odpovídala hodnotami m/z přepokládaným hodnotám, které byly spočítány v programu Compass Isotope Pattern. Nejintenzivnější pík představoval adukt juvenilního hormonu III se sodíkem, dále byly zaznamenány píky pro protonizovaný juvenilní hormon III a jeho protonizovaný dimer. Optimalizace chromatografické separace proběhla na koloně s reverzní fází ARION Polar[®] C₁₈. Byl zjištěn retenční čas standardu juvenilního hormonu III a hmotnostní spektra standardu v eluovaném píku. Nejintenzivnější pík

hmotnostního spektra představoval ion o $m/z = 235,1751$, na který se juvenilní hormon III samovolně v průběhu ionizace rozpadá. Po fragmentaci protonizované molekuly juvenilního hormonu III se získalo MSMS spektrum, v němž nejintenzivnější pík odpovídal fragmentu o $m/z = 153,1353$. Extrakce juvenilního hormonu III z *Apis mellifera* se provedla několika extrakčními činidly (hexan; aceton; chloroform; směs hexan-voda; směs hexan-methanol; směs chloroform – voda). Juvenilní hormon III se ale v žádném vzorku nepodařilo detekovat. Metodu extrakce juvenilního hormonu III je potřeba dále optimalizovat.

Klíčová slova	včela medonosná, hormonální regulace, vitellogenin
Počet stran	55
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Eliška Moravcová
Title	Juvenile hormone and its function in longevity of honey bees
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Jiří Danihlík, PhD.
The year of presentation	2022

Abstract

Juvenile hormone is a lipophilic sesquiterpenoid substance involved in metamorphosis, reproduction, polymorphism and caste formation in bee colonies. It affects the synthesis of vitellogenin in the fat body and the longevity of bees. The highest levels of the juvenile hormone are in foraging bees, then in nurse bees, and the lowest levels are in queens. Two populations of honeybees change in a hive during the year: short-lived summer bees and long-lived winter bees. The summer generation of bees has higher levels of juvenile hormone and lower vitellogenin levels in hemolymph compared to the winter generation of bees.

The juvenile hormone can be determined immunochemically by ELISA, radioimmunoassay, liquid and gas chromatography. The thesis aims to optimize the method of high-performance liquid chromatography in conjunction with electrospray ionization and quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UHPLC – ESI – QTOF) for the determination of juvenile hormone III.

The theoretical part of the thesis is a literature search on bees' juvenile hormone and longevity. In the experimental part, the UHPLC – ESI – QTOF method was optimized to determine juvenile hormone III. The mass spectra were measured after direct injection of the juvenile hormone III standard into the mass spectrometer. The experimental mass spectra corresponded to m/z values calculated in the Compass Isotope Pattern program. The most intense peak was the adduct of juvenile hormone III with sodium, followed by peaks for protonated juvenile hormone III and its protonated dimer. Chromatographic separation optimization was performed on ARION Polar® C₁₈ reverse-phase column. The retention time of the juvenile hormone III standard and the

mass spectrum of the standard were determined in the eluted peak. The most intense peak of the mass spectrum was the ion $m/z = 235,1751$, to which juvenile hormone III spontaneously breaks down during ionization. After the fragmentation of the protonated juvenile hormone III molecule, the MSMS spectrum was obtained in which the intensest peak corresponded to a fragment $m / z = 153,1353$. Extraction of juvenile hormone III from *Apis mellifera* was performed with several extraction reagents (hexane; acetone; chloroform; hexane-water; hexane-methanol; chloroform-water). The juvenile hormone III was not detected in any sample. The juvenile hormone III extraction method needs to be further optimized.

Keywords	Honeybee, hormonal regulation, vitellogenin
Number of pages	0
Number of appendices	55
Language	Czech

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce panu Mgr. Jiřímu Danihlíkovi, Ph.D. za čas, který mi věnoval při zpracování této práce. Také děkuji katedře biochemie, která mi umožnila práci na experimentální části.

OBSAH

CÍLE PRÁCE.....	10
1 ÚVOD.....	11
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	12
2.1 Život včelstva.....	12
2.1.1 Plod	12
2.1.2 Matka	13
2.1.3 Dělnice	13
2.1.4 Trubec	15
2.1.5 Včelí dílo.....	15
2.1.6 Letní a zimní generace včel	16
2.2 Dlouhověkost včel	17
2.2.1 Juvenilní hormon	17
2.2.2 Vitellogenin	19
2.2.3 Zimní a letní generace včel.....	19
2.3 Biosyntéza juvenilního hormonu	21
2.4 Degradace juvenilního hormonu.....	23
2.5 Receptory juvenilního hormonu	24
2.6 Metody stanovení juvenilního hormonu	25
2.6.1 Stanovení genové exprese enzymů biosyntetické dráhy juvenilního hormonu pomocí RT-qPCR.....	25
2.6.2 ELISA	26
2.6.3 RIA.....	27
2.6.4 Chromatografie	27
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
3.1 Materiál.....	32
3.1.1 Biologický materiál.....	32
3.1.2 Chemikálie	32
3.1.3 Použité roztoky a média.....	32
3.2 Přístrojové vybavení	32
3.3 Metody	32
3.3.2 Použití programu Compass Isotope Pattern.....	32
3.3.3 MS spektrum pro standard juvenilního hormonu III stanovený přímým nástřikem do zdroje.....	33
3.3.4 Hmotnostní spektrometrická analýza.....	33
3.3.5 HPLC	35
3.3.6 Extrakce juvenilního hormonu.....	35

3.3.6.1	Extrakce hexanem, extrakce acetonem	35
3.3.6.2	Optimalizace extrakce směsmi rozpouštědel	36
4	VÝSLEDKY A DISKUSE	38
4.1	Hmotnostně spektrometrická analýza JH III	38
4.1.2	Predikované hodnoty m/z JH III	38
4.1.3	Experimentální MS a MSMS spektra JH III	41
4.1.4	Interpretace fragmentačních iontů v MSMS spektrech	46
4.1.5	Chromatografické chování JH III	47
4.2	Juvenilní hormon získaný z <i>Apis mellifera</i>	48
5	ZÁVĚR	50
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	51
7	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	55

CÍLE PRÁCE

- Příprava literárního přehledu o poznatků o funkci juvenilního hormonu.
- Zpracování literární rešerše o biosyntéze a odbourání juvenilního hormonu hmyzu.
- Zpracování literární rešerše o fyziologii dlouhověkosti včely medonosné.
- Příprava přehledu metod analýzy juvenilního hormonu v různých živočišných tkání.
- Optimalizace metody kapalinové chromatografie pro detekci juvenilního hormonu.

1 ÚVOD

V průběhu roku se ve včelstvu vystřídají dvě generace dělnic, krátkověké letní včely a dlouhověké zimní včely. Letní včely se vyskytují v hnízdě od jara do konce léta. Dožívají se v průměru 30–40 dnů. Zimní včely jsou v hnízdě od podzimu do konce zimy. Dožívají se až 160 dnů.

Juvenilní hormon je seskviterpenoidní látka, která je syntetizovaná v párovém orgánu *Corpora allata*. Juvenilní hormon se podílí na metamorfóze, rozmnožování, polymorfismu, tvorbě kast ve včelstvu a ovlivňuje syntézu vitellogeninu v tukovém tělese. Letní generace včel má vyšší hladinu juvenilního hormonu a nižší hladinu vitellogeninu v hemolymfě. Zatím co zimní generace včel má nižší hladinu juvenilního hormonu a vyšší hladinu vitellogeninu v hemolymfě v porovnání s letní generací.

Juvenilní hormon lze stanovit imunochemicky metodou ELISA, radioimunoanalýzou a kapalinovou nebo plynovou chromatografií. Dále je možné studovat míru aktivace biosyntetické nebo degradační dráhy juvenilního hormonu stanovením genové exprese enzymů zapojených do těchto drah.

Každoročně dochází k velkému úhynu včelstev a snahou včelařů je, aby byly ztráty minimální. Studují se procesy a faktory které mají vliv na životnost včel. Mezi faktory ovlivňující délku života včel patří i juvenilní hormon.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Život včelstva

Včela medonosná (*Apis mellifera*) patří mezi vysoce eusociální hmyz. Z taxonomického hlediska ji můžeme zařadit mezi blanokřídly hmyz (Gruna *et al.*, 2017).

Dle Dogantzis *et al.* (2021), pochází včela medonosná z Asie, odkud se rozšířila dále do Afriky a Evropy. V České republice převažuje severozápadní skupina *A. m. mellifera* a v minoritním zastoupení i jihovýchodní skupina včel *A. m. carnica* (Gruna *et al.*, 2017).

Včelstvo se chová jako samostatný živý organismus. Je tvořeno matkou, dělnicemi, trubci, plodem a včelím dílem. Každá včela má určitou funkci, kterou se podílí na chodu včelstva (Gruna *et al.*, 2017).

2.1.1 Plod

Včely patří ke hmyzu s proměnou dokonalou. Plod je tvořen vajíčkem, larvou a kuklou. Matka naklade vajíčka do jednotlivých buněk (1 vajíčko = 1 buňka), z nichž se následně vyvíjejí matky, dělnice a trubci. Larvy se živí krmnou kašičkou, pergou a sesterským mlékem. Krmná kašička je tvořena v hltanových a kusadlových žlázách dělnic. Larvy matek se živí mateří kašičkou a je třeba je krmit po celou dobu larválního stádia každých 5 minut na rozdíl od dělnic, které jsou krmeny dělničí kašičkou každých 30–60 minut po dobu tří dnů. Při ideálních podmínkách (35 °C) se včelí plod vyvíjí 16 (matka), 21 (dělnice) a 24 (trubec) dnů (Tab. 1). Při zhoršených podmínkách může vývoj trvat déle. Na konci stádia stočené larvy dochází k zavíčkování otevřeného plodu (Gruna *et al.*, 2017).

Tab. 1 Vývojová stádia plodu – počet jednotlivých dnů (Daníhlík *et al.*, 2017).

Vývojové stádium	Vajíčko	Stočená larva	Vzpřímená larva	Předkukla	Kukla	Celkem
Matka	3	5	2	1	5	16
Dělnice	3	6	2	2	8	21
Trubec	3	7	3	3	8	24

2.1.2 Matka

Ve včelstvu se nachází v jednom čase jedna matka. Více současně se jich nachází pouze při rojení nebo tiché výměně matky. V případě, že se jich vylíhne víc, tak mezi sebou soupeří. Panuška zlikviduje ostatní matky a žihadlem usmrtí vyvíjející se plody matek.

O matku pečují 8–16 dělnic, které ji krmí mateří kašičkou, čistí a roznášejí mateřské feromony po hnízdě. Jejím hlavním úkolem je kladení vajec a udržování pospolitosti včelstva pomocí mateřích feromonů. Mateří feromony jsou produkovány kusadlovými žlázami. Tento feromon pak koluje v potravě včel, které si ho předávají trofalaxí, dává vůni včelstvu, potlačuje rojovou náladu, pomáhá včelám vrátit se zpět do hnízda a brání rozvoji vaječníků u dělnic.

Matka se páří jednou za život. Ve věku 5–7 dní opouští hnízdo a vydává se na snubní let při kterém se páří s 12–20 trubci. V semenném vácku si pak uchová po spáření 3–7 mil spermií, které následně slouží k oplodnění jednotlivých vajíček za celý její život (Gruna *et al.*, 2017). Za den je pak schopná naklást až 2000 vajíček (Corona *et al.*, 2007). Matka se dožívá 3–5 let (Gruna *et al.*, 2017).

2.1.3 Dělnice

Nejpočetnější kastu včelstva tvoří dělnice, které zajišťují chod včelstva – starají se o plod, potravu, udržují teplotu hnízda, brání hnízdo před predátory, staví hnízdo, starají se o matku a trubce.

Dělnice jsou neplodné, protože mají zakrnělé vaječníky, což je způsobeno mateřím feromonem. V nepřítomnosti matky mohou ale naklást neoplozená vajíčka, z kterých vznikne hrboplod, z něhož se vyvinou trubci. Dělnice se dožívají 3–5 týdnů (letní generace) a 7–9 měsíců (zimní generace) (Gruna *et al.*, 2017).

Dělnice, mladušky, po vylíhnutí do 20. dne vykonávají práci v hnízdě (Gruna *et al.*, 2017). Dělnička práce ve včelstvu (Tab. 2) je dána potřebami včelstva a je doprovázena fyziologickými změnami jednotlivých včel (Lorenço *et al.*, 2019). Uklízečka čistí a uklízí prázdné buňky a připravuje je pro naklazení nových vajíček nebo uskladnění medu či pylu. Také se podílí na vynášení zbytků a uhynulých včel ven z hnízda. Krmičky a kojičky mají dobře vyvinuté hltanové žlázy a krmí otevřený plod. Stavitelky mají vyvinuté voskotvorné žlázy, podílejí se na stavbě a obnově plástů a hnízda. Přejímatelky a zpracovatelky potravu přijímají nektar, pyl a medovici

od létavek a tvoří med. Strážkyně střeží na česně a chrání úl před predátory. Létavky se dělí na pátračky, které vyhledávají zdroje potravy, a sběratelky, jež sbírají pyl, nektar, medovici, propolis, vodu a následně ji přinášejí do hnízda. Dělnice se živí nektarem, medem a pergou (Gruna *et. al*, 2017).

Tab. 2 Úkoly jednotlivých dělnic.

Den	Úkol
1-2	uklízečka
3-5	krmička
6-11	kojička
12-18	stavitelka
19-20	strážkyně
Od 20. dne	létavka

2.1.4 Trubec

Trubec je včelí samec, jehož hlavním úkolem je pářit se s mladými matkami a zahřívát plod v době vrcholné snůšky. Trubčí larvy se vyvíjejí v trubčích nebo dělničích (hrboplod) buňkách. V úle se nacházejí od dubna do srpna, poté jsou z úlu vystrnaděni. Trubci nemají žihadlo. Často se před pářením s matkami shromažďují na trubčích shromaždištích. Živý se medem a pergou (Gruna et al., 2017).

2.1.5 Včelí dílo

Včelí dílo je tvořeno voskovými plásty, které slouží ke kladení vajíček, vývoji plodu, pohlcování škodlivin a ke komunikaci včel. Dále slouží jako úložiště pylu a medu. Udržuje teplotu (35 °C) a mikroklima v hnízdě. Jednotlivé plásty jsou tvořeny hexagonálními buňkami. Základní stavební jednotkou plástu je vosk, který produkují dělnice, stavitelky, v tzv. voskotvorných zrcadélkách umístěných mezi třetím a šestým tergitem na zadečku. Zasnoutou šupinku vosku, jež vznikla na zrcadélku, včely dále zpracují kusadly a přilepí ke vznikajícímu plástu. Plásty jsou potaženy antimikrobiální vrstvičkou propolisu a slouží jako místo pro kladení vajíček a uchovávání medu a pylu.

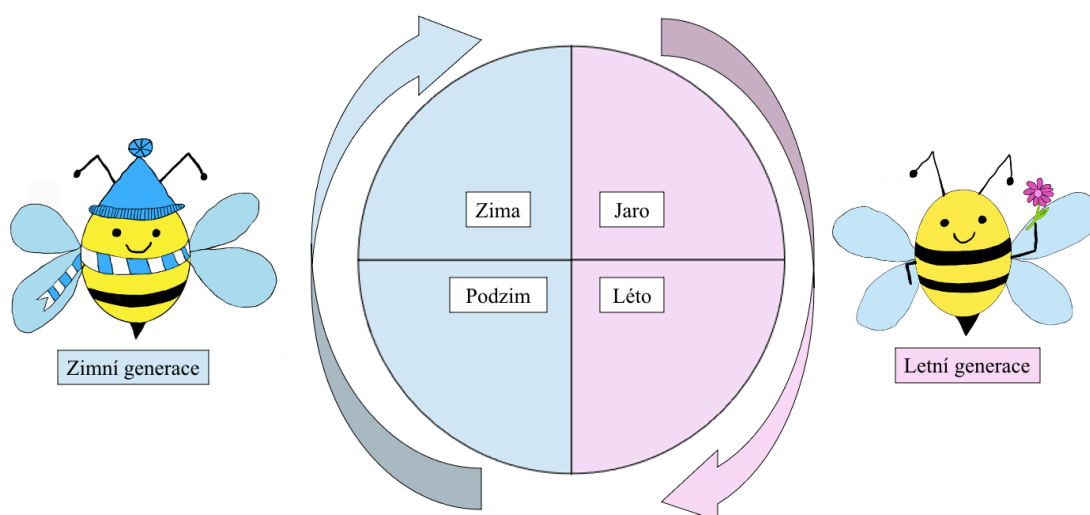
Jsou tři typy plástových buněk – mateří, trubčí a dělničí. Mateří buňky (matečníky) jsou kónického tvaru a slouží k vývoji matek. Larva v nich visí hlavou dolů. Jejím vypadnutí ven zabraňuje apalbumin, který je součástí mateří kašičky. Dělničí buňky slouží k vývoji dělnic a skladování medu a pylu. Trubčí buňky jsou větší než ty dělničí a slouží k vývoji trubců a též ke skladování medu a pylu (Gruna et al., 2017).

2.1.6 Letní a zimní generace včel

V průběhu roku se ve včelstvu vystřídají dvě generace dělnic, krátkověké letní včely a dlouhověké zimní včely (Obr. 1).

Letní generace včel se líhne a vyskytuje ve včelstvu od jara do konce léta. Jejich hlavním úkolem je sběr nektaru, medovice, pylu, starání se o plod a příprava včelstva na zimu. Letní včely se průměrně dožívají 30–40 dnů. (Fluri *et al.*, 1977; Fukuda *et Sekiguchi*, 1966; Maurizio *et Hodges*, 1950).

Zimní generace včel se líhne od srpna do konce plodování na podzim. Ve včelstvu pak přetrvává od konce léta do jara. Včely se dožívají až 160 dnů (Fluri *et al.*; 1977; Fukuda *et Sekiguchi*, 1966). Jejich hlavním úkolem je úspěšně přezimovat. Na začátku jara zahajují chov a starají se o plody, z nichž se následně líhne letní generace včel, jež je nahradí poté, co uhynou (Mattila *et al.*, 2001).



Obr. 1 Střídání zimní a letní generace.

2.2 Dlouhověkost včel

Mezi vnitřní faktory, které jsou spojovány s dlouhověkostí včel patří rozdílné hladiny vitellogeninu (Vg) a juvenilního hormonu (JH) v hemolymfě.

Včely jsou ale i z venku ovlivňovány stresovými podmínkami a nemocemi, které mají významný vliv na délku jejich života. Včely musí v průběhu roku čelit nákazám parazitů (*Varroa destructor*, *Nosema apis*), patogenů (*Paenibacillus larvae*) a virů (paralýza včel, virus deformovaných křídel), které mají za následek úbytek včelstev (Beaurepaire *et al.*, 2020; Ebeling *et al.*, 2016). Mezi stresové podmínky přicházející z vnějšího okolí patří například pesticidy, nedostatečná výživa či špatné zacházení se včelstvem (Steinhauer *et al.*, 2018).

2.2.1 Juvenilní hormon

Juvenilní hormony jsou seskviterpenoidní látky. Jedná se o deriváty methylesteru kyseliny farnesoové a je známo nejméně osm homologů juvenilních hormonů (Shinoda, 2016). Jednotlivé typy se liší různými ethylovými substituenty na acylovém zbytku (JH 0, JH I, JH II) či přidávkem 6,7 epoxidové skupiny (JH III- bisepoxid, JHB3) (Crone *et al.*, 2007).

Každý druh hmyzu má specifický typ juvenilního hormonu. Lepidoptera mají JH I a JH II, zatímco JH III (Obr. 2) se nachází u většiny hmyzu včetně *Apis mellifera* (Westerlund, 2004).

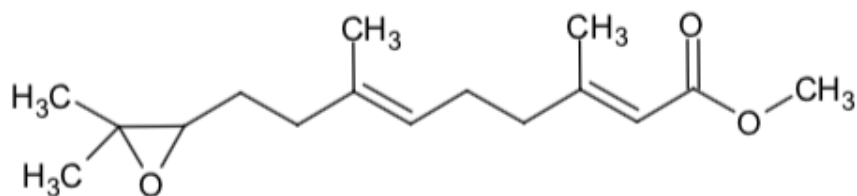
Juvenilní hormony se podílejí na metamorfóze a rozmnožování hmyzu. Udržují larvu v juvenilním stádiu, čímž zabraňují nástupu metamorfózy hmyzu v dospělého jedince do té doby, než larva doroste. Ke konci larválního stádia dojde k poklesu syntézy JH III a spustí se metamorfóza v dospělce (Seina *et al.*, 2014). Juvenilní hormony regulují reprodukci samic hmyzu. Podílejí se na stimulaci genové exprese vitellogeninu v tukovém tělese, který je následně transportován do zrajících vajíček samic (Corona *et al.*, 2007). U včelích larev hraje důležitou roli ve vývoji ovaríí. V dospělosti u včelích dělnic nemá tak velký vliv na gonadotropní orgány, jako je tomu u jiného hmyzu (Bomptorin *et al.*, 2014). JH III také ovlivňuje polymorfismus a tvorbu kast ve včelstvu (Corona *et al.* 2007). Nejvyšší hladiny JH III jsou detekovatelné u létavek, pak u mladušek a nejméně u matky (Lorenço *et al.*, 2019).

JH III se podílí se na přeměně mladušky v létavku a naopak, přičemž u mladušek byla zaznamenána nižší hodnota JH III než v létavkách (Bomptorin *et al.*, 2014). U čerstvě

vylíhnutých včel byly zaznamenány vyšší hodnoty JH III než u mladušek (Steinmann *et al.*, 2015). Zároveň je možné pozorovat zvýšenou hladinu JH III v hemolymfě letní generace včel (Fluri *et al.*, 1977).

Dle Bomptorin *et al.* (2014) je možná spojitost mezi syntézou JH III s potravou, kdy u létavek živících se převážně sacharidovou stravou byla zaznamenána vyšší hodnota JH III na rozdíl od mladušek živících se proteinovou stravou, u nichž byla hodnota JH III znatelně nižší.

Genová exprese enzymů pro syntézu JH III se moc neliší v larvách dělnic a matky na rozdíl od esterasy juvenilního hormonu (JHE), která je vyšší u matky (Bomptorin *et al.*, 2014).



Obr. 2 Molekula juvenilního hormonu III.

2.2.2 Vitellogenin

Vitellogenin (Vg) je prekurzor žloutkového proteinu, který slouží jako zdroj výživy pro vyvíjející se embryo. Je syntetizován v tukovém tělese, odkud je uvolňován do hemolymfy a transportován do oocytů samic hmyzu (Steinmann *et al.*, 2015). Má zásobní a ochrannou funkci. Podílí se na transportu sacharidů, mastných kyselin, fosfátů, vitamínů a hormonů (Karina *et al.*, 2005). Vitellogenin vykazuje antioxidační schopnosti, díky kterým je nedílnou součástí imunitního systému hmyzu (Corona *et al.*, 2007). Jeho syntéza je regulována juvenilním hormonem. Vitellogenin a juvenilní hormon vzájemně vykazují negativní korelaci, čili zvýšení hladiny JH vede k poklesu syntézy vitellogeninu, kdežto jeho snížení vede ke zvýšení syntézy vitellogeninu (Steinmann *et al.*, 2015).

Včely mají 180 kDa vitellogenin (Corona *et al.*, 2007). U čerstvě vylíhnutých matek tvoří Vg první tři dny 70 % všech proteinů v hemolymfě. Jeho vysoká hodnota je u matek udržována po zbytek života. Matky ho produkují tukovým tělesem a ovarii na rozdíl od dělnic, které ho produkují pouze tukovým tělesem.

U mladušek je Vg syntetizován ve větším množství během prvních sedmi dnů, kdy tvoří až 40 % proteinů v hemolymfě. S rostoucím věkem jeho produkce klesá (Karina *et al.*, 2005). Trubci mají v hemolymfě pouze malé množství Vg v larválním vývoji. Po vylíhnutí do třech týdnů vymizí (Trenczek *et al.*, 1989).

2.2.3 Zimní a letní generace včel

Dělnice zimní generace včel mají vyšší hladinu Vg a nižší hladinu JH III v hemolymfě. Jejich tukové těleso je větší a obsahuje více zásobních živin (Fluri *et al.*, 1977). Jejich hlavním zdrojem obživy jen med (Haydak, 1970).

Zimní včely nemají vyvinutou buněčnou imunitu do takové míry jako letní, což kompenzují zvýšenou oxidační aktivitou v hemolymfě (humorální imunita). Jejich tukové těleso produkuje antimikrobiální peptidy (apidaecin, abaecin, hymenoptaecin, defensin-1) a lysozym, které byly detekovány v přítomnosti bakteriální infekce (Daníhlík *et al.*, 2016). Zimní generace včel, stejně jako matka, je více rezistentní k oxidačnímu stresu díky vyšší hladině Vg, který se podílí na likvidaci volných kyslíkových radikálů (Corona *et al.*, 2007). Faktory podílející se na imunitě zimních dělnic by mohly mít vliv na adaptaci k rezistenci a snížení rizika nákazy bakteriálními patogeny a tím i prodloužení života včel (Steinmann *et al.*, 2015).

Včely letní generace dělnic mají v hemolymfě méně Vg a více JH III než zimní generace (Fluri *et al.*, 1977). U dělnic letní generace byla na rozdíl od zimní generace zaznamenána zvýšená exprese genů buněčné imunity při bakteriální infekci. Buněčnou imunitu včel představují hemocyty, které mají schopnost fagocytózy, nodulace, cytotoxicity, enkapsulace, a antimikrobiální peptidy syntetizované v hemocytech a tukovém tělese. Exprese genů humorální imunity byla minimální (Steinmann *et al.*, 2015; Dostálková *et al.*, 2020).

Letní včely jsou více aktivní, sbírají pyl, nektar a medovici. Mají zvětšené hltanové žlázy a mají méně zásobního tuku. Létavky jsou mnohem více vystaveny různým patogenům než mladušky (Huang *et al.*, 1994; Kunc *et al.*, 2019).

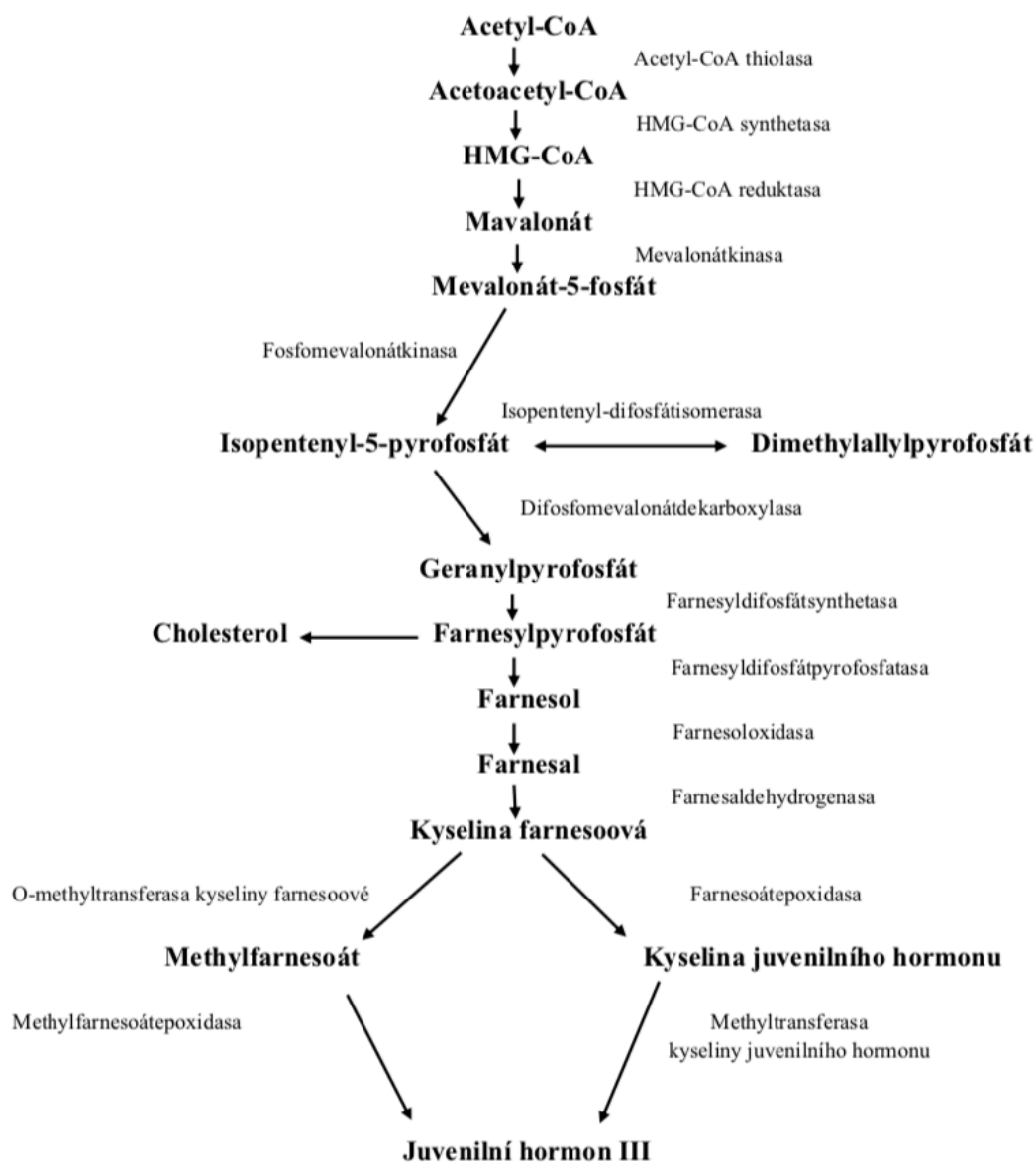
Na podzim a na jaře dochází každý rok k výměně dvou generací včel v hnízdě. Letní generace se stará o snůšku a plody. Úkolem zimní generace je zase úspěšně přezimovat (Fluri *et al.*, 1977).

Přeměna letních dělnic na zimní je řízena mnoha faktory, mezi které patří například pokles teploty, změna vlhkosti hnízda, zkrácení fotoperiody, pokles množství přinášené potravy do hnízda, snížení koncentrace snůškového feromonu, zvýšená aktivita včel v hnízdě a odchod trubců z hnízda (Knoll *et al.*, 2020). Zároveň dochází ke strukturálním změnám mozku dělnic, snižuje se syntéza juvenilního hormonu III a zvyšuje se syntéza vitellogeninu (Knoll *et al.*, 2020).

2.3 Biosyntéza juvenilního hormonu

K syntéze juvenilního hormonu dochází v párovém orgánu *Corpora allata* a je hormonálně řízena allotropiny a allostatiny z mozku. Dále je regulována negativní zpětnou vazbou při zvýšení titru JH v hemolymfě (Shinoda 2016). Po syntéze je JH uvolněn do hemolymfy a transportován pomocí bílkovinného nosiče JHBP (juvenile hormone binding protein) do příslušné tkáně. JHBP je lipophorin, který chrání JH před esterázami juvenilního hormonu v hemolymfě, a to tak že vytvoří kolem JH hydrofobní obal, čímž ho může bezpečně transportovat hemolymfou (Westerlund 2004).

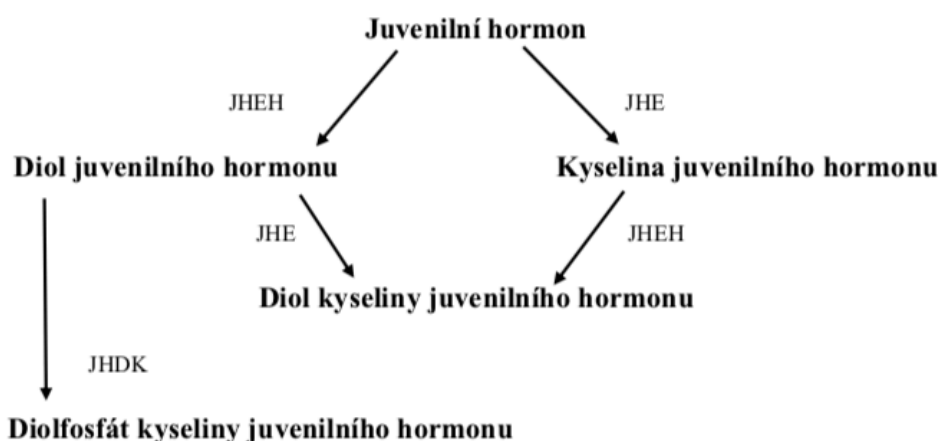
Syntéza JH (Obr. 3) vychází z mevalonové dráhy, kdy je z acetyl-CoA syntetizován farnesol, který je následně oxidován na farnesal a po dehydrogenaci farnesaldehydogenasou vzniká kyselina farnesoová (Bomptorin *et al.*, 2014). U *Lepidoptera* následně vzniká kyselina juvenilního hormonu a pak JH III, kdežto u *Dichoptera* a *Orthoptera* vzniká JH III přes methylfarnesoát (Chanchay *et al.*, 2019). JH III je výchozí látkou pro JH3B, JHI, JHII, JH0 (Cheong *et al.*, 2015).



Obr. 3 Biosyntetická dráha juvenilního hormonu. Upraveno podle Bomptorin *et al.*, (2014) a Chanchay *et al.*, (2019).

2.4 Degradace juvenilního hormonu

Juvenilní hormon je degradován (Obr. 4) v hemolymfě esterasou juvenilního hormonu a v tkáních epoxidhydrolasou juvenilního hormonu (JHEH) (Seina *et al.*, 2014). Degradace spočívá ve vzniku biologicky neaktivních látek, kterými jsou dioly kyseliny juvenilního hormonu a diolfosfát juvenilního hormonu (Morgan, 2010). JHE je syntetizována tukovým tělesem, a odtud sekretována do hemolymfy (Mackert *et al.*, 2008). Na počátku larválního vývoje je aktivita JHE velmi nízká, ale s rostoucím věkem roste a pak zase u létavek klesá (Wisniewsky *et al.*, 1986). JHE katalyzuje hydrolýzu esterové vazby v juvenilním hormonu za vzniku kyseliny juvenilního hormonu. JHEH zase hydratuje epoxidovou vazbu za vzniku diolu. Vzniklý diol může být dále přeměněn kinasou diolu juvenilního hormonu (JHDK) na diolfosfát juvenilního hormonu (Morgan 2010).



Obr. 4 Katabolická dráha juvenilního hormonu. Upraveno podle Morgan (2010) a Chanchay *et al.*, (2019).

2.5 Receptory juvenilního hormonu

Receptory pro juvenilní hormony nebyly po dlouho dobu známy. Do nedávna se předpokládalo, že by se mohlo jednat o methopren-tolerantní (Met) Per-Arnt-Sim (PAS) doménový protein (Konopová *et Jindra*, 2007).

Wilson *et Fabian* (1986) poprvé izolovali Met z mutantního kmene *Drosophila*. Předpokládalo se, že by se mohlo jednat o receptor juvenilního hormonu (Ashok *et al.*, 1998). Konopová *et Jindra* (2007) zjistili, že juvenilní hormon skrze gen Met blokuje metamorfózu larvy v dospělce u *Tribolium castaneum*. Při narušení funkce Met došlo ke snížení citlivosti brouka k juvenilnímu hormonu. To se následně projevilo předčasným nástupem metamorfózy.

Podle nejnovějších poznatků je receptorem pro juvenilní hormon intracelulární ligandový receptor Met/Gce, který je obsažen v heterodimerním proteinovém komplexu, který je regulován transkripčními faktory bHLH-PAS. Důkazy o existenci tohoto receptoru jsou založeny na molekulární a genetické úrovni. Juvenilní hormon se kompetitivně váže na Met/Gce proteiny s různou afinitou. Vazba ligandu je stereoselektivní a závisí na specifických zbytcích v PAS-B doméně Met/Gce (Jindra *et al.*, 2021).

2.6 Metody stanovení juvenilního hormonu

Jednou z možností, jak studovat míru aktivace biosyntetické nebo degradační dráhy juvenilního hormonu, je stanovení genové exprese enzymů do těchto drah zapojených. Samotný juvenilní hormon lze stanovit imunochemicky metodou ELISA, radioimunoanalýzou (RIA) či kapalinovou nebo plynovou chromatografií.

2.6.1 Stanovení genové exprese enzymů biosyntetické dráhy juvenilního hormonu pomocí RT-qPCR

PCR metoda slouží k mnohanásobné replikaci DNA *in vitro*, kdy jsou segmenty cílené DNA v procesu amplifikace až milionkrát znásobeny. Celý proces probíhá v termocykléru. K syntéze DNA je třeba templátová DNA, DNA polymerasa a primer. Nejdříve dochází k denaturaci DNA teplem, čímž se rozruší vodíkové můstky mezi vlákny DNA. Poté se dva oligonukleotidové primery naváží na cílovou DNA – každý na jeden konec. DNA polymerasa se napojí na primery, zvýší se teplota a začne se syntetizovat nové vlákno DNA. Po ochlazení dojde k odpojení primerů. Vznikají dvě molekuly DNA. Celý proces se $30 \times - 40 \times$ opakuje, čímž dojde ke znásobení počtu původních molekul DNA 10^9-10^{12} (Madigan *et al.*, 2019).

Kvantitativní Real-Time PCR (RT-qPCR) metoda vychází z mRNA. Pomocí enzymu reverzní transkriptasy se syntetizuje komplementární DNA (cDNA). RT-qPCR využívá k detekci množství nově syntetizované DNA fluorescenci. Fluorescenční látky se váží nespecificky na amplifikované DNA. Po jejich navázání na DNA je vyzářeno fluorescenční záření. Hladina fluorescence barviva navázaného na dvoušroubovici DNA je následně detekována detektorem a je přímo úměrná množství přítomné DNA. Pomocí této metody je možné na rozdíl od klasické PCR kvantifikovat množství amplifikované DNA v každém cyklu PCR (Madigan *et al.*, 2019).

Lourenço *et al.* (2019) využily tuto metodu k analýze genové exprese enzymů pro syntézu juvenilního hormonu, vitellogeninu a dalších látek po stimulaci bakteriální infekcí. RNA izolovali chloroformovou extrakcí z tukového tělesa včely medonosné. Po reverzní transkripci byla cDNA podrobena qPCR. Jako zdroj fluorescence byla použita technologie SYBR Green, což je nespecifické fluorescenční barvivo, které se váže na dvouvláknovou DNA.

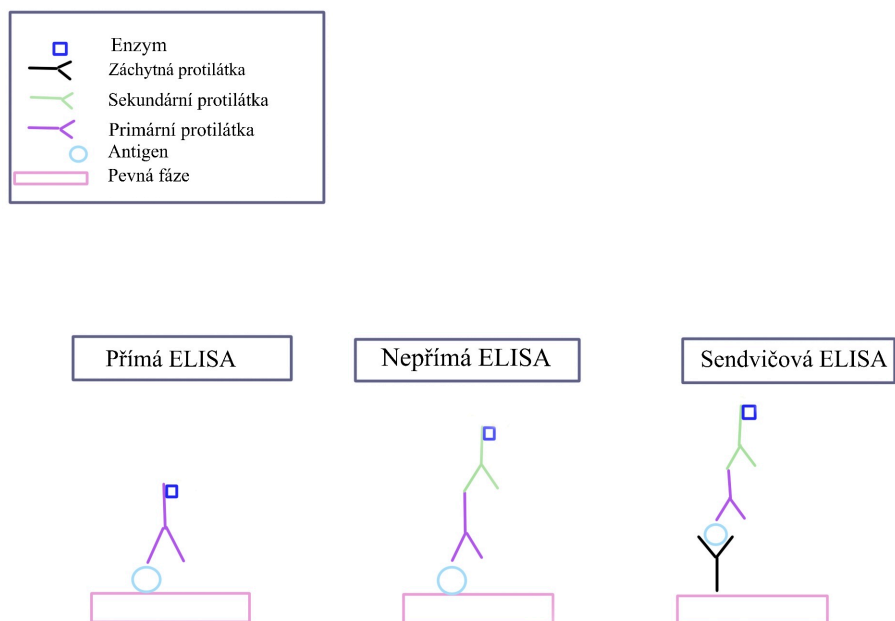
Steinmann *et al.* (2015) stanovoval pomocí této metody genovou expresi enzymů pro syntézu vitellogeninu, antimikrobiálních peptidů a methylfarnesoátepoxidasu

po nákaze včel virem deformovaných křídel. K extrakci RNA využili speciální Nucleospin RNA II kit. Syntetizovaná cDNA byla z kolonek eluována vodou. Jako zdroj fluorescenčního záření byla též využita technologie SYBR Green.

2.6.2 ELISA

ELISA je specifická a citlivá imunochemická metoda, pomocí níž se dají kvantifikovat vysoko i nízkomolekulární látky. Je založena na detekci signálu po vazbě protilátky nepřímo na antigen nebo na sekundární protilátku. Vzniklý imunokomplex (Obr. 5) detekujeme spektrofotometricky (nejčastěji produkty enzymové reakce) nebo fluorescenčně (Madigan *et al.*, 2019).

Metodu ELISA využili King *et al.* (1992) ke stanovení JHBL (juvenile hormone binding lipophorin) z hemolymfy *Diploptera punctata* pomocí monoklonálních protilátek.



Obr. 5 Typy ELISA metody: přímá, nepřímá, sendvičová; nakresleno podle Madigan (2019).

2.6.3 RIA

Kvantifikaci juvenilního hormonu lze provést radioimunoanalýzou, která je založena na imunochemické reakci antigenu se specifickou protilátkou v přítomnosti radioaktivně značeného analogu juvenilního hormonu. Jedná se o kompetitivní reakci, kdy neznačený antigen (juvenilní hormon), kterým je stanovovaná látka, soupeří o vazebná místa na protilátce s radioaktivně značeným analogem juvenilního hormonu. Změřený signál radioaktivní značky komplexu značený antigen-protilátka je nepřímo úměrný množství stanovovaného antigenu, protože čím větší je signál navázaného radioaktivního juvenilního hormonu, tím méně jej je ve vzorku (Sharma *et al.*, 2014).

Tuto metodu využili například Huang *et. al.*, (1994), kteří stanovovali JH III z hemolymfy *Apis mellifera*. JH III extrahovali z hemolymfy pomocí hexanu s přídavkem NaCl. JH III se extrahoval do hexanové fáze. Po odpaření rozpouštědla rozpustili vzniklý odparek v ethanolu a přidali antisérum juvenilního hormonu a radioaktivně značený JH III. Po inkubaci bylo množství radioaktivně značeného JH III kvantifikováno pomocí kapalinové scintilační spektrometrie. Specifitu RIA metody ověřili frakcionací získané hexanové fáze pomocí HPLC (silikagelová kolona 5 μm , 4.6 mm \times 25 cm; MF: 5% nebo 10% diethylether v hexanu; průtoková rychlost: 2 ml/min). Vzniklé jednodominutové frakce byly vysušeny a resuspendovány v ethanolu a analyzovány pomocí RIA. Eluovaný pík odpovídal retenčním časem píku pro standard JH III (Huang *et al.*, 1994).

Postupem podle Huang *et. al.*, (1994) se ve své práci inspirovali Lourenço *et al.* (2019), kteří stanovovali pomocí RIA metody titr juvenilního hormonu v hemolymfě včel po nákaze bakteriální infekcí *Serratia marcescens*. Juvenilní hormon extrahovali ze vzorku hemolymfy pomocí hexanu a toluenu. Následně přidali ke vzorku radioaktivní analog juvenilního hormonu. Specifické antisérum juvenilního hormonu bylo rozpuštěno ve fosfátovém pufru s přídavkem séra albuminu a králičího imunoglobulinu G. Po proběhnutí reakce stanovovali míru radioaktivity jednotlivých vzorků.

2.6.4 Chromatografie

Chromatografie je analytická separační metoda, která je založena na dělení jednotlivých složek (analytů) směsi mezi mobilní a stacionární fází. K separaci dochází na základě rozdílné afinity složek směsi k oběma fázím.

Podle typu mobilní fáze dělíme chromatografii na plynou (GC) a kapalinovou (LC).

Pomocí GC lze od sebe separovat látky, které byly předem převedeny do plynné fáze. Stacionární fáze může být tvořena pevnou látkou (plynová adsorpční chromatografie) nebo kapalinou zakotvenou na pevném nosiči (plynová rozdělovací chromatografie). Nosný plyn je tvořen inertním plynem jako je např. N₂, He, H₂, Ar nebo CO₂ (Záruba *et al.*, 2016).

Muchamp *et al.* (1984) stanovovali JH III z *Locusta migratoria* pomocí GC/MS. JH III byl získán hexanovou extrakcí vzorku *corpora allata*.

Kapalinová chromatografie je tvořena kapalnou mobilní fází a pevnou (kapalinová adsorpční chromatografie, iontově výměnná chromatografie, tenkovrstvá adsorpční chromatografie) nebo kapalnou fází (kapalinová rozdělovací chromatografie, gelová permeační chromatografie, papírová rozdělovací chromatografie, tenkovrstevná rozdělovací chromatografie) (Záruba *et al.*, 2016).

Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) je vhodná pro separaci polárních látek jako jsou např. sacharidy, aminokyseliny, peptidy nebo jiné polární organické sloučeniny. Mobilní fáze je tvořena vodnou a organickou fází (nejčastěji acetonitrilem). Stacionární fáze je tvořena silikagelem, na který je vázána polární sloučenina (aminopropyl, polyaminy, acetonitril). Separace je založena na hydrofilních donor-akceptor a dipól-dipól interakcích analytu s oběma fázemi (Jandera P., 2011; Zauner *et al.* 2011).

Chromatografie na reverzní fázi slouží k separaci méně polárních až nepolárních látek. Stacionární fáze je nepolární a je tvořena silikagelem a alifatickým uhlovodíkem (např. C₁₈). Mobilní fáze je polární a je tvořena vodou a organickou polární sloučeninou (MeOH, acetonitril). K separaci analytů dochází na základě rozdílné polarit. Látky s nižší polaritou jsou déle zadržovány v koloně než látky s vyšší polaritou (Vreeker, 2017).

Chromatografii lze spojit s hmotnostní spektrometrií, která slouží ke kvantitativní a kvalitativní analýze vzorku. Hmotnostní spektrometrie je založená na separaci iontů v plynné fázi podle m/z. (Skoog *et al.*, 2019, Záruba *et al.*, 2016). Hmotnostní spektrometr se stává z těchto částí: dávkovač vzorku, iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor (Záruba *et al.*, 2016).

Vzorek vstupuje do hmotnostního spektrometru dávkovačem, který je propojen s kapalinovým chromatografem, ze kterého vytéká eluent (Záruba *et al.*, 2016). Poté vzorek proudí do iontového zdroje, kde dochází k ionizaci neutrální molekuly na nabitě ionty. V hmotnostním analyzátoru dochází k separaci iontů na základě hodnoty m/z. Nakonec jsou ionty detekovány detektorem (Skoog *et al.*, 2019).

HPLC – ESI – MS/MS využívá k ionizaci elektrosprej. Při ionizaci elektrosprejem (ESI) je zdrojem ionizační energie elektrické pole, které je produkováno sprejem částic. Dochází k nabití kapiček eluentu a odpaření rozpouštědla. Při odpařování dochází ke zmenšování kapiček do té doby než dojde ke coulombovské explozi, při které vznikají nabitě ionty (Skoog *et al.*, 2019, Záruba *et al.*, 2016). Ionty následně putují do hmotnostního analyzátoru, kde jsou separovány na základě m/z . Ve spojení se separačními technikami se nejčastěji používají kvadrupólové analyzátory. Kvadrupólový analyzátor je tvořen čtyřmi tyčemi, na které působí stejnosměrné a vysokofrekvenční střídavé napětí. Tyče se nacházejí kolem osy trajektorie iontů. Podle hodnot m/z dochází k různému zakřivení trajektorie iontů (Záruba *et al.*, 2016).

S ESI ionizací lze spojit a kombinovat tandemové hmotnostní analyzátory jako jsou např. QqTOF nebo QqQ (Skoog *et al.*, 2019).

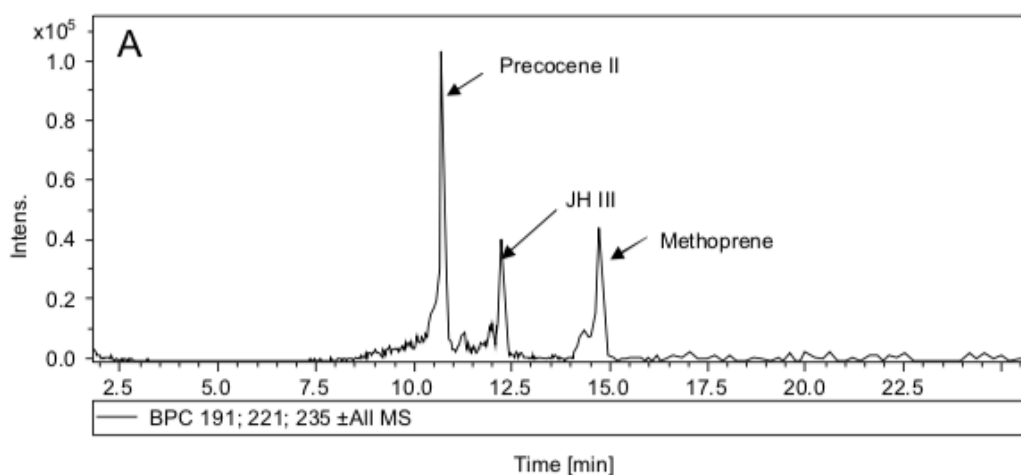
Zhairigetu *et al.*, (2007) ve svém experimentu stanovovaly JH III ze mšic a *Melanoplus sanguinipes* pomocí LC-ESI-MS/MS. Extrakci z odebrané hemolymfy provedli dvěma způsoby – extrakcí hexanem a extrakcí směsí isooktanu a methanolu. Extrakce směsí isooktanu a methanolu (1:1; v/v) (Podobně jako Westerlund *et Hoffmann*; 2004) byla provedena následovně. K odebrané hemolymfě se přidala směs isooktanu a methanolu (hemolymfa:směs – 1:20), která obsahovala methopren nebo precocen II jako vnitřní standard. Směs byla vortexována, inkubována 30 min při laboratorní teplotě a centrifugována ($8500 \times g$, 15 min). Následně byla odebrána isooktanová fáze a převedena do skleněné vialky. Methanolvá fáze byla opět vortexována, centrifugována ($10000 \times g$, 30 min) a nakonec odebrána do skleněné vialy, kde se smíchala s izooktanovou fází. Směs se nechala odpařit vakuovou odparkou a po vysušení byl odparek rozpuštěn v 10% NaOH. Poté byla provedena LC-ESI-MS/MS. Separace proběhla na reverzní fázi s C_{18} kolonou. Mobilní fáze byla tvořena vodou a MeOH. Jako standard byl použit JH III rozpuštěný v MeOH.

Extrakce hexanem byla provedena následujícím způsobem. K hemolymfě bylo přidáno 0,5 ml acetonitrilu, který obsahoval methopren nebo precocen II jako vnitřní standard. Ke směsi bylo přidáno 0,5 ml 0,9% NaCl. Vzorek byl dvakrát extrahován 1 ml hexanu – po přidání hexanu byl vzorek vortexován a centrifugován ($5000 \times g$). Hexanová fáze byla odebrána do skleněné vialky a vakuovou odparkou. Odparek byl rozpuštěn v 20–50 ml methanolu. Následně byla provedena LC-ESI-MS/MS (Zhairigetu *et al.*, 2007).

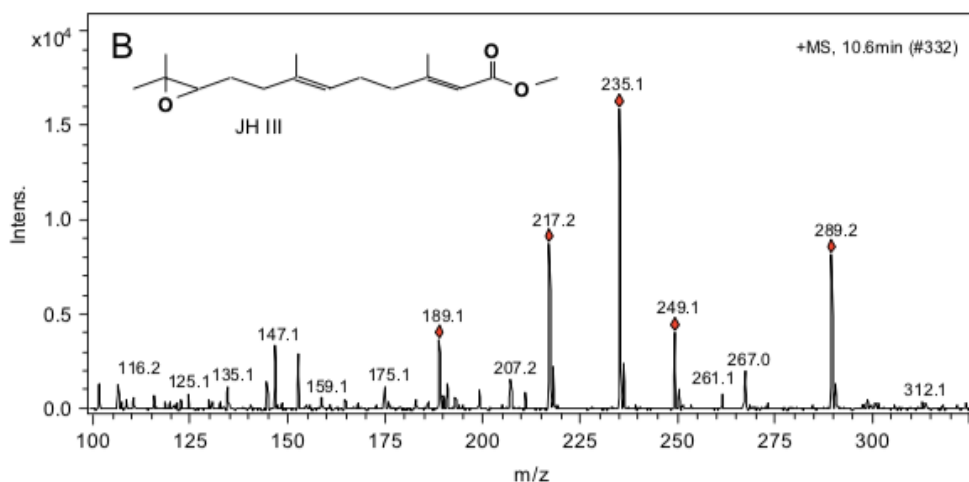
Nastavení kapalinového chromatografu vypadalo následovně. Chromatografie proběhla na reverzní fázi s C₁₈ kolonou (Vydac 218 MS 3.1505, 150 mm × 5 cm). Eluce probíhala gradientově. Mobilní fáze (MF) A byla tvořena vodou a MF B methanolem.

Hmotnostní spektrometr byl nastavený pro měření v pozitivním módu. Sušící plyn byl dávkován pod tlakem 158 579,5 Pa, rychlostí 7 l/min a teplotou 250 °C. K fragmentaci iontů docházelo v iontové pasti, přičemž kolizním plynem bylo helium. Stanovení probíhalo v MS/MS automatickém módu (Zhairigetu *et al.*, 2007).

Na obr. 6 je chromatogram, který Zhairigetu *et al.* naměřili. Je na něm vidět pík JH III a píky pro methopren a precocen II, které byly použity jako vnitřní standardy. Další záznam (Obr. 7) představuje MS spektrum, na kterém jsou viditelné píky pro jednotlivé molekuly a fragmenty JH III. Největší pík má fragment JH III o $m/z = 235,1$.



Obr. 6 Chromatogram pro juvenilní hormon, methemopren a procecon II, které získali Zhairigetu *et al.* (2007).



Obr. 7 MS spektrum juvenilního hormonu, které získali Zhairigetu *et al.* (2007).

Westerlund *et al.* (2004) stanovovali JH III z *Gryllus bimaculatus*, *Spodoptera frugiperda*, *Acyrtosiphon pisum* a *Myrmicaria eumenoides* pomocí LC/MS. Extrakci provedli směsí isooktanu a methanolu. Separace proběhla gradientovou elucí na C₁₈ koloně (ReproSil-Pur ODS-3).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál

Vzorky zmrazených včel byly dodány školitelem.

3.1.2 Chemikálie

Standard juvenilního hormonu III (Sigma-Aldrich, USA)

3.1.3 Použité roztoky a média

Kalibrační roztok: 12,5 ml destilované vody; 12,5 ml isopropanol, 50 μ l koncentrované kyseliny mravenčí, 250 μ l 1 mol \cdot l⁻¹ hydroxidu sodného

3.2 Přístrojové vybavení

HPLC systém UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, USA)

Hmotnostní spektrometr Compact qTOF (Bruker Daltonics, Německo)

Chlazená centrifuga 5415 R (Eppendorf, Německo)

Vortex (Stuart, UK)

Vakuová odparka Concentrator plus (Eppendorf, Německo)

Ultrazvuková lázeň Elmasonic (Elma Schmidbauer GmbH, Německo)

Kulový mlýnek Fast Prep FP120 (Thermo Fisher Scientific, USA)

3.3 Metody

3.3.2 Použití programu Compass Isotope Pattern

V programu Compass Isotope Pattern se vypočítali m/z hodnoty pro molekuly a možné izotopy protonizovaného juvenilního hormonu III, aduktu juvenilního hormonu III se sodíkem a protonizovaného dimeru juvenilního hormonu III. Na základě zjištěných hodnot m/z bylo možné následně identifikovat juvenilní hormon III v hmotnostním spektru, které bylo experimentálně změřeno pro standard juvenilního hormonu III.

3.3.3 MS spektrum pro standard juvenilního hormonu III stanovený přímým nástřikem do zdroje

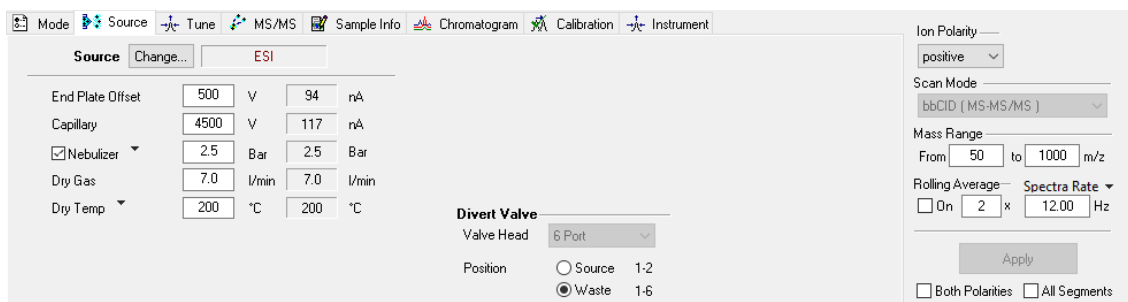
Hmotnostní spektrometr se nastavil pro metodu měření v MS a MSMS módu s přímým nástřikem. Byla zvolena univerzální metoda pro MS analýzu přímým nástřikem dodaná firmou Bruker. Poté se provedl kontinuální přímý nástřik $1 \text{ umol}\cdot\text{l}^{-1}$ standardu JH III rozpuštěném v 80% acetonitrilu.

3.3.4 Hmotnostní spektrometrická analýza

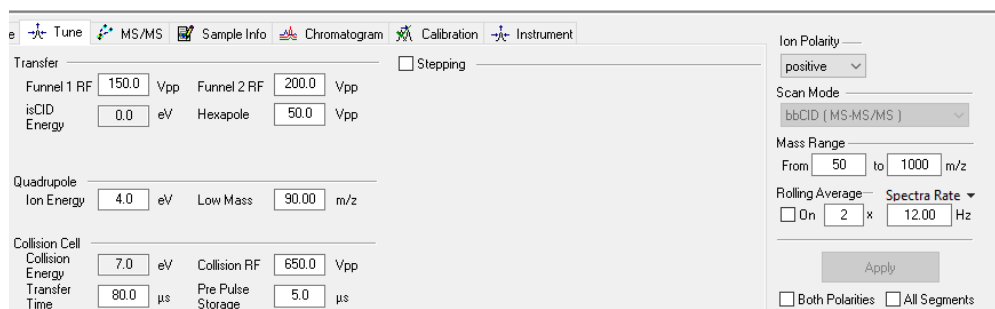
Pro stanovení JH III v biologických vzorcích byla pro spojení s kapalinovou chromatografií nastavena metoda pro analýzu malých molekul. Nastavení systémové konfigurace hmotnostního spektrometru vypadalo následovně. Obr. 8 popisuje nastavení iontového zdroje. K ionizaci molekul byla využita metoda ionizace elektrosprejem. Měřilo se v modu ESI+. Sušící plyn byl tvořen dusíkem. Do iontového zdroje byl dávkován pod tlakem $2,5 \cdot 10^5 \text{ Pa}$, rychlostí 7 l/min. Teplota plynu byla 200 °C. Na obr. 9 je nastavení parametrů transferu iontů a kolizní cely.

Hmotnostní rozsah, ve kterém se měřilo byl 50–1000 m/z. Obr. 10 zobrazuje nastavení iontového zdroje, MS/MS spektra byla měřena pomocí bbCID. Kolizní energie pro MS byl 7,0 eV a pro MS/MS 20 eV.

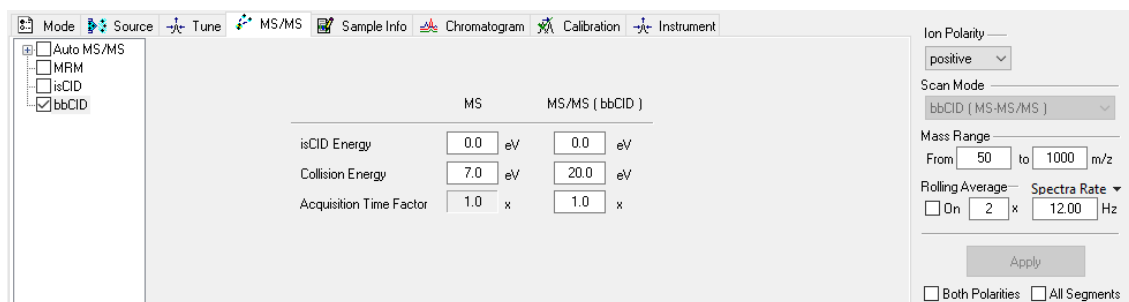
Během optimalizace byla změřena i spektra v MRM módu s různou kolizní energií, nastavení ostatních parametrů (iontový zdroj, transfer iontů apod.) bylo shodné jako pro bbCID analýzu.



Obr. 8 Nastavení iontového zdroje v programu QTOF CONTROL.



Obr. 9 Nastavení parametrů transferu iontů a kolizní cely.



Obr. 10 Nastavení parametrů pro MSMS měření v bbCID módu.

3.3.5 HPLC

Při analýze byla použita C₁₈ UHPLC kolona (ARION Polar®) o délce 150 mm, vnitřním průměru 2,1 mm velikostí částic 3 μm. Mobilní fáze byla tvořena 85% acetonitrilem. Eluce probíhala izokraticky při průtoku 400 μl/min a teplotě 30 °C.

3.3.6 Extrakce juvenilního hormonu

Pro extrakci JH III, který představuje lipofilní látku, byla zvolena nepolární extrakční činidla. Extrakce hexanem byla inspirována prací Hunag *et al.*, (1994) a Lourenço *et al.*, (2019), kteří extrahovali JH III hexanem.

Extrakce juvenilního hormonu se provedla hexanem; acetonem, chloroformem, směsí hexan-voda, směsí hexan-methanol; směsí chloroform-voda z různých tělních částí (hlava, hrud', zadeček) včely medonosné (*Apis mellifera*).

3.3.6.1 Extrakce hexanem, extrakce acetonem

Postup pro extrakci vzorků acetonem a hexanem byl stejný. Připravilo se osm vzorků s danými tělními částmi včelího těla (Tab. 3).

Tab. 3 Extrakce JH III z *Apis mellifera* hexanem a extrakce acetonem.

Tělní část	Počet zpracovaných kusů	Extrakční činidlo
hlava	1	200 + 400 μl hexan
hlava	3	200 + 400 μl hexan
hrud'	1	200 + 400 μl hexan
hrud'	3	200 + 400 μl hexan
hlava	1	200 + 400 μl aceton
hlava	3	200 + 400 μl aceton
hrud'	1	200 + 400 μl aceton
hrud'	3	200 + 400 μl aceton

Ke vzorkům v mikrozkušavkách se přidalo 200 μl hexanu (acetonu) a skleněné kuličky. Zkušavky se uzavřely a daly do kulového mlýnku. Po homogenizaci se přidalo 600 μl hexanu (acetonu). Vzorky se vortexovaly a 10 min centrifugovaly (16 100 \times g; 4 $^{\circ}\text{C}$). Po centrifugaci se odebral supernatant do nových mikrozkušavek, které se daly na 60 min (30 $^{\circ}\text{C}$) do vakuové odparky. Po odpaření rozpouštědla se k odparkům přidalo 50 μl 90% acetonitrilu. Zkušavky se daly na 10 min do ultrazvukové lázně. Poté se vortexovaly a centrifugovaly 10 min (16 000 \times g; 4 $^{\circ}\text{C}$). Vzniklý supernatant se odebral do skleněných vialek, které se zavíčkovaly. Vzorky byly poté podrobeny analýze UHPLC–ESI–QTOF.

3.3.6.2 Optimalizace extrakce směsí rozpouštědel

Další extrakce se provedly chloroformem, směsí chloroform-voda, směsí hexan-voda, směsí hexan-methanol. JH III se extrahoval z různých tělních částí (zadeček, hlava) *Apis mellifera*. Pro kontrolu se k vybraným vzorkům přidalo 5 μl 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ standardu JH III (Tab. 4).

Ke vzorkům tělních částí, které byly vloženy do mikrozkušavek, se přidalo 200 μl extrakčního činidla, skleněné kuličky a k vybraným vzorkům 5 μl 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ standardu JH III. Zkušavky se uzavřely a daly do kulového mlýnku. Po homogenizaci se přidalo 200 μl extrakčního činidla. Vzorky se vortexovaly a 5 min centrifugovaly (16 000 \times g; 4 $^{\circ}\text{C}$). Po centrifugaci se odebral supernatant do nových mikrozkušavek. Vzniklý precipitát a případně zbylá polární fáze (methanol/voda) se opět stejným způsobem extrahovaly 200 μl rozpouštědla. Po centrifugaci se opět odebral supernatant a smíchal se se supernatantem odebraným při první extrakci. Zkušavky se supernatantem se daly na 60 min (30 $^{\circ}\text{C}$) do vakuové odparky. Po odpaření rozpouštědla se k odparkům přidalo 50 μl 90% acetonitrilu. Zkušavky se daly na 10 min do ultrazvukové lázně. Poté se vortexovaly a centrifugovaly 10 min (16 100 \times g; 4 $^{\circ}\text{C}$). Vzniklý supernatant se odebral do skleněných vialek, které se zavíčkovaly. Vzorky byly podrobeny analýze UHPLC–ESI–QTOF.

Tab. 4 Extrakce JH III z *Apis mellifera* různými extrakčními činidly.

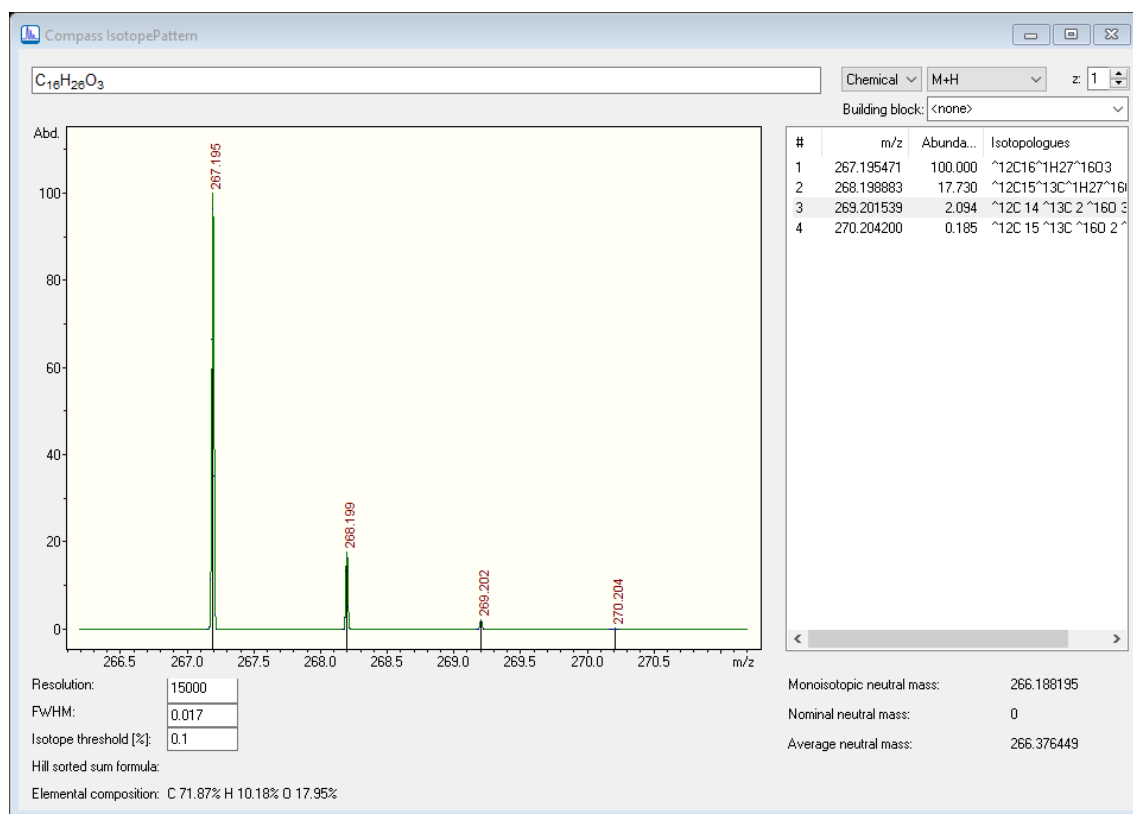
Tělní část	Počet kusů	Standard JH III (1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Extrakční činidlo	Množství extrakčního činidla
zadeček	1	–		
zadeček	1	ano	hexan + voda	a) Před homogenizací: 200 μl vody b) 1. extrakce: 600 μl hexanu c) 2. extrakce: 200 μl hexanu
hlava	1	–		
hlava	1	ano		
zadeček	1	–		
zadeček	1	ano	hexan + methanol	a) Před homogenizací: 200 μl methanolu b) 1. extrakce: 200 μl hexanu c) 2. extrakce: 200 μl hexanu
hlava	1	–		
hlava	1	ano		
zadeček	1	–		
zadeček	1	ano	chloroform	a) Před homogenizací: 200 μl chloroformu b) 1. extrakce: 200 μl chloroformu c) 2. extrakce: 200 μl chloroformu
hlava	1	–		
hlava	1	ano		
zadeček	1	–		
zadeček	1	ano	chloroform + voda	a) Před homogenizací: 200 μl vody b) 1. extrakce: 200 μl chloroformu c) 2. extrakce: 200 μl chloroformu
hlava	1	–		
hlava	1	ano		
zadeček	1	–		

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

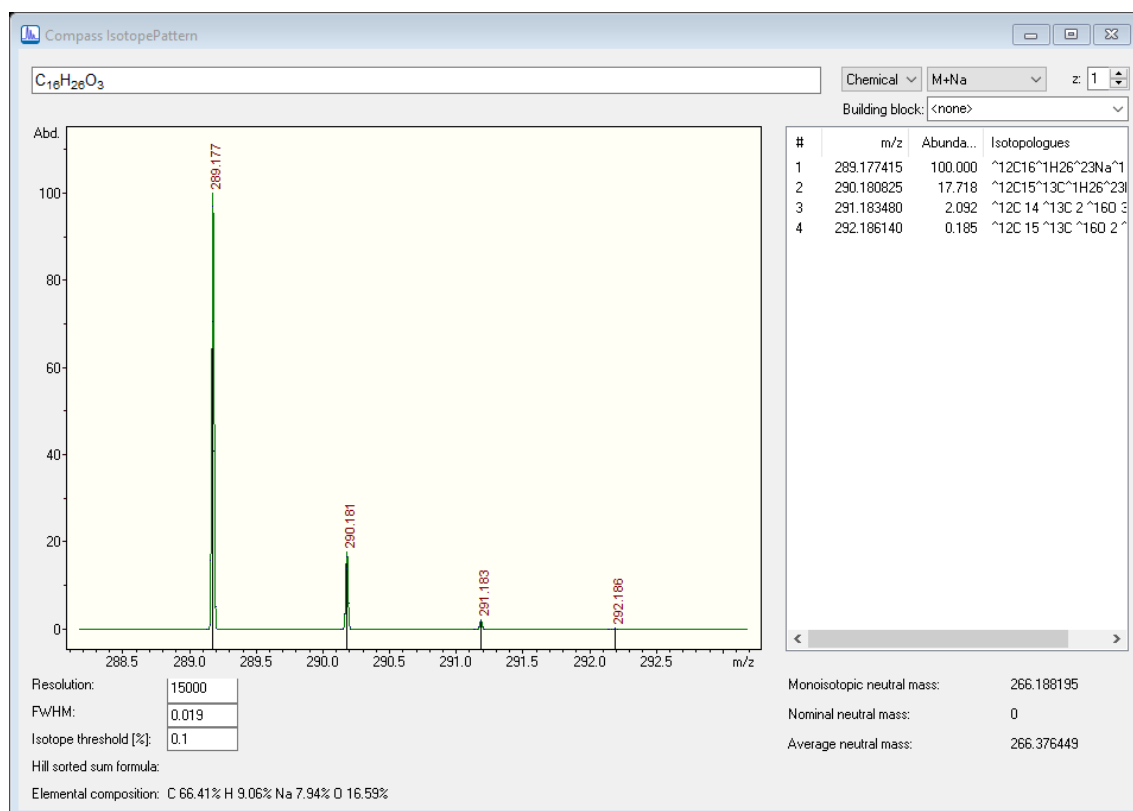
4.1 Hmotnostně spektrometrická analýza JH III

4.1.2 Predikované hodnoty m/z JH III

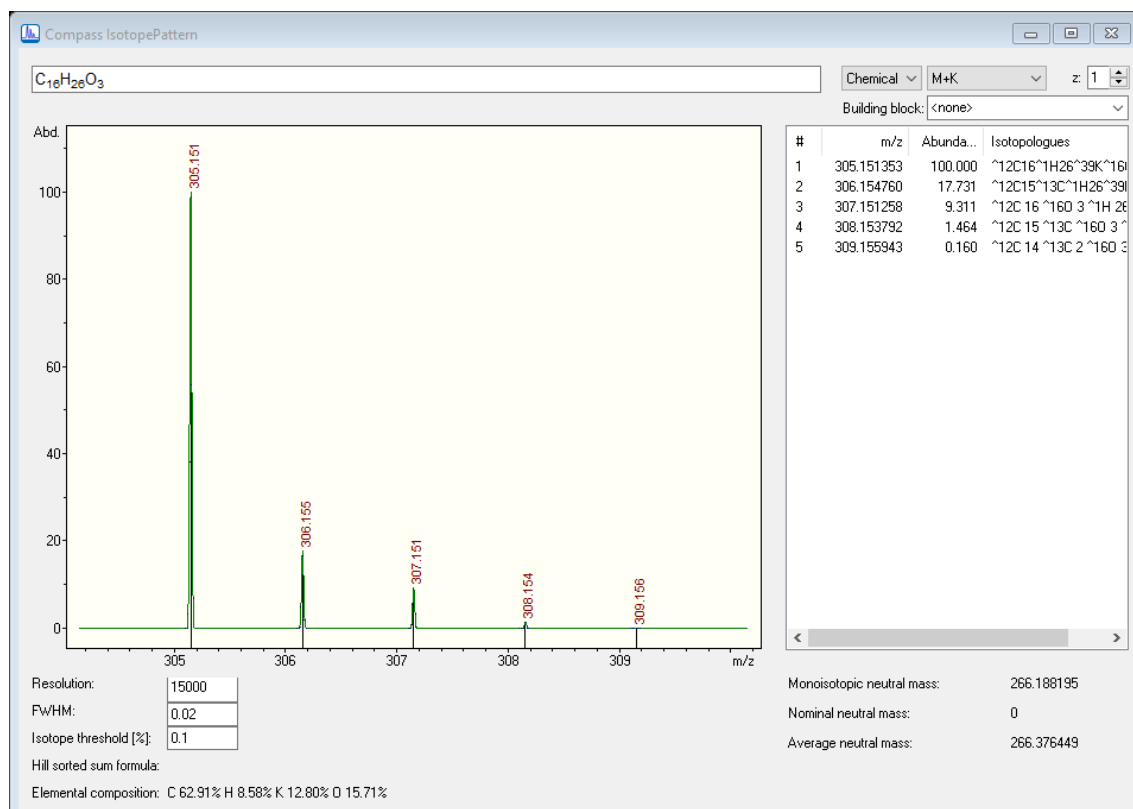
Pomocí programu Compass Isotope Pattern byly vypočteny hodnoty m/z pro molekulu JH III. Spočítány byly hodnoty m/z pro nejčastěji se vyskytující adukty v hmotnostních spektrech. Na obr. 11 je vypočtená hodnota m/z pro protonizovaný JH III, na obr. 12 pro adukt juvenilního hormonu se sodíkem, na obr. 13 pro adukt juvenilního hormonu s draslíkem, na obr. 14 pro protonizovaný dimer juvenilního hormonu a na obr. 15 pro adukt dimery juvenilního hormonu se sodíkem.



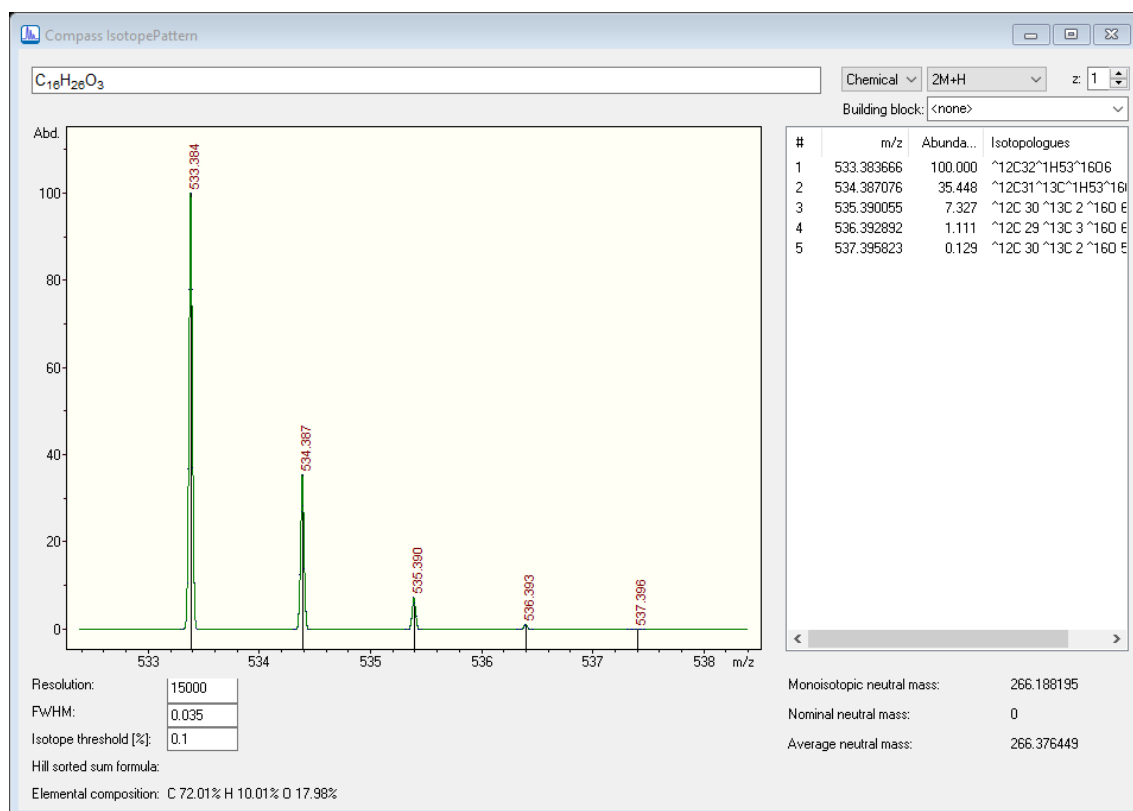
Obr. 11 Vypočtená hodnota m/z pro protonizovaný JH III ($m/z = 267,195$) a jeho izotopy.



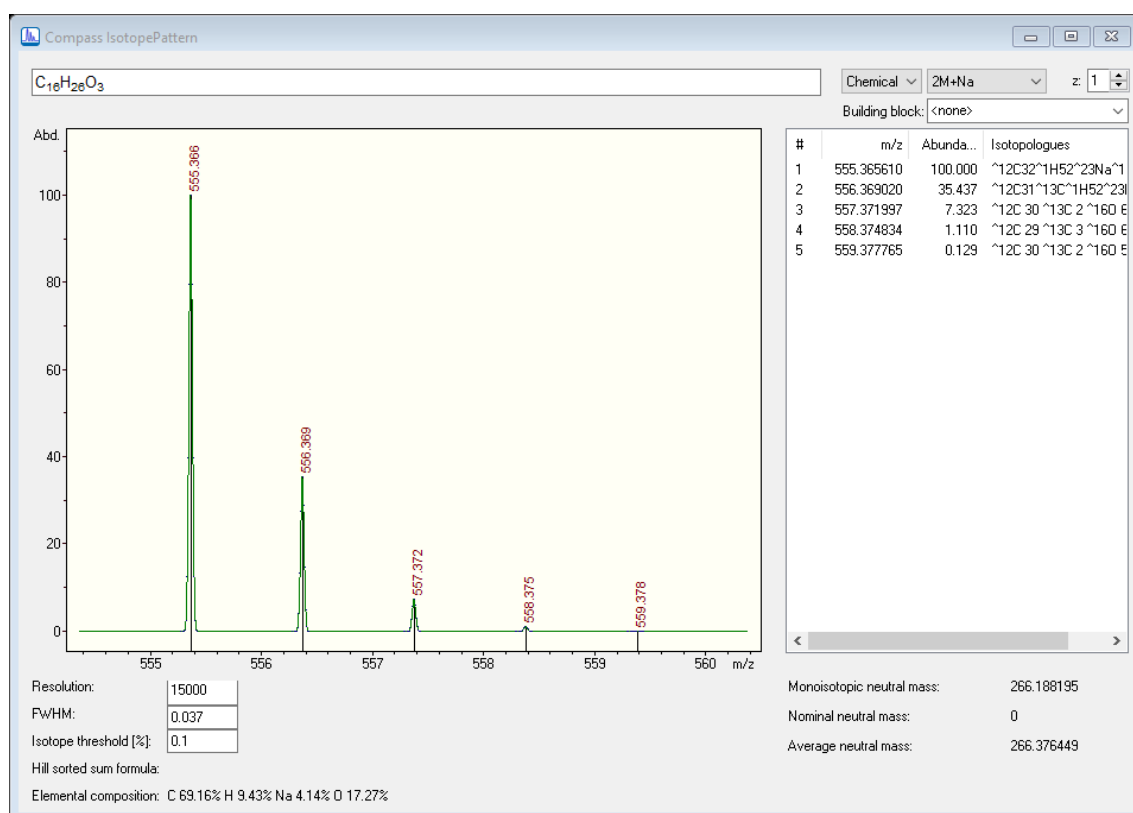
Obr. 12 Vypočtená hodnota m/z pro adukt JH III se sodíkem ($m/z = 289,177$) a jeho izoty.



Obr. 13 Vypočtená hodnota m/z pro adukt JH III s draslíkem ($m/z = 305,151$) a jeho izoty.



Obr. 14 Vypočtená hodnota m/z pro protonizovaný dimer JH III ($m/z = 533,384$) a jeho izotopy.

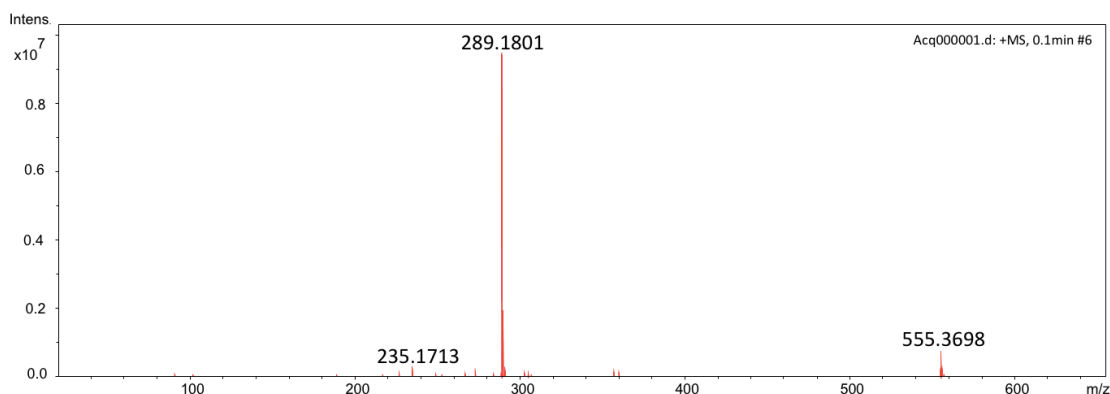


Obr. 15 Vypočtená hodnota m/z pro protonizovaný adukt dimeru JH III se sodíkem ($m/z = 555,366$) a jeho izotopy.

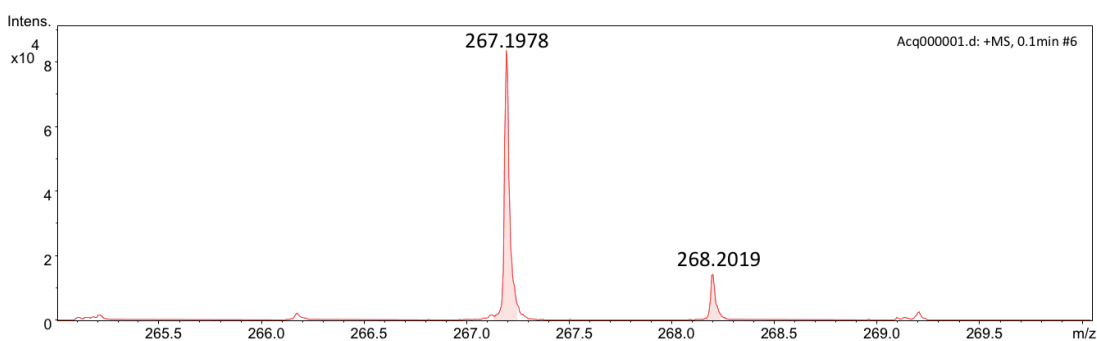
4.1.3 Experimentální MS a MSMS spektra JH III

Hmotnostní spektra byla změřena po přímém nástřiku standardu JH III do hmotnostního spektrometru. Naměřená MS spektra pro molekuly JH III odpovídala hodnotami m/z předpokládaným hodnotám, které se vypočetli v programu Compass Isotope Pattern, pro protonizovaný juvenilní hormonu III ($m/z = 267,1989$) (Obr. 17), adukt juvenilního hormonu III se sodíkem ($m/z = 289,1810$) (Obr. 18) a protonizovaný dimer juvenilního hormonu III ($m/z = 555,3699$) (Obr. 19)

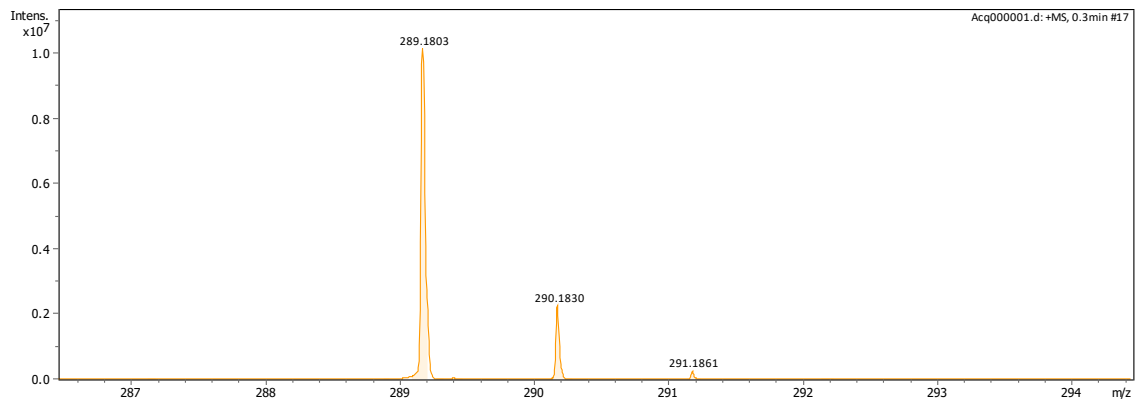
Největší zastoupení ve standardu JH III po přímém nástřiku měla molekula aduktu JH III se sodíkem (Obr. 16). Dále je to viditelné i na jednotlivých MS spektrech, kdy intenzita signálu pro měřená MS spektra jednotlivých molekul byla pro adukt JH III se sodíkem nejvyšší (Obr. 18) a pro protonizovaný JH III (Obr. 17) nejmenší.



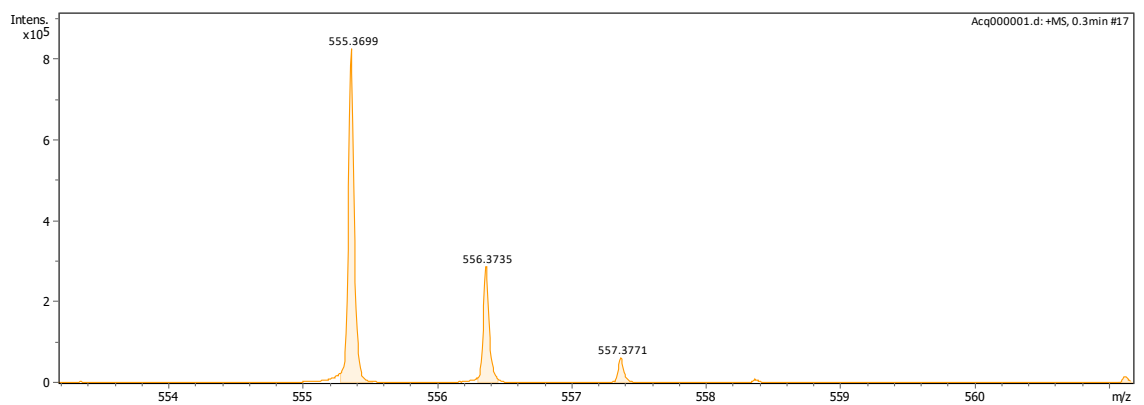
Obr. 16 MS spektrum pro standard JH III po přímém nástřiku.



Obrázek 16 MS spektrum pro protonizovaný JH III ($m/z = 267,1978$) a jeho izotopy.

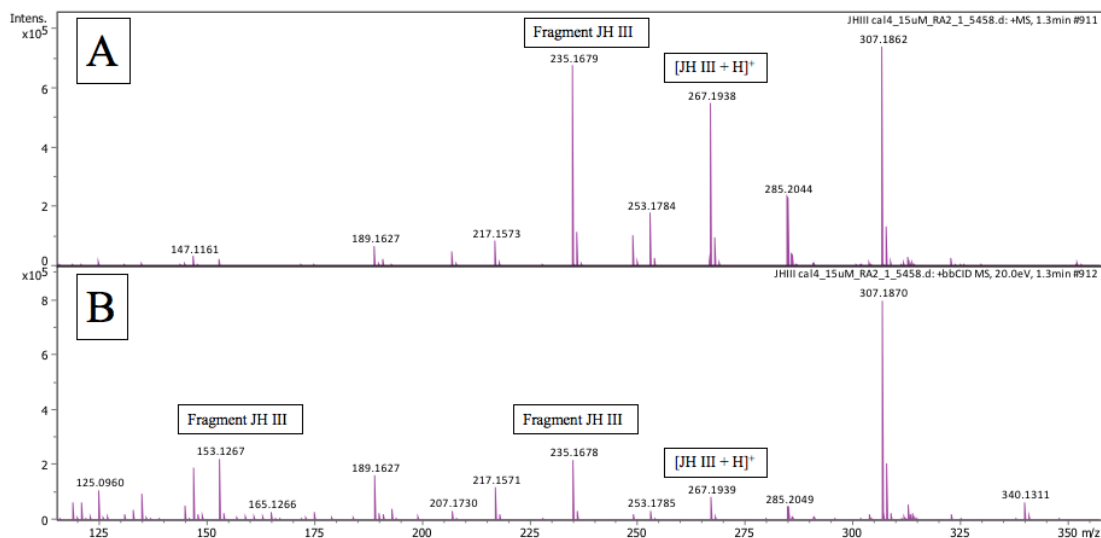


Obr. 18 MS spektrum pro adukt JH III se sodíkem ($m/z=289,1803$) a jeho izotopy.



Obr. 19 MS spektrum pro protonizovaný dimer JH III ($m/z = 555,3699$) a jeho izotopy.

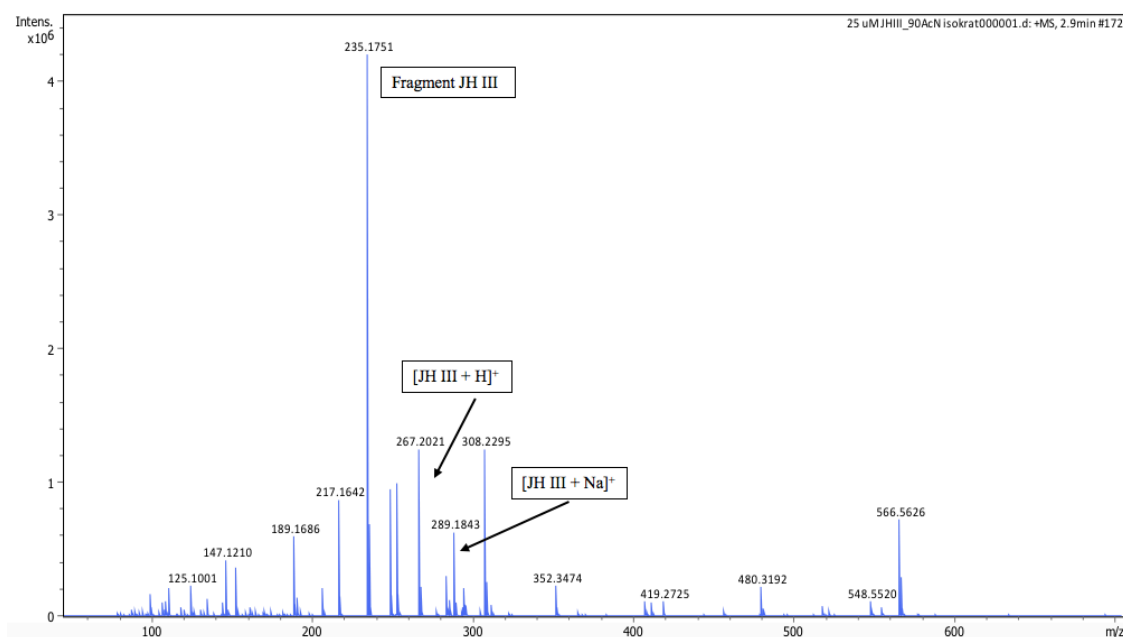
Při optimalizaci podmínek hmotnostní spektrometrie ve spojení s kapalinovou chromatografií bylo zjištěno, že se molekula JH III samovolně rozpadá na fragment ($m/z = 235,1679$) (Obr. 20 A). Po fragmentaci molekuly v bbCID módu měření vzniká několik fragmentů JH III, mezi nimiž je výše zmíněný fragment $m/z = 235,1679$ a pak i $m/z = 153,1267$ (Obr. 20 B). Pík o $m/z = 307,1870$ se nepodařilo interpretovat, pravděpodobně se ale jedná o nečistotu.



Obr. 20: A - MS spektrum pro standard JH III; B – bbCID MS spektrum pro JH III

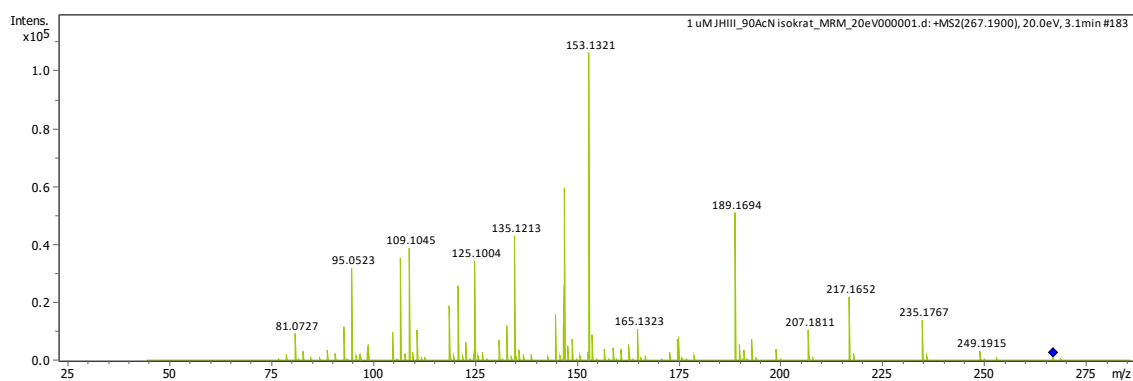
Obr. 21 znázorňuje MS spektrum pro standard JH III, na němž jsou viditelné píky pro fragment JH III o $m/z = 235,1751$, protonizovaný JH III a adukt JH III se sodíkem. Stejně jako Zhairigetu *et al.* (2007) (Obr. 7) se podařilo získat píky (Obr. 21) pro fragmenty a ionty o $m/z = 235,1$ (největší pík); $m/z = 189,1$; $m/z = 217,2$; $m/z = 289,2$.

Westerlund *et al.* (2004) zaznamenali pík pro adukt JH III se sodíkem ($m/z = 289$), který extrahovali z hemolymfy *Acyrtosiphon pisum* a *Myrmicaria eumenides*.



Obr. 21 MS spektrum pro JH III.

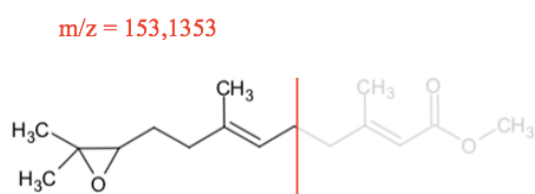
MSMS hmotnostní spektra byla také měřena v MRM módu, přičemž typické fragmentační píky korespondují s MSMS spektrem změřeným v bbCID módu. Největší pík představuje fragment o $m/z = 153, 1353$. Na fragmentaci molekuly JH III je vhodná energie 20 eV, která byla použita i pro měření v bbCID módu. Na obr. 22 je záznam MSMS změřený v MRM módu spektra molekuly JH III.



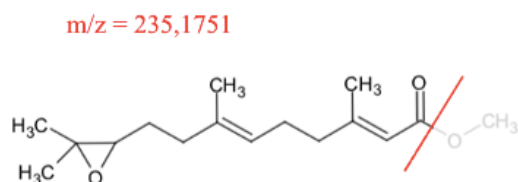
Obr. 22 MRM MS spektrum pro fragmenty JH III.

4.1.4 Interpretace fragmentačních iontů v MSMS spektrech

Fragment JH III o $m/z = 153,1353$ vzniká po odštěpení OCH_3 skupiny (Obr. 23). Tento fragment má nejvyšší intenzitu signálu na MSMS spektru pro standard JH III (Obr. 22). Dále se ve spektru vyskytuje pík o $m/z = 235,1820$, který odpovídá odštěpení molekuly znázorněné na obr. 24. Tento pík je také zmíněn v publikaci Zhairiget *et al.*, (2007), kteří jej stanovili v hemolymfě mšic a *Melanoplus sanguinipes* pomocí LC-ESI-MS/MS. Dále ho zmiňuje Muchamp *et al.* (1985), kteří měřili JH III izolovaný z *Locusta migratoria* pomocí GC/MS.



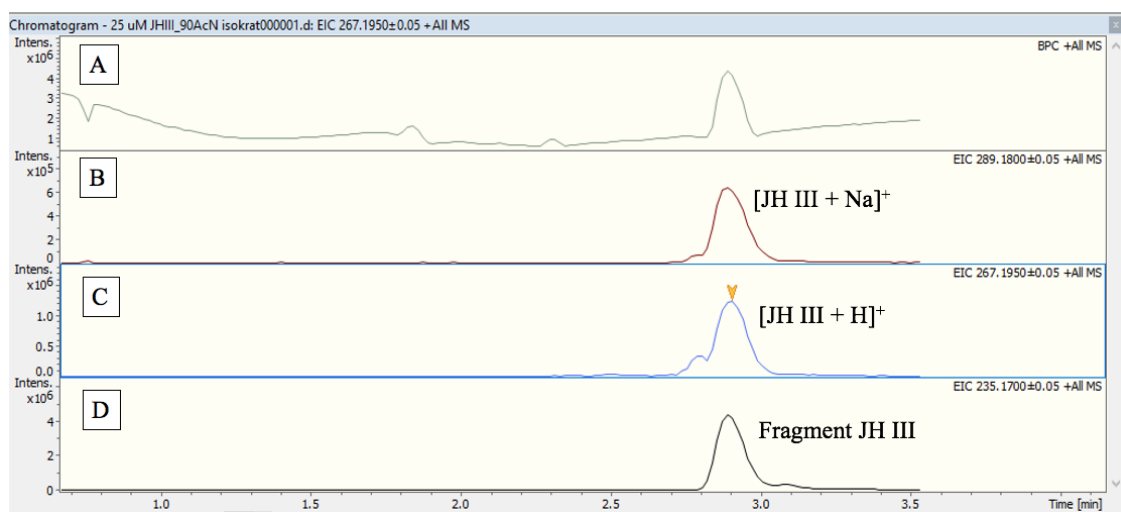
Obr. 17 Fragment JH III o $m/z = 153,1353$.



Obr. 18 Fragment JH III o $m/z = 235,1751$.

4.1.5 Chromatografické chování JH III

Chromatografické záznamy na obr. 25 zobrazují BPC chromatogram (A), extrahované chromatogramy pro iont $m/z = 289,18$ (B), iont $m/z = 267,195$ (C) a iont $m/z = 235,170$ (D), přičemž BPC chromatogram (A) v sobě zahrnuje všechny molekuly detekovatelné v daný čas a při daném nastavení hmotnostního spektrometru. Těmto chromatografickým záznamům odpovídalo MS spektrum na obr. 21, na kterém můžeme vidět píky pro jednotlivé ionty a fragmenty JH III.



Obr. 19 Chromatogramy pro standard JH III – BPC chromatogram (A), adukt JH III se sodíkem (B), protonizovaný JH III (C) a fragment JH III o $m/z = 235,170$ (D).

4.2 Juvenilní hormon získaný z *Apis mellifera*

Juvenilní hormon se v žádném ze vzorků nepodařilo detekovat (Tab. 5; Tab 6), a to ani ve vzorcích, které obsahovaly přídavek standardu JH III. Juvenilní hormon se nejspíše někde během extrakce ztrácel. Pravděpodobně došlo k jeho adhezi na plastové zkumavky nebo skleněné vialky. Problém s adhezí na sklo/plast by se možná dal vyřešit použitím silanových, teflonových nebo carbowax zkumavek (Giese *et al.*, 1977).

Další možností, proč se JH III nepodařilo detekovat, mohlo být to, že se ve včele nachází malé množství JH III, které je pod mezí detekce UHPLC–ESI–QTOF. Westerlund *et al.* (2004) měli detekční limit LC–MS/MS pro JH III 6 pg a limit pro kvantifikaci 20 pg. Zhairigetu *et al.*, (2007) měli detekční limit 8 pg. V případě, že by byla mez detekce UHPLC–ESI–QTOF v řádech pikogramů, tak by ale mělo být možné detekovat JH III ve vzorcích s přídavkem 5 µl standardu JH III o koncentraci 1 µmol·l⁻¹ odpovídající 5 pmolů, respektive hmotnosti 1,33 ng, což se ale nepodařilo.

Do budoucna by bylo vhodné vyzkoušet extrakci dalšími rozpouštědly jako je např. isooktan, pomocí kterého stanovovali JH III ve své práci např. Zhairigetu *et al.*, (2007) nebo Westerlund *et al.* (2004), kteří extrahovali JH III směsí isookatan-methanol. Dále by se mohlo zkusit změřit JH III z více včel– ve vzorku by se tak nacházelo více JH III. Zhairigetu *et al.*, (2007) extrahovali JH III pro jeden vzorek z 10 kyjatek hrachových (*Acyrtosiphon pisum*). Nebo jako Westerlund *et al.* (2004) změřit JH III přímo z odebrané hemolymfy.

Tab. 5 Přítomnost JH III ve vzorcích, které byly extrahovány hexanem nebo acetonem

Tělní část	Počet kusů	Rozpouštědlo	Standard JH III (1 µmol·l ⁻¹)	Přítomnost JH III po detekci UHPLC-ESI-QTOF
hlava	1	hexan	–	Ne
hlava	3	hexan	–	Ne
hrud'	1	hexan	–	Ne
hrud'	3	hexan	–	Ne
hlava	1	aceton	–	Ne
hlava	3	aceton	–	Ne
hrud'	1	aceton	–	Ne
hrud'	3	aceton	–	Ne

Tab. 6 Přítomnost JH III ve vzorcích, které byly extrahovány hexanem a vodou, hexanem a methanolem, chloroformem, chloroformem a vodou.

Tělní část	Počet kusů	Extrakční činidlo	Standard JH III (1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Přítomnost JH III po detekci UHPLC-ESI-QTOF
zadeček	1	hexan + voda	–	Ne
zadeček	1	hexan + voda	Ano	Ne
hlava	1	hexan + voda	–	Ne
hlava	1	hexan + voda	Ano	Ne
zadeček	1	hexan + methanol	–	Ne
zadeček	1	hexan + methanol	Ano	Ne
hlava	1	hexan + methanol	–	Ne
hlava	1	hexan + methanol	Ano	Ne
zadeček	1	chloroform	–	Ne
zadeček	1	chloroform	Ano	Ne
hlava	1	chloroform	–	Ne
hlava	1	chloroform	Ano	Ne
zadeček	1	chloroform + voda	–	Ne
zadeček	1	chloroform + voda	Ano	Ne
hlava	1	chloroform + voda	–	Ne
hlava	1	chloroform + voda	Ano	Ne

5 ZÁVĚR

Bakalářská práce je zaměřena na juvenilní hormon a jeho funkci v dlouhověkosti včel. V teoretické části je zpracována literární rešerše týkající se poznatků o juvenilním hormonu, jeho metabolismu, funkci a metodách analýzy pro jeho stanovení. Dále je zde zpracována literární rešerše týkající se dlouhověkosti včely medonosné.

V experimentální části se optimalizovala metoda UHPLC-ESI-QTOF pro stanovení JH III. Naměřená MS spektra pro molekuly JH III odpovídala hodnotami m/z předpokládaným hodnotám, které se vypočetli v programu Compass Isotope Pattern. Největší pík představoval adukt JH III se sodíkem, dále byly zaznamenány píky pro protonizovaný JH III a protonizovaný dimer JH III. Optimalizovala se metoda kapalinové chromatografie na reverzní fázi s C_{18} UHPLC kolonou (ARION Polar®). Získaly se záznamy o retenčním čase pro standard JH III. Dále se získala MS spektra pro standard JH III. Zjistilo se, že se JH III v průběhu ionizace samovolně rozpadá na ion o $m/z = 235,1751$, u něhož byl zaznamenán největší pík, dále byly na naměřeném MS spektru viditelné píky pro protonizovaný JH III a adukt JH III se sodíkem. Po fragmentaci protonizované molekuly JH III se získalo MSMS spektrum, kde největší pík odpovídal fragmentu o $m/z = 153,1353$.

Extrakce JH III, který představuje lipofilní látku, z *Apis mellifera* se několika extrakčními činidly (hexan; aceton; chlorform; směs hexan-voda; směs hexan-methanol; směs chloroform – voda) z různých tělních částí (hlava, hrud', zadeček). V žádném ze vzorků se JH III nepodařilo detekovat. Metodu extrakce JH III je do budoucna nutné dále optimalizovat.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Ashok, M., Turner Ch., Thomas G. Wilson, T. G., 1998. "Insect juvenile hormone resistance gene homology with the bHLH-PAS family of transcriptional regulators". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (6): 2761-2766. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.2761>.

Beaurepaire, A., Piot, N., Doublet, V., Antunez, K., Campbell, E., Chantawannakul, P., Chejanovsky, N., *et al.* 2020. "Diversity and Global Distribution of Viruses of the Western Honey Bee, *Apis mellifera*". *Insects* 11 (4). <https://doi.org/10.3390/insects11040239>.

Bomtorin, A. D., Mackert, A., Rosa, G. C. C., Moda, L. M., Martins, J. R., Bitondi, M. M. G., Hartfelder, K., Simões, Z. L. P., Korb, J., 2014. "Juvenile Hormone Biosynthesis Gene Expression in the corpora allata of Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Female Castes". *PLoS ONE* 9 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086923>.

Corona, M., Velarde, R. A., Remolina, S., Moran-Lauter, A., Wang, Y., Hughes K. A., Robinson, K. A., 2007. "Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (17): 7128-7133. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701909104>.

Crone, E. J., Sutherland, T.D., Campbell, P.M., Coppin C. V., Russell, R. J., Oakeshott, J. G., 2007. "Only one esterase of *Drosophila melanogaster* is likely to degrade juvenile hormone in vivo". *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37 (6): 540-549. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.02.010>.

Dostálková, Silvie, Pavel Dobeš, Martin Kunc, Jana Hurychová, Mária Škrabišová, Marek Petřivalský, Dalibor Titěra, Jaroslav Havlík, Pavel Hyršl, and Jiří Danihlík. 2021. "Winter honeybee (*Apis mellifera*) populations show greater potential to induce immune response than summer ones after immune stimuli". *Journal of Experimental Biology* 224 (3). <https://doi.org/10.1242/jeb.232595>.

Ebeling, J., Knispel, H., Hertlein, G., Fünfhaus, A., Genersch, E., 2016. "Biology of *Paenibacillus* larvae, a deadly pathogen of honey bee larvae". *Applied Microbiology and Biotechnology* 100 (17): 7387-7395. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7716-0>.

Fluri, P., Wille, Gerig, H., Lüscher, M., 1977. "Juvenile hormone, vitellogenin and haemocyte composition in winter worker honeybees (*Apis mellifera*)". *Experientia* 33 (9): 1240-1241. <https://doi.org/10.1007/BF01922354>.

Fukuda, H. *et* Sekiguchi, K. (1966). Seasonal change of the honeybee worker longevity in Sapporo, North Japan, with notes on some factors affecting the life-span. *Jap. J. Ecol.* 16, 206-212. https://doi.org/10.18960/seitai.16.5_206

Gruna, B., Počuch, M., Přidal, A., Lstibůrek, J., 2016-. *Včelařství*. České Budějovice: PSNV.

Giese, Ch., Spindler, K. D., Emmerich, H., 1977. "The Solubility of Insect Juvenile Hormone in Aqueous Solutions and Its Adsorption by Glassware and Plastics". *Zeitschrift für Naturforschung C* 32 (3-4): 158-160. <https://doi.org/10.1515/znc-1977-3-403>.

Haydak *et* Mykola H. 1970. "Honey Bee Nutrition". *Annual Review of Entomology* 15 (1): 143-156. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.15.010170.001043>.

- Huang, Z.-Y., Robinson, G. E., Borst, D.W., 1994. "Physiological correlates of division of labor among similarly aged honey bees". *Journal of Comparative Physiology A* 174 (6). <https://doi.org/10.1007/BF00192722>.
- Chanchay, Pornchanan, Wanwipa Vongsangnak, Anchana Thancharoen, and Ajaraporn Sriboonlert. 2019. "Reconstruction of insect hormone pathways in an aquatic firefly, *Sclerotia aquatilis* (Coleoptera: Lampyridae), using RNA-seq". *PeerJ* 7. <https://doi.org/10.7717/peerj.7428>.
- Chen, Zhaorigetu, Klaus D. Linse, Tina E. Taub-Montemayor, and Mary Ann Rankin. 2007. "Comparison of radioimmunoassay and liquid chromatography tandem mass spectrometry for determination of juvenile hormone titers". *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37 (8): 799-807. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.05.019>.
- Cheong, Sam P. S., Juan Huang, Bendena, G. W., Tobe, S.S, Hui, J.H.L., 2015. "Evolution of Ecdysis and Metamorphosis in Arthropods: The Rise of Regulation of Juvenile Hormone". *Integrative and Comparative Biology* 55 (5): 878-890. <https://doi.org/10.1093/icb/icv066>.
- Jandera, P., "HILIC chromatografie: perspektivní technika separace polárních látek na polárních stacionárních fázích vevodně-organických mobilních fázích". *Chemagazín* 2011 (2): str. 9.
- Jindra, M., Tumova, S., Milacek, M., Bittova L., 2021. "A decade with the juvenile hormone receptor". *Genes and Endocrine Signaling in Development and Homeostasis*: 37-85. <https://doi.org/10.1016/bs.aiip.2021.03.001>.
- Záruba, K., 2016. In *Analytická chemie* 1st ed., 134 - 159. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze.
- King, L.E., et Tobe, S. S., 1993. "Changes in the titre of a juvenile hormone III binding lipophorin in the haemolymph of *Diptera punctata* during development and reproduction: Functional significance". *Journal of Insect Physiology* 39 (3): 241-251. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(93\)90095-9](https://doi.org/10.1016/0022-1910(93)90095-9).
- Knoll, S., Pinna, W., Varcasia, A., Scala, A., Cappai, M.G, 2020. "The honey bee (*Apis mellifera* L., 1758) and the seasonal adaptation of productions. Highlights on summer to winter transition and back to summer metabolic activity. A review". *Livestock Science* 235. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104011>.
- Konopova, B., et Jindra, M., 2007. "Juvenile hormone resistance gene Methoprene-tolerant controls entry into metamorphosis in the beetle *Tribolium castaneum*". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (25): 10488-10493. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703719104>.
- Konopova, B., et Jindra, M., 2007. "Juvenile hormone resistance gene Methoprene-tolerant controls entry into metamorphosis in the beetle *Tribolium castaneum*". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (25): 10488-10493. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703719104>.
- Kunc, M., Dobeš, P., Hurychová, J., Vojtek, L., Poiani, S. B, Danihlík, J., Havlík, J., Titěra, D., Hyršl, P., 2019. "The Year of the Honey Bee (*Apis mellifera* L.) with Respect to Its Physiology and Immunity: A Search for Biochemical Markers of Longevity". *Insects* 10 (8). <https://doi.org/10.3390/insects10080244>.
- Lourenço, A. P., Martins, J. R., Torres, F. A. S., Aline Mackert, Aguiar, L. R., Hartfelder, K., Bitondi, M. M. G., and Zilá Luz Paulino Simões. 2019. "Immunosenescence in honey bees (*Apis mellifera* L.) is caused by intrinsic senescence and behavioral physiology". *Experimental Gerontology* 119: 174-183. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2019.02.005>.

- Mackert, A., Nascimento, A. M., Bitondi, Klaus Hartfelder, M. M. G., Simões, Z. L. P., 2008. "Identification of a juvenile hormone esterase-like gene in the honey bee, *Apis mellifera* L. — Expression analysis and functional assays". *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 150 (1): 33-44. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.01.004>.
- Madigan, M. T. 2019. In *Brock biology of microorganisms* Fifteenth edition, 369-885. New York: Pearson.
- Mattila, H. R., Harris, J. L., G. W. Otis, G. W., 2001. "Timing of production of winter bees in honey bee (*Apis mellifera*) colonies". *Insectes Sociaux* 48 (2): 88-93. <https://doi.org/10.1007/PL00001764>.
- Mauchamp, B., Couillaud, F., Malosse, Ch., 1985. "Gas chromatography-mass spectroscopy analysis of juvenile hormone released by insect corpora allata". *Analytical Biochemistry* 145 (2): 251-256. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90358-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90358-6).
- Maurizio, A. et Hodges, F. E. D. 2015. "The Influence of Pollen Feeding and Brood Rearing on the Length of Life and Physiological Condition of the Honeybee Preliminary Report". *Bee World* 31 (2): 9-12. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1950.11094617>.
- Morgan, E. D., 2010. "Insect Hormones". *Comprehensive Natural Products II*: 127-151. <https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00093-9>.
- SEINO, A., Ogura, T., Tsubota, T., Shimomura, M., Nakakura, T., Tan, A., Mita, K., Shinoda, T., Nakagawa, Y., Shiotsuki, T., 2014. "Characterization of Juvenile Hormone Epoxide Hydrolase and Related Genes in the Larval Development of the Silkworm *Bombyx mori*". *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 74 (7): 1421-1429. <https://doi.org/10.1271/bbb.100104>.
- Sharma, A., Pillai, M.R.A., Gautam, S., Hajare, S.N., 2014. "MYCOTOXINS | Immunological Techniques for Detection and Analysis". *Encyclopedia of Food Microbiology*: 869-879. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00233-0>.
- Shinoda, T., 2016. "Juvenile Hormone". *Handbook of Hormones*: 564-e99-3. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801028-0.00099-4>.
- Skoog, D. A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, R. S., 2019. *Analytická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
- Steinhauer, N., Kulhanek, K., Antúnez, K., Human, H., Chantawannakul, P., Chauzat, M. P., van Engelsdorp, D., 2018. "Drivers of colony losses". *Current Opinion in Insect Science* 26: 142-148. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.004>.
- Trenczek, T., Zillikens, A., Engels, W., 1989. "Developmental patterns of vitellogenin haemolymph titre and rate of synthesis in adult drone honey bees (*Apis mellifera*)". *Journal of Insect Physiology* 35 (6): 475-481. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(89\)90054-1](https://doi.org/10.1016/0022-1910(89)90054-1).
- Vreeker, Gerda C. M., Wührer, M 2017. "Reversed-phase separation methods for glycan analysis". *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 409 (2): 359-378. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-0073-0>.
- Westerlund, S. A., et Hoffmann, K. H., 2004. "Rapid quantification of juvenile hormones and their metabolites in insect haemolymph by liquid chromatography?mass spectrometry (LC-MS)".

Analytical and Bioanalytical Chemistry 379 (3): 540-543. <https://doi.org/10.1007/s00216-004-2598-x>.

Wilson, Thomas G., and Judit Fabian. 1986. "A *Drosophila melanogaster* mutant resistant to a chemical analog of juvenile hormone". *Developmental Biology* 118 (1): 190-201. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(86\)90087-4](https://doi.org/10.1016/0012-1606(86)90087-4).

Wiśniewski, J. R., Muszyńska-Pytel, M., Krystyna Grzelak, and Marian Kochman. 1987. "Biosynthesis and degradation of juvenile hormone in corpora allata and imaginal wing discs of *Galleria mellonella* (L.)". *Insect Biochemistry* 17 (1): 249-254. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(87\)90167-3](https://doi.org/10.1016/0020-1790(87)90167-3).

Zauner, G., Deelder, A. M., Wührer, M., 2011. "Recent advances in hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) for structural glycomics". *ELECTROPHORESIS* 32 (24): 3456-3466. <https://doi.org/10.1002/elps.201100247>.

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

bbCID - broadband collision induced dissociation

ELISA - enzyme-linked immuno sorbent assay

ESI – ionizace elektrosprejem

GC – plynová chromatografie

HILIC – hydrofilní interakční chromatografie

HPLC – vysokotlaká kapalinová chromatografie

JH – juvenilní hormon

JHBP – juvenile hormone binding protein

JHDK – kinasa diolu juvenilního hormonu

JHE – esterasa juvenilního hormonu

JHEH – epoxidhydrolasa juvenilního hormonu

LC – kapalinová chromatografie

MF – mobilní fáze

MRM - multiple reaction monitoring

MS – mass spectrum

RIA – radioimunoanalýza

RT-qPCR – kvantitativní polymerázová reakce v reálném čase

UHPLC–ESI–QTOF – vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s ionizací elektrosprejem a hmotnostním analyzátozem doby letu

Vg – Vitellogenin