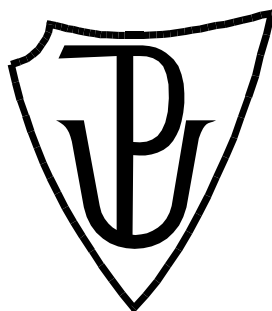


# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## Vliv výživy na humorální imunitní systém včel (*Apis mellifera*)

### DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	<b>Bc. Petra Wenzelová</b>
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jiří Danihlák, Ph.D.
Konzultant:	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok:	2018

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové 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 30. 4. 2018

Za věnovaný čas při vedení mé práce v laboratoři patří největší poděkování vedoucímu diplomové práce Mgr. Jiřímu Danihlíkovi, Ph.D. Mé poděkování patří také všem zaměstnancům Katedry biochemie UPOL za vstřícný a přátelský přístup během celého mého navazujícího magisterského studia. Ráda bych v této práci poděkovala Bc. Haně Dostálové za cenné rady při studiu. V neposlední řadě chci také poděkovat své rodině a nejbližším přátelům za lásku a podporu, které mi dávali po celou dobu studia.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Petra Wenzelová
Název práce	Vliv výživy na humorální imunitní systém včel ( <i>Apis mellifera</i> )
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Jiří Danihlák, Ph.D
Konzultant	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok obhajoby práce	2018

### Abstrakt

Část imunitního systému včely medonosné (*Apis mellifera*) je tvořena nespecifickými reakcemi humorální imunity. Mezi látky zajišťující humorální imunitu jsou řazeny mj. antimikrobiální peptidy. V poslední době roste zájem včelařů o vhodná krmiva pro jejich včelí společenstva. Žádoucí je posílit sociální imunitu včelstev.

Předmětem sledování byl vliv výživy s různě pozměněnými parametry na změnu hladin exprese genů antimikrobiálních peptidů abaecinu a apidaecinu, dále genu vitellogeninu a esterasy juvenilního hormonu (EC 3.1.1.59). Včely byly krmeny po dobu osmi dní roztokem sacharosy a různých medů, komerčně vyrobenými výživovými roztoky APIVITAL®, Apiinvert a AgenaBee®. Druhou skupinu krmných směsí tvořily stejné roztoky obohacené o esenciální aminokyseliny. Poslední den krmení byly včely vystaveny antigenu v podobě lipopolysacharidů (LPS), které byly přidány do sledovaných krmiv. Včely byly chovány *in vitro*. Pro měření hladin relativních expresí sledovaných genů bylo použito kvantifikační metody Real-Time PCR.

Vyšší úmrtnost včel byla sledována při krmení roztoky s přidáními esenciálními aminokyselinami o výsledné koncentraci  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  každé aminokyseliny v krmivu. Po přidání antigenu LPS ke sledovaným krmivům byl zpozorován opačný trend. Nejvyšší hladiny relativních expresí sledovaných genů byly změřeny po krmení roztoků sacharosy a jarních květových medů.

Klíčová slova	Výživa včely medonosné, abaecin, apidaecin, vitellogenin, esterasa juvenilního hormonu, humorální imunita.
Počet stran	70

Počet příloh

0

Jazyk

Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Petra Wenzelová
Title	The diet effect of nutrition in the humoral immune system of honey bee ( <i>Apis mellifera</i> )
Type of thesis	Master's
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Jiří Danihlák, Ph.D
Consultant	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
The year of presentation	2018

### Abstract

Part of the honey bee's immune system consists of non-specific humoral immune responses. Humoral immunity substances include, but are not limited to, antimicrobial peptides. Recently, the beekeepers are more and more interested in suitable feed for their bee communities. Main interest lies in strengthening the social immunity of hives.

The subject of the study was the effect of nutrition with variously modified parameters on the change of the levels of expression of the genes of the antimicrobial peptides abaecin and apidaecin, as well as the vitellogenin gene and the juvenile hormone esterase (EC 3.1.1.59). The bees were fed for eight days with a solution of sucrose and various honey, commercially produced APIVITAL®, Apiinvert and AgenaBee® nutritional solutions. The second group of feed mixtures consisted of the same solutions enriched with essential amino acid. On the last day of feeding, the bees were exposed to the lipopolysaccharide (LPS) antigen, which was added to the feed. The bees were kept *in vitro*. The Real-Time PCR quantification method was used to measure the relative levels of gene expression of the genes under study.

Higher bee mortality was observed when feeding solutions with added essential amino acids with a final concentration of  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  of each amino acid in the feed. After the addition of LPS antigen to the monitored feed, the opposite trend was observed. The highest level of relative expression of the monitored genes were measured after feeding sucrose and spring blossom honey.

Key words	Honeybee nutrition, abaecin, apidaecin, vitellogenin, juvenile hormone esterase, humoral immunity
-----------	---

Number of pages	70
Number of appendices	0
Language	Czech

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b>	11
<b>2</b>	<b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b>	12
2.1	Imunitní systém hmyzu	12
2.1.1	Fyzikální bariéra	12
2.1.2	Buněčná imunita	12
2.1.3	Humorální imunita	13
2.1.3.1	Antimikrobiální peptidy	13
2.1.3.1.1	Antimikrobiální peptidy včely medonosné ( <i>Apis mellifera</i> )	15
2.1.4	Lipopolysacharidy	17
2.2	Sociální imunita	17
2.2.1	Vybrané části sociální imunity včely medonosné ( <i>Apis mellifera</i> )	18
2.3	Dlouhověkost včel	19
2.3.1	Vliv vitellogeninu na dlouhověkost včel	19
2.3.2	Hormonální regulace juvenilním hormonem	21
2.4	Vliv výživy na imunitní systém, vitalitu a dlouhověkost včely medonosné ( <i>Apis mellifera</i> )	22
2.4.1	Základní složky včelí potravy	22
2.4.1.1	Med	22
2.4.1.1.1	5-hydroxymethylfurfural	23
2.4.1.2	Pyl	25
2.4.2	Další krmiva pro včely	26
2.5	Chov včel <i>in vitro</i>	29
2.6	Real-Time PCR	31
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	32
3.1	Materiál	32
3.1.1	Použité chemikálie	32
3.1.2	Biologický materiál	32
3.1.3	Přístrojové vybavení	33
3.1.4	Použité roztoky	33
3.1.5	Použité kity	34
3.2	Metody	35
3.2.1	Charakteristika krminých roztoků použitých pro laboratorní experiment	35
3.2.2	Příprava zásobních roztoků ke krmení včel	35
3.2.3	Rozvržení experimentálních klíček se včelami a jejich krmení připravenými roztoky	37
3.2.4	Chov včely medonosné ( <i>Apis mellifera</i> ) <i>in vitro</i>	37



3.2.5	Izolace a přečištění RNA z celých těl včely medonosné	38
3.2.6	Kontrola integrity RNA	39
3.2.7	Přepis izolované a přečištěné RNA do cDNA pomocí reverzní transkriptasy 40	
3.2.8	Použité primery pro Real-Time PCR	41
3.2.9	Kvantitativní Real-Time PCR (RT-PCR)	41
3.2.10	Použité statistické programy	42
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY</b>	<b>43</b>
4.1	Kontrola integrity RNA	43
4.2	Určení křivek životnosti	43
4.3	Procentuální zastoupení přeživších včel po přidání LPS	46
4.4	Závislost relativní genové exprese na užití experimentálních krmiv	49
4.5	Hladiny relativních genových expresí sledovaných genů po přidavku LPS	57
<b>5</b>	<b>DISKUZE</b>	<b>60</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR</b>	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA</b>	<b>66</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b>	<b>70</b>

## **Cíle práce**

Vypracování literární rešerše shrnující aktuální poznatky o změnách imunokompetence včelího plodu a dospělých včel.

Vypracování literární rešerše zaměřené na stresové faktory spojené s výživou, které ovlivňují imunitu jednotlivých včel.

Studium změn relativní exprese vybraných genů zapojených do humorální imunity včel.

## 1 ÚVOD

Včela medonosná (*Apis mellifera*) je hospodářsky významný eusociální hmyz. Studium včelí imunity má pro člověka ekonomický význam. Společně se čmeláky, mouchami a plno dalším hmyzem, jsou pro lidstvo důležité pro svoji schopnost opylovávat celou řadu rostlin, především pak zemědělské plodiny. Díky porozumění reakcím imunitního systému mohou být snáze kontrolováni včelí škůdci, a může být včelám zajištěno přežití v ekosystému. Člověk od včel získává mnoho produktů jako je med, propolis či včelí vosk. Pro rovnováhu je třeba včelám za tyto produkty poskytovat čisté prostředí úlu a zdraví nezávadné okolní prostředí. To vše by nestačilo bez přispění včelí výživy. V posledních letech dochází celosvětově k výrazným úbytkům včelstev nebo k jejich oslabení. Takové oslabení může být ovlivňováno přítomností řady parazitů či patogenů. Dochází k oslabení imunity jedinců a tím i k oslabení celé sociální imunity kolonií. K nejobávanějším hrozbám patří napadení včel kleštíkem včelím. Tento parazit oslabuje imunitní systém včel. Vědci se domnívají, že strava bohatší na bílkoviny v podobě pylové výživy má za následek silnější imunitní systém včel. Studium výživy a jejího dopadu na humorální imunitu včel může být využito v praktickém včelaření.

## **2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY**

### **2.1 Imunitní systém hmyzu**

Mezi základní homeostatické mechanismy organismů je řazen imunitní systém. Slouží jako ochrana před cizorodými vlivy v podobě změn vnějšího prostředí nebo při zásahu škodlivých látek, cizích organismů či mikroorganismů, které se v přírodě vyskytují. Základními funkcemi imunity jsou obranyschopnost, autotolerance (rozpoznání vlastních tkání) a imunitní dohled (rozpoznání vlastních tkání s pozměněnou funkcí) (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Hmyz řadíme do kmene členovců v rámci velké skupiny bezobratlých. Základem imunitního systému a jeho imunitních odpovědí bezobratlých je nespecifická imunita, označována též termíny neadaptivní či vrozená imunita. Nespecifická imunita bezobratlých se vyznačuje rychlou imunitní odpovědí. Imunitní systém bezobratlých nemá tzv. imunologickou paměť na rozdíl od obratlovců, kteří disponují specifickými imunitními mechanismy, pak mluvíme o tzv. adaptivní imunitě, tedy o získaných imunitních procesech během jejich životního vývoje (Linh *et al.*, 2008).

Imunitní systém bezobratlých, a tedy i hmyzu, lze rozdělit na tři základní části, a to na fyzikální bariéru, buněčnou imunitu a humorální imunitu (Turner, 1994).

#### **2.1.1 Fyzikální bariéra**

Fyzikální bariéra tvoří první vrstvu, která chrání tělo před vstupem vnějších patogenů. Mezi fyzikální bariéry patří např. kutikula, slizové vrstvy, různý typ schránek nebo střevní stěna, u ní hlavně peritrofitická membrána. Mezi prvky fyzikální bariéry můžeme také zařadit i změny fyziologické, které jsou spojeny se změnami pH, např. v trávicím traktu hmyzu nebo změny biofilmu symbiotických mikroorganismů, jež zabraňují vnějšímu cizorodému vniknutí. Pokud dojde k narušení této fyzikální bariéry, zaktivují se další ochranné a obranné součásti - humorální a buněčná imunita (Turner, 1994; Crailsheim a Riessberger-Galle, 2001; Olofsson a Vásquez, 2008).

#### **2.1.2 Buněčná imunita**

Imunitní reakce, které jsou zprostředkovávány buňkami imunitního systému, jsou součástí tzv. buněčné imunity. Imunitní odpovědi typu buněčného a humorálního jsou velice úzce spjaté. Mezi buněčné imunitní odpovědi jsou řazeny koagulace, hojení

zranění, fagocytóza, cytotoxicita, nodulace a enkapsulace (Turner, 1994; Sinpoo *et al.*, 2018).

Specifické buňky, které zajišťují výše uvedené mechanismy, se nazývají hemocyty. Některé hemocyty jsou úzce spojeny i s látkami, které jsou produkovány v rámci humorální imunitní odpovědi. Jde o lektiny, fenoloxidasový systém, antimikrobiální peptidy (AMP) a lysozym. Nejvíce zastoupenými druhy hemocytů v hemolymfě hmyzu jsou plasmocyty, granulocyty, prohemocyty a oenocyty (Metheniti *et al.*, 2001; Cunha *et al.*, 2009). S věkem se zastoupení hemocytů mění (Amaral *et al.*, 2010).

Během procesu fagocytózy buňky nachází, pohlcují a zneškodňují patogenní mikroorganismy, které by mohly zapříčinit vyvolání různých nemocí. Pomocí cytotoxických látek dochází k usmrcování patogenů a parazitů. Proces imunitní odpovědi hemocytů, při níž dochází k agregaci buněk proti velkému množství patogenního organismu, se nazývá nodulace. Pojmem enkapsulace označujeme obalení větších buněk cizorodých patogenů. Buňky jsou obaleny hemocyty, které následně nekrotizují celý buněčný agregát. Proces probíhá v řádech několika dnů (Gillespie *et al.*, 1997; Hořejší a Bartůňková, 2009).

### **2.1.3 Humorální imunita**

Humorální imunitu lze označit spojením látková imunita. Patří sem nejen buněčné produkty, ale i látky, které se vyskytují v organismu a mají imunitní funkci. Složky humorální nespecifické imunity vytvářejí celistvý systém, který reaguje řádově v minutách na přítomnost škodlivých látek. Tyto složky nejsou ovlivňovány předchozím stykem s antigenem. Nemají tedy tzv. imunologickou paměť. Mezi komponenty humorální imunity jsou řazeny antimikrobiální peptidy, lysozym (EC 3.2.1.17), fenoloxidasový systém a aglutininy (lektiny) (Hořejší a Bartůňková, 2009; Turner 1994). Většina těchto látek je sekretována v tukovém tělese (biosyntetický orgán, analog jater u obratlovců). Mohou být produkovány a přítomny i v hemolymfě. Množství těchto látek je závislé také na fázi vývoje a pohlaví (Laughton *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2017; Sinpoo *et al.*, 2018).

#### **2.1.3.1 Antimikrobiální peptidy**

Antimikrobiální peptidy (AMP) byly izolovány napříč všemi živými organismy od prokaryot až po člověka. AMP jsou geneticky kódovány a ribosomálně syntetizovány. Společnou charakteristikou je krátký řetězec obsahující 9 – 60 aminokyselin, tepelná

stabilita a většina z nich má pozitivní náboj (Li *et al.*, 2012). Antimikrobiální peptidy fungují jako jedna ze součástí prvních obranných mechanismů proti infekčním mikroorganismům. Je to jeden z důležitých evolučních mechanismů. Každý živý organismus je neustále podroben útoky různých druhů patogenů. Je tedy potřeba, aby organismus uměl dostatečně rozeznat patogeny a mohl se proti nim bránit. AMP mohou být v krátkém časovém intervalu doručeny do místa infekce a zabránit tak šíření patogenu (Hancock, 2001; Cooper a Alder, 2006).

Po napadení hmyzího jedince jsou AMP syntetizovány především tukovým tělesem, některými druhy hemocytů, střevním epitelem a reprodukčním ústrojím. Následně jsou aktivní AMP uvolněny do hemolymfy. U vyšších organismů se vyskytují především v tkáních, vystavených vzdušným patogenům. Mnoho AMP u vyšších organismů funguje multifunkčně jako signální molekuly, imunitní modulátory či mitogeny (Vilmos a Kurucz, 1998; Hancock, 2001; Cooper a Alder, 2006; Shagghi *et al.*, 2018).

Mechanismus imunitní reakce zprostředkované AMP spočívá v jejich interakci s povrchovými molekulami zabudovanými do vnějších membrán patogena. Kladně nabitá AMP tvoří elektrostatickou vazbu se záporně nabitou membránou bakterie, přesněji s lipopolysacharidy (LPS), které jsou na povrchu membrány Gram-negativních bakterií. Dále takovou vazbu tvoří s peptidoglykany, které se nachází na povrchu membrán Gram-negativních i Gram-pozitivních bakterií, a s  $\beta$ -1,3-glukany, které jsou zabudovány do buněčné stěny hub. Po navázání AMP s kladným nábojem dochází ke změně membránového potenciálu a vytvoření membránových kanálků, skrz které mohou procházet menší proteiny nebo hydrofobní látky. Jejich průnik do buňky napomáhá lýze bakteriálních buněk (Hancock 1997; Randolt *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2010).

Cílem AMP nemusí být pouze membrány a narušení jejich integrity. V posledních 20 letech byl u desítek AMP nastíněn další typ mechanismu účinku, a to zásah do intracelulárních procesů patogena. Tyto peptidy membránou pouze pronikají bez jejího poškození a jsou translokovány do cytoplasmy bakterie. V cytoplasmě dochází k jejich hromadění či navázání na cílovou molekulu, což má za následek zásah do různých intracelulárních procesů. AMP tak mohou uvnitř buňky působit na regulaci enzymové aktivity, dále na inhibici replikace DNA, buněčného dělení, proteosyntézy či syntézy buněčné stěny (Teixeira *et al.*, 2012).

Díky svému mechanismu působení proti bakteriálním agens skýtají AMP ve farmakologické praxi výhodu nad konvenčně užívanými antibiotiky. Zavedením AMP jako terapeutik pro léčbu bakteriálních infekcí by se dala obejít stále častěji vznikající rezistence bakterií k nadužívaným antibiotikům. Farmakologická aplikace AMP se proto setkává se značným zájmem a v budoucnosti se předpokládá vyšší použití těchto látek (Li *et al.*, 2012).

K dnešku je známo podle databáze antimikrobiálních peptidů (APD, Antimicrobial Peptide Database) přes 280 AMP nacházejících se u hmyzu. Lze je řadit do čtyř skupin: peptidy bohaté na prolin, peptidy bohaté na glycin, hmyzí defensiny a cecropiny (Li *et al.*, 2012).

#### 2.1.3.1.1 Antimikrobiální peptidy včely medonosné (*Apis mellifera*)

Po infikaci bakteriemi byly v hemolymfě včely medonosné detekovány AMP abaecin, apidaeciny, defensiny a hymenoptaecin, v mateří kašičce jelleiny a royalisin, mellitin byl pak zaznamenán ve včelím jedu (Klaudiny *et al.*, 2009).

Abaecin i apidaeciny řadíme mezi peptidy bohaté na prolin a patří do skupiny kationických lineárních peptidů. Obsah prolinu v řetězci je alespoň 25 % a jejich aminokyselinové sekvence se navzájem podobají (Li *et al.*, 2012).

Abaecin byl poprvé charakterizován v roce 1990. Jedná se o kationický peptid kódovaný 34 aminokyselinami - YVPLPNVPQPGRRPFPTFPQGQPFNPKIKWPQGY. Jeho obsah v hemolymfě je nižší než u apidaecinu. Vzhledem k tomu, že se abaecin ve svém antimikrobiálním účinku liší od apidaecinů a diptericinů, je řazen mimo tyto dvě skupiny peptidů. V hemolymfě se jeho maximální množství nachází cca 48 hodin od zásahu infekce (Casteels *et al.*, 1990). Dle prostředí, ve kterém tento peptid působí, se liší jeho antimikrobiální aktivita. Nevyšší účinek byl zaznamenán v prostředí s nízkou iontovou silou. Účinnost abaecinu je ověřena jak proti  $G^+$  tak i proti  $G^-$  bakteriím, u nichž však je jeho efekt působení značně nižší a vyžaduje spolupráci s dalším typem AMP, jak bylo dokázáno ve studii Rahnamaeiana *et al.* (2015). Abaecin izolovaný z čmeláka *Bombus pascuorum* Scopoli a *Bombus terrestris* v experimentech vykazoval proti  $G^-$  bakteriím nízkou působnost při jeho velmi nízké koncentraci i po zvýšené koncentraci až na 200  $\mu\text{M}$ . Avšak při společném působení s peptidem hymenoptaecinem byla minimální účinná koncentrace těchto antimikrobiálních peptidů 1,25  $\mu\text{M}$ . Hymenoptaecin je další malý protein (tvořen 93 aminokyselinami) patřící ke

včelím AMP, indukovaným po infekci. Hymenoptaecin se spoluúčastní antimikrobiální reakce s peptidem abaecinem. Jejich součinnost zajišťuje vzájemné posílení jejich účinku. Hymenoptaecin vytváří póry do membrán bakterií. Těmito póry pak může abaecin pronikat a navázat se na vnitrobuněčný cíl, bakteriální chaperon DnaK (heat-shock protein). Díky tomuto mechanismu může abaecin inhibovat skládání proteinů a zabránit bakteriím v růstu a množení. Aminokyselinová sekvence obou spolupracujících peptidů si je velice podobná. Abaecin a hymenoptaecin jsou exprimovány současně a uvolňují se do hemolymfy během obranných reakcí vrozené imunity (Rahnamaeian *et al.*, 2015).

Jednou z nejvýznamnějších součástí humorální imunity včel je peptid apidaecin a jeho isoformy Ia, Ib, II a III. Prvně byly izolovány z hemolymfy včel medonosných (*Apis mellifera*) (Li *et al.*, 2006). Jiné isoformy tohoto peptidu bohatého na prolin byly izolovány i u jiných zástupců blanokřídlého hmyzu (*Hymenoptera*) např. u vos (*Vespula*) či včelám příbuzným čmeláků (*Bombus*) (Casteels a Tempst, 1994). C-konec obsahuje vysoce konzervovanou část osmi aminokyselin PRPPHPR(I/L). Změny provedené na C-konci mají za následek ztrátu antimikrobiální aktivity a krátká konzervovaná aminokyselinová sekvence je proto klíčovou částí molekuly peptidu. Aminokyselinová část peptidu na jeho N-konci je volná. Pokud se uskuteční změna na tomto konci, antimikrobiální aktivita peptidu bude rozdílná, ale zcela se neztratí (Li *et al.*, 2006). Primární sekvence apidaecinu včely medonosné (*Apis mellifera*) obsahuje 18 aminokyselin. Jeho isoformy se liší záměnou na 6. nebo 9. aminokyselině (viz Tab. 1). Proti G<sup>-</sup> bakteriím je apidaecin účinnější než jemu podobný abaecin (Casteels *et al.*, 1989).

Tab. 1: Aminokyselinové sekvence isoform apidaecinu (upraveno a převzato z Li *et al.*, 2006)

Isoforma	Aminokyselinová sekvence
Ia	GNNRPVYIPQPRPPHPRI
Ib	GNNROVYIPQPRPPHPRL
II	GNNRPIYIPQPRPPHPRL
III	GNNRPIYISQPRPPHPRL

V hemolymfě plodu je přítomen neaktivní prekurzor peptidu. Aby se peptid stal aktivním, musí dojít k odštěpení 8 aminokyselin signální sekvence z neaktivního



prekurzoru. U dospělců se tvoří aktivní forma peptidu bez signální sekvence. Apidaecin se vyznačuje vysokou antimikrobiální odpovědí, jejich antimikrobiální účinek se projevuje v krátkém časovém horizontu. Po infekci dochází k nárůstu jeho koncentrace už po cca 6 hodinách. Antimikrobiálně tyto peptidy nepůsobí proti houbám a kvasinkám. Při zásahu apidaecinů jako imunitní odpovědi po napadení mikroorganismem nedochází k narušení cytoplasmatické membrány bakterií, ale působí intracelulárně vazbou na bakteriální chaperon DnaK a chaperonin GroEL (Casteels a Tempst, 1994; Otvos, 2000).

#### **2.1.4 Lipopolysacharidy**

Lipopolysacharidy (LPS) jsou součástí vnějších membrán  $G^-$  bakterií. Zajišťují funkčnost a strukturální integritu membrán. Bakteriální LPS jsou v organismu rozpoznávány pomocí monocytů a makrofágů, které reagují rychlou vrozenou protizánětlivou odezvou v imunitním systému (Erridge *et al.*, 2002).

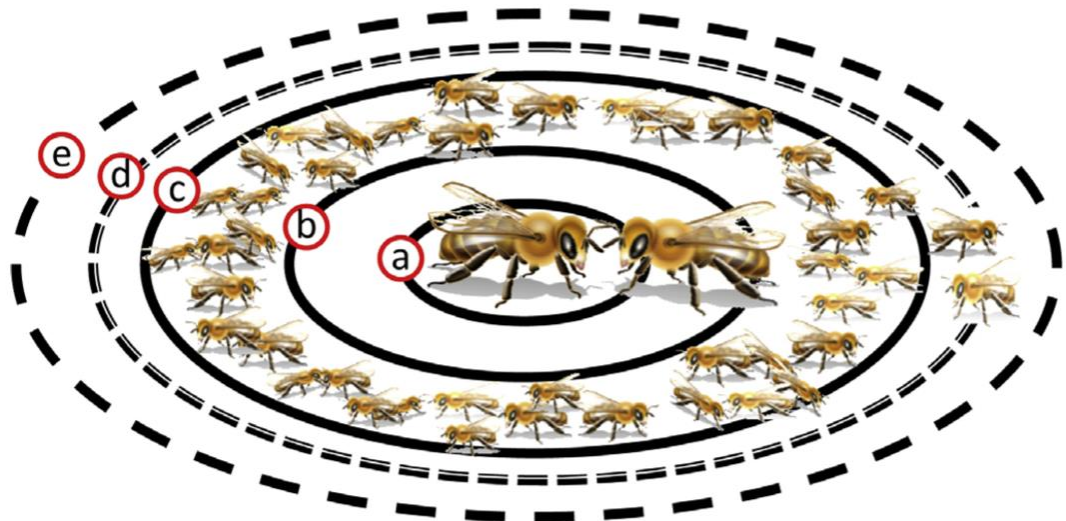
LPS jsou běžně používány pro stimulaci imunitního systému nejenom včel, ale obecně pro stimulaci imunitního systému hmyzu. Použití LPS má výhodu v tom, že stimulují imunitní odpověď v hostiteli a neříší infekci mezi nezasaženými jedinci (Richard *et al.*, 2008).

### **2.2 Sociální imunita**

Hmyzí společenství, ve kterých žije velký počet jedinců pohromadě, je označován jako eusociální. Uvnitř společenstev eusociálního hmyzu žijí stovky až tisíce jedinců stejného druhu, a každý člen plní svoji roli při vzájemné spolupráci. Dokáží pak společně např. zajišťovat výživu a výchovu plodu nebo se bránit proti patogenům a škůdcům. Koordinované chování jedinců žijících v koloniích napomohlo k vývinu celkové obranyschopnosti jednotlivých společenství. Taková obranyschopnost eusociálního hmyzu je nazývána sociální imunita a vyvinula se mezi některými skupinami blanokřídlého hmyzu, jako jsou např. včely, čmeláci, mravenci nebo vosy. Soustavná spolupráce takových jedinců zlepšuje jejich imunitní reakce (Cremer *et al.*, 2007). Sociální imunitní odpověď na úrovni celé kolonie pak odpovídá obdobným vlastnostem jako komplexní imunitní systém mnohobuněčného organismu. Jednotliví jedinci pracují jako jednotlivé buňky imunitního systému (Cremer a Sixt, 2009).

### 2.2.1 Vybrané části sociální imunity včely medonosné (*Apis mellifera*)

K obranným mechanismům včely medonosné patří odstraňování cizorodých látek z těla, jako jsou částice pylu, prachu nebo parazitů. Jde o tzv. autogrooming (péče včely o sebe sama). Kolektivně pak dospělé včely čistí nemocné a parazitované včely a plod. Toto chování je nazýváno allo-grooming (vzájemná péče o druhou včelu). Dalším obranným mechanismem včely je péče, při které se včely starají o čistotu hnízda (Jander, 1976; Wilson-Rich *et al.*, 2009). Včely zajišťují i tzv. undertaking neboli „pohřební službu,“ v rámci které včely vynášejí ven z úlu mrtvé jedince, popř. larvy. Tím zajišťují snížení kontaktu s potencionálními patogenními organismy a zvýšení sociální imunity (Hart a Ratnieks, 2001; Evans a Spivak, 2010). Díky sociální imunitě je zajištěna i stráž česna před vnějšími útočníky či přirozené hynutí mimo úlový prostor (Daníhlík a Petřivalský, 2015). Úrovně obrany včely medonosné jsou znázorněny na Obr. 1 (Evans a Spivak, 2010).



Obr. 1 Úrovně obrany včely medonosné (*Apis mellifera*) žijících v koloniích. (a) individuální imunita (fyzikální bariéra, buněčná a humorální imunita), (b) párová spolupráce s další včelou (např. allo-grooming), (c) obrana na úrovni kolonie (kastování, rozdělení úloh), (d) minimalizace vstupu cizích mikroorganismů do hnízda, (e) využívání jiných látek z okolí pro ochranu např. využití pryskyřic pro čištění hnízda (převzato z Evans a Spivak, 2010).

## 2.3 Dlouhověkost včel

### 2.3.1 Vliv vitellogeninu na dlouhověkost včel

Během výzkumů je stále více času věnováno procesům stárnutí včel. Existuje korelující vztah mezi dlouhověkostí včely a hladinou exprese genu prekurzorového žloutkového proteinu, vitellogeninu (Seehuus *et al.*, 2006).

Vitellogenin spadá do skupiny glykolipoproteinů, což jsou proteiny, které mají na sobě navázané jednotky mastných kyselin a sacharidů. Jedná se o samičí prekurzorový žloutkový glykolipoprotein, jehož exprese je řízená hormonálně a je produkován organismy samičího pohlaví, které produkují vajíčka. Vitellogenin izolovaný z včely medonosné (*Apis mellifera*) má molekulovou hmotnost 180 kDa (Wheeler a Kawooya, 1990). Jde o monomer vyskytující se v genomu v jedné alele. Aminokyselinová sekvence vitellogeninu je slabě konzervována, jak vyplývá z porovnání jeho sekvence u včely medonosné s jinými 19 vitellogeniny z 16 druhů hmyzu. Včelímu genu se nejvíce podobá aminokyselinová sekvence vitellogeninů druhů *Pimpla nipponica* a to z 58 % a *Athalia rosae* z 54 % z řádu blanokřídlého hmyzu (Barchuk, *et al.*, 2002; Piulachs *et al.*, 2003).

Včelí vitellogenin je produkován tukovým tělesem, nachází se v hemolymfě, kterou je také přenášen do cílových tkání, kterými jsou hltanové žlázy dělnic – pro výrobu mateří kašičky, a ovaria - pro produkci vajíček královen (Amdam *et al.*, 2003; Seehuus *et al.*, 2007).

Syntéza vitellogeninu se liší napříč kastami a časovým vývojem jedince. U včelích matek začíná již ve stádiu kukly cca 60 hod před proměnou v dospělce. Protein se začne hromadit v hemolymfě včelí matky během tří dnů a může představovat až 70 % jejich hemolymfových proteinů. Je produkován i v období, kdy včelí matky nekladou vajíčka. V nižších koncentracích se vitellogenin vyskytuje pak u dělnic, překvapivě byly zjištěny i velice nízké hladiny vitellogeninu u trubců. Hladina vitellogeninu je nejvyšší u mladých dělnic, které krmí plod, a to konkrétně v době, kdy včely dozrávají v dospělce. Během takového období je produkce vitellogeninu schopna zajistit 30 – 100 vajíček denně. Během prvních 7 dnů života dospělé dělnice může hladina vitellogeninu představovat až 40 % všech proteinů obsažených v hemolymfě. Po dosažení dospělého věku dojde k řadě změn v chování a fyziologii. Hladina exprese genu vitellogeninu s věkem klesá, a to má za následek opačný vzrůst hladiny genové exprese juvenilního

hormonu (JH). JH u dospělých starých matek a dělnic potlačuje produkci vitellogeninu během krmení. Může dojít k úplnému zastavení syntézy vitellogeninu. Produkci vitellogeninu v hypofaryngeálních žlázách (hltanových žlázách sloužících k produkci mateří kašičky) má za následek komplex mozku s přilehlou žlázou zvanou *corpus allatum*. Hltanové žlázy jsou spojené ze žlázovými aciny (Amdam *et al.*, 2003). Aciny jsou lalůčky, navzájem propojeny kanálky (Šobotník *et al.*, 2008). Vitellogenin v hltanových žlázách ovlivňuje samotnou tvorbu mateří kašičky krmiček. Pravděpodobně dodává mateří kašičce potřebné aminokyseliny a stává se tak nedílnou součástí výživy plodu (Amdam *et al.*, 2003).

Hypotézu o korelujícím vztahu výše popsaného vitellogeninu s dlouhověkostí včel formuloval Omholt (1988). Navrhl, že životnost včelí dělnice je ovlivněna její péčí o plod. V nepřítomnosti plodu dochází v hemolymfě k hromadění vitellogeninu. Tato akumulace pak ve fyziologii včely vede k delšímu dožití včel, za kterým stojí fakt, že vitellogenin nebyl upotřeben pro produkci potravy plodu (Amdam a Omholt, 2002).

Včelí plod tvoří tzv. feromon včelího plodu. Jedná se o směs 10 methyl- a ethyl-esterů mastných kyselin. Feromon včelího plodu byl identifikován na larvách. Ovlivňuje hladinu exprese genu vitellogeninu právě díky pravděpodobné spotřebě vitellogeninu pro tvorbu krmné kaše plodu (Amdam a Omholt, 2002; Le Contee *et al.*, 2006).

Hladina vitellogeninu u dospělce může být negativně ovlivněna i během jejich larválního vývoje, kdy na takových jedincích parazitovaly cizorodé organismy. Mezi takové parazity patří roztoč kleštík včelí (*Varroa destructor*), který představuje jednu z největších celosvětových hrozeb včelstev. Množí se na zavíčkovaném včelím plodu, který tak poškozují a oslabují (Egekwu *et al.*, 2018). Hladina exprese genu vitellogeninu u napadených jedinců je v dospělosti mnohem nižší než u jedinců nenapadených (Amdam *et al.*, 2004).

Na stárnutí organismu se podepisuje i oxidativní poškození intracelulárních proteinů (Nyström, 2005). Vitellogenin disponuje antioxidačními vlastnostmi, na kterých se podílí také jeho vazba na zinek (Seehuus *et al.*, 2006). Po snížení množství buněčné mRNA vitellogeninu metodou interference RNA bylo zjištěno, že vitellogenin chrání včelu před oxidačním poškozením způsobeným např. herbicidem s obsaženou látkou paraquat, který vyvolává tvorbu reaktivních forem kyslíku. Proto se včely, které

dosahují vyšší hladiny genové exprese vitellogeninu, dožívají vyššího věku, a to i přes vyšší míru vystavení oxidativním stresům (Seehuus *et al.*, 2006).

### 2.3.2 Hormonální regulace juvenilním hormonem

Endokrinní soustava hmyzu je řazena mezi nejdokonaleji prozkoumané systémy. Skládá se z několika center. Jedním z center je neurosekretorický systému mozku se dvěma přilehlými žlázami – *corpus cardiacum* a *corpus allatum*. Endokrinní soustava vylučuje tři základní skupiny hormonů, a to peptidické neurohormony, ekdysteroidy a juvenilní hormony (JH). V *corpora allata* probíhá biosyntéza JH, které jsou následně přímo vylučovány do hemolymfy, kterou jsou transportovány za pomoci bílkovinného nosiče JHBP („juvenile hormone binding protein“). JH patří do skupiny seskviterpenoidů a jejich molekuly obsahují methylesterovou skupinu na jednom konci a epoxidovou skupinu na druhém konci molekulového řetězce (Kodrík *et al.*, 2015).

Funkce JH spočívá v udržení jedince v larválním stádiu. V přítomnosti JH v hemolymfě dochází k zabránění nástupu metamorfózy zablokováním exprese genů pro její spuštění (Riddiford, 1996). Metamorfóza je pozastavena, dokud není larva na tento proces dostatečně zralá, a nemá dostatek hmoty pro dosažení stádia dospělého jedince. Zároveň tak dochází k navýšení hladiny prohormonu ekdysonu, který indukuje kuklení larev a podněcuje svlékací procesy larev. JH je zodpovědný za růst larev a zabezpečuje podržení stádia larvy při jejím svlékání. Během růstu larvy je sekrece JH nižší, až následně převáží působení ekdysonu. Dojde tak ke stádiu, kdy se larva zakuklí. Přísná regulace hladiny JH a ekdysonu je nutná pro normální metamorfózu a vývoj hmyzu (Kodrík, 2004).

Druhá důležitá funkce JH spočívá v řízení rozmnožování. U samic nízké hladiny JH stimulují příslušné geny k produkci vitellogeninu. Tím je zajištěna tvorba žloutku pro embryo. U samců JH stimulují činnost přídatných pohlavních žláz. V případě stimulace vitellogeneze JH mluvíme o hormonálně řízené genové expresi a vzájemném inhibičním účinku JH a vitellogeninu. JH jsou důležité i pro řadu jiných funkcí, jako je např. syntéza bílkovin, metabolismus, diapauza či hmyzí polymorfismus (Hartfelder, 2000).

U vysoce organizovaného eusociálního hmyzu včely vykazuje JH vysokou regulační roli ve vývoji fenotypů, a tím napomáhá v zařazení včel do příslušné kasty. Kasta včelám není určena geneticky, ale rozdíly v krmení mladých larev. Příslušné kasty mají i rozdílný endokrinní systém, který je ovlivněn též produkcí JH. Jednotliví jedinci mají

své úkoly ve společenství. Rozdělení není však pevně stanoveno, jelikož je třeba se přizpůsobovat potřebám kolonie. Mezi takové faktory může patřit např. potřeba zvýšení dělnic – krmiček, které se starají o přísun potravy malým larvám. V této kastě se uměle navýší titer JH, který potlačí syntézu vitellogeninu a na nějaký čas se včela stane dělnicí starající se o potomstvo (Mackert *et al.*, 2008).

Do metabolismu JH zasahují dva enzymy. Epoxidová skupina JH je odštěpena hydrolyticky za pomoci membránového epoxidasy juvenilního hormonu (EC 1.14.13.203), aktivního v tkáních. Methyl-esterová skupina je hydrolyzována enzymem esterasou juvenilního hormonu (JHE), (EC 3.1.1.59) (Kamita a Hammock, 2010). Jedná se o enzym ze skupiny karboxylesteras, který je syntetizován tukovým tělesem a následně uvolněn do hemolymfy. Je schopný v malých množstvích rychle a dlouhodobě regulovat hladinu JH jeho hydrolyzou, a to i za přítomnosti JHBP (Mackert *et al.*, 2008).

JHE je klíčová pro regulaci hladiny titru JH v hemolymfě během vývoje a reprodukce hmyzu (Mackert *et al.*, 2008). Biochemicky se jedná o enzym, který je schopen hydrolyzovat JH. Tento enzym má vysokou konstantu specifity ( $k_{cat}/K_m$ ) kvůli nízké hodnotě Michaelisovy konstanty ( $K_m$ ). JHE upřednostňuje estery, tvořené malým alkoholem (methyl- či ethylalkoholem) a kyselinou s dlouhým alkylovým řetězcem o stejné délce, jako je páteř JH (Campbell *et al.*, 1998). Díky této preferenci alkoholů dochází ke sterickeému omezení na aktivním místě JHE. Vyšší estery nemusí být hydrolyzovány za pomoci JHE vůbec nebo s výrazně nižší rychlostí. Studie sekvencí genu JHE z různých druhů hmyzu umožnily pochopit regulaci aktivity JHE. Kromě primární role v katabolismu JH plní JHE pravděpodobně i úlohu enzymového vychytávače. To je podpořeno faktem, že JHE má poměrně nízkou  $K_m$  a dosahuje maximální aktivity až po propadu koncentrací JH v hemolymfě (Kamita a Hammock, 2010).

## **2.4 Vliv výživy na imunitní systém, vitalitu a dlouhověkost včely medonosné (*Apis mellifera*)**

### **2.4.1 Základní složky včelí potravy**

Základní výživu včel tvoří med a pyl. Díky sběru nektaru a pylu je včelami zajištěno opylování rostlin. Včely také sbírají na větvích, jehlicích stromů a stéblech trav i medovici. Vedle těchto složek potravy zajišťují včely i sběr rostlinných pryskyřic

(propolis), které užívají pro tmelení spár v hnízdních dutinách. Propolis využívají i pro jeho antioxidační vlastnosti. Tenkou vrstvou jím pokrývají povrch plástů (Tautz, 2009).

#### **2.4.1.1 Med**

Med vzniká zahušťováním nektaru a medovice. Tuto směs si vzájemně včely předávají a současně zrající tekutinu obohacují o další enzymy a mikroorganismy (Weiß, 2005). Med také obsahuje aminokyseliny, minerály, vitaminy a proteiny, které se do medu dostávají pomocí pylových zrn či enzymů štěpící sacharidy. Obohacení medu o enzymy zapříčiňují především mikroorganismy střevní mikroflóry včel (Ptaszyńska *et al.*, 2016).

Do medu se enzymy dostávají při jeho výrobě prostřednictvím sekrecí slinných žláz dělnic (Olaitan *et al.*, 2007). U zdravých včel převažují až v 70% zastoupení především G<sup>-</sup> bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* (např. rod *Enterobacter*, *Escherichia*), z čeledi *Pseudomonadaceae* (rod *Pseudomonas*), či čeledi *Alcaligenaceae* (*Achromobacter*). Ve zbytku G<sup>+</sup> bakterií převažuje rod *Bacillus* a *Streptococcus*. Pouze 1 % připadá na kvasinky a další houby. V pylových zrnech mají vyšší zastoupení kvasinky rodu *Saccharomyces* nebo houby rodu *Candida*, dále bakterie rodu *Lactobacillus* či *Pseudomonas* (Ptaszyńska *et al.*, 2016). Dalšími primárními zdroji mikroorganismů mohou být prach, vzduch, nektar či venkovní špína. K naočkování mikroorganismy dochází i u larev. Původně mohou být larvy sterilní, jsou ovšem krmeny nesterilní směsí pylu a nektaru. Pyl může být původním zdrojem mikrobů ve střevech včel. Nejčastěji byly identifikovány spóry aerobního druhu *Bacillus* ve střevech včel a současně na povrchu rostlin. Sekundárními zdroji mikrobiální kontaminace jsou lidé, kontejnery nebo vítr, který spóry přenáší (Olaitan *et al.*, 2007).

Podle původu medu je rozlišován květový a medovicový med. Rozdílné je jejich chemické složení i vlastnosti. Mezi nejvíce zastoupené cukerné složky v medu patří monosacharidy glukosa a fruktosa, dále se v medu v menší míře vyskytují disacharidy sacharosa, trehalosa, maltosa nebo turanosa. Oligosacharidy jsou obsaženy v minoritním množství od 2 do 10 % (m/m). Poměr jednotlivých sacharidů závisí na druhu medu. Květové medy obsahují více monosacharidů, kdežto medovicové medy více oligosacharidů. Pod 1 % (m/m) se v medu nacházejí enzymy a minerální látky (Ahmad a Pardini, 1990; Belitz *et al.*, 2009). V podobě enzymu štěpící sacharid je zastoupena invertasa, která štěpí sacharosu, a diastasa, která štěpí škrob. Své významné zastoupení má glukosoxidasa, která katalyzuje přeměnu glukosy na kyselinu

glukonovou za vzniku vedlejšího produktu peroxidu vodíku. Ten má antimikrobiální vlastnosti. Další složení závisí na původu medu. Je možné analyzovat antimikrobiální a antioxidační látky, jako jsou vitamíny, nukleové kyseliny či fenolické látky (Olofsson a Vásquez, 2008; Halouzka *et al.*, 2016). Antioxidační, antimikrobiální a nutriční hodnoty, využívané včelami, se mění se složením medu (Molan, 2006).

#### 2.4.1.1.1 5-hydroxymetylfurfural (HMF)

Cyklický aldehyd 5-hydroxymetylfurfural (HMF) vzniká přirozeně v medu a v komerčně vyráběných roztocích kyseliny katalyzovanou dehydratací hexos (hlavně glukosy a fruktosy) nebo tzv. Maillardovou reakcí (Fallico *et al.*, 2008). Už při procesu zrání medu v plástech vzniká HMF v malém množství, a to 0,6 – 2 mg / kg čerstvého medu (Přidal 2003).

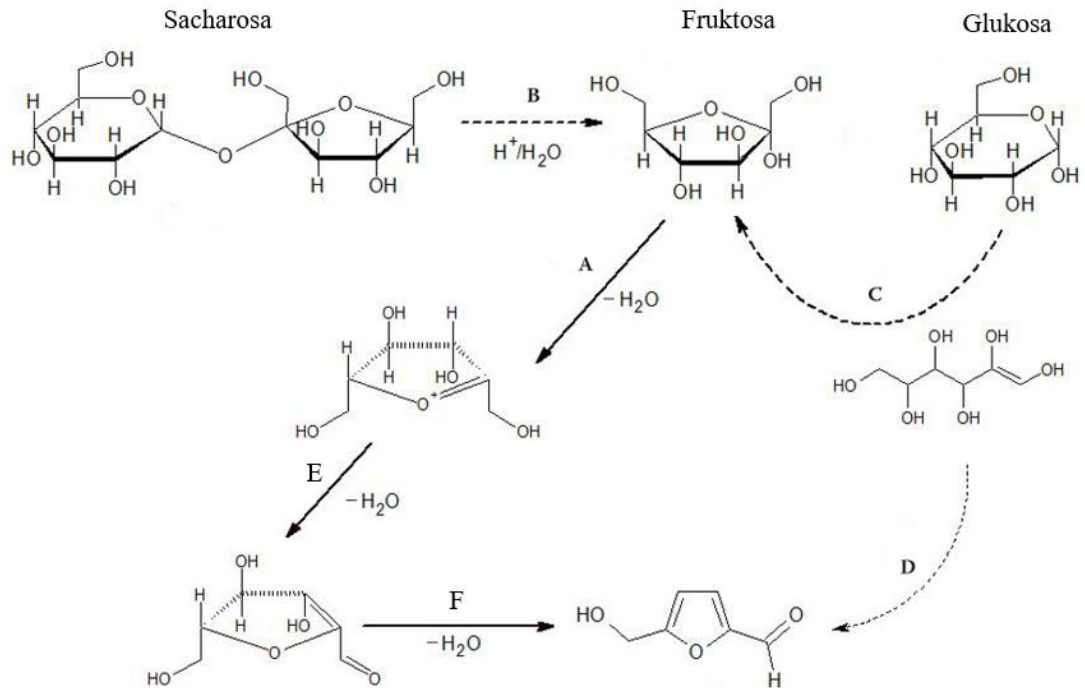
Úroveň HMF závisí na původu a chemických vlastnostech medu, době a teplotě skladování krmiva. Množství této látky přibývá rychleji při vyšších teplotách ve skladovaném prostředí. HMF se tak stává ukazatelem čerstvosti, stáří a přehřátí medů (Fallico *et al.*, 2008).

HMF je ve vysokých koncentracích toxický pro dospělé včely i larvy. Byla testována krmiva s různě vysokou koncentrací HMF. Čím vyšší byly jeho koncentrace, tím byla vyšší i úmrtnost experimentálních včel. Studie uvádí se, že koncentrace HMF do 0,75 mg/ml krmné směsi nebyly pro krmené včely ani larvy smrtící. Nejen po domácímu vyráběné sirupy a krmné směsi, ale i komerčně dostupné roztoky mohou obsahovat různě vysoké koncentrace HMF, které by pro včely mohly být už smrtící. Je třeba se takovým roztokům vyvarovat (Krainer *et al.*, 2015).

Svazová norma ČESKÝ MED dle § 10 vyhlášky č. 76/2003 Sb., oddíl 2 Med stanovuje, že český med musí obsahovat nejvýše do 20 mg/kg HMF u všech druhů medu.

Zjednodušený mechanismus vzniku HMF ze sacharosy je znázorněn na Obr. 2 (Kowalski *et al.*, 2013).





Obr. 2 Zjednodušený mechanismus vzniku HMF ze sacharosy: A – hlavní mechanismus dehydratace fruktosy; B – inverze sacharosy; C - Lobry de Bruyn-Alberda van Ekensteinova izomerizace; D – boční dráha transformace glukosy; E, F – dehydratace a vznik dvojných vazeb HMF (upraveno a převzato z Kowalski et al., 2013).

#### 2.4.1.2 Pyl

Pyl hraje zásadní roli v přežití včel. Jde o významnou zásobní látku proteinů, tuků, vitamínů a minerálů. V úlu je pyl společně s nektarem smíchán a natlačen do buněk určených pro zrání produktu, kterému se říká perga neboli včelí chléb. Na procesu fermentace se s největší pravděpodobností podílejí i mikroorganismy. Jimi je tzv. naočkován před samotným uložením do buněk. Buňky jsou pokryty tenkou vrstvičkou medu, který zabraňuje znehodnocení pergy. Díky probíhajícím biochemickým procesům se složení pylu a včelího chlebu liší. Např. včelí chléb obsahuje více redukujících cukrů než pyl pocházející ze stejných rostlin. Biochemické přeměny během tvorby včelího chlebu jsou výsledkem mikrobiálního účinku. Pyl prochází fermentačním procesem podobným mléčnému kvašení za přispění kvasinek a bakterií rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*, které pocházejí z medonosných žláz včely. Bakterie mohou být odpovědné za zlepšení nutričních hodnot díky produkci vitamínů. Přesný mechanismus kvašení ovšem není znám (Gilliam, 1979; Vásquez a Olofsson, 2009). Ševčík (1950) provedl mikrobiologickou analýzu uloženého pylu v buňkách a čerstvého pylu. Během tvorby pergy byly zjištěny čtyři fáze mikrobiálního vývoje, k nimž došlo během sedmi

dnů od výskytu kvasinek, sporulujících aerobních bakterií a bakterií mléčného kvašení, bakterií, které produkovaly indol. Po izolaci kvasinek z čerstvého i fermentovaného pylu bylo zjištěno, že nezkrasily žádné cukry.

Pyl může obsahovat ovšem také sacharidy toxické pro včely. Takovými sacharidy jsou galaktosa, laktosa, arabinosa, xylosa, rafinosa, manosa, stachylosa a melibiosa. Tyto cukry lze nalézt také v nektaru rostlin čeledi čajovníkovitých (*Theaceae*) a slézovitých (*Tiliaceae*) (Brodschneider a Crailsheim, 2010). Včely si neumí poradit s jejich úplným rozkladem a efektivně je využít ve svůj prospěch.

Mladé dělnice zkonsumují více než 80 % skladovaného pylu pro dokončení úplného vývoje v dospělce. Dospělí jedinci vyžadují velké množství pylu pro vývin sekrečních hltanových žláz, díky kterým z pylových rezerv přerozdělují pyl larvám ve formě sekrecí, produkovaných hltanovými žlázami. Včelstva s nedostatkem pylu vykazovala vyšší ztráty, nižší životnost a efektivitu práce. U včelstev s nedostatkem pylu docházelo ke špatnému vývoji hltanových žláz, a tím byla znemožněna dostatečná produkce mateří kašičky pro zajištění krmení larev (Carroll *et al.*, 2017).

Pokud jsou při nedostatku pylu ve včelstvu přítomny patogeny a parazitičtí roztoči, může dojít k výrazným ztrátám na včelstvu. Byl sledován vliv viru deformovaných křídel v závislosti na skladbě krmiva a stáří včel. Hladina titru viru deformovaných křídel s věkem včel roste. Ovšem u včel krmených pylem nebo bílkovinnou náhražkou byly hladiny ve srovnání se skupinou krmenou kukuřičným sirupem s vysokým obsahem fruktosy mnohem nižší. V případě skupiny, která konzumovala pyl, byla jeho spotřeba nižší než u skupiny s bílkovinnou náhražkou. To mohlo být zapříčiněno obtížně stravitelnou voskovou stěnou, která pylové zrno obklopuje. Běžně je ve včelstvu nejprve skladován v buňkách, kde na něj působí mikroby, a včely mohou pyl lépe trávit (DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2010).

Mezi další hrozby včelaření patří roztoč kleštík včelí (*Varroa destructor*), proti kterému se imunitní systém včel musí bránit. Včely zatížené dietou obsahující pyl dokázaly ve větším rozsahu zapojit svůj imunitní systém v případě napadení kleštíkem. A to tak, že byla zvýšena míra exprese genů, klíčových aktivátorů imunitního systému, konkrétně genů pro apidaecin, defensin, hymenoptaecin a gen pro enzym lysozym (EC 3.2.1.17) (Alaux *et al.*, 2011).

Pyl má evidentně i příznivý vliv na hladinu exprese genu vitellogeninu. Skupinám afrikanizovaných včel byla podávána výživa, která se lišila v množství pylu. Nejvyšší hladiny exprese vitellogeninu vykazovala skupina krmena směsí, která obsahovala alespoň 50 % pylu. Skupiny, které byly krmeny směsmi obsahující 0 % a 15 % pylu, vykazovaly hladiny genu mnohem nižší (Bitondi a Simoes, 1996). Příznivý vliv pylu na vyšší hladinu exprese vitellogeninu potvrdili i Alaux *et al.* (2011).

#### **2.4.2 Další krmiva pro včely**

Základem pro růst a vývoj včelstva je odpovídající výživa. Vlivem člověka se přírodní ekosystémy stále mění. Nemusí tedy být zajištěna dostatečná škála živin, které včely pro svůj vývoj potřebují. Defekty ve výživě v předchozích fázích mají dopad a následnou fázi dospělců, a špatně vyživovaní jedinci zase naopak nedostatečně zásobují mladé generace. Mezi plodem a včelami, a mezi včelami navzájem dochází k předávání potravy, čímž si vytváří sociální žaludek, který informuje včelstvo o tom, jaký je jejich aktuální stav potravy. Mohou tak přizpůsobit své hledání za aktuálně chybějící a potřebnou potravou. Na zdraví včelstva se odráží právě i dobrá potrava a přítomnost všech živin v ní, které včely potřebují. Zdraví jedinci jsou schopni produkovat potomky, kteří jsou následně schopni odolávat parazitům, infekcím a insekticidům i v období nedostatku potravy (Brodschneider a Crailsheim, 2010).

Na dvě včelstva, každé o deseti rámcích, se množství spotřebovaného pylu odhaduje na 13,4 – 17,8 kg za rok. Pyl z různých rostlin obsahuje rozdílné nutriční hodnoty. Pro vývoj kolonie jsou potřebné v potravě zejména aminokyseliny (AMK) Leu, Ile a Val. Pro zajištění obsahu aminokyselin mohou být podávány proteinové doplňky, které budou splňovat požadavek na správnou skladbu AMK (Brodschneider a Crailsheim, 2010). Bez zásobního pylu nejsou schopny včely dlouhodobě udržet rozmnožování a péči o následující generace. V závislosti na nedostatku bílkovin v potravě vyvinuly včely mechanismus kanibalizace. Dochází k požívání nejprve mladých larev, do kterých bylo investováno méně úsilí při krmení, následně přichází řada i na starší larvy (Schmickl a Crailsheim, 2001).

Dospělé včely jsou závislé na sacharidech. Dospělá včela spotřebuje 4 mg využitelných cukrů denně pro přežití. Zhruba 40 % nalezených sacharidů v sóji, které jsou toxické pro včely, se používá jako náhražka pylu. Toxicita takových sacharidů se snižuje po podání dostatku nektaru nebo se mechanicky sacharidy zředí na jejich

výslednou koncentraci 4 % roztokem 50% sacharosy. Nedostatek sacharidů díky špatným zimním zásobám se odrazí na sníženém počtu larev odchovaných na jaře (Brodschneider a Crailsheim, 2010).

V průběhu roku, kdy včelaři sklízí med, je třeba zajistit koloniím zdroje sacharidů, a to především během přezimování včelstev. Během zimního krmení mohou včelaři včelstvům dodávat např. sacharosu, cukrový sirup (směs vody a čisté sacharosy z cukrové třtiny nebo řepy), škrobový sirup, invertovaný sirup nebo kukuřičný sirup s vysokým obsahem fruktosy (z ang. „high-fructose corn syrup,“ HFCS). Nevýhodou při použití obyčejné sacharosy je nutnost dodávat vysoká množství připraveného sacharosového sirupu, a během dlouhodobého skladování může docházet ke kvašení. HFCS se začal používat pro svoji nižší cenu a mikrobiologickou stabilitu vůči vysokému osmotickému tlaku (Semkiw a Skubida, 2016).

Škrobové sirupy (v Evropě označované též jako maltosové) jsou vyráběny z obilného škrobu, především z pšeničného (Semkiw a Skubida, 2016). Enzymy  $\alpha$ -amylasa,  $\beta$ -amylasa, maltasa a invertasa, které se nachází v hltanových žlázách, jsou teoreticky schopné rozštěpit všechny vazby mezi di- a polysacharidy v sirupu tak, že přechodně vytvoří malá množství náhodných di- a trisacharidů. V Polsku během zimního krmení byly testovány různé druhy škrobového sirupu, které se využívají v potravinářském průmyslu. Během dlouhé a nepříznivé zimní sezóny 2005-2006 docházelo k výrazným úbytkům kolonií ve včelstvech. Včely nebyly schopné využít sirupy během zimy. Docházelo k vysoké krystalizaci sirupů díky vysokému obsahu glukosy (38 %) v kombinaci s nízkým obsahem fruktosy (22,1 %). Enzym  $\alpha$ -amylasu včely využívají pro hydrolýzu dlouhých řetězců amylosy a amylopektinu na glukosu. Navíc dochází k hydrolýze disacharidů sacharosy a maltosy, čímž se zvyšují koncentrace glukosy, a tím krystalizaci ve včelích plástvích umocní. Dalším nebezpečím pro přezimující včely je zatížení konečníku včely díky maltodextrinu. Ve vzorcích byl průměrně jeho obsah 2 % (Rybak *et al.*, 2006). Semkiw a Skubida (2016) testovali během zimního krmení tři dostupná škrobová krmiva na polském trhu ve srovnání s invertovaným sacharosovým Apiinvertem z Německa. Jako kontrola byl použit sacharosový sirup, míchaný v poměru 5:3 (sacharosa : voda). Testování probíhalo po dobu dvou zimních období 2012-2013 a 2013-2014. Nebyly vykázány žádné závažné obtíže s krystalizací roztoků. Během krmení nedocházelo k žádným významným statistickým rozdílům mezi koloniemi, které byly krmeny jednotlivými roztoky. Analyzované škrobové sirupy se ukázaly stejně

vhodné pro krmení během zimy jako invertovaný Apiinvert či roztok sacharosy (Semkiw a Skubida, 2016).

V laboratorních podmínkách Barker a Lehner (1978) testovali vliv HFCS na přežití včelích dělnic. Tento sirup neprokázal oproti medu a roztoku sacharosy žádnou výhodu. Vedle těchto krmiv byl testován i hroznový sirup, který způsoboval včelám úplavici a byl vyhodnocen jako nevhodné krmivo. Chromatografie ovšem neukázala na žádné toxiny, pouze na výskyt oxidu siřičitého. Rozdíly v počtech přeživších včel v závislosti na krmivech nebyly významné. Signifikantní rozdíl byl u klecí, které byly krmeny sacharosovým sirupem. Po tomto krmivu včely přežívaly nejdéle. Sacharosový sirup byl dodáván o koncentraci 50 % (w/v), ostatní krmiva o koncentraci 52 % (w/v)

Hlavním zdrojem bílkovin pro mladé larvy je mateří kašička, vylučována hltanovými žlázami. Produkce mateří kašičky si klade požadavek na dostatek esenciální AMK (Schmitzová *et al.*, 1998). Ty jsou důležité pro somatické, růstové a reprodukční funkce včely. V laboratorních podmínkách byly testovány různé poměry koncentrací esenciální AMK v  $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-3}$  roztoku sacharosy pro dietní strategii vedoucí ke zlepšení zdraví včel. Při vyšším zastoupení AMK ve stravě včely trpěly zkrácenou životností. Jednalo se o zastoupení AMK v sacharidovém roztoku v poměrech 1:50 a 1:75 (AMK : sacharosa). Optimální pro životnost včel se ukázal poměr 1:250 (AMK : sacharosa). Při přejídání AMK s dostatečným příjmem sacharidů se i tak zkracuje délka života včely (Paoli *et al.*, 2014).

## 2.5 Chov včel *in vitro*

Hmyz je v laboratoři chován a sledován pro různá odvětví výzkumu. Sledují se toxické, parazitologické nebo fyziologické studie na hmyz při laboratorním chovu. V případě včel mohou být zvoleny různé strategie sledování. Mohou být sledováni jedinci jednoho včelstva nebo jedinci různých včelstev, kteří jsou odebíráni ve stejném období. Při chovu *in vitro* musí být striktně kontrolovány podmínky pro přežití hmyzu v uměle vytvořeném prostředí. Mezi regulovatelné faktory patří např. výběr experimentálního prostředí, vhodný výběr sledovaných objektů, zajištění tepelné regulace, světla aj. Pro vědecké účely není využíván v laboratorních podmínkách pouze chov včel, ale i chov jiného blanokřídlého hmyzu např. čmeláků.

Strategie chovu včel *in vitro* se může lišit v závislosti na sledovaných faktorech a parametrech v laboratoři. Mezi takové faktory a parametry může být zařazeno např.

stádium vývoje včely – mladší vývojová stadia dělnic, létavky, stáří včely nebo přítomnost matky a trubců u sledovaných experimentálních jedinců. Pro laboratorní chov včel není třeba držet v experimentálních prostorech včelí matku. Z vybraného včelstva je doporučeno vyjmutí celého rámmu i se zavíčkovanými a nevylíhnutými včelami, u kterých je očekáváno, že se vylíhnou do 3 dnů. Rámky je vhodné umístit do laboratorních inkubátorů ideálně s teplotním optimem 34,5 °C. Pro včely je zajištěna dostatečná vlhkost prostřednictvím nádoby s vodou, umístěné na dno inkubátoru (Williams *et al.*, 2013).

Čerstvě vylíhnuté mladé včely jsou umístěny do chovných klíček, které by měly být ideálně použity jen jednorázově. Optimální teplota pro laboratorní chov v klíčkách je 30 °C. V chovné klícce by mělo být zajištěno dostatečné odvětrávání umožněno skrz vzdušné materiály. Dále by měly umožňovat lehkou manipulaci s mrtvými jedinci při jejich odstraňování z klíček. Laboratorní klíčky jsou často vyráběné z umělohmotných kelímků. Velikost klíček by měla být adekvátně uzpůsobena dle počtu včel. Ideální velikost klíčky je v poměru 1:3 (včela : cm<sup>3</sup> prostoru). Včely jsou chovány za předem daných specifických podmínek několik dnů. Doba chovu v klíčkách je závislá na konkrétních parametrech sledování daného experimentu. Včelám jsou krmné roztoky podávány otvorem v klíčkách plastovými injekčními stříkačkami. Krmivy bývá např. roztok sacharosy, medů nebo komerčně vyráběných cukerných tekutin. Nutné je též zajistit dostatečný přísun kyslíku (Williams *et al.*, 2013).

Obr. 3 ukazuje klíčky použité pro tuto diplomovou práci při chovu včel *in vitro*.

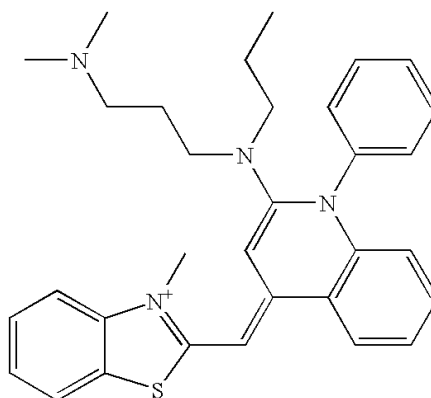


Obr. 3 Chovné klíčky se včelami a krmivem podávaným v injekčních stříkačkách, autor obrázku Petra Wenzelová.

## 2.6 Real-Time PCR (RT-PCR)

Jednou z variant polymerázové řetězové reakce (PCR) je Real-Time PCR (RT-PCR), která slouží pro přímou kvantifikaci PCR produktů v reálném čase. Tato metoda kvantifikuje přítomné množství DNA, což je důležité při detailním studiu genové exprese. Pro detekci množství DNA musí být přítomna fluorescenční interkalační látka, která je navázána na přítomnou DNA. Detektorem je zachycena hladina fluorescence, a tím je zaznamenáno množství navázané DNA (Pfaffl, 2004).

Pro detekci vznikajících produktů mohou být použity různé fluorescenční sondy, které nekovalentně interagují s dsDNA. V této práci pro RT-PCR bylo využito techniky SYBR® Green I. SYBR® Green I patří mezi nespecifická cyaninová barviva. Dva odlišné heterocyklické kruhy jsou spojeny metioninovou vazbou viz Obr. 4 (Zipper *et al.*, 2004). Signál se zvyšuje s narůstajícím množstvím PCR produktů. SYBR® Green I má největší citlivost pro modré světlo o vlnové délce 522 nm. Tato barviva, která se vážou nespecificky na DNA, nemohou být používána u mnohonásobných reakcí. U použití těchto barviv je nevýhodou neodlišitelnost nespecifických produktů, které během amplifikace vznikají.



Obr. 1 Vzorec fluorescenčního barviva SYBR® Green I (upraveno a převzato z Zipper *et al.*, 2004).

Jednou z možných strategií kvantifikace metodou RT-PCR je relativní kvantifikace. Jedná se o proces založený na porovnání exprese mezi sledovaným vzorkem a kontrolou. Jako kontrolní geny jsou použity provozní geny (tzv. „housekeeping genes“, HKG), jejichž míra exprese se v čase nemění. Nejčastěji je použito vyjádření kvantifikace, které udává do poměru exprese cílových genů s expresí provozních genů.

Vhodné je použít pro kontrolu alespoň dvou HKG. Používanými bývá např.  $\beta$ -aktin, elongační faktor-1 $\alpha$  nebo tubulin (Pfaffl, 2001). Pro zjištění vhodnosti HKG existují programy, jako jsou např. NormFinder, BestKeeper či geNorm.

Jedním z možných výpočtů relativní kvantifikace je přístup bez korelace efektivity. U tohoto přístupu se předpokládá, že efektivita RT-PCR HKG a sledovaného genu je stejná nebo velmi podobná. Pak je o ní uvažováno jako o 100%. Ve výpočtech se uvádí Ct hodnoty (z anglického výrazu cycle of treshold, cyklus prahu). Cyklem prahu je myšlena hodnota, kdy dojde k nahromadění dostatečného množství produktu a signál je rozlišitelný od pozadí, je v exponenciální fázi amplifikace. Ct hodnota je hodnota cyklu amplifikace, kdy je dosažen nárůst fluorescence nad práh pozadí vyskytující se v reakci. Dochází k jejímu zachycení detektorem. Číslo je zaznamenáno jako hodnota Ct, se kterou se dále pracuje. Jelikož se jedná o exponenciální závislost, je třeba si stále připomínat, že čím jsou hodnoty Ct nižší, tím máme daného amplifikovaného dsDNA produktu více a tím je jeho genová exprese vyšší. Naopak tedy, čím větší bude hodnota Ct, tím bylo v reakci méně přítomné dsDNA (Bustin a Nolan, 2004).

### **3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

#### **3.1 Materiál**

##### **3.1.1 Použité chemikálie**

Agarosa

Blue Loading Dye (6x, Promega)

LPS (Biocompare)

Magnetické kuličky Agencourt RNAClean XP (Beckman Coulter)

PCR Marker (BioRad)

Primery pro PCR reakce pro geny abaecin, apidaecin, JHE, vitellogenin,  $\beta$ -aktin a elongační faktor  $\alpha$

TAE pufr (TRIS-acetátový-EDTA pufr)

Sacharosa ( 1. Cukerní společnost Praha, s.r.o.)

Sigma-Aldrich®: GelRed, Tyr, Phe, Leu, Ile, His, Met, Val, Thr, Arg a Lys

##### **3.1.2 Biologický materiál**

Pro experimentální část byly rámky mladého zavíčkovaného plodu včely medonosné (*Apis mellifera*) poskytnuty ze včelnic Mgr. Jiřího Danihlíka, Ph.D. Rámky byly



vybrány náhodně z různých včelstev. Rámky byly dovezeny na katedru biochemie UPOL v Olomouci, inkubovány po cca 3 dny do vylíhnutí mladých včel. Po vylíhnutí došlo k hromadnému smíšení všech včel z rámků ve dřevěném boxu k tomuto smíšení určenému.

### **3.1.3 Přístrojové vybavení**

Analytické váhy (Sartorius, Německo)

Autokláv 2540 EKA (Tuttnauer, Německo)

Automatické pipety (Eppendorf, Německo)

CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio Rad, USA)

Digitální fotoaparát (SONY, Japonsko)

Digitální předvážky (Radwag®, Česká republika)

Elektroforetický systém Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA)

Elektromagnetická míchačka IKA (Labicom, Česká republika)

Flowbox Bioban (SterilSafe®, Itálie)

Chlazená centrifuga Allegra 64R (Beckman Coulter Inc., USA)

Chlazená centrifuga 5415 R (Eppendorf, Německo)

Inkubátor EN 120 (Nüve, Turecko)

Magnetický stojánek

Minicentrifuga MCF 2360 (Vitrum, Česká republika)

PCR termocykler (Eppendorf, Německo)

Refraktometr typ VBC4 (VšeProVčelařství)

Ruční svařovačka (ABE. TEC, s.r.o., Česká republika)

Spektrofotometr BioSpec-nano (Shimadzu, USA)

Vortex mixer (Stuart, UK)

Zdroj pro elektroforézu PowerPac™ 300 (Bio-Rad, USA)

### **3.1.4 Použité roztoky**

GITC pufr: 5,25 M guanidium thiokyanát, 50 mM Tris-HCl (pH 6,4), 20 mM EDTA, 1,3% Triton X-100, 1% 2-merkptoethanol (Williams *et al.*, 2013)

Sacharosa 50% (w/v) vodný roztok

Roztoky medů 50% (w/v) vodný roztok

APIVITAL® 50% (w/v) vodný roztok, komerčně dostupný (firma Stech s.r.o, Dobruška, Česká republika)

Apiinvert 50% (w/v) vodný roztok, komerčně dostupný (firma Südzucker, Mannheim, Německo)

AgenaBee® 50% (w/v) vodný roztok, komerčně dostupný (firma AGRANA, Aschach nad Dunajem, Rakousko)

1,1% agarosa v TAE pufru

### **3.1.5 Použité kity**

RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)

Sybr Select® Master Mix (Life Technologies)

Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Sigma-Aldrich®)

TURBO DNA-*free*™ Kit (ThermoFisher SCIENTIFIC)

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Charakteristika krminých roztoků použitých pro laboratorní experiment

V laboratorních podmínkách byl pozorován vliv sedmi krmiv, přičemž některá z nich byla obohacena o AMK podle Paoli *et al.*, 2014. Přidanými AMK byly Tyr, Phe, Leu, Ile, His, Met, Val, Thr, Arg a Lys. Obsah sacharidů v komerčně vyráběných invertech a poskytnutých medech byl změřen refraktometrem.

Seznam použitých krmiv:

- 1) Sacharosa – Vodný roztok sacharosy. Krmeno referenční skupině.
- 2) APIVITAL® sirup – Složení dle výrobce: 30 % glukosa, 40 % fruktosa, 30 % sacharosa, oligosacharidy méně než 1 %, HMF max 10 mg/kg, sacharidy 72,5 g (ve 100 g roztoku). Refraktometrem bylo zjištěno 72,5 g sacharidů (ve 100 g roztoku).
- 3) Apiinvert sirup – Složení dle výrobce: 30 % glukosa, 39 % fruktosa, 31 % sacharosa, sacharidy 73 g (ve 100 g roztoku) a obsah vody je max. 28 %, HMF neuveden. Refraktometrem bylo zjištěno 73 g sacharidů (ve 100 g roztoku).
- 4) AgenaBee® sirup – krmný roztok vyáběný ze škrobu. Složení: 24 % glukosa, 17 % fruktosa, 42 % maltosa, 17 % maltotriosa a další oligosacharidy. HMF neuveden. Refraktometrem bylo zjištěno 75 g sacharidů (ve 100 g roztoku).
- 5) ID\_17 – Med jarní květový, oblast Sviadnov, refraktometrem bylo zjištěno 81,5 g sacharidů (ve 100 g roztoku).
- 6) ID\_37 – Medovicový med, oblast Konstantinovy Lázně, refraktometrem bylo zjištěno 84,5 g sacharidů (ve 100 g roztoku).
- 7) ID\_56 – Med jarní květový + lípa + slunečnice, oblast Lednice, refraktometrem bylo zjištěno 81 g sacharidů (ve 100 g roztoku).

Pozn.: V experimentu krmné medy jsou identifikovány číslem ID. V předložené práci byly pro pozorování účinku krmeného medu na přežití včel v laboratorních podmínkách vybrány medy ze tří různých lolalit ČR.

### 3.2.2 Příprava zásobních roztoků ke krmení včel

Kromě roztoků medů byly ke všem krmivům přidány již zmíněné AMK. Tyto roztoky sloužily jako další sada krmiv k porovnání. AMK byly přidávány do roztoků sacharosy,

APIVITALu, Apiinvertu a AgenaBee®. Jednotlivé navážky AMK jsou zaznamenány v Tab. 2. Všechny roztoky byly naředěny tak, aby jejich výsledná koncentrace byla 50 % (w/v) ve vodném roztoku. Každého zásobního roztoku bylo chystáno 200 g. Původní dodané komerční roztoky a medy byly nejdříve změřeny refraktometrem k dopočítání množství přidané vody. Zjištěný podíl sacharosy ve 100 g se podělil požadovanou výslednou koncentrací, a tak se zjistil faktor ředění, tedy  $x$  (faktor ředění) =  $m$  (naměřená sacharosa) /  $c$  (w/v). AMK byly naváženy tak, aby výsledná koncentrace každé AMK v roztocích byla  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-3}$ . Všechny zásobní roztoky byly chystány v autoklávovaných a sterilních nádobách. Faktory ředění jsou uvedeny v Tab. 3.

Tab. 2 Navážky AMK pro sledované roztoky s relativní molekulovou hmotností a rozpustností při  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

AMK	Mr AMK	Rozpustnost při $20 \text{ }^\circ\text{C}$ (g/l)	Navážky AMK (g)
Tyr	181,19	0,38	0,362
Phe	165,19	27,00	0,330
Leu	131,18	24,00	0,262
I-Leu	131,17	32,10	0,262
His	155,16	38,20	0,310
Met	149,20	48,00	0,298
Val	117,15	85,00	0,234
Thr	119,12	90,00	0,238
Arg	174,20	148,70	0,348
Lys	164,21	1500,00	0,328

Tab. 3 Změřené sacharidy krmiv refraktorem a vypočítané hodnoty faktorů ředění.

krmivo	sacharidy (g) na 100 g roztoku	faktor ředění
APIVITAL®	72,5	1,45
Apiinvert	73	1,46
AgenaBee®	75	1,5
ID_17	81,5	1,63
ID_37	84,5	1,69
ID_56	81	1,62

Po přidání AMK do směsi byly roztoky ponechány na automatické elektromíchače za stálého míchání až do druhého dne pro lepší rozpuštění AMK. Několik hodin se nechaly míchat i ostatní naředěné roztoky kvůli své vysoké viskozitě. Roztoky medů byly po naředění a řádném míchání centrifugovány při  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  40 min při 10 000 RPM,

aby došlo k odstranění pylových zrn a nečistot. Těmito krmivy byly naplněny sterilní plastové injekční stříkačky o objemu 5 ml. Takto připravené roztoky byly zamrazeny při - 60 °C. Následně se připravily ještě roztoky s LPS, kterými byly včely krmeny poslední den experimentu. Pro jejich přípravu bylo 5 ml každého doposud připraveného roztoku smícháno s 1mg LPS tak, aby výsledná koncentrace LPS v roztocích byla 200 µg·ml<sup>-3</sup>. Koncentrace byla získaná a upravená podle Negri *et al.* (2017). Roztoky s LPS byly podávány posledních 24 hodin krmení.

### 3.2.3 Rozvržení experimentálních klíček se včelami a jejich krmení připravenými roztoky

Celkem bylo připraveno 33 experimentálních klíček se včelami. Každé 3 klíčky byly krmeny stejným druhem krmiva. Dohromady bylo testováno 11 krmiv. Posledních 24 hodin byly včely v klíčkách č. 2 a 3 vystaveny antigenu (LPS), o který byly obohaceny krmné směsi. K roztokům medů nebyly přidávány ani AMK ani LPS. Rozvržení krmiv v klíčkách je uvedeno v Tab. 4.

Tab. 4 Rozvržení krmiv pro včely v klíčkách.

1.-7. den krmení klíčka č. 1,2,3	8. den krmení	
	klíčka č. 1	klíčka č. 2 a 3
Sacharosa	Sacharosa	Sacharosa+LPS
Sacharosa + AMK	Sacharosa + AMK	Sacharosa + AMK+LPS
APIVITAL®	APIVITAL®	APIVITAL® + LPS
APIVITAL® +AMK	APIVITAL® + AMK	APIVITAL® + AMK + LPS
Apiinvert	Apiinvert	Apiinvert + LPS
Apiinvert + AMK	Apiinvert + AMK	Apiinvert + AMK + LPS
AgenaBee®	AgenaBee®	AgenaBee® + LPS
AgenaBee® + AMK	AgenaBee® + AMK	AgenaBee® + AMK + LPS
ID_17	ID_17	ID_17
ID_37	ID_37	ID_37
ID_56	ID_56	ID_56

### 3.2.4 Chov včely medonosné (*Apis mellifera*) *in vitro*

K laboratornímu chovu byly využity pouze včelí dělnice staré 1-2 dny po vylíhnutí, kterými byly naplněny klíčky uměle vytvořené částečně podle Williams *et al.*, 2013, kde každá obsahovala 70 – 100 čerstvě vylíhnutých včel. Klíčka představovala jednu

experimentální skupinu. Každá experimentální skupina tvořila triplikát, tedy tři klícky, které byly krmeny totožným krmivem. Naplněné klícky byly udržovány v inkubátoru při 36 °C po dobu 7 dnů. Krmiva se mladým včelám dodávala každý druhý den. Při podávání krmiv docházelo k odběru již mrtvých včel pro zajištění čistoty v klíce. Po sedmém dni krmení došlo k prvnímu odběru včel z klícek. Vzorky se pak uchovávaly při -80 °C. Zbytek včel v prvních klíčkách byl krmen posledních 24 hodin stejnými krmivy jako doposud, včely z klícek č. 2 a 3. byly imunizovány krmivy s LPS. Klícky s medy byly nepozměněny. Po posledních 24 hodinách byly mrtvé včely vyjmuty z klecí a živé zamrazeny i s klecemi při -60 °C. Včely byly skladovány - 80 °C. Přesné počty včel v klíčkách byly zjišťovány sečtením mrtvých včel a včel použitých pro oba odběry. Se včelami bylo vždy manipulováno co nejšetrněji a nejrychleji.



*Obr. 5 Prázdná experimentální klícka s připraveným krmivem pro včely, autor obrázku Petra Wenzelová.*

### **3.2.5 Izolace a přečistění RNA z celých těl včely medonosné**

Pro izolaci RNA a následní přepis do cDNA byla použita již připravená a zamrazená těla včel při -80 °C. Každý vzorek tvořilo 5 včel, které byly tloučkem homogenizovány s GITC pufrem v zataveném sterilním sáčku z pevného plastu. Množství použitého pufru pro homogenizaci bylo 600 µl pufru/dělnice, tedy ke každému vzorku pěti včel byly použity 3 ml GITC pufru. Z homogenátu byl odebírán 1 ml bez zbylých částí těl včel. 100 µl připraveného homogenátu bylo smícháno s 360 µl RLT pufru obohaceného

o 2-merkaptoethanol. Pro izolaci RNA byl použit kit RNeasy Plant Mini Kit (Qiagene). Postup izolace byl proveden podle protokolu dodaného výrobcem. Eluce RNA byla provedena do 95  $\mu$ l RNase-Free vody. Koncentrace a kvalita izolované RNA byly stanoveny na mikroobjemovém spektrofotometru. Pro měření byly použity vždy 2  $\mu$ l vzorku. Pro odstranění znečišťující DNA byla použita DNAasa Turbo DNAase. 1  $\mu$ l Turbo DNAasy s 10  $\mu$ l reakčního pufru byly přidány ke vzorku RNA. Inkubace takto připraveného vzorku probíhala 30 min při 37 °C a 1000 RPM. Potom byl přidán opět 1  $\mu$ l Turbo DNAasy a nechala se proběhnout další inkubace za stejných podmínek. Následně byla RNA přečištěna za pomoci suspenze magnetických kuliček Agencourt RNAClean XP na magnetickém stojánku. K dosavadnímu celkovému objemu RNA bylo přidáno 50  $\mu$ l suspenze magnetických kuliček a 40  $\mu$ l isopropanolu. Došlo k důkladnému promíchání pipetou a následně inkubaci za laboratorní teploty po dobu 10 min. Poté došlo k zachycení magnetických kuliček s navázanou RNA na dně mikrozkušavky pomocí magnetického stojánku. Kuličky byly třikrát promyty ve 200  $\mu$ l 70% v/v ethanolu. Po každém promytí byly kuličky s RNA v mikrozkušavkách umístěny a zachyceny opět magnetem. Mikrozkušavky s ethanolem byly vždy ponechaly 5 min na magnetickém stojánku. Po posledním promytí se ethanol odsál pipetou, a vzorky se nechaly 15-20 minut sušit. RNA byla eluována do objemu 32  $\mu$ l RNase-Free vody. Opět se důkladně promíchaly kuličky s vodou pipetou a nechalo se inkubovat 10 minut při laboratorní teplotě. Poté se supernatant za pomoci magnetu ve stojánku odsál pipetou. Hodnoty koncentrace a absorbance přečištěné RNA byly změřeny opět na mikroobjemovém spektrofotometru. Hodnoty poměru absorbancí při 260 a 280 nm ( $A_{260/280}$ ) 1,8 – 2,3 značí, že RNA je bez kontaminace. Při kontaminaci proteiny jsou hodnoty tohoto poměru absorbancí nižší. Pokud jsou hodnoty poměru absorbancí při 260 a 280 nm ( $A_{260/280}$ ) vyšší, značí tyto hodnoty kontaminace fenolickými látkami.

### **3.2.6 Kontrola integrity RNA**

Za pomoci separace horizontální agarosové elektroforézy byla testována integrita izolované RNA. 1,1% w/v agarosa byla rozehráta v TAE pufru (1x). Pro vizualizaci RNA byl použit GelRed (4  $\mu$ l do 100  $\mu$ l rozpuštěné agarosy). Vždy bylo použito 10  $\mu$ l izolované a přečištěné RNA, ke které byly přidány 2  $\mu$ l Loading Dye. Jako standard velikosti produktů (50 bp) byl použit marker značky BioRad. Elektroforéza byla vyvíjena 1 h při konstantním napětí 70 V.

### 3.2.7 Přepis izolované a přečištěné RNA do cDNA pomocí reverzní transkriptasy

K přepisu izolované a přečištěné RNA do cDNA byl použit Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Sigma-Aldrich®). Přepis je rozdělen do dvou fází. První fáze trvá 5 minut ve výsledném reakčním objemu 15  $\mu\text{l}$ , kdy RNA je společně s ostatními komponenty zahřívána na 70 °C. Objemy reakčních složek jsou uvedeny v Tab. 5. Objem vyizolované RNA závisí na hodnotě koncentrace vzorku změřené po izolaci a kroku ošetření DNAasou. Koncentrace přidávané RNA musela být 150 ng/ $\mu\text{l}$ , tj. 2  $\mu\text{g}$  v reakčním roztoku a do zbylých 15  $\mu\text{l}$  byla dodána PCR voda. Pokud byly naměřené hodnoty koncentrací nízké, přidalo se do reakční směsi v první fázi maximální objem 14  $\mu\text{l}$  vyizolované RNA. Ve druhé fázi přepisu se po reakci v první fázi ke směsi přidalo 25  $\mu\text{l}$  hotového premixu složeného z komponent v Tab. 6. Výsledná směs měla objem 40  $\mu\text{l}$ . Složení reakce ve druhé fázi je zaznamenáno v Tab. 6.

Tab. 5 Objemy jednotlivých složek pro první fázi přepisu do cDNA za pomoci reakce reverzní transkriptasy.

Složka	Objem složky ( $\mu\text{l}$ ) / reakce
izolovaná RNA	dle koncentrace izolované RNA
oligo dT primery	1
PCR voda	do celkového objemu 15

Tab. 6 Objemy jednotlivých složek pro druhou fázi přepisu do cDNA za pomoci reakce reverzní transkriptasy

Složka	Objem složky ( $\mu\text{l}$ ) / reakce
reakční pufr M-MVLV (5x)	5
dATP, 10 mM	1,25
dTTP, 10 mM	1,25
dCTP, 10 mM	1,25
dGTP, 10 mM	1,25
rekombinantní RNasin	
inhibitory ribonukleas	0,6
reverzní transkriptasa	1
PCR voda	13,4



Tab. 7 Nastavené parametry PCR reakce pro přepis do cDNA za pomoci reversní transkriptasy.

Teplota (°C)	Čas
42	60 min
65	20 min
4	∞

### 3.2.8 Použité primery pro Real-Time PCR

$\beta$ -aktin a elongační faktor-1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) byly použity jako provozní geny (tzv. „housekeeping genes“ HKG). Primery pro pozorované geny byly syntetizovány firmou Sigma-Aldrich® podle dostupné literatury, jejíž citace jsou uvedeny v Tab. 8 ve sloupci Reference.

Tab. 8: Sekvence PCR primerů zkoumaných genů.

Název peptidu		Primer 5' --> 3'	T <sub>m</sub> (°C)	Reference
Aktin	F	TGCCAACACTGTCCTTTCTG	64,0	Lourenco <i>et al.</i> , 2008
EF-1 $\alpha$	F	GGAGATGCTGCCATCGTTAT	63,9	Lourenço <i>et al.</i> , 2008
Abaecin	F	CAGCATTCGCATACGTACCA	64,6	Evans, 2006
Apidaecin	F	TTTTGCCTTAGCAATTCTTGTTG	60,0	Simone <i>et al.</i> , 2009
Vitellogenin	F	AGTTCCGACCGACGACG	64	Ament <i>et al.</i> , 2011
JHE	F	TTCTTTCTTCTCTTGACTTTTGTT	64,5	Ament <i>et al.</i> , 2011

### 3.2.9 Kvantitativní Real-Time PCR (RT-PCR)

Za pomoci komerčního kitu Sybr Select® Master Mix (Life Technologies) byla provedena metoda kvantitativní RT-PCR pro zjištění Ct hodnot HKG a GOI. Celkový objem pro jednu reakci činil 5  $\mu$ l. Objemy jednotlivých složek reakce jsou zaznamenány v Tab. 9, nastavení reakce je zaznamenáno v Tab. 10. Oboje bylo zachováno dle pokynů výrobce s výše použitými primery pro HKG a pro zkoumané geny abaecin, apidaecin, vitellogenin a esterasu juvenilního hormonu.

Tab. 9 Objemy jednotlivých složek pro RT-PCR reakce.

Složka	Objem složky (μl)
Sybr Select® Master Mix	2,5
F primer (3,3 mM)	0,45
R primer (3,3 mM)	0,45
cDNA templát	1,6

Tab. 10 Nastavené parametry pro RT-PCR reakce.

Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů
95	10 min	1
95	15 s	40
60	60 s	40
60 – 95 interval 0,5	10 s	disociační křivka
4	∞	∞

Jako HKG sloužily geny  $\beta$ -aktinu a EF-1 $\alpha$ . Byly nejprve změřeny hodnoty Ct všech vzorků pro tyto geny. Následovalo ředění vzorků na stejnou hodnotu Ct, a to Ct = 20. Z rozdílu získané Ct hodnoty a požadované Ct hodnoty se vypočítal faktor ředění, kterým se vydělil výsledný požadovaný objem naředěného vzorku. Do požadovaného množství byl vzorek naředěn sterilní PCR vodou.

### 3.2.10 Použité statistické programy

Grafy, znázorňující počty přeživších včel v procentech, byly sestrojeny v klasickém tabulkovém procesoru Excel od firmy Microsoft. Výsledky pro porovnání úrovní hladin genových expresí jednotlivých genů jsou znázorněny v krabicových grafech, tzv. boxplotech. Sestaveny byly prostřednictvím internetového programu, který je dostupný na: <http://shiny.chemgrid.org/boxplotr/>. Ke statistickému zpracování výsledků byl použit program Statistica 13.1. Pro vyhodnocení statistické významnosti bylo využito t-testů vyhodnocených na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

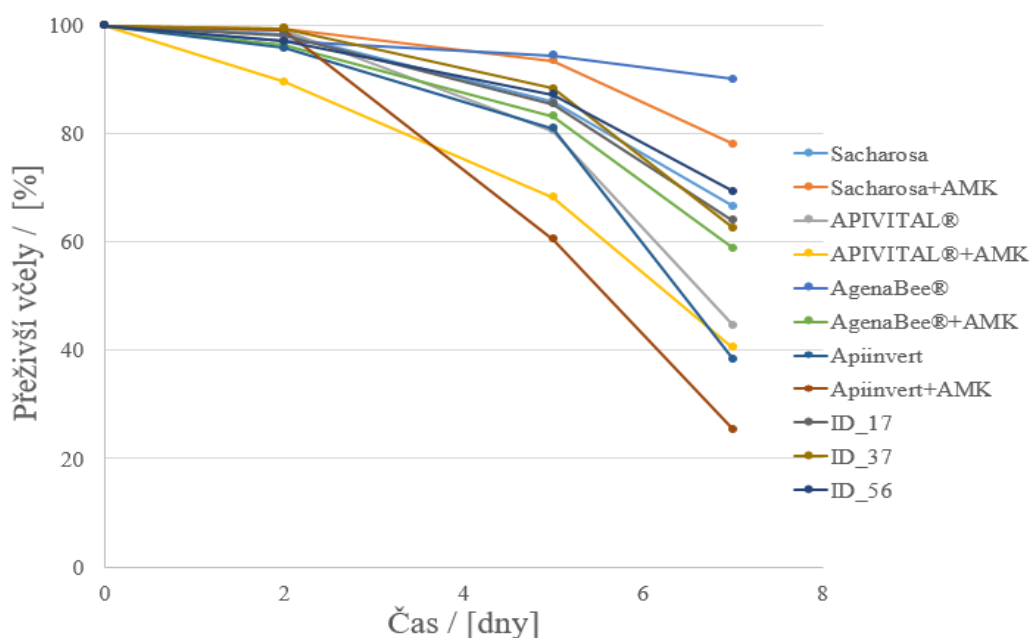
## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Kontrola integrity RNA

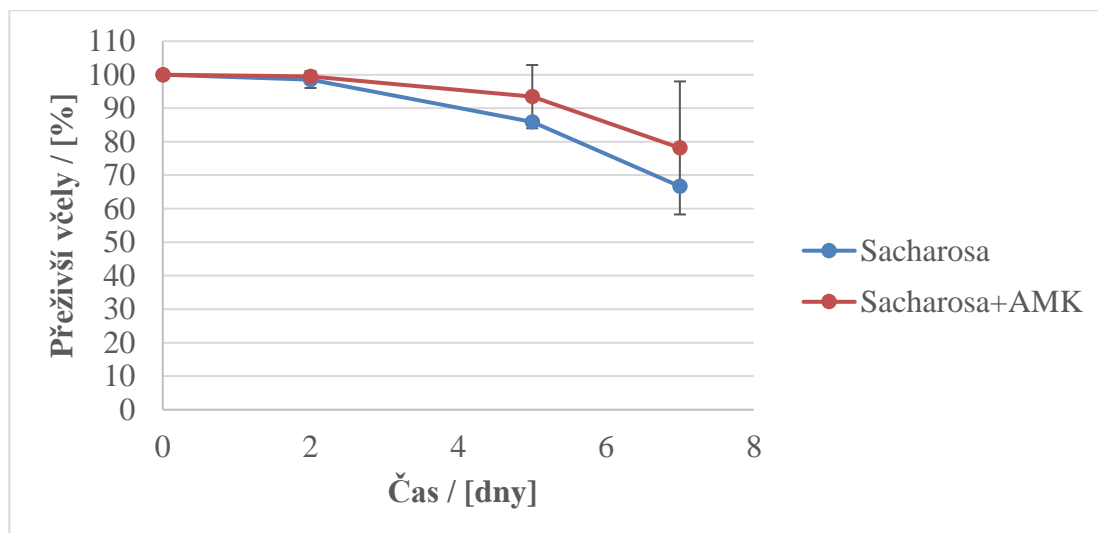
Kontrola integrity RNA byla provedena stanovením poměru absorbance 260 nm a 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ). U izolované RNA se hodnoty poměru absorbance 260 a 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) pohybovaly v průměru 2,287. Integrity izolované RNA byla potvrzena 1,1% agarosovou elektroforézou. Na gelu byly detekovány dva fragmenty o velikostech odpovídajících 18S a 28 rRNA.

### 4.2 Určení křivek životnosti

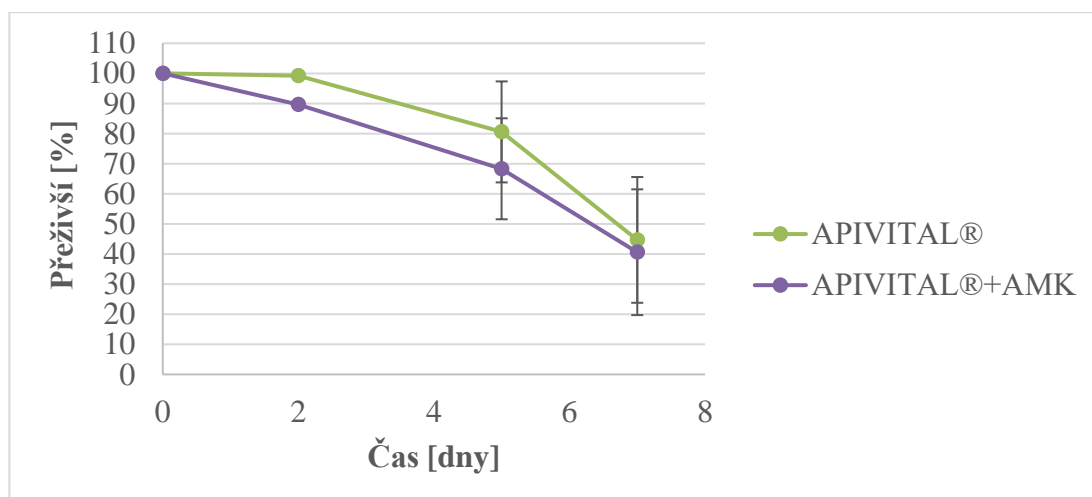
Během krmicí fáze byla sledována úmrtnost včel v závislosti na podávání jednotlivých druhů krmiv. Včely byly krmeny po dobu 7 dnů jedenácti krmivy, která jsou sepsána v Tab. 4 (viz kapitola 3.2.3). Každá experimentální skupina byla krmena v triplicátech. V den krmení byly vždy odebrány z klíček mrtvé včely. Celkový počet včel v jednotlivých klíčkách byl zpětně dopočítáván součtem mrtvých a přeživších včel, které byly vhodné pro jednotlivé odběry. Grafy 1 – 6 znázorňují přeživší včely, které byly krmeny jednotlivými krmivy po dobu 7 dnů. Výsledky jsou zobrazeny v procentech i s příslušnými směrodatnými odchylkami.



Graf 1: Procentuální zastoupení přeživších včel krměných po dobu 7 dnů do prvního odběru. Porovnání všech krmiv použitých v experimentu.

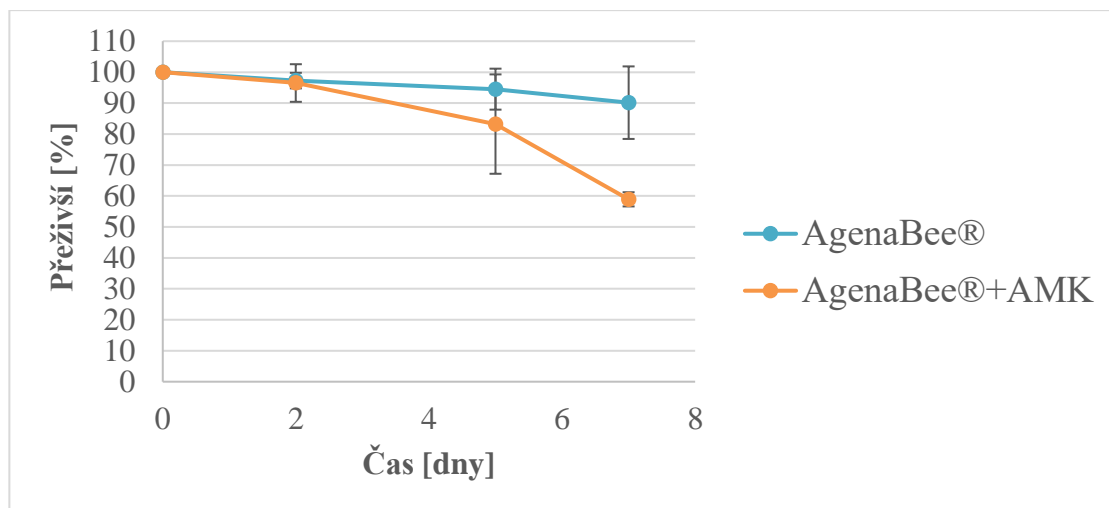


Graf 2 Procentuální zastoupení přeživších včel krmených po dobu 7 dnů do prvního odběru. Porovnání krmiv sacharosy a sacharosy + AMK.



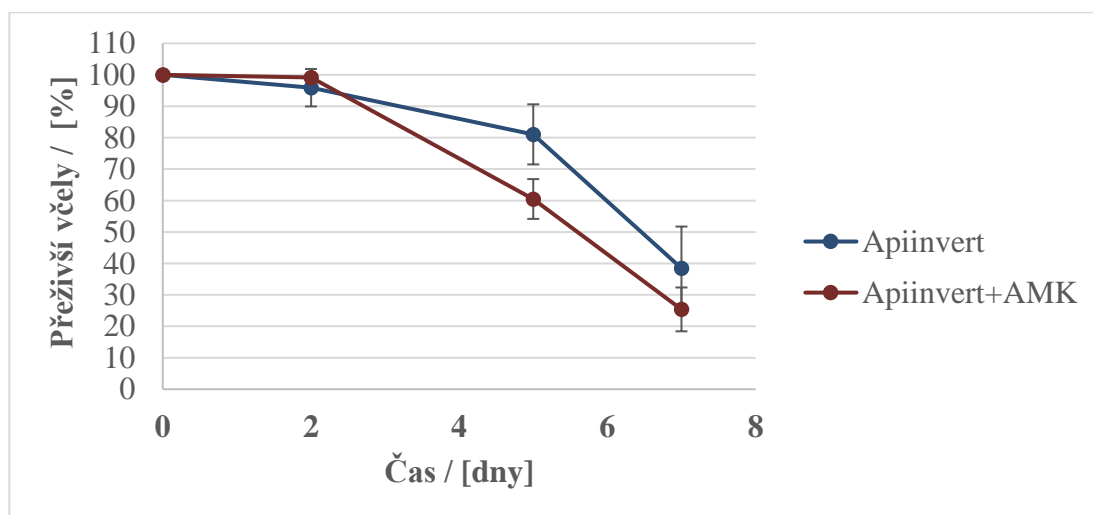
Graf 3 Procentuální zastoupení přeživších včel krmených po dobu 7 dnů do prvního odběru. Porovnání krmiv APIVITAL® a APIVITAL® + AMK.

U experimentální skupiny krmené komerčním roztokem APIVITALu byla zaznamenána vyšší úmrtnost včel než v případě užití roztoků ze sacharosy a AgenaBee® (Graf 1), nicméně bylo zpozorováno, že včely krmené tímto krmivem byly energičtější, a to jak v případě APIVITALu bez AMK tak i APIVITALu s AMK.



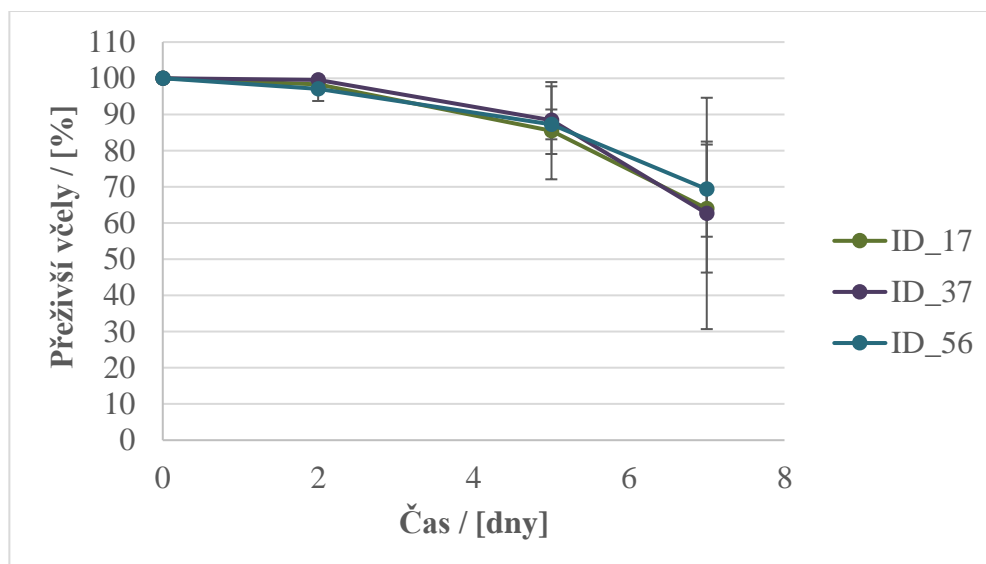
Graf 4 Procentuální zastoupení přeživších včel krmených po dobu 7 dnů do prvního odběru. Porovnání krmiv AgenaBee® a AgenaBee + AMK.

V případě AgenaBee® se jedná o krmivo vyráběné ze škrobu. Mortalita včel při krmení tímto roztokem bez AMK (Graf 1 a Graf 4) nebyla tak vysoká v porovnání s ostatními krmivy. Směrodatné odchylky jsou nižší než u skupin krmených jinými roztoky.



Graf 5 Procentuální zastoupení přeživších včel krmených po dobu 7 dnů do prvního odběru. Porovnání krmiv Apiinvert a Apiinvert + AMK.

Německé krmivo Apiinvert si ve sledovaných krmivech dobře nevedl. U včel krmených tímto krmivem by pozorován trend k vyšší mortalitě (Graf 1 a Graf 5). Dále bylo i zpozorováno, že při krmení tímto krmivem nebyly včely tak energické.

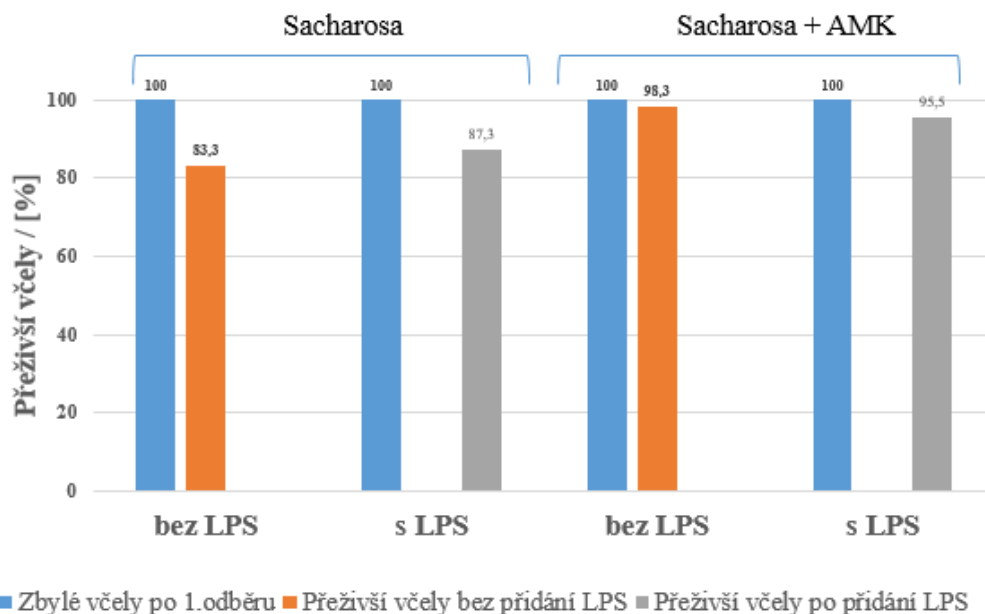


Graf 6 Procentuální zastoupení přeživších včel krmených po dobu 7 dnů do prvního odběru. Porovnání krmných medů ID\_17, ID\_37 a ID\_56.

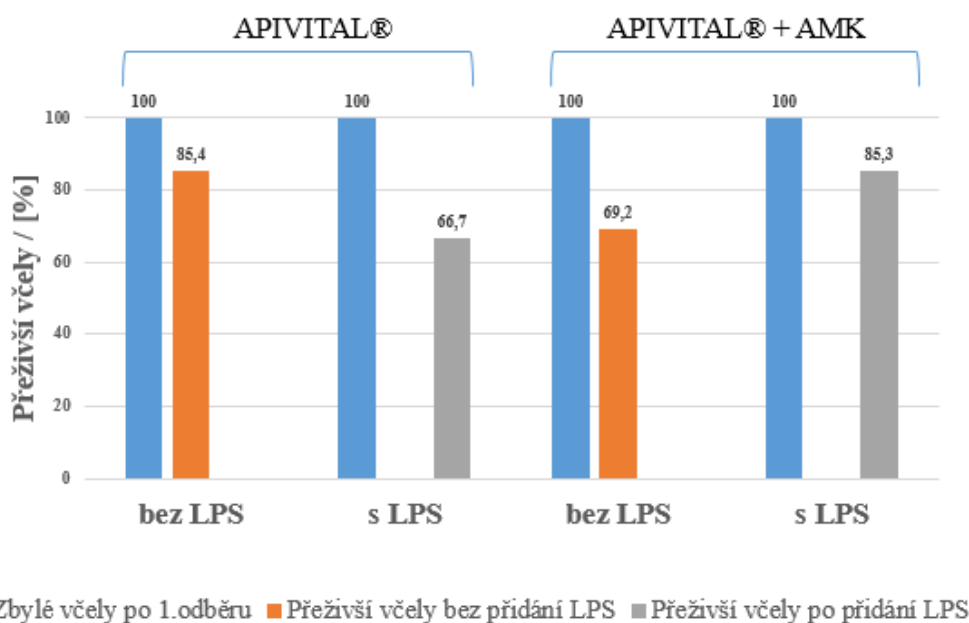
Z Grafů 2 – 6 je patrné, že včely lépe přeživaly na roztocích, které neobsahovaly žádné přídatky AMK. Původ medů neměl na mortalitu krmených včel vliv. Referenční skupina krmena sacharosou vykazovala stejný trend v úmrtnosti, jako ostatní krmiva.

### 4.3 Procentuální zastoupení přeživších včel po přidání LPS

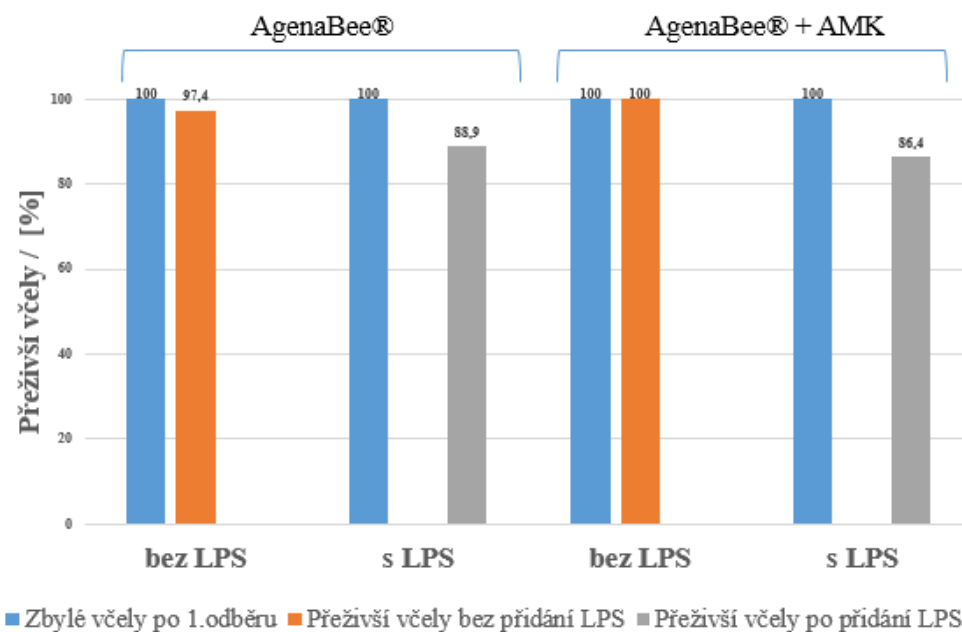
Posledních 24 hodin byla včelám podávána krmiva obohacena o LPS. Typy krmiv jsou uvedeny v Tab. 4 (viz kapitola 3.2.3). Z každého triplikátu klíček, jehož včely byly po sedm dní syceny stejným druhem krmiva, byla klíčka č. 1 krmena původním roztokem krmiva stejně, jako předešlé dny. Klíčky č. 2 a 3 byly krmeny týmiž krmivy obohacenými o LPS. Přežití včel na těchto krmivech je zaznamenáno ve sloupcových Grafech 7 – 10. Grafy uvádějí procentuální zastoupení přeživších včel. Krmné roztoky medů nebyly obohaceny o LPS.



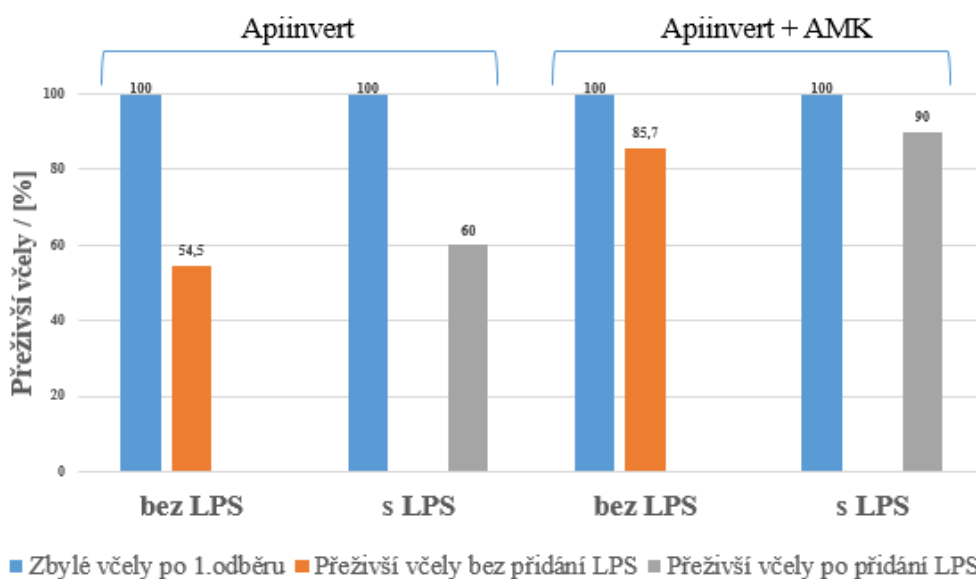
Graf 7 Procentuální zastoupení přeživších včel krmených po dobu 24 hodin od prvního odběru. Porovnání krmiv Sacharosa a Sacharosa + AMK.



Graf 8 Procentuální zastoupení přeživších včel krmených po dobu 24 hodin od prvního odběru. Porovnání krmiv APIVITAL® a APIVITAL® + AMK.



Graf 9 Procentuální zastoupení přeživších včel krmených po dobu 24 hodin od prvního odběru. Porovnání krmiv AgenaBee® a AgenaBee® + AMK.



Graf 10 Procentuální zastoupení přeživších včel krmených po dobu 24 hodin od prvního odběru.

Porovnání krmiv Apiinvert a Apiinvert + AMK.

Nejvyšší mortalita včel za posledních 24 hodin, kdy byly krmeny roztoky obohacenými o LPS, byla zaznamenána u krmiva Apiinvert (Graf 10). U krmiv sacharosa, APIVITAL® a Apiinvert, ke kterým byly přidány AMK, byla sledována nižší mortalita než v případě stejných krmiv bez AMK (Graf 8, Graf 9 a Graf 10). Tento trend



je protichůdný v porovnání s výsledky, které byly pozorovány během krmení bez LPS v předešlých sedmi dnech, kdy včely vykazovaly vyšší úmrtnost při krmení s přidáním AMK.

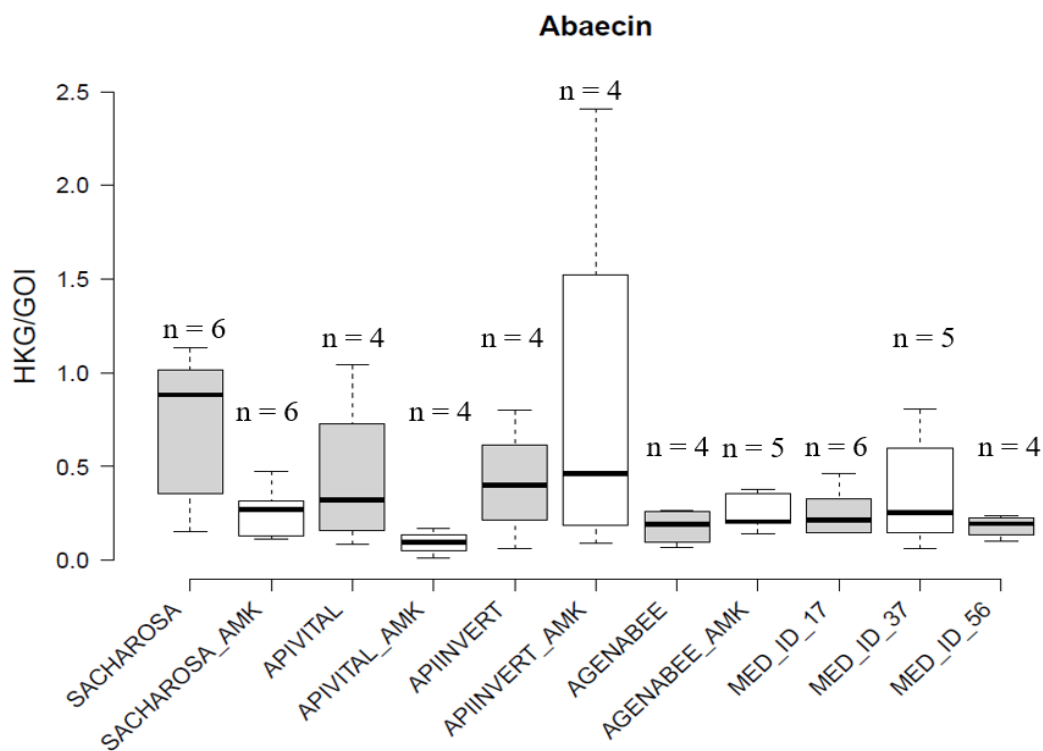
#### **4.4 Závislost relativní genové exprese na užití experimentálních krmiv**

Pro zjištění hodnot relativní genové exprese genů AMP, vitellogeninu a JHE byla použita cDNA. cDNA pro jeden vzorek byla přepsána z celkové RNA izolované z pěti přeživších včel skladovaných při -80 °C. Hodnoty relativní genové exprese sledovaných genů byly změřeny kvantifikační metodou RT-PCR. Následující výsledky jsou prezentovány v krabicových grafech, které porovnávají poměr relativních genových expresí HKG a relativních genových expresí sledovaného GOI (z anglického výrazu „gene of interest“, gen sledovaného zájmu) ve vzorcích. V grafech jsou zaznamenány hodnoty při krmení během prvních sedmi dní.

Výsledky byly statisticky vyhodnoceny v programu Statistica 13.1 analytickými metodami t-test a one-way ANOVA, po které následovala Post-hoc analýza za pomoci Tukey HSD testu. Vyhodnocení je znázorněno pro hladinu významnosti  $\alpha = 0,05$ .

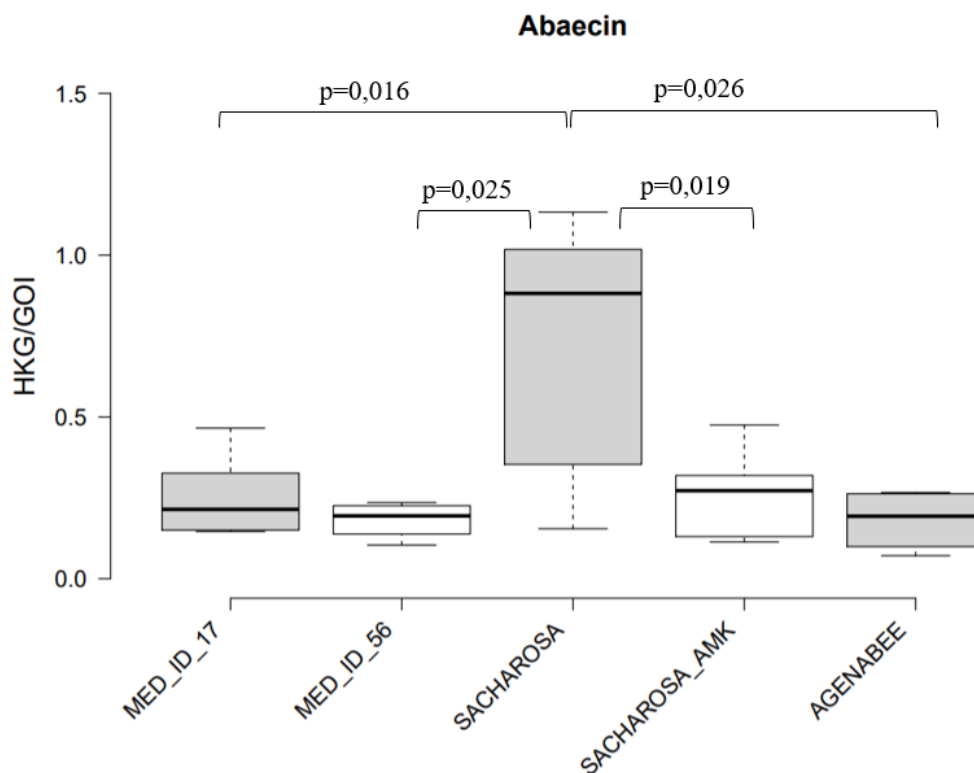
S využitím t-testů byly statisticky porovnávány průměry hladin relativních genových expresí pozorovaných genů. Všechna krmiva byla těmito testy porovnána navzájem. P-hodnoty (pravděpodobnosti výsledků) statisticky významných rozdílů jsou zaznamenány do krabicových grafech 12, 14, 16, 18 a 19, a pro daná dvě krmiva jsou vždy spojeny svorkou.

V porovnání hladin relativní exprese sledovaných genů pro abaecin, apidaecin, JHE a vitellogenin jsou znázorněny v grafech 11, 13, 15 a 17 i hodnoty n, které udávají počty vzorků, ze kterých byly grafy sestaveny.



Graf 11 Porovnání hladin relativní exprese genu *abaecinu* u včel, které byly krmené zkoumanými roztoky krmiv.

V Grafu 11 je zpozorován trend nižší exprese *abaecinu* u včel krmených všemi zkoumanými krmivy oproti kontrolní skupině krmené sacharosou



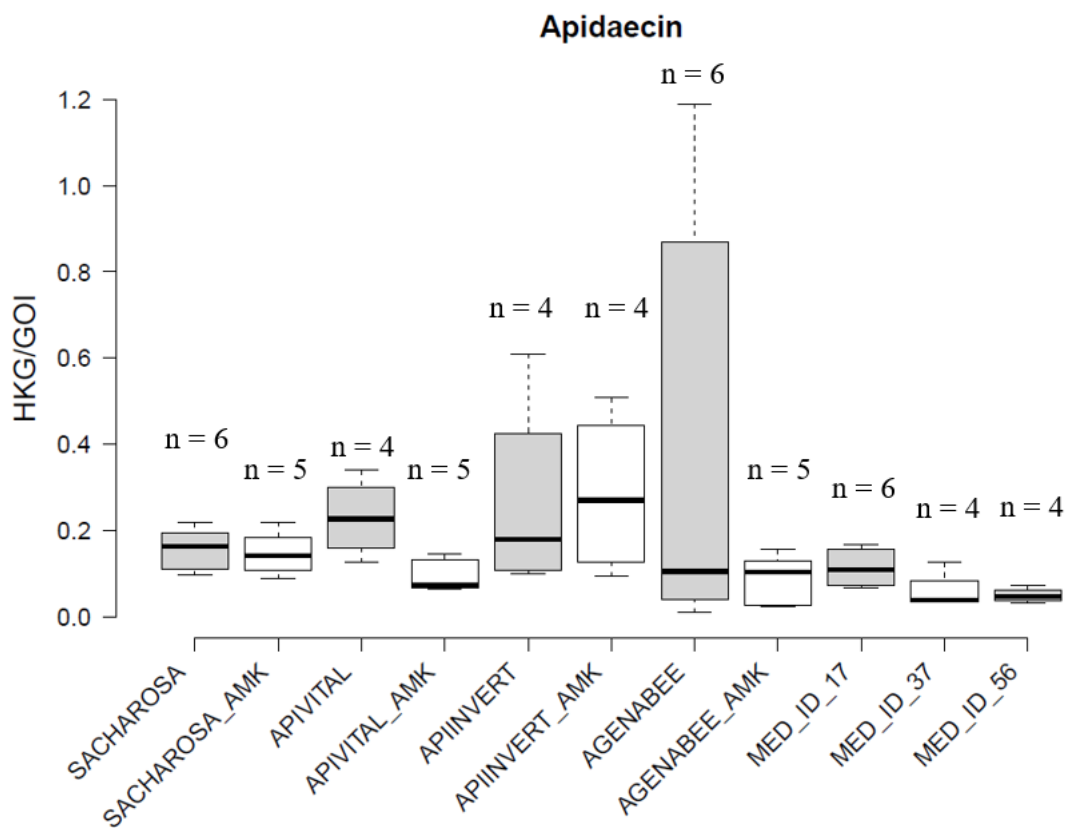
Graf 12 Porovnání hladin relativní exprese genu abaecinu se znázorněnými p-hodnotami u vzorků se statisticky významnými rozdíly.

Pro celý soubor dat s relativními genovými expresemi abaecinu byla spočítána za pomoci one-way ANOVA hodnota  $p = 0,074$ . Z této hodnoty ani z dílčích p-hodnot vygenerovaných metodou ANOVA nevyplývají žádné statisticky významné rozdíly. U hladin genových expresí abaecinu na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly.

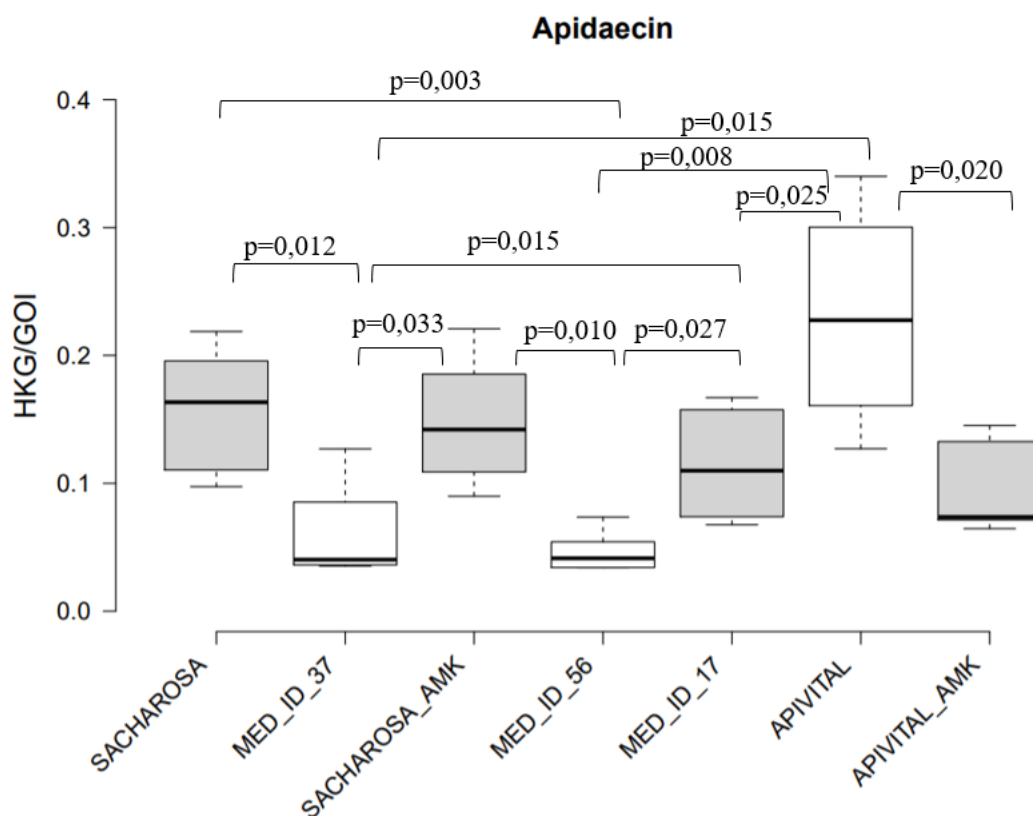
Na základě párových t-testů jsou statisticky významné rozdíly pozorovány v porovnání krmiv sacharosa a sacharosa obohacena o AMK, sacharosa a medy ID\_17 a ID\_56, a sacharosa a AgenaBee®. Míra exprese byla signifikantně nižší oproti kontrolní skupině. Srovnání sacharosa s medy vykazovaly po použití t-testů statisticky významné rozdíly medy ID\_17 a ID\_56. Med ID\_37 oproti sacharose nevykazoval žádné statistické významné rozdíly (na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ).

Největší exprese abaecinu byla zaznamenána u včel krmených neobohacným roztokem sacharosa (Graf 11). U sacharosa byla zároveň pozorována statisticky signifikantní změna v expresi při porovnání s její variantou doplněnou o AMK ( $p = 0,019$ ) (Graf 12), po které míra exprese abaecinu klesla. Ostatní krmiva nevykazovala

statisticky významné rozdíly a nebyl tak pozorován trend poklesu či nárůstu exprese v závislosti na přídavku AMK.



Graf 13 Porovnání hladin relativní exprese genu *apidaecinu* u včel, které byly krmené zkoumanými roztoky krmiv.



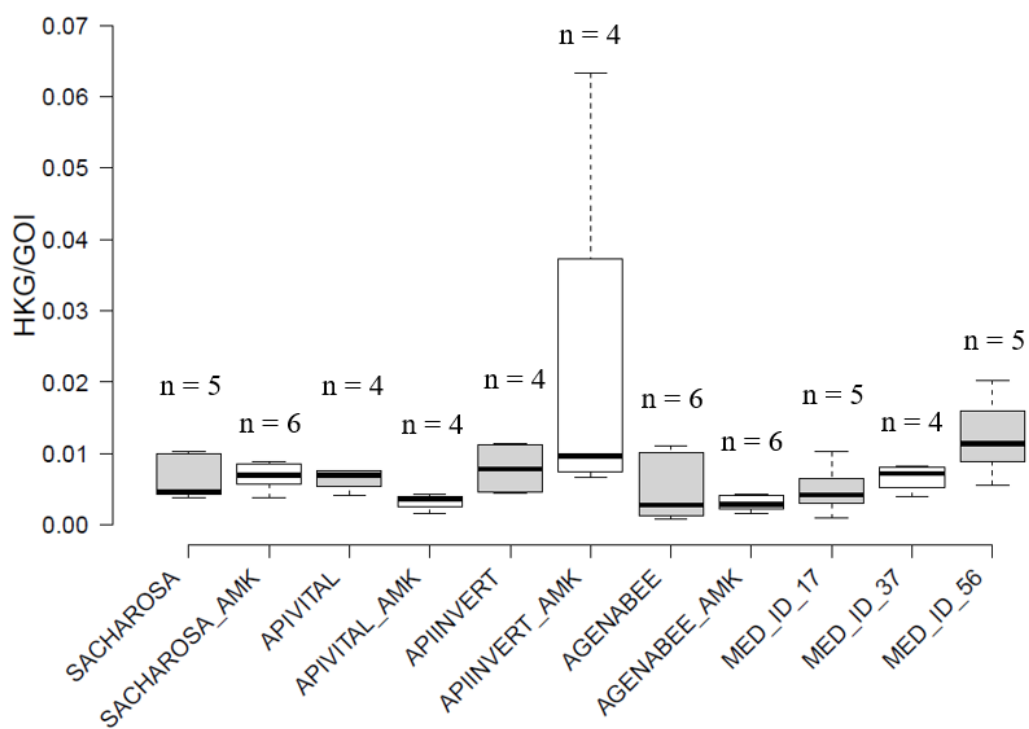
Graf 14 Porovnání hladin relativní exprese genu apidaecinu se znázorněnými p-hodnotami u vzorků se statisticky významnými rozdíly.

Data byla porovnána opět pomocí statistické analýzy one-way ANOVA. Pro celý soubor dat s relativními genovými expresemi apidaecinu byla spočítána hodnota  $p = 0,192$ .

Z grafu 13 je patrné, že se exprese apidaecinu mezi jednotlivými skupinami příliš nelišila. Za pomoci párových t-testů byl zaznamenán statisticky významný rozdíl v expresi genu pro apidaecin mezi skupinou krmenu APIVITALEm a APIVITALEm s přídatkem AMK ( $p = 0,020$ ) (Graf 14). Byla pozorována signifikantně nižší exprese apidaecinu oproti skupině včel krměných nepozměněným roztokem APIVITALu.

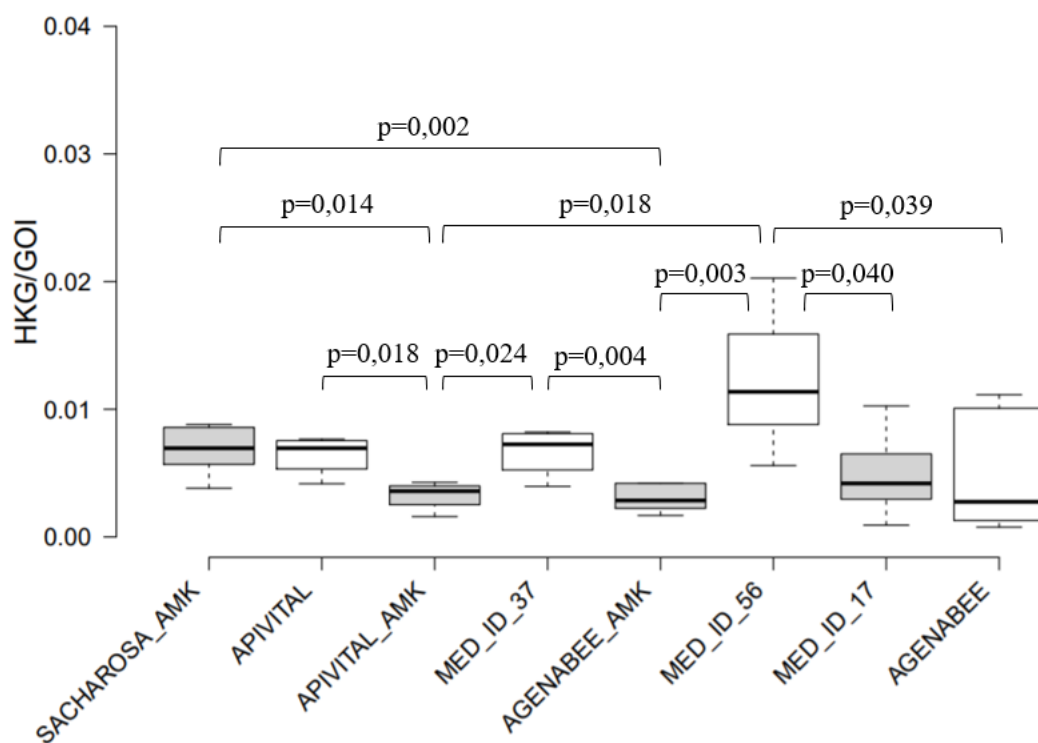
Jednotlivé typy krmiv byly opět porovnávané se sacharosou, jakožto referenční skupinou, t-testem. Významné rozdíly byly pozorovány při srovnání krmných směsí sacharosy s medy (Graf 14) ( $p < 0,05$ ). Signifikantně nižší exprese apidaecinu byla u včel krměných medy.

### Juvenilní hormon esterasa



Graf 15 Porovnání hladin relativní exprese genu juvenilního hormonu esterasy u včel, které byly krmené zkoumanými roztoky krmiv.

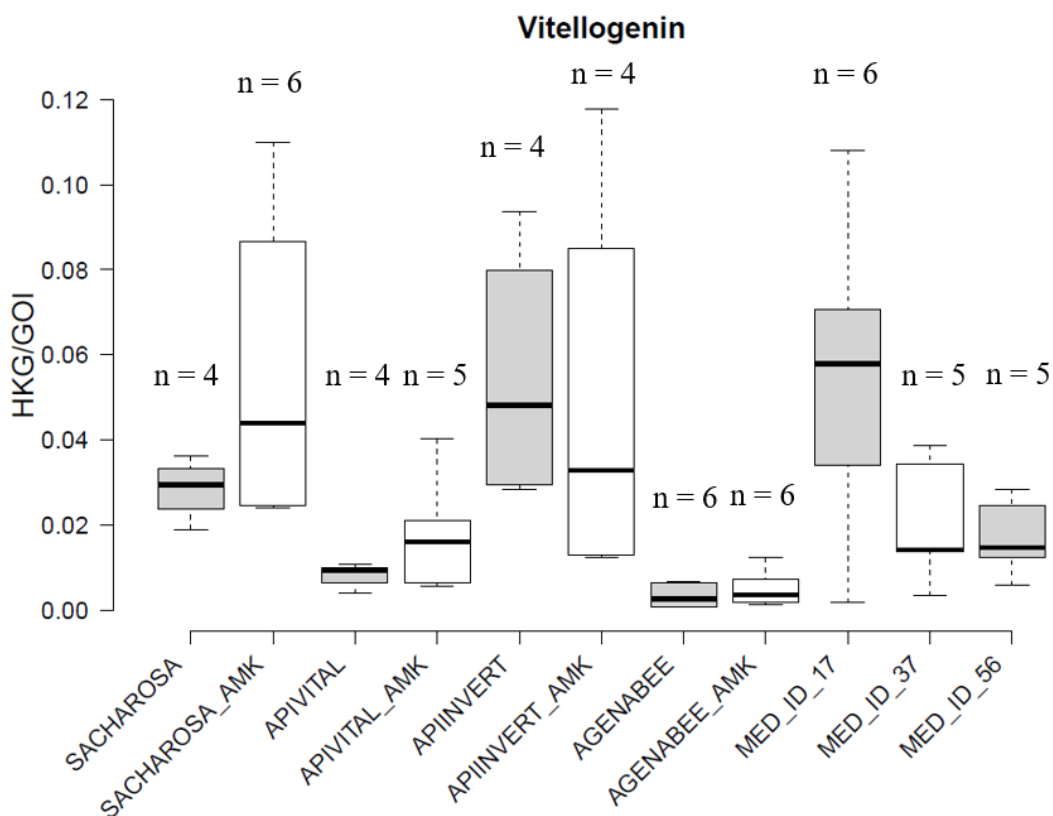
### Juvenilní hormon esterasa



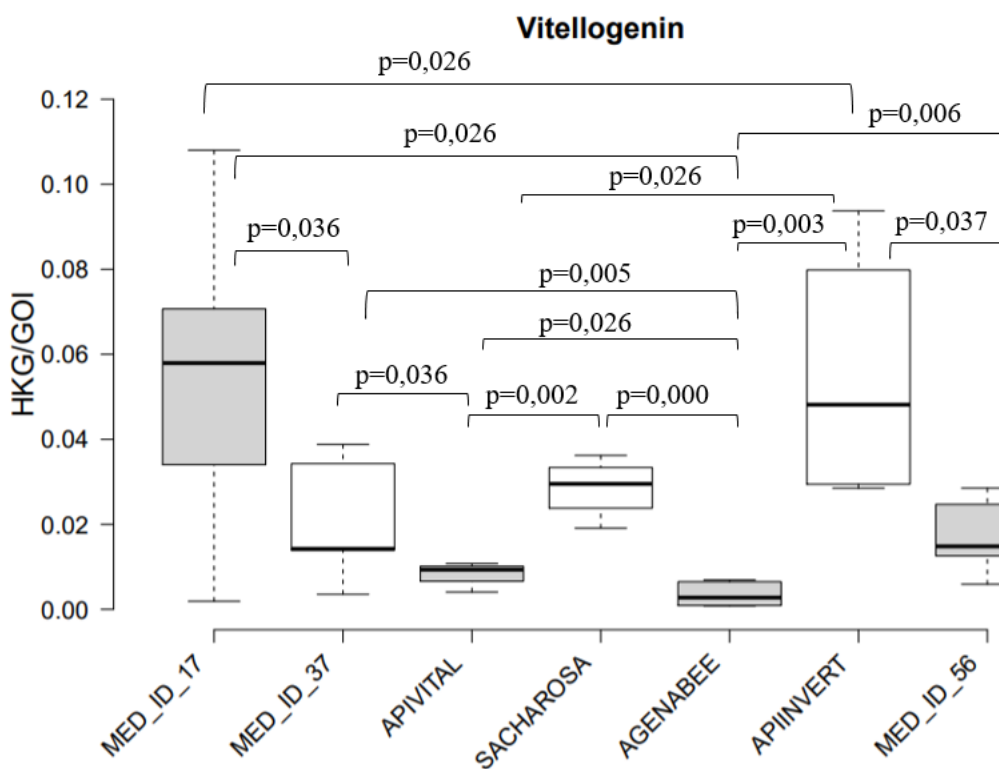
Graf 16 Porovnání hladin relativní exprese genu juvenilního hormonu esterasa se znázorněnými p-hodnotami u vzorků se statisticky významnými rozdíly.

Dále byly zjištěny hladiny relativní exprese JHE v závislosti na krmení zkoumanými směsmi. Z výsledků dle analýzy Post-hoc one-way ANOVY byl zpozorován signifikantní rozdíl mezi krmivou APIVITAL<sup>®</sup> a APIVITAL<sup>®</sup> s AMK (  $p = 0,018$ ). Nejvyšší hladiny relativní genové exprese pro JHE byly pozorovány po podání krmného roztoku Apiinvertu s AMK a medu ID\_56 (Graf 15).

Pro celý soubor dat s relativními genovými expresemi JHE byla spočítána hodnota  $p = 0,056$ . Jako referenční skupina sloužily opět včely krmené sacharosou. V krabicovém Grafu 16 jsou vyznačeny ty p-hodnoty párových t-testů, u kterých byly pozorovány statisticky rozdíly na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

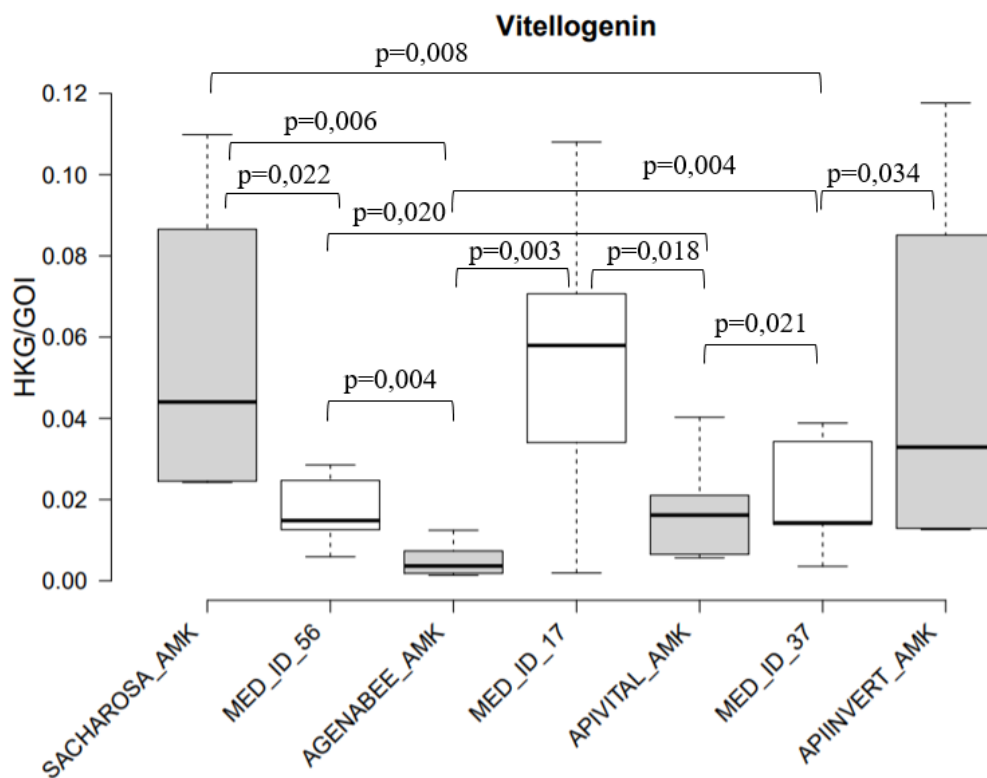


Graf 17 Porovnání hladin relativní exprese genu vitellogeninu u včel, které byly krmené zkoumanými roztoky krmiv.



Graf 18 Porovnání hladin relativní exprese genu vitellogenin se znázorněnými p-hodnotami u vzorků se statisticky významnými rozdíly pro krmiva bez AMK.





Graf 19 Porovnání hladin relativní exprese genu vitellogenin se znázorněnými p-hodnotami u vzorků se statisticky významnými rozdíly pro medy a krmiva s přidavkem AMK.

Posledním sledovaným genem je gen pro vitellogenin. Analýzou Post-hoc one-way ANOVA a t-testy nebyly pozorovány statisticky průkazné rozdíly v míře relativní exprese genu při porovnání krmiv a jejich variant obohacených o AMK. Statisticky zpozorované významné rozdíly hladin relativních genových expresí vitellogeninu mezi jednotlivými krmivy jsou uvedeny v Grafech 18 a 19. Výsledky jsou porovnávány na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

Hladiny relativních genových expresí JHE byly nižší než u genu vitellogeninu, kdy se hodnoty HKG/GOI blížily k hodnotě 0,12, zatímco u JHE hodnoty nepřesáhly číslo 0,07.

#### 4.5 Hladiny relativních genových expresí sledovaných genů po přidavku LPS

Analyzovány byly hladiny relativních genových expresí sledovaných genů (pro abaecin, apidaecin, vitellogenin a JHE) po přidavku LPS. Následující tabulky 11 – 14 znázorňují změny hladin relativních expresí po prvním odběru bez LPS, po druhém odběru bez LPS a po druhém odběru s LPS. Spočítány byly poměry relativních genových expresí

HKG a sledovaného GOI každého vzorku. Do tabulek 11 – 14 jsou zaznamenány aritmetické průměry poměru HKG/GOI pro jednotlivé odběry daného krmiva.

Tab. 11 Změny relativních genových expresí genu *abaecinu* po prvním odběru, druhém odběru bez přídavku LPS a s přídavkem LPS.

HKG/GOI <i>Abaecin</i>			
Krmivo	1. odběr	2.odběr/bez LPS	2.odběr/přídavek LPS
<b>Sacharosa</b>	0,74	0,17	0,24
<b>Sacharosa+AMK</b>	0,26	0,43	0,22
<b>APIVITAL<sup>®</sup></b>	0,44	0,08	0,14
<b>APIVITAL<sup>®</sup>+AMK</b>	0,17	0,07	0,19
<b>Apiinvert</b>	0,41	0,63	0,95
<b>Apiinvert+AMK</b>	0,86	0,34	1,23
<b>AgenaBee<sup>®</sup></b>	0,55	0,48	0,36
<b>AgenaBee<sup>®</sup>+AMK</b>	0,34	0,19	0,30

Tab. 12 Změny relativních genových expresí genu *apidaecinu* po prvním odběru, druhém odběru bez přídavku LPS a s přídavkem LPS.

HKG/GOI <i>Apidaecin</i>			
Krmivo	1. odběr	2.odběr/bez LPS	2.odběr/přídavek LPS
<b>Sacharosa</b>	0,16	0,06	0,06
<b>Sacharosa+AMK</b>	0,20	0,24	0,28
<b>APIVITAL<sup>®</sup></b>	0,23	0,08	0,11
<b>APIVITAL<sup>®</sup>+AMK</b>	0,10	0,28	0,07
<b>Apiinvert</b>	0,27	2,18	3,02
<b>Apiinvert+AMK</b>	0,29	0,11	0,27
<b>AgenaBee<sup>®</sup></b>	0,39	0,38	0,24
<b>AgenaBee<sup>®</sup>+AM</b>			
<b>K</b>	0,14	0,07	0,07

Tab. 13 Změny relativních genových expresí genu *juvenilního hormonu esterasy* po prvním odběru, druhém odběru bez přídavku LPS a s přídavkem LPS.

HKG/GOI <i>JHE</i>			
Krmivo	1. odběr	2.odběr/bez LPS	2.odběr/přídavek LPS
<b>Sacharosa</b>	0,01	0,00	0,01
<b>Sacharosa+AMK</b>	0,01	0,01	0,00
<b>APIVITAL<sup>®</sup></b>	0,01	0,01	0,01
<b>APIVITAL<sup>®</sup>+AM</b>	0,00	0,01	0,00

<b>K</b>			
<b>Apiinvert</b>	0,01	0,01	0,06
<b>Apiinvert+AMK</b>	0,02	0,01	0,01
<b>AgenaBee<sup>®</sup></b>	0,00	0,00	0,00
<b>AgenaBee<sup>®</sup>+AM</b>			
<b>K</b>	0,00	0,00	0,00

Při srovnání relativních expresí genu pro JHE je zřejmé, že většina hodnot je vyšších při druhém odběru po přidání LPS než bez nich.

*Tab. 14 Změny relativních genových expresí genu vitellogeninu po prvním odběru, druhém odběru bez přídatku LPS a s přídatkem LPS.*

Krmivo	HKG/GOI Vitellogenin		
	1. odběr	2.odběr/bez LPS	2.odběr/přídavek LPS
<b>Sacharosa</b>	0,05	0,01	0,02
<b>Sacharosa+AMK</b>	0,06	0,02	0,00
<b>APIVITAL<sup>®</sup></b>	0,01	0,07	0,12
<b>APIVITAL<sup>®</sup>+AMK</b>	0,02	0,02	0,00
<b>Apiinvert</b>	0,05	0,04	0,10
<b>Apiinvert+AMK</b>	0,05	0,03	0,07
<b>AgenaBee<sup>®</sup></b>	0,00	0,00	0,02
<b>AgenaBee<sup>®</sup>+AMK</b>	0,01	0,03	0,02

Hladiny relativních genových expresí vitellogeninu po druhém odběru byly vyšší než hladiny po druhém odběru bez LPS (Tab. 14).

U všech zkoumaných genů krmivo AgenaBee<sup>®</sup> vykazuje nižší hodnoty relativních genových expresí po přidání LPS do této krmné směsi. Dalším takovým krmivem je APIVITAL<sup>®</sup> s přídatkem AMK. Touto směsí krmené včely vykázaly při druhém odběru s přídatkem LPS vyšší hodnotu pouze u abaecinu. Krmivo sacharosa + AMK vykázalo vyšší hodnotu pouze u genu apidaecinu.

## 5 DISKUZE

Současným celosvětovým problémem, se kterým se potýkají včelaři, je zvýšená úmrtnost včelstev vlivem infekcí zapříčiněnými různými patogeny. To se odráží ve vyšší poptávce včelařů po vhodných krmivech, která by mohla napomoci ke zvýšení obranyschopnosti a podpoře vitality i dlouhověkosti. Vhodná krmiva mohou rovněž podpořit produkci antimikrobiálních peptidů, které jsou součástí humorální imunity včel (Brodschneider a Crailsheim, 2010; Semkiw a Skubida, 2016). Správně fungující humorální imunita jedinců přispívá k posílení sociální imunity včelstva. V této práci byla porovnána komerčně dostupná krmiva APIVITAL<sup>®</sup>, Apiinvert a AgenaBee<sup>®</sup>, dále vodný roztok sacharosy a krmné roztoky tří medů. Část včel byla krmena roztoky komerčních krmiv nebo sacharosy obohacenými o esenciální AMK. Každá AMK měla výslednou koncentraci 0,01 mol·l<sup>-3</sup>. Ty mohou nahradit v úlu nedostatečnou zásobu pylu, který je hlavním přirozeným zdrojem AMK.

Jedním ze sledovaných parametrů v experimentální části byla úmrtnost včel v závislosti na typu podaného krmiva. Vyšší mortalita byla sledována u skupin krmených roztoky obohacenými o esenciální AMK v porovnání s roztoky bez aditiv. Příčinou by mohla být neschopnost včel převádět tak vysoké koncentrace AMK na energii při glukoneogenezi. V tomto případě docházelo k vyšší úmrtnosti včel s dietou zatíženou vysokými koncentracemi AMK v důsledku metabolického stresu. Podobný trend pozorovali i Paoli *et al.* (2014). Krmili včely 1 mol·l<sup>-3</sup> roztokem sacharosy obohacené o různě vysoké koncentrace esenciálních AMK. Zkrácenou životností trpěly včelí skupiny krmené roztoky, které obsahovaly nižší průměr sacharidů k esenciálním AMK. Jednalo se především o poměry 1:50 a 1:75 (AMK : sacharosa). Optimální pro přeživší včely se ukázal poměr 1:250 (AMK : sacharosa). Pozorování ovšem vědecká skupina prováděla 14 dní.

Včely krmené komerčně vyráběným krmivem Apiinvert a Apiinvert s přídavkem aminokyselin vykazovaly vyšší úmrtnost. Tento fakt může být způsoben látkou HMF. Ta vzniká přirozeně v medech a krmivech při samotné výrobě. Čím déle jsou krmiva pro včely skladována v prostorech o vysoké teplotě, tím větší je pravděpodobnost, že se bude tvořit více množství HMF (Fallico *et al.*, 2008). Připravené roztoky pro účel diplomové práce byly nachystány do injekčních stříkaček a zamrazeny, nicméně komerčně vyráběná krmiva a medy byly před zpracováním skladovány v teplém

prostředí, což mohlo umocnit rozklad redukujících cukrů za vzniku HMF, a tím mohlo být jeho množství v krmných směsích navýšeno.

Svazová norma ČESKÝ MED dle § 10 vyhlášky č. 76/2003 Sb., oddíl 2 Med stanovuje množství HMF do 20 mg/kg ve všech druzích českého medu. Vliv koncentrací HMF na životnost včel zkoumali Krainer *et al.* (2015). Studie uvádí se, že koncentrace HMF do 0,75 mg/ml krmné směsi nebyly smrtící ani pro dospělé včely ani larvy.

Výzkumný ústav včelařský, s. r. o. (VÚVč) podrobil analýzám vedle českých medů i komerčně vyráběná krmiva. Zjišťoval přítomné množství HMF ([www.beedol.cz/2012/mije-stanovisko-ke-krmivu-apismix](http://www.beedol.cz/2012/mije-stanovisko-ke-krmivu-apismix)). Z komerčně vyráběných krmiv pro analytický rozbor použil právě APIVITAL® a Apiinvert, které jsou zkoumány i v této práci. VÚVč při analýzách krmiva značky Apiinvert zjistil hodnoty vysoké až 65,4 mg HMF na kg krmiva. Pro tuto diplomovou práci nebyly medy ani komerčně vyráběná krmiva podrobeny analýzám, které by zjišťovaly množství HMF. Křivky životnosti v kapitole 4.2 ukazují na vyšší úmrtnost při krmení Apiinvertem oproti ostatním krmným směsím. Jedním z aspektů na zvýšenou mortalitu by mohlo být množství přítomného HMF.

Semkiw a Skubida (2016) porovnávali krmení německého Apiinvertu společně s krmivou vyrobenými ze škrobu, tedy ze stejné látky, jako je roztok AgenaBee®, který patří ke komerčně vyráběným krmivům. Skupina neodhalila žádné statisticky významné rozdíly mezi škrobovými krmivou a invertovanými sacharidovými krmivou. Analyzované škrobové sirupy se ukázaly stejně vhodné pro krmení včel jako ty invertované nebo sirup z obyčejné sacharosy. V experimentální části této práce si vedl lépe roztok obyčejné sacharosy než zmíněný Apiinvert. Nejnížší hladiny relativních genových expresí nebyly sledovány ani po krmení roztokem AgenaBee®, i když je vyráběn ze škrobu. Již v minulosti podle Rybak *et al.* (2006) se ukázala škrobová krmiva jako nevhodná strava pro včely kvůli neefektivnímu rozkladu škrobu a jeho spotřebě. Testovali krmivo v zimě na přezimujících včelách, kdežto šetření v rámci diplomové práce probíhalo za laboratorních podmínek.

V práci byl sledován vliv krmných roztoků na expresi vybraných AMP – abaecinu a apidaecinu, které se jako součást humorální imunity podílejí na imunitní odpovědi včely při napadení patogeny (Klaudiny *et al.*, 2009). Nejvyšší hladina relativní exprese genu abaecinu byla zaznamenána při krmení obyčejné sacharosy. Relativní exprese genu

apidaecinu byla zaznamenána při krmení APIVITAL<sup>®</sup> a sacharosou. Překvapivě byly zjištěny statistické rozdíly hodnot pro krmnou směs sacharosy a medů.

Med navíc obsahuje aminokyseliny, minerály, vitaminy a proteiny (Ptaszyńska *et al.*, 2016). Jedná se vlastně o roztok sacharosy, glukosy a fruktosy, tudíž by mohlo být očekáváno, že hodnoty relativní genové exprese pro medy a sirup z obyčejné sacharosy budou podobné nebo krmné roztoky medů budou vykazovat vyšší hladiny genových expresí včel při krmení díky jeho přidané hodnotě v podobě látek, které med navíc obsahuje.

Poměr glykolipoproteinu vitellogenin a enzymu esterasy juvenilního hormonu jsou důležitými ukazateli vitality a správného kastovního zařazení včely (Mackert *et al.*, 2008).

Měření hladiny genové exprese vitellogeninu u včel v závislosti na použití komerčně vyráběných krmiv s AMK nebylo doposud publikováno. U hmyzu hnědé kobyly (*Nilaparvata lugens*) byla prokázána zvýšená exprese genu vitellogeninu při podání krmiva s přísadkou AMK (Lu *et al.*, 2016). V předložené diplomové práci byla pozorována dynamika navýšení hladin relativní exprese genu vitellogeninu u podávaného sacharidového roztoku Apiinvertu a medu ID 17. Dále hladina exprese genu pro vitellogenin byla zaznamenána vyšší v případě včel krmených roztoky obohacenými o esenciální AMK, konkrétně u krmiv sacharosa, APIVITAL<sup>®</sup> a Apiinvert. Nicméně, stále se jedná o transkript, což nemusí plně odrážet přímou skutečnost toho, zda se více proteinu vitellogeninu nachází v hemolymfě včel. Stejný trend nárůstu exprese genu pro vitellogenin sledovali ve svém výzkumu Bitondi a Simoes (1996). Ti přikrmovali včely pylem. Vyšší hladiny exprese zaznamenali u skupiny včel, která byla krmena vyšším podílem pylu, který slouží včelám jako zásobní látka AMK. Při krmení roztoky s AMK ukazují výsledky této diplomové práce, že je relativní exprese genu vitellogeninu hodne různorodá. Jedno z možných vysvětlení je, že na dodané esenciální AMK včely reagují velice individuálně.

Hladina relativní genové exprese JHE nebyla napříč všemi druhy krmiv prokazatelně ovlivněna přísadkou AMK. Studie zabývající se vlivem krmiva na hladiny exprese genu JHE včely medonosné (*Apis mellifera*) nebyly doposud publikovány. V budoucích výkumech by bylo zajímavé sledovat vliv krmiv nejen na vitellogenin a JHE, ale i JH, jejichž hladiny titrů v hemolymfě se vzájemně odrážejí na dlouhověkosti a vitalitě včel (Hartfelder, 2000; Amdam *et al.*, 2003).

V poslední části experimentální práce byly včely vystaveny antigenu (LPS), jenž byl přidáván do vodných roztoků krmiv. Takto byly včely krmeny posledních 24 hodin experimentu. Byl sledován vliv vystavení antigenu (LPS) na hladiny vybraných genů humorální imunity včel. LPS byly podávány v roztocích krmiv (s nebo bez AMK). Zaznamenán byl opačný trend mortality než u krmiv, která obsahovala pouze přídavky AMK. Předběžné výsledky ukazují, že včely krmené přídavky LPS vykazovaly nižší úmrtnost u krmiv s přídavky esenciálních AMK. Nižší úmrtnost po přídavku LPS může u některých krmiv souviset s nárůstem exprese AMP apidaecinu a abaecinu vlivem imunizace. Konkrétně u skupiny krmené roztoky APIVITALu s AMK, Apiinvertu a Apiinvertu s AMK docházelo k nárůstům hladiny genové exprese abaecinu. Nárůst genové exprese apidaecinu po imunizaci LPS byl pak sledován u krmných směsí sacharosy s AMK a Apiinvertu. Po vystavení antigenu by mohl být žádoucí vyšší příjem AMK z potravy, které by mohly být efektivněji zužitkovány při translaci AMP, a tím aktivovat imunitní systém včel. Studiu vlivu LPS na expresi AMP se dříve věnovali Choi *et al.*, (2008). Experimenty neprováděli na včele medonosné (*Apis mellifera*), ale na čmelácích *Bombus ignitus*. Výsledky výzkumu odhalily zvýšenou expresi genů 4 AMP, mezi kterými byl i gen pro abaecin a apidaecin. Jejich studie se však nezabývala výživou. LPS nebyly podávány v krmivech, nýbrž injekčně. Po injekčním podání LPS došlo k nárůstu genové exprese AMP.

Důležitým stresujícím faktorem je i prostředí a prostor, ve kterém se včely nacházely. Včely byly drženy v umělých klíčkách v laboratorních podmínkách. Každá uměle vytvořena klíčka, sestavena částečně podle Williams *et al.* (2013), obsahovala 70 – 100 včel. Včely byly chovány *in vitro* v uzavřeném prostoru o objemu 200 ml. Prostor byl dostatečně odvětráván. Všechny skupiny měly stejné podmínky pro chov. Těmito podmínkami byla teplota 36°C, vlhkost, stejný inkubátor a všechny včely byly krmeny *ad libitum*. Výsledky obsahují i odlehlé hodnoty. Tyto odlehlé hodnoty mohou být zapříčiněny biologickou variabilitou. Ve svém výzkumu Paoli *et al.*, (2014) používali pro chov *in vitro* klíčky z plexiskla o rozměrech 11×6×20 cm. Plněny byly pouze dvaceti včelami. Vědci se nedomnívali, že by úmrtnost byla zapříčiněna nedostatečným prostorem pro pohyb včel. I tento prostorový aspekt by mohl hrát roli v přežívání včel za laboratorních podmínek. Do budoucna by stálo za zvážení, zda by nebylo pro včely komfortnější použít klíčky, které by byly prostorově objemnější. Případně zda klíčky neplnit menším množstvím včel.

## 6 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce se zabývala humorálním imunotním systémem včely medonosné (*Apis mellifera*) se zaměřením na antimikrobiální peptidy (AMP) abaecin, apidaecin, dále na glykolipoprotein vitellogenin a enzym esterasu juvenilního hormonu (JHE).

V teoretické části byla zpracována literární rešerše, která shrnuje některé poznatky o změnách imunokompetence včelího plodu a dospělých včel v závislosti na podávání krmiv.

Hlavním cílem práce bylo hodnocení vybraných krmiv a jejich variací obohacených o esenciální aminokyseliny (AMK) nebo lipopolysacharidy (LPS) ve vztahu k úmrtnosti včel a k relativní expresi genů vybraných peptidů zapojených do humorální imunity včel, genu vitellogeninu a genu esterasy juvenilního hormonu.

Krmiva s přidanými esenciálními AMK o výsledné koncentraci  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-3}$  každé AMK v krmivu vykazovala vyšší úmrtnost včel než krmiva bez přidaných AMK. Po přidání antigenu LPS ke sledovaným krmivům s a bez AMK byl zpozorován opačný trend. Vyšší úmrtnost byla u skupin včel, které byly krmeny krmivou bez AMK. Po vystavení antigenu mohl být žádoucí vyšší příjem esenciálních AMK z potravy, které by mohly být efektivněji využity při translaci AMP. Ovšem, jak bylo prací potvrzeno, vysoké koncentrace esenciálních AMK ve výživě nemusí být pro včely příznivým řešením ve zvýšení životnosti.

V další části práce byly měřeny relativní exprese genů pro abaecin, apidaecin, vitellogenin a JHE kvantifikační metodou Real-Time PCR. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny v programu Statistica 13.1 analytickými metodami t-test a one-way ANOVA, po které následovala Post-hoc analýza za pomoci Tukey HSD testu. Vyhodnocení je uskutečněno na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Nejvyšší hladina relativní exprese genu abaecinu byla po krmení obyčejným sirupem sacharosy, u apidaecinu byl nejvyšší nárůst u skupiny krmené Apiinvertem s AMK. Zvýšené hladiny relativní genové exprese vitellogeninu byly pozorovány po krmení medem ID 17. Včelí jedinci krmení medem ID 56 po tomto krmivu vykazovali nejvyšší genové exprese JHE.

Z prvotních výsledků nelze vyvodit striktní závěry, které by jasně poukazovaly na krmivo s výraznějšími účinky na zvýšení obranyschopnosti, vitalitu a dlouhověkost



včel. Experimenty krmení včel je žádoucí v budoucnu zopakovat, popřípadě se zamyslet nad jiným alternativním množstvím přidaných esenciálních AMK

## 7 LITERATURA

- Ahmad S., Pardini R. S. (1990): Mechanisms for regulating oxygen toxicity in phytophagous insects. *Free Radical Biology and Medicine* **8**, 401-413.
- Alaux C., Dantec C., Parrinello H., Le Conte Y. (2011): Nutrigenomics in honey bees: Digital gene expression analysis of pollen's nutritive effects on healthy and varroa parasitized bees. *BMC Genomics* **12**: 496, <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-216412-496>.
- Amaral I. M. R., Neto J. F. M., Pereira G. B., Franco M. B., Beletti M. E., Kerr W. E., Bonetti A. M., Ueira-Vieira C. (2010): Circulating hemocytes from larvae of *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae, Meliponini): Cell types and their role in phagocytosis. *Micron* **41**, 123-129.
- Amdam G. V., Omholt S. (2002): The Regulatory Anatomy of Honeybee Lifespan. *Journal of Theoretical Biology* **216**, 209-228.
- Amdam G. V., Norberg K., Hagen A., Omholt S. W. (2003): Social exploitation of vitellogenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 1799-1802.
- Amdam G. V., Hartfelder K., Norberg K., Hagen A., Omholt S. W. (2004): Altered Physiology in Worker Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) Infested with the Mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae): A Factor in Colony Loss During Overwintering? *Journal of Economic Entomology* **97**, 741-747.
- Ament S. A., Chan Q. W., Wheeler M. M., Nixon S. E., Johnson S. P., Rodriguez-Zas S. L., Foster L. J., Robinson, G. E. (2011): Mechanisms of stable lipid loss in a social insect. *Journal of Experimental Biology* **214**, 3808-3821.
- Barker R. J., Lehner Y. (1978): Laboratory comparison of high fructose corn syrup, grape syrup, honey, and sucrose syrup as maintenance food for caged honey bees. *Apidologie* **9**, 111-116.
- Barchuk A. R., Bitondi M. M. G., Simões Z. L. P. (2002): Effects of juvenile hormone and ecdysone on the timing of vitellogenin appearance in hemolymph of queen and worker pupae of *Apis mellifera*. *Journal of Insect Science* **2**, 1-8.
- Belitz H. D., Grosch W., Schieberle P. (2009): *Food chemistry*. 4th ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Germany, 1070 stran.
- Beedol home page: <http://www.beedol.cz/2012/mije-stanovisko-ke-krmivu-apismix> (18. 4. 2018)
- Bitondi M. M. G., Simões Z. L. P. (1996): The relationship between level of pollen in the diet, vitellogenin and juvenile hormone titres in Africanized *Apis mellifera* workers. *Journal of Apicultural Research* **35**, 27-36.
- Brodschneider R., Crailsheim K. (2010): Nutrition and health in honey bees. *Apidologie* **41**, 278-294.
- Bustin S. A., Nolan T. (2004): Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. *Journal of Biomolecular Techniques : JBT* **15**, 155-166.
- Campbell P. M., Oakeshott J. G., Healy M. J. (1998): Purification and kinetic characterisation of juvenile hormone esterase from *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **28**, 501-515.
- Casteels P., Ampe Ch., Jacobs F., Vaeck M., Tempst P. (1989): Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *The EMBO Journal* **8**, 2387-2391.
- Casteels P., Ampe Ch., Riviere L., van Damme J., Elicone Ch., Fleming M., Jacobs F., Tempst P. (1990): Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honey bee (*Apis mellifera*). *European Journal of Biochemistry* **187**, 381-386.
- Casteels P., Tempst P. (1994): Apidaecin-type peptide antibiotics function through a nonporeforming mechanism involving stereospecificity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **199**, 339-345.
- Carroll M. J., Brown N., Goodall C., Downs A. M., Sheenan T. H., Anderson K. E., Pratt S. C. (2017): Honey bees preferentially consume freshly-stored pollen. *PLOS ONE* **12**, 1-21.

- Cooper M. D., Alder M. N. (2006): The Evolution of Adaptive Immune Systems. *Cell* **124**, 815-822.
- Crailsheim K., Riessberger-Galle U. (2001): Honey bee age-dependent resistance against American foulbrood. *Apidologie* **32**, 91-103.
- Cremer S., Armitage S. A. O., Schmid-Hempel P. (2007): Social Immunity. *Current Biology* **17**, 693-702.
- Cremer S., Sixt M. (2009): Analogies in the evolution of individual and social immunity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **364**, 129-142.
- Cunha F. M., Wanderley-Teixeira V., Teixeira A. A., Albuquerque A. C., Alves L. C., Lima E. A. (2009): Hemocyte characterization of *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae) Workers and Hemocyte Evaluation after Parasitism by *Metarhizium anisopliae*. *Neotropical Entomology* **38**, 293-297.
- Danihlík J., Petřivalký M., (2015): Aktuální vědecké poznatky o imunitě a zdraví včel. *Veterinářství* **65**, 431-433.
- de Grandi-Hoffman G., Chen Y., Huang E., Huang M. H. (2010): The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology* **56**, 1184-1191.
- Egekwa N. I., Posada F., Sonenshine D. E., Cook S. (2018): Using an in vitro system for maintaining *Varroa destructor* mites on *Apis mellifera* pupae as hosts: studies of mite longevity and feeding behavior. *Experimental and Applied Acarology* **74**, 301-315.
- Erridge C., Bennett-Guerrero E., Poxton I. R. (2002): Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes and Infection* **4**, 837-851.
- Evans, J. D. (2006): Beepath: An ordered quantitative-PCR array for exploring honey bee immunity and disease. *Journal of Invertebrate Pathology* **93**, 135-139.
- Evans J. D., Spivak M. (2010): Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**, 62-72.
- Fallico B., Arena E., Zappala M. (2008): Degradation of 5-Hydroxymethylfurfural in Honey. *Journal of Food Science* **73**, 625-631.
- Gillespie J. P., Kanost M. R., Trenczek T. (1997): Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology* **42**, 611-643.
- Gilliam M. (1979): Microbiology of pollen and bee bread: the yeasts. *Apidologie* **10**, 43-53.
- Halouzka R., Tarkowski P., Zeljković S. Č. (2016): Characterisation of phenolics and other quality parameters of different types of honey. *Czech Journal of Food Sciences* **34**, 244-253.
- Hancock R. E. W. (1997): Peptide antibiotics. *Lancet*, **349**, 418-422.
- Hancock R. E. W. (2001): Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *The Lancet Infectious Diseases* **1**, 156-164.
- Hart A. G., Ratnieks F. L. (2001): Erratum to: Why do honey-bee (*Apis mellifera*) foragers transfer nectar to several receivers? Information improvement through multiple sampling in a biological system. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **49**, 330-330.
- Hartfelder K. (2000): Insect juvenile hormone: from "status quo" to high society. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **33**, 157-177.
- Hořejší V., Bartůňková J (2009): Základní pojmy, funkce a složky imunitního systému. Buněčné složky nespecifické imunity. Humorální složky nespecifické imunity. In: *Základy imunologie*. 4 th ed., (Britnická R. ed.), TRITON, Praha, Česká republika, 23-55.
- Choi Y. S., Choo Y. M., Lee K. S., Yoon H. J., Kim I., Je Y. H., Sohn H. D., Jin B. R. (2008): Cloning and expression profiling of four antibacterial peptide genes from the bumblebee *Bombus ignitus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **150**, 141-146.
- Jander R. (1976): Grooming and pollen manipulation in bees (Apoidea): the nature and evolution of movements involving the foreleg. *Physiological Entomology* **1**, 179-194.
- Kamita S. G., Hammock B. D. (2010): Juvenile hormone esterase: biochemistry and structure. *Journal of Pesticide Science* **35**, 265-274.

- Klaudiny J., Bachanová K., Albert Š., Halgašová L., Dzúrová M., Kopernický J. (2009): Honeybee defensin: their characterization and studies of their expression in honeybee colonies. *Collection Symposium Series* **11**, 59-63.
- Kodrík D. (2004): *Fyziologie hmyzu*. České Budějovice: Entomologický ústav Akademie věd České republiky, Biologická fakulta, Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích, Česká republika, 220 stran.
- Kodrík D., Bednářová A., Zemanová M., Krishnan N. (2015): Hormonal Regulation of Response to Oxidative Stress in Insects An-Update. *International Journal of Molecular Sciences* **16**, 25788-25791.
- Kowalski S., Lukaszewicz M., Juszczak L., Kutyla-Kupidura E. M. (2013): Dynamics of 5-hydroxymethylfurfural formation in shortbreads during thermal processing. *Czech Journal of Food Sciences* **31**, 33-42.
- Krainer S., Brodschneider R., Vollmann J., Crailsheim K., Riessberger-Gallé U. (2015): Effect of hydroxymethylfurfural (HMF) on mortality of artificially reared honey bee larvae (*Apis mellifera carnica*). *Ecotoxicology* **25**, 320-328.
- Laughton A. M., Boots M., Siva-Jothy M. T. (2011): The ontogeny of immunity in the honey bee, *Apis mellifera L.* following an immune challenge. *Journal of Insect Physiology* **57**, 1023-1032.
- Le Conte Y., Bécard J. M., Costagliola G., de Vaublanc, G., Maâtaoui M. E., Crauser D., Plettner E., Slessor K. N. (2006): Larval salivary glands are a source of primer and releaser pheromone in honey bee (*Apis mellifera L.*). *Naturwissenschaften* **93**, 237-241.
- Lee S. A., Jang S. H., Kim B. H., Shibata T., Yoo J., Jung Y., Kawabata S. I., Lee B. L. (2017): Insecticidal activity of the metalloprotease AprA occurs through suppression of host cellular and humoral immunity. *Developmental and Comparative Immunology* **81**, 116-126.
- Li W., Ma G., Zhou X. (2006): Apidaecin-type peptides: biodiversity, structure-function relationships and mode of action. *Peptides* **27**, 2350-2359.
- Li Y., Xiang Q., Zhang Q., Huang Y., Su Z. (2012): Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides* **37**, 207-215.
- Linh N., Schneider P., Schneider D. S. (2008): Evidence for specificity and memory in the insect innate immune response. In: *Insect Immunology*. 1st ed., (Beckage N. E. ed.) Elsevier Academic Press, Amsterdam, The Netherlands, 97 - 123.
- Lourenço A. P., Mackert A., dos Santos Cristino A., Simões Z. L. P. (2008): Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie* **39**, 372-385.
- Lu K., Chen X., Liu W. T., Zhang X. Y., Chen M. X., Zhou Q. (2016): Nutritional Signaling Regulates Vitellogenin Synthesis and Egg Development through Juvenile Hormone in *Nilaparvata lugens* (Stål). *International Journal of Molecular Sciences* **17**: 269.
- Mackert A., do Nascimento A. M., Bitondi M. M. G., Hartfelder K., 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**, 33-44.
- Metheniti A., Paraskevopoulou N., Lambropoulou M., Marmaras V. J. (2001): Involvement of FAK/Src complex in the processes of *Escherichia coli* phagocytosis by insect hemocytes. *FEBS Letters* **496**, 55-59.
- Molan P. C. (2006): The Antibacterial Activity of Honey. *Bee World* **73**, 5-28.
- Negri P., Ramirez L., Quintana S., Szawarski N., Maggi M., Le Conte Y., Lamattina L., Eguaras, M. (2017): Dietary Supplementation of Honey Bee Larvae with Arginine and Abscisic Acid Enhances Nitric Oxide and Granulocyte Immune Responses after Trauma. *Insects* **8**: 85.
- Nyström T. (2005): Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *The EMBO Journal* **24**, 1311-1317.
- Olaitan P. B., Adeleke O. E., Ola, I. O. (2007): Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *African Health Sciences* **7**, 159-165.

- Olofsson T. C., Vásquez A. (2008): Detection and Identification of a Novel Lactic Acid Bacterial Flora Within the Honey Stomach of the Honeybee *Apis mellifera*. *Current Microbiology* **57**, 356-363.
- Omholt S. W. (1988): Relationships between worker longevity and the intracolony population dynamics of the honeybee. *Journal of Theoretical Biology* **130**, 275-284.
- Otvos L., (2000): Interaction between heat-shock proteins and antimicrobial peptides. *Biochemistry* **39**, 14150-14159.
- Paoli P. P., Donley D., Stabler D., Saseendranath A., Nicolson S. W., Simpson S. J., Wright G. A. (2014): Nutritional balance of essential amino acids and carbohydrates of the adult worker honeybee depends on age. *Amino Acids* **46**, 1449-1458.
- Paoli P. P., Wakeling L. A., Wright G. A. and Ford, D. (2014): The dietary proportion of essential amino acids and Sir2 influence lifespan in the honeybee. *AGE* **36**, 1239-1247.
- Pfaffl M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**, 2002-2007.
- Pfaffl M. (2004): Quantification strategies in real-time PCR In: *A-Z of quantitative PCR*. (Bustin S.A. ed.), International University Line, USA, 87-112.
- Piulachs M. D., Guidugli K. R., Barchuk A. R., Cruz J., Simões Z. L. P., Bellés X. (2003): The vitellogenin of the honey bee, *Apis mellifera*: structural analysis of the cDNA and expression studies. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **33**, 459-465.
- Ptaszyńska A. A., Paleolog J., Borsuk, G., (2016): *Nosema ceranae* Infection Promotes Proliferation of Yeasts in Honey Bee Intestines. *PLOS ONE* **11**, 726-740.
- Přidal A. (2003): Definice medu. In: *Včelí produkty*. Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Česká Republika, 24-82.
- Rahnamaeian M., Cytrynska M., Zdybicka-Barabas A., Dobszlaff K., Wiesner J., Twyman R. M., Zuchner T., Sadd B. M., Regoes R. R., Schmid-Hempel P., Vilcinskis, A. (2015): Insect antimicrobial peptides show potentiating functional interactions against Gram-negative bacteria. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **282**, 20150293.
- Randolt K., Gimple O., Geissendörfer J., Reinders J., Prusko C., Mueller M. J., Albert S., Tautz J., Hildburg B. (2008): Immune-Related Proteins Induced in the Hemolymph After Aseptic and Septic Injury Differ in Honey Bee Worker Larvae and Adults. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **69**, 155-167.
- Riddiford L. M. (1996): Juvenile hormone: The status of its "status quo" action. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **32**, 271-286.
- Richard F. J., Aubert A., Grozinger C. M. (2008): Modulation of social interactions by immune stimulation in honey bee, *Apis mellifera*, workers. *BMC Biology* **6**:50.
- Rybak-Chmielewska H., Szczęśna T., Waś E. (2006): Attempt to assay maltodextrins occurring in starch syrup and in winter stores made by bees from that syrup. *Journal of Apicultural Science* **50**, 127-135.
- Seehuus S. C., Norberg K., Gimsa U., Krekling T., Amdam G. V. (2006): Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 962-967.
- Semkiw P., Skubida, P. (2016): Suitability of Starch Syrups for Winter Feeding of Honeybee Colonies. *Journal of Apicultural Science* **60**, 141-152.
- Shagghi N., Palombo E. A., Clayton A. H. A., Bhave M. (2018): Antimicrobial peptides: biochemical determinants of activity and biophysical techniques of elucidating their functionality. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **34**, 62.
- 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.
- Schmitzová J., Klaudivy J., Albert Š., Schröder W., Schreckengost W., Hanes J., Júdová J., Šimúth J. (1998): A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **54**, 1020-1030.
- Simone M., Evans J. D., Spivak, M. (2009): Resin collection and social immunity in honey Bees. *Evolution* **63**, 3016-3022.

- Sinpoo C., Paxton R. J., Disayathanoowat T., Krongdang S., Chantawannakul P. (2018): Impact of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* on individual worker bees of the two host species (*Apis cerana* and *Apis mellifera*) and regulation of host immune response. *Journal of Insect Physiology* **105**, 1-8.
- Ševčík V. (1950): *Mikrobiologie pylového kvašení*. Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno, Česká Republika, 130 stran.
- Šobotník J., Kalinová B., Cahlíková L., Weyda F., Ptáček V., Valterová I. (2008): Age-dependent changes in structure and function of the male labial gland in *Bombus terrestris*. *Journal of Insect Physiology* **54**, 204–214.
- Tautz J. (2010): *Fenomenální včely*. 2nd ed., Brázda, Praha, Česká republika, 270 stran.
- Schmickl T., Crailsheim K. (2001): Cannibalism and early capping: strategy of honeybee colonies in times of experimental pollen shortages. *Journal of Comparative Physiology A: Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* **187**, 541-547.
- Teixeira V., Feio M. J., Bastos M. (2012): Role of lipids in their interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in Lipid Research* **51**, 149-177.
- Turner R. J. 1994: *Immunology - A Comparative Approach*. John Wiley and Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 236 stran.
- Vásquez A., Olofsson T. C. (2009): The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *Journal of Apicultural Research* **48**, 189-195.
- Vilmos P., Kurucz E. (1998): Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunology Letters* **62**, 59-66.
- Weiβ, K. (2005): *Víkendový včelař: Škola včelaření s nástavkovými úly*. Víkend, Líbeznice, Česká republika, 247 stran.
- Wheeler D. E., Kawooya J. K. (1990): Purification and characterization of honey bee vitellogenin. *Archives of insect biochemistry and physiology* **14**, 253–267.
- Wilson-Rich N., Spivak M., Fefferman N. H., Starks P. T. (2009): Genetic, Individual, and Group Facilitation of Disease Resistance in Insect Societies. *Annual Review of Entomology* **54**, 405-423.
- Zipper H., Brunner H., Bernhagen J., Vitzthum F. (2004): Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research* **32**, 103-103.

## 8 Seznam použitých zkratek

AMP	antimikrobiální peptidy
AMK	aminokyseliny
GOI	gene of interest (gen sledovaného zájmu)
HFCS	high-fructose corn syrup HFCS (kukuřičný sirup s vysokým obsahem fruktosy)
HKG	housekeeping genes (provozní geny)
HMF	5-hydroxymetylfurfural
JH	juvenilní hormon
JHBP	juvenile hormone binding protein (protein vázající juvenilní hormon)
JHE	esterasa juvenilního hormonu
RT-PCR	Real-Time PCR