

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních
zdrojů

Katedra zoologie a rybářství



**Hemolymfa včely medonosné ve vztahu k výživě a
zdravotnímu stavu včelstva**

Diplomová práce

Vedoucí práce: Ing. Dalibor Titěra, CSc.

Autor práce: Bc. Nikola Grätzová

© 2014 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Hemolymfa včely medonosné ve vztahu k výživě a zdravotnímu stavu včelstva" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 10. 4. 2014 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou upřímně poděkovala vedoucímu mé práce Ing. Daliboru Titěrovi, CSc. za metodické vedení, poskytnutí odborných rad a připomínek a také možnosti vypracovat tuto diplomovou práci v laboratořích Výzkumného ústavu včelařského v Dole, dále mé poděkování patří všem pracovníkům ústavu za ochotu a pomoc s vypracováním pokusné části a doc. Ing. Jaroslavu Havlíkovi, Ph.D. za pomoc se statistickým zpracováním výzkumu. V neposlední řadě bych ráda poděkovala svému manželovi Michalovi, rodičům a celé své rodině za neskutečnou podporu a toleranci nejen při psaní této práce, ale po dobu celého studia.

Hemolymfa včely medonosné ve vztahu k výživě a zdravotnímu stavu včelstva

Souhrn

Cílem této práce je rozbor včelí hemolymfy od včel s různou úrovní proteinové a glycidové výživy a různým zdravotním stavem. Výsledek práce by mohl pomoci vysvětlit problematiku správné výživy včel a poskytnout výsledky pro analýzu zdraví včel. V posledních letech dochází k velkým úhynům včelstev a příčiny jsou nejasné. Domníváme se, že včely chované na monoflorálním pylu, tedy v krajině s malou květovou diverzitou jsou oslabeny, mají nižší imunokompetenci a jsou tak snadno náchylné k onemocněním, entomopatogenům a hůře odolávají parazitům. Předpokládáme, že na náhlém úhynu včel má svůj podíl snížená biodiverzita, tj. masové velkoplošné pěstování monokultur.

Do pokusu byla zahrnuta tři včelstva s rozdílným přístupem k potravě. Vzorky hemolymfy byly odebrány cca od 10- ti včel z každé skupiny a pětkrát zopakovány. První odběr proběhl u včel z proletové haly, které byly živeny ze svých zimních zásob a na další odběry byly dány ven, kde měly přístup k jarní pastvě. Další skupinou byly včely nakrmeny řepkovým pylem a umístěné v izolátoru, aby se zamezilo přístupu k jinému druhu pylu. Třetí skupinu tvořily včely, kterým byly dány pylové zásoby ze včelstva umístěného v blízkosti přírodní rezervace s pestrými snůškovými poměry. Tyto včely jsme umístily vedle izolátoru, kde měly přístup k pastvě. V experimentu se provedla identifikace typů hemocytů a určoval se jejich počet. V hemolymfě jsme rozlišili čtyři typy hemocytů. Jedná se o prohemocyty, plasmocyty, granulocyty a buňky vřetenovitého tvaru.

Statistické zpracování dat ukázalo významné rozdíly v zastoupení hemocytů. V podmínkách proletové haly bylo průkazně méně granulocytů než v obou dalších variantách, ve variantě "venek" je zase průkazně více plasmocytů. Včely umístěné v izolátoru, měly oproti ostatním pokusným skupinám, ze všech krevních buněk nejméně plasmocytů. Nejvyrovnanější počty hemocytů měly včely umístěné venku a měly přístup k vyvážené potravě. Na základě výsledků lze říci, že z hlediska zdraví včel, je vyvážená a plnohodnotná potrava pro včely nezbytná. Pokud chceme mít včelstvo zdravé, bez parazitů a v dobré kondici musíme vhodně zvolit místo, kam svá včelstva umístíme, abychom dosáhly, co nejlepších výsledků.

Klíčová slova: *Apis mellifera*, hemolymfa včel, výživa včel, hemocyty.

Honeybee haemolymph in relationship to nutrition and health status of bee colony

Summary

The objective of this thesis is the analysis of bee haemolymph by bees with different levels of protein and carbohydrate nutrition and a different health condition. The result of this thesis could help explain the issue of proper nutrition of bees and provide results for analysis of health bees. There is a large colony mortalities occur in recent years and the reasons are unclear. We are suppose that bees which are kept on the monofloráním pollen, consequently in the landscape with a small floral diversity are weakened, they have lower immunocompetence and they are easily susceptible to diseases, entomopathogenics and less resistant to parasites.

In this attempt were included three colonies with varying acces to food. The samples of hemolymph were removed approximately from 10 bees from each group and repeated five times. The first sampling was carried out be bees from the fly through hall which were nurtured from their winter stores and the other samples were given out, where they had access to spring pasture. The next group were bees nurtured by rapeseed oil and disposed in the insulator to prevent access other kinds of pollen. The third group were bees which were given pollen stores from colony located near the nature reserve with colorful floral rate. We placed these bees next to the insulator, where they had access to the pasture. Experiment was perfomed to identify the types of haemocytes and determined their number. We distinguish four types of haemocytes in haemolymph. They are plasmocytes, prohemocytes, granulocytes and spindle shaped cells.

Statistical processing of the data showed significant differences in the representation by haemocytes. In the conditions of the fly through hall was significantly less granulocytes than in the other two variants, in the variant „ outside “ is significantly more plasmocytes. The bees placed in the insulator had of all blood cells least of plasmocytes. The most balanced numbers of the haemocytes had bees placed outside and had access to a balanced nutrition. Based on the results we can say that in terms of the health of bees is balanced and a full nutrition necessary for bees. If we want to have a healthy colony, without parasites and in good condition we have to appropriately choose the place where the colony is placed to get the best results.

Key words: *Apis mellifera*, haemolymph of bee, nutrition of bees, haemocytes.

Obsah

1. ÚVOD.....	1
1. CÍL PRÁCE.....	2
3. LITERÁRNÍ REŠERŠE	3
3.1. Taxonomické zařazení včely medonosné.....	3
3.2. Krevní oběh a hemolymfa.....	4
3.3. Hmyzí hemocyty	5
3.3.1. Typy hmyzích hemocytů.....	5
3.3.2. Hemocyty včely medonosné	8
3.4. Přehled hemocytů.....	10
3.5. Elektroforetické analýzy	11
3.5.1. 2D elektroforéza	11
3.6. Fyziologie trávení včel.....	12
3.7. Výživa včel.....	12
3.7.1. Nutriční požadavky	13
3.7.2. Pyl	13
3.7.3. Nektar, medovice, med	15
3.7.3.1. Nektar	15
3.7.3.2. Medovice	16
3.7.3.3. Med.....	17
4. MATERIÁL A METODY	19
4.1. Pokusné varianty	19
4.1.1. Datový plán odběrů u zkoumaných skupin a počty vzorků	19
4.2. Technika odběru.....	20
4.3. Postup odběru.....	20
4.4. Panoptické barvení dle Pappenheima.....	21
4.5. Mikroskopování	21
4.6. Vyhodnocení výsledků.....	22
5. VÝSLEDKY	23
5.1 Výsledky vyhodnoceny programem IBM SPSS 8.0.....	39
5.1.1. Dvouvýběrový T – test po Bonferroniho korekci	45
6. DISKUSE.....	46

7. ZÁVĚR	49
8. SEZNAM LITERATURY	50
8.1. Literatura	50
8.2. Internetové zdroje.....	52
9. PŘÍLOHY	53

1. ÚVOD

„ Včely jsou jako kouzelná studánka, čím víc nabíráš, tím víc vody se v ní objevuje“

Karl von Frisch

Stáří včely medonosné bylo podle paleontologických nálezů určeno přibližně 25 milionů let, přitom člověk *Homo sapiens* je na Zemi přibližně 100 000 let. Vzhled tehdejší včely se od vzhledu dnešní včely medonosné příliš nelišil. Nejstarší kreslený doklad o jejich existenci pochází z doby paleolitické asi před 15 000 lety. Jedná se o kresbu z Pavoučí jeskyně nacházející se ve Španělsku, která znázorňuje postavu ženy, obletované včelami vytahující z dutiny ve skále plást. Další objevená kresba pochází z roku 1450 př. n. l. v hrobce egyptského šlechtice Rekhima. Tato kresba vyobrazuje dvě postavy při odebírání medu z hliněných úlů, při čemž používají kouř. Předpokládá se, že člověk nejdříve využíval pouze med, který mu sloužil jako chutná potrava, a až mnohem později odhalil možnosti využití ostatních včelích produktů.

Včela medonosná (*Apis mellifera*) má nejen velký hospodářský význam jako vysoce ceněný opylovač řady zemědělských plodin, ovocných stromů a též jako producent řady přírodních produktů (pyl, med, mateří kašička, jed aj.), ale je také velice dobrým bioindikátorem znečištěného prostředí. Ve světové literatuře zatím zcela chybí popis spektra a funkce leukocytů včel medonosných. Rovněž není nic známo o variabilitě hematologických parametrů, ačkoliv včelí hemolymfu lze snadno odebrat z abdomenu pomocí tenké skleněné kapiláry. Z těchto důvodů jsme se zaměřili na toto téma a chtěli bychom do této problematiky přispět novými poznatky.

2. CÍL PRÁCE

Cílem předkládané diplomové práce je ověření hypotézy, že složení včelí hemolymfy u včel s různou úrovní proteinové a glycidové výživy a různým zdravotním stavem se liší. Výsledek této práce by mohl přispět k vysvětlení problematiky správné výživy včel a poskytnout výsledky pro analýzu zdraví včel a fenoménu Colony Collapse Disorder (tzv. syndrom zhroucení včelstev).

Dalším cílem je osvojení si metody odběru hemolymfy, její fixace a barvení, s následným mikroskopickým vyhodnocením. Nastudování biologie včel a nastudování hmyzí hemolymfy k získání vědomostí o hemocytech.

3. LITERÁRNÍ REŠERŠE

3.1. Taxonomické zařazení včely medonosné

Včely jsou pravděpodobně potomci vos, jejichž evoluce započala v období křídly současně se vznikem primitivních krytosemenných rostlin. V relativně krátkém období vývoje včel, trvajícím asi padesát milionů let, byl nejvýznamnější přechod z dravého způsobu života na sběr pylu. Z morfologického hlediska se nejvýrazněji přeměnilo ústní ústrojí k dokonalejšímu sání nektaru (Michener, 1979).

Odhaduje se, že by se počet druhů včel mohl blížit až třiceti tisícům (Michener, 2000). Včely jsou řazeny do jednoho rodu (*Apis*), který obsahuje pět druhů: *Apis mellifera* – včelu medonosnou, *A. dorsata* a *A. laboriosa* – včely velké, indické včely *A. cerana* a včely trpasličí *A. florea* (Winston, 1991). Význam včel není jen ve tvorbě včelích produktů, ale včely jsou hlavně významnými členy ekosystému. Kdyby ze země vymizely včely, nedošlo by k opylování hmyzosubných rostlin, což by mělo vliv na zánik spousty druhů rostlin. V neposlední řadě je včela dobrým bioindikátorem znečištěného prostředí.

Zařazení včely medonosné do systému živočichů dle Pokorného et Šifnera (2004):

Říše: Animalia

Kmen: Arthropoda

Podkmen: Tracheata

Nadtřída: Hexapoda

Třída: Insecta

Podtřída: Pterygota

Řád: Hymenoptera

Čeleď: Apidae

Rod: *Apis*

Druh: *Apis mellifera* (objevena roku 1758 Carlem Linné).

3.2. Krevní oběh a hemolymfa

Včela medonosná nemá pravou tělní dutinu, ale jen smíšenou, tzv. *haemocoel* (Navrátil et al., 2012). Krevní oběh má neuzavřený, to znamená, že krevní tekutina protéká jen srdcem a hlavní cévou. Jejím otevřeným koncem se pak vylévá do tělních dutin a proudí volně kolem všech tělních orgánů v hlavě, hrudi a zadečku a dostává se i do končetin a křídel (Veselý et al., 2003).

Hemolymfa neplní jako u obratlovců úkol roznášení kyslíku k jednotlivým orgánům. (Schönfeld, 1955). Po těle včely roznáší výživné látky, odplavuje škodlivé zplodiny látkové přeměny k exkrečním orgánům, nadbytečné živiny dopravuje hlavně k tukovému tělesu (Veselý a kol, 2003). Krevní tělíska neobsahují krevní barvivo – hemoglobin, a tudíž včely nemají červené krvinky, které by měly vliv na barvu krve. Ta je podmíněna zbarvením hemolymfy a je slabě nahnědlé barvy (Schönfeld, 1955). Hemolymfa je složena převážně z vody, anorganických solí, sacharidů, bílkovin, hormonů, lipidů, volných aminokyselin a makrofágů, jako jsou buňky hemocyty (Leta et al., 1996; Hrassnigg et al., 2003; Burmester a Hankeln, 2007).

Hemolymfa tvoří asi čtvrtinu hmotnosti celého těla včely. Obsahuje krevní tělíska (hemocyty) ve dvou formách. Jako proleukocyty – kulaté buňky s velkým jádrem, vyskytující se hlavně u mladých včel, a z nich vznikající leukocyty – bílé krvinky (Veselý et al., 2003). V krvi přezimujících včel bylo v jednom kubickém milimetru napočteno průměrně 21 000 těchto krvinek (Schönfeld, 1955). Bílé krvinky mají schopnost měňavkovitého pohybu, takže často mění tvar (Veselý et al., 2003). Mají ostře ohraničené jádro, tvarově odpovídající buňce. Leukocyty obsahují hodně buněčné plasmy, skoro pravidelně homogenní. V plasmě jsou někdy uložena různě veliká a různotvará granula nebo i krátké tyčinky. Tyto zrnkovité tvary se nalézají hojněji v krvi mladičkových včel. V krvi létavek jsou vzácnější (Schönfeld, 1955). Výzkumem provedeným ústavem biologie v USA bylo prokázáno, že se počet hemocytů liší dle vývojového stádia včel. Wilson - Rich et al. (2008) uvádí počty hemocytů u larvy okolo 2000 buněk/cm³, kukly asi 4000 buněk/cm³ a u dospělé včely klesne na přibližně 500 buněk/cm³.

3.3. Hmyzí hemocyty

Hemocyty byly poprvé popsány holandským biologem Janem Schwammerdanem v roce 1758 u vší, jako takzvané „bílé krevní buňky“. Konkrétně se jednalo o veš šatní *Pediculus humanus* (Crosley, 1975). Hemocyty se vyskytují již v embryonálním stádiu jedince, kde mají mezodermální původ (Dorn, 1978). Do hemolymfy se vyplavují z hemopoetických orgánů a formují se do hvězdicovitého tvaru retikulární buňky (Silva et al., 2002). Nedá se vyloučit, že po vyplavení se hemocyty v oběhu dále netransformují a nedochází ke vzniku jiného typu buněk (Ribeiro and Brehélin, 2006). Vzhledem k velkému počtu druhů hmyzu a jejich velikosti, zatím nebyly popsány všechny druhy hemocytů těchto jedinců (Berger et Slavíčková, 2008).

3.3.1. Typy hmyzích hemocytů

Klasifikace hmyzích hemocytů byla založena na morfologických, cytochemických a funkčních vlastnostech, které byly pozorovány pod světelným a elektronovým mikroskopem (Berger et Slavíčková, 2008). Mezi nejčastější typy hemocytů patří prohemocyty, plasmocyty, granulocyty, spherulocyty, adipocyty, a oenocytoidy. Jejich vlastnosti se u různých druhů hmyzu mírně liší (Gupta, 1979; Ribeiro nad Brehélin, 2006). Těchto šest typů hemocytů je popsáno dále. Tento popis je obecný a nelze říci, že je to tak u všech druhů hmyzu, u kterých se tyto buňky nachází.

Berger et Slavíčková (2008) popsaly prohemocyty zkoumané u ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus*) jako nejmenší buňky v hemolymfě. Mají velké jádro (3-13 μm) které téměř vyplňuje buňku a malý pruh basofilní cytoplazmy. Jsou to kulaté, oválné nebo eliptické buňky o velikosti 3 - 9 μm . V průběhu mitózy se z nich vyvíjí plasmocyty a pravděpodobně i granulocyty. Pocházejí z kmenových buněk, ale v odborných pramenech je možné nalézt i tvrzení, že prohemocyty mohou být kmenovými buňkami.

Dosud byla dobře popsána transformace prohemocytů na granulocyty, plasmocyty a spherulocyty (Lavine and Strand, 2002).

Granulocyty mají různou velikost a tvar. Jádro je malé a v cytoplazmě se nacházejí stejnotvaré acidofilní inkluze. Některé inkluze mají strukturální charakteristiky

melanosomálních nebo premelanosomálních plastidů (Berger et Slavíčková, 2008; Ribeiro and Brehélin, 2006). Vyznačují velkým množstvím membránově vázaných granulí, které se mohou povrchově vyměňovat v souvislosti s obrannou funkcí organismu. V granulocytech se také nachází bohatá síť endoplazmatického retikula. Granulocyty se vyvíjejí z plasmocytů. V hemolymfě jsou hojně zastoupeny, jejich celkový objem je od 30 do 65% (Raina, 1976; Akai and Sato, 1973).

Spherulocyty jsou ovoidní buňky obvykle menší než některé plasmocyty a větší než prohemocyty. Jsou zastoupeny až v množství pohybujícím se kolem 4%. Cytoplazma obsahuje velké acidofilní inkluze. V některých případech se mohou spherulocyty vyvinout z prohemocytů (Berger et Slavíčková, 2008; Yamashita and Iwabuchi, 2001).

Plasmatocyty mají různou velikost a tvar hlavně na rozhraní cytoplazmy. Většinou je nalezneme jako protáhlé nebo vřetenovité buňky o velikosti 4-25 μm s kulatým nebo podlouhlým jádrem, které tvoří kolem 40-50% buňky. U většiny hmyzu jsou zastoupeny vždy ve více než 28% z celkového počtu haemocytů. V cytoplazmě se nacházejí basofilní granula, hrubé endoplazmatické retikulum a Golgiho komplex. Plasmatocyty jsou pohyblivé buňky schopné fagocytózy. Jsou tedy v první linii obrany proti patogenům a tedy velmi důležitou celulární složkou imunitního systému. (Berger et Slavíčková, 2008; Pech and Strand, 2000; Gupta, 1979).

Adipocyty jsou hemocyty s různou velikostí. Vyznačují se především ovoidním tvarem s granulárními a lipidovými složkami v cytoplazmě, kde je možné vidět také drsné endoplazmatické retikulum a Golgiho komplex. To poukazuje na syntetickou a sekretoriální činnost buňky (Butt and Shields, 1996; Gupta, 1979).

Oenocytoidy mají kulatý tvar, který má v průměru přibližně 6-13 μm , s excentricky uloženým malým jádrem. Cytoplazma je bohatá na vakuoly, které mohou být naplněné heterogenním materiálem nebo naopak mohou být zcela prázdné. V cytoplazmě se objevuje také hladké endoplazmatické retikulum a mitochondrie. Oenocyty tvoří kolem 4,6% z celkového rozpočtu cirkulujících hemocytů (Brayner et al., 2005; Akai and Sato, 1977).

U některého hmyzu je však možné setkat se s úplně odlišnými typy buněk. Je tomu tak například u rodu *Drosophila* – octomilky. Meister and Lagueux (2003) tyto hemocyty popsali. U tohoto druhu hmyzu nalezneme tři typy buněk. Jsou jimi plasmocyty, křišťálové buňky a lamellocyty. Plasmocyty octomilek jsou profesionálními fagocyty, připomínající buňky savců monocyty/ makrofágy. V hemolymfě octomilek jich je přibližně 90 – 95 %. Křišťálové buňky

obsahují enzymy potřebné pro humorální melanizaci, které doprovází řadu imunitních reakcí. Produkce melaninu tvoří jako vedlejší produkty cytotoxické volné radikály, které jsou potřebné k likvidaci patogenů. Lamellocyty představují typ buněk, které rozpoznají parazitismus na larvách octomilek a vytváří jakési kapsle okolo vetřelce. Zapouzdření spolu s melanizací nakonec parazita usmrtí. V případě napadení parazitem se plasmocyty diferencují právě do lamellocytů, aby došlo k ochraně larvy.

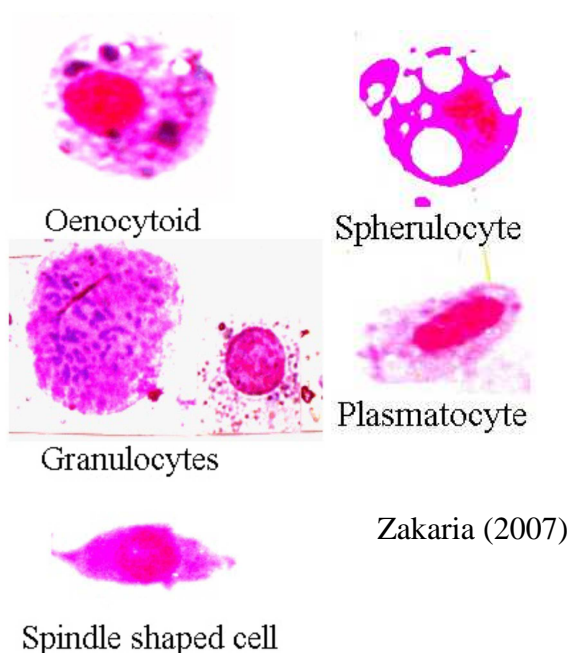
V hemolymfě bource morušového (*Bombyx mori*) existuje 5 typů cirkulujících hemocytů, které jsou klasifikovány jako prohemocyty, granulocyty, plasmocyty, spherulocyty a oenocytoidy. Všechny z nich se podílejí na humorální a buněčné imunitě a to buď přímo, nebo nepřímo. Nedávné studie ukazují, že v hematopoetických orgánech larev bource morušového, existují hlavně prohemocyty a oenocytoidy. Na základě *in vitro* pozorování bylo zjištěno, že prohemocyty bource se mohou diferencovat do plasmocytů a granulocytů. Granulocyty mají schopnost rozpoznat invazi patogenů, které se pak podrobí fagocytóza nebo zapouzdření. Tyto buňky jsou také důležité pro hojení ran a mohou se diferencovat do spherulocytů. Ty můžeme rozpoznat díky obsahu velkých granul v cytoplazmě. Oenocytoidy jsou největším typem buňky, které jsou díky své velikosti a také průhlednosti dobře identifikovatelné (Liu et al., 2013).

3.3.2. Hemocyty včely medonosné

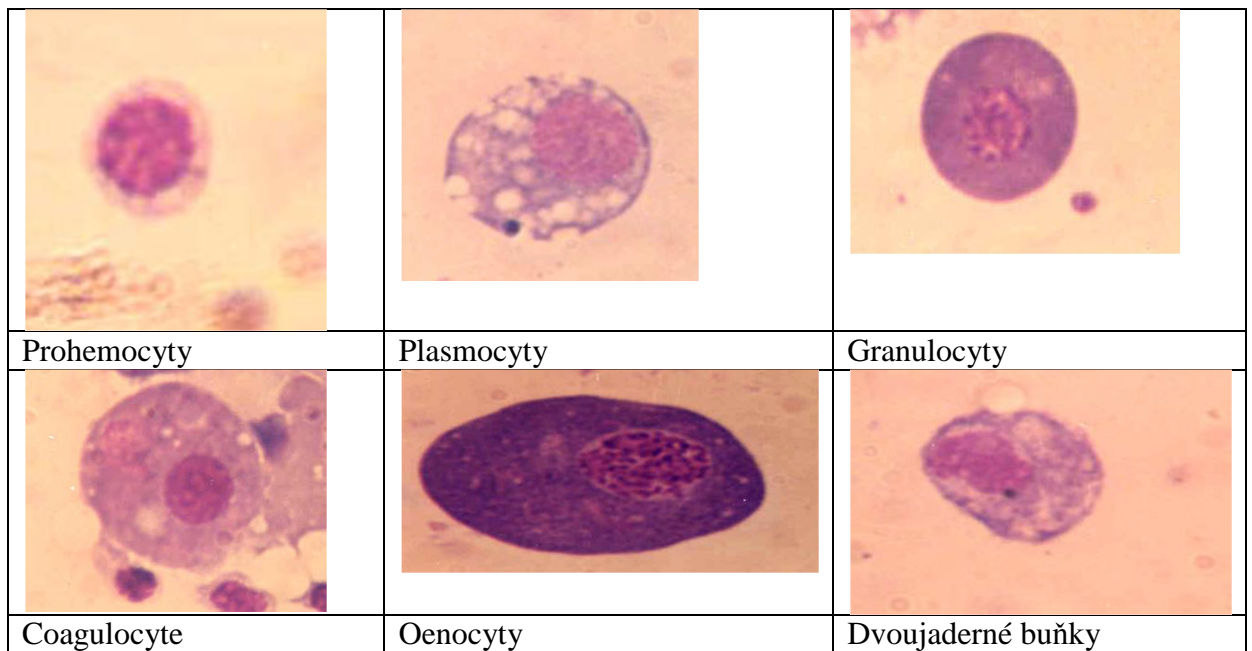
U včely medonosné můžeme leukocyty rozdělit do šesti hlavních skupin na prohemocyty, plasmocyty, granulocyty, spherulocyty, oenocyty a adipohemocyty (Gupta, 1991). Po prohledání webů Web of Science a Google Scholar bylo nalezeno velmi malé množství vědeckých prací, které by k tomuto tématu svým obsahem přispěly. Nejvíce informací o včelí hemolymfě uvádí Sawson et al. (2010), Szymas and Jędrzeszuk (2003) a Zakaria (2007). Jejich výsledky jsou téměř shodné. Sawson et al., (2010) ve svém výzkumu včelí hemolymfy pozoroval celkem šest typů hemocytů mezi nimiž byly plasmocyty, granulocyty, prohemocyty, oenocyty, coagulocyty a dvoujaderné buňky u kterých se domnívají, že jsou určitou mezifází, která představuje neúplné buněčné dělení tzv. mitózu. Zakaria (2007) vyhodnotil hemocyty obdobně, jen dvoujaderné buňky ve svém výzkumu zmíněny nemá a informuje o buňkách vřetenovitého tvaru – spindle shaped cells. Szymas and Jędrzeszuk (2003) popsali pouze plasmocyty, granulocyty a ostatní typy hemocytů zařadili ve vyhodnocování do jedné společné skupiny „ostatní“.

Z výše zmíněných typů hemocytů jsme v naší zkoumané hemolymfě pozorovali pouze 4 typy. Jsou jimi plasmocyty, prohemocyty, granulocyty a buňky vřetenovitého tvaru.

Obrázek č. 1:



Obrázek č. 2:



Sawsan et al. (2010)

Prohemocyty (PR) jsou většinou zaobleného tvaru a malých rozměrů. Některé z nich mohou být oválné nebo vřetenovité. Jádru vyplňuje téměř celou buňku a většinou je umístěno v jejím středu. Cytoplazma je kolem jádra v tenké vrstvě se zřetelnými bazofily. Obsahuje malé granule, kapky nebo vakuoly (Sawson et al., 2010).

Plasmocyty (PL) jsou větší než prohemocyty s proměnlivou velikostí, kulaté, oválné nebo vřetenovité někdy i velice nepravidelné. Jádru má kulatý nebo protáhlý tvar se zřetelným jadérkem. V buňce je centrálně umístěno. Cytoplazma je bohatá bazofilní a může vykazovat drobné vakuoly (Sawson et al., 2010). Szymas and Jędraszuk (2003) popisuje cytoplazmu plasmocytů jako hyalinně neutrální nebo světle bazofilní.

Granulocyty (GR) jsou zaoblené eliptické buňky s relativně malým jádrem, které je kulaté nebo podlouhlé a centrálně umístěné. Cytoplazma je charakteristicky zrnitá (Sawson et al., 2010).

Coagulocyty (CO) jsou kulaté nebo oválné buňky. Jádru je relativně malé, zaoblené nebo podlouhlé a je centrálně umístěné. Cytoplazma je charakteristicky nebo nepravidelně polygonální (Sawson et al., 2010).

Oenocyty (OE) jsou velké buňky zaobleného nebo oválného tvaru. Ve srovnání s velikostí buňky, je jádru malé a je umístěné excentricky. Vykazuje průměrná acidophilia a

odhaluje homogenní cytoplazmu obsahující jemná a slabá acidophilní granula (Sawson et al., 2010).

3.4. Přehled hemocytů

Druh hmyzu	Typy krevních buněk									
	PR	PL	GRA	SPHE	ADIP	OE	Křišť. buňky	Lamel.	COA	Vřeten. buňky
Ruměnice pospolná	X	X	X	X						
Bourec morušový	X	X	X	X		X				
Octomilka		X					X	X		
Včela medonosná	X	X	X	X	X	X			X	X

Vysvětlivky: PR – prohemocyty, PL – plasmocyty, GRA – granulocyty,

SPHE – spherulocyty, ADIP – adipocyty, OE – oenocyty, COA – coagulocyty

3.5. Elektroforetické analýzy

3.5.1. 2D elektroforéza

Dvourozměrná elektroforéza umožňuje rozlišení až 10 000 proteinů. Využívá kombinace dvou metod: isoelektrické fokusace (IEF) a elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE). Proteiny jsou separovány ve dvou rozměrech. Nejdříve jsou rozděleny podle svého isoelektrického bodu. Isoelektrický bod (dále pI) je pH roztoku, při němž je součet kladných a záporných nábojů nulový. Poté následuje separace v druhém rozměru. Dochází k provedení SDS-PAGE, která probíhá v elektrickém poli kolmo k prvnímu rozměru. V průběhu SDS-PAGE jsou proteiny rozděleny podle své molekulové hmotnosti. Separované proteiny, je nutno zviditelnit pomocí barvicích nebo značících metod (chemických či radioaktivních). Výsledná „mapa“ separovaných proteinů je převedena na informace ve formě digitálních dat a zpracována pomocí analýzy obrazu. Odlišně exprimované proteiny identifikované pomocí analýzy obrazu, jsou vyříznuty a dále analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie (MS – Mass Spectrometry) (Westermeier and Naven, 2002).

Přestože je dvourozměrná elektroforéza hlavní metodou proteomiky, má také velkou řadu nevýhod. Problémy nastávají především s proteiny, které se ve vzorku vyskytují ve velmi nízkých koncentracích, dále s velmi zásaditými či hydrofóbními proteiny. Nevýhodou této metody je mimo jiné i malé využití automatizace či složitý průběh samotného procesu (Westermeier and Naven, 2002).

Rozborem hemolymfy touto metodou se zabýval vědecký tým pracoviště Výzkumného ústavu rostlinné výroby v Ruzyni pod vedením RNDr. Tomáše Erbana, PhD. Tento výzkum probíhal současně s rozborem hemolymfy mikroskopickou metodou, ale vzhledem ke složitějšímu průběhu, nebyly zatím provedeny pokusy s různým přístupem včel k potravě, které jsou publikovány v této práci.

3.6. Fyziologie trávení včel

Trávicí soustava včely medonosné (*Apis mellifera*) slouží k příjmu a zpracování potravy trávením. Dále je klíčová pro vznik medu i k přenosu a zpracování sladiny. Dokáže oddělit trávení potravy a zpracování sladiny na med. Včela přijímá většinu potravy ve formě roztoku, který se zpracovává chemicky. Dochází ke štěpení složitých látek a jejich následné vstřebávání pomocí střevní výstelky do hemolymfy. Pomocí enzymů dochází ke štěpení potravy, jedná se o proteázy (chymozin, pepsin, trypsin), karbohydrázy (invertáza, diastáza, glykogenáza), esterázy (lipáza) a další (Přidal, 2003).

Trávicí ústrojí včely medonosné se skládá ze tří částí. Přední střevo (*stomodeum*), žaludek (*mesenteron*) a zadní střevo (*proctodeum*). Z nich pouze žaludek vznikl z vnitřního zárodečného listu a má tedy zvláštní žláznatý epitel, který umožňuje trávení. Ostatní dvě části vznikly vchlípením vnějšího zárodečného listu a mají obdobnou stavbu jako kutikula (Veselý et al., 2003). *Mesenteron* je tedy původu entodermálního, *stomodeum* a *proctodeum* původu ektodermálního (Rada et al., 2009).

Včela pozře potravu ústy, dále pokračuje do hltanu (*pharynx*), jícnu (*oesophagus*), medného váčku (*ingluvies*), česla (*proventriculus*), česlové rourky, mesenteronu (*mesenteron*), tenkým střevem (*ileum*) až do výkalového váčku s rektálními žlázami (Přidal, 2003).

3.7. Výživa včel

Přirozenou potravou včely medonosné je med a pyl. Med je potrava bohatá na uhlohydráty. Pyl je na uhlohydráty chudý, ale je bohatý na bílkoviny, tuky a soli, kromě dostatečného množství cukrů. Soli jsou dodávány také ve vodě. Včela přijímá potravu tekutou i pevnou. Pevnou (pyl) uchopuje a drtí kusadly, pro tekutou potravu (med, nektar, voda) jí slouží sosák (Schönfeld, 1955).

3.7.1. Nutriční požadavky

Včely ke svému životu vyžadují bílkoviny (aminokyseliny), sacharidy (cukry), lipidy (mastné kyseliny, steroly), vitamíny, minerální látky (soli) a vodu. Je důležité, aby tyto živiny byly pro zajištění optimální potravy zastoupeny v určitém kvalitativním a kvantitativním poměru (Standifer, 1980).

3.7.2. Pyl

Pyl neboli pylová zrna jsou samčí reprodukční buňky vytvářené v prašnicích kvetoucích rostlin (Drašar et al., 1978). Pyl je druhou nejdůležitější složkou potravy včel, zdroj bílkovin, minerálů a vitamínů. Obsah bílkovin v pylu se pohybuje kolem 10 - 36%. Složení pylu závisí na druhu rostliny, ze které pyl pochází. Rozdíly ve složení pylu jsou proto zřejmé. Uvádí se, že jedno včelstvo je schopné zkonzumovat za rok 20 – 40 kg pylu (Standifer, 1980; Titěra, 2006). Včely vyžadují pyl alespoň s 20 % bílkovin (Rada et al., 2009). Dle Handla (1991), lze obsah výživných látek v pylových zrnech rozdělit pyly do 3 skupin. Na pyly dobré z vrby, ovocných stromů, kaštanů, břečťanu, hořčice, máku, jetele a řepky. Střední pocházející z lísky, topolu, olše, javoru, chrpy a jiných květin a pyly špatné z jehličnatých stromů, například borovice (méně než 10 %). Včelám se během návštěvy květů rostlin zachycují jednotlivá pylová zrna na chloupkách na těle. Tato pylová zrna včely „vyčesávají“ a přidáváním obsahu medného včelího vaku s výměšků žláz včel utvářejí tzv. pylové rousky, které umísťují na třetí pár nohou. Po přinesení do úlu, může být pyl konzumován a tráven. Přebytný pyl včely stlačí do plástů, aby v něm nebyly vzduchové mezery. V takto uloženém pylu probíhají biochemické změny. Kromě enzymů pylových zrn a enzymů sekretů přidaných do pylu včelami se podílejí na změnách v uloženém pylu i některé mikroorganismy, především kvasinky. Takto uložený a konzervovaný pyl se nazývá plástový pyl a pro včely je hlavním zdrojem potravy. Trvanlivost takového pylu je značná. Teprve u více než rok starého plástového pylu pozorujeme postupné snižování výživné hodnoty. Naproti tomu pylové rousky, pokud nejsou zpracovány včelami, ztrácejí svou výživnou hodnotu okamžitě (Veselý et al., 2003).

Tabulka: Složení pylu (Titěra, 2006)

Složka	Podíl	Rozsah
Bílkoviny	22%	7 – 35%
Voda	16%	6 – 25%
Sporopolenin	15%	4 – 28%
Sacharóza	11%	5 – 22%
Tuky	7%	2 – 14%
Popeloviny	6%	2 – 10%
Fruktóza	5%	1 – 9%
Celulóza	5%	3 – 7%
Glukóza	4%	1 – 11%
Škrob	2%	1 – 8%
Ostatní	3%	

Ke konzumaci pylu dochází již po vylíhnutí. K největší konzumaci pylu dochází mezi 3. - 9. dnem života. Tento pyl nespotebouvávají pro sebe, ale transformují potravu na krmnou kašičku pro larvy. Po 18. dnu života množství konzumovaného pylu klesá a létavky již prakticky nepřijímají žádný pyl (Veselý et al., 2003). Po polknutí pylových zrn procházejí bez porušení medným váčkem až do žaludku, kde je obsah zrn uvolněn z obalu. Enzymatickému trávení pomáhají do určité míry i rozdíly osmotických tlaků mezi pylem, obsahem medného váčku i žaludku. Některá zrna popraskají, jindy se obsah vylévá póry v pylových blánách. Bílkoviny a další potřebné látky jsou po enzymatickém rozložení vstřebány a transportovány hemolymfou do celého těla (Veselý et al., 2003). Z pylu mohou včely zužitkovat 70-85 % látek (Standifer, 1980). Proteiny se skládají z aminokyselin, které jsou nezbytné pro vývoj a růst včel. Nejdůležitější jsou leucin, valin a izoleucin, tyto tři aminokyseliny lze považovat za limitující (Rada et al., 2009). S výjimkou histidinu a nejspíše i argininu, nemohou být aminokyseliny včelami syntetizovány a musí být získány z pylu nebo nějakého jiného vhodného zdroje bílkovin (Standifer, 1980). Při delším nedostatku pylu v přírodě dochází ve včelstvu ke spotřebě pylových zásob. Po jejich vyčerpání nemohou pokračovat v tvorbě krmné kašičky a to se projeví odstraněním otevřeného plodu. Trpí – li včelstva částečným nedostatkem pylu, odchovají jen omezené množství plodu. Včely vylíhlé z hůře živěných larev trpí podvýživou. Nedostatek pylu v potravě dospělých včel se projeví zkrácením jejich života (Veselý et al., 2003). Analýzami obsahu trávicího traktu dospělých včel byla zjištěna

průměrná denní konzumace 3,4 – 4,3 mg pylu/včelu. Během života dělnice je to odhadem 160-180 mg pylu (Rada et al., 2009).

Tabulka: Esenciální aminokyseliny ve výživě včel (Rada et al., 2009)

Aminokyseliny	Minimální obsah v trávěných bílkovinách	AMK
Threonin	3,0 %	
Valin	4,0%	
Methionin	1,5%	
Leucin	4,5%	
Isoleucin	4,0%	
Lysin	3,0%	
Histidin	1,5%	
Arginin	3,0%	
Fenylalanin	2,5%	
Tryptofan	1,0%	

3.7.3. Nektar, medovice, med

3.7.3.1. Nektar

Nektar je sladká šťáva tvořící se v květních nebo mimokvětních nektariích hmyzosubných rostlin. Čerstvý nektar obsahuje vodu (15 – 95%), cukry (sacharóza, fruktóza, glukóza a jiné), malé množství dusíkatých látek, minerálních látek, organických kyselin. Nektar obsahuje i pylová zrna či buňky rostlinných pletiv (Přidal, 2005). Z cukrů je v nektaru nejvíce zastoupen sacharóza, glukóza a fruktóza a podle jejich vzájemného poměru rozdělujeme nektary do tří skupin:

- Nektary s převahou sacharózy,
- Nektary se stejným poměrem sacharózy, glukózy a fruktózy,
- Nektary bez sacharózy (Veselý et al., 2003).

Nektar přinesený do úlu je prozatímne ukládán do buněk plástů. Včely ho začnou ihned zpracovávat neustálým přenášením z buňky až do konečného uložení v plástu (Standifer, 1980). Tím, že včely opakovaně nasávají nektar do medného váčku a opětně jej vyvrhují do buněk, obohacují konečný produkt dalším přidáváním enzymů a v menší míře i živočišnými bílkovinami z hltanových žláz. Zpracování nektaru v med obstarávají mladušky ve stáří 10 - 20 dnů. Létavka, která přinesla plný váček nektaru, se nezabývá jeho dalším zpracováním a vyprazdňuje nektar přímo do buňky. Když je buňka ještě prázdná, rozetře kapičku po dně a po stěně buňky. Zahuštění nektaru probíhá rychle, až skoro do 60%, další zahušťování je zdlohavější. Včela podle odporu v sání poznává, jak mnoho je nektar zahuštěn a zralý. Konečného zahuštění nektaru na 80% mladušky stále znovu nasávají a přenášejí nektar z buňky do buňky, takže med dozrává přirozenou cestou ve 3 - 4 dnech (Mussen, 2008). Nektar, resp. Nektarový med včela tráví téměř beze zbytku. Nestravitelných látek je méně než 1 % (Veselý et al., 2003).

3.7.3.2. Medovice

Medovice je sladká lepkavá tekutina, kterou sbírají včely na jehličí, listech a větévkách rostlin. Přinášejí ji do úlu a tvoří z ní med (Haragsim, 1966). Dlouho se věřilo, že tuto medovici produkuje sama rostlina, dnes však víme, že ji produkují různé druhy mšic (*Aphidinea*) a červců (*Coccinea*) na listnatých nebo jehličnatých stromech. Vznik lesní medovicové snůšky předpokládá velký výskyt právě těchto producentů, kteří svým ústním zařízením napichují rostlinné sítkovce, kterými proudí cukry obsahující míza. Obsah cukrů ve stromové šťávě kolísá během sezóny. Nejvyšší koncentrace je v době největší a nejmohutnější asimilace, tzn. v jarním období (Boháč, 2003). Medovice a z ní vzniklý med obsahují vyšší procento jiných sacharidů, z části nebo zcela nestravitelných. Ty se dostávají nezměněné do výkalů, a pokud včely mohou létat, výkalů se zbavují. Pouze v zimě

nestravitelné látky z medovicového medu včely zatěžují a za určitých okolností mohou způsobit přeplnění výkalových vaků. Obsah trisacharidu melecitózy v některých medovicových medech způsobuje rychlou krystalizaci medu v plástech (Veselý et al., 2003).

3.7.3.3. Med

Med je zahuštěný a biochemicky přeměněný produkt nektaru a medovice, který slouží včelám jako plnohodnotná součást potravy. Jednoduché cukry fruktóza a glukóza, které jsou hlavními složkami medu, jsou v organismu včely lehké rozložitelné. Roční spotřeba medu jedním včelstvem se odhaduje na 60 – 120 kg (Veselý et al., 2003).

Složení medu: (White and Doner, 2008)

SLOŽKA MEDU	KVĚTOVÝ MED	MEDOVICOVÝ MED
JEDNODUCHÉ CUKRY [%]		
fruktóza	38,2	31,8
glukóza	31,3	26,1
SLOŽITÉ CUKRY [%]		
sacharóza	0,7	0,5
ostatní	9,5	22,1
MINERÁLNÍ LÁTKY [mg]		
draslík	205	1676
sodík	18	76
vápník	49	51
hořčík	19	35
železo	2,4	9,4
mangan	0,3	4,1
křemík	9	14
zinek	1,2	2,5
VITAMÍNY		
B1, B2, B3, B5, B6, C - vše v malém množství		
OSTATNÍ		
VODA	15-21 %	
antioxidanty	2 mmol/kg	
tuky	0,015%	
pH	3,4	6,1
A dále: pylová zrna, bílkoviny, kyseliny, aminokyseliny, barviva, aromatické látky, acetylcholin, adrenalin, peroxid vodíku, ...		

4. MATERIÁL A METODY

Včelí hemolymfa pro tuto diplomovou práci byla získávána z abdomenu včel medonosných (*Apis mellifera*). Vzorky hemolymfy byly odebírány v laboratořích Výzkumného ústavu včelařského v Dole. Vlastní výzkum byl realizován v období od dubna do srpna 2013. Celkem byla odebrána hemolymfa od 157 včel, které byly rozděleny do třech skupin s rozdílným přístupem k potravě.

4.1. Pokusné varianty

Vzorky byly odebrány cca od 10 včel z každé skupiny a pětkrát zopakovány. První odběr proběhl u včel z proletové haly, které byly živeny ze svých zimních zásob a na další odběry byly dány ven, kde měly přístup k jarní pastvě. Jako další pokusné skupiny byly vytvořeny dvě včelstva – smetence. Smetence byly udržovány bezmatečné. Včelstva byla osazena do jednoho nástavku se soušemi a glycidovými zásobami. Jednu zkoumanou skupinu tvořily včely umístěné v izolátoru, které byly na tzv. monodietě, nakrmeny řepkovým pylem. Včelstvo bylo bez přístupu k jakékoli jiné potravě kromě svých „řepkových“ zásob. V případě potřeby byl včelám dodán cukerný roztok jako zdroj glycidů. Další včelstvo (smetenec) bylo umístěno vedle izolátoru. Jako zásoby byly těmto včelám dány pylové zásoby ze včelstva umístěného v blízkosti přírodní rezervace s pestrými snůškovými poměry a po umístění na stanoviště měly přístup k jejich přirozené potravě. Odběry těchto dvou skupin probíhaly současně v jeden den.

4.1.1. Datový plán odběrů u zkoumaných skupin a počty vzorků

Včely z proletové haly, které byly 14.4.2013 dány ven na stanoviště:

Odběry	12. 4. 2013	17. 4. 2013	24. 4. 2013	16. 5. 2013	28. 5. 2013
Počty včel	13	16	6	11	10

Včely umístěné v izolátoru:

Odběry	10. 7. 2013	1. 8. 2013	7. 8. 2013	14. 8. 2013	21. 8. 2013
Počty včel	11	10	10	11	10

Včely umístěné vedle izolátoru:

Odběry	10. 7. 2013	1. 8. 2013	7. 8. 2013	14. 8. 2013	21. 8. 2013
Počty včel	10	7	11	11	10

4.2. Technika odběru

Základní technikou odběru, je punkce mezisegmentální blány mezi druhým a třetím tergitem zkoumaného jedince, pomocí tenké skleněné kapiláry vytažené nad plamenem ze skleněné trubičky o průměru cca 1,8 mm. Vnější průměr kapiláry po vytažení byl 40 µm.

4.3. Postup odběru

První krok k úspěšnému odběru hemolymfy je odchycení včel. Včely jsme chytali do klíček, tak aby při odchytu nebyly nijak zraněny. Včely byly v úlu odchyceny náhodně a u žádných z nich nebylo známo její stáří. Při odběru hemolymfy je důležité pracovat rychle a přesně. Po odchycení jsme včely uspali oxidem uhličitým. Včely jsme uspávali jednotlivě. Opakovaným uspáním, ale i dlouhým pobytem v klíčce spojené se stresem včel dochází k úbytku hemolymfy a tím se nepodaří odebrat potřebné množství. Pro tento výzkum bylo od jedné včely odebráno 10 ± 2 µl hemolymfy. Pokud se v kapiláře objevila žlutá či hnědá tekutina tento vzorek nebyl použit. S největší pravděpodobností došlo k napíchnutí žaludku a tato tekutina byla žaludeční šťáva. Odebíraná hemolymfa měla z jara čirou barvu, později se barvila do jantarova. Ihned po odebrání byla hemolymfa nanесena na čisté podložní sklíčko a byl proveden roztěr, který jsme ponechali na čistém a suchém místě do zaschnutí. Poté se barvila podle tzv. panoptického barvení dle Pappenheima. Vzorky hemolymfy se od

jednotlivých včel nemíchaly. Roztěr byl proveden v rozměrech cca 2x2 cm a pod mikroskopem se prohlížel a vyhodnocoval celý vzorek, tzn., že nalezený počet hemocytů odpovídá 10 μ l.

4.4. Panoptické barvení dle Pappenheima

Panoptické barvení dle Pappenheima slouží k obarvení krevních nátěrů. Používají se dvě směsi barviv, které jsou neutrální. Prvním barvivem je May-Grünwald, jedná se o eozinát azuru II., který je rozpuštěný v metanolu. Druhým barvivem je Giemsa-Romanovski. Jedná se o eozinát metylenové modři a o eozinát metylenu azuru rozpuštěného ve směsi stejných dílů metanolu a glycerolu.

Postup:

1) Fixace krevních nátěrů

Krevní nátěry se fixují metylalkoholem (metanolem). Nátěry můžeme do metanolu vložit na 3 minuty nebo je ve vodorovné poloze metanolem pokapat a čekat do odpaření.

2) Barvení krevních nátěrů

Na celý nátěr se nanese barvivo May-Grünwald, které se předem naředí destilovanou vodou 1:1 a nechá se působit 2-3 minuty. Barvivo poté slijeme a opláchneme nátěr destilovanou vodou. Na nátěr nanese barvivo Giemsa-Romanowskyho. Toto barvivo musí být před barvením naředěno destilovanou vodou 1:10. Nátěr pod barvivem fixujeme 15-20 minut. Poté barvivo slijeme a opláchneme nátěr destilovanou vodou. Preparát necháme uschnout na vzduchu.

4.5. Mikroskopování

Správně obarvené preparáty mají fialovou barvu a buňky mají při mikroskopování různé odstíny fialové, modré až po červenou barvu. Pappenheimovo panoptické barvení se běžně používá v hematologii k určení počtu hemocytů. Této metody bylo využito i u tohoto

výzkumu a vzorky byly hodnoceny pomocí světelného mikroskopu s 1000násobným zvětšením (10x okulár a 100x objektiv) pod imerzním olejem.

4.6. Vyhodnocení výsledků

Výsledky, které jsme získali pozorováním a vyhodnocením hemolymfy, byly zpracovány do tabulek v programu Microsoft Office Excel. Z námi získaných výsledků se spočítali průměrné hodnoty a směrodatné odchylky. Na základě součtu jednotlivých typů hemocytů byly vytvořeny grafy. Ke statistickému zpracování byl použit program IBM SPSS 8.0, ve kterém jsme výsledky vyhodnotili dvouvýběrovým T – testem za použití Bonferroniho korekce.

5. VÝSLEDKY

Pokusy provedené podle metodiky popsané v kapitole 4 přinesly následující výsledky shrnuté v tabulkách 1 - 15 a jsou dále vyhodnoceny.

V každé tabulce je uveden skutečný počet hemocytů příslušné kategorie, nalezených v roztěru hemolymfy odebrané od 6 až 16 včel jedné varianty pokusu (každá včela na jednom řádku).

Každá tabulka je dokreslena souhrnným grafem, kde na svislé ose je absolutní počet sumy hemocytů nalezený v každé kategorii sumárně za všechny změřené včely. Pro posouzení výsledků je podstatný rozdíl mezi kategoriemi viditelný na ose rovnoběžné, označené čísly 1 – 4.

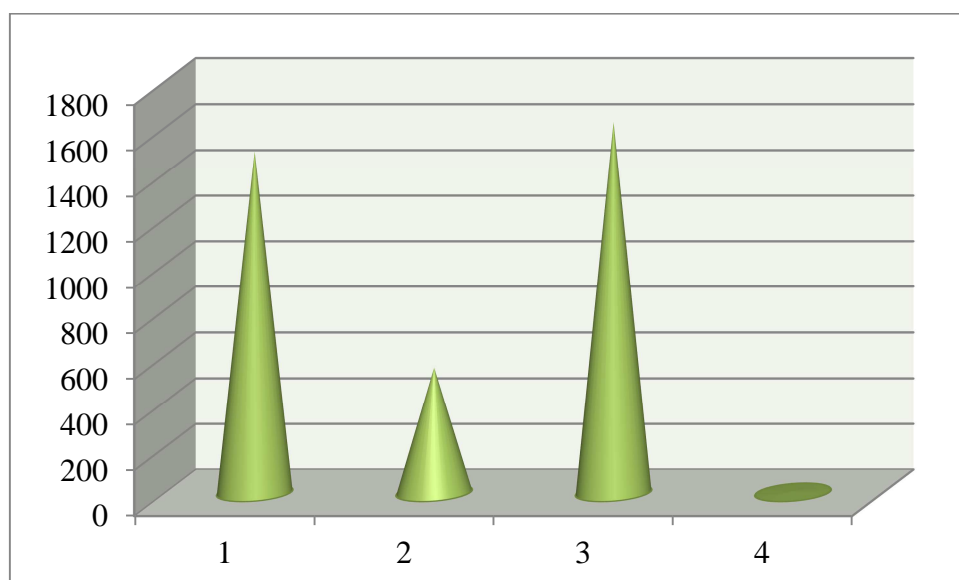
Na dalších samostatných grafech č. 1 – 5 (strana 39 – 44) jsou znázorněny rozdíly mezi variantami.

Tabulka č. 1

Odběry vzorků ze dne 12. 4. 2013, vzorky odebrány od včel z proletové haly.

Včela	Hemocyty			
	Plasmocyty	Granulocyty	Prohemocyty	Buňka vřetenovitého tvaru
	1	2	3	4
1.	172	34	74	1
2.	187	19	63	0
3.	165	120	90	0
4.	65	83	275	1
5.	19	109	102	0
6.	142	17	55	2
7.	33	107	180	0
8.	133	34	172	2
9.	182	7	122	0
10.	51	8	34	0
11.	273	3	99	1
12.	22	3	253	0
13.	53	5	106	0

Suma	1497	549	1625	7
Průměr	115,2	42,2	125,0	0,5
Směr. odchylka	79,8	45,2	74,5	0,8

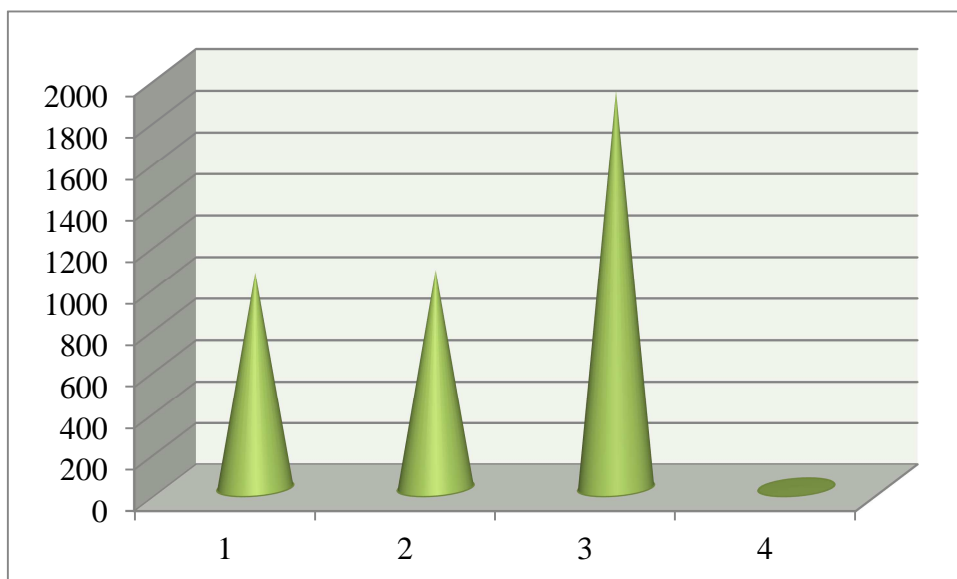


Tabulka č. 2

Odběry vzorků ze dne 17. 4. 2013, odběry provedeny u včelstev z proletové haly, které byly dány ven.

Včela	Hemocyty			
	Plasmocyty	Granulocyty	Prohemocyty	Buňka vřetenovitého tvaru
	1	2	3	4
1.	18	23	287	1
2.	23	5	120	0
3.	57	112	138	0
4.	8	192	203	0
5.	54	43	200	0
6.	192	21	130	0
7.	155	18	59	0
8.	229	63	71	0
9.	50	60	139	0
10.	Špatně obarveno			
11.	23	193	8	0
12.	58	4	228	2
13.	102	103	137	0
14.	11	125	126	0
15.	32	54	34	0
16.	27	36	34	0

Suma	1039	1052	1914	3
Průměr	69,3	70,1	127,6	0,2
Směr. odchylka	69,2	62,1	78,6	0,6

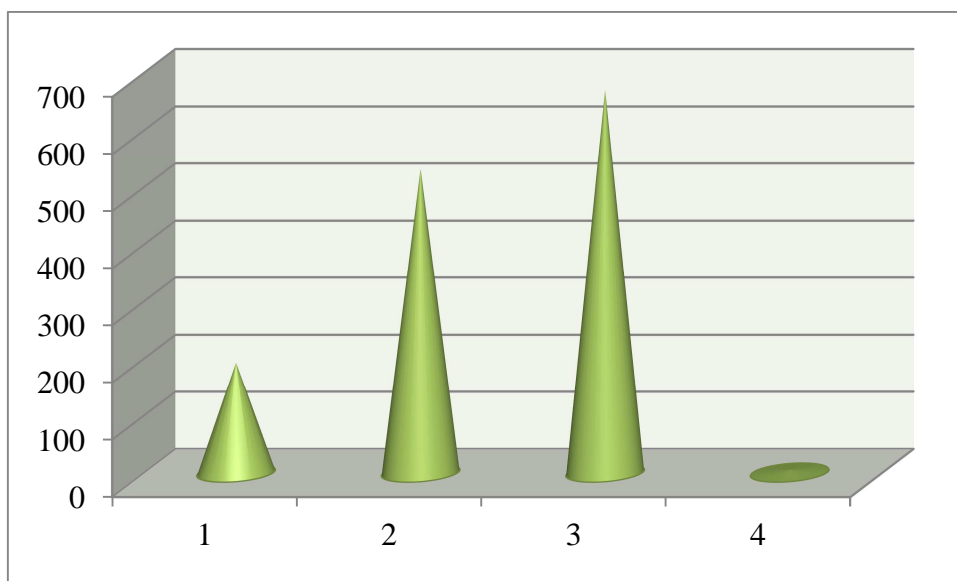


Tabulka č. 3

Odběry vzorků ze dne 24. 4. 2013, odběr vzorků proveden ze stejných včelstev jako u tabulky č. 2. Odchyceno pouze 6 včel.

Včela	Hemocyty			
	Plasmocyty 1	Granulocyty 2	Prohemocyty 3	Buňka vřetenovitého tvaru 4
1.	120	65	115	3
2.	15	142	107	0
3.	27	163	167	2
4.	13	36	67	1
5.	6	29	76	0
6.	12	97	139	0

Suma	193	532	671	6
Průměr	32,2	88,7	111,8	1,0
Směr. odchylka	43,6	55,4	37,7	1,3

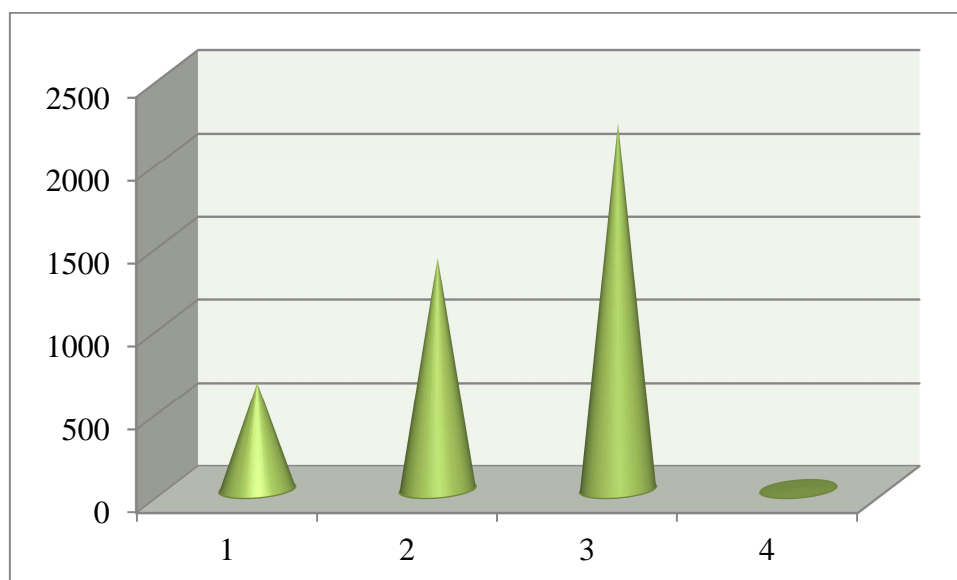


Tabulka č. 4

Vzorky odebrány dne 16. 5. 2013, vzorky od včel umístěných za ústavem; stejně jako předešlé tabulky.

Včela	Hemocyty			
	Plasmocyty	Granulocyty	Prohemocyty	Buňka vřetenovitého tvaru
	1	2	3	4
1.	128	261	255	3
2.	27	90	203	0
3.	112	61	181	1
4.	105	170	130	0
5.	64	181	206	0
6.	52	211	140	0
7.	22	216	219	2
8.	25	123	143	0
9.	41	25	217	3
10.	39	10	253	0
11.	28	47	259	0

Suma	643	1395	2206	9
Průměr	58,5	126,8	200,5	0,8
Směr. odchylka	38,7	86,0	47,0	1,3

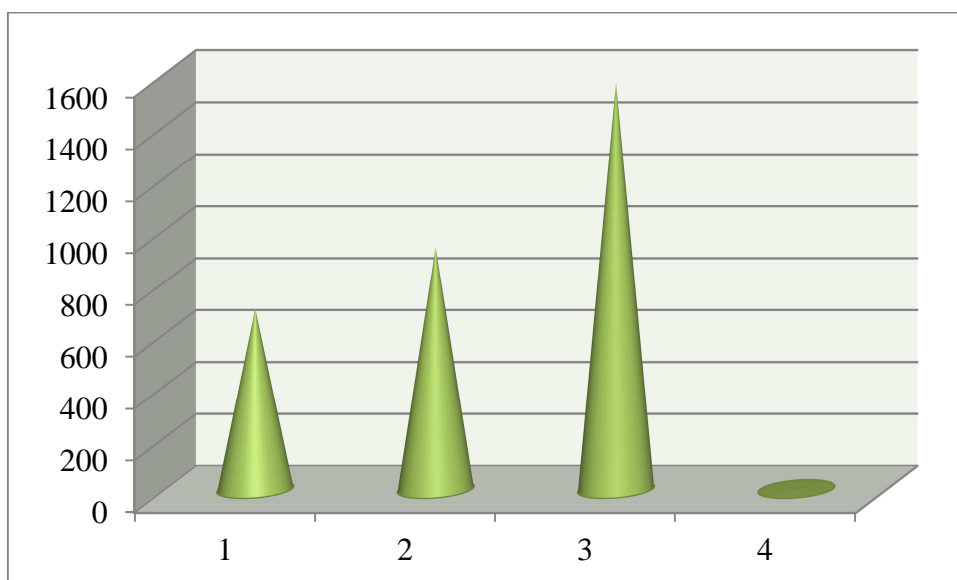


Tabulka č. 5

Odběry provedeny 28. 5. 2013, hemolymfa odebírána od včel z proletové haly, které byly dány ven (stejně jako předešlé odběry).

Včela	Hemocyty			
	Plasmocyty	Granulocyty	Prohemocyty	Buňka vřetenovitého tvaru
	1	2	3	4
1.	56	22	155	0
2.	54	93	213	3
3.	103	82	126	0
4.	162	48	83	0
5.	91	97	118	0
6.	46	143	102	0
7.	37	221	179	0
8.	28	47	259	1
9.	44	76	213	0
10.	73	103	116	0

Suma	694	932	1564	4
Průměr	69,4	93,2	156,4	0,4
Směr. odchylka	40,2	56,4	57,6	1,0

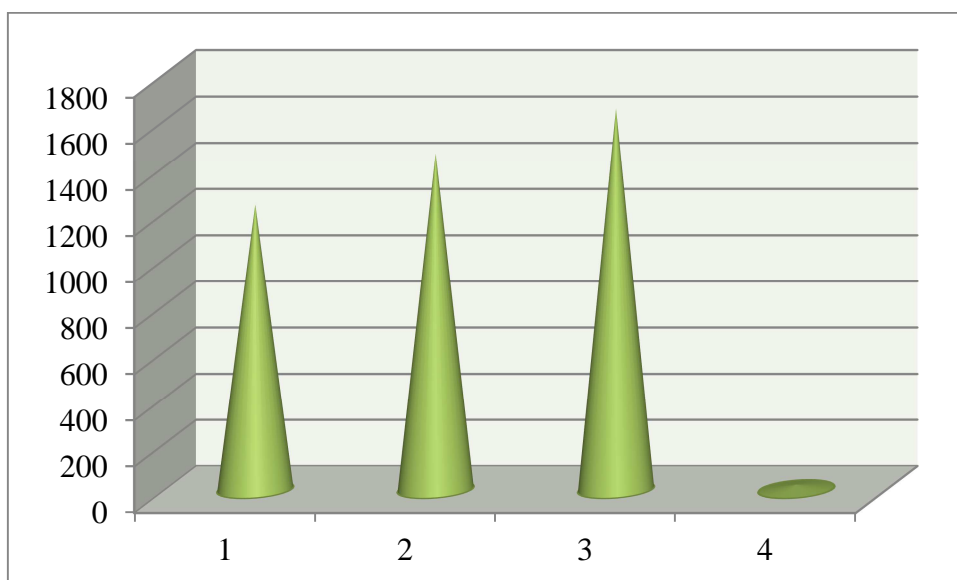


Tabulka č. 6

Vzorky odebrány 10. 7. 2013, hemolymfa odebrána včelám umístěným v izolátoru, které nemají přístup k pastvě. Včely byly nakrmeny řepkovým pylem → jsou na tzv. monodietě.

Včela	Hemocyty			
	Plasmocyty	Granulocyty	Prohemocyty	Buňka vřetenovitého tvaru
	1	2	3	4
1.	202	153	107	10
2.	112	98	96	3
3.	48	55	236	0
4.	83	265	241	7
5.	97	176	117	0
6.	186	201	132	1
7.	152	90	102	1
8.	111	86	175	0
9.	69	113	191	0
10.	73	98	115	0
11.	101	121	139	0

Suma	1234	1456	1651	22
Průměr	112,2	132,4	150,1	2,0
Směr. odchylka	48,8	61,2	52,7	2,3

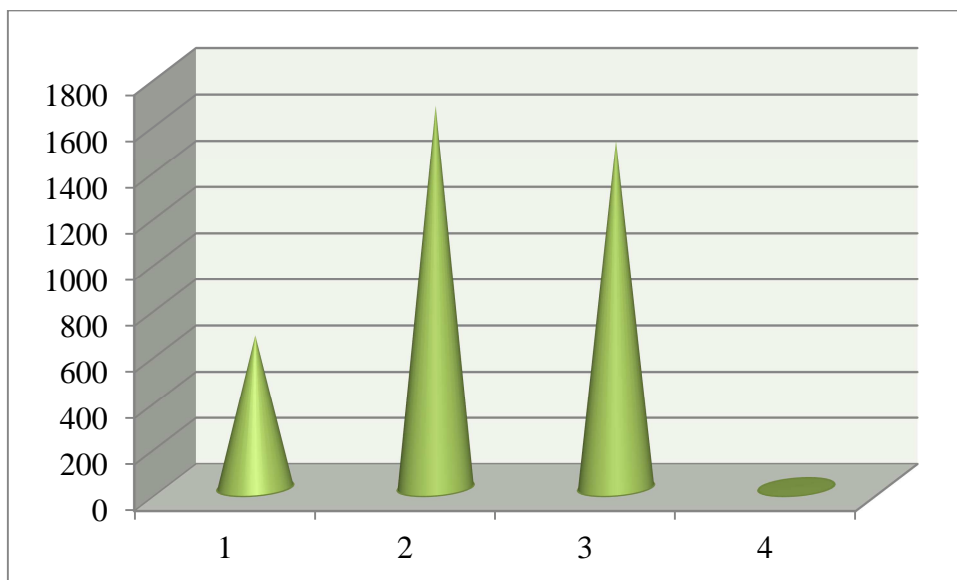


Tabulka č. 7

Odběry provedeny 10. 7. 2013. K porovnání s hemolymfou včel z izolátoru byly odebrány vzorky včelám na stejném stanovišti – vedle izolátoru, které měly normální přístup na pastvu.

Včela	Hemocyty			
	Plasmocyty 1	Granulocyty 2	Prohemocyty 3	Buňka vřetenovitého tvaru 4
1.	38	112	96	0
2.	32	244	145	0
3.	71	205	146	1
4.	62	211	297	1
5.	47	93	153	0
6.	85	136	93	1
7.	59	187	113	0
8.	104	67	166	0
9.	77	224	158	0
10.	84	175	136	0

Suma	659	1654	1503	3
Průměr	65,9	165,4	150,3	0,3
Směr. odchylka	22,7	60,1	57,5	0,5

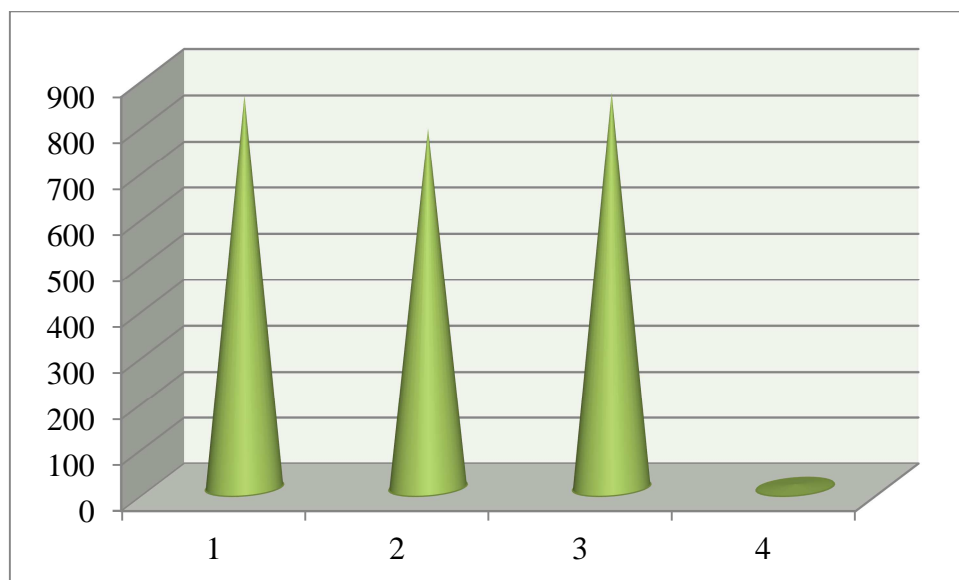


Tabulka č. 8

Odběry provedeny 1. 8. 2013 u včel z izolátoru.

Včela	Hemocyty			
	Plasmocyty 1	Granulocyty 2	Prohemocyty 3	Buňka vřetenovitého tvaru 4
1.	Špatně obarveno			
2.	86	43	74	2
3.	142	122	63	0
4.	87	65	26	1
5.	160	131	174	1
6.	27	56	157	0
7.	93	111	105	0
8.	69	52	89	0
9.	115	99	47	2
10.	73	102	123	1

Suma	852	781	858	7
Průměr	94,7	86,8	95,3	0,8
Směr. odchylka	39,9	33,0	49,4	0,8



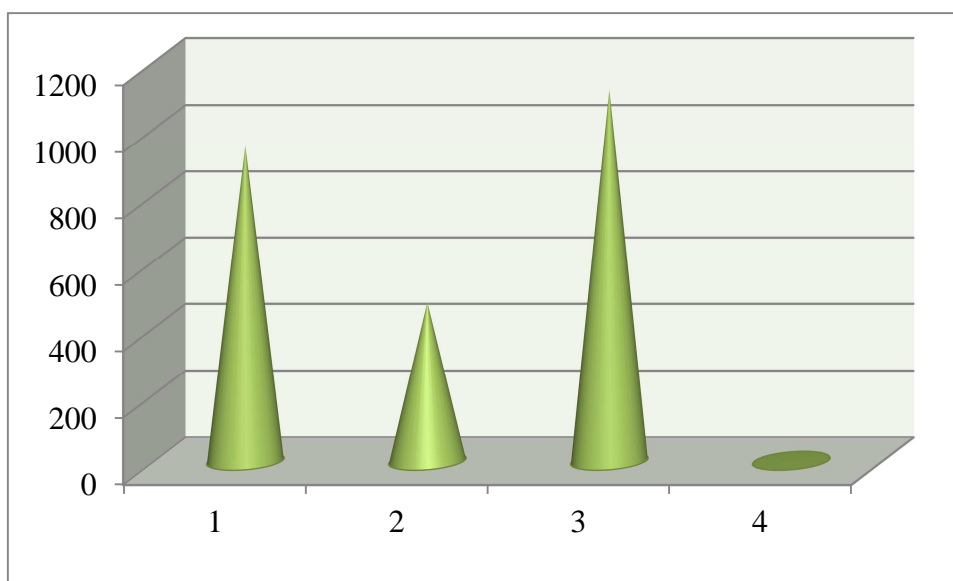
Tabulka č. 9

Vzorky odebrány 1. 8. 2013 od včel umístěných vedle izolátoru venku s přístupem k pastvě.

Vzorky se podařilo odebrat pouze u 7 včel.

Včela	Hemocyty			
	Plasmocyty	Granulocyty	Prohemocyty	Buňka vřetenovitého tvaru
	1	2	3	4
1.	177	82	108	1
2.	189	37	166	0
3.	106	53	172	0
4.	117	58	143	0
5.	128	101	189	0
6.	98	56	163	1
7.	132	88	176	0

Suma	947	475	1117	2
Průměr	135,3	67,9	159,6	0,3
Směr. odchylka	34,8	22,8	26,7	0,5

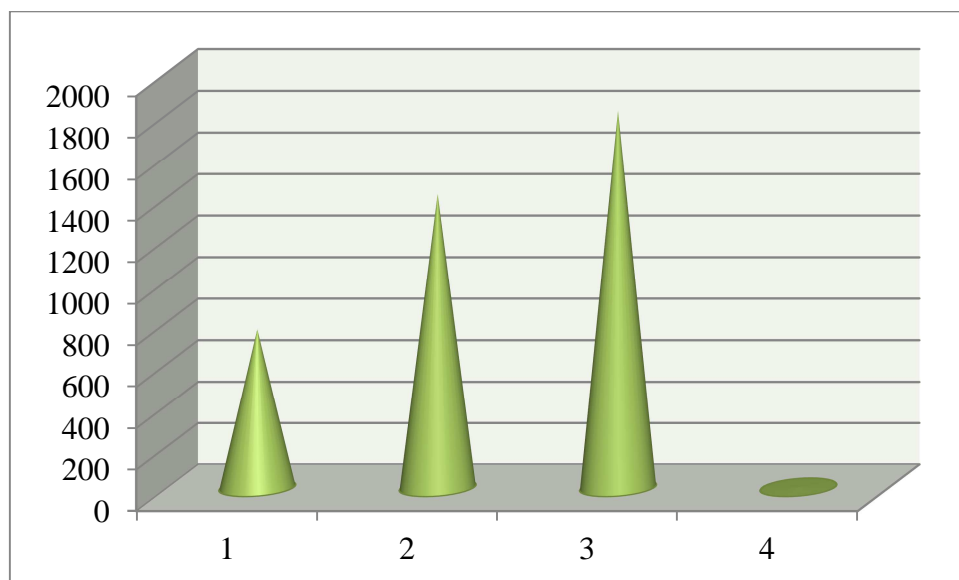


Tabulka č. 10

Vzorky odebrány 7. 8. 2013 od včel z izolátoru.

Včela	Hemocyty			
	Plasmocyty	Granulocyty	Prohemocyty	Buňka vřetenovitého tvaru
	1	2	3	4
1.	68	83	131	1
2.	110	165	223	0
3.	59	98	106	0
4.	91	110	165	0
5.	66	203	189	2
6.	74	187	201	0
7.	82	162	231	0
8.	103	93	187	0
9.	47	142	196	1
10.	65	173	189	0

Suma	765	1416	1818	4
Průměr	76,5	141,6	181,8	0,4
Směr. odchylka	19,9	42,8	38,6	0,7

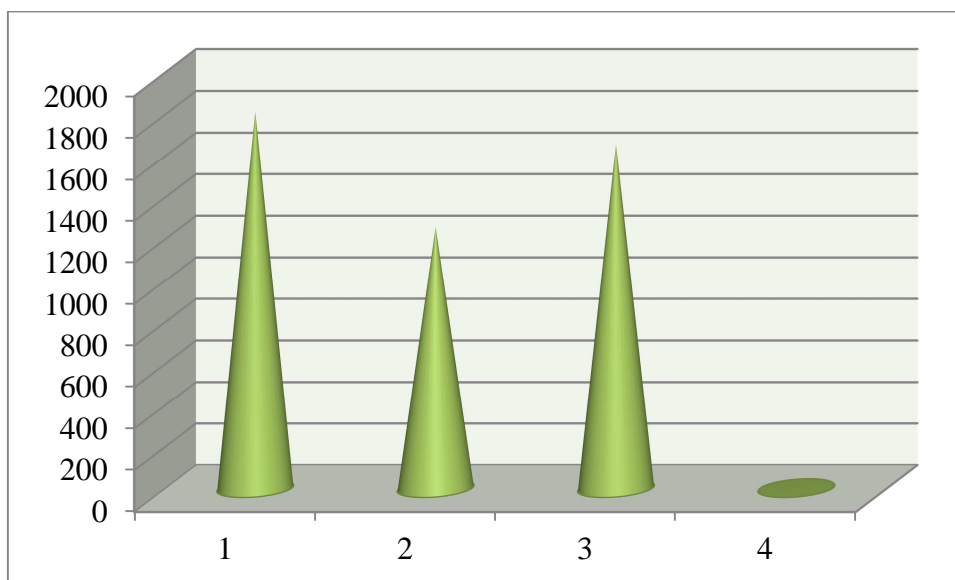


Tabulka č. 11

Vzorky odebrány 7. 8. 2013 do včel venku vedle izolátoru.

Včela	Hemocyty			
	Plasmocyty	Granulocyty	Prohemocyty	Buňka vřetenovitého tvaru
	1	2	3	4
1.	160	102	156	2
2.	181	93	143	0
3.	132	87	184	0
4.	149	110	93	0
5.	115	76	173	1
6.	201	174	191	0
7.	176	121	86	0
8.	198	135	205	0
9.	143	95	153	0
10.	187	129	174	0
11.	172	136	99	0

Suma	1814	1258	1657	3
Průměr	164,9	114,4	150,6	0,3
Směr. odchylka	27,7	28,2	41,2	0,6

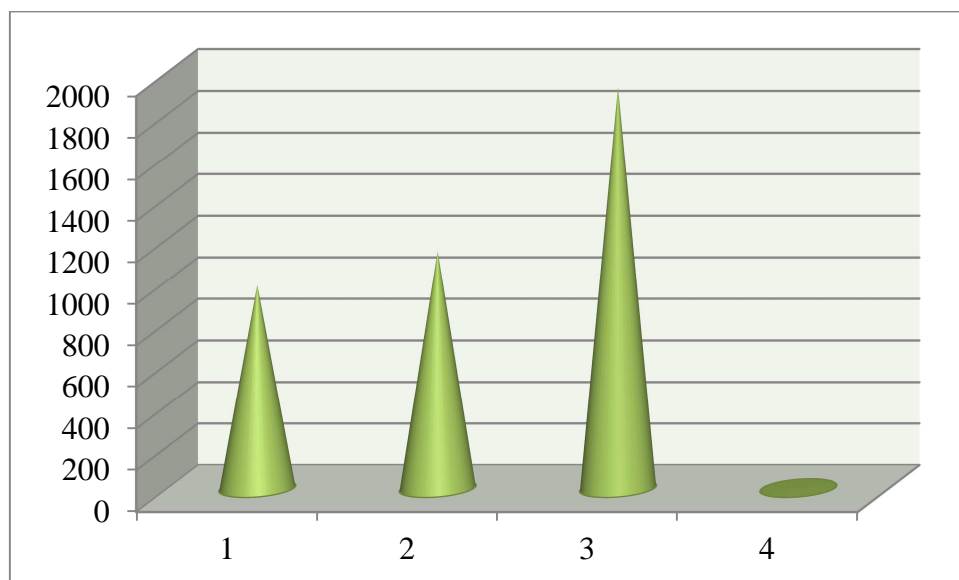


Tabulka č. 12

Vzorky odebrány 14. 8. 2013 od včel z izolátoru.

Včela	Hemocyty			
	Plasmocyty	Granulocyty	Prohemocyty	Buňka vřetenovitého tvaru
	1	2	3	4
1.	98	128	135	0
2.	62	76	176	0
3.	54	61	152	0
4.	77	182	208	2
5.	103	131	125	0
6.	41	89	198	0
7.	68	112	202	1
8.	135	57	190	0
9.	94	109	181	0
10.	149	83	179	0
11.	98	115	186	1

Suma	979	1143	1932	4
Průměr	89,0	103,9	175,6	0,4
Směr. odchylka	33,1	36,2	27,1	0,7

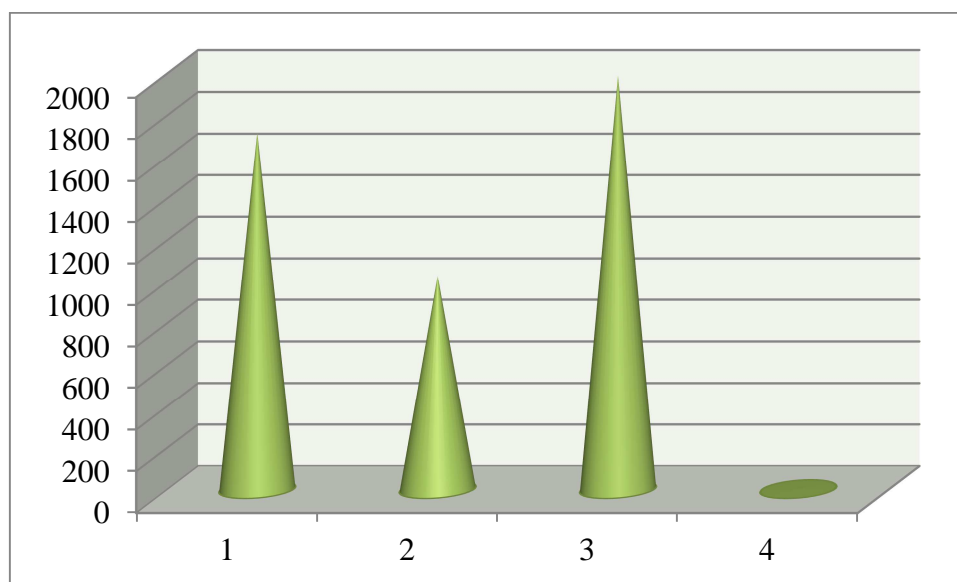


Tabulka č. 13

Vzorky odebrány 14. 8. 2013 od včel vedle izolátoru s přístupem k potravě.

Včela	Hemocyty			
	Plasmocyty	Granulocyty	Prohemocyty	Buňka vřetenovitého tvaru
	1	2	3	4
1.	187	87	189	1
2.	145	101	204	0
3.	162	92	176	0
4.	198	108	197	0
5.	134	76	171	0
6.	152	93	242	1
7.	128	115	87	0
8.	111	69	210	0
9.	169	124	152	0
10.	175	79	199	1
11.	158	84	164	0

Suma	1719	1028	1991	3
Průměr	156,3	93,5	181,0	0,3
Směr. odchylka	25,9	17,1	39,8	0,5

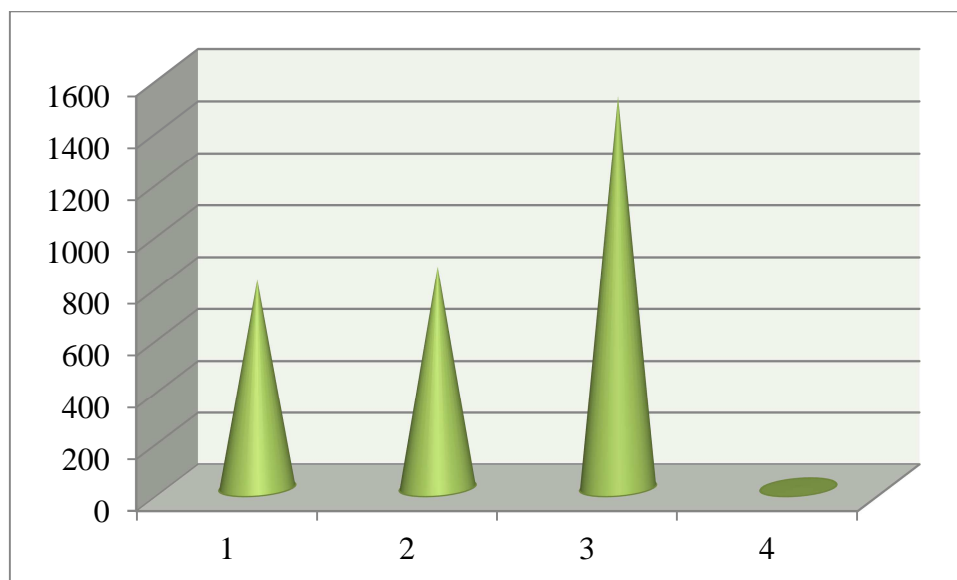


Tabulka č. 14

Hemolymfa odebrána 21. 8. 2013 do včel umístěných v izolátoru.

Včela	Hemocyty			
	Plasmocyty	Granulocyty	Prohemocyty	Buňka vřetenovitého tvaru
	1	2	3	4
1.	67	57	135	0
2.	98	34	192	0
3.	110	78	98	1
4.	72	93	116	0
5.	53	115	127	0
6.	49	84	176	0
7.	87	109	203	0
8.	83	121	110	0
9.	105	65	143	1
10.	79	99	210	0

Suma	803	855	1510	2
Průměr	80,3	85,5	151,0	0,2
Směr. odchylka	20,6	27,6	41,0	0,4

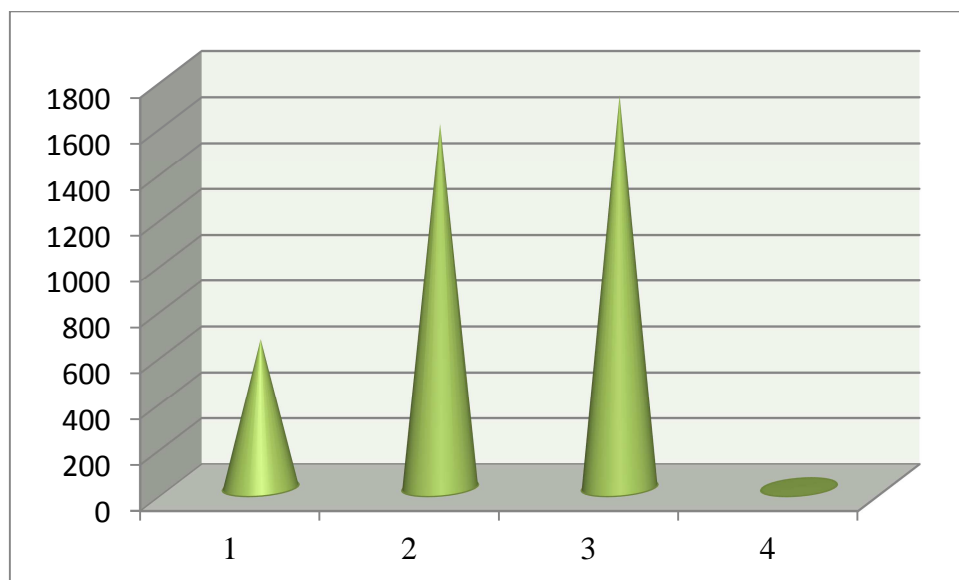


Tabulka č. 15

Vzorky odebrány 21. 8. 2013 od včel umístěných vedle izolátoru.

Včela	Hemocyty			
	Plasmocyty	Granulocyty	Prohemocyty	Buňka vřetenovitého tvaru
	1	2	3	4
1.	45	153	124	0
2.	39	186	105	0
3.	76	200	163	0
4.	58	85	178	0
5.	63	133	201	1
6.	27	203	119	0
7.	104	148	185	2
8.	95	96	139	0
9.	84	165	231	0
10.	56	218	265	0

Suma	647	1587	1710	3
Průměr	64,7	158,7	171,0	0,3
Směr. odchylka	24,8	44,9	51,6	0,7



5.1 Výsledky vyhodnoceny programem IBM SPSS 8.0

Vysvětlivky ke grafům:

Flight room = proletová hala

Outdoor = venek

GR = granulocyty

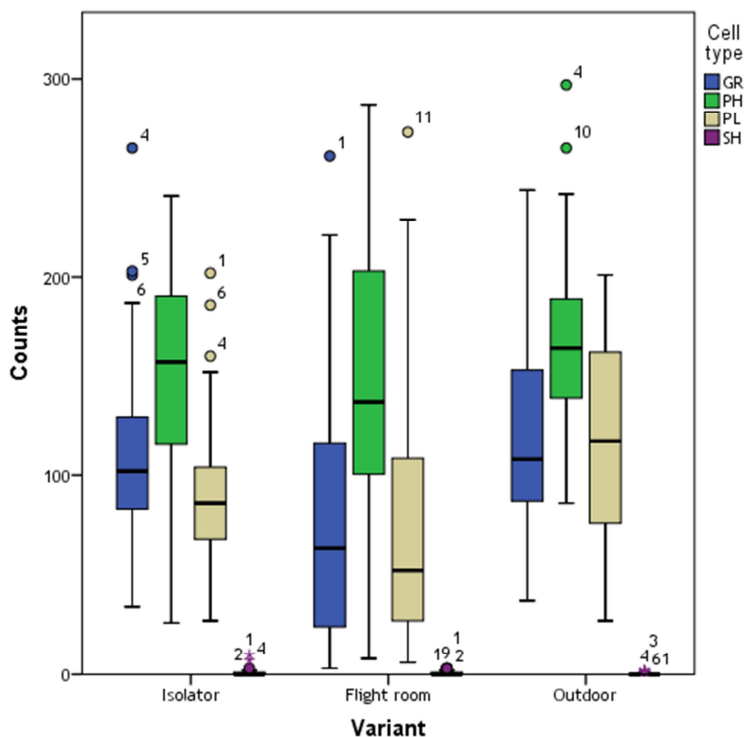
PH = prohemocyty

PL = plasmocyty

SH = buňky vřetenovitého tvaru

Graf č.1 Rozdíly v zastoupení jednotlivých kategorií hemocytů ve třech pokusných variantách

Popis variant je v kapitole 4.1. Pokusné varianty na str. 19.

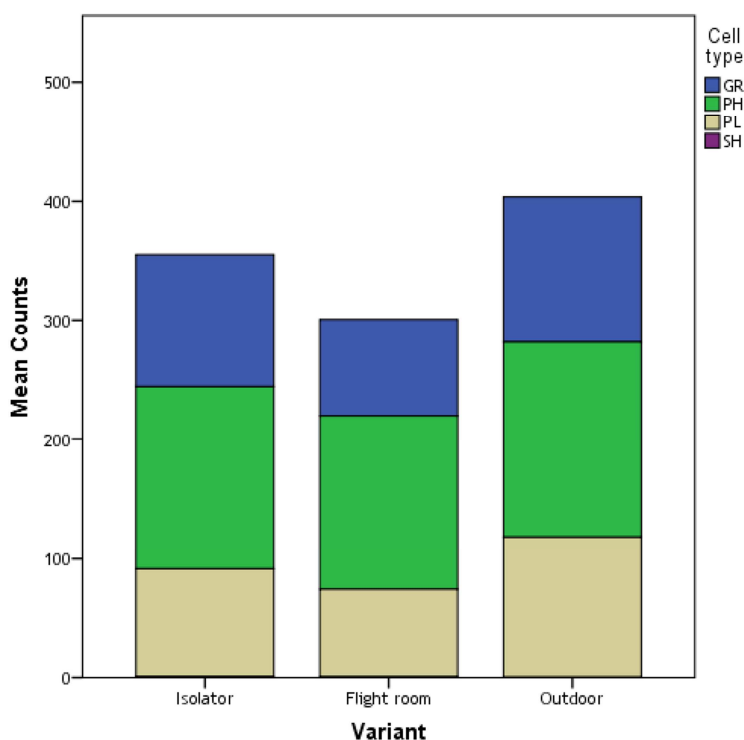


Barevné sloupce představují počty hemocytů, ve kterých je tučně vyjádřen medián. Jedná se o interkvartilní rozmezí IQR, což je míra statistického rozptylu mezi prvním a třetím

kvartilem. Úsečky znázorňují minimum a maximum naměřených hodnot, v našem případě včelích hemocytů.

Na grafu č.1 je možné sledovat variabilitu vzorků. V proletové hale se počty hemocytů pohybovaly od pár kusů až po 275 ks jednoho typu buněk u jedné včely. Právě v podmínkách proletové haly byly výkyvy počtů hemocytů největší. U včel umístěných v izolátoru je možné sledovat největší zastoupení prohemocytů a nejmenší rozptyl počtu hemocytů u plasmocytů. Venkovní včely mají počty hemocytů vyrovnané, s počtem buněk od cca 25 po 280 ks. Výjimku tvoří pouze buňky vřetenovitého tvaru, které ve všech pokusných variantách byly velice ojedinělé a jejich počty nepřekročily hranici 10 ks.

Graf č. 2 Relativní zastoupení kategorií



Z grafu je zřejmé, že největší počet hemocytů byl sledován u včel umístěných na venkovním stanovišti s přístupem k přirozené a plnohodnotné potravě. Nejméně hemocytů měly včely z proletové haly, které měli i nejmenší zastoupení granulocytů a plasmocytů oproti dalším dvěma zkoumaným skupinám.

Tabulka č 1. T-test buněk vyjádřené jako množství a procentické zastoupení, kdy součet všech čtyř hemocytů = 100

Buňky	Vyjádření	Izolátor	Proletovka	Venek
GR	amounts	111 _a	81_b	122 _a
	ratio	30,6 _a	26,0 _a	30,6 _a
PH	amounts	152 _a	145 _a	163 _a
	ratio	42,9 _a	49,9_b	40,3 _a
PL	amounts	91 _a	74 _a	118_b
	ratio	26,2 _a	25,1 _a	29,1 _a
SH	amounts	1 _a	1 _a	0 _a
	ratio	,2 _a	,2 _a	,1 _a
TOT	amounts	356_a	301_b	402_c
	ratio	100,0 ¹	100,0 ¹	100,0 ¹

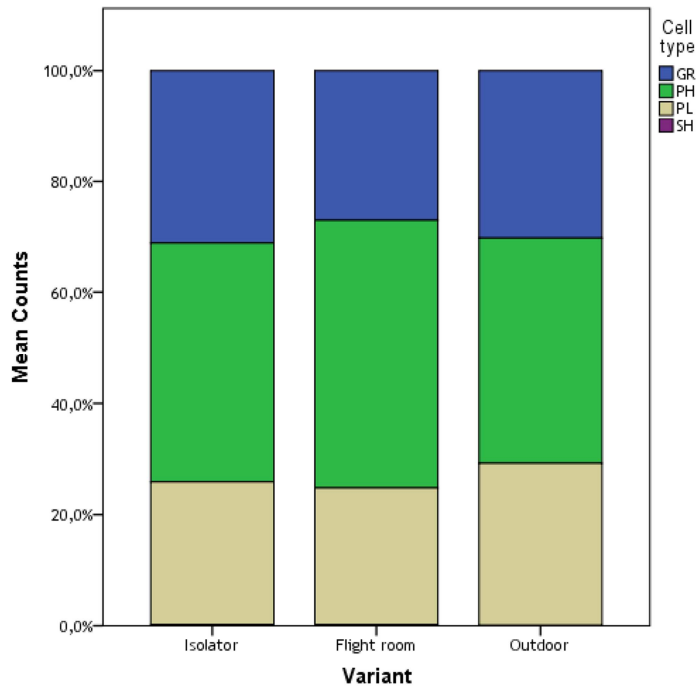
Amounts = suma, celkový počet hemocytů

Ratio = poměr

Rozdílné indexy v řádku značí statisticky významný rozdíl na $P < 0,05$. V tabulce je jasně viditelný rozdíl mezi celkovým počtem hemocytů ve všech třech variantách. Z hlediska procentického zastoupení krevních buněk měly včely v proletové hale 49,9 % prohemocytů v celkovém počtu nalezených hemocytů. Zároveň však měly ze všech zkoumaných skupin celkový počet hemocytů nejmenší, nejvíce hemocytů pak měly včely na venkovním stanovišti. Tyto včely měly ve své hemolymfě nejvíce prohemocytů. Včely umístěné v izolátoru neměly ve své hemolymfě žádný typ buněk, o kterých bychom mohli tvrdit, že zde byl statisticky významný rozdíl oproti ostatním dvěma skupinám.

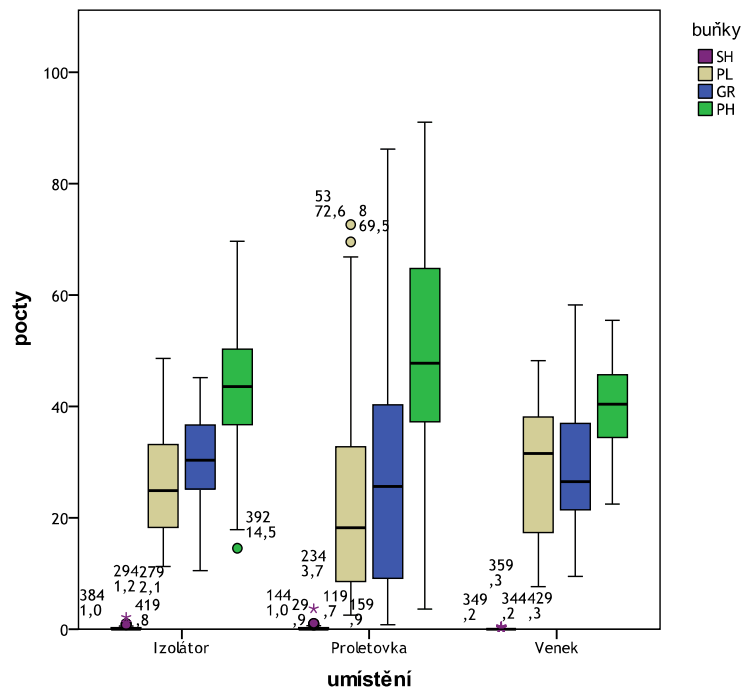
Graf č. 3 Relativní zastoupení kategorií vztažené na procenta

Graf doplňující předchozí tabulku, kde je celkový počet všech buněk v hemolymfě brán jako 100%



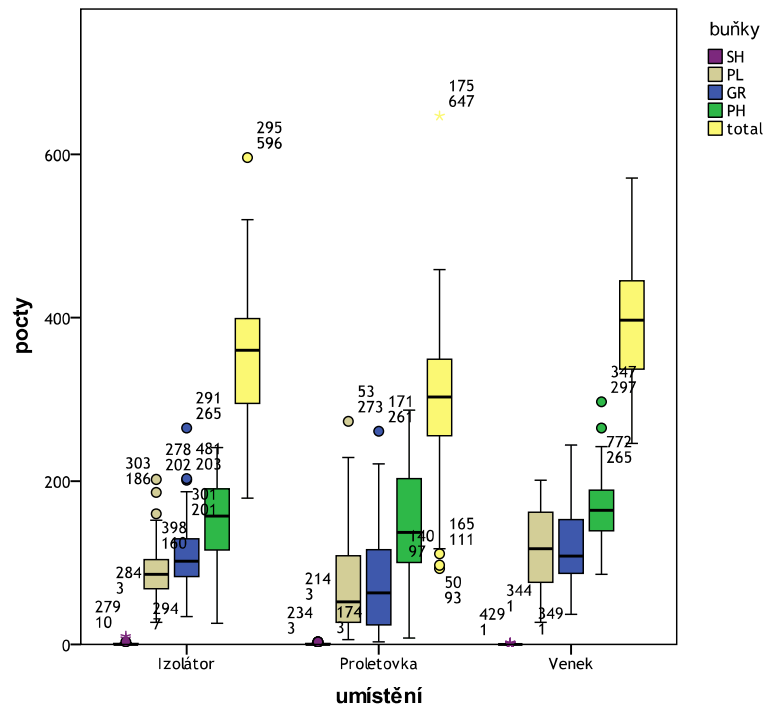
Z grafu je zřejmé, že včely v proletové hale mají oproti ostatním pokusným variantám více prohemocytů a méně granulocytů a plasmocytů. Můžeme také vidět u hemolymfy odebrané včelám z venkovního stanoviště nejvyrovnanější zastoupení hemocytů. U těchto včel žádný typ buněk nepřevažuje.

Graf č 4 Procentické zastoupení buněk v procentech



Z grafu je zřejmé, že včely v proletové hale mají oproti ostatním pokusným variantám více prohemocytů a méně granulocytů a plasmocytů. U hemolymfy odebrané včelám z venkovního stanoviště můžeme vidět nejvyrovnanější zastoupení hemocytů. U těchto včel žádný typ buněk nepřevažuje. Včely působily ze všech pokusných skupin nejzdravěji a nejmírněji.

Graf č. 5 Nominální hodnoty



V grafu vidíme, že včely umístěné venku, které měly přístup k přirozené, právě kvetoucí potravě, mají největší počet hemocytů. U včel umístěných v proletové hale vidíme vyrovnané hodnoty plasmocytů a granulocytů. O těchto včelách můžeme dále říci, že největší variabilitu v počtech hemocytů měly u prohemocytů. Zároveň mělo toto včelstvo nejméně hemocytů ze všech tří pokusných variant. Včely umístěné v izolátoru, měly oproti ostatním pokusným skupinám, ze všech krevních buněk nejméně plasmocytů.

5.1.1. Dvouvýběrový T – test po Bonferroniho korekci

			Variant					
			Izolátor		Proletovka		Venek	
			Mean	Standard Deviation	Mean	Standard Deviation	Mean	Standard Deviation
Cell type	GR	Counts	111 _a	47	81 _b	67	122 _a	51
	PH	Counts	152 _a	50	145 _a	70	163 _a	45
	PL	Counts	91 _a	36	74 _a	64	118 _b	52
	SH	Counts	1 _a	2	1 _a	1	0 _a	1

Hodnoty ve stejném řádku a sloupci nesdílejí stejný index a statisticky se výrazně liší při $P < 0,05$ za použití dvouvýběrového T - testu. Buňky bez dolního indexu nejsou v testu zahrnuty. Testy jsou upraveny a určeny pro párová porovnání v řadě každého vnitřního sloupce upraveny pomocí Bonferroniho korekce.

Statistické zpracování dat ukázalo, že i přes velký rozptyl, který je u biologických měření tohoto typu obvyklý, byly dokumentovány statisticky významné rozdíly v zastoupení hemocytů. V podmínkách proletové haly bylo průkazně méně granulocytů než v obou dalších variantách, ve variantě "venek" je zase průkazně více plasmocytů. Pokud budou tyto výsledky opakovatelné v dalších pokusech, můžeme konstatovat, že krevní obraz včel se mění podle podmínek, ve kterých se včelstvo nalézá. Parametry krevního obrazu včely medonosné bude možno použít pro diagnostiku případných nenormálních stavů včelstev vedoucích k dalším komplikacím až po kolaps včelstva.

6. DISKUSE

Vzhledem k faktu, že k tématu týkající se krevního obrazu včel není mnoho vědeckých článků ani jiných materiálů, je složité naše výsledky potvrdit či vyvrátit. K tvrzením o jaké typy buněk se jedná, je nutné podotknout, že právě k malému počtu výzkumů na toto téma provedených, je možné, že jednotlivé výzkumné týmy pozorovaly stejné buňky, pouze v jiném stádiu buněčného dělení a považují je za druhy rozdílné. Náš tým vycházel ze znalostí hmyzí hemolymfy z kapitoly 3.3.1, i z publikací o hemolymfě včel zmíněných v kapitole 3.3.2, a z dostupných fotodokumentací a obrázků.

Již Schönfeld (1955) uvedl, že v krvi přezimujících včel bylo v jednom kubickém milimetru napočteno průměrně 21 000 těchto krvinek. Od tohoto výsledku se naše pokusy velice výrazně liší. Přezimující včely jsme měli umístěny v proletové hale a průměrný počet hemocytů u těchto včel byl pouhých 301 ks. Schönfeld (1955) neuvedl kolik μl hemolymfy bylo včelám odebráno, ani jaký byl přesný postup odběrů a bližší specifikace pokusu.

Wilson – Rich (2008) získal svým experimentem výsledky týkající se počtu včelích hemocytů. Uvedl, že tyto počty jsou u larvy okolo 2000 buněk/ cm^3 , kukly asi 4000 buněk/ cm^3 a u dospělé včely klesne na přibližně 500 buněk/ cm^3 . V našem výzkumu nebylo známo stáří včel, u kterých jsme hemolymfu odebírali. Pod mikroskopem jsme sledovali celý roztěr hemolymfy, který odpovídal hmotnosti 10 μl . Celkové počty buněk v námi získané hemolymfě byly průměrně u včel z izolátoru 356 ks, u včel v proletové hale 301 ks a u včel umístěných venku 402 ks. Z těchto výsledků je možné říci, že vzhledem k faktu, že $1 \text{ cm}^3 = 1 \text{ ml}$ a 10 μl odpovídá 0,01 ml, nám výsledky nevyšly stejně, jak uvádí Wilson – Rich (2008). V tomto případě je důležité podotknout, že stejně jako u Schönfelda (1955) neznáme prostředí, ve kterém Wilson – Rich (2008) hemolymfu odebírali, jak a kde byly včely umístěny a jaký přístup k potravě měly. K získání přesnějších výsledků a možnosti potvrdit či vyvrátit tvrzení naše či zmíněných autorů, je potřeba zopakovat tyto experimenty a měření ve stejných podmínkách.

Sawson et al. (2010) ve své studii uvedl, že největší zastoupení mají v hemolymfě plasmocyty a granulocyty. Tyto výsledky použil ve spojení s vyrovnanou potravou, kdy včely měly přístup k polyflorální potravě. V tomto případě si na základě našich výsledků troufám nesouhlasit. Naše výsledky ukázaly u vzorků odebraných včelám umístěným na stanovišti

s přístupem k právě kvetoucí pastvě největší podíl prohemocytů. Tento rozdíl nebyl o moc výraznější oproti počtům plasmocytů a granulocytů. Tyto výsledky můžeme vidět v kapitole 5.1 Výsledky vyhodnoceny programem IBM SPSS 8.0 v grafu č. 2 a grafu č. 3. Sawson et al. (2010) dále uvádí, že velké zastoupení měly také coagulocyty, které se nám dle popisu ani fotografií dostupných v článku nepovedlo v našich vzorcích charakterizovat. Kromě již výše zmíněných třech typů krvinek jsme v hemolymfě pozorovali buňky vřetenovitého tvaru, o kterých se ve své publikaci zmínil Zakaria (2007), který tyto hemocyty označil za vzácný typ. S tímto tvrzením se shodujeme i my, jelikož jsme vřetenovité buňky v hemolymfě nacházeli velmi zřídka a ve velice malém, téměř zanedbatelném počtu.

V předešlých výsledcích je možné pozorovat významné rozdíly mezi počty hemocytů u všech skupin včel.

U skupiny jedna, tj. u včel, které byly umístěny v proletové hale bylo průkazně méně granulocytů než v dalších dvou skupinách. Tyto včely byly částečně živeny zásobami, které měli přes zimu a částečně jarní pastvou (pyl ze zlatice prostřední, vrby jívy a dalších jarních rostlin). Na této skupině včel bylo nejvíce znatelné, že jsou včely vyčerpané a nezbyvá jim mnoho sil pro let a sběr potravy. Kondice včelstva byla podmíněná i faktem, že se jednalo o zimní včely. U včel, které byly nakrmeny monoflorálně, tzn. řepkovým pylem a umístěny v izolátoru, aby se zabránilo jejich přístupu k jiné potravě kromě svých zásob, byly v největším počtu zastoupeny prohemocyty, nejmenší zastoupení v hemolymfě měly plasmocyty. Tyto včely byly bez matky a na včelstvu byla znatelná únava a úbytek životnosti. Nejmenší výkyvy hemocytů měly včely umístěné venku s přístupem k polyflorální potravě. Lze říci, že u těchto včel byly počty krvinek relativně vyrovnané. Toto včelstvo bylo v plné síle, mírné povahy a bez jakýchkoli známek nemocí.

Z hlediska zdraví včel se dá na základě této práce říci, že přístup k přirozené a plnohodnotné potravě je základ. Jak je možné vidět v grafech v kapitole 5. Výsledky, nejvyrovnanější počet hemocytů mají včely s vyváženým příjmem potravy. Při výběru správného stanoviště včelám je důležité znát květovou diverzitu krajiny – jestli zde kvete dostatečné množství a druhů rostlin a jaká je dostupnost potravy, abychom zamezili sběru monoflorálního pylu, zajistit včelám blízký zdroj vody a znát například i povětrnostní podmínky daného místa. Dalším velmi důležitým faktorem je zvažování, kolik včelstev na jedno stanoviště dáváme, či jak daleko jsou stanoviště od sebe. Aby nedocházelo k tomu, že na malé rozloze pozemku či na pozemku s malou květovou diverzitou umístíme velký počet včelstev. Tím by včely neměly dostatek potravy a docházelo by ke slábnutí a následnému úhynu

včelstev. V odborné literatuře se uvádí, že včela je schopna doletět pro potravu až 5 km, z praxe však víme, že tato vzdálenost může být až dvojnásobná. Tato skutečnost není v zájmu včelařů ani včelstev, neboť dlouhým letem se včely vyčerpávají, dochází k nadměrné spotřebě energie a přínos nektaru a pylu do včelstva je významně malý. Z tohoto důvodu by měl být kladen velký důraz na volbu správného stanoviště. Umístí – li včelař svoje včely na nevhodně zvolené místo, tyto včely zpravidla živoří.

7. ZÁVĚR

Předkládaná diplomová práce se v literární rešerši zabývá hmyzí hemolymfou obecně, porovnává různé druhy hmyzu a jejich hemocyty. Další kapitolou je hemolymfa včely medonosné a výživa včel. Diplomová práce byla založena na rozboru včelí hemolymfy u včel s různou úrovní výživy. Výzkum byl realizován v laboratořích Výzkumného ústavu včelařského v Dole, odkud pocházely i námi zkoumané včely, resp. jejich hemolymfa. V kapitole 5. jsou výsledky experimentu kompletně zveřejněny. Cílem práce bylo zjistit vliv výživy na včelí hemolymfu a zdraví včel, aby se docílilo co nejmenšího úhynu včel a zamezilo se dalším případným nenormálním stavům včelstev vedoucích k dalším komplikacím až po kolaps včelstva. Bylo zjištěno, že včely s přístupem k pestré polyflorální výživě mají vyrovnané počty krevních buněk a oproti včelstvům kmeným monoflorálním pylem jsou zdravější, mírné a v lepší kondici. Tudíž je pro včelaře nezbytné, aby při umístění svých včelstev na stanoviště znal květovou diverzitu krajiny, aby včelám zajistil vyváženou výživu a tím zamezil onemocnění a vysílení svého včelstva s následky úhynu.

„ Z včelařství naučil jsem se přírodu více znáti a více milovati, než z mnoha knih učených.“ (J. A. Komenský)

8. SEZNAM LITERATURY

8.1. Literatura

- Akai, H., Sato, S. 1977. Surface and internal ultrastructure of the hemocytes in *Lucilia illustris*. Insect hemocytes development, forms, functions and techniques, edited by Gupta A. P.. New York. Cambridge University. p. 145 - 153.
- Berger, J., Slavíčková, K. 2008. Morphological Characterization of Hemocytes in the Adult Linden Bug, *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Heteroptera), *Zoological Studies* 47. p. 466-472.
- Burmester, T., Hankeln, T. 2007. The respiratory proteins of insects, *J. Insect Physiol.* 53. p. 285-294.
- Butt, T. M., Shields, K. S. 1996. The Structure and Behavior of Gypsy Moth - *Lymantria dispar* Hemocytes, *Journal of invertebrate pathology*, 68. p. 1-14.
- Crosley, A. C. 1975. The cytophysiology of insect blood cells, *Asvance Insect Physiology* 11. p. 117-221.
- Drašar, J. a kol. 1978. Včelařství, Státní zemědělské nakladatelství, Praha. p. 312.
- Gupta, A. P. 1979. Hemocyte types: their structures, synonymies, interrelationships, and taxonomic significance, *In AP Gupta, ed. Insect hemocytes*. New York: Cambridge Univ. Press. p. 85-127.
- Gupta A. P., Ed. 1991. *Immunology of Insects and other Arthropods*, CRC Press, Boca Raton, FL. p. 508.
- Handl, B. 1991. Včelí produkty ve výživě člověka a v lékařství, ZO ČSV v Kunštátu na Moravě. p. 24.
- Haragsim, O. 1966. *Medovice a včely*, SZN Praha. p. 176.
- Hrassnigg, N., Leonhard, B., Crailsheim, K. 2003. Free amino acids in haemolymph of honey bee queens (*Apis mellifera* L), *Amino Acids* 24. p. 204-212.
- Lavine, M. D., Strand, M. R. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32. p. 1295-1309.
- Leta, M. A., Gilbert, C., Morse, R. A. 1996. Levels of hemolymph sugars and body glycogen of honeybees (*Apis mellifera* L) from colonies preparing to swarm, *J. Insect Physiol.* 42. p. 239-245.

- Liu, F., Xu, Q., Zhang, Q., Lu, A., Ling, E., Beerntsen, B. 2013. Hemocytes and hematopoiesis in the silkworm, *Bombyx mori*, University in China. p. 102 – 109. ISJ 10: 102-109.
- Meister, M., Lagueux M. 2003. Drosophila blood cells, Cellular Microbiology 5(9). p. 573–580.
- Michener, C. D. 1979. Biogeography of the bees, *Ann. Mo. Bot. Gard* 66. p. 277- 347.
- Michener, C. D. 2000. The bees of the World, The John Hopkins University Press, Baltimore. p. 913.
- Mussen, E. C. 2008. Feeding bees nectar substitutes, Extension Apiculturist, UC Davis. p. 219-221.
- Pech, L. L., Strand, M. R. 2000. Plasmatocytes from the moth *Pseudoplusia includens* induce apoptosis of granular cells, *Journal of Insect Physiology* 46. p. 1565-1573.
- Pokorný, V., Šifner, F. 2004. Atlas hmyzu, Paseka. p. 7. ISBN: 8071856584.
- Přidal, A. 2003. Včelí produkty, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. p. 102. ISBN: 80-7157-717-0.
- Raina, A. K. (1976). Ultrastructure of the larval hemocytes next term of the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera: Gelechiidae), *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 5. p. 187-195.
- Ribeiro, C., Brehélin, M. 2006, Insect haemocytes: What type of cell is that?, *J. of Insect Physiology* 52. p. 417-429.
- Sawson S. et al. 2010. Effect of different feeding diets on the haemolymph of the newly emerged honeybee workers *Apis mellifera* L., *Egypt. Acad. J. biolog. Sci.*, 3 (1). p. 213 - 22 0. ISSN: 1687-8809.
- Schönfeld, A. 1955. Anatomie, morfologie a fyziologie včely medonosné, Státní zemědělské nakladatelství, Praha. p. 369.
- Silva, J. E. B., Boleli, I. C., Simoes, Z. L. P. 2002, Hemocyte types and total and differential counts in unparasitized and parasitized *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae) larvae, *Braz. J. Biol.*, 62(4A). p. 689-699.
- Szymas, B., Jędrzeszuk, A. 2003. The influence of different diets on haemocytes of adult worker honey bees *Apis mellifera*, *Apidologie*. p. 97–102.

- Titěra, D. 2006. Včelí produkty mýtů zbavené: med, vosk, pyl, mateří kašička, propolis, včelí jed, 1. vyd. Praha: Ve spolupráci s ČSV Nakladatelství Brázda. p. 176. ISBN 80-209-0347-X.
- Veselý, V. et al. 2003. Včelařství, Brázda, Praha. p. 272. ISBN: 8020903208.
- Westermeier, R., Naven, T. 2002. Proteomics in practice: a laboratory manual of proteome analysis, Wiley-VCH Verlag-GmbH, Weinheim. p. 325 – 334.
- White, J., Doner, L. (2008). Honey composition and properties, Beekeeping in the United States. Agriculture handbook number 335. p. 82 – 91.
- Wilson – Rich, N., Dres, S., Starks, P. 2008. The ontogeny of immunity: Development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*), Department of Biology. Tufts University. p. 123 – 135.
- Winston, M. L. 1991. The biology of the honey bee, Harvard University Press, Cambridge. p. 281.
- Yamashita, M., Iwabuchi, K. 2001. Bombyx mori prohemocyte division and differentiation in individual microcultures, *Journal of Insect Physiology* 47. p. 325-331.
- Zakaria, M. E. 2007. The Cellular Immunity Responses In The Haemolymph Of Honey Bee Workers Infected, By American Foulbrood Disease (AFB). *Journal of Applied Sciences Research*. 3(1). p. 56-63.

8.2. Internetové zdroje

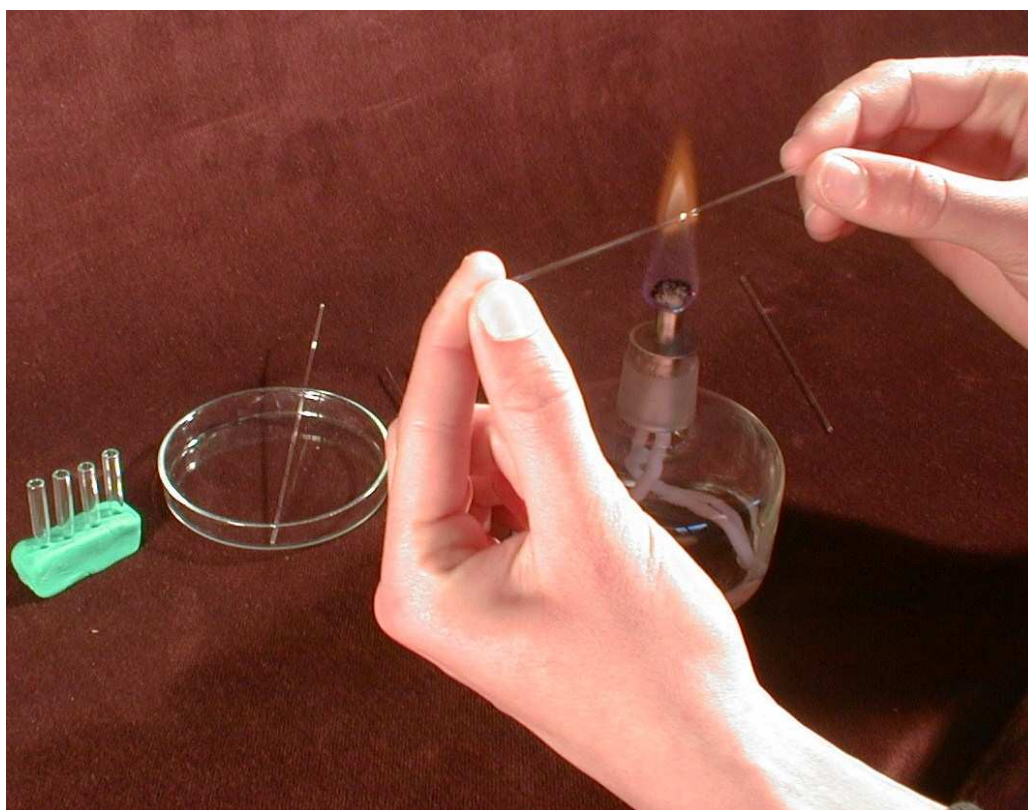
- Boháč, J. O vzniku medovicového medu [online]. Červenec 2013 [cit. 2014-01-08]. Dostupné z http://www.psnv.cz/index.php?option=com_content&view=article&id=72:o-vzniku-medovicoveho-medu&catid=58:vceli-pastva&Itemid=68.
- Navrátil, S., Klíma, Z., Palíková, M. Choroby včel – multimediální pomůcka [online]. Červen 2012 [cit. 2012-10-21]. Dostupné z <http://soubory.vfu.cz/fvhe/choroby-vcel/>.
- Rada V., Havlík, J., Flesar, J. Biologicky aktivní látky ve výživě včel [online]. Červen 2009 [cit. 2012-11-10]. Dostupné z <http://www.vuzv.cz/sites/Vcely.pdf>.

9. PŘÍLOHY

Seznam příloh

1. Vytažení skleněné kapiláry nad plamenem – foto: Ing. Dalibor Titěra, CSc.
2. Odběr hemolymfy – foto: Ing. Dalibor Titěra, CSc
3. Odběr hemolymfy – detail – foto: Ing. Dalibor Titěra, CSc
4. Hemocyty (granulocyty, plasmocyty, prohemocyty) – foto: Ing. Eliška Vrabcová
5. Hemocyty (plasmocyty, prohemocyty) – foto: Ing. Eliška Vrabcová
6. Hemocyty (plasmocyty, prohemocyty, buňky vřeten. tvaru = spindle shape cell) – foto: Bc. Nikola Grätzová
7. Hemocyty - foto: Bc. Nikola Grätzová
8. Hemocyty II. - foto: Bc. Nikola Grätzová

Příloha č. 1: Vytažení skleněné kapiláry nad plamenem



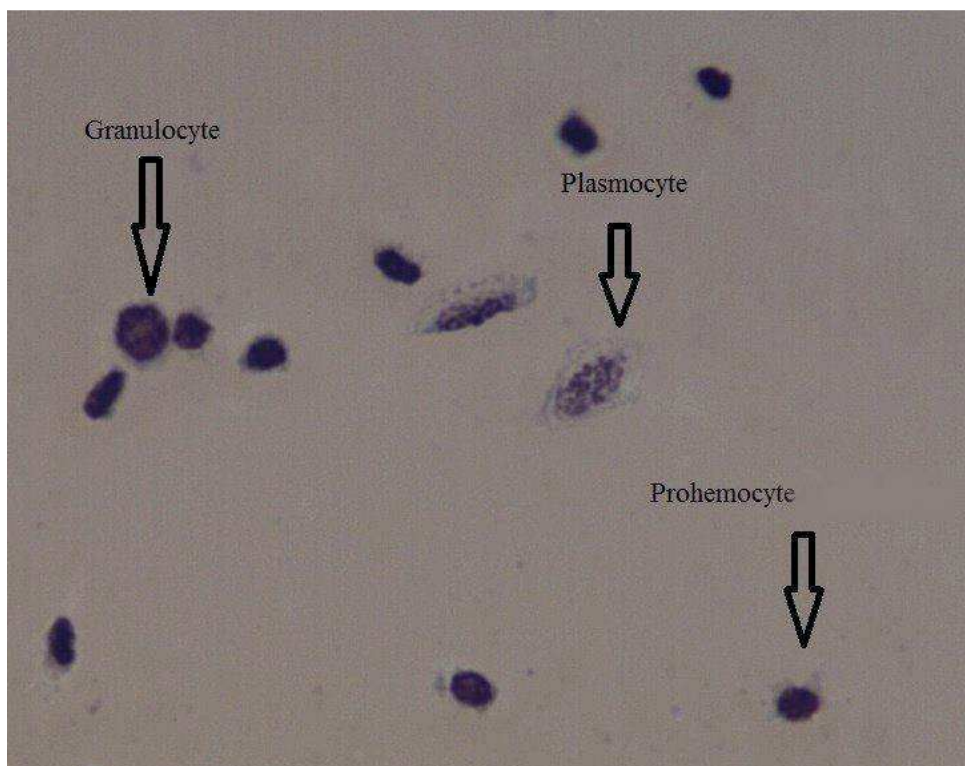
Příloha č. 2: Odběr hemolymfy



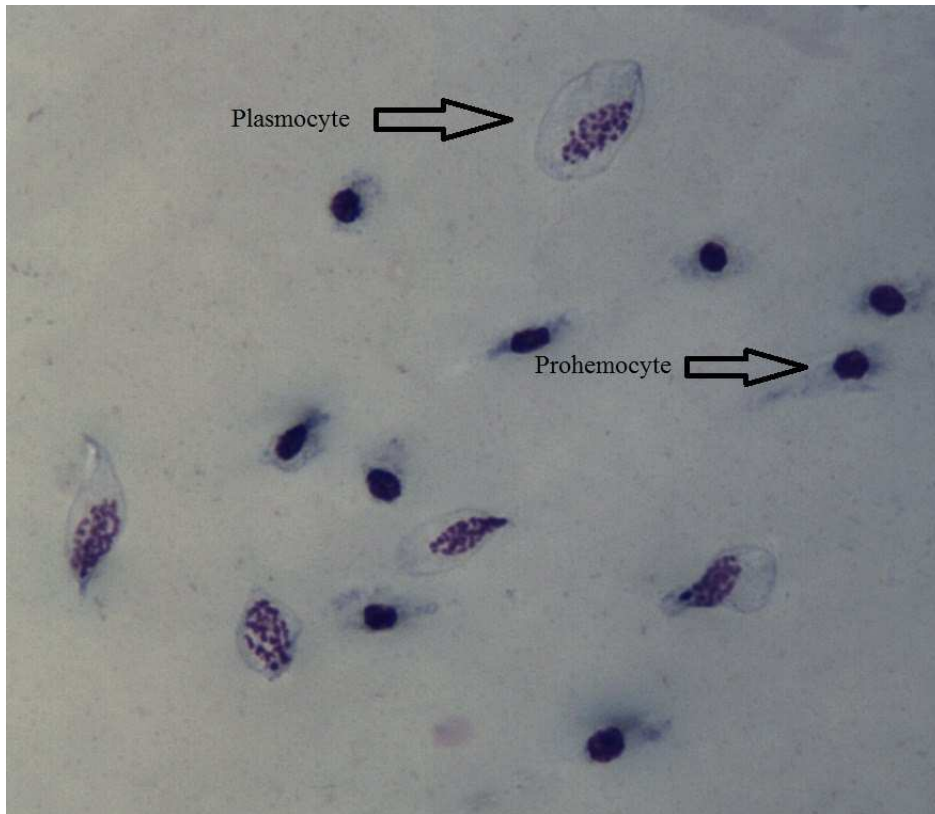
Příloha č 3: Odběr hemolymfy - detail



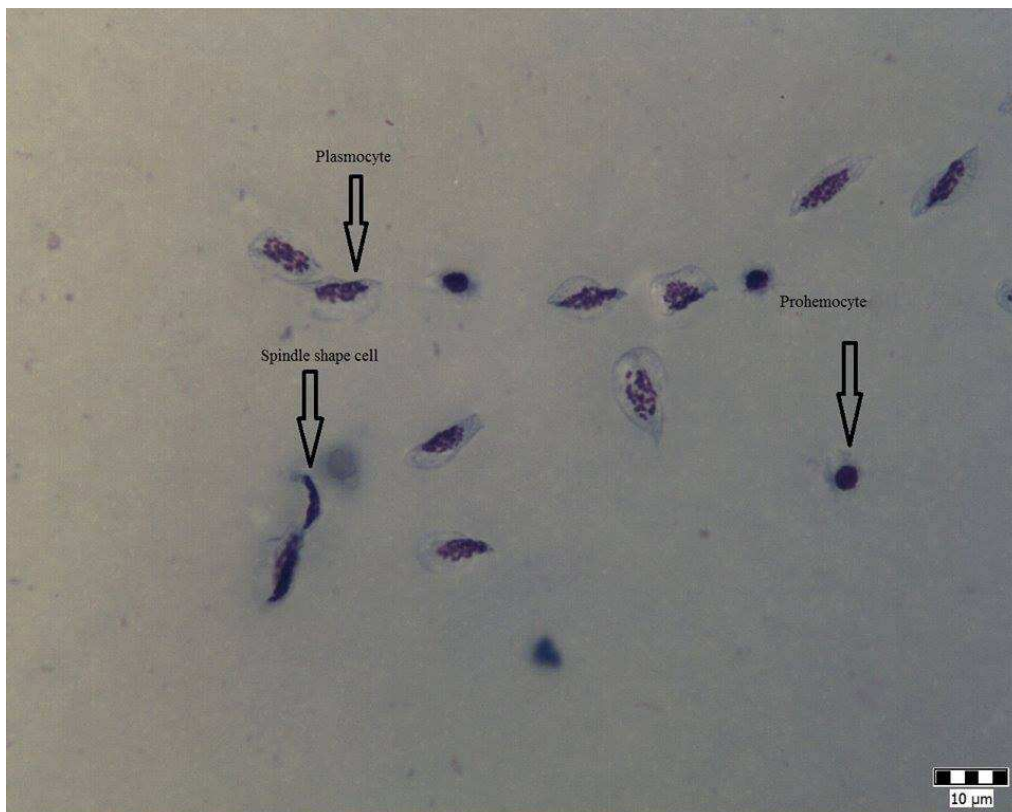
Příloha č. 4: Hemocyty (granulocyty, plasmocyty, prohemocyty)



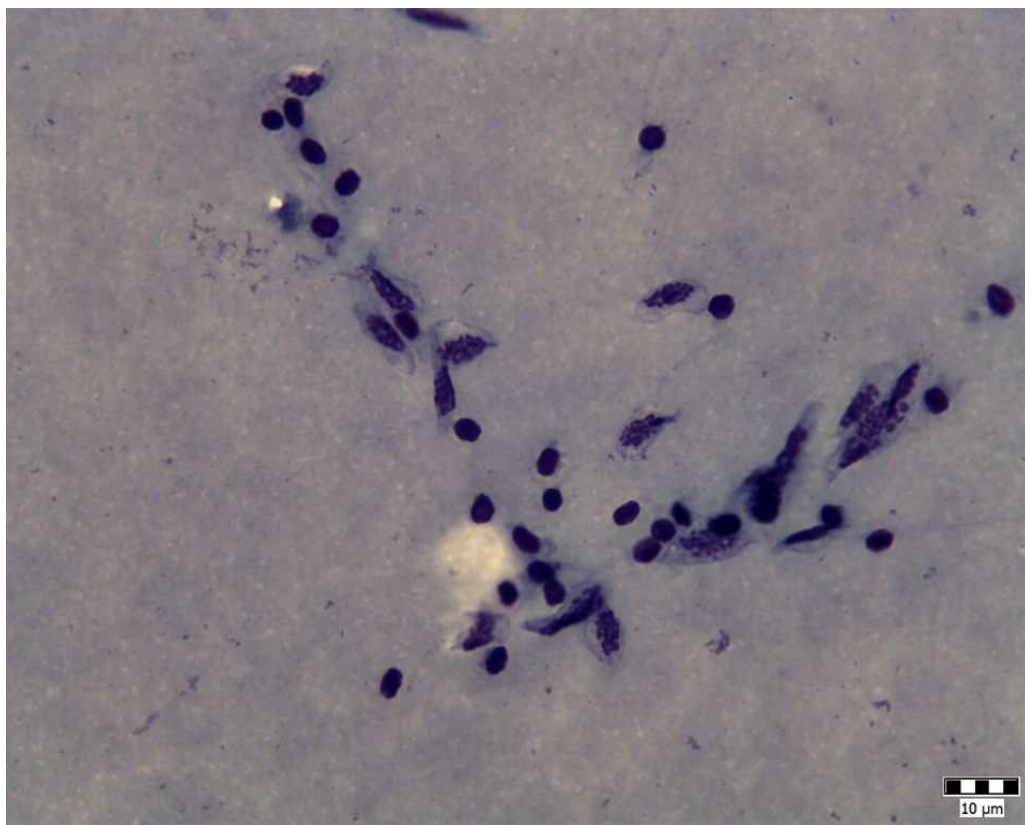
Příloha č. 5: Hemocyty (plasmocyty, prohemocyty)



Příloha č. 6: Hemocyty (plasmocyty, prohemocyty, buňky vřeten. tvaru = spindle shape cell)



Příloha č. 7: Hemocyty



Příloha č. 8: Hemocyty II.

