

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



**Expresní profily vybraných genů cytochromů P450  
u včely medonosné (*Apis mellifera* L.)**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

|                |  |
|----------------|--|
| Autor:         | <b>Barbora Palůchová</b>               |
| Studijní obor: | Chemie pro vzdělávání – biologie       |
| Forma studia:  | Prezenční                              |
| Vedoucí práce: | <b>doc. RNDr. Ondřej Vladan, Ph.D.</b> |
| Rok:           | 2019                                   |
| Místo:         | Olomouc                                |

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

V Olomouci dne 3.5.2019

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala doc. RNDr. Vladanu Ondřejovi, Ph.D. za odborné vedení této práce, za jeho ochotu, rady, připomínky a čas, který do mne investoval. Ráda bych také poděkovala paní Mgr. Michaele Švécarové, Ph.D. za její čas a pomoc při práci v laboratoři i psaní této práce.

## Bibliografická identifikace

|                         |  |
|-------------------------|--|
| Jméno a příjmení autora | Barbora Palůchová  |
| Název práce             | Expresní profily vybraných genů cytochromů P450 u včely medonosné ( <i>Apis mellifera</i> L.)  |
| Typ práce               | bakalářská   |
| Pracoviště              | Katedra botaniky   |
| Vedoucí práce           | doc. RNDr. Ondřej Vladan, Ph.D.  |
| Rok obhajoby práce:     | 2019   |
| Abstrakt                | <p>Včela medonosná je považována za předního opylovače na Zemi. V posledních letech se vyskytují diskuze o vlivu chemikálií na život včel. S chemikáliemi přijde včela do styku jak ve volné přírodě, jelikož zemědělci používají mnoho druhů pesticidů na ochranu své úrody, tak i v samotném úlu, kde včelaři aplikují akaricidy proti kleštíkovi včelímu. V této práci byl vliv pesticidů a akaricidů sledován pomocí měření změn expresí vybraných cytochromů P450, konkrétně genů CYP4G11, CYP9Q1, CYP9Q2 a CYP9Q3. Pro měření změn bylo využíváno metody real-time PCR. Byl prokázán významný vliv tau-fluvalinátu a amitrazu na expresi vybraných genů a byla vyvinuta metoda pro monitorování vlivu pesticidů na včelu medonosnou.</p> |
| Klíčová slova           | <i>Apis mellifera</i> , včela medonosná, cytochrom P450, real-time PCR, amitraz, tau-fluvalinát, exprese genů  |
| Počet stran             | 70   |
| Počet příloh            | 1  |
| Jazyk                   | český  |

## Bibliographical identification

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| Autor's first name and surname | Barbora Palůchová   |
| Title                          | Expression profiles of selected cytochrome P450s genes in honey bee ( <i>Apis mellifera</i> L.)   |
| Type of thesis                 | bachelor  |
| Department                     | Department of botany  |
| Supervisor                     | doc. RNDr. Ondřej Vladan, Ph.D.   |
| The year of presentation       | 2019  |
| Abstract                       | <p><i>Apis mellifera</i> is considered the leading pollinator on Earth. In recent years, there has been discussion of the impact of chemicals on bee life. Chemicals come into contact with bees, as farmers use many types of pesticides to protect their crops, as well as in the beehive, where beekeepers apply acaricides against a bee parasite <i>varroa destructor</i>. In this work, the effect of pesticides and acaricides was monitored by measuring changes in expression of selected cytochromes P450, namely the CYP4G11, CYP9Q1, CYP9Q2 and CYP9Q3. To measure changes, real-time PCR method was used. Significant influence of tau-fluvalinate and amitraz on the expression of selected genes was demonstrated and a method for monitoring exposure effect to pesticides was developed.</p> |
| Keywords                       | <i>Apis mellifera</i> , honey bee, cytochrome P450, real-time PCR, amitraz, tau-fluvalinate, gene expression  |
| Number of pages                | 70  |
| Number of appendices           | 1   |
| Language                       | Czech   |

## OBSAH

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1.    | Úvod .....   | 1  |
| 2.    | Cíle práce .....   | 2  |
| 3.    | Současný stav řešené problematiky (Literární část) .....   | 3  |
| 3.1   | Včela medonosná .....  | 3  |
| 3.1.1 | Taxonomie .....  | 5  |
| 3.1.2 | Morfologie .....   | 5  |
| 3.2   | Hierarchie včelstva .....  | 9  |
| 3.2.1 | Matka .....  | 10 |
| 3.2.2 | Dělnice .....  | 10 |
| 3.2.3 | Trubci .....   | 11 |
| 3.3   | Včelí produkty .....   | 11 |
| 3.3.1 | Med .....  | 11 |
| 3.3.2 | Mateří kašička .....   | 15 |
| 3.3.3 | Propolis .....   | 17 |
| 3.4   | Cytochrom P450 .....   | 18 |
| 3.5   | Katalasa .....   | 20 |
| 3.6   | Ekologické faktory ovlivňující život a rozvoj včelstev .....   | 21 |
| 3.7   | Xenobiotika přicházející do styku se včelou medonosnou .....   | 22 |
| 3.7.1 | Amitraz .....  | 23 |
| 3.7.2 | Tau-fluvalinát .....   | 24 |
| 3.8   | Vypořádání včely medonosné s cizorodými látkami .....  | 25 |
| 4.    | Materiály a metody .....   | 31 |
| 4.1   | Lokality odběru včel .....   | 31 |
| 4.2   | Biologický materiál .....  | 33 |
| 4.3   | Vybavení laboratoře .....  | 33 |
| 4.4   | Seznam použitých chemikálií .....  | 34 |
| 4.5   | Seznam použitých Kitů .....  | 34 |
| 4.6   | Izolace RNA .....  | 34 |
| 4.7   | Tvorba směsných vzorků .....   | 34 |
| 4.8   | Přečištění RNA za pomoci DNasy .....   | 35 |
| 4.9   | Přepis RNA do cDNA .....   | 35 |
| 4.10  | Real-time PCR .....  | 35 |
| 4.11  | Elektroforetická separace .....  | 37 |
| 5.    | Výsledky .....   | 38 |
| 5.1   | Relativní exprese katalasy a cytochromů po vystavení amitrazu a tau-fluvalinátu v lokalitě Loučná nad Desnou ..... | 39 |
| 5.1.1 | Relativní exprese katalasy .....   | 39 |
| 5.1.2 | Relativní exprese genů <i>CYP4G11</i> , <i>CYP9Q1</i> , <i>CYP9Q2</i> , <i>CYP9Q3</i> .....                        | 40 |
| 5.1.3 | Relativní exprese cytochromů a katalasy v matce a trubci .....   | 47 |
| 5.2   | Relativní exprese katalasy a cytochromů v lokalitě Jívová a Šternberk .....  | 48 |
| 6.    | Diskuze .....  | 50 |
| 7.    | Didaktická část .....  | 52 |
| 8.    | Závěr .....  | 53 |
| 9.    | Seznam zkratk .....  | 54 |
| 10.   | Přílohy .....  | 55 |

|      |                                       |    |
|------|---------------------------------------|----|
| 10.1 | Pracovní list k didaktické části..... | 55 |
| 11.  | Literatura.....                       | 63 |

# 1. ÚVOD

Včela medonosná, latinsky *Apis mellifera*, je vedle mravenců nebo vos zástupcem sociálního hmyzu. Kromě toho, že nám poskytuje med a vosk, je zodpovědná za opylení hospodářských plodin a rozmnožování rostlin. Hmyzosnubnost, tedy opylení rostliny zástupcem hmyzu, může probíhat prostřednictvím motýlů, čmeláků nebo brouků. Opylovat mohou ale i ptáci jako je kolibřík či savci – např. netopýr. Nicméně skutečností zůstává, že včela je přední opylovač na celé Zemi. Jen ve Spojených státech se hodnota jejího přínosu do zemědělství poskytováním opylování více než 90 druhům plodin odhaduje na 14 miliard USD ročně, tedy zhruba 298 bilionů Kč [1]. Mimo jiné hraje včela medonosná také důležitou roli v zachování přirozeného koloběhu v přírodě.

Po celé Zemi se vyskytují hromadné úhyny včelstev z nejrůznějších důvodů. S touto skutečností se stále více diskutuje vliv různých běžně používaných chemikálií na včelu medonosnou. Chemikálie se používají zcela běžně v zemědělství pro lepší produkci. Chemické složky používají ale také samotní včelaři, a to sice k ochraně včelstev např. před kleštíkem včelím.

Práce se zabývá vlivem různých chemických látek, které budou diskutovány a ověřovány v této bakalářské práci. V literární části budou uvedeny současné poznatky jak obecně o včele medonosné, tak i o tom, jakým způsobem se včela vypořádává s xenobiotiky. Budou uvedeny některé potenciálně nebezpečné chemické látky a důraz bude kladen zejména na amitraz a tau-fluvalinát.

Získané poznatky o vlivu amitrazu a tau-fluvalinátu na včelu medonosnou pak budou ověřovány měřením změny expresí některých genů za pomoci metody real-time PCR, konkrétně geny katalasy a vybraných cytochromů P450. Bude také vyvinuta a zkoumána metoda pro monitoring vlivu pesticidů na včelu medonosnou.



## 2. CÍLE PRÁCE

- 1) Vypracování literární rešerše k zadanému tématu z dostupných vědeckých zdrojů.
- 2) Ozkoušení vědecké metody pro monitoring vlivu xenobiotik (amitrazu, tau-fluvalinátu, zemědělských pesticidů) na včelu medonosnou analýzou exprese vybraných genů cytochromů P450 metodou real-time PCR.
- 3) Ověření a diskutování vlivu xenobiotik na včelu medonosnou.
- 4) Zhotovení pracovního listu pro didaktické účely středních škol.

### 3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY (LITERÁRNÍ ČÁST)

#### 3.1 Včela medonosná

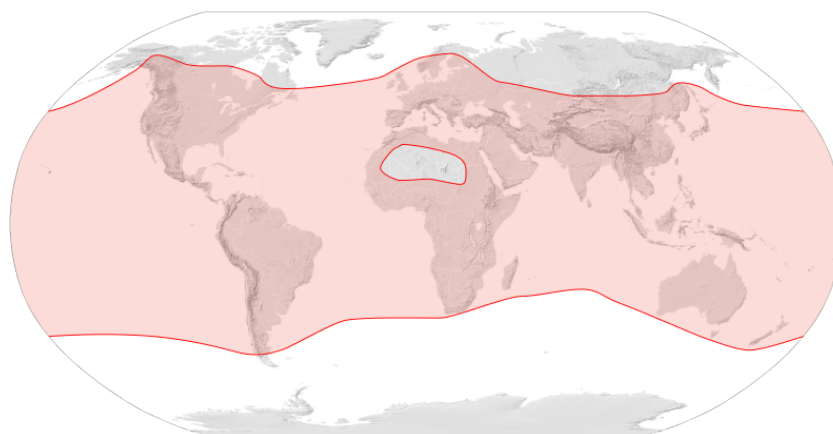
Včely jsou člověku známe již od pradávna. Poskytují med a vosk a jsou nejdůležitějším opylovačem. Jejich přítomnost je tedy přínosem nejen pro člověka, ale i pro celou řadu rostlin, které nazýváme hmyzosnubné. V mírném podnebném pásu, tedy v našem prostředí, je asi 80 % rostlin hmyzosnubných. Včely hrají důležitou roli v zachování přirozeného koloběhu v přírodě. Podílí se přímo i nepřímo na jedné třetině lidské výživy.



Obr. 1: Včela medonosná. Zdroj: <http://i.pinimg.com/originals/a2/a3/d3/a2a3d326709a42e560a91a843ef9d3f7.jpg>.

Včela medonosná (viz Obr. 1) patří do řádu blanokřídlých a řadíme ji mezi sociální hmyz vedle mravenců nebo vos. Pro její hospodářský význam se v našem prostředí jedná o neznámější druh včely. Zároveň jde o evolučně nejdokonalejší druh, neboť je nejlépe přizpůsobená k opylování. Původně se vyskytovala v oblasti Evropy, Afriky a Jihozápadní Asie. V 17. století však byla vlivem kolonizace rozšířena i do Ameriky, Austrálie a do celého Nového Světa [2]. Dnes se vyskytuje po celé zeměkouli

(viz Obr. 2) [3]. Ideální místo pro jejich výskyt, by mělo mít dostatek rostlin poskytujících nektar, vody, stínu a nejlépe proděravěných prostorů např. ve stromu sloužících jako úkryt [4].



Obr. 2: Rozšíření včely medonosné na Zemi. Zdroj: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/b4/Apis\\_mellifera\\_distribution\\_map.svg/2000px-Apis\\_mellifera\\_distribution\\_map.svg.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/b4/Apis_mellifera_distribution_map.svg/2000px-Apis_mellifera_distribution_map.svg.png)

Občas se včelstvo považuje za jakýsi superorganismus, tento pojem poprvé formuloval americký biolog William Morton Wheeler. Znamená to, že mnoho včel dohromady, tedy včelstvo, se chová jako zdánlivě vyvinutější organismus. Často se skloňuje podobnost včelstva se savci z hlediska evolučních vlastností [5]. Tyto analogie jsou především následující:

- Savci se vyznačují nízkou intenzitou rozmnožování jako včely.
- Samice savců vytvářejí mateřské mléko ve speciálních žlázách pro krmení potomků, samičky včel produkují tzv. sesterské mléko.
- Savci zajišťují vyvíjejícím se potomkům oddělené prostředí od vnějšího světa poskytováním ochrany v děloze matky. Včely podobně izolují své potomky v jakési sociální děloze včelího úlu.
- Co se týče termoregulace, tělesná teplota savců se pohybuje okolo 36 °C, včely udržují larvy ve zmíněné sociální děloze při teplotě 35 °C.
- Savci mají nejvyšší schopnost učit se novým věcem a rozvíjet kognitivní vlastnosti díky velkému mozku. Včely mají taktéž dobře vyvinuté vlohy k učení i kognitivním vlastnostem. Mnohdy jsou na vyšší úrovni než někteří obratlovci. Mezi bezobratlými živočichy se řadí k nejchytřejším tvorům.

### 3.1.1 Taxonomie

Latinské pojmenování *Apis mellifera* vzniklo v roce 1758 z podnětu Carla Linného, zakladatele moderní taxonomie. V některé literatuře se však lze setkat i s označením *Apis mellifica*, které také vyslovil Carl Linné. Pár let po původním označení, si totiž uvědomil nepřesnost, poněvadž včela sbírá nektar, nikoliv med. Proto původní označení pozměnil. *Apis mellifera* v doslovném překladu znamená včela med nosící, zatímco *Apis mellifica* včela med vyrábějící. Obě pojmenování jsou správně, do češtiny však překládáme pouze jako včela medonosná [3, 6].

Systematické zařazení včely medonosné je následující:

- Říše: živočichové (*Animalia*)
- Kmen: členovci (*Arthropoda*)
- Třída: hmyz (*Insecta*)
- Řád: blanokřídlí (*Hymenoptera*)
- Podřád: štíhlopasí (*Apocrita*)
- Čeleď: včelovití (*Apidae*)
- Rod: včela (*Apis*)
- Druh: medonosná (*Mellifera*)

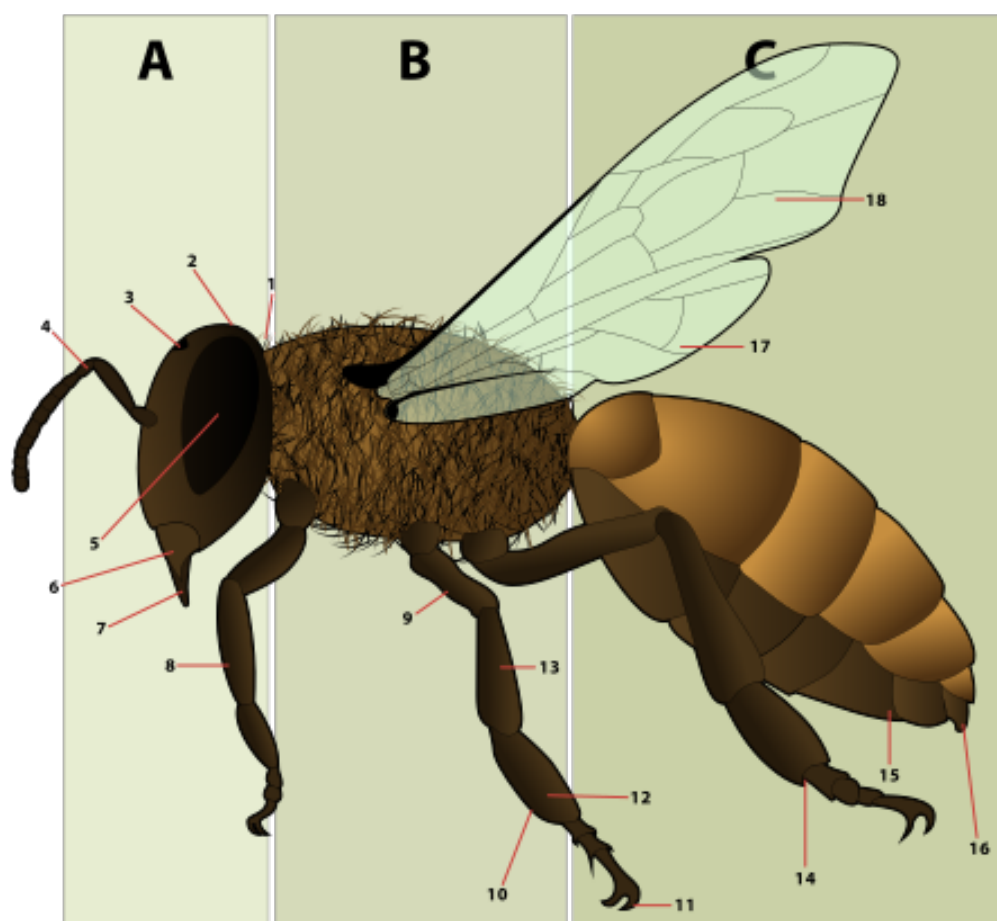
Kromě včely medonosné existují také další druhy, a to včela východní (*Apis cerana*), včela obrovská (*Apis dorsata*), včela skalní (*Apis laboriosa*) nebo včela květná (*Apis florea*).

### 3.1.2 Morfologie

Tělo včely je složeno ze tří částí, a to sice z hlavy, hrudi a zadečku (viz Obr. 3). Literatura se na popisu a charakteristice obecně shoduje [3, 6-9], neboť morfologie včely je již zcela prozkoumaná. Původně byla každá část článkovaná, nyní je však článkovaný pouze zadeček. Na povrchu těla je pevná kutikula tvořená převážně dusíkatým polysacharidem chitinem. Jedná se de facto o vnější kostru (*exoscelet*), kdy jsou na ni zevnitř upevněny svaly a uvnitř ukryty a právě kutikulou chráněny orgánové soustavy. Chitinový plášť je velmi pevný a umožňuje připevněnému svalstvu vyvíjet

značnou sílu. Důkazem je, že včela dokáže letět rychlostí až 18 m/s. Pro porovnání, moucha létá rychlostí zhruba 2 m/s [7].

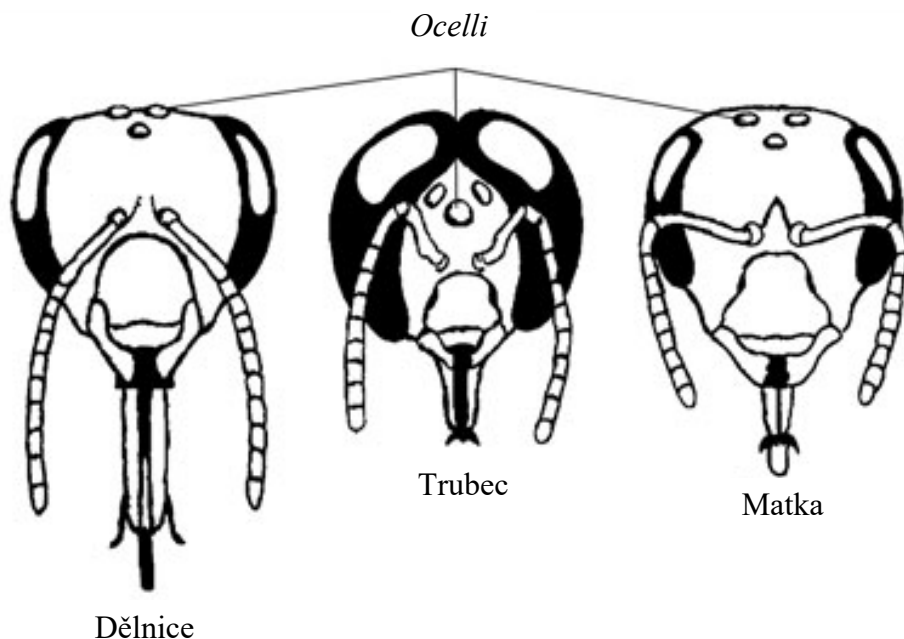
Jednotlivé články, zvané sklerity, jsou propojeny pružnou chitinovou blánou, tzv. intersegmentální membránou. Larva má těchto segmentů 13, dospělá dělnice nebo matka jen 11, protože 2 články jsou přeměněny na žihadlový aparát. Celé tělo je také pokryto chloupky, které mají funkci ochrannou pro důležité smyslové orgány, třeba oči. Ochlupení navíc umožňuje pro včelu snadnější čištění těla vykartáčováním pomocí nohou. Včelí tělo obsahuje průměrně 69,3 % vody. Živá včela váží v průměru 96,68 mg, vysušená 29,68 mg. Sušina obsahuje 13,8 % dusíkatých látek [7].



Obr. 3: Tělo včely medonosné. A – hlava, B – tělo, C - zadeček. Zdroj: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/4b/HoneyBeeAnatomy.svg/2000px-HoneyBeeAnatomy.svg.png>

## Hlava

Kompaktní jednolitá vnější kostra hlavy (*cranium*) je tvořena chitinem. Podle [8] váží hlava (*caput*) 8,34 až 9,85 mg. Deska hlavy je díky chitinu pevná a silná. Včele jsou umožněny snadné pohyby hlavou všemi směry. Vnitřní kostra (*tentorium*) slouží jako opora svalstva.



Obr. 4: Hlava jednotlivých kast včely medonosné. Vlevo dělnice, uprostřed trubec, napravo matka. Upraveno z: <https://i.pinimg.com/originals/f4/67/2c/f4672cd42d03fbce1154e12c831aba0f.jpg>

Po bocích temene (*vertex*) jsou 2 složené oči (*oculi compositi*). Složené oči jsou tvořeny mnoha stejně konstruovanými jehlancovitě do špice protáhlými útvary tzv. ommatidii. Na vrchu temene se nacházejí 3 jednoduché oči (*ocelli*). Buttel-Reepen [8] zjistil, že včely mají 4 až 9,5 tisíce ommatidií v jednom oku v závislosti na tom, zdali se jedná o matku, dělnici nebo trubce. Jednoduché a složené oči se pravděpodobně doplňují. Včela je schopná rozeznávat barvy [8], proto příroda obohatila květy nejrůznějšími barvami.

Asi uprostřed čela tyčí článkovitá ústrojí nazývaná tykadla (*antennae*). U dělnic a matek jsou tykadla tvořena 12 články, zatímco u trubců 13. Tykadla jsou centrem

mnoha smyslových orgánů, zejména těch čichových a hmatových, ale pravděpodobně se tam nalézají i sluchové buňky.

Na spodu hlavy jsou ústní orgány (*trophi*). Okolo nich jsou situovány kusadla a sosák. Kusadla slouží ke kousání a liší se tvarem dle kasty (viz Obr. 4). Jsou zde také umístěny chuťové [8] i čichové orgány. Sosák má nasávací a lízací funkci.

### *Hrud'*

Hrud' (*thorax*) je tvořena 3 embryonálními články – předohrudí (*prothorax*), středohrudí (*mesothorax*) a zadohrudí (*metathorax*). Stopkovité zúžení mezi hrudí a zadečkem tvoří bedra, která vznikla z prvního embryonálního článku zadečku. Téměř celý prostor hrudí je vyplněn svalovinou, která ovládá dva pohybové orgány umístěné právě na hrudí. Těmito orgány jsou křídla (*alae*) a nohy (*pedes*). Podle [8] váží hrud' 36,65 - 39,74 mg.

Nohou má včela 3 páry a slouží jí nejen k pohybu, ale i sběru nebo čištění. Na třetím páru nohou se nachází košíčky, do kterých včely sbírají pyl. Nohy dále nesou chemické a mechanické receptory.

Mimo nohou zajišťují pohyb 2 páry blanitých křídel. Přední křídla jsou větší než zadní, navzájem jsou propojena háčky. Jedná se vlastně o vychlípeniny pokožky. Neslouží pouze k lokomoci, ale také k provětrávání úlu. Jsou připojena na středohrud' a zadohrud'. Každé křídlo je vyztuženo žilkami. Křídly tedy prochází vzdušnice, nervy i hemolymfa. Pohyb křídel zajišťují létací svaly v hrudí. Včela je schopna mávnout křídly asi 190krát za sekundu [8]. Při zatížení včela nezvýší frekvenci mávání, ale úhel.

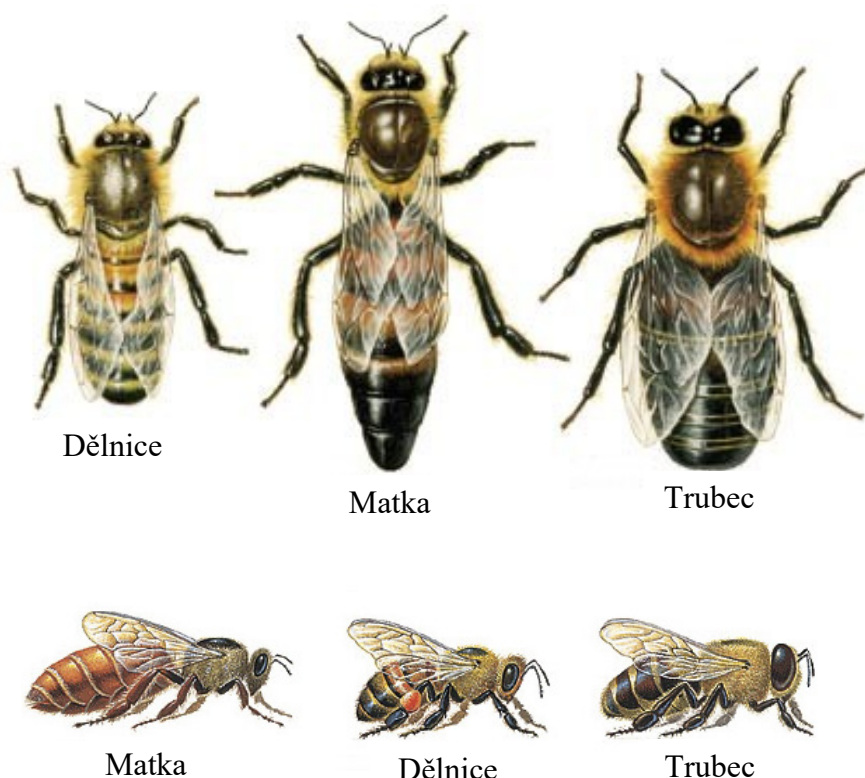
### *Zadeček*

Poslední částí včely je zadeček (*abdomen*). Ukývá v sobě zažívací orgány, medový váček, jedovou žlázu, vzdušné vaky, žihadlo, voskotvorné žlázy a vonnou žlázu. Žihadlo je napojené na jedovou žlázu a na konci je duté. Žihadlem může včela zaútočit a díky propojení s jedovou žlázou vnést do oběti jed. Na žihadle jsou háčky, kvůli nimž po útoku včela umírá, neboť tyto háčky způsobí odtrhnutí žihadla a jedové

žlázy od zadečku včely. Na žihadle se také vyskytují smyslové orgány pomáhající včele určit, kam má své žihadlo zapíchnout. Voskotvorné žlázy, stejně jako vonné (zvané také Nassanovy), mají pouze dělnice. Díky vonné žláze jsou včely schopny označit vlastní úl nebo zdroj nektaru. Každé včelstvo má svou typickou vůni. To výrazně napomáhá návratu dělnic ze sběru nebo matky ze snubního letu do úlu.

### 3.2 Hierarchie včelstva

Jak již bylo řečeno, včela je zástupce sociálního hmyzu. To vlastně znamená, že žádný člen včelstva nemá v silách přežít jako samostatný jedinec [3, 6]. Dalším znakem sociálního hmyzu je rozdělení jeho populace do určitých kast lišících se nejen vzhledem, ale především schopnostmi, úkoly a vlastně jejich účelem. U včel jsou známy tři kasty: matka, dělnice a trubec. Jednotlivé kasty jsou znázorněny na Obr. 5.



Obr. 5: Porovnání vzhledu jednotlivých kast včelstva. Upraveno z: [https://lh3.googleusercontent.com/proxy/StwxJZw8nQEUyX9dDDsPETXASiRhfyLWOqwslf fhgj6\\_S\\_pBsxJqrfAilbCJ-UPWkCrZBbcI0Ep86JPjLp9rgS1as9s2XHXrbYQ2CyloioP3-1asHuiBA=w1200-h630-p-k-no-nu](https://lh3.googleusercontent.com/proxy/StwxJZw8nQEUyX9dDDsPETXASiRhfyLWOqwslf fhgj6_S_pBsxJqrfAilbCJ-UPWkCrZBbcI0Ep86JPjLp9rgS1as9s2XHXrbYQ2CyloioP3-1asHuiBA=w1200-h630-p-k-no-nu)



### 3.2.1 Matka

Matka, někdy také nazývaná jako královna, je ve včelstvu většinou pouze jedna. Existují ale výjimečné situace, kdy v jeden moment koexistují matky dvě. Tyto situace zahrnují tzv. tichou výměnu, kdy ve včelstvu je jedna matka stará a jedna mladá, a rojení. Matka se dožívá věku 3 – 7 let [3, 6, 8, 10]. Pokud zemře nebo není schopna klást vajíčka, včelstvo si vychová královnu novou. Zpravidla není schopna se sama živit, musí ji živit dělnice výměšky hltanových žláz.

Hlava a hrud' jsou podobně velké, zadeček je protáhlý a na konci zašpičatělý. Pohlavní ústrojí se nachází v zadečku. Hlava má srdcovitý tvar. Na rozdíl od dělnic jí chybí voskotvorné a hltanové žlázy. Dokonalý vývoj matky probíhá ve speciálních podlouhlých buňkách, tzv. matečnicích, asi 15 – 16 dní [10], to je nejkratší larvální vývoj ze všech kast. Líhne se z oplozených vajíček stejně jako dělnice, avšak na rozdíl od dělnic, které jsou po prvních 3 dnech dále krmeny pylem a medem, jsou matky stále krmeny mateří kašičkou. Ihned po vylíhnutí zabije ostatní nevylihnuté matky svým žihadlem. Po 5 – 10 dnech od vylíhnutí se matka vydává na snubní let na trubčí shromaždiště, kde proběhne páření s několika trubci. Spermie si uloží do semenného vaku na celý život a dále se již nepáří.

Je to jediná plodná samice ve včelstvu a kladení vajíček je její jediný účel. Je schopná jich naklást 1 500 až 2 000 denně. Klade dva druhy vajíček. Z oplozených vajíček se líhnou matky a dělnice, zatímco z neoplozených trubci.

### 3.2.2 Dělnice

Dělnice jsou nejpočetnější kastou. V zimním období jich je ve včelstvu asi 20 000, zatímco v létě dokonce až 100 000 [10]. Dělnice je samička vylíhnutá z oplozeného vajíčka. V letních a jarních měsících žijí 4 – 5 týdnů, pokud se vylíhnou mimo snůškové období, žijí po dobu 6 – 8 měsíců.

Nohy jsou přizpůsobené k práci, dlouhý sosák zase k sání nektaru, medovice nebo vody. Hlava má trojúhelníkový tvar, zadeček je krátký. Mohou produkovat vosk voskotvornými žlázami a mateří kašičku hltanovými žlázami. Mají také vonnou žlázu, tzv. Nassanovu, pomocí níž vylučují feromon, kterým poté označují potravu a úl.

Pomocí tohoto feromonu jsou schopny rozeznat včely vlastního úlu od včel z úlu jiného. Do svého úlu pustí z cizího úlu pouze mladé dělnice nebo dělnice nasáté medem, ostatní vyženou či ubodají. Mají nedokonale vyvinuté pohlavní ústrojí a nemají semenný váček. Jsou tedy schopny klást vajíčka, ale pouze neoplozená. Může však nastat situace, kdy včelstvo osiřít, není si tedy schopno odchovat včelí matku a dojde ke vzájemnému krmení dělnic mateří kašičkou. Tím se u dělnic aktivují jejich vaječníky a stává se z ní tzv. trubčice. Trubčice se však nejsou schopny spářit s trubcem, kladou tedy neoplozená vajíčka, ze kterých se líhnou pouze trubci.

Jejich vývoj trvá 21 dní a strava je rozdílná než u matky. Létavka se z plodu dělnice stane až po 40 dnech. Po vylíhnutí totiž dělnice dělají několik činností, než se z nich stanou létavky. Nejprve čistí buňky, tehdy jsou to tzv. čističky. Později se z nich stanou krmičky, kdy krmí plody medem a pylem. Poté krmí larvy mateří kašičkou, v tomto stádiu to jsou tzv. kojičky. Následně staví plásty pomocí vosku, mluvíme o stavitelkách. A nakonec po stádiu strážkyně se z nich stávají létavky, jejichž úkolem je nosit vodu, pyl, medovici, propolis a nektar.

### **3.2.3 Trubci**

Trubec je pohlavní jedinec včelstva, jedná se o samce vylíhnutého z neoplozeného vajíčka. Žijí pouze v letních měsících (květen až červen) a v úlu jich jsou asi 2 - 3 tisíce. Mohou žít až 3 měsíce. Jejich vývoj trvá 24 dní. Na konci léta jsou dělnicemi vytlačeni na kraj úlu, kde vyhladoví a umřou.

Mají zavalité tělo, velké oči a mohutný široký zadeček. Hlava má kruhovitý tvar. Nemají žihadlo. Pohlavně dospívají 13. den po vylíhnutí, do té doby jsou krmeni dělnicemi. Jejich jediným úkolem je oplodnit matky. Po páření umírají.

## **3.3 Včelí produkty**

### **3.3.1 Med**

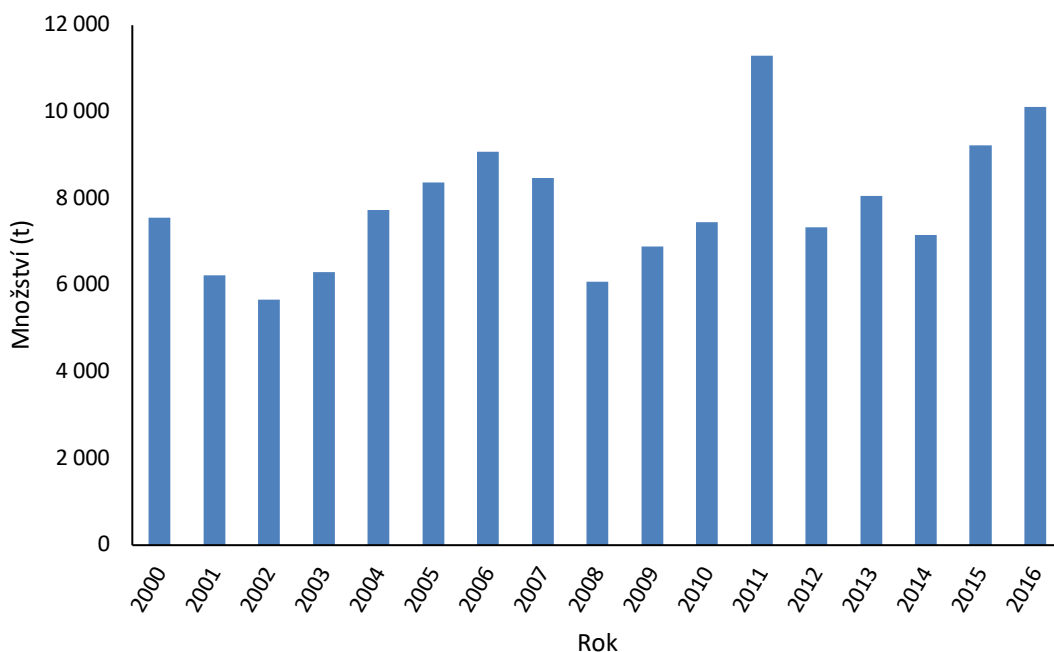
Med je hustá lepkavá kapalina vyráběná včelami ze sesbíraných a následně zahuštěných sladkých šťáv nektaru či medovice. V závislosti na květinách, ze kterých byl nektar sbírán, se liší barva i vůně. Podle Organizace pro výživu a zemědělství [11]

bylo v roce 2016 vyprodukováno 1 786 996 tun medu na celém světě. Mezi nejvýraznější producenty patří Čína, USA, Turecko, Rusko nebo Ukrajina. Jejich produkce je uvedena v

Tab. 1. Produkce v České republice za rok 2016 byla 10 113 tun a v posledních dvou dekádách kolísá mezi 6 a 10 tisíci tun za rok (viz Obr. 6).

Tab. 1: Vyrobené množství medu nejvýznamnějších producentů v roce 2016 [11].

| <b>Země</b> | <b>Množství (t)</b> |
|-------------|---------------------|
| Rusko       | 69 764              |
| Turecko     | 105 532             |
| Ukrajina    | 59 294              |
| USA         | 73 428              |
| Čína        | 502 614             |



Obr. 6: Graf znázorňující množství vyprodukovaného medu v České republice od roku 2000 [11].

Med se člověkem používá za různými účely již od pradávna. První zmínky se datují do roku 3 000 let před naším letopočtem [12]. Jeho hlavní využití je jako potravina nebo doplněk potravy. Může za to jeho sladká chuť. Používá se do čajů, jako přísada na pečení, jako sladidlo a mnoho dalšího. Medem se neživí pouze člověk, ale také např. medvěd nebo šimpanz. Důvodem, proč jej včely vyrábí je však skutečnost, že

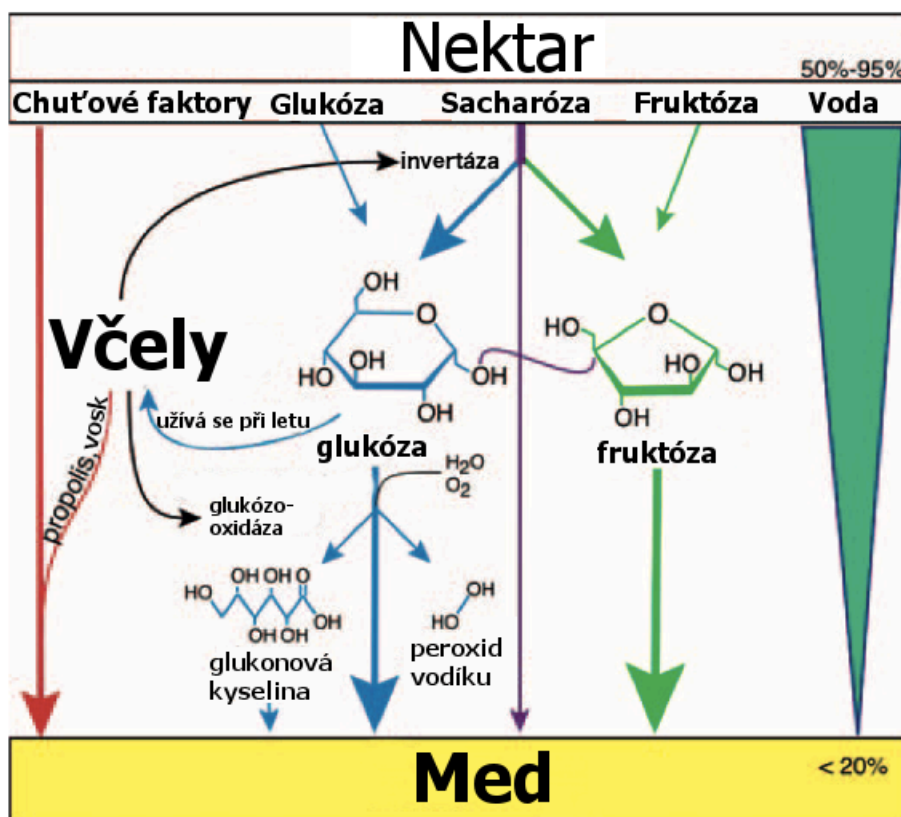
je to hlavně jejich potrava a hlavní zdroj energie. Z medu lze vyrobit také alkoholické nápoje, jako např. medovina. Med z některých rostlin, např. z rododendronu, může být toxický. Je využíván i v kosmetickém průmyslu jako součást mýdel, šamponů, krémů, kondicionérů apod.

Složení medu je různé v závislosti na počasí [12] a lokalitě, respektive nektaru květů, z nichž včely sbírají. Med je směs cukrů, vody a dalších složek. Fruktosa a glukosa tvoří hlavní podíl medu (70 – 80 %), sacharosa tvoří další část složení (2 - 10 %). Dalšími látkami jsou voda (asi 18 %), dextrin, proteiny, vosk, prach, minerály, kyseliny, vitamíny (B1, B2, C), nikotinová kyselina, kyselina mravenčí, laktony, dusík, polyfenoly, aminokyseliny a další [12, 13]. Med někdy krystalizuje (nebo také granuluje) při teplotě mezi 10 a 18 °C [14]. Látka za to zodpovědná je glukosa monohydrát. Med je rozpustný ve vodě a hygroskopický, vodu ze vzduchu může absorbovat při relativní vlhkosti vzduchu nad 60 %. *pH* medu je 3,2 – 4,5; tedy kyselé.

Za jeho častým užíváním nejen dnes, ale vlastně už od počátků lidstva, stojí jeho léčebné účinky. Už Pythagoras, jenž žil okolo roku 530 před Kristem, hojně užíval med s domněnkou, že mu prodlouží život [12]. Přisuzují se mu antibakteriální a antiseptické účinky. Za antibakteriálním účinkem stojí zejména nízká aktivita vody medu. Důsledkem toho je, že bakterie ani kvasinky nejsou schopny v medu růst a množit se. Dalším důvodem, proč bakterie v medu nepřežijí, je vysoká koncentrace sacharidů, což způsobuje osmosu. Z těchto příčin se med prakticky nekazí. Proti *E. coli* a *S. aerus* působí velice účinně, zatímco proti *S. pyogenes* nebo *S. typhimurium* je účinek slabší [13]. Zároveň se antibakteriální účinek snižuje s časem skladování [15]. Rizikem je *C. botulinum*, jejíž spory mohou v medu přežít a šířit botulotoxin, to je riziko hlavně pro kojence [13]. Za antiseptické účinky je zodpovědný peroxid vodíku, který vzniká chemickou reakcí:  $\text{glukosa} + \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \rightarrow \text{kys. glukonová} + \text{H}_2\text{O}_2$ . Tuto reakci katalyzuje enzym glukosa oxidasa, kterou produkují právě včely. Díky antiseptickému účinku se med používá na obvazy, na rány nebo popáleniny nejen v čínské či indické tradiční medicíně [12, 13]. Polyfenoly v medu obsažené jsou antioxidanty. Dalším pozitivním účinkem je zvyšování populace probiotických bakterií ve střevech,

což zvyšuje obranyschopnost, zlepšuje trávení, snižuje cholesterol nebo působí proti rakovině tlustého střeva [13]. Spekulace o protialergickému účinku se zatím neprokázaly.

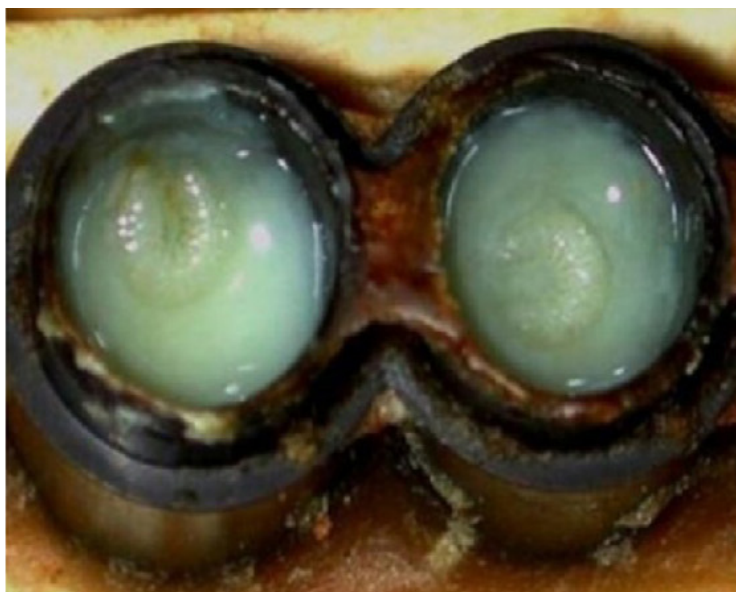
Chemických dějů stojících za přeměnou nektaru na med je několik. První reakci katalyzuje enzym produkovaný hypofaryngeálními žlázami invertasa, která rozděljuje disacharid sacharosu z nektaru na dva monosacharidy glukosu a fruktosu. Díky této reakci je med vlastně pro člověka sladší, neboť lidské chuťové buňky vnímají fruktózu mnohem sladčeji než sacharózu. Po této fázi není med příliš koncentrovaný a za jeho schopností odolávat mikrobům stojí již zmíněný glukózo-oxidázový systém, kdy enzym glukóza oxidáza přeměňuje glukózu na glukonovou kyselinu a peroxid vodíku. Peroxid vodíku je však zároveň velice těkavý a většina ho rychle vyprchá. Tato reakce se může ale lehce opakovat po zředění medu vodou. Celý tento biochemický proces je znázorněn na Obr. 7.



Obr. 7: Schéma znázorňující chemické reakce stojící za přeměnou nektaru v med [12].

### 3.3.2 Mateří kašička

Dalším výrobkem včel je mateří kašička (viz Obr. 8). Jedná se o produkt hltanových žláz mladých dělnic, které právě mateří kašičkou krmí larvy. Larvy dělnic a trubců jsou mateří kašičkou krmeny pouze první 3 dny, zatímco matka po celou dobu jejího života [6, 10, 13]. Právě potrava v podobě mateří kašičky je příčinou jiné morfologie i fyziologických schopností matky. Mateří kašička je hustá bílá až lehce nažloutlá výživná substance s fenolovým zápachem.

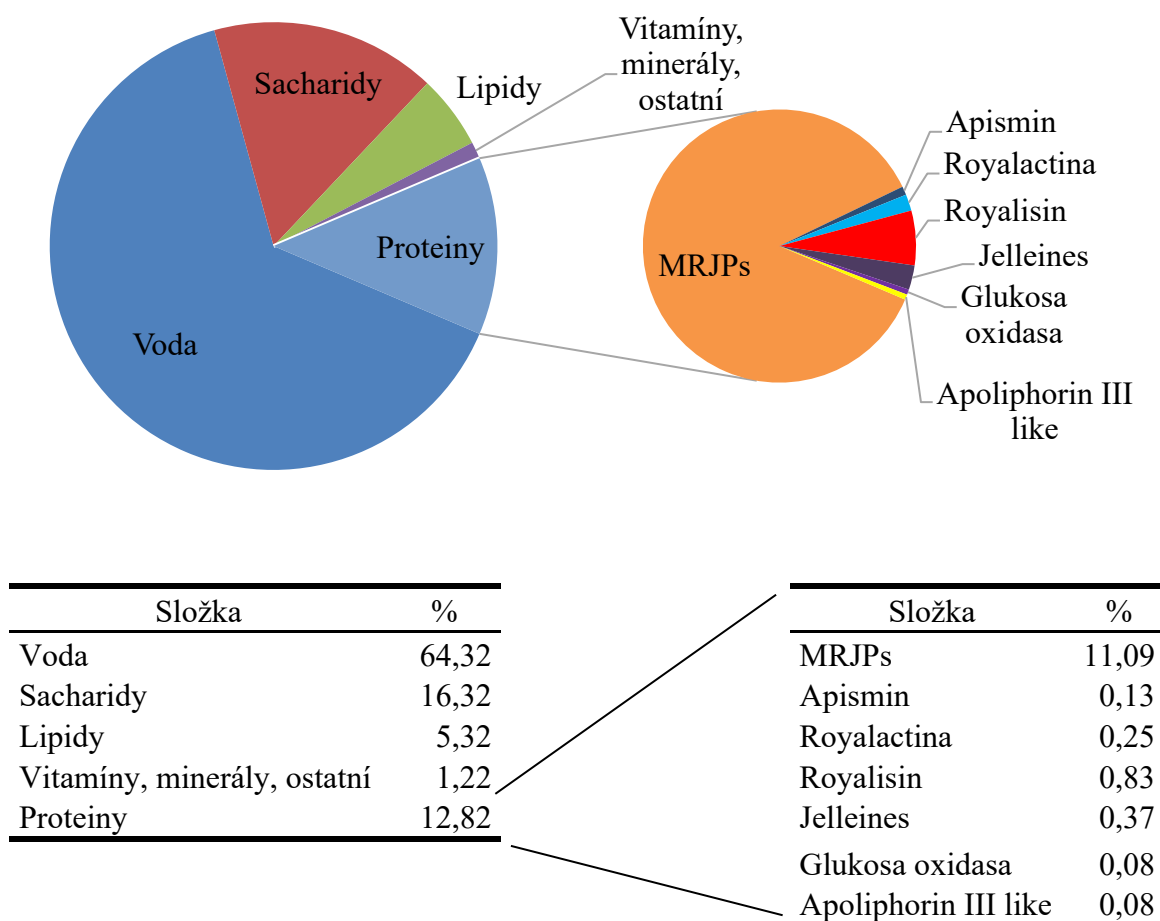


Obr. 8: Larvy matek v mateří kašičce [16].

Fratini [16] uvádí, že její využívání člověkem sahá až do dob starověku. Již Aristoteles se zmiňoval o mateří kašičce, když studoval její vliv na včelí matku, a hojně ji užíval jako potravinu nejen pro sebe, ale i pro své žáky. Mateří kašičku používala ve své kosmetice i Kleopatra. Stejně tak si jejich účinků cenili faraonové nebo staré čínské dynastie.

Mateří kašička obsahuje hlavně vodu a bílkovinné složky, proto se jedná o dobrou potravu pro včely. Složení se může měnit s klimatickými změnami [16]. Kromě vody a bílkovin je složena ještě ze sacharidů, lipidů, minerálních látek, vitamínů (nejvíce B5, B6, C), hormonů atd. Za hlavní látku zodpovědnou za mimořádné léčivé ale i jiné účinky je považována kyselina 10-hydroxy-*trans*-2-decenová (10-HDA) [13]. Je to jednoduchá nenasycená mastná kyselina, která ovlivňuje diferenciaci kmenových

buněk [17], má estrogení aktivitu [18] a jedná se o potenciální antidepresivum [19]. Její *pH* je 3,6 – 4,2 [16]. Hlavní skupinou proteinů jsou MRJPs (Major Royal Jelly Proteins), bližší informace o složení jsou na Obr. 9.



Obr. 9: Průměrné složení mateří kašičky [16].

Dodnes se mateří kašička užívá v tradičních medicínách zejména v Asii, ale také v kosmetice, farmacii nebo jako doplněk stravy. Přisuzují se jí totiž léčivé schopnosti posilující imunitu, působící proti astmatu či jaterním nemocím. Její omlazující účinky však dodnes nebyly prokázány [20]. Co však bylo často studováno a dobře dokázáno, je antibakteriální účinek mateří kašičky [16, 21]. Efektivní je účinek hlavně proti grampozitivním bakteriím, proti gramnegativním bakteriím je účinek slabší. Za antibakteriální účinek jsou zodpovědné peptidy a proteiny Royalisin, Jelleines a také glukosa oxidasa. Mateří kašička je dokonce účinná i proti resistantním bakteriím, jako je např. MRSA (methilicin resistantní *S. Aureus*) [16].

### 3.3.3 Propolis

Propolis (viz Obr. 10), někdy také zvaný smoluňka nebo včelí tmel, je pryskyřičná látka aromatického zápachu. Je to produkt včel vzniklý smícháním nasbírané hmoty z pryskyřičných rostlin a výměšků hlavových žláz včel. Propolis v řečtině znamená pro ochranu města [22, 23] a přesně pro takový účel jej používají i včely. V úlu totiž zastává roli stavebního a ochranného materiálu, včely ním vystylají buňky plástů, zadělávají díry, *de facto* funguje jako jakési včelí lepidlo. Včely ním mohou také pokrýt těla vetřelců, která nejsou schopna z úlu vynést (např. myš nebo rejsek), čímž zabrání jejich rozkladu [22]. Barva může být zelenožlutá, hnědá se zabarvením do červena, až temně hnědá, záleží na složení a stáří. Při úlové teplotě je propolis měkký a tvárný. Bod tání má v rozmezí 70 – 100 °C. Ve vodě je špatně rozpustný, lépe rozpustný v chloroformu a etheru a velice dobře rozpustný v ethanolu a glycerinu. Je hustější než voda.



Obr. 10: Ztvrdlý propolis. Zdroj: [http://mountpelion.gr/wp-content/uploads/bfi\\_thumb/propolnncpnm2s3t3pabv74gxuy6b23awinq6uor1kgaa82nk.png](http://mountpelion.gr/wp-content/uploads/bfi_thumb/propolnncpnm2s3t3pabv74gxuy6b23awinq6uor1kgaa82nk.png)

Jeho složení je různé v závislosti na rostlinstvu a klimatických podmínkách [23]. Proto je poměrně problematický pro farmaceutické užívání z důvodu standardizace. Biologická aktivita se však se složením nemění [22]. Z většiny je složen z pryskyřičných látek (50 %) a vosku (30 %). Dále obsahuje balzámy a etherické oleje (< 10 %), pyl (5 %) vitaminy hlavně skupiny B (1 ppm), fenolové sloučeniny (flavonoidy, aromatické kyseliny, benzopyrany) a di- a triterpeny [22, 23].

Hojně se využívá pro jeho léčivé účinky v podobě tinktury (směs nadrobeného propolisu a ethanolu) nebo masti (směs propolisu s lékařskou vazelínou nebo sádlem).

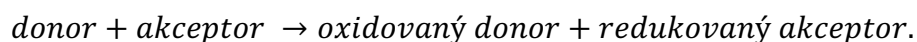


Propolis však není žádným novým objevem, jeho objev se datuje až k roku 300 před Kristem, užívali jej již staří Egypťané, Řekové a Římané [22]. Mezi jeho léčivé účinky patří antimikrobiální, protizánětlivá nebo antioxidační aktivita a posilování imunity. Působí také protinádorově, mechanismus toho účinku však zatím nebyl dostatečně vyjasněn [22]. Další nemoci, na které pomáhá, je cukrovka nebo srdeční choroby [23]. V kožním lékařství se používá na houbové onemocnění a ve stomatologii zase jako povrchové anestetikum [22]. Díky jeho biologické aktivitě je úl dobře chráněn proti nemocím. Propolis může způsobovat alergie. Občas je analyzován jakožto indikátor životního prostředí, např. pro zjištění radioaktivních prvků v okolí [22].

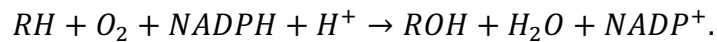
### 3.4 Cytochrom P450

Enzymy jsou katalyzátory bílkovinné povahy. Jejich úkolem je ovlivňovat aktivační energii reakcí, přičemž do reakce vstupují i z ní vystupují nezměněné. Pokud se vlivem katalytické aktivity sníží aktivační energie, reakce proběhne rychleji, pokud se aktivační energie zvýší, reakce naopak proběhne pomaleji. Enzymy však neovlivňují směr reakce.

Cytochrom P450 (označovaný jako CYP) je enzym patřící do 1. enzymové třídy - oxidoreduktas. Strukturu cytochromu P450 včely medonosné, konkrétně vycházející z genu CYP6AS5, lze vidět na Obr. 11. Oxidoreduktasy katalyzují intermolekulární oxidačně-redukční reakce [24]. Podskupinou této třídy jsou oxygenasy, které využívají jako oxidační činidlo molekulový kyslík, monooxygenasy potom do substrátu začleňují pouze jeden atom kyslíku. Cytochrom P450 je monooxygenasa z rodiny cytochromů. Je jich známo přes 50 tisíc druhů. Cytochromy P450 byly objeveny v celé živočišné říši. Obecná rovnice katalyzovaná oxidoreduktasou vypadá následovně, kdy donor je redukční činidlo a akceptor oxidační činidlo:

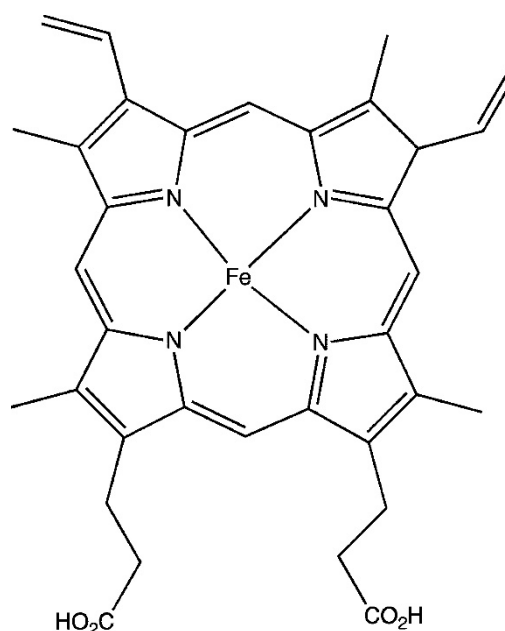


Nejobvyklejší reakcí katalyzovanou cytochromem P450 je vsunutí atomu kyslíku do alifatické pozice organického substrátu (RH), zatímco druhý atom kyslíku je redukován za vzniku vody, kdy jako zdroj elektronů zde působí kofaktor NADPH zprostředkovaný pomocí cytochrom P450 reduktasy:



Obr. 11: Struktura cytochromu P450 včely medonosné. Nalezeno podle genu CYP6AS5 na UniProtu [25]. Model vypočítán společností ModBase.

Cytochromy byly původně nalezeny jako buněčné pigmenty, odtud pochází také jejich název. Jsou lokalizovány na membránách a obsahují hemové skupiny, jejichž prostřednictvím se přenáší elektrony. Hem, struktura je vyobrazená na Obr. 12, je prostetická skupina obsahující tetrapyrrolové jádro, v jehož středu je navázán atom železa. Atom železa jakožto centrální atom má koordinační číslo 6. Tyto molekuly jsou nazývány taktéž porfyriny. Atom železa se střídavě redukuje a oxiduje z  $Fe^{2+}$  na  $Fe^{3+}$  a naopak. Právě tímto způsobem se přenáší elektrony. Redukovaná forma cytochromů v komplexu s oxidem uhelnatým vykazuje silné absorpční maximum v UV-VIS spektru při vlnové délce 450 nm, jedná se o tzv. Soretův pík, proto P450 v názvu.

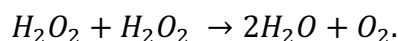


Obr. 12: Struktura hemu. Vzato z [26], vytvořeno v ChemDraw [27].

Cytochromy se účastní metabolismu některých endogenních metabolitů (rodiny 4 - 51), ale hlavně většiny xenobiotik (rodiny 1, 2 a 3). Pomocí oxidace přeměňují lipofilní xenobiotika na hydrofilní, čímž se mění jejich rozpustnost. Účastní se tedy rozkládání cizorodých látek, jako jsou např. pesticidy.

### 3.5 Katalasa

Katalasa je enzym řadící se do první enzymové třídy oxidoreduktas. Zkráceně se označuje jako Cat. Tento enzym se vyskytuje téměř ve všech aerobně respirujících organismech. Peroxid vodíku je škodlivý meziproduct mnoha běžných metabolických procesů a je potřeba jej rychle přeměnit na jinou méně škodlivou látku. Právě k ochraně buněk před toxickými vlivy peroxidu vodíky slouží katalasa tím, že katalyzuje disproportionaci peroxidu vodíku na vodu a kyslík:



Katalytická činnost katalasy je mimořádná. Uvádí se, že jedna molekula enzymu může za minutu přeměnit 5 milionů molekul peroxidu vodíku [24]. Struktura katalasy včely medonosné je znázorněna na Obr. 13.



Obr. 13: Struktura katalasy včely medonosné. Nalezeno na UniProtu [25], model vypočítán společností ModBase.

### 3.6 Ekologické faktory ovlivňující život a rozvoj včelstev

V posledních letech se objevují náhlé úhyny včelstev. Tento jev byl očividný zejména v USA, kde se mu začala také věnovat poměrně velká pozornost. Syndrom velkých ztrát v populacích včel byl pojmenován jako Colony Collapse Disorder (CCD) [28]. Za touto negativní skutečností může stát několik vlivů. Včely musí čelit stále obtížnějším podmínkám. Plásty včelstev trpících CCD jsou ukázány na Obr. 14.



Obr. 14: Plásty s nedostatečným pokrytím buněk dokazujícím náhlý úhyn včel [28].

Mezi tyto podmínky můžeme řadit rozrůstající se urbanisaci, kdy včelám je bráno jejich přirozené a hostinné prostředí. Výstavba dopravních sítí má stejný efekt, a navíc mnoho včel zahyne srážkami s auty, obzvláště pak tehdy, když se u cest budují okrasné plochy s květináči. Klimatické změny samozřejmě včelám taktéž neprospívají stejně jako soutěžení divokých včel s těmi domácími. Negativní vliv může mít také

dopravní stres způsobený transportem včel. Včely jsou při převozu vystavovány vysokým teplotám, častým vibracím nebo vysokým koncentracím CO<sub>2</sub> [29]. To vše může napomoci virálním či bakteriálním onemocněním.

Právě mikrobiální nebezpečí je další nezanedbatelnou položkou, která ovlivňuje zdraví včel [29]. Mnoho parazitů je šířeno nechtěně člověkem. Mezi hlavní parazity a patogeny působící na včely patří [30]:

- Prvoci: *Crithidia mellificae*, *Malpighamoeba mellificae*,
- Bakterie: *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius*, *Spiroplasma apis*, *Spiroplasma melliferum*,
- Viry: *Iflaviridae*, *Dicistroviridae*, Deformed Wing Virus (DWV),
- Houby: *Nosema ceranae*,
- Roztoči: *Varroa destructor*.

Dalším problémem je snížená hojnost, a hlavně různorodost květin [29]. Na zemědělci osetých polích roste pouze jeden druh rostliny, jelikož je to pro farmáře příznivé. Ti se snaží vyhubit plevel a mít tak pole pouze s jedinou rostlinou. Potrava včel je poté příliš monotónní, což pro ně není dobré. Navíc, pokud se takto pěstuje plodina, která má v sobě obsažené přirozené toxiny jako např. mandloně (obsahují toxin glykosid amygdalin), včely této látky spotřebovávají více než by bylo vhodné a může se to pak projevit na jejich zdraví.

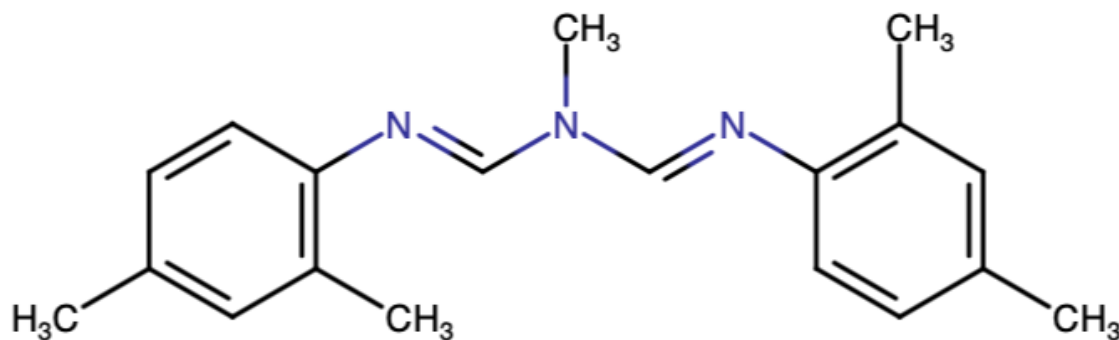
### **3.7 Xenobiotika přicházející do styku se včelou medonosnou**

Se zemědělským vlivem souvisí i asi nejkontroverznější složka negativních efektů na včelstva, a to sice používání pesticidů, herbicidů a jiných agrochemikálií. Jak již bylo řečeno, herbicidy jsou zodpovědné za monokulturní prostředí, které je pro farmáře příznivé, avšak pro včely se stává nehostinným z toho důvodu, že množství květin, které by mohly být potenciálně opylovány, je zredukováno. Ve včelách bylo nalezeno více než 150 pesticidních residuí [29]. Předpokládá se, že nejrizikovější chemikálie pro včely jsou neonicotinoidy thiamethoxam, imidacloprid a clothianidin a organofosfáty phosmet a chlorpyrifos [29].

Důležité je uvědomit si, že tyto vlivy nepřichází izolovaně, působí všechny dohromady. Expozice pesticidům může například narušit detoxifikační mechanismy a celkovou obranyschopnost, čímž jsou pak včely náchylnější k parazitům. Příkladem může být fungicid EBI (ergosterol biosynthesis inhibitor), který nemá významný toxický vliv, ale zvyšuje toxicitu neonicotinoidů, a to až 1 000krát [29].

### 3.7.1 Amitraz

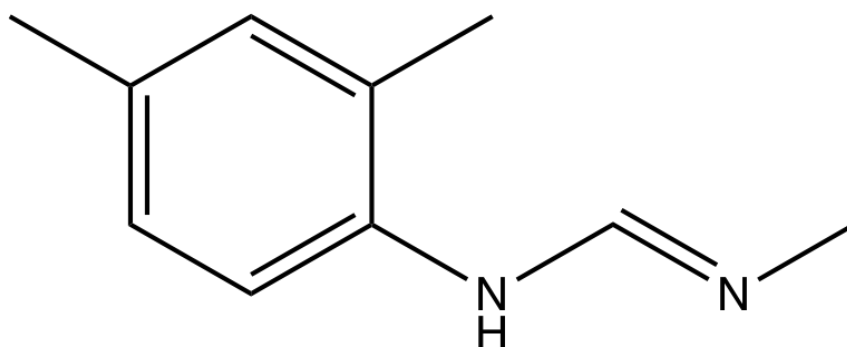
Parasitem, proti kterému včelaři chrání své roje, je kleštík včelí, latinsky *Varroa destructor*. Preventivní opatření proti varroóze, jak se jmenuje onemocnění způsobené kleštíkem, je dáno legislativně a je tedy povinné pro všechny včelaře vyjma biovčelařů, kteří však musí mít patřičné povolení pro léčbu kyselinou mravenčí. Varroáza oslabuje včelí organismus, což může vést až k úmrtí celého včelstva. *Apis mellifera* má proti tomuto roztoči malou resistenci. Kromě již zmíněného oslabení imunitního systému a vlastně celého organismu, působí kleštík jako vektor pro patogeny, např. DWV (Deformed Wings Virus). Ve výsledku tedy roztoč způsobuje dvojnásobnou škodu, sám oslabuje imunitu, a navíc napomáhá šíření dalších patogenů, které pak mají další negativní vlivy. Jednou z látek, která se používá proti tomuto parazitovi je amitraz, dalšími látkami jsou coumaphos, tau-fluvalinát nebo flumethrin.



Obr. 15: Struktura amitrazu. Převzato z [26].

Amitraz (viz Obr. 15), sumárně C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>, nomenklaturně správně 1,5-di-(2,4-dimethylphenyl)-3-methyl-1,3,5-triaza-penta-1,4-dien, akaricid, tedy insekticid určený výhradně k hubení roztočů. Poprvé byl syntetisován v Anglii v roce 1969. Jeho molární hmotnost je 293,412 g·mol<sup>-1</sup> [26]. Bod tání je 81 – 82 °C [31]. Hustota při teplotě 20,85 °C je 1,131 g·cm<sup>-3</sup> [31]. Amitraz je nerozpustný ve vodě.

Tato látka má mnoho vlastností, působí antiparasiticky, akaricidně [32] nebo také toxicky [33, 34]. Nebylo u něj prokázáno, že by se podílel na snížení imunity nebo že by se v jeho přítomnosti zvyšovalo množství patogenů [35]. Na rozdíl od jiných akaricidů však amitraz nezůstává v prostředí úlu, neboť se poměrně rychle metabolisuje na jiné látky. Jeho metabolit N-(2,4-dimethylphenyl)-N'-methylformamidin (DPMF, viz Obr. 16) se však akumuluje ve vosku a včelách samotných [35]. Zároveň má DPMF stejné vlivy jako amitraz. Amitraz i DPMF mají na včely negativní vlivy. Po vystavení organismů těmto látkám byla zaznamenána zrychlená srdeční frekvence a celkově významná vyšší úmrtnost [35]. Že je třeba hledět na všechny vlivy zároveň, nikoliv pouze na jeden, platí i zde. Prokázalo se totiž, že včely nakažené virem a zároveň vystavené amitrazu nebo DPMF vykazovaly vyšší mortalitu než včely, které s těmito látkami do styku nepřišly [35].



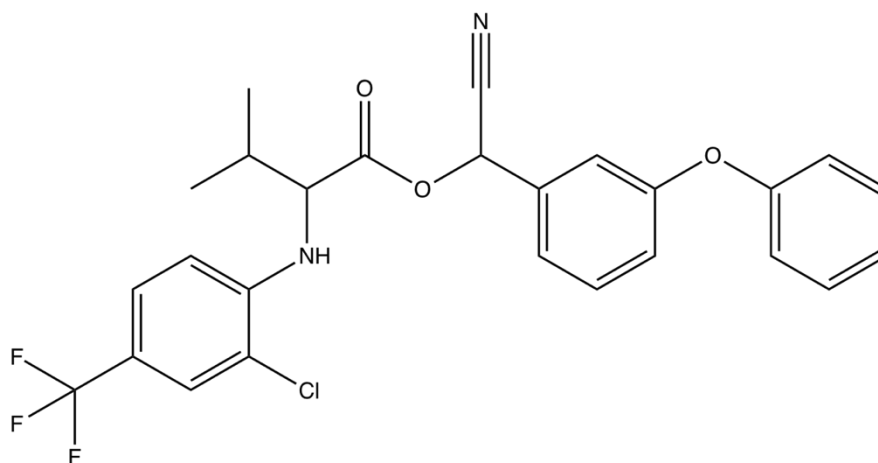
Obr. 16: Struktura N-(2,4-dimethylphenyl)-N'-methylformamidinu (DPMF). Vytvořeno v ChemDraw [27].

### 3.7.2 Tau-fluvalinát

Další akaricidní látkou užívanou v boji proti kleštíkovi je tau-fluvalinát (Obr. 17). Sumární vzorec této látky je  $C_{26}H_{22}ClF_3N_2O_3$  a molární hmotnost je  $502,913 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  [26]. Jedná se o toxickou [36], antiparasitickou [37], viskózní a netěkavou látku, jejíž bod tání je více než  $450 \text{ }^\circ\text{C}$  [38]. Je rozpustná pouze v organických rozpouštědlech. Používá se ve směsi isomerů [39]. Z hlediska toxicity je jeho efekt menší než u amitrazu [40].

Lipofilní charakter má za následek snadné ukládání do vosku [41], kde může zůstat po dlouhé roky a po opětovném použití tau-fluvalinátu může dojít k nárůstu této

koncentrace [39]. Problémem v poslední době je skutečnost, že kleštík si vybuďoval na tau-fluvalinát resistenci [39, 42]. Mutace zodpovědné za tuto resistenci se dokonce vyskytovaly i u 45 % populace kleštíků, kteří s látkou nepřišli vůbec do styku [42]. Tau-fluvalinát navíc může reagovat s dalšími akaricidy nebo fungicidy a zvyšovat jejich toxicitu, proto se nedoporučuje léčit zároveň více látkami, které jsou detoxifikovány cytochromy P450, tj. tau-fluvalinát v kombinaci s coumaphosem či fenpyroximátem [39]. Včely jsou však pravděpodobně na tau-fluvalinát (resp. na všechny pyrethroidy) adaptované, jelikož rostliny, které včely opylovávají, vytvářejí přirozeně strukturně podobné pyrethriny [43].



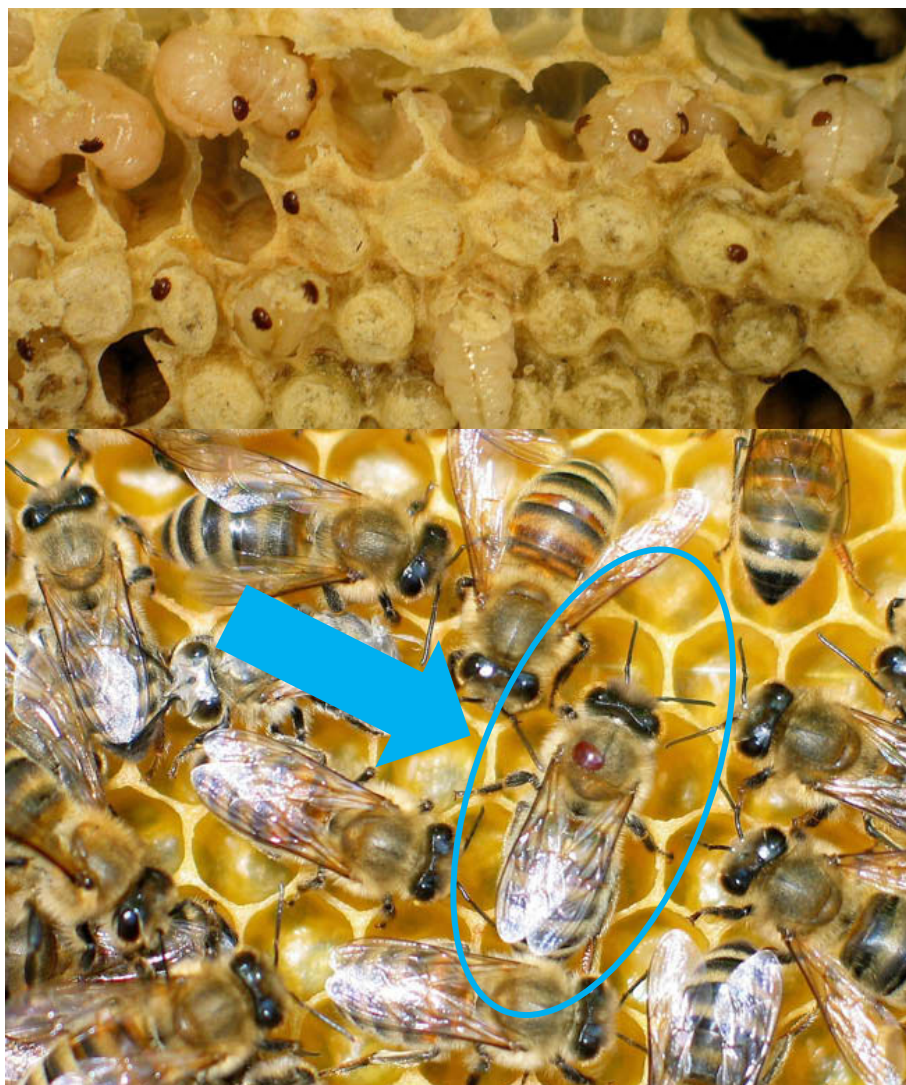
Obr. 17: Struktura tau-fluvalinátu. Vytvořeno v ChemDraw [27].

### 3.8 Vypořádání včely medonosné s cizorodými látkami

Včela během svého života přijde do styku s mnoha cizorodými látkami. Může se jednat o pesticidy užívané zemědělci na polích, jako jsou neonikotinoidy, syntetické akaricidy užívané proti včelímu škůdci *Varroa destructor* nebo fytochemikálie. Kleštík včelí napadající včelu medonosnou je na Obr. 18. Fytochemikálie jsou bioaktivní látky přirozeně se vyskytující v rostlinách. Jsou barevné, proto se o nich někdy hovoří jako o barevných pigmentech rostlin a slouží pro ochranu rostlin. Jejich účinek je pro člověka obvykle příznivý, podobný vliv má i na včely. Udává se, že v jednom kuse ovoce se jich vyskytují desítky až stovky. Bylo jich doposud identifikováno na 12 tisíc. Nacházejí v nektaru, medu, propolisu a pylu [44, 45]. Včely se dále musejí potýkat s mykotoxiny



produkovanými houbami *Aspergillus*, které napadají včelí úly, hlavně pyl a med, neboť se jedná o pro ně ideální prostředí [46, 47].



Obr. 18: Larvy včely medonosné napadené kleštíkem včelím (nahore). Dospělé včely napadené kleštíkem včelím (dole). Převzato z [48].

Jako většina hmyzu i včely při metabolismu xenobiotik a pesticidů spoléhají na sadu detoxifikačních enzymů. Hlavními detoxifikačními enzymy jsou cytochromy P450 monooxygenasy [49]. Přestože jsou cytochromy P450 důležité pro toleranci a odolnost vůči xenobiotikům u mnoha jiných druhů hmyzu [50], genom včely medonosné kóduje 46 cytochromů P450, což je mnohem méně než u ostatních hmyzích genomů [51]. Obdobně jsou u včel zredukované i detoxifikační genové rodiny kódující karboxylesterasy a glutathion-S-transferasy [52]. Jsou to také důvody, proč se lze

domnívat, že regulace těchto detoxifikačních enzymů probíhá u včel odlišně než u jiného hmyzu.

Ať už musí včela zpracovat aflatoxin B1, tedy mykotoxin produkovaný houbami *Aspergillus*, akaricidy (zejména coumaphos), insekticidy užívané proti kleštíkovci nebo další pesticidy, jako jsou tau-fluvalinát, pyrethroidy (hlavně lambda-cyhalothrin) či různé organofosfáty, vždy stojí v centru této detoxikace cytochrom P450 [53-57]. Vůči akaricidům jsou včely docela tolerantní, což je přisuzováno rychlé detoxifikaci cytochromy P450. Mohou být tedy použity proti roztoči *Varroa*. Ostatní organofosfáty a pyrethroidy jsou pro včely vysoce toxické, avšak toxicita daných látek vždy závisí na konkrétní sloučenině [58].

Indukce, jev kdy se produkce detoxifikačních enzymů zvětšuje po vystavení toxinům [59], je široce spjat s transkripcí genů pro tyto enzymy, poněvadž se minimalizují náklady na metabolickou aktivitu a zároveň se tak chrání organismus před oxidačním poškozením, které může doprovázet aktivitu cytochromů P450 [51]. Ovšem pouze málo studií prokázalo indukci cytochromů P450 u včel. V [60] bylo demonstrováno, že benzo(a)pyren monooxidasová aktivita byla indukována po vystavení benzo(a)pyrenu samotnému, jakožto i akaricidům tau-fluvalinátu a cymiazol hydrochloridu.

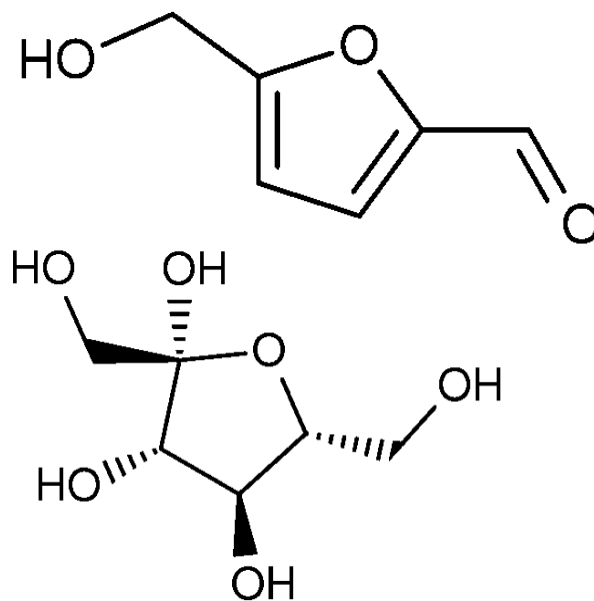
Po vystavení fenobarbitalu se prokázala zvýšená enzymatická aktivita i transkripce cytochromů P450 u *Diptera* [61-64], *Lepidoptera* [65-69] i *Blattodea* [70]. Dalo by se tedy předpokládat, že podobný vliv bude mít fenobarbital i na včely. Opak je však pravdou, neboť fenobarbital zvyšuje toxicitu tau-fluvalinátu i lambda-cyhalothrinu [51], z čehož se dá usuzovat, že neproběhla indukce cytochromů P450. Pravděpodobně totiž fenobarbital soupeří s pesticidy o detoxifikaci zprostředkovanou cytochromy P450 [71, 72]. Indol-3-carbinol a kyselina salicylová vliv na aktivitu cytochromů P450 neměly, jediný kvercetin běžně se vyskytující v pylu a medu výrazně snížil toxicitu tau-fluvalinátu [51].

Med je poměrně efektivní induktor cytochromů P450 u lidí [73], ačkoliv se neprokázalo, které konkrétní sloučeniny jsou za tuto skutečnost zodpovědné.

Předpokládá se vliv přírodních fotochemikálií obsažených v pylu, nektaru a medu. Tyto složky jsou prokázány induktory cytochromů P450. Jedná se o flavonoidy, mezi které patří již zmíněný kvercetin, který indukuje cytochromy P450 i u motýlích larev [74] a který je obsažen v listech. Také propolis, pryskyřičná hmota sloužící včelám jako konstrukční materiál a antibiotikum [75], je bohatý na flavonoidy a fenolové sloučeniny a indukuje cytochromy P450.

Ve včelařství není výjimečností využívání náhradní potraviny pro včelstvo. Med se včelám bere a nektaru může být pro včely nedostatek. V těchto případech se uchylují včelaři k dávání sacharosy nebo vysokofruktosového kukuřičného sirupu (HFCS, z anglického high fructose corn sirup) jakožto náhradním cukrům v potravě včel [76, 77]. Tyto umělé náhrady neobsahují fytochemikálie obsažené v medu, pylu, nektaru nebo propolisu a mají schopnost regulovat cytochromy P450.

V [51] byl zkoumán vliv diety na včely. Ukázalo se, že toxicitu tau-fluvalinátu nebo imidaclopridu výživa včel neovlivnila, stejně tak se nezměnila jejich životnost. Ovšem v přítomnosti aflatoxinu B1 žily včely krmené medem podstatně déle než ty živené HFCS nebo sacharosou. To podporuje tvrzení, že fytochemikálie obsažené v medu indukují cytochromy P450 a tím pádem i napomáhají toleranci k mykotoxinům. Fruktosa v HFCS může být navíc převrácena na toxický 5-hydroxymethylfurfural způsobující symptomy podobné úplavici a zvýšenou úmrtnost [78]. Struktura 5-hydroxymethylfurfuralu je znázorněna na Obr. 19.



Obr. 19: Toxický 5-hydroxymethylfurfural (vlevo) a D-fruktofuranóza (vpravo). Vzato z [26].

Zajímavé je, že se v závislosti na dietě změnila i morfologie vnitřností včel. Při pitvě vnitřností se ukázaly viditelné odlišnosti. Vnitřnosti včel živících se sacharosou byly oproti těm krmeným medem křehké, zvadlé a celkově menší. Vnitřnosti A na Obr. 20 patří včele živené pouze sacharosou, vnitřnosti B včele krmené směsí 3 ml medu a 5 g sacharosy a vnitřnosti C jsou včely, jež byla krmena pouze medem.



Obr. 20: Vnitřnosti včel podle diety. Převzato z [51].

Výsledky naznačují, že regulace včelích cytochromů P450 je přizpůsobena chemikáliím přirozeně se vyskytujícím v prostředí včel a také že, alespoň co se toxikologické kapacity týče, není strava cukrem ekvivalentní stravě medem [51]. Metabolismus pesticidů u včel je pravděpodobně důsledkem náhodné podobnosti molekul pesticidů s fytochemikáliemi, spíše než důkazem evoluce v příčinnosti vystavování těmto látkám. Včely jsou možná již odedávna adaptované na pyrethroidy (např. tau-fluvalinát), protože právě přírodní obranné látky rostlin mají podobnou strukturu.

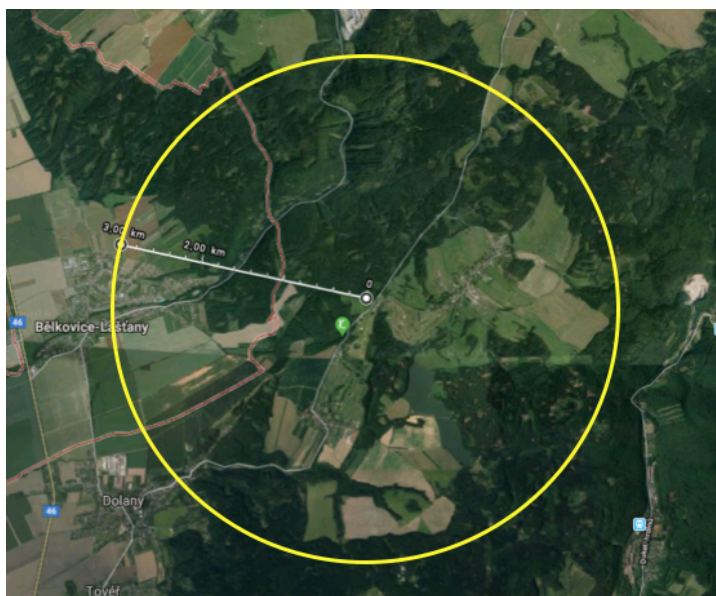
## 4. MATERIÁLY A METODY

### 4.1 Lokality odběru včel

Vzorky včely medonosné byly odebírány celkem ze tří lokalit, Jívová, Šternberk a Loučná nad Desnou.

#### *Jívová*

V této oblasti, jejíž nadmořská výška je zhruba 600 m n. m., se včelstva nachází hlavně v okolí luk a lesů (viz Obr. 21).

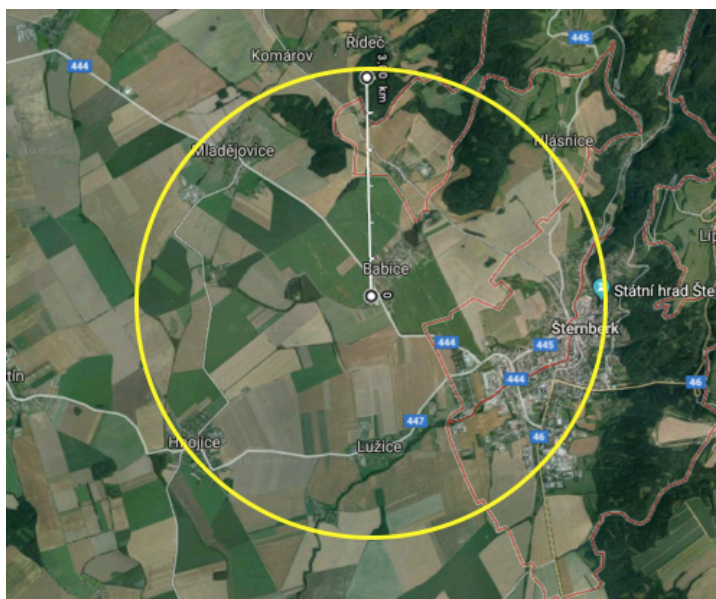


Obr. 21: Okolí místa odběru vzorků včely medonosné v lokalitě Jívová. Žlutou kružnicí je označena vzdálenost 3 km od úlu. Vzato z Google Maps.



## Šternberk

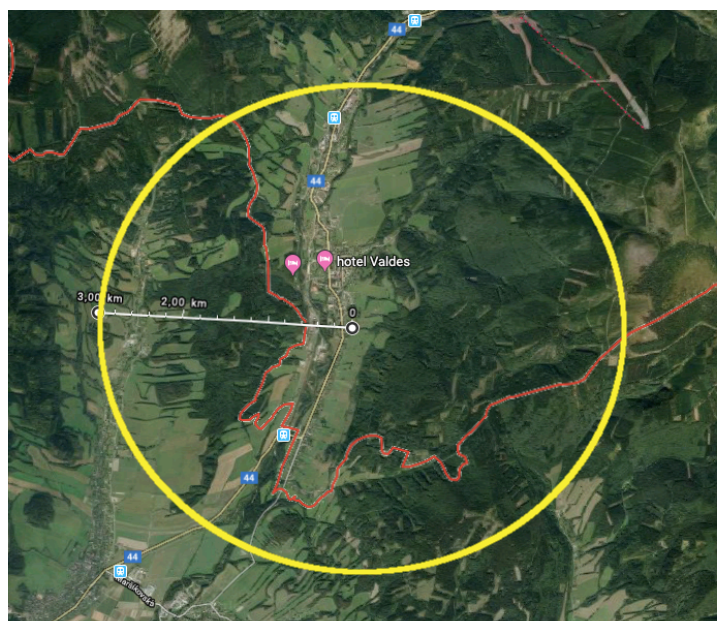
Tato lokalita s nadmořskou výškou okolo 248 m n. m. se nachází na úpatí Nízkého Jeseníku. Okolo místa odchyty včel se rozléhá zejména zemědělci intenzivně využívaná orná půda, dolet včel zasahuje i do intravilánu několika obcí (viz Obr. 22).



Obr. 22: Okolí míst odběru vzorků včely medonosné v lokalitě Šternberk. Žlutou kružnicí je označena vzdálenost 3 km od úlů. Vzato z Google Maps.

## Loučná nad Desnou

Tato oblast se nachází v údolí horního toku Desné, pod Červenohorským sedlem. Nadmořská výška oblasti je cca 450 m n. m. V této lokalitě se nachází hlavně lesy a louky, jedná se tedy opět o oblast bez zemědělsky obdělávané půdy, v doletu včel je také intravilán obce Loučná nad Desnou (viz Obr. 23).



Obr. 23: Okolí místa odběru vzorků včely medonosné v lokalitě Loučná nad Desnou. Žlutou kružnicí je označena vzdálenost 3 km od úlů. Vzato z Google Maps.

## 4.2 Biologický materiál

Živočišný materiál *Apis mellifera* z oblasti Loučná nad Desnou byl dodán panem doc. RNDr. Vladanem Ondřejem Ph.D. Materiál z ostatních lokalit (Jívová a Šternberk), byl zajištěn autorem bakalářské práce.

## 4.3 Vybavení laboratoře

Automatické pipety (Eppendorf), centrifuga (Eppendorf), elektroforéza (Major Science), Eppendorf™ Mastercycler™ pro PCR systém (Eppendorf), nanodrop (ThermoScientific), termoblok Mixing BlockMB- 102 (Bioer), Light Cyler Nano (Roshe), digestoř (Merci ®), digitální předvážky (KERN), mikrovlnná trouba MS023.



#### 4.4 Seznam použitých chemikálií

Ethanol, HypperLadder™ 100bp (Bioline), 2-merkptoethanol (Sigma-Aldrich), agarosa molecular grade (Bioline), GelRed™ Nucleid Acid Stain (Biotium), primery.

#### 4.5 Seznam použitých Kitů

Fast start PCR Master (Roche), LightCycler® Fast Star DNA Master<sup>PLUS</sup>SYBR Green I (Roche), RQ1 RNase – Free DNase (Promega), Spectrum Plant Total RNA kit (Sigma-Aldrich), Transcriptor Hight Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche).

#### 4.6 Izolace RNA

K izolaci RNA byl zvolen kit Spectrum™ Plant Total RNA, izolace byla provedena dle přiloženého návodu. Použit byl protokol A. Jako vzorky pro izolaci RNA sloužily usmrcené včely medonosné, které byly skladovány při teplotě (-80 °C). K homogenizaci živočišné tkáně byl použit homogenizátor FastPrep 24 a Program 1 (délka programu 60 s, rychlost 6,5 m·s<sup>-1</sup>).

Do každé mikrozkuhavky byla vložena jedna včela medonosná a k ní bylo přidáno 500 µl lyzačního roztoku s 2-merkptoethanolem. Na 1 ml lyzačního roztoku připadlo 10 µl 2-merkptoethanolu.

Po homogenizaci byla provedena inkubace homogenátu při teplotě 56 °C po dobu 3 - 5 minut. Po inkubaci následovalo přefiltrování získaného homogenátu a poté byla RNA navázána na binding kolonu a dále promyta pomocí Wash1 a Wash2 (2x). Na závěr byla vyizolovaná RNA eluována. Všechny centrifugační kroky probíhaly při 13 000 rpm a teplotě 4° C. Získaná koncentrace RNA byla změřena na přístroji NanoDrop a skladována při - 70 °C.

#### 4.7 Tvorba směsných vzorků

Z vyizolované RNA byly vytvořeny tzv. směsné vzorky v závislosti na daném ročním období, což se týkalo především oblastí Jívová a Šternberk. Z oblasti Loučná nad Desnou byly směsné vzorky připraveny, z odebraných včel před a po aplikaci látek

amitraz a tau-fluvalinát. Směsný vzorek vznikl smícháním vyizolované RNA ze včel z daného období.

#### **4.8 Přečištění RNA za pomoci DNasy**

Po izolaci RNA a přípravě směsných vzorků bylo provedeno odstranění DNA ze vzorku pomocí kitu RNase Free-DNase (Promega). K 8  $\mu$ l vyizolované RNA bylo přidáno 1  $\mu$ l RQ1 10x reakčního pufru a 1  $\mu$ l RQ1 DNasy. Směs byla přenesena na termoblok, kde byla inkubována při teplotě 37 °C po dobu 30 minut. Po inkubaci byl do směsi přidán 1  $\mu$ l RQ1 STOP Solution, čímž došlo k inaktivaci DNasy. Na závěr byla provedena 10minutová inkubace při 65 °C.

#### **4.9 Přepis RNA do cDNA**

K přepisu RNA do cDNA byl použit Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit a přepis byl uskutečněn podle návodu výrobce.

K reakci bylo použito 8  $\mu$ l přečištěného směsného vzorku, ke kterému bylo přidáno 1  $\mu$ l Anchored-oligo (DT)<sub>18</sub> primeru. Následně byla provedena 10minutová inkubace při teplotě 65 °C. Dále byl předpřipraven premix, který na jeden vzorek obsahoval 4  $\mu$ l reakčního pufru, 0,5  $\mu$ l inhibitoru RNasy, 2  $\mu$ l mix deoxynukleotidu, 1  $\mu$ l DDT a 1,1  $\mu$ l reverzní transkriptasy. Premix byl lehce promíchán pomocí vortexu. Poté byl vzniklý premix rozpipetován po 8,6  $\mu$ l do jednotlivých směsných vzorků a následně 1 hodinu inkubován při 45 °C. K inaktivaci reverzní transkriptasy byla použita inkubace při 85 °C po dobu 5 minut. Koncentrace cDNA byla změřena na NanoDropu a následně byly vzorky uloženy do –20°C.

#### **4.10 Real-time PCR**

Pro real-time PCR byl použit kit LightCycler Fast Start DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I, postup byl proveden podle návodu přidaného výrobcem. K reakci bylo použito 200 ng cDNA. Reakce proběhla za podmínek uvedených v Tab. 2. Použité primery lze vidět v Tab. 3.

Získaná data byla zpracována programem Light Cycler Nano Software, který vyhodnotil  $C_T$  hodnoty jednotlivých vzorků.  $C_T$  hodnoty byly dále zpracovány pomocí metody  $\Delta\Delta C_T$ . Jako kontroly sloužily exprese nově vylíhnutých včel tzv. mladušek. K relativní kvantifikaci byl použit referenční gen (tzv. housekeeping gen) *eIF3S8*.

Výpočet relativní exprese metodou  $\Delta\Delta C_T$ :

$$\begin{aligned} \text{relativní exprese} &= 2^{-\Delta\Delta C_T} \\ \Delta\Delta C_T &= \Delta C_{T,\text{vzorek}} - \Delta C_{T,\text{kontrola}} \\ \Delta C_T &= C_{T,\text{studovaný gen}} - C_{T,\text{referenční gen}} \end{aligned}$$

Tab. 2: Program real-time PCR.

| Krok                 | Teplota (°C)         | Čas (s) | Počet cyklů |
|----------------------|----------------------|---------|-------------|
| Počáteční denaturace | 95                   | 300     | 1           |
| Denaturace           | 95                   | 10      | 45          |
| Annealing            | 55                   | 30      | 45          |
| Elongace             | 72                   | 20      | 45          |
| Finální extenze      | 72                   | 300     | 1           |
| Analýza teploty tání | 65 až 97 (0,05 °C/s) | 60      | 1           |
| Chlazení             | 40                   | 30      | 1           |

Tab. 3: Seznam použitých primerů.

| Sledovaný gen  | Primery | Sekvence                      | Citace |
|----------------|---------|-------------------------------|--------|
| <i>CYP9Q1</i>  | F       | 5'-TCGAGAAGTTTTTCCACCG-3'     | [79]   |
|                | R       | 5'-CTCTTTCCTCCTCGATTG -3'     |        |
| <i>CYP9Q2</i>  | F       | 5'-GATTATCGCCTATTATTACTG-3'   | [79]   |
|                | R       | 5'-GTTCTCCTTCCCTCTGAT-3'      |        |
| <i>CYP9Q3</i>  | F       | 5'-GTTCCGGGAAAATGACTAC-3'     | [79]   |
|                | R       | 5'-GGTCAAAATGGTGGTGAC-3'      |        |
| <i>CYP4G11</i> | F       | 5'-GGAAGTCCTGATGCCATGTT-3'    | [79]   |
|                | R       | 5'-CATTCGCATTGAACAGATCG-3'    |        |
| <i>eIF3S8</i>  | F       | 5'-TGAGTGTCTGCTATGGATTGCAA-3' | *      |
|                | R       | 5'-TCGCGGCTCGTGGTAAA-3'       |        |
| <i>CAT</i>     | F       | 5'-CTGGAAGTGGAACACCGATT-3'    | *      |
|                | R       | 5'-TGACAGTATCTGCGGAACCA-3'    |        |

\* Navrženo Mgr. Michaelou Švécarovou, Ph.D. v programu Primer3.

#### **4.11 Elektroforetická separace**

K vyhodnocení produktů PCR reakcí byla použita elektroforetická separace na 1,7% agarosovém gelu v 0,5× TBE pufru. Do vzorku bylo přidáno barvivo 2 µl EurX SimlySafe™ pro vizualizaci PCR produktu. K zjištění molekulové hmotnosti byl použit marker HyperLadder™ 100 bp Plus s rozsahem 100 – 3 000 bp. Separace probíhala 35 - 40 minut při napětí 100 V.

## 5. VÝSLEDKY

Dosažené výsledky jsou uvedeny a diskutovány v následujících podkapitolách. Výsledky jsou utříděny do formy sloupcových grafů a rozděleny dle lokality, popřípadě podle toho, zdali se týkají exprese katalasy nebo cytochromů.

Důsledek po vystavení tau-fluvalinátu anebo amitrazu v lokalitě Loučná nad Desnou reflektují údaje pro expresi genu u včely sedící na plástech tzv. „nelétavky“. Jak název napovídá, jedná se o včelu, která ještě nedosáhla ve svém vývinu stádia létavky, tudíž v úlu zaujímá funkci včely krmičky nebo čističky. V kapitole 5.1.3 je navíc ukázán rozdíl v expresi katalasy a cytochromů po vystavení tau-fluvalinátu nebo amitrazu u matky a trubce.

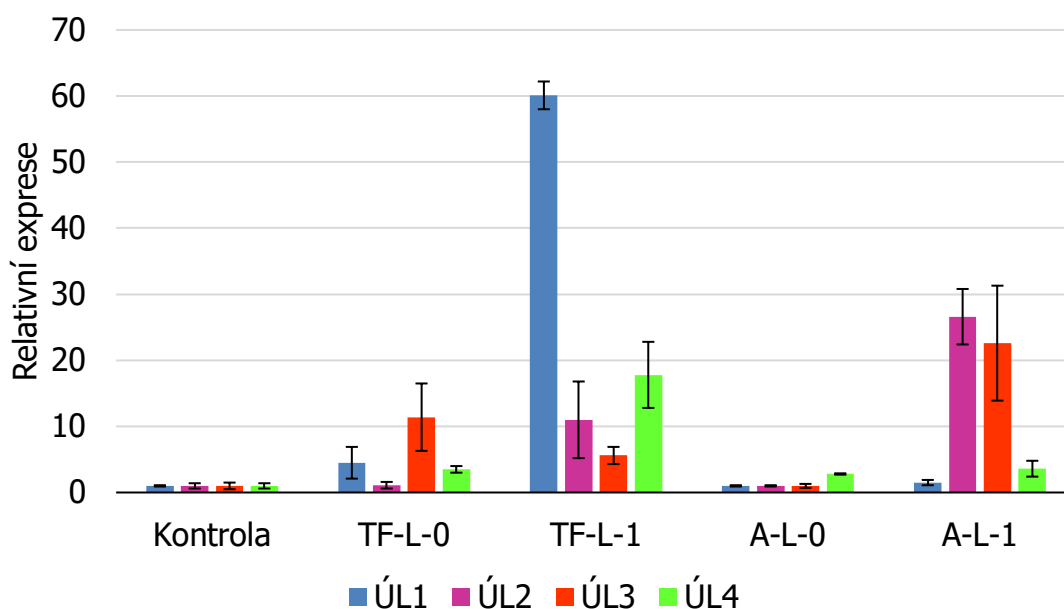
V lokalitě Jívová a Šternberk jsou údaje rozděleny podle ročního období, kdy byly vzorky odebrány. Tato včelstva nebyla měřena na vliv amitrazu nebo tau-fluvalinátu, ale na vliv pesticidů. Při zjišťování vystavení včel v lokalitách Jívová a Šternberk jednotlivým pesticidům se pracuje se skutečností, že včela medonosná obvykle léta pro potravu do vzdálenosti 3 km od úlu. Okolo každého stanoviště byla tedy zkoumána zemědělská půda v poloměru 3 km. Majitelé jednotlivých orných půd byli poté kontaktováni a dotázáni na informaci ohledně vysazeného rostlinstva, a hlavně použitých pesticidů. Běžně se během roku použije několik desítek různých herbicidů, insekticidů, fungicidů, pomocných látek aj.

Uvedené výsledky byly stanoveny jako relativní exprese, která byla provedena pomocí real-time PCR na přístroji Light Cycler Nano. Bylo naměřeno několik sérií vzorků, které vždy obsahovaly negativní vzorky, a to ve dvou kopiích. Získané hodnoty byly zprůměrovány a zaneseny do grafů. Specifita produktu byla ověřena za pomoci analýzy křivek teploty tání. Nakonec byla provedena elektroforetická separace produktů real-time PCR. Změny v relativní expresi jednotlivých genů se lišily, neboť vzorky z oblasti Loučná nad Desnou byly studovány na vliv akaricidů, zatímco včely z oblasti Jívová a Šternberk na vliv pesticidů.

## 5.1 Relativní exprese katalasy a cytochromů po vystavení amitrazu a tau-fluvalinátu v lokalitě Loučná nad Desnou

### 5.1.1 Relativní exprese katalasy

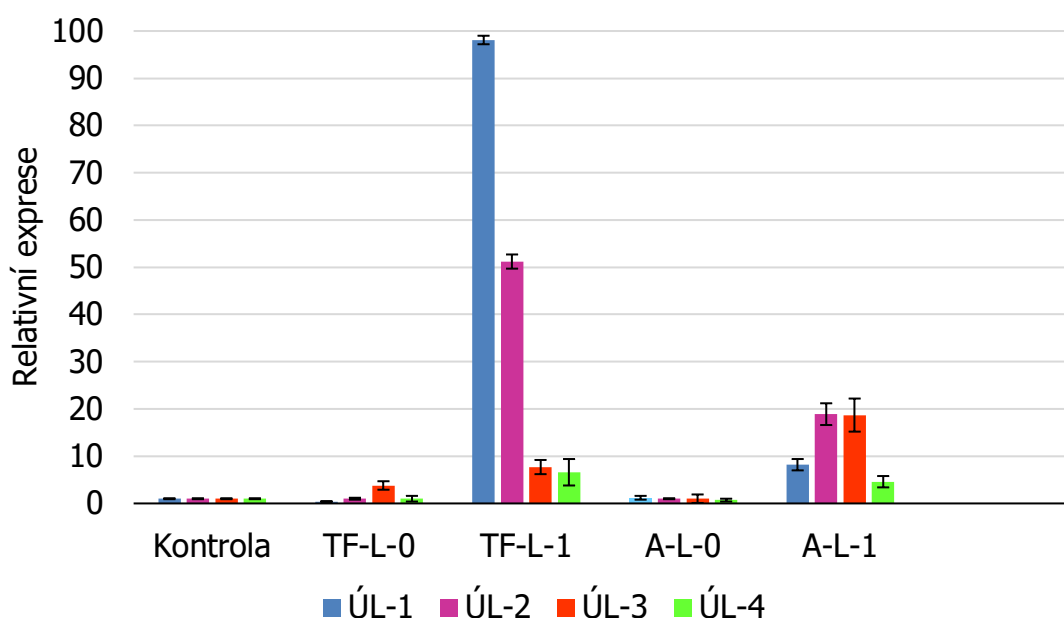
Na Obr. 24 lze vidět, že po vystavení včel přípravku obsahujícímu tau-fluvalinát byla v případech úlů 1, 2 a 4 exprese katalasy zvýšena v rozmezí 11 – 17,8x, nejvyšší nárůst byl zaznamenán u úlu 1, kde exprese dosahovala zvýšení až 60,1x. Pouze u úlu č. 3 se tento jev zvýšení exprese neprokázal. Po aplikaci látky amitraz byl sledován nárůst exprese u úlů 2,3. U úlu č. 2 exprese činila zvýšení 26,6x a u úlu č. 3 22,6x. Hodnoty exprese u zbylých dvou úlů (1,4) se pohybovaly na úrovni kontroly.



Obr. 24: Relativní exprese katalasy ve včele medonosné z lokality Loučná nad Desnou. Kontrola - kontrolní vzorek, TF-L-0 - před vystavením tau-fluvalinátu, TF-L-1 - po vystavení tau-fluvalinátu, A-L-0 - před vystavením amitrazu, A-L-1 - po vystavení amitraz

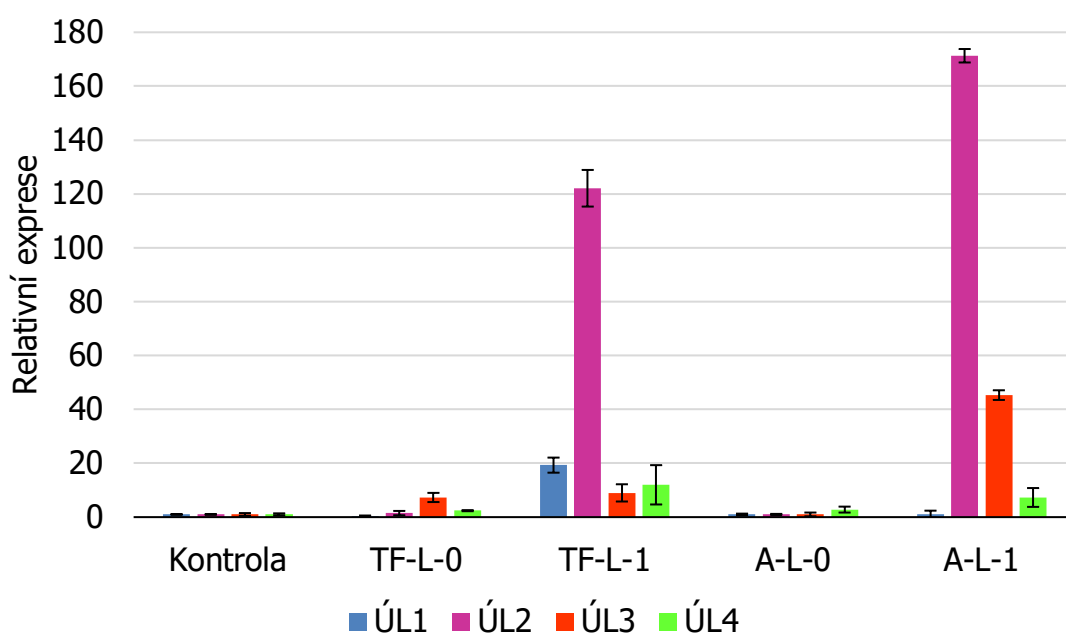
### 5.1.2 Relativní exprese genů *CYP4G11*, *CYP9Q1*, *CYP9Q2*, *CYP9Q3*

Relativní exprese genu *CYP4G11* je zvýšena ve všech úlech po vystavení tau-fluvalinátu, respektive amitrazu (viz Obr. 25). Nejvýraznější zvýšení je patrné po aplikaci látky tau-fluvalinát, kde hodnota exprese u úlu 1 dosahuje zvýšení 98,1x od hodnoty kontroly. U úlu 2 je exprese zvýšená 51,2x, u zbylých úlů 3 a 4 exprese nedosahovala takových vysokých hodnot, ale i tak bylo mírné zvýšení exprese zaznamenáno, a to u úlu č.3 7,7x a u úlu č. 4 6,6x. Po vystavení úlů látkou amitraz, vykazoval gen největší zvýšení u úlů č. 2 18,9x a u úlu č.3 18,7x. Pro úl č. 1 dosahovala hodnota exprese zvýšení 8,2x. Získaná hodnota exprese u úlu č. 4 měla mírný nárůst od hodnoty kontroly 3,1x.



Obr. 25: Relativní exprese genu *CYP4G11* ve včele medonosné z lokality Loučná nad Desnou. Kontrola - kontrolní vzorek, TF-L-0 - před vystavením tau-fluvalinátu, TF-L-1 - po vystavení tau-fluvalinátu, A-L-0 - před vystavením amitrazu, A-L-1 - po vystavení amitrazu.

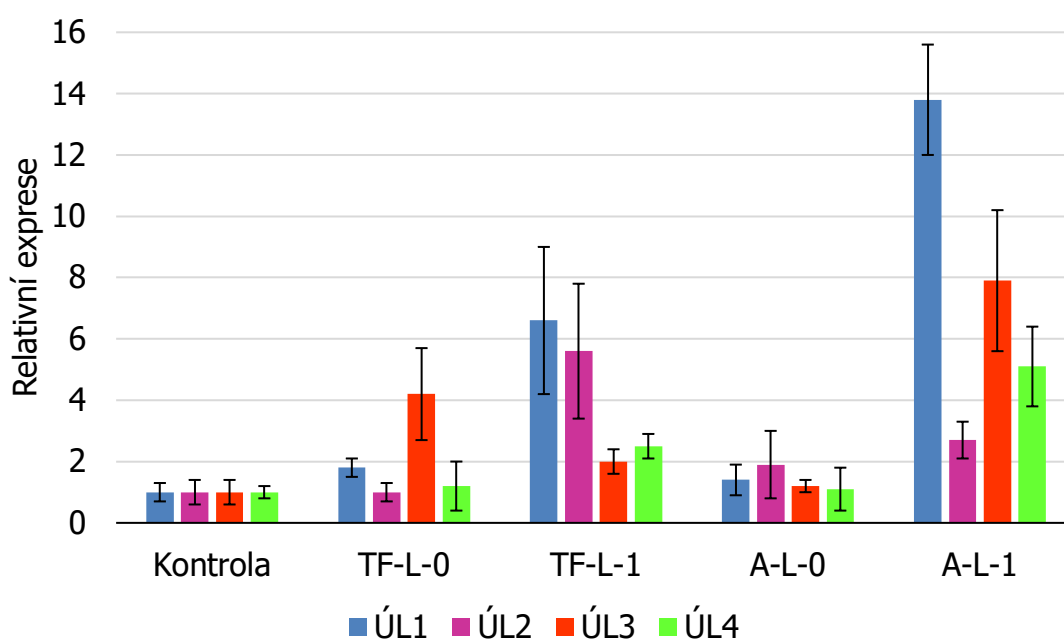
Zvýšená exprese genu *CYP9Q1*, jak je patrné z Obr. 26, je nejzřetelnější u úlu č. 2, a to jak po vystavení tau-fluvalinátu, kde hodnota dosahovala zvýšení 122,1x, tak i po aplikaci látky amitraz, která zapříčinila zvýšení exprese 171,3x. V tomto případě byla naměřena vůbec největší změna v expresi. Zvýšená pak byla exprese i u dalších úlů po vystavení látky tau-fluvalitnát. U úlu č. 1 exprese vzrostla 19,3x. Nejmenší změna byla zaznamenána u úlu č.3, kdy hodnota exprese činila 9násobek od hodnoty kontroly. Další výrazná změna v expresi proběhla u úlu č. 3 po vystavení amitrazu, exprese se zde zvýšila 45,3x.



Obr. 26: Relativní exprese genu *CYP9Q1* ve včele medonosné z lokality Loučná nad Desnou. Kontrola - kontrolní vzorek, TF-L-0 - před vystavením tau-fluvalinátu, TF-L-1 - po vystavení tau-fluvalinátu, A-L-0 - před vystavením amitrazu, A-L-1 - po vystavení amitrazu.

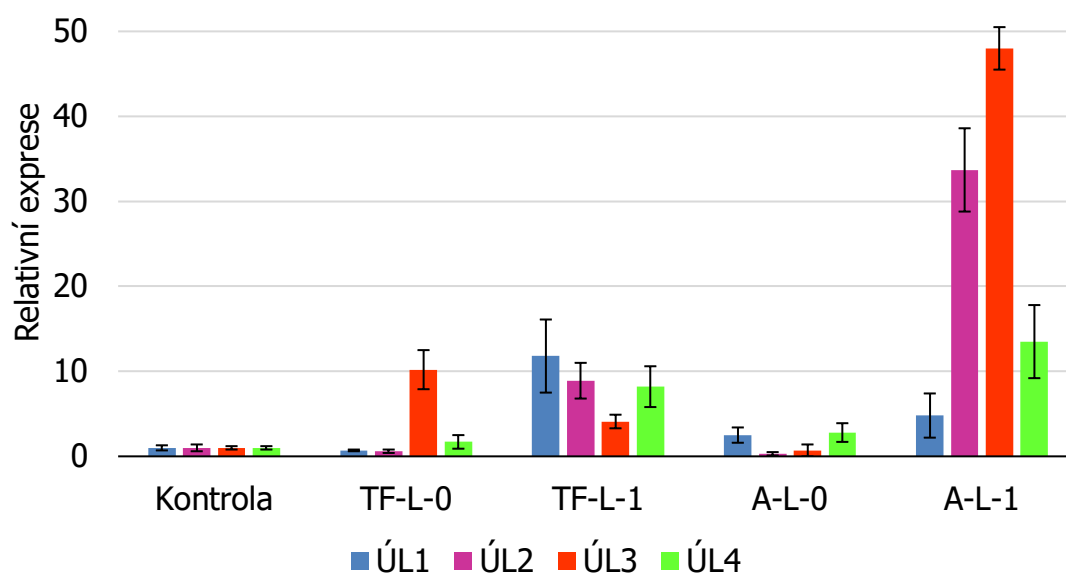


Po vystavení amitrazu byla exprese genu *CYP9Q2* (viz Obr. 27) zvýšená ve všech případech. Nejvyšší expresi vykazoval úl č. 1, kde exprese dosahovala zvýšení 13,8x, zatímco u úlu č. 2 byla exprese po aplikaci amitrazu nejmenší, tedy mírně nad úroveň kontroly (2,1x), u úlu č. 3 bylo sledováno zvýšení 7,9x a úl č. 4 5,1x. Po vystavení látky tau-fluvalinát byla situace u úlu č. 1 obdobná jako u amitrazu, tedy, že úl č. 1 dosahoval nejvyšší zvýšené exprese a to 6,6x. U úlu č. 2 byla zaznamenána zvýšená hodnota exprese 5,6x. Úly č. 3 a 4 vykazovaly nejmenší nárůst exprese, a to v rozmezí 2 – 2,5x.



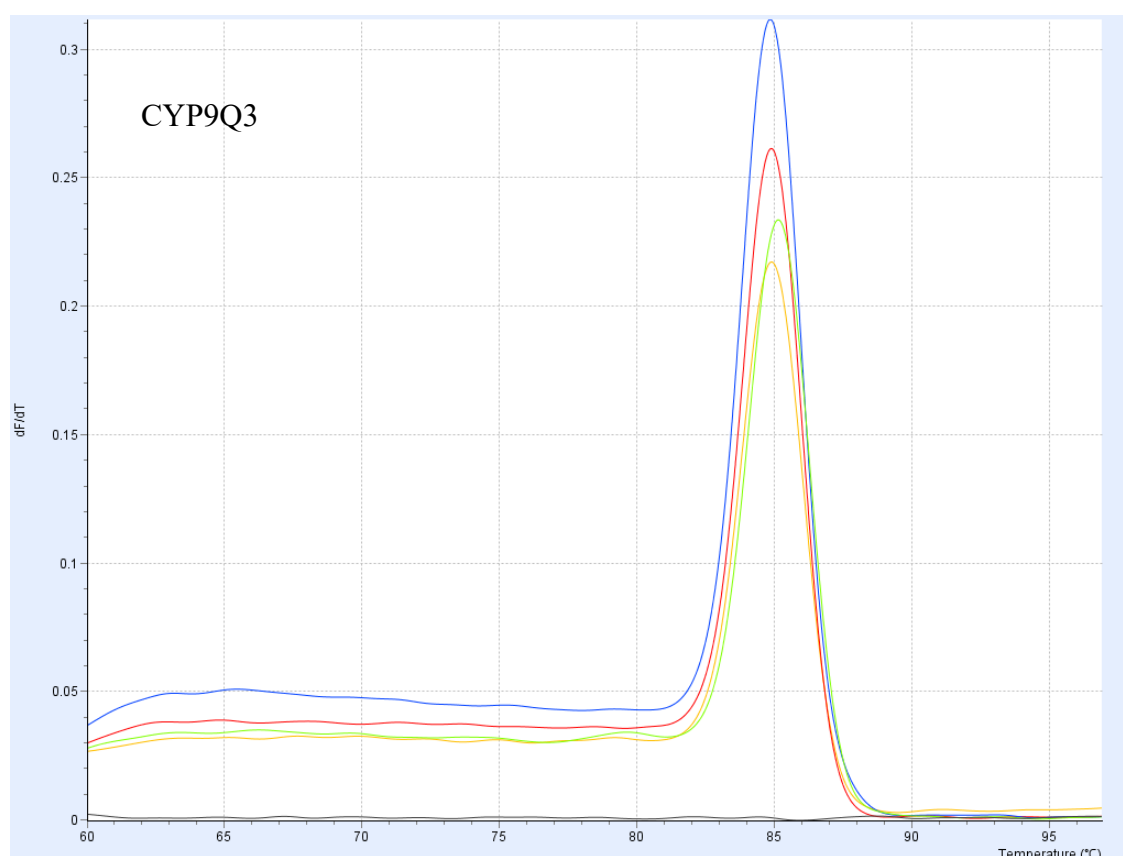
Obr. 27: Relativní exprese genu *CYP9Q2* ve včele medonosné z lokality Loučná nad Desnou. Kontrola - kontrolní vzorek, TF-L-0 - před vystavením tau-fluvalinátu, TF-L-1 - po vystavení tau-fluvalinátu, A-L-0 - před vystavením amitrazu, A-L-1 - po vystavení amitrazu.

Expresce genu *CYP9Q3* byla zvýšena téměř ve všech případech kromě jednoho (viz Obr. 28). U úlu č. 2 a 3 po vystavení amitrazu byla expresce genu zvýšena markantně, u úlu č. 2 byla expresce zvýšena 33,7x a u úlu č. 3 dokonce 48x. Zbylé dva úly nedosahovaly tak extrémního zvýšení. U úlu č. 1 byl zaznamenán nárůst expresce pouze 4,8x a u úlu č. 4 13,5x. Po aplikaci látky tau-fluvalinátu se u úlů č. 1, 2 a 4 naměřené expresce pohybovaly v rozmezí 8,2 – 11,8x.



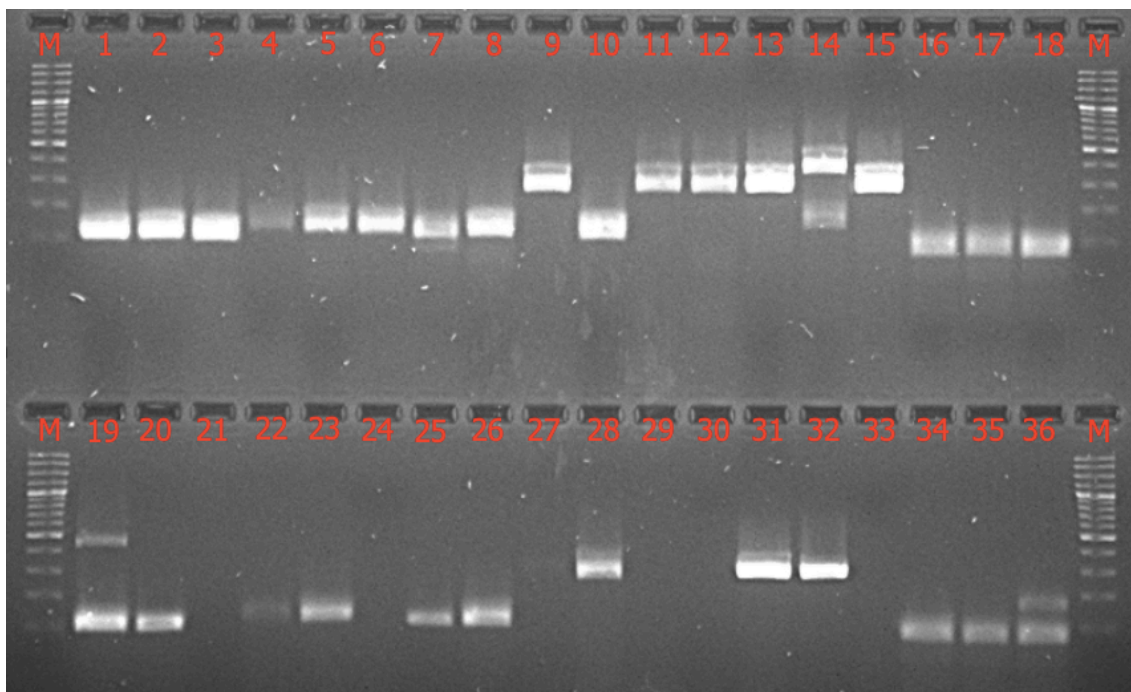
Obr. 28: Relativní expresce genu *CYP9Q3* ve včele medonosné z lokality Loučná nad Desnou. Kontrola - kontrolní vzorek, TF-L-0 - před vystavením tau-fluvalinátu, TF-L-1 - po vystavení tau-fluvalinátu, A-L-0 - před vystavením amitrazu, A-L-1 - po vystavení amitrazu.

Jak lze vidět na Obr. 29, negativní kontroly nevykazují žádný pík, neboť studovaný gen byl nahrazen vodou, zatímco studované geny mají vždy pík pouze jeden, čímž se potvrzuje správnost provedení metody real-time PCR. Píky genu *CYP4G11* se pohybují okolo teploty 83 °C, píky genu *eiF3S8* okolo teploty 81 °C, píky genu *CAT* okolo 83 °C, píky genu *CYP9Q1* okolo 85 °C, píky genu *CYP9Q2* okolo 84 °C a píky genu *CYP9Q3* okolo teploty 85 °C.



Obr. 29: Výsledky analýzy křivek teplot tání produktů real-time PCR z lokality Loučná nad Desnou. Modrá křivka charakterizuje úl 1, žlutá úl 2, červená úl 3 a zelená úl 4. Kontrolní vzorky jsou znázorněny šedou a černou barvou.

Na Obr. 30 jsou studované geny *CYP9Q1*, *CYP9Q2*, *CYP9Q3* a *eiF3S8*, které dosahovaly molekulové hmotnosti 100 bp, zatímco geny *CAT* a *CYP4G11* měly velikost 500 bp.



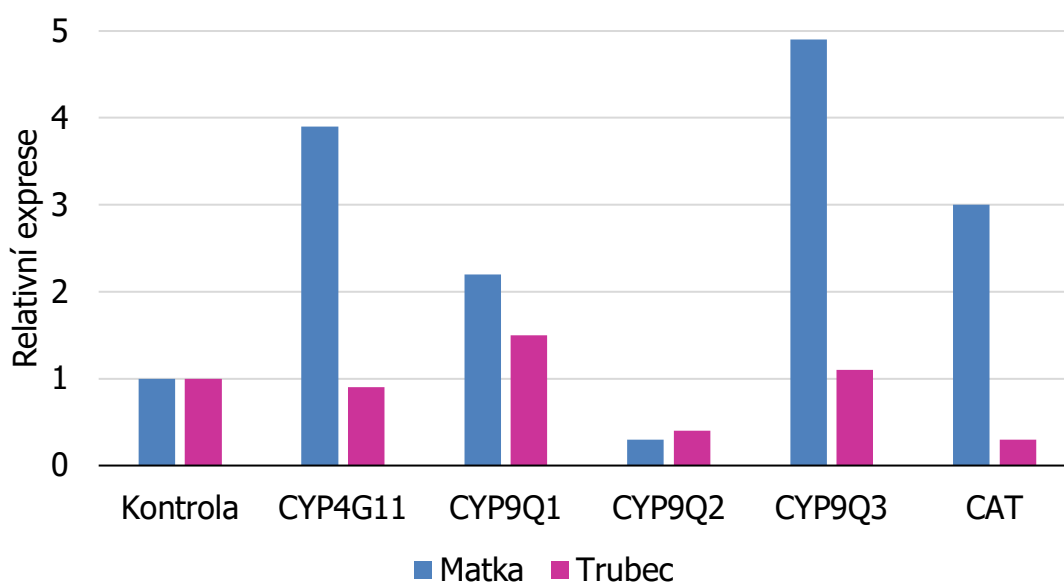
Obr. 30: Výsledek elektroforetické separace produktů real-time PCR lokality Loučná nad Desnou. Jako marker molekulové hmotnosti byl použit HyperLadder™ 100 bp Plus. Označení je vysvětleno v Tab. 4

Tab. 4: Tabulka vysvětlující označení v Obr. 30.

| Označení | Číslo úlu | Význam | Gen            | Označení | Číslo úlu | Význam             | Gen            |
|----------|-----------|--------|----------------|----------|-----------|--------------------|----------------|
| M        | -         | Marker | -              | 19       | 3         | TF-L-1             |                |
| 1        | 4         | TF-L-1 |                | 20       | 3         | A-L-1              | <i>CYPQ3</i>   |
| 2        | 4         | A-L-0  | <i>CYPQ3</i>   | 21       | -         | Negativní kontrola |                |
| 3        | 4         | A-L-1  |                | 22       | 3         | TF-L-1             |                |
| 4        | 4         | TF-L-1 |                | 23       | 3         | A-L-1              | <i>CYPQ2</i>   |
| 5        | 4         | A-L-0  | <i>CYPQ2</i>   | 24       | -         | Negativní kontrola |                |
| 6        | 4         | A-L-1  |                | 25       | 3         | TF-L-1             |                |
| 7        | 4         | TF-L-1 |                | 26       | 3         | A-L-1              | <i>CYPQ1</i>   |
| 8        | 4         | TF-L-0 | <i>CYPQ1</i>   | 27       | -         | Negativní kontrola |                |
| 9        | 4         | A-L-1  |                | 28       | 3         | TF-L-1             |                |
| 10       | 4         | TF-L-1 |                | 29       | 3         | A-L-1              | <i>CAT2</i>    |
| 11       | 3         | TF-L-0 | <i>CAT2</i>    | 30       | -         | Negativní kontrola |                |
| 12       | 4         | A-L-1  |                | 31       | 3         | TF-L-1             |                |
| 13       | 4         | TF-L-1 |                | 32       | 3         | A-L-1              | <i>CYP4G11</i> |
| 14       | 2         | A-L-0  | <i>CYP4G11</i> | 33       | -         | Negativní kontrola |                |
| 15       | 4         | A-L-1  |                | 34       | 3         | TF-L-1             |                |
| 16       | 4         | TF-L-1 |                | 35       | 3         | A-L-1              | <i>eiF3S8</i>  |
| 17       | 4         | A-L-0  | <i>eiF3S8</i>  | 36       | -         | Negativní kontrola |                |
| 18       | 4         | A-L-1  |                |          |           |                    |                |

### 5.1.3 Relativní exprese cytochromů a katalasy v matce a trubci

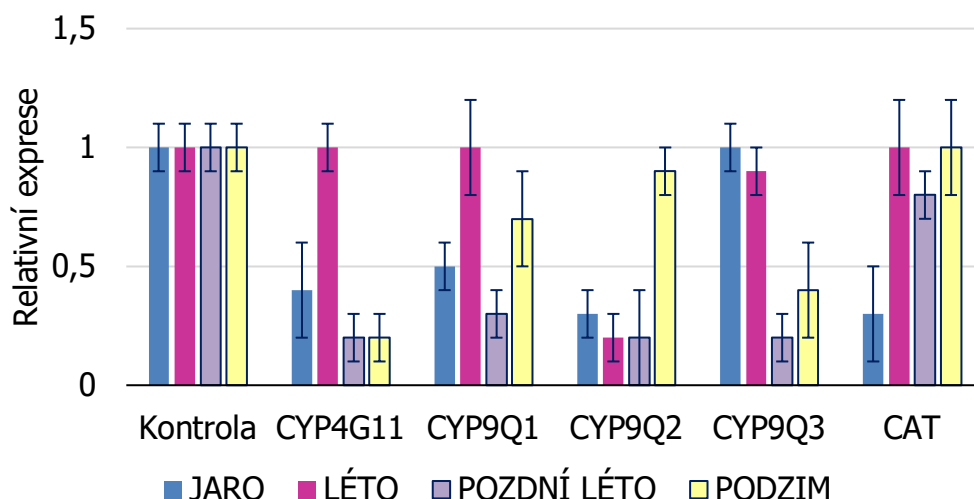
Na Obr. 31 byla nejvyšší dosažená exprese u matky pozorována u genu *CYP9Q3*, kde její hodnota činila 4,9násobku hodnoty kontroly. Dále byla zvýšena exprese zaznamenána u genu *CYP4G11*, kde nárůst činil 3,9x. U genu *CAT* byla exprese zvýšena 3x a u genu *CYP9Q1* 2,2x. Pouze u genu *CYP9Q2* se hodnota exprese pohybovala na úrovni kontroly. U trubce nebyl nárůst exprese genu tak výrazný jak u matky. Relativní exprese byla zvýšena pouze dvakrát, a to u genu *CYP9Q1*, kde naměřená hodnota exprese dosahovala zvýšení 1,5x a u genu *CYP9Q3* byla exprese zvýšená pouze 1,1x. Matka s trubcem byli odebíráni během rojivosti včel tudíž během měsíce května.



Obr. 31: Porovnání relativních expresí katalasy a cytochromů *CYP4G11*, *CYP9Q1*, *CYP9Q2* a *CYP9Q3* v matce a trubci z lokality Loučná nad Desnou.

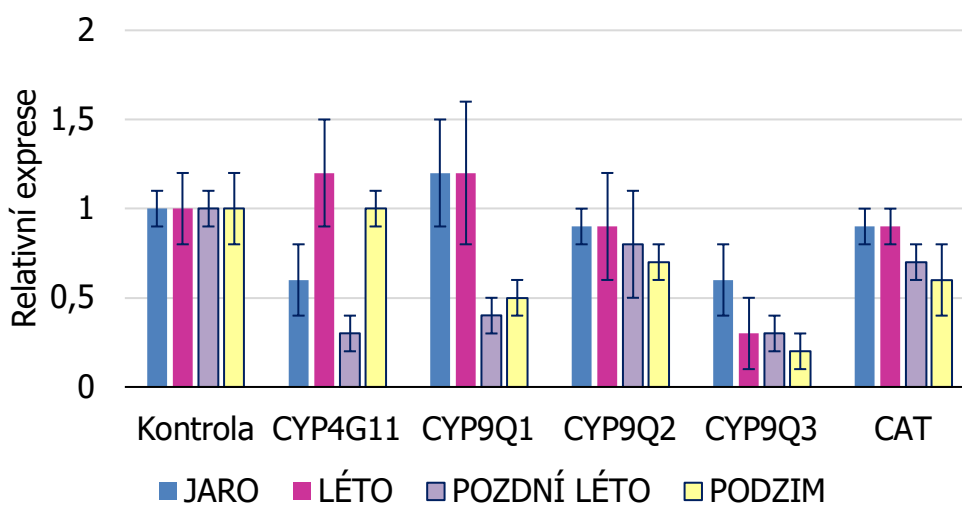
## 5.2 Relativní exprese katalasy a cytochromů v lokalitě Jívová a Šternberk

Jak lze vidět na Obr. 32, včelstva v lokalitě Jívová nevykazují žádné zvýšené exprese jak katalasy, tak i cytochromů nebyly pozorovány, respektive byly tak nízké, že je započítáváme na úroveň kontroly.



Obr. 32: Relativní exprese katalasy a cytochromů *CYP4G11*, *CYP9Q1*, *CYP9Q2* a *CYP9Q3* ve včelstvu z lokality Jívová.

Obdobně jako v případě lokality Jívová i v lokalitě Šternberk (Obr. 33) prakticky nebylo pozorováno zvýšení exprese. Ve všech ostatních případech, včetně katalasy, nebyly zvýšené exprese ani zaznamenány.



Obr. 33: Relativní exprese katalasy a cytochromů *CYP4G11*, *CYP9Q1*, *CYP9Q2* a *CYP9Q3* ve včelstvu z lokality Šternberk.

Shrneme-li všechny výsledky týkající se cytochromů dohromady, zdá se, že zvýšení exprese proběhlo téměř pokaždé. U některých cytochromů byla však zaznamenána významně zvýšená exprese po vystavení tau-fluvalinátu, zatímco u jiných zase naopak po amitrazu. U genu *CYP4G11* (Obr. 25) byla exprese výrazně zvýšena ve dvou případech po vystavení tau-fluvalinátem, naopak u genů *CYP9Q2* (Obr. 27) a *CYP9Q3* (Obr. 28) bylo nejvyšší zvýšení exprese zaznamenáno po vystavení amitrazu. U genu *CYP9Q1* (Obr. 26) proběhlo významné zvýšení u úlu č. 2 po obou akaricidech, po amitrazu lehce výrazněji.



## 6. DISKUZE

Cílem této bakalářské práce byla optimalizace metody pro monitoring vlivu xenobiotik, konkrétně akaricidů a pesticidů, na organismus včely medonosné. Včely byly odebírány ze tří oblastí, a to Loučná nad Desnou, Jívová a Šternberk. Z Loučné nad Desnou byly včely testovány na vliv akaricidů tau-fluvalinátu a amitrazu, z oblasti Jívová a Šternberk na vliv pesticidů.

Expresí stresového enzymu katalasy je výrazně ovlivňována vystavením včely medonosné tau-fluvalinátu i amitrazu. Dokládají to získané výsledky z lokality Loučná nad Desnou (viz Obr. 24). Potvrzují se tak tedy výsledky, které ve své práci publikuje Schmehl [80]. Co se týče exprese zkoumaných cytochromů P450 (*CYP4G11*, *CYP9Q1*, *CYP9Q2* a *CYP9Q3*) zodpovědných za detoxifikaci organismu po vystavení akaricidů tau-fluvalinátu a amitrazu, z dosažených výsledků vyplývá, že v případě každého genu byla jeho exprese zvýšena (viz Obr. 25, Obr. 26, Obr. 27 a Obr. 28). Johnson [40] pak tvrdí, že cytochromy P450 jsou zodpovědné za detoxifikaci pouze po vystavení organismu tau-fluvalinátu, nikoliv však amitrazu. Tento jev však výsledky získané touto prací nepotvrzují. Boncristiani [81] zkoumal expresi genů *CYP4G11*, *CYP6AS14*, *CYP306* nebo *CYP6a514* po vystavení včely tau-fluvalinátu a amitrazu. Výsledkem jeho práce je tvrzení, že vystavení organismu těmito akaricidům nevede k významné změně v expresi zmíněných genů. Výsledky této práce však jeho studii nepotvrzují, jelikož po vystavení včely zmíněným akaricidům byla zvýšena exprese genu *CYP4G11* (viz Obr. 25). Obecně lze říci, že se potvrdil předpoklad, že oba zmíněné akaricidy mají vliv na včelu medonosnou a působí zátěž na její organismus.

Včely mohou být využívány pro účely monitoringu čistoty životního prostředí, mohou tedy sloužit jako bioindikátory. Průměrný rádius doletu včel je 1,5 km a celková plocha doletu tedy cca 7 km<sup>2</sup> [82]. Včely se tak dají použít jako indikátory znečištění pesticidy jak v městských, tak v zemědělských ekosystémech [83]. Každé včelstvo má de facto tisíce detektorů [84]. Dalšími důvody, proč jsou včely dobrými bioindikátory, jsou jejich relativně snadný chov a všudypřítomnost [82]. Intenzita znečištění se stanovuje nejen chemickou analýzou pochytaných včel ze záchytných stanic, ale také

rozborem medu, vosku nebo pylu. Včely jsou tedy účinnou a levnou alternativou k posuzování vlivu člověka na ekosystém [84]. Druhá část této studie byla věnována právě možnosti metodiky monitoringu na vlivu pesticidů organismu včely medonosné. Byly odebírány včely ze dvou lokalit, z lokality Jívová a Šternberk. Jak lze vidět na Obr. 32 a Obr. 33, nebyly v těchto místech zaznamenány žádné významné zvýšení v expresích vybraných již zmíněných cytochromů P450. Vyvíjející metodika nemohla přinést významnější výsledky, neboť obsahovala několik nedokonalostí. V první řadě se jednalo o metodu *in natura*, kde nebylo možné se ani přiblížit laboratorním podmínkám. Nelze tedy s jistotou tvrdit, že včely navštívily porost plodin po chemickém ošetření. Dalším problémem byla samotná komunikace se zemědělci, kdy nebylo možné zjistit přesné chemikálie, které byly použity. Také nebylo možné stanovit přesná pravidla pro odběr včel, jelikož nebyla známá data aplikování postřiků. Proto se včely odebíraly náhodně ve čtyřech různých obdobích. V neposlední řadě pak byla metoda testována pouze jednu včelařskou sezónu. Lze tedy říci, že se jednalo pouze o jakousi pilotní zkoušku této metodiky bez přikládání velké váhy dosaženým výsledkům, ale s důrazem na optimalizaci základních metod molekulární biologie a ověřování použitých primerů. Nabízí se tedy získat výsledky obdobnou metodikou, ovšem s lepší komunikací se zemědělci, v delším časovém horizontu a s ověřením v laboratorních podmínkách. Metodiku pro zkoumání vlivu pesticidů na včelu medonosnou v laboratorních podmínkách opublikoval Erban [85]. Při této metodě je klíčovým typem vzorků larva zavíčkovaná v buňce plástu, která již nepřijímají potravu s případným xenobiotikem, kterou jim dodávají včely krmičky. Po vylíhnutí byly včely vystaveny přímému styku s pesticidy [85]. Právě takto je proteomickým přístupem možno nejlépe kvantifikovat negativní vlivy xenobiotik.

## 7. DIDAKTICKÁ ČÁST

Pro didaktickou část jsem se rozhodla vytvořit pracovní list s moderními prvky, který by měl studenty vtáhnout do tématu hravou formou. Pracovní list je zaměřen na základní pojmy týkající se včel a jejich okolí. První částí pracovního listu je tajenka, na kterou navazuje popis obrázku, kdy se přiřazují popisky jednotlivým částem včely. Dále se přiřazují k jednotlivým obrázkům příslušné pojmy. Další částí je doplňování pojmů do volných buněk tabulky dle logického uskupení. Poslední částí pracovního listu je doplňování pojmů do textu.

Samostatný pracovní list ve verzi pro studenty i učitele se je přiložen v kapitole 10.

## 8. ZÁVĚR

V této práci byly zkoumány skrze měření expresí detoxifikačních genů dva různé faktory na organismus včely medonosné, a to sice vliv pesticidů a vliv akaricidů tau-fluvalinátu a amitrazu používaných včelaři k ošetření včelstev proti varroase.

V obou lokalitách, ve kterých byla včelstva testována na vliv pesticidů, se neprojeví žádné významné zvýšené exprese sledovaných cytochromů P450, ani katalasy. Výzkum probíhal však spíše jako vývoj nové metody monitoringu vlivu pesticidů na včelu medonosnou. Lze však usoudit, že takto prováděný monitoring by v delším časovém úseku mohl přinést přesné a správné výsledky. Metodu monitoringu by mohla dále vylepšit znalost fenologie rostlin a komunikace se zemědělci v dané oblasti, včetně znalosti aktuálních agrochemických postupů a aplikací.

Co se týče vystavení amitrazu nebo tau-fluvalinátu, zde byly dosaženy jednoznačné výsledky. Obě tyto látky mají výrazný vliv na expresi cytochromů P450 i katalasy, kdy ve většině případů byla exprese těchto genů zvýšena, v některých případech byla relativní exprese genu zvýšena až 170násobně. Existuje mnoho faktorů, které mohou ohrozit životy včel medonosných a není pochyb, že oba zmíněné akaricidy mezi tyto vlivy patří také.

## 9. SEZNAM ZKRATEK

|                       |   |
|-----------------------|---|
| 10-HDA                | 10-hydroxy- <i>trans</i> -2-decenová kyselina   |
| Apod.                 | A podobně   |
| <i>C. botulinum</i>   | <i>Clostridium botulinum</i>  |
| CAT                   | Katalasa  |
| CCD                   | Syndron zhroucení včelstev z angl. Colony Collapse Disorder                                 |
| cDNA                  | Komplementární DNA z angl. Complementary DNA  |
| CYP                   | Cytochrom   |
| DNA                   | Deoxyribonukleová kyselina  |
| DPMF                  | N-(2,4-dimethylfenyl)-N'-methylformamid z angl. N-(2,4-dimethylphenyl)-N'-methylformamidine |
| DWV                   | Virus deformovaných křídel z angl. Deformed Wings Virus                                     |
| <i>E. coli</i>        | <i>Escherichia coli</i>   |
| EBI                   | Inhibitor biosyntézy ergosterolů z angl. Ergosterol Biosynthesis Inhibitor                  |
| HFCS                  | Vysoce fruktózový kukuřičný sirup z angl. High Fructose Corn Sirup                          |
| Kys.                  | Kyselina  |
| MRJPs                 | Major Royal Jelly proteiny z angl. Major Royal Jelly Proteins                               |
| MRSA                  | Metilicin-rezistentní zlatý stafylokok  |
| NADPH                 | nikotinamidadenindinukleotid  |
| Např.                 | Například   |
| PCR                   | Polymerázová řetězová reakce z angl. Polymerase Chain Reaction                              |
| Resp.                 | Respektive  |
| RNA                   | Ribonukleová kyselina   |
| <i>S. Aureus</i>      | <i>Staphylococcus aureus</i>  |
| <i>S. pyogenes</i>    | <i>Streptococcus pyogenes</i>   |
| <i>S. typhimurium</i> | <i>Salmonella typhimurium</i>   |
| Tzv.                  | Takzvaný  |
| USD                   | Americký dolar  |
| UV                    | Ultrafialové z angl. Ultraviolet  |
| VIS                   | Barevné spektrum z angl. Visible Spectrum   |

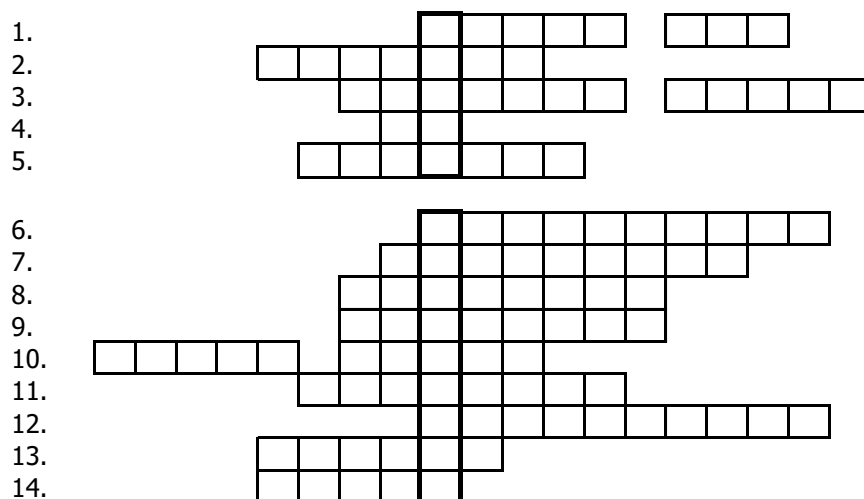
## 10. PŘÍLOHY

### 10.1 Pracovní list k didaktické části

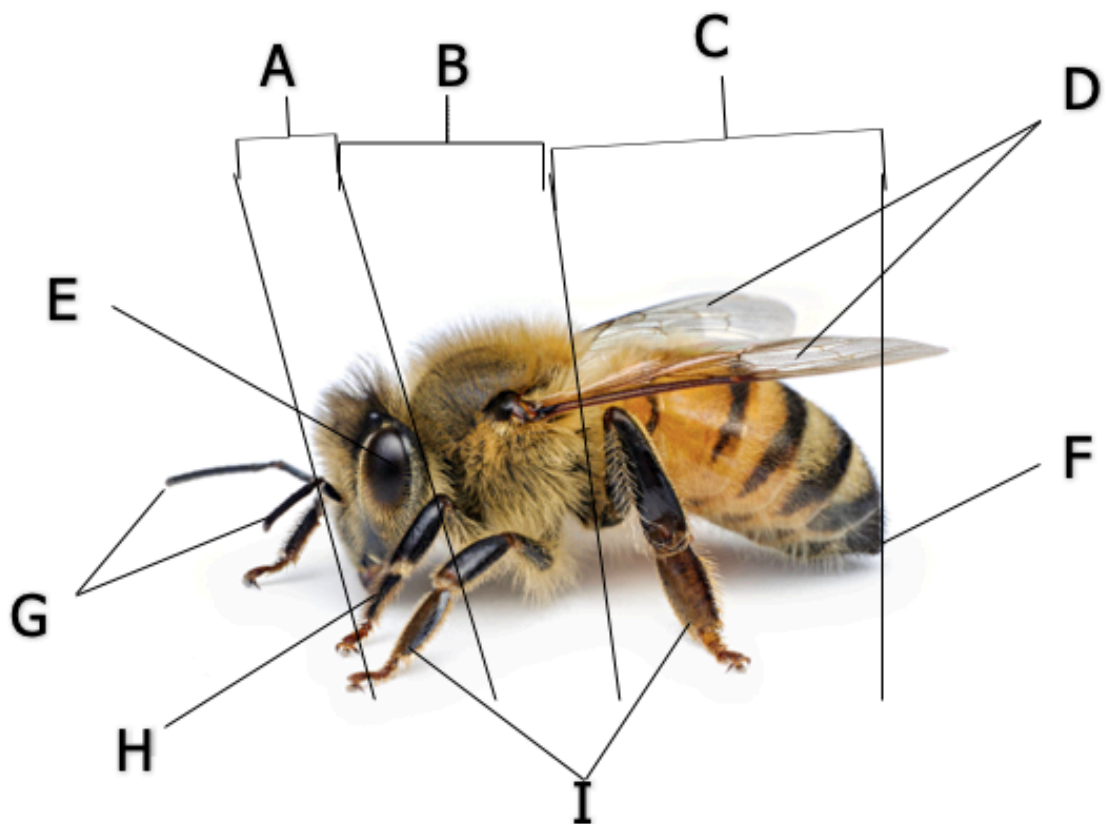
#### Pracovní list na téma včela medonosná (*Apis mellifera*) pro studenty všeobecného gymnázia

Cvičení 1: Vyplňte tajenku.

1. V žihadle včely se nachází...
2. Dělnice, která se stará o potravu pouze larev.
3. Včelí parazit.
4. Včelaři v něm chovají včely.
5. Dělnice obstarávají potravu pro celé včelstvo.
  
6. Matka se líhne v...
7. Chemikálie používané v zemědělství, které včelám škodí.
8. Výměšek mšic, který zároveň slouží včelám jako potravu.
9. Lepkává pryskyřičná substance, které včely sbírají na pupenech keřů a stromů.
10. Projev, kterým se včely mezi sebou dorozumívají.
11. Chemické substance, které mohou včely vylučovat a i se pomocí nich dorozumívají.
12. "Povolání," kterým se včela stává okolo 12. dnu života.
13. Přirozený způsob, kdy stará matka spolu s některými včelami opustí včelstvo, aby založila nové sídlo.
14. Po bodnutí včela...



Cvičení 2: Přiřad'te jednotlivým písmenům správný název.



Čisticí noha

Hlava

Hrud'

Pár křídel

Sběrací nohy

Složené oko

Tykadla

Zadeček

Žihadlo

Cvičení 3: Přiřad'te k obrázkům správné pojmy.

Matka

Propolis

*Varroa destructor*

Včelí plod

Trubec





Cvičení 4: Doplň chybějící údaje v tabulce.

| <b>Stáří</b> | <b>Povolání</b> | <b>Pracovní náplň</b>                                |
|--------------|-----------------|--|
| 2 - 4 hod.   |                 | Čistí buňky a připravuje je matce pro kladení larev. |
| 4 dny        | krmička         |  |
| 6 dní        |                 | Krmí matku mateří kašičkou.                          |
| 12 dní       |                 | Staví včelí dílo.                                    |
| 18 dní       | strážkyně       |  |
|              |                 | Zajišťuje potravu pro celé včelstvo.                 |

Cvičení 5: Doplň chybějící údaje v textu.

Včela medonosná patří mezi ..... hmyz. Tělo včely se skládá ze ..... částí: ....., ..... a ..... Včely žijí ve společenstvu, které nazýváme včelstvo. Každé včelstvo má určitou hierarchii. Zpravidla bývá složeno z jedné ....., která má za úkol ..... Dalšími členy včelstva jsou ....., jejichž úlohou je oplodnit matku nebo zahřívat včelí plod. Poslední kastou jsou .....

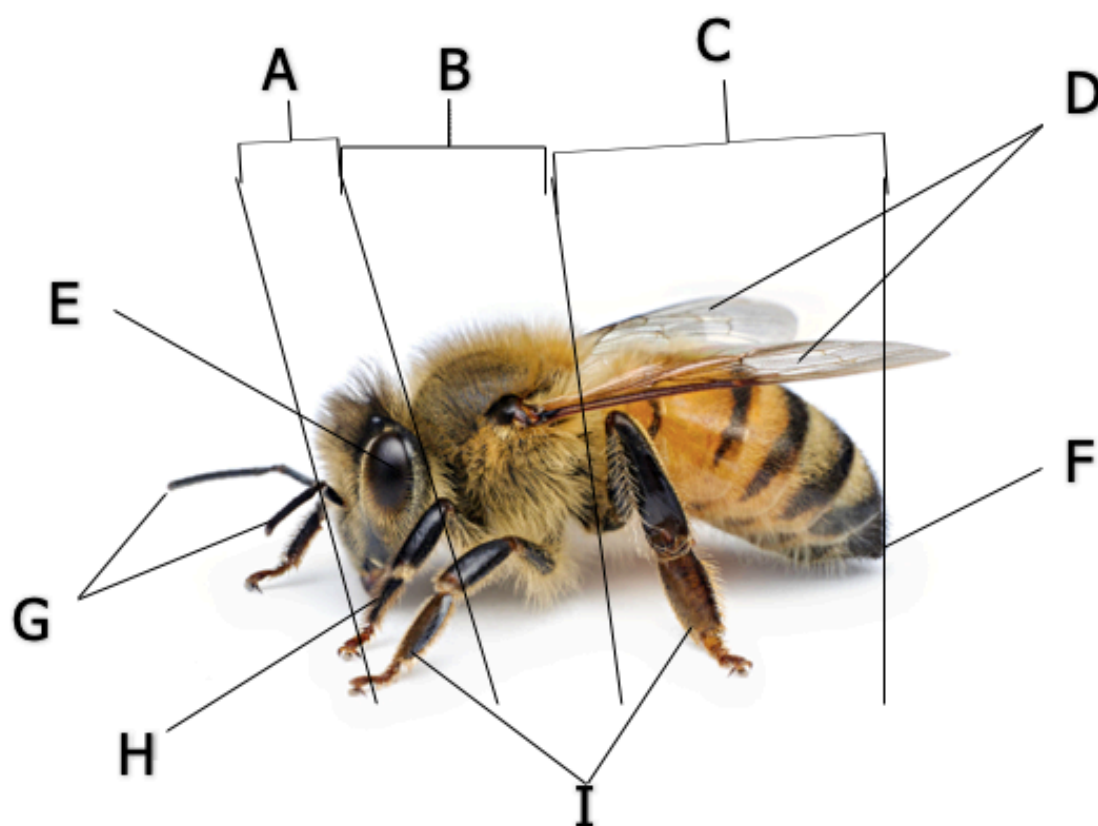
## Pracovní list na téma včela medonosná (*Apis mellifera*) pro učitele žáků X. ročníku všeobecného gymnázia

### Cvičení 1: Vyplňte tajenku.

1. V žihadle včely se nachází...
2. Dělnice, která se stará o potravu pouze larev.
3. Včelí parazit.
4. Včelaři v něm chovají včely.
5. Dělnice obstarávající potravu pro celé včelstvo.
6. Matka se líhne v...
7. Chemikálie používané v zemědělství, které včelám škodí.
8. Výměšek mšic, který zároveň slouží včelám jako potrava.
9. Lepkává pryskyřičná substance, které včely sbírají na pupenech keřů a stromů.
10. Projev, kterým se včely mezi sebou dorozumívají.
11. Chemické substance, které mohou včely vylučovat a i se pomocí nich dorozumívají.
12. "Povolání," kterým se včela stává okolo 12. dnu života.
13. Přírozený způsob, kdy stará matka spolu s některými včelami opustí včelstvo, aby založila nové sídlo.
14. Po bodnutí včela...

|     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1.  |   |   |   | V | Č | E | L | Í |   | J | E | D |   |   |   |   |   |
| 2.  | K | R | M | Í | Č | K | A |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 3.  |   |   | K | L | E | Š | T | Í | K | V | Č | E | L | Í |   |   |   |
| 4.  |   |   |   | Ú | L |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 5.  |   |   | L | É | T | A | V | K | A |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 6.  |   |   |   |   | M | A | T | E | Č | N | Í | C | Í | C | H |   |   |
| 7.  |   |   |   |   |   | P | E | S | T | Í | C | I | D | Y |   |   |   |
| 8.  |   |   |   |   |   |   | M | E | D | O | V | I | C | E |   |   |   |
| 9.  |   |   |   |   |   |   |   | P | R | O | P | O | L | I | S |   |   |
| 10. | V | Č | E | L | Í |   |   | T | A | N | E | C |   |   |   |   |   |
| 11. |   |   |   |   |   | F | E | R | O | M | O | N | Y |   |   |   |   |
| 12. |   |   |   |   |   |   |   | S | T | A | V | I | T | E | L | K | A |
| 13. |   |   |   |   |   |   |   |   | R | O | J | E | N | Í |   |   |   |
| 14. |   |   |   |   |   |   |   |   |   | U | M | Í | R | Á |   |   |   |

Cvičení 2: Přiřaďte jednotlivým písmenům správný název.



Čisticí noha - H

Hlava - A

Hrud' - B

Pár křídel - D

Sběrací nohy - I

Složené oko - E

Tykadla - G

Zadeček - C

Žihadlo - F

Cvičení 3: Přiřad'te k obrázkům správné pojmy.



Včelí plod



Matka



Propolis



*Varroa destructor*



Trubec

Cvičení 4: Doplň chybějící údaje v tabulce.

| <b>Stáří</b>  | <b>Povolání</b>   | <b>Pracovní náplň</b>                                |
|---------------|-------------------|--|
| 2 - 4 hod.    | <i>čistička</i>   | Čistí buňky a připravuje je matce pro kladení larev. |
| 4 dny         | krmička           | <i>Zásobuje larvy potravou.</i>                      |
| 6 dní         | <i>kojička</i>    | Krmí matku mateří kašičkou.                          |
| 12 dní        | <i>stavitelka</i> | Staví včelí dílo.                                    |
| 18 dní        | strážkyně         | <i>Střeží vchod do úlu, tzv. česno.</i>              |
| <i>21 dní</i> | <i>létavka</i>    | Zajišťuje potravu pro celé včelstvo.                 |

Cvičení 5: Doplň chybějící údaje v textu.

Včela medonosná patří mezi .....blanokřídlý..... hmyz. Tělo včely se skládá ze 3 částí: hlavy, hrudi a zadečku. Včely žijí ve společenstvu, které nazýváme včelstvo. Každé včelstvo má určitou hierarchii. Zpravidla bývá složeno z jedné .....matky....., která má za úkol .....klást..... vejce..... Dalším členem včelstva jsou .....trubci....., jejichž úlohou je oplodnit matku nebo zahřívat včelí plod. Poslední kastou jsou .....dělnice.....

## 11. LITERATURA

1. Morse, R. A.; Calderone, N. W., The value of honey bees as pollinators of US crops in 2000. *Bee culture* **2000**, 128 (3), 1-15.
2. Sammataro, D.; Avitabile, A., *The beekeeper's handbook*. Cornell University Press: **1998**.
3. Veselý, V., *Včelařství*. Brázda: **2003**.
4. Winston, M. L.; Dropkin, J. A.; Taylor, O. R., Demography and life history characteristics of two honey bee races (*Apis mellifera*). *Oecologia* **1981**, 48 (3), 407-413.
5. Tautz, J.; Heilmann, H. R.; Matyásková, O., *Fenomenální včely: biologie včelstva jako superorganizmu*. Brázda: **2010**.
6. Drašar, J., *Včelařství*. 1. vyd. Praha: SZN **1978**, 312 (6).
7. Schönfeld, A. n., *Anatomie, morfologie a fyziologie včely medonosné*. **1955**.
8. Tomšík, B., *Včelařství*. 1. vyd. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd: **1953**.
9. Milne, L.; Milne, M.; Rayfield, S., *National Audubon Society Field Guide to Insects and Spiders of North America*. Knopf, New York, NY: **2000**.
10. Janota, D., *Včelařství*. Státní zemědělské naklad: **1954**.
11. Food and Agriculture Organization of the United Nations. *FAOSTAT statistics database*, Rome, Italy: FAO, **2018**.
12. Resh, V. H.; Cardé, R. T., *Encyclopedia of insects*. Academic Press: **2009**.
13. Khan, I. A.; Abourashed, E. A., *Leung's encyclopedia of common natural ingredients: used in food, drugs and cosmetics*. John Wiley & Sons: **2011**.
14. *Honey*. Encyclopædia Britannica Inc: **2016**.
15. Badawy, O.; Shafii, S.; Tharwat, E.; Kamal, A., Antibacterial activity of bee honey and its therapeutic usefulness against *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella typhimurium* infection. *Rev Sci Tech* **2004**, 23 (3), 1011-22.
16. Fratini, F.; Cilia, G.; Mancini, S.; Felicioli, A., Royal Jelly: An ancient remedy with remarkable antibacterial properties. *Microbiological research* **2016**, 192, 130-141.

17. Hattori, N.; Nomoto, H.; Fukumitsu, H.; Mishima, S.; Furukawa, S., Royal jelly and its unique fatty acid, 10-hydroxy-trans-2-decenoic acid, promote neurogenesis by neural stem/progenitor cells *in vitro*. *Biomedical research* **2007**, *28* (5), 261-266.
18. Suzuki, K.-M.; Isohama, Y.; Maruyama, H.; Yamada, Y.; Narita, Y.; Ohta, S.; Araki, Y.; Miyata, T.; Mishima, S., Estrogenic activities of fatty acids and a sterol isolated from royal jelly. *Evidence-based complementary and alternative medicine* **2008**, *5* (3), 295-302.
19. Ito, S.; Nitta, Y.; Fukumitsu, H.; Soumiya, H.; Ikeno, K.; Nakamura, T.; Furukawa, S., Antidepressant-like activity of 10-hydroxy-trans-2-decenoic acid, a unique unsaturated fatty acid of royal jelly, in stress-inducible depression-like mouse model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2012**.
20. *Royal jelly*. Encyclopædia Britannica Inc: **2016**.
21. Coutinho, D.; Karibasappa, S.; Mehta, D., Royal Jelly Antimicrobial Activity against *Periodontopathic Bacteria*. *Journal of Interdisciplinary Dentistry* **2018**, *8* (1).
22. Sforcin, J., Propolis and the immune system: a review. *Journal of ethnopharmacology* **2007**, *113* (1), 1-14.
23. Falcão, S. I.; Vale, N.; Gomes, P.; Domingues, M. R.; Freire, C.; Cardoso, S. M.; Vilas-Boas, M., Phenolic profiling of Portuguese propolis by LC–MS spectrometry: uncommon propolis rich in flavonoid glycosides. *Phytochemical Analysis* **2013**, *24* (4), 309-318.
24. Kodíček, M.; Valentová, O.; Hynek, R., *Biochemie, chemický pohled na biologický svět*. VŠCHT Praha: **2015**.
25. The UniProt Consortium; UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic acids research* **2019**, *47* (Issue D1), D506-D515.
26. *Reaxys*. [Frankfurt, Germany] ; [New York, NY] : Elsevier.
27. Cousins, K. R., *ChemDraw Ultra 9.0*. CambridgeSoft, 100 CambridgePark Drive, Cambridge, MA 02140. ACS Publications: **2005**.
28. vanEngelsdorp, D.; Evans, J. D.; Saegerman, C.; Mullin, C.; Haubruge, E.; Nguyen, B. K.; Frazier, M.; Frazier, J.; Cox-Foster, D.; Chen, Y.; Underwood,

- R.; Tarpy, D. R.; Pettis, J. S.; Brown, J., Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. *PLOS ONE* **2009**, *4* (8), e6481-e6481.
29. Goulson, D.; Nicholls, E.; Botías, C.; Rotheray, E. L., Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*. New York, NY: **2015**, *347* (6229), 1255957-1255957.
  30. Evans, J. D.; Schwarz, R. S., Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee health. *Trends in microbiology* **2011**, *19* (12), 614-620.
  31. de Villiers, M. M.; van Eeden, C. M.; Liebenberg, W.; Song, M.; Kolling, W. M.; Caira, M. R., Structural characterization, physicochemical properties, suspension stability, and adsorption properties of four solid forms of amitraz. *Journal of agricultural and food chemistry* **2004**, *52* (24), 7362-7369.
  32. Williams, H.; Mertens, C.; Becker, K.; Miculka, C.; Streber, W., *Composition for Enhanced Antiparasitic Activity*. Google Patents: **2010**.
  33. Al-Thani, R. K.; Al-Thani, A. S.; Elbetieha, A.; Darmani, H., Assessment of reproductive and fertility effects of amitraz pesticide in male mice. *Toxicology letters* **2003**, *138* (3), 253-260.
  34. Aydin, K.; Kurtoglu, S.; Poyrazoglu, M. H.; Üzüm, K.; Üstünbas, H. B.; Hallaç, I. K., Amitraz poisoning in children: clinical and laboratory findings of eight cases. *Human & experimental toxicology* **1997**, *16* (11), 680-682.
  35. O'Neal, S. T.; Brewster, C. C.; Bloomquist, J. R.; Anderson, T. D., Amitraz and its metabolite modulate honey bee cardiac function and tolerance to viral infection. *Journal of Invertebrate Pathology* **2017**, *149*, 119-126.
  36. Maggi, M.; Gende, L.; Russo, K.; Fritz, R.; Eguaras, M., Bioactivity of *Rosmarinus officinalis* essential oils against *Apis mellifera*, *Varroa destructor* and *Paenibacillus* larvae related to the drying treatment of the plant material. *Natural product research* **2011**, *25* (4), 397-406.
  37. Janowicz, P.; Baldan, A.; Baldan, V.; Baldan, F.; Baldan, A., *Composition and method for delivering chemical agent to insects*. Google Patents: **2006**.
  38. Coordinators, N. R., Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic acids research* **2016**, *44* (Database issue), D7.



39. Johnson, R. M.; Huang, Z. Y.; Berenbaum, M. R., Role of detoxification in *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) tolerance of the miticide tau-fluvalinate. *International Journal of Acarology* **2010**, *36* (1), 1-6.
40. Johnson, R. M.; Dahlgren, L.; Siegfried, B. D.; Ellis, M. D., Acaricide, fungicide and drug interactions in honey bees (*Apis mellifera*). *PLOS ONE* **2013**, *8* (1), e54092.
41. Mullin, C. A.; Frazier, M.; Frazier, J. L.; Ashcraft, S.; Simonds, R.; Pettis, J. S., High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PLOS ONE* **2010**, *5* (3), e9754.
42. González-Cabrera, J.; Rodríguez-Vargas, S.; Davies, T. E.; Field, L. M.; Schmehl, D.; Ellis, J. D.; Krieger, K.; Williamson, M. S., Novel Mutations in the voltage-gated sodium channel of pyrethroid-resistant *Varroa destructor* populations from the Southeastern USA. *PLOS ONE* **2016**, *11* (5), e0155332.
43. Mao, W.; Schuler, M. A.; Berenbaum, M. R., Honey constituents up-regulate detoxification and immunity genes in the western honey bee *Apis mellifera*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2013**, *110* (22), 8842-8846.
44. Campos, M.; Markham, K. R.; Mitchell, K. A.; da Cunha, A. P., An approach to the characterization of bee pollens via their flavonoid/phenolic profiles. *Phytochemical Analysis* **1997**, *8* (4), 181-185.
45. Kenjerić, D.; Mandić, M. L.; Primorac, L.; Bubalo, D.; Perl, A., Flavonoid profile of Robinia honeys produced in Croatia. *Food Chemistry* **2007**, *102* (3), 683-690.
46. Medina, Á.; González, G.; Sáez, J. M.; Mateo, R.; Jiménez, M., Bee pollen, a substrate that stimulates ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Systematic and applied microbiology* **2004**, *27* (2), 261-267.
47. Gonzalez, G.; Hinojo, M.; Mateo, R.; Medina, A.; Jiménez, M., Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. *International journal of food microbiology* **2005**, *105* (1), 1-9.
48. Rosenkranz, P.; Aumeier, P.; Ziegelmann, B., Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of invertebrate pathology* **2010**, *103*, S96-S119.

49. Feyereisen, R., Insect cytochrome P450. *Comprehensive Molecular Insect Science*. **2005**, *4*, 1-77.
50. Daborn, P. J.; Le Goff, G., The genetics and genomics of insecticide resistance. *TRENDS in Genetics* **2004**, *20* (3), 163-170.
51. Johnson, R. M.; Mao, W.; Pollock, H. S.; Niu, G.; Schuler, M. A.; Berenbaum, M. R., Ecologically appropriate xenobiotics induce cytochrome P450s in *Apis mellifera*. *PLOS ONE* **2012**, *7* (2), e31051.
52. Claudianos, C.; Ranson, H.; Johnson, R.; Biswas, S.; Schuler, M.; Berenbaum, M.; Feyereisen, R.; Oakeshott, J. G., A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect molecular biology* **2006**, *15* (5), 615-636.
53. Niu, G.; Johnson, R. M.; Berenbaum, M. R., Toxicity of mycotoxins to honeybees and its amelioration by propolis. *Apidologie* **2010**.
54. Johnson, R. M.; Wen, Z.; Schuler, M. A.; Berenbaum, M. R., Mediation of pyrethroid insecticide toxicity to honey bees (*Hymenoptera: Apidae*) by cytochrome P450 monooxygenases. *Journal of economic entomology* **2006**, *99* (4), 1046-1050.
55. Mao, W.; Schuler, M. A.; Berenbaum, M. R., *CYP9Q*-mediated detoxification of acaricides in the honey bee (*Apis mellifera*). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011**, *108* (31), 12657-12662.
56. Pilling, E.; Bromleychallenor, K.; Walker, C.; Jepson, P., Mechanism of synergism between the pyrethroid insecticide  $\lambda$ -cyhalothrin and the imidazole fungicide prochloraz, in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **1995**, *51* (1), 1-11.
57. Johnson, R. M.; Pollock, H. S.; Berenbaum, M. R., Synergistic interactions between in-hive miticides in *Apis mellifera*. *Journal of economic entomology* **2009**, *102* (2), 474-479.
58. Hardstone, M. C.; Scott, J. G., Is *Apis mellifera* more sensitive to insecticides than other insects? *Pest management science* **2010**, *66* (11), 1171-1180.
59. Nebert, D. W.; Gonzalez, F. J., P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annual review of biochemistry* **1987**, *56* (1), 945-993.

60. Kezić, N.; Lucić, D.; Sulimanović, D., Induction of mixed function oxidase activity in honey bee as a bioassay for detection of environmental xenobiotics. *Apidologie* **1992**, *23* (3), 217-223.
61. Terriere, L. C.; Yu, S. J., Induction of detoxifying enzymes in insects. *Journal of agricultural and food chemistry* **1974**, *22* (3), 366-373.
62. Agosin, M., Insect cytochrome P-450. *Molecular and cellular biochemistry* **1976**, *12* (1), 33-44.
63. Amichot, M.; Brun, A.; Cuany, A.; De Souza, G.; Le Mouel, T.; Bride, J.; Babault, M.; Salaün, J.; Rahmani, R.; Berge, J., Induction of cytochrome P450 activities in *Drosophila melanogaster* strains susceptible or resistant to insecticides. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* **1998**, *121* (1), 311-319.
64. Fisher, T.; Crane, M.; Callaghan, A., Induction of cytochrome P-450 activity in individual *Chironomus riparius* Meigen larvae exposed to xenobiotics. *Ecotoxicology and environmental safety* **2003**, *54* (1), 1-6.
65. Brattsten, L. B.; Wilkinson, C. F., Properties of 5-aminolaevulinatase and its relationship to microsomal mixed-function oxidation in the southern armyworm (*Spodoptera eridania*). *Biochemical Journal* **1975**, *150* (1), 97-104.
66. Simon, J. Y.; Ing, R. T., Microsomal biphenyl hydroxylase of fall armyworm larvae and its induction by allelochemicals and host plants. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* **1984**, *78* (1), 145-152.
67. Yu, S., Allelochemical stimulation of ecdysone 20-monooxygenase in fall armyworm larvae. *Archives of insect biochemistry and physiology* **1995**, *28* (4), 365-375.
68. Natsuhara, K.; Shimada, K.; Tanaka, T.; Miyata, T., Phenobarbital induction of permethrin detoxification and phenobarbital metabolism in susceptible and resistant strains of the beet armyworm *Spodoptera exigua* (Hübner). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **2004**, *79* (2), 33-41.

69. Anspaugh, D. D.; Roe, R. M., Regulation of JH epoxide hydrolase versus JH esterase activity in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, by juvenile hormone and xenobiotics. *Journal of insect physiology* **2005**, *51* (5), 523-535.
70. Brown, D.; Zhang, L.; Wen, Z.; Scott, J. G., Induction of P450 monooxygenases in the German cockroach, *Blattella germanica* L. *Archives of insect biochemistry and physiology* **2003**, *53* (3), 119-124.
71. Bull, D. L.; Ivie, G. W.; Beier, R. C.; Pryor, N. W., *In vitro* metabolism of a linear furanocoumarin (8-methoxypsoralen, xanthotoxin) by mixed-function oxidases of larvae of black swallowtail butterfly and fall armyworm. *Journal of chemical ecology* **1986**, *12* (4), 885-892.
72. Tanaka, E., Clinically significant pharmacokinetic drug interactions between antiepileptic drugs. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics* **1999**, *24* (2), 87-92.
73. Tushar, T.; Vinod, T.; Rajan, S.; Shashindran, C.; Adithan, C., Effect of honey on *CYP3A4*, *CYP2D6* and *CYP2C19* enzyme activity in healthy human volunteers. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* **2007**, *100* (4), 269-272.
74. Stevens, J. L.; Snyder, M. J.; Koener, J. F.; Feyereisen, R., Inducible P450s of the *CYP9* family from larval *Manduca sexta* midgut. *Insect biochemistry and molecular biology* **2000**, *30* (7), 559-568.
75. Simone-Finstrom, M.; Spivak, M., Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie* **2010**, *41* (3), 295-311.
76. Furgala, B.; McCutcheon, D., Wintering productive colonies. *Hive and Honey Bee edited by Joe M. Graham-Hamilton, Illinois: Dadant&Sons* **1992**, 829-868.
77. Brodschneider, R.; Crailsheim, K., Nutrition and health in honey bees. *Apidologie* **2010**, *41* (3), 278-294.
78. LeBlanc, B. W.; Eggleston, G.; Sammataro, D.; Cornett, C.; Dufault, R.; Deeby, T.; St. Cyr, E., Formation of hydroxymethylfurfural in domestic high-fructose corn syrup and its toxicity to the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57* (16), 7369-7376.

79. Mao, W.; Schuler, M. A.; Berenbaum, M. R., A dietary phytochemical alters caste-associated gene expression in honey bees. *Science advances* **2015**, *1* (7), e1500795.
80. Schmehl, D. R.; Teal, P. E.; Frazier, J. L.; Grozinger, C. M., Genomic analysis of the interaction between pesticide exposure and nutrition in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of insect physiology* **2014**, *71*, 177-190.
81. Boncristiani, H.; Underwood, R.; Schwarz, R.; Evans, J. D.; Pettis, J., Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees *Apis mellifera*. *Journal of insect physiology* **2012**, *58* (5), 613-620.
82. Hýbl, M., Význam opylovatelů pro bioindikaci pesticidů a dopad intenzivního zemědělství na krajinu. *Moderní včelař* **2019**, *2*, 2.
83. Crane, E., Bees, honey and pollen as indicators of metals in the environment. *Bee World*. UK: **1984**.
84. Porrini, C.; Caprio, E.; Tesoriero, D.; Di Prisco, G., Using honey bee as bioindicator of chemicals in Campanian agroecosystems (South Italy). *Bulletin of Insectology* **2014**, *67* (1), 137-146.
85. Erban, T., *Hodnocení vlivu xenobiotik na včely v průběhu ontogeneze metodami proteomické, metabolické a genomické analýzy*. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.: Praha: **2016**.