

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Alkaloidy v nektaru: vliv na preferenci pastvy a toxicitu
vůči larvám včel *in vitro*
Diplomová práce**

Autor práce: Bc. Lýdia Stanková

Vedoucí práce: doc. Ing. Jaroslav Havlík, Ph.D.

© 2014 ČZU v Praze

Čestné prehlásenie

Prehlasujem, že svoju diplomovú prácu "Alkaloidy v nektaru: vliv na preferenci pastvy a toxicitu vůči larvám včel in vitro" som vypracovala samostatne pod vedením vedúceho diplomovej práce a s použitím odbornej literatúry a ďalších informačných zdrojov, ktoré sú citované v práci a uvedené v zozname literatúry na konci práce. Ako autorka uvedenej diplomovej práce ďalej prehlasujem, že som v súvislosti s inými výtvormi neporušil autorské práva tretích osôb.

V Prahe dňa _____

Pod'akovanie

Touto cestou by som rada pod'akovala doc. Ing. Jaroslavovi Havlíkovi, PhD., (Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky, Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů). Pod'akovanie patrí aj kolektívu pracovníkov KMVD a Výskumnému ústavu včelárskemu s.r.o. Libčice nad Vltavou. Taktiež by som rada pod'akovala Ing. Zuzane Hroncovej za cenné rady a pomoc vo všetkých ohľadoch. Moja najväčšia vďaka však patrí rodičom, ktorý mi umožnili študovať a v každom smere ma podporovali.

Táto štúdia bola podporovaná Grantom NAZV QJ1210047: Vývoj nových prostriedkov pre podporu imunity včiel, prevenciu a liečbu včelích ochorení a grantom CIGA 20132013.

Alkaloidy v nektaru: vliv na preferenci pastvy a toxicitu vůči larvám včel *in vitro*

Súhrn

Výskyt alkaloidov, z ktorých mnohé patria medzi jedovaté látky, v nektári by sa mohol javiť paradoxný. Jednou z teórií ich výskytu je, že tieto látky vytvárajú filter pre opel'ovače. Existujú tiež teórie nazeraajúce na ich výskyt ako na výskyt látok poskytujúcich včelám antimikrobiálnu ochranu proti patogénom, pretože rada z nich vykazuje antimikrobiálny účinok. Cieľom práce je odhaliť preferencie včiel voči nízkym koncentráciám alkaloidov v modeli s použitím umelých kvetov. Bol sledovaný vplyv preferencie alebo repelencie roztokov v umelých kvetoch v roztoku umelého nektáru (roztok 20% sacharózy) v koncentračnom rozmedzí 50,0; 16,7; 5,6; 1,9; 0,6; 0,2 $\mu\text{g/ml}$. Experiment bol uskutočnený v desiatich nadväzujúcich opakovaníach. Design bol prevedený podľa Gegear a kol. (2007) s miernymi modifikáciami a bol plne randomizovaný po každom opakovaní, aby sa obmedzili pamäťové efekty včiel. Zo štyroch testovaných alkaloidov bol najviac preferovaný kofeín v koncentrácií 0,2 až 1,9 $\mu\text{g/ml}$, ktorý o 20 % presahoval preferenciu kontrolného roztoku bez prídavku alkaloidov. Najväčší repelentný účinok vykazoval senecionin, ktorý včely odpuzoval pri všetkých testovaných koncentráciách.

K potvrdeniu možných účinkov alkaloidov v obrane včiel proti mikroorganizmom bol uskutočnený iný experiment, v ktorom bola včelám podávaná potrava s obsahom extraktu z rastliny *M. cordata*. Táto rastlina je význačná vysokým množstvom sanguinarinu a chelerythrinu a podľa hypotézy by mierne dávky alkaloidov mali znížiť životaschopnosť včelích lariev. Ich účinok bol porovnávaný s kontrolou bez prídavku týchto látok a kontrolou, v ktorej boli použité antibiotiká. Bolo sledované prežitie normálnych lariev pod prirodzeným infekčným tlakom, teda neboli umelo infikované žiadnym ochorením. Podávanie zmesi alkaloidov z *M. cordata* nevedlo k zvýšeniu odolnosti jedincov, ale naopak k ich zníženiu. Rovnaké výsledky boli pozorované aj v kontrole s antibiotikami. Takýto rozpor sa ukázal ako dôsledok použitia dimethylsulfoxidu. Výsledky nášho výskumu prispievajú k pochopeniu vzťahov medzi rastlinami a opel'ovačmi.

Klíčová slova: Včela medonosná, *in vitro* odchov lariev, alkaloidy, preferencia, kofeín, nikotín, senecionin, sanguinarin, *M. cordata*.

Nectar alkaloids: feeding preference and larval toxicity *in vitro*

Summary

The presence of alkaloids, many of which belong to toxic substances in the nectar could appear paradoxical. One theory of its occurrence claims that these substances create a filter to pollinators. However, there are also theories, viewing them as the occurrence of the presence of substances that provide the bee's antimicrobial defence against pathogens. It is true that a row of alkaloids exhibits antimicrobial activity. The goal of this work is to reveal preferences of bees to the low concentrations of alkaloids in a model using artificial flowers. An impact of preference or repellence solutions in artificial nectar in artificial flowers (20% sucrose solution) in the concentration range of 50.0; 16.7, 5.6, 1.9, 0.6, 0.2 mg/μl was studied. The experiment was conducted in ten gradual repetitions. Design of the experiment has been derived under Gegear et al. (2007) with slight modifications and was always fully randomized after each repetition order to limit memory effects of bees. Out of four tested alkaloids caffeine in concentrations from 0.2 to 1.9 mg/ml was the most preferred, which exceeded the preference control solution by 20 % without an addition of alkaloids. The greatest repellence showed senecionin that was repelled by the bees at all concentrations which were tested.

Another experiment in which the bees were supplied with food consisting the plant extract of *M. cordata* was performed to confirm the potential effect of alkaloids in bees' defence against microorganisms. This plant has an outstanding high amounts of sangvinarin and chelerythrine, and, according to the hypothesis, mild doses of alkaloids should reduce the viability of the bee larvae. The effect was compared with the control without addition of these substances as well as with the control in which antibiotics were used. Survival of the normal larvae under the natural infection pressure was observed too. Thus larvae were not artificially infected with any disease. Administration of a mixture of alkaloids from *M. cordata* does not increase the resistance of larvae, but rather decrease it, as well as antibiotics check. This contradiction emerged as a result of the use of dimethylsulfoxide. The results of this research contribute to understanding of the relationships between plants and pollinators.

Keywords: Honey bee, *in vitro* rearing of larvae, alkaloids, preference, caffeine, nicotine, senecionin, sangvinarin, *M. cordata*

Obsah

1. Úvod	8
2. Cieľ práce	9
3. Včelí tráviaci trakt a jeho mikroflóra	10
3.1 Tráviaci trakt.....	10
3.2 Mikroflóra tráviaceho traktu.....	12
4. Požiadavky na výživu a zdroje potravy	13
4.1 Peľ.....	13
4.2 Nektár.....	15
5. Sekundárne metabolity v peľi a nektári.....	16
5.1 Fenolické látky.....	18
5.2 Alkaloidy	20
5.3 Glykosidy	23
6. Vplyv alkaloidov na mortalitu a zdravie kolónií.....	25
7. Ochorenia včiel súvisiace so stravou	30
7.1 Úhyn plodu hladom.....	31
7.2 Úplavica včiel (<i>Laxatio apium</i>).....	31
7.3 Peľová zápcha včiel (<i>Obstipatio pollinaris apium</i>)	31
7.4 Toxikózy včiel (<i>Intoxicaciones apium</i>).....	32
7.4.1 Peľové toxikózy	32
7.4.2 Nektárové toxikózy.....	32
7.4.3 Medovicové toxikózy	33
8. Experimentálna časť.....	34
8.1 Experiment – Preferenčný test.....	34
8.1.1 Materiál.....	34
8.1.2 Príprava umelých kvetov a dosky.....	34
8.1.2.1 Umelé kvety	34
8.1.2.2 Polyesterová doska.....	35
8.1.3 Príprava roztokov.....	35
8.1.4 Postup preferenčných testov	36
8.2 Experiment – Umelý odchov larvičiek	38
8.2.1 Materiál.....	38
8.2.2 Príprava roztokov.....	38
8.2.3 Príprava kultivačnej doštičky.....	39
8.2.4 Príprava diéty.....	39
8.2.5 Postup pri larvovaní a odchove larvičiek.....	40

9. Výsledky.....	42
9.1 Výsledky preferenčného testu	42
9.2 Výsledky – Umelý odchov larvičiek.....	43
10.Diskusia.....	44
11.Záver	48
12.Zoznam použitej literatúry	49
13.Obrazová príloha	55
14.Zoznam tabuliek.....	57
15.Zoznam obrázkov.....	58
16.Zoznam skratiek.....	59

1. Úvod

Včelárstvo je jedným z najstarších odborov ľudskej činnosti. Včelárili už dokonca starí Egypťania, včelie produkty boli pre človeka dôležitou zložkou potravy od samého začiatku vývoja a svoje miesto vo výžive si udržiavajú dodnes. Rovnako dôležitá je aj schopnosť včiel opelovať rastliny a tým zvyšovať výnosy pri pestovaní kultúrnych plodín. Život včelieho spoločenstva a chov včiel je však nesmierne zaujímavý aj sám o sebe, a tak aj dnes je včelárstvo odborom, ktorý okrem hospodárskeho úžitku prispieva aj prospešnému tráveniu voľného času a rozvíjaniu vzťahu k prírode.

Vo vyspelých štátoch je včelárstvo významným odvetvím poľnohospodárskej výroby. Chov včiel je totiž dôležitý faktor intenzifikácie agroprodukcie a zohráva dôležitú úlohu aj pri udržaní biodiverzity životného prostredia. Okrem krajiny tvorby majú včely svoj význam aj z hľadiska výroby a spracovania včelích produktov vo forme potravín, farmaceutických výrobkov a kozmetických prípravkov.

Včely patria medzi blanokridly hmyz a do kmeňa článkonožcov. Medonosné a spoločenské včely sa delia na 4 druhy: včela zlatá, včela indická, včela kvetná, včela medonosná. Včela medonosná je rozšírená na celom svete. Jej pôvodná vlasť je Európa, India a Afrika, kým do ostatných častí sa dostala pomocou chovateľov. Podľa farby, tvaru a vnútornej povahy sa včela medonosná delí na druhy: včela severná, včela nordická, včela talianska, včela kaukazská.

Včely v prírode nachádzajú mnoho hodnotných zdrojov potravy a všetky rastliny, ktoré ju poskytujú tvoria tzv. včelíu pastvu. Patria sem rastliny hmyzosnubné poskytujúce nektár a peľ, či rastliny vetrosnubné poskytujúce predovšetkým peľ, ale aj rastliny hostiace producentov medovice. Všetky tieto tri zdroje sú rovnako významné. Všeobecne najlepšiu včelíu pastvu poskytuje krajina s vysokou biodiverzitou a teda mnohými druhmi rastlín.

2. Cieľ práce

V nektári niektorých rastlín sa vyskytujú v malej miere alkaloidy. Výskyt týchto mnohokrát toxických látok sa javí ako paradoxný. Cieľom práce je odhaliť preferencie včiel voči nízkym koncentráciám alkaloidov v modeli s použitím umelých kvetov. Model bude optimalizovaný a validovaný. Tiež bude sledovaný vplyv vybraných alkaloidov na životaschopnosť lariiev. Metóda bude optimalizovaná a zavedená do praxe.

Práca prispeje k pochopeniu širokých ekologických súvislostí medzi rastlinami, výživou včiel a ich zdravím.

3. Včelí tráviaci trakt a jeho mikroflóra

3.1 Tráviaci trakt

Tráviaci trakt slúži včele k prijímaniu a spracovaniu potravy; tiež k odstraňovaniu nestrávených zvyškov potravy z tela, ako aj k hromadeniu v dobe, kedy včely nemôžu z úľa vylietať (Veselý a kol., 1985).

Tráviaci trakt sa skladá z troch častí: prednej – *stomodeum*, žalúdka – *mesenteron* a zadnej časti – *proctodeum*. Z nich iba žalúdok vznikol z vnútorného zárodočného listu a má vlastný žľaznatý epitel, ktorý umožňuje trávenie. Ostatné dve časti vznikli vychlípením vonkajšieho zárodočného listu a majú obdobnú stavbu ako pokožka (Veselý a kol., 1985).

Vchod do tráviaceho traktu tvoria ústa (*os*) umiestnené medzi horným a dolným vnútorným pyskom (*epipharynx* a *hypopharynx*). Dolný vnútorný pysk je súčasťou hltanovej doštičky, po bokoch ktorej vyúsťujú hltanové žliazky. K prednej časti tráviaceho traktu patrí hltan (*pharynx*) a pažerák (*aesophagus*), ktorý sa v zadočku rozširuje do medného váčku (*vole*) (Veselý a kol., 1985).

Ústny otvor vedie priamo do hltanu, ktorý je v orálnom konci rozšírený viac než v ďalšej časti hltanovej rúry; má silnejšie vyvinuté svalstvo (Schönfeld, 1955). Táto trubica je tvorená jednovrstvovým epitelom, ktorý sa nachádza na podstavnej blanke (*tunica propria*) a vylučuje chitínový povlak obdobne ako bunky pokožky. Okolo hltanu sa nachádzajú okružné aj pozdĺžne svaly, ktoré spolu so svalmi upínajúcimi sa k hltanu a vnútornej strane čelného štítka ovplyvňujú rozširovanie a zužovanie hltanu, a tým nasávanie potravy a jej posun do ďalších častí tráviaceho traktu (Veselý a kol., 1985). Zadná stena (a čiastočne aj postranné steny) rozšírenej časti hltanu v blízkosti ústneho otvoru je vystužená zvláštnou doštičkou, nazývanou hltanová, do ktorej vyúsťuje hltanová žľaza. Priamo nad jej vyústením sú umiestnené zmyslové orgány. Hltanová rúra sa nezúčastňuje trávenia prijímanej potravy, potrava ňou iba prechádza do žalúdka (Schönfeld, 1955).

Pažerák prechádza hrudňou a má rovnakú stavbu ako hltan, posúvanie potravy je ovládané okružnými a pozdĺžnymi svalmi. V zadočku sa potom rozširuje v medný váček, taktiež rovnakej anatomickej stavby ako dve predchádzajúce časti. Ani v ňom nedochádza k tráveniu, iba k chemickej premene tekutej potravy (nektár, medovica), vďaka výlučkom žliaz do tráviaceho traktu a hlavovej časti. V medovom váčku takisto včely vyrábajú krmnu kašičku z peľu, medu a výlučkov hltanových žliaz, ktorou krmia staršie larvy.

Prechod potravy z medného vaku do žalúdka je regulovaný tzv. hrablicou (*proventriculus*), ktorá je vklinená, do medného vaku, tak aj do žalúdka. Okrem uvedenej funkcie bráni spätnému posunu natrávanej potravy zo žalúdka do medného vaku (Veselý a kol., 1985).

Žalúdok má podobu pretiahnutého, v kľučku stočeného vaku; v prednej časti je vak užší, rozširuje sa smerom dozadu (Schönfeld, 1955). Žalúdok je napojený k prednej a zadnej časti tráviaceho traktu pomocou chlopne vpredu (*valvula cardiaca*) a vzadu (*valvula pylorica*). Dĺžka žalúdka je 10 mm u robotnice, matka má 13 mm a trúd 19 mm dlhý žalúdok, široký ho majú rovnako približne 1,5 – 2 mm (Veselý a kol., 1985). Epitel žalúdka je zložený v početné kruhové záhyby - riasy, čím sa podstatne zvyšuje plocha žalúdka. Uskutočňuje sa tu sekrécia pri trávení a absorpcia látok (Schönfeld, 1955).

Pyloricou chlopňou je napojené tenké črevo (*ileum*). Jeho epiteliálne bunky vylučujú chitín. Je to tenká rúrka dĺžky okolo 7 mm s drsným vnútorným povrchom, ktorý zaisťuje spolu s drobnými chitínovými zúbkami pylorickej chlopne, rozdrobenie nestrávených zvyškov potravy a ich ďalší posun do konečníka (Veselý a kol., 1985).

Konečník (*rectum*) je posledná časť tráviaceho traktu. Často sa nazýva tiež výkalový vak. Slúži ako rezervoár nestrávených zvyškov potravy v dobe, kedy sa ich nemôžu včely dlhú dobu zbaviť. Stavba steny odpovedá epiteliálnym bunkám, ktoré sú nižšie. Konečník je formovaný do tvaru vaku. Naplnený vak môže tvoriť až 57 % hmotnosti tela včely. Rektálne žľazy v podobe šiestich prúžkov na povrchu prednej časti výkalového vaku bránia svojim sekretom kvaseniu a hnitiu nestrávených zvyškov potravy, čím ovplyvňujú zrejme vodný režim včely (Veselý a kol., 1985). Výkalový vak je početne pretkaný tracheami. Podľa rozborov v jeho stenách prebieha trávenie a zažívanie tukov z prijatého peľu, avšak len u včiel krmičiek a prezimujúcich včiel (Schönfeld, 1955).

3.2 Mikroflóra tráviaceho traktu

Baktérie predstavujú hlavnú zložku mikroflóry včely medonosnej (*Apis mellifera*) (Drobníková, 1990). Pokiaľ je včelstvo zdravé, vyskytujú sa gramnegatívne a grampozitívne baktérie v rovnakom množstve. Dominantnými skupinami sú Alfa-, Beta- a Grammaproteobacteria, Bacteroides a Firmicutes (Mohr a Tebbe, 2006). Z gramnegatívnych môžeme menovať zástupcov rodu *Acinetobacter*, *Erwinia*, *Proteus*, *Morganella*, *Klebsiella* a *Enterobacter* (Drobníková, 1990). Grampozitívne baktérie sú zastúpené hlavne v rodoch *Bacillus*, *Micrococcus* a *Staphylococcus* (Inglis et al., 1993). Nezastupiteľnú úlohu majú druhy rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* svojimi blahodarnými účinkami, ktorými sa môžu podieľať na ochrane hostiteľa pred infekciami (Ouwehand et al., 2002). Zo skupiny gramvariabilných baktérií nachádzame najčastejšie zástupcov rodu *Achromobacter*, *Lactobacillus* a *Corynebacterium* (Drobníková, 1990).

Baktériu sú prítomne už v larve a kokóne, ktoré chránia pred inváziou plesní a významne zvyšujú šance na prežitie (Kaltenpoth et al., 2005). Novo narodené včely získavajú črevnú mikroflóru výmenou potravy so staršími jedincami kolónie a konzumáciou peľu (Gilliam, 1997). Včela medonosná (*Apis mellifera*), má charakteristickú črevnú mikroflóru zloženú z mnohých druhov mikroorganizmov, ktoré sa zdajú byť špecifické pre sociálny hmyz. Udržovanie tejto stabilnej a odlišnej mikroflóry sa odvíja od sociálneho štýlu života tohto hmyzu. Rovnako ako u ostatných druhov zvierat, baktérie v črevách včiel zrejme riadia funkcie dôležité pre zdravie hostiteľa (Engel a Moran 2013). Probiotické baktérie môžu pomocou selektovaných proteínov spolupracovať s bunkami čreva hostiteľa a sprostredkovať tak komunikáciu baktéria – hostiteľ, a následne sa môžu prostredníctvom proteínov dorozumievať aj medzi sebou navzájom (Buck et al., 2005). Mikroskopické huby, s ktorými sa včela v prostredí stretne, sú pre ňu podmienené patogény. Pokiaľ je jedinec silný a zdravý, nepredstavujú pre neho väčšie nebezpečenstvo (Drobníková, 1983). Z obsahu čriev boli identifikované rody *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Epicoccus*, *Trichosporonoides* a *Mucor* (Gilliam a Prest 1972, Kačániová et al. 2009). Kvasinky sa vyskytujú v žalúdku včiel len výnimočne. Ak sú včely vystavené nepriaznivým podmienkam prostredia, môžu sa kvasinky premnožiť a narušiť rovnováhu organizmu. Vo výkalovom vaku včiel sa vyskytujú rody *Candida*, *Pichia* a *Hansenula* (Drobníková 1983). Inglis et al. (1993) sa zmieňuje, že ďaleko viac kvasiniek bolo izolovaných z nektáru, peľu a zo zásob potravy, než z čreva a trusu hmyzu. Táto informácia len potvrdzuje predchádzajúce zmienenie sa o výskytu kvasiniek u chorých alebo oslabených včiel.

4. Požiadavky na výživu a zdroje potravy

Zdrojom energie pre všetko živé na Zemi je Slnko. Zelené rastliny túto energiu slnečného svetla využívajú pre biosyntézu zložitých molekúl, schopných túto energiu uchovať a predať. Všetky živočíchy vrátane včiel sú závislé na rastlinách. Aby včela mohla žiť, musí mať stále potrebnú potravu, z ktorej získava energiu a stavebné látky (Veselý a kol., 1985).

Podobne ako ostatné živočíchy potrebujú aj včely dostatok potravy. Vyžadujú vyvážený pomer cukrov, bielkovín, tukov, vitamínov a minerálov. Prirodzenými zložkami včelej potravy je nektár a peľ. Pri zbere a ukladaní týchto surovín pridávajú včely výlučky svojich žliaz. Dodané enzýmy žliaz štiepia zložitejšie látky aj mimo telo včely, v bunkách plástu. Nepostrádateľnou súčasťou života včiel je samozrejme voda. Napomáha udržiavať teplotu a vlhkosť v priestore obývanom včelami, zároveň sa využíva pri spracovaní a rozdelení potravy vrátane zásob. Nektár (sladké šťavy rastlín) prípadne medovica obohatené o výlučky žliaz predstavujú dôležitý zdroj energie nevyhnutný pre správny rast, rozmnožovanie, lietanie, tvorbu tepla, glykogénu a ďalšie činnosti. V prípade dostatočného množstva ich včely ukládajú do buniek v podobe medu. Hlavným zdrojom bielkovín, aminokyselín, tukov prípadne minerálnych látok a vitamínov je bezpochyby peľ (Rada V. a kol. 2009).

4.1 Peľ

Peľové zná sú samčie pohlavné bunky rastlín, ktoré sa vytvárajú v prášniciach tyčínok, tj. v samčích pohlavných orgánoch kvetu. Tvar, veľkosť a povrchová štruktúra peľového zrna je rôzna, edične ustálená pre každý rastlinný druh. Veľkosť peľových zrn sa pohybuje od veľmi drobných zrn nezábudky (2 – 3 mikrometre) až po veľké peľové zrná tekvice (200 – 250 mikrometrov); u tých je veľkosť pre včely už zrejme prílišná – pravdepodobne sa im z nich zle vytvárajú peľové rúška. Peľové zrná môžu byť guľovité, elipsoidné, pozdĺžne, oválne a pod. Množstvo peľu, ktoré poskytuje jeden kvet či kvetenstvo je veľmi rozdielne. Všetky však vytvárajú oveľa viac peľu ako je ho treba pre dostatočné opelenie kvetov (Kubišová S. 1988).

Včely donášajú peľ ako svoju základnú potravu v rúškach na zadnom páre nôh. Ruškujú peľ z jedného druhu rastliny – monotropický odber, a preto môžeme podľa farby rúška peľ druhovo triediť. Rúškovaný peľ môže ešte aspoň čiastočne klíčiť. Pri spracovaní pridávajú včely k peľu látku zabraňujúcu klíčeniu. Výživné látky z peľu prechádzajú z väčšej časti pórmi v bunečnej blane bez väčšieho narušenia tráviacimi enzýmami. Nutričná hodnota

peľu závisí na mnohých faktoroch. Najviac sú cenené pele z vŕby, ďateliny, gaštanovníka siateho, horčice, maku a ovocných stromov (Veselý a kol., 1985).

Peľ je jediným zdrojom dusíkatých látok pre včelstvo a má rozhodujúci význam pre rast včelieho spoločenstva. Vlastný rast včelstva je rast lariev a včelieho plodu, kde je sústredená najväčšia intenzita premeny látok, a teda aj spotreba peľu. Larvy dostávajú v potrave peľ sprostredkovaný v podobe kŕmnej kašičky. Iba v posledných hodinách pred zaviečkovaním dostávajú larvy v potrave priamo peľ. Vysoká kvalita potravy umožňuje, aby vývoj včelej larvy prebehol vo veľmi krátkej dobe. Význam peľu je zásadný pre tvorbu sekretných hltanových žliaz, materskej kašičky (Kubišová S. 1988).

Peľ obsahuje do 30 % vody, rúškovaný peľ je vlhčí než peľ získaný priamo z rastlín bez včiel. Prevažnú časť sušiny tvoria spravidla cukry. Sú to hlavne polysacharidy škrob a celulóza, ktorá je pre peľ typická. Peľ obsahuje aj určité množstvo glukózy, fruktózy a sacharózy, ktoré môžu v súhrne dosahovať až 50 % všetkých cukrov. Ďalej obsahuje do 10 % lipidov, sterolov a mastných kyselín. Bielkoviny tvoria asi tretinu sušiny. Väčšina z nich sú enzýmy, ktorých je niekoľko tisíc. Taktiež obsahuje aj voľné aminokyseliny, tvoriace asi 6 % sušiny. Obsah vitamínov je omnoho vyšší než u ostatných včelích produktov s výnimkou materskej kašičky (Veselý a kol., 1985).

Tab.1: Základné zloženie peľu

Zložka	Obsah %
Voda	6 – 25
Celulóza	3 – 7
Sporopolenin	4 – 28
Cukry	13 – 37
Tuky	2 – 14
Bielkoviny	7 – 35
Popoloviny	2 – 10
Ostatné	-

Zdroj: Kubišová S., 1988.

4.2 Nektár

Nektár je sladký medový sekret kvetných žliazok, nazývaných medníky čiže nektárie (*nectaria*). Nektárie bývajú v kvetoch umiestnené najčastejšie veľmi hlboko. Tvar a skladba nektarií je pre každý druh rastliny individuálne typická. Takisto aj umiestnenie v kvete je vo vzťahu k postaveniu tyčiniek a blíz špecifické. Včelami prinášaný nektár je ukladaný neplánovane, dočasne do buniek plástu. Včely ho okamžite spracovávajú ustavičným prenášaním z provizórneho uloženia v bunkách až do definitívneho uskladnenia. Tým sa však značne znižuje rozloha plochy, ktorú pôvodne zaberá prinesený nektár. Čím dlhšie sa včely zaoberajú touto úpravou nektáru, tým viac, pokiaľ ide o obsah vody, je vyrovnanější konečný výrobok – med. Neustálym nasávaním nektáru do medného vâčku a opätovným vyvrhovaním do buniek sa obohacuje o ďalšie enzýmy z hltanových žliaz a tiež živočíšne bielkoviny. Opakované prenášanie nektáru z bunky do bunky, má za účel jeho zahustenie a obohatenie enzýmami (Schönfeld, 1955).

Nektár zbierajú lietavky vo veku 18 – 20 dní, však podľa potreby často už 11 dní staré alebo niekedy naopak staré až 30 dní. Spracovanie nektáru na med zabezpečujú mladušky vo veku 10 – 20 dní. Lietavka, ktorá priniesla plný medový vâчок nektáru, sa nezaobera jeho ďalším spracovaním a vyprázdňuje nektár priamo do bunky, výnimku činí iba v prípade veľkej znášky. Zahustenie nektáru majú na starosti mladušky. Zahustenie prebieha rýchlo až do 60 %; ďalšie zahustenie je už zdĺhavejšie; konečnú mieru hustoty odhaduje včela podľa odporu, aký spôsobuje nasávanie kvapaliny (Schönfeld, 1955).

Obsah vody v nektároch veľmi značne kolíše, podľa pôvodu obsahuje 30,98 – 93,76 % vody a niekedy aj viac. Nektár je v podstate vodný roztok cukrov. Počet rôznych druhov cukrov v nektároch je pomerne malý a ich obsah v nektároch rôznych rastlín značne kolíše. Vo väčšine dodnes analyzovaných nektárov sa najčastejšie nachádza sacharóza, prevláda však aj glukóza a fruktóza (Schönfeld, 1955). Ďalej obsahuje bielkoviny, minerálne látky, kyseliny a vitamíny. Farbív a aromatických látok obsahuje nektár len nepatrné množstvo (Lampeitl, 1996).

Zloženie a množstvo vylučovaného nektáru je závislé, ak prihliadame k špecifickým rozdielom medzi rastlinami, na mnohých faktoroch. Veľkú rolu zohrá často druh pôdy, množstvo živín a klimatické podmienky. Vplyv má taktiež denná doba. Takmer všetky rastliny poskytujú nektár v rôznu dennú dobu. Všeobecne vylučujú kvety viac nektáru ráno než popoludní. Tvorbu podporuje dusno a južný až juhozápadný vietor. Suché východné vetry naopak tvorbu nektáru skoro zastavujú (Lampeitl, 1996). Chemické zloženie nektáru sa

taktiež veľmi líši medzi druhmi rastlín, a dokonca aj medzi rôznymi typmi nektárov v rámci rovnakých druhov rastlín (Adler, 2001).

Tab. 2: Rozbory nektárov niektorých rastlín:

Rastlina	Celkový obsah cukrov (%)	Invertný cukor (%)	Sacharóza	Sušina (%)
Gaštan konský	68,6	0,3	68,3	66,8
Žerucha	46,3	11,3	35,0	40,9
Horčica poľná	46,2	36,2	10,0	32,1
Hluchavka	42,4	9,6	32,8	38,4
Čerešňa	35,1	16,2	18,9	33,6
Lipa	29,8	13,5	16,3	29,6
Jabloň	21,3	12,8	8,5	19,7
Slivka	12,9	4,5	8,4	14,7

Zdroj: Schönfeld, 1955

5. Sekundárne metabolity v peľi a nektári

Nektár je chemicky zložitá látka. Obsahuje primárne metabolity, ako sú cukry a aminokyseliny, u ktorých sa predpokladá, že zvyšujú rastlinnú spôsobilosť tým, že priťahujú opel'ovače, obsahuje taktiež sekundárne metabolity, ako sú fenoly, alkaloidy a neproteínové aminokyseliny, ktoré sú považované za odpudzovačov „zlodejov“ nektáru (Kessler and Baldwin, 2006).

Sekundárne metabolity (SC) nie sú v kvetinovom nektári nezvyčajné. Nektár niektorých rastlín môže byť odpudivý, alebo dokonca toxický pre kvetinových návštevníkov a rozšírený "toxický nektár" je zarážajúci vzhľadom k svojej atraktívnej úlohu v opel'ovaní (Singaravelan et. al., 2005). Je potrebné mať na pamäti niektoré vyslovené námietky a to:

- nektár, ktorý obsahuje sekundárne zlúčeniny nie je vždy toxický
- nektár, ktorý je odrádzajúci alebo toxický pre jeden druh kvetinových návštevníkov, nemusí mať vplyv na ostatné druhy
- jednotlivé sekundárne zlúčeniny môžu slúžiť viacerým úlohám a môžu pôsobiť vzájomne synergicky (Adler, 2001).

Toxicita nektáru, sama o sebe, nemusí byť vlastnosť, ktorá je udržiavaná, ale skôr vlastnosť, ktorá bola vybraná evolúciou, alebo vlastnosť, ktorá je dôsledkom iných vlastností, ktoré sú v súčasnosti na základe výberu. Môže sa vyskytovať v rastlinách, ktoré obsahujú vysoké množstvo sekundárnych metabolitov. V niekedy toxicita nektáru nesúvisí s obranou rastlín. Napríklad nektár *Lathraea clandestina* je toxický v dôsledku prítomnosti amoniaku, ktorý je v nektári vytvorený enzymatickou degradáciou aminokyselín. Nektár z *Epipactis orchidei* je toxický kvôli etanolu, ktorý je vyrobený mikroorganizmami žijúcimi v ňom. Zdá sa, že v týchto prípadoch je toxicita nektáru nezávislá na produkcii sekundárnych zlúčenín (Adler, 2001).

Odpudzovanie a toxicita SC u nektáru môže byť aktivovaná pomocou nepožiteľnosti alebo svojím účinkom na centrálny nervový systém kvetinových návštevníkov. V dôsledku toho môžu SC v nektári sprostredkovať interakcie rastlina - opeľovač ovplyvňujúce spôsobilosť týchto rastlín a opeľovačov. Viaceré adaptačné hypotézy boli pripravované na vysvetlenie ekologickej a evolučnej úlohy SC v nektári (Singaravelan et. al., 2005).

Medzi najčastejšie tvrdenia patrí, že SC odrádzajú „zlodejov“ nektáru a všestranné, alebo neefektívne opeľovače. Väčšina doteraz študovaných SC (napr. alkaloidy, glykosidy, fenolické látky) v skutočnosti odrádza včely (*Apis mellifera*) v širokom rozsahu vysokých koncentrácií. Účinky SC na včely sú závislé na dávke a období (Singaravelan et. al., 2005).

Cievnaté rastliny obsahujú obrovské množstvo chemických zlúčenín, odlišujú sa od medziproduktov a produktov z primárneho metabolizmu, ktoré sa líšia v závislosti od rodu a druhu. Obmedzená distribúcia z týchto zlúčenín im umožňuje použiteľnosť ako taxonomický symbol, a tzv. "sekundárne metabolity" zásadným spôsobom prispievajú k špecifickému zápachu, chuti a farbe rastlín. Pojem "sekundárny metabolit" je trochu neuspokojivý, pretože pokrýva náhodnú veľmi širokú škálu nepríbuzných zlúčenín a zahrnuje sekundárne nedôležitú úlohu. V minulosti boli tieto sekundárne metabolity zobrazené ako odpadové produkty vzniknuté z "chybovosti" primárneho metabolizmu, a teda málo dôležité pre rastlinný metabolizmus a rast. Je zrejmé, že takéto názory sú veľmi nepresné a zavádzajúce, a že mnohé vedľajšie produkty sú kľúčovými prvkami aktívneho a silného obranného mechanizmu (Bennett et al., 1994).

Tab. 3. Nektár vybraných rastlín obsahujúci sekundárne metabolity

Druh	Čeľad'	Sekundárny metabolit
Eul'kovec zlomocný (<i>Atropa belladonna</i>)	Lilkovité (<i>Solanaceae</i>)	Alkaloid
Anjelská trúba (<i>Brugmansia aurea</i>)	Lilkovité (<i>Solanaceae</i>)	Alkaloid
Tabák Virgínsky (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Lilkovité (<i>Solanaceae</i>)	Alkaloid
Zvonček repkový (<i>Campanula rapunculoides</i>)	Zvončekovité (<i>Campanulaceae</i>)	Alkaloid
Tekvica obyčajná (<i>Cucurbita pepo</i>)	Tekvicovité (<i>Cucurbitaceae</i>)	Alkaloid
Leknovec štítnatý (<i>Nymphoides peltata</i>)	Horčovitité (<i>Gentianaceae</i>)	Alkaloid
Kosatec žltý (<i>Iris pseudocorus</i>)	Kosatcovité (<i>Iridaceae</i>)	Alkaloid
Ľadenec rožkatý (<i>Lotus corniculatus</i>)	Bôbovitité (<i>Fabaceae</i>)	Alkaloid
Rhododendron (<i>Rhododendron ponticum</i>)	Vresovcovitých (<i>Ericaceae</i>)	Alkaloid
Hadinec skorocelový (<i>Echium plantagineum</i>)	<i>Boraginaceae</i>	Pyrolyzidínové alkaloidy

Zdroj: Adler L. S., 2001.

5.1 Fenolické látky

Fenolické látky tvoria veľmi rozsiahlu heterogénnu skupinu sekundárnych metabolitov. V rastlinnej ríši sú všadeprítomné, lebo len rastliny a mikroorganizmy majú schopnosť syntetizovať aromatické jadro. Živočíchy sú preto závislé na príjmu týchto látok vo výžive, prípadne na symbióze s mikrobiálnou populáciou, ktorá vedie k produkcii nepostrádateľných metabolitov. Fenolické látky sú prírodné, bezdusíkaté zlúčeniny, ktorých aromatické jadro vzniklo principiálne z metabolitov shikomovej kyseliny či polyacetátu, resp. kombináciou oboch. V rastlinných produktoch obecné, sa uplatňujú ako látky vonné a chuťové. Niektoré z

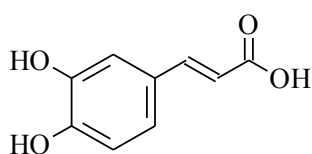
nich sú primárnymi zložkami silíc, prípadne vznikajú sekundárne (hlavne pôsobením mikroorganizmov z fenolických kyselín a lignínu). V prípade potravín vznikajú taktiež pri ich spracovaní, pri termických procesoch či ako vedľajšie produkty mliečného a alkoholového kvasenia. Kondenzované triesloviny (flavolany) sú nositeľmi trpkkej chuti, niektoré fenolické látky sú prírodnými farbivami (niektoré chinony, lignany, flavonoidy a im príbuzenské stilbety, xanthyony a iné) a prírodnými antioxidantmi (Míka a kol., 2001).

Väčšina prirodzene sa vyskytujúcich fenolových látok je prítomná ako konjugáty s mono- a polysacharidmi, spojených s jednou alebo viacerými fenolovými skupinami, a môžu sa vyskytovať aj ako funkčné deriváty, ako estery a metyl estery. Hoci táto štruktúrna rôznorodosť vedie k celej rade 22 fenolových zlúčenín, ktoré sa vyskytujú v prírode, môžeme ich v zásade rozdeliť do niekoľkých tried. Z nich sú fenolové kyseliny, flavonoidy a triesloviny považované za hlavné diétne fenolové zlúčeniny (Balasundram et al., 2005).

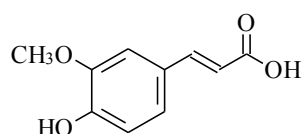
Polyfenolické látky sú súčasťou prakticky všetkých potravín. Niektoré fenoly vykazujú výrazné biologické účinky, a radia sa preto napr. medzi obranné látky rastlín zvané fytoalexiny, prírodné antioxidanty alebo prirodzene toxické látky (Velišek J., 2009).

V rastlinách bolo identifikovaných niekoľko tisíc fenolických látok s ohromnou rozmanitosťou štruktúr. Spoločným rysom je, že obsahujú jedno alebo viac aromatických jadier substituovaných hydroxylovými skupinami. Mnohé z týchto látok sú zastúpené v bežných potravinách, hlavne v ovocí, zelenine a niektorých nápojoch (Trna a Táborská).

Najčastejšie sa vyskytujú tri skupiny fenolických látok. A to fenolické kyseliny, flavonoidy a skupina stilbenov a lignanov, ktoré sú menej časté. Fenolické kyseliny sú prítomné v rade potravín. Najčastejšie je to kyselina kávová a jej estery, ďalej kyselina ferulová (Trna a Táborská).



Kyseliny kávová



Kyselina ferulová

Najbežnejším esterom kyseliny kávovej je kyselina chlorogenová, ktorá je prítomná v mnohých druhoch ovocia, zeleniny a káve. Bohatým zdrojom sú zemiaky, jablká, hrušky, marhule, broskyne, artičoky (Trna a Táborská).

Dominantný flavonoid v prírode je flavonol kvercetín. Kvercetín sa nachádza vo vysokých koncentráciách v bežných potravinách ako je cibuľa, jablká, kel, červené hrozno,

zelený a čierny čaj. V týchto zdrojoch sa nachádza jednak vo forme voľnej a viazaný s cukornými jednotkami. Flavonoly sú významné „citrusové“ flavonoidy. Sú to látky typicky sa vyskytujúce v pomarančoch a grepfruitoch. Zvláštnu skupinu flavonoidov tvoria isoflavonoidy. Patrí k nim predovšetkým daidzein a genistein. Nachádzajú sa hlavne v strukovinách, výdatným zdrojom je hlavne sója (Trna a Táborská).

5.2 Alkaloidy

Alkaloidy sú prírodné látky obsahujúce jeden alebo viac atómov dusíka amínového charakteru, ktoré môžu byť zabudované v kruhu (heterocyklické alkaloidy), alebo v alifatickom reťazci (alkaloidy s exocyklickým atómom dusíka). Celý rad substrátov obsahujúcich alkaloidy bol známy (aj zneužívaný) už v stredoveku, ba i dávno predtým. Veľmi dlho sú známe aj účinky *ópia* a látok v ňom obsiahnutých. Výrazný fyziologický účinok alkaloidov spôsobil, že už v 19. storočí boli izolované typické alkaloidy ako sú morfín, strychnín, chinín, nikotín, kodeín, papaverín. Účinok alkaloidov sa často prejavuje ich extrémnou toxicitou, na druhej strane však mnohé majú v subletálnych dávkach terapeuticky veľmi výhodné farmakologické vlastnosti a používajú sa ako dôležité liečivá (Koreňová, 2008). Medzi základné vlastnosti alkaloidov patrí ich bazicita, ktorú vyvoláva atóm dusíka v molekule. Sú málo rozpustné vo vode a naopak dobre rozpustné v slabo polárnych a nepolárnych rozpúšťadlách (napr. diethylether, ethanol, chloroform) (Aniszewski, 2007). Niektoré alkaloidy môžu mať tiež antibakteriálny a antivírusový účinok alebo môžu zabráňovať tvorbe plesní. Tieto vlastnosti potom môžu rastliny využívať ako ochranu pred zvieratami (Macholán, 1998).

Objavujú sa domnienky, že by alkaloidy mohli sprostredkovať tzv. allelopatiu (Macholán, 1998), medzidruhovú interakciu medzi dvoma a viacerými organizmami, kde jeden z organizmov (amenzál) je negatívne ovplyvňovaný chemickými látkami druhého organizmu (inhibítor). Inhibítor môže vypúšťať aj viac druhov látok a nie je nijak ovplyvnený amenzálom (Aniszewski, 2007).

Alkaloidy sa obyčajne nachádzajú u vyšších druhov rastlín, ale našli sa aj v niektorých papradiach, prasličkách i hubách (*Claviseps purpurea*, *Psilocybe*). Doposiaľ sa alkaloidy našli približne v 4000 rastlinných druhoch a odhaduje sa, že asi 10 – 20 % všetkých rastlín obsahuje alkaloidy. Známych je asi 10 000 a ich počet sa neustále zvyšuje (Koreňová, 2008). Alkaloidy môžeme nájsť vo všetkých častiach rastlín od koreňa až po plody (Aniszewski, 2007). V jednej rastline sa väčšinou vyskytuje zároveň niekoľko rôznych druhov. Napríklad v kôre chinínovníka je viac než 20 druhov alkaloidov. Na Madagaskare môžeme nájsť rastlinu

Katarant rúžoví, z ktorého bolo izolovaných zhruba 70 rôznych alkaloidov (Ferenčík a kol. 2000).

Niektoré alkaloidy, najmä jednoduchšej štruktúry, sú rozšírenejšie. Napríklad nikotín sa nachádza v rastlinách rôznych čeľadí. Význam alkaloidov pre rastliny nie je dosiaľ jednoznačne objasnený. Niektoré dohady vychádzajú z názoru, že ich silný fyziologický účinok môže poskytovať ochranu proti bylinožravcom a parazitom. Existuje však omnoho viac rastlín, ktorým alkaloidy neposkytujú dostatočnú ochranu (Koreňová, 2008).

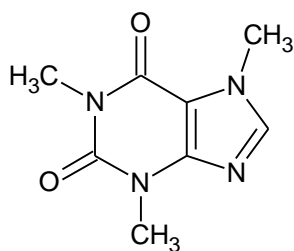
Prítomnosť alkaloidov a ďalších sekundárnych metabolitov v peli a nektári niekoľkých druhov rastlín sa zdá paradoxný, pretože sú považované za toxíny. Nektár z *Citrus* spp. obsahuje malé množstvo kofeínu, zatiaľ čo nikotín je prítomný v nektári rastlín tabaku. Ďalší alkaloid tomatín sa vyskytuje v nektári niektorých druhov čeľade *Nightshade* a vysoko toxický gelsemin sa vyskytuje v rastlinách, ako je *Gelsemium* sp. Rastliny z čeľade *Boraginaceae* sú bohaté na pyrolizidínové alkaloidy, ako seneccionin a sú populárne medzi včelami. Alkaloidy môžu byť dôležité v obrane proti včelím patogénom, pretože niektoré z nich sú známe vykazovaním antimikrobiálneho účinku (Singaravelan et al., 2005).

Nikotín je prirodzene sa vyskytujúci alkaloid, ktorý je široko distribuovaný v rastlinnej ríši, ale najznámejší je v rodine *Solanaceae*, ktorá zahŕňa mnoho poľnohospodárskych plodín a taktiež tabak. Je vysoko toxický pre väčšinu bylinožravcov prostredníctvom svojho pôsobenia na acetylcholinové receptory, a tým ovplyvňuje rôzne biologické funkcie. Opeľovače sa môžu stretnúť s nikotínom v nektári ale aj v peli. Okrem svojho výskytu v rastlinách, sa nikotín používa aj ako prírodný insekticíd v ekologickom poľnohospodárstve. Syntetické analógy nikotínu, a to neonicotinoídy, sú používané po celom svete ako insekticídy, vzhľadom k ich vysokej afinite k hmyzu (Köhler et al., 2012).

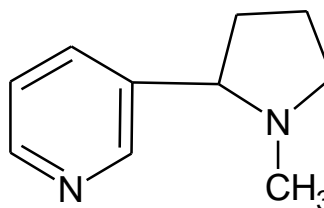
Vysoké koncentrácie glykosidov a alkaloidov gelseminu a skopuletinu boli preukázané v peli amerického Jasminovca vždyzeleného (*Gelsemium sempervirens*), ktorý hojne rastie od Virgínie po Guatemalu (Haragsim, 2007). Kvitne od začiatku marca do konca apríla, produkuje niekoľko stoviek žltých rúrkovitých kvetov. Nektár Jasminovca (*Gelsemium sempervirens*) obsahuje alkaloid, gelsemin, ktorý sa pohybuje v koncentrácii od 5,8 až 246,1 ppm (priemerne = 48 ppm) ale nachádza sa tiež v listoch (Elliott et al. 2008). Pôsobí toxicky predovšetkým na mladušky, ktoré sa živia jeho peľom. Včely hynú hromadne s príznakmi paralýzy. Med zo žltého jasmína je jedovatý aj pre človeka, ochromuje srdcovú činnosť (Haragsim, 2007).

Kofeín je prírodná látka vyskytujúca sa v listoch, semenách alebo plodoch viac ako stovky rôznych druhov rastlín po celom svete. Z chemického hľadiska patrí do skupiny látok

známych ako xantíny. Čistý kofeín je biely prášok horkej chuti, pomenovaný z latinčiny podľa rastliny Kávovník arabský (*Coffea arabica*) vyskytujúcej sa v subtropickom a tropickom podnebnom pásme. Tento xantínový alkaloid sa okrem kávovníka a kakaovníka nachádza aj v iných rastlinách, ako napr. čajových listoch a guaranových plodoch (Armenta et al. 2005).



kofeín



Nikotin

Pyrolizidínové alkaloidy (PA) sú zlúčeniny, rastlinnej obrany, ktoré sú pravidelne nachádzané v štyroch rastlinných rodinách v rámci krytosemenných rastlín, tj, *Asteraceae* (kmene *Senecioneae* a *Eupatorieae*), *Boraginaceae*, *Apocynaceae*, a rod *Crotalaria*. Existuje asi 350 rôznych známych štruktúr. 1,2 - nenasýtené PA sú toxické alebo pôsobia ako odstrašujúci prostriedok proti hmyzu a bylinožravcom. Častý výskyt veľkého množstva v mede a peli ukazuje, že včely sú konfrontované PA pri pastve v prírodných podmienkach. Zdá sa pravdepodobné, že nektár z rastlín obsahuje taktiež tieto zlúčeniny, ale neexistuje o tom žiadny priamy dôkaz. Na druhej strane, existujú údaje o PA v peli. Tie naznačujú, že peľ z rastlín obsahuje ich vysoké koncentrácie (Reinhard et al., 2009).

Alkaloidy sa nevyskytujú len v rastlinách ale aj u zvierat a to predovšetkým u mlokov, žiab, rýb, stonožiek, obojživelníkov a niektorých cicavcov. Niektoré z izolovaných alkaloidov, ako sú napríklad guanidínové alkaloidy, vykazujú antibakteriálnu a antivírusovú aktivitu. Tieto vlastnosti sú vystavované Herpes vírusu alebo vírusu HIV a je sledovaná ich reakcia (Aniszewski, 2007). Vďaka veľkým toxickým účinkom alkaloidov môže byť ich cieľom aj DNA. Jedná sa napríklad o lipofilné alkaloidy ako je barberin, alebo sanguinarin. Alkaloidy sú schopné interakcie medzi nukleotidmi v DNA, kde môžu poškodiť replikáciu. Pyrolizidínové alkaloidy sú schopné tvoriť kovalentné väzby s bázami DNA (Fattorusso et al. 2008).

5.3 Glykosidy

Glykosidy sú v rade publikácií zmieňované ako samostatná skupina, hoci sa jedná o konjugáty vyššie zmienených látok s cukrami. Cukorná zložka významne ovplyvňuje ich biologickú dostupnosť a vlastnosti. Sú rozšírené po celej rastlinnej ríši, zvlášť v čeľadiach svláčcovité, bôbovité, iskerníkovité. V rastline majú ochrannú funkciu, niektoré majú baktericídne a mykocídne účinky (antibiotiká, fytoicídy), iné sú farbivá (anthokyany). Väčšinou sú horkej chuti alebo špecifickej vône a preto nachádzajú uplatnenie v potravinárstve. Niektoré sú veľmi jedovaté, ale vo fyziologických dávkach pôsobia priaznivo na organizmus, a preto sú často využívané v lekárstve. Hydrolýzou glykosidov vzniká cukorná zložka (glycid) a necukorná (aglykon), ktorá určuje charakter účinku jednotlivých glykosidov (Bulánková, 2005).

Niektoré druhy sú charakteristické pre danú čeľaď rastlín, napr. thioglykosidy pre *Brassicaceae*, ale častejšia je prítomnosť viacerých typov glykosidov. Pre rastlinu má tvorba glykosidov pravdepodobne význam detoxikačného mechanizmu, ktorým sa toxické a lipofilné, vo vode nerozpustné látky, transformujú na zlúčeniny vo vode rozpustné, ktoré môžu byť v tele rastliny transportované. Glykosidy môžu taktiež slúžiť k ukladaniu cukrov alebo snáď aj aglokonov, pretože glykosidická väzba sa veľmi ľahko štiepi (hydrolyzuje) v mierne kyslom prostredí. Samozrejme sa tiež jednoducho štiepia enzymatickým pôsobením špecifických glykosidáz, ktorých je v prírode vskutku veľa (Moravcová, 2006).

Vybrané včelárske rastliny obsahujúce glykosidy:

Routa vonná (*Ruta graveolens L.*) – Kvitne od júna do septembra. Pestovaná na záhradách ako rastlina liečivá aj aromatická. Obsahuje glykosid rutín (látka príbuzná vitamínu P), triesloviny a horčiny. Patrí medzi vynikajúce nektárové účinky. Najviac nektáru tvorí v ranných hodinách (Haragsim, 2013).

Svetlík lekársky (*Euphrasia rostkoviana Hayne*) – Kvitne od polovice júna do polovice októbra. Je to predovšetkým rastlina lúčna, rastúca od nížin až po hory. Je rastlinou liečivou. Obsahuje glykosid aukubín, trieslovinu gallotanin, silice, horčiny, vitamín C a provitamín A. Je nenápadnou, veľmi dobrou nektárovou rastlinou, včely ju čulo vyhľadávajú. Poskytuje ale málo peľu (Haragsim, 2013).

Senovka grécka (*Trigonella foenum - graecum L.*) – Kvitne v júni a júli. Patrí medzi rastliny liečivé. Obsahuje flavonový glykosid, slizové látky, bielkoviny, silice, saponíny a množstvo organicky viazaného fosforu, železa a cholínu. Je veľmi dobrou nektárovou bylinou (Haragsim, 2013).

Ďatelina lúčna (*Trifolium pratense L.*) – je vynikajúcou krmovinou a zároveň aj liečebnou bylinou. Obsahuje glykosid tricholín, silice, triesloviny, organické kyseliny, flávonové farbivá a živicové látky. Považuje sa za vynikajúcu nektárovárnu rastlinu. Peľ je včelami zbieraný po celé leto (Haragsim, 2013).

Ďatelina plazivá (*Trifolium repens L.*) – Je liečivou rastlinou. Kvet obsahuje glykosid tricholin, triesloviny, kyselinu oxalovú, kumarínovú, salycilovú, množstvo flavonových farbív a živicových látok. Je dobrou nektárovárnou a peľodárnou rastlinou (Haragsim, 2013).

Tab. 4: Účinok nektáru niektorých rastlín na včely

Druh	Čeľad'	Príčina toxicity	Efekt
Cibuľa kuchynská (Allium cepa)	Laliovité (Liliaceae)	Vysoká koncentrácia draslíka	Odpudzuje včely
<i>Aloe littoralis</i>	Laliovité (Liliaceae)	Fenoly	Odpudzuje včely
Mandľa Vama (Prunus dulcis)	Ružovité (Rosaceae)	Fenoly	Riedi med, odpuďzuje včely
Tamariška (Tamarix pentandra)	Tamariškovité (Tamaricaceae)	Fenoly	Odpudzuje včely
<i>Asclepias spp.</i>	Apocynaceae	Galitoxin	Toxický pre včely
Astragalus miser v. serotinus	Bôbovité (Fabaceae)	Miserotoxin, nitropropanol, glykosid	Toxický pre včely
<i>Rhododendron spp.</i>	Vresovcovitých (Ericaceae)	Acetylandromedol	Toxický pre včely
Lipy (Tilia spp.)	Lipovité (Tiliaceae)	Manosa	Toxický pre včely

Zdroj: Adler L. S., 2001.

Tab. 5: Vplyv niektorých alkaloidov na kŕmne správanie včiel

Alkaloid	LD ₅₀ (%)	ED ₅₀ (%)	Toxicita
Arecolín		- -	++++
Berberín	0,003	0,01	++++
Brucín	0,2	0,05	+++
Cinchonidín		0,04	++++
Cinchonine		0,007	++
Efedrin		0,09	++++
Gramín		0,2	
Hyoscyamine		0,005	+
Kofeín		0,03	+
Kolchicín		0,2	+++
Nicotine	0,2	0,03	++++
Quinidín	0,02	0,02	+
Sparteín	0,05	0,03	++
Tropin		0,2	+++
Yohimbine		0,008	++++

- - žiadny vplyv; ED₅₀ – koncentrácia alkaloidov v kŕmnom roztoku, ktorá spôsobila 50 % maximalnu možnú toxicitu, stanovená semikvantitatívne: + 5 – 25 %, ++ 25 – 50 %; +++ 50 – 75 %; ++++ 75 - 100 % mortalita. LD₅₀ – koncentrácia alkaloidov v kŕmnom roztoku, ktorá spôsobila smrť 50 % včiel. Zdroj: Detzel a Wink, 1993.

6. Vplyv alkaloidov na mortalitu a zdravie kolónií

Reinhard a kol. (2009) testoval toxický vplyv pyrolizidínových alkaloidov zo Starčeka jarného (*Senecio vernalis*) a to čistý monocrotalin a 1,2 – dihydromonocrotalin. Včely boli izolované v klietkach, ktoré boli umiestnené v inkubátore pri teplote 25 ± 2 °C, v tme pri relatívnej vlhkosti vzduchu 50 až 70 %. Roztoky boli včelám podávané v koncentráciách 0,02; 0,2 a 2 % (w/w). PA boli izolované z prírodného zdroja (*Senecio vernalis*). Roztoky boli ponúkané hladným včelám po dobu 2 hodín, následne bol roztok nahradený 50 % roztokom sacharózy *ad libitum* na ďalších 46 hodín. Spolu s každou sériou testov PA boli vykonané aj dve kontrolné skupiny. Prvá dostala po dobu 2 hodín pred začiatkom testu čistý sacharózový roztok a druhá nedostala pred testovaním žiadne kŕmenie. Uhynuté včely z každej klietky boli odoberané a počítane po 2, 4, 6, 24, 30 a 48 hodinách. Mŕtvi jedinci z každého časového

úseku boli uložený zvlášť k ďalšej chemickej analýze, aby mohla byť vykonaná so zreteľom na dobu smrti. Výsledky následnej analýzy ukázali, že monocrotalin spôsobil výrazne vyššiu úmrtnosť včiel pri koncentrácii 2 %. Naproti tomu 1,2 – dihydromonocrotaline nespôsobil výrazný nárast úmrtnosti oproti kontrole. V kontrolných skupinách bola preukázaná vyššia úmrtnosť v skupine druhej, ktorej pred začiatkom testu nebol poskytnutý cukorný roztok.

Vplyv nikotínu na včelie kolónie bol publikovaný v štúdií Köhler a kol. (2012), kde bol rozdelený na dve časti. V prvej bol experiment prevedený na šiestich kolóniách včely medonosnej (*Apis mellifera scutellata*) vo voľnej prírode. Kŕmenie im bolo predkladané na Petriho miskách, ktoré umožňovali súčasné nakŕmenie 50 jedincov. Tieto kŕmidla boli umiestnené 1m od vstupu do úľa a všetky kolónie boli testované súčasne. Na každej kŕmnej stanici bola včelám predložená v jednom kŕmítku voda a v ostatných sacharózový roztok s nikotínom. Ten bol podávaný v koncentráciách 0, 3, 6, 15, 30, 60 a 300 μM . Sacharózový roztok bol predkladaný v troch koncentráciách (0,15; 0,32 a 0,63 M) v rôznych dňoch. V tomto experimente bolo zistené, že repelentný účinok nikotínu závisí na jeho koncentrácii v nektári. Tento účinok bol silnejší v nektári s nižšou koncentráciou cukornej zložky. V druhej časti štúdie bol účinok nikotínu testovaný na 12 kolóniách včiel, ktoré boli oddelené v klietkach a kŕmené jednou zo štyroch koncentrácií nikotínu 0 – 300 μM v roztoku 0,63 M sacharózy po dobu 21 dní. Nízke koncentrácie nikotínu nemali významný negatívny vplyv na prežitie kolónie ale so zvyšujúcou sa koncentráciou nikotínu sa zvyšovala aj úmrtnosť.

V štúdií spracovali Singaravelan a kol. (2005) preferenciu štyroch vybraných alkaloidov u voľne lietajúcich včiel (*Apis mellifera*) v prirodzených podmienkach. Včelám bol ponúkaný 20 % cukorný roztok ako kontrola a 20 % cukorný roztok s prídavkom alkaloidov. Vybrané alkaloidy boli nikotín, anabasin, kofeín a amygdalín. Štúdia bola rozdelená na dva experimenty. V prvom experimente boli skúmané koncentrácie v širšom rozsahu, ktoré umožnili zistiť prahové škodlivé koncentrácie pre testované alkaloidy okrem anabazínu. V druhom experimente boli testované koncentrácie v prirodzene sa vyskytujúcom rozsahu. Každá z koncentrácií bola testovaná v 3-5 po sebe nasledujúcich dňoch, kedy v každý deň boli testované všetky koncentrácie. Medzi dvomi sledovanými koncentraciami bol dodržaný rozstup 5 dní, počas ktorých bol včelám podávaný len kontrolný roztok. V prvom experimente bolo sledované, že žiadna z testovaných koncentrácií amygdalínu nevykazovala odpudzujúci účinok voči včelám. Naproti tomu nikotín a kofeín vykazovali vo vyšších koncentráciách vyšší odpudivý účinok. V druhom experimente, kde boli koncentrácie alkaloidov výrazne znížené na úroveň prirodzene sa vyskytujúcu v prírode, bolo preukázané,

že anabazín ako jediný vykazuje odpudzujúci účinok vo všetkých koncentráciách. Včely dávali výraznú prednosť nižším koncentráciám nikotínu a kofeínu ako kontrolnému roztoku. A spotrebovali taktiež viac amygdalínu vo všetkých koncentráciách.

Preferencia včiel (*Apis cerana*) voči toxickému nektáru z kvetov *Tripterygium hypoglaucum* bola publikovaná v štúdiu Tan a kol. (2007). Z vybraného úľa bolo náhodne odobraných 40 včiel do každej zo šiestich skupín. Tri skupiny dostávali ako potravu toxický med a ostatné tri skupiny boli prezentované ako kontrolná skupina, ktorej bol podávaný normálny med zmiešaný s cukrom 1:1 aby vznikla kašička, ktorá bola podávaná včelám. Včely boli udržiavané v inkubátore pri teplote 25 °C a 70 % relatívnej vlhkosti. Mŕtve včely v každej z klietok sa počítali trikrát denne po dobu 6 dní. V tejto štúdiu bolo vytvorených niekoľko sérii testovaní. V preferenčnom experimente bol včelám podávaný toxický med z kvetov *Tripterygium hypoglaucum* v koncentrácii 0,6 µg/g, čo je koncentrácia, ktorá je vyššia ako v zriedenom mede, a kontrolný 30 % sacharózový roztok. Boli zistené výrazné rozdiely vo frekvencii a časoch návštev včiel medzi kontrolným a toxickým roztokom. Výsledky testov ukázali, že frekvencia návštev včiel na podávačoch s kontrolným roztokom bola podstatne vyššia u podávača s toxickým. Podobne aj časy nasávania roztoku z podávača boli dlhšie u kontrolnej skupiny.

Gegeer a kol. (2007) otestovali preferenciu čmeliakov (*Bombus impatiens*) voči alkaloidu gelsemínu, ktorý sa nachádza v nektári Jasmínovca (*Gelsemium sempervirens*). V prirodzených podmienkach sa gelsemín v nektári nachádza v rozmedzí 5,8 – 246,1 ng/µL. Dizajn experimentu bol postavený na vytvorení umelých kvetov a lúky za pomoci mikroskúmaviiek a polyesterových dosiek potiahnutých zeleným papierom pre lepšiu imitáciu. Kvety boli vytvorené v dvoch farbách, žlté a modré, kde žlté imitovali kvety Jasmínovca (*Gelsemium sempervirens*). Kvety v experimente boli rozdelené do piatich skupín podľa obsahu sacharózy a gelsemínu. Skupiny: 1A (30 % sacharóza s 50 ng µL gelsemínu), 1B (50 % sacharóza s 50 ng µL gelsemínu), 1C (30 % sacharóza s 5 ng µL gelsemínu), 2 (30 % sacharóza s 50 ng/µL gelsemínu) a skupina 3 (30 % sacharózy s 125 ng/µL gelsemínu). Koncentrácie gelsemínu boli vybrané na základe výskytu v prírode. Každá skupina s určenou koncentráciou bola čmeliakom ponúkaná v 30 kvetochoch, s každým opakovaním boli miesta randomizované a taktiež boli obmenené farebné goliere, aby nedochádzalo k farebnej alebo pamäťovej preferencii. Kvetiny boli naplnené 3 µL nektáru a po odčerpaní boli hneď doplnené. Preferencia čmeliakov bola výrazne ovplyvnená koncentráciou gelsemínu v nektári. Nevykazovali preferenciu nektáru, kde bola koncentrácia sacharózy s alkaloidom vyššia. Pri

percentuálnom výpočte návštev jednotlivých skupín bolo zistené, že najnavštevovanejšou skupinou bola 1A, ktorá obsahovala 30 % sacharózy s 50 ng/ μ L gelsemínu.

V štúdií Singaravelan a kol. (2006) boli testované tri rôzne koncentrácie nikotínu na životaschopnosť kolónie včiel. Experiment bol rozdelený na viac sekcií. Hlavnými sledovanými údajmi bola životaschopnosť lariev a dospelých včiel pri podávaní 20 % cukorného roztoku s prídavkom nikotínu v koncentráciách 0,5; 5 a 50 ppm. Experiment bol realizovaný v priebehu 26 dní a štyroch opakovaníach. Vo výsledkoch bolo zistené, že včely zhromažďovali roztok s výnimkou roztoku s koncentráciou nikotínu 50 ppm. Pri tejto koncentrácii podstatne znížili svoju aktivitu ako aj príjem potravy po 15 d. Pri podávaní vybraných koncentrácií nikotínu tvorila prežiteľnosť u dospelých včiel v každej skupine viac ako 80 %. Bolo taktiež zistené, že podávanie roztoku s prídavkom nikotínu nemalo podstatný vplyv na liahnutie lariev. Vo všetkých kolóniách bolo vyliahnutých približne 70 % lariev. Mierne nesignifikantné zníženie liahnutia sa vyskytlo pri podávaní roztoku s 50 ppm nikotínu. Prirodzene sa vyskytujúce koncentrácie nikotínu (0,5 – 50 ppm) v nektári neovplyvnili životaschopnosť lariev. Avšak roztok s koncentráciou nikotínu 50 ppm znižuje prežiteľnosť lariev o 30 % viac ako ostatné koncentrácie. K vysokej úmrtnosti lariev dochádzalo hlavne u 3 dni starých lariev.

Včely sú dôležitým opel'ovačom avokáda. Avšak, vzhľadom k nízkej atraktivite kvetov, je opelenie často nedostatočné. Aj preto vypracoval Afik a kol. (2006) štúdiu, ktorá sa zaoberá mimo iné aj preferenciou včiel k medu z avokáda (*Persea americana: Lauraceae*) a vplyv fenolových látok na preferenciu medu. Kolónie včiel boli držané v izolačnom stane o rozmeroch 12 x 6 x 3m. Pre preferenčný test medu boli pripravené každý deň tri rôzne roztoky (avokádový med, med nepochádzajúci z avokáda a sacharóza riedená s destilovanou vodou na 60% roztok). Roztok bol včelám predkladaný v 200ml krmidlách. Tieto krmidlá boli umiestnené v kruhu, 15 cm od seba, na kolotoči, ktorý sa pomaly otáčal aby sa dalo zabrániť zaujatosti na jedno miesto. Experiment bol zastavený v momente keď spotreba jedného z roztokov dosiahla 130 ml alebo po uplynutí 4h od začiatku testovania. Bolo zistené, že včely majú väčšiu preferenciu k cukornému roztoku, ale preferencie ostatných testovaných roztokov sa zvyšuje so zvyšujúcou sa koncentráciou cukrov v roztoku. Pri zisťovaní vplyvu fenolových zlúčenín v tejto štúdií boli včelám predkladané tri rôzne roztoky a to zriedený avokádový med, sacharózový roztok s prídavkom koncentrátu fenolových zlúčenín z avokádového medu a roztok sacharózy s etanolom (rozpúšťadlo). V každom podávači boli predkladané roztoky v množstve 200 g. Týmto testom bolo zistené, že včely uprednostňujú roztok sacharózy obohatenej o fenolové zlúčeniny než ostatné roztoky. Medzi roztokom

z avokádového medu a sacharózovým roztokom neboli významné rozdiely v preferencii sledované, pravdepodobne v dôsledku silnej príťažlivosti zo strany obohateného roztoku.

Ricín obyčajný (*Ricinus communis*) je tropická rastlina, ktorá je široko distribuovaná po celom svete. V Brazílii je z veľkej časti používaná na výrobu oleja spracovávaného na bionaftu. Toxické účinky peľu z *R. communis* pre včely (*Apis mellifera*) boli testované v štúdiu de Assis Juníour a kol. (2011). Na tento experiment boli použité včely rovnakej vekovej skupiny, ktoré boli odobraté z úľa. Tri skupiny boli vytvorené po 20 včelách, ktoré boli umiestnené do dreveného boxu (11 cm x 11 cm x 7 cm) a takto boli držané v aklimatizačnej komore pri 32 °C a 70 % relatívnej vlhkosti. Bola im podávaná diéta zmiešaním práškového cukru (83 %) s medom (17 %). Peľ z *R. communis* bol pridávaný do diéty v množstve 0 %, 2,5 %, 5 % a 10 % (w/w). Každá diéta bola podávaná 60 včelám, ktoré boli následne sledované každý deň až do posledného úmrtia. Vo výsledkoch bolo publikované, že prídavok peľu z *R. communis* zvyšoval mortalitu včiel v priebehu experimentu. Bolo to závislé aj na podávanom množstve, kde prídavok 10 % peľu pôsobil najtoxickejšie a 2,5 % najmenej oproti kontrole, kde nebol pridávaný vôbec.

Delphinium barbeyi (*Ranunculaceae*) je trvalka vyskytujúca sa na vlhkých subalpských lúkach v skalnatých horách USA. V nektári obsahuje norditerpénové alkaloidy, ale v koncentráciách, ktoré sú podstatne nižšie ako tie, ktoré boli nájdené v jej listoch a kvetoch. V štúdiu Manson a kol. (2013) skúmal do akej miery majú alkaloidy z nektáru *Delphinium barbeyi* vplyv na čmeliakov. *Bombus appositus* bol podávaný cukorný roztok obohatený o alkaloidy v koncentráciách: 0 µg/µL (kontrola); 0,1 µg/µL; 1 µg/µL; 2 µg/µL a 4 µg/µL. Vo výsledkoch bolo publikované, že účinok nektáru s prídavkom alkaloidov je závislý na podávanej koncentrácii. So zvyšujúcou sa koncentráciou alkaloidov v potrave sa znižovala aktivita a sila čmeliakov.

Cook a kol. (2013) taktiež testoval vplyv norditerpenových alkaloidov z rastlín rodu *Delphinium* a ich účinok na čmeliaky (*Bombus impatiens*). Čmeliakom bola podávaná diéta s prídavkom alkaloidov z *D. barbeyi* o štyroch koncentráciách (0,1; 1; 2 a 4 mg/ml). Alkaloidy boli pridávané do 45% roztoku sacharózy, ktorý bez prídavku slúžil ako kontrola. Čmeliaky boli pre experiment odobrané z troch kolónií aby neboli výsledky ovplyvnené jednotlivou kolóniou. Následne boli rozdelené do skupín a umiestnené do fľaštičiek, v ktorých boli po dobu 2h ponechané bez akejkoľvek potravy. Potom sa im podalo 500 ml potravy s prídavkom každej z koncentrácií alkaloidov. Bolo zistené, že včely, ktorým bol podávaný sacharózový roztok s prídavkom alkaloidov znižovali svoju aktivitu v závislosti na

podávanej koncentrácii. K najvyššiemu poklesu aktivity došlo v skupine, ktorej bola podávaná diéta s prídavkom alkaloidov o koncentrácii 4 mg/ml.

V štúdií Manson a kol. (2010) bol testovaný účinok gelsemínu z rastliny *Gelsemium sempervirens* voči prvku *Crithidia bombi*. Boli použité koncentrácie prirodzene sa vyskytujúce v prírode a to v rozmedzí 5,8 až 246,1 ng/μl, ktoré boli aplikované do 30% sacharózového roztoku. K pokusu boli použité skupiny po 20 čmeliakoch z piatich rôznych úľov, ktoré boli infikované *C. bombi*. Čmeliaky boli chované v jednotlivých 15 ml fľašiach, kde im bola podávaná diéta v množstve 5 ml buď ako kontrola (30 % roztok sacharózy) alebo s prídavkom gelsemínu v 30% roztoku sacharózy, spolu s peľom po dobu 10 dní. Týmto experimentom bolo zistené, že strava bohatá na gelsemín u čmeliakov znižuje intenzitu infekcie *C. bombi*. Po 7 dňoch od infekcie bolo u čmeliakov, ktorým bola podávaná diéta s obsahom gelsemínu, zistená 2,2krát znížená intenzita infekcie ako u kontrolnej skupiny. Gelsemín zabránil ťažkým infekčným príznakom v siedmych dňoch. Bola taktiež zistená závislosť veľkosti a intenzity infekcie, kde sa u čmeliakov väčšej konštitúcie vyvinula ľahšia infekcia ako u menších.

7. Ochorenia včiel súvisiace so stravou

Včely nachádzajú v prírode jedovaté druhy peľu alebo nektáru. Peľ z iskerníka (*Ranunculus auricomus*) obsahuje jedovatý alkaloid anemonín, iný peľ obsahuje toxické cukry, hlavne galaktózu alebo D – manózu a L – manózu. Taktiež niektoré duhy líp (*Pilia tomentosa*, *T. argentea*, *T. platyphilla*) majú jedovatý nektár nielen pre včely, ale aj pre rôzne druhy čmeliakov. V niektorých rokoch je toxický nektár u jerlína (*Sophora japonica*) aj u pagaštanu konského (*Aescitius hippocastanum*). Príčinou sú spravidla toxické cukry v nektári. Iné druhy nektáru nie sú toxické pre včely, ale sú jedovaté pre cicavce. Z histórie sú známe jedovaté medy z rododendrónu (andromedotoxin) z Malej Ázie, ďalej z Nového Zélandu obsahujúce rutín a hyenanchin. Ak majú včely prístup do potravinárskych závodov, môžu sa otráviť napr. prepáleným cukrom pri požiari cukrovaru alebo pivovaru. Príčinou je rozklad cukru na karamel. Pre včely sú jedovaté aj saponíny obsiahnuté v nerafinovanom repnom cukri. Ďalšie zdroje toxických látok v potrave sú nevhodne vyrobené invertné cukry. Otravy včiel môže spôsobiť v zimnom krmive aj kuchynská soľ v koncentracii 1 %, celoročne potom tiež ťažké kovy ako je meď, kobalt, olovo a iné. Taktiež kyselina benzoová, používaná konzervárskom priemysle a potravinárskych farbivách, tzv. bretoby, môžu spôsobiť otravy včiel (Veselý a kol., 1985).

7.1 Úhyn plodu hladom

K úhynu plodu hladom s jeho následným požieraním včelami dochádza najčastejšie ku koncu zimy a na začiatku jari, v dôsledku nedostatočného zásobenia včelstva kvalitnou potravou. Na dne úľa v bunkách plástu nachádzame pokožky z vysatého nezaviečkovaného plodu. U zaviečkovaného plodu bývajú porušené viečka a vysaté mäkké časti kukiel. V letnom období sa môžeme stretnúť u včiel, ktorá majú trubcokladné matky alebo trubčice, s úhynom trubčieho plodu v dôsledku podvýživy a zlého ošetrenia včelami. Uhynutý plod nebýva včelami vysatý. Ostáva v bunkách a rozkladá sa s príznakmi podobnými hnilobe včelieho plodu. K odlíšeniu od hniloby je nutné mikroskopické a kultivačné vyšetrenie (Veselý a kol., 1985).

7.2 Úplavica včiel (*Laxatio apium*)

Úplavicou označujeme chorobný stav, pri ktorom dochádza ku kaleniu včiel v úli. Vyskytuje sa ako samostatné ochorenie, často však býva sprievodným príznakom iných chorôb. Príčinou samostatného ochorenia býva nevhodná potrava, zvlášť medovicové medy, s vysokým množstvom nestráviteľných látok, časté vyrušovanie včelstva zo zimného kľudu, vysoká vlhkosť v úli, strata matky a pod. Chorobný stav prebieha tak, že uvedené príčiny spôsobujú zvýšený príjem potravy buď málo stráviteľnej alebo k úhrade energie. Nestrávená potrava alebo jej zvyšky sa v zvýšenej miere hromadia vo výkalovom vaku. Ako náhle váha vaku prekročí 46,3 % celkovej váhy včely, povolia zvierače výkalového vaku a dochádza ku kaleniu. Ak nemôže včela pri nepriaznivom počasí opustiť úl, kalí v ňom. Postihnuté včely majú nafúknutý zadoček, opúšťajú zimné hrozno a kalia v úli. Plast a steny úľa sú pokryté výkalmi. Pri silnej úplavici sa šíri z úľa odporný zápach. Najčastejšie sa vyskytuje v októbri, decembri a januári (Lucký, 1972).

7.3 Peľová zápcha včiel (*Obstipatio pollinaris apium*)

Obyčajne sa vyskytuje v máji u mladých včiel krmičiek a kojičiek. Je pre ňu vžitý zastaralý názov „májovka“. Príčinou ochorenia je pravdepodobne namrznutý peľ, ktorý je v ranných hodinách po chladnej noci, kedy teplota klesne k 0 °C alebo aj pod bod mrazu, nazbieraný a v peľových váčkoch prinesený do úľa. Pri nedostatočných peľových zásobách je krmičkami alebo kojičkami ihneď požitý. Chladné počasie znemožňuje mladuškám vyletieť, takže sa nemôžu v pravý čas vyprázdniť a lietavky nemôžu prinášať vodu. Tým dochádza k zahusteniu obsahu v tráviacom trakte a následnej zápche. Zápcha je ďalej vysvetľovaná aj

veľkým príjmom čerstvého, doposiaľ neskvášeného peľu, ktorý je ťažko stráviteľný. Postihnuté mladušky vybiehajú z úľa, majú nafúknutý zadoček a s námahou vytlačujú nitkovité, nažltlé, polotuhé výkaly. Pretože nevedia ešte poriadne lietať, padajú často na zem, kde sa zhlukujú v malé hrozienka a hynú chladom. Chorobný stav sa vyskytuje od apríla do júna (Lucký, 1972).

7.4 Toxikózy včiel (Intoxicaciones apium)

Otravy včiel bývajú najčastejšie vyvolané toxickými látkami, ktoré sa používajú k hubeniu rastlinných škodcov alebo sa vyskytnú v potrave včiel. Podľa etiológie, priebehu a patologických zmien rozlišujeme otravy peľové, nektárové, medovicové a pod. (Lucký, 1972).

7.4.1 Peľové toxikózy

K intoxikácii peľom dochádza prevažne u včiel – krmičiek, ktoré prijímajú peľ vo veľkých dávkach. V našich podmienkach je toxický peľ z iskerníka (*Ranunculus auricomus*), vyvolávajúci ochorenie podobné zápche. Postihnuté včely nachádzame na lietáku alebo na zemi pod úľom. Jedná sa o uhynuté alebo hynúce včely s nafúknutým zadočkom. Žalúdok a črevá sú pri pitve zväčšené, naplnené peľovou masou, žltej farby a tuhej konzistencie. Objavuje sa od mája do júla, obvykle náhle, trvá niekoľko dní, rýchle ustupuje a spôsobuje veľké škody (Lucký, 1972).

7.4.2 Nektárové toxikózy

K intoxikácii niektorými druhmi nektárov dochádza u včiel lietaviek a mladušiek. U nás to býva nektár niektorých jedovatých rastlín ako je blen (*Hyoscyamus niger*), jesienka (*Colchicum autumnale*), gaštan konský (*Aesculus hippocastanum*) a pod. Priotrávené včely je možné zastihnúť priamo na kvete alebo hynú na ceste do úľa. Táto prudká intoxikácia ostane väčšinou nepovšimnutá a taktiež straty na včelstve, ktoré nebývajú obvykle veľké, bývajú nepatrné. Pri nektárovej intoxikácii nezistíme na žalúdku a črevách žiadne špecifické zmeny. Výskyt nie je častý, straty na včelstve sa rýchle nahradia (Lucký, 1972).

7.4.3 Medovicové toxikózy

Chorobný stav postihujúci včely je vyvolaný toxickými látkami, ktoré sú obsiahnuté v čerstvej medovici a medovicovom mede. Väčšina autorov sa zhoduje v názore, že toxickými látkami sú rôzne minerálne látky. Toxicita medovic stúpa s pribúdajúcim množstvom usadeniny pri liehovej skúške. Pozorovanými zmenami je tmavohnedý zadoček, ktorý po čase černie. Žalúdočná sliznica býva porušená, epitel sa odlupuje a žalúdočná stena sa stáva tenšou. Stenou žalúdka prestupujú baktérie a cudzopasiaci prvoci. Silne postihnuté včely opúšťajú zimné hrozno a rozliezajú sa po úli, padajú na dno, a tie ktoré majú veľmi naplnený výkalový vak alebo hnačku vyliezajú z úľa. Hynutie vrcholí obvykle koncom zimy a potom na jar. Nezriedka uhynie aj matka (Lucký, 1972).

8. Experimentálna časť

8.1 Experiment – Preferenčný test

8.1.1 Materiál

Roztoky a reagensy

- Glukóza
- Fruktóza
- DMSO
- Nikotín 98 % (Sigma)
- Kofeín 98 % (Sigma - Aldrich)
- Senecionín 95 % (Sigma)
- Gelsemín
- dd H₂O

Prístroje

- Scaltec
- Analytické váhy
- Pipety Eppendorf

Ďalší použitý materiál

- Mikroskúmavky Eppendorfkky (1,5 ml)
- Farebný papier (žltý, zelený)
- Polystyrénová doska

8.1.2 Príprava umelých kvetov a dosky

8.1.2.1 Umelé kvety

Na každé z opakovaní preferenčného testu bolo použitých 75 kvetiniiek, na ktorých prípravu bolo použité: žltý tvrdší papier, mikroskúmavky 1,5 ml, nožnice, pravítko, kružidlo, analytické váhy, farebne fixky. Najprv boli na papier predkreslené kružidlom kolieska o priemere 3 cm, ktoré boli následne vystrihnuté a v prostriedku prestrihnuté. Do každého papierika bola vložená mikroskúmavku, aby vznikli kvetinky (Obr. 2.). Takto pripravené kvety boli popísané farebnými fixkami, aby pri pozorovaní testu bolo rozoznateľné o aký alkaloid sa jedná. Každá z kvetiniiek bola samostatne predvážená a váha zaznamenaná do tabuliek.

8.1.2.2 Polyesterová doska

Dosku bola pripravená tak aby imitovala lúku s kvetmi. Na prípravu bolo použité: dve polystyrénové dosky o rozmeroch 0,5m x 1m, oblepenú z oboch strán tvrdším zeleným papierom. Kvety boli v doske umiestnené do sústrednej špirály so 75 pozíciami. Pozície boli skalpelom vyrezané jamky umožňujúce fixáciu kvetov (Obr. 3.). Jednotlivé pozície na špirále boli očíslované a poradie kvetníek v experimente bolo vždy randomizované podľa generátoru náhodných čísel.

8.1.3 Príprava roztokov

Zásobný roztok – Na analytickej váhe sme si predvážili mikroskúmavku do ktorej sme následne navážili 1 mg vybraného alkaloidu, do ktorého bol pridaný 1ml DMSO. Takto pripravený roztok sa miešal do rozpustenia alkaloidu na Scaltecu.

Cukorný roztok – Do 200 ml sklenenej fľaše so uzáverom sa navážilo 10 % fruktózy a 10 % glukózy, ktoré bolo následne doliate do 200 ml dd H₂O a miešané do rozpustenia cukrov v roztoku.

Testované koncentrácie roztokov – 50,0; 16,7; 5,6; 1,9; 0,6; 0,2 (µg/ml)

Tieto koncentrácie sa pripravovali 3-násobnou riediacou radou. Pripravila sa rada šiestich mikroskúmaviek. Do prvej sa napipetovalo 105 µl cukorného roztoku a pridalo sa 105 µl roztoku v DMSO, tým vznikla koncentrácia 500 µl/ml (a celkom objem 210 µl), do ostatných 5 mikroskúmaviek sa napipetovalo po 140 µl cukorného roztoku. Z prvej mikroskúmavky sa odobrala 1/3, tj 70 µl a dala sa do druhej, pretrepala sa na Scaltecu a zase sa z nej odoberalo 70 µl ďalej (do tretej) atd. až po šiestu, z ktorej bolo tiež odobraných 70 µl ale toto množstvo sa odstránilo. Na koniec sme dosiahli to, že v každej mikroskúmavke bolo 140 µl roztoku o koncentrácii 10x vyššej než vyššie uvedenej.

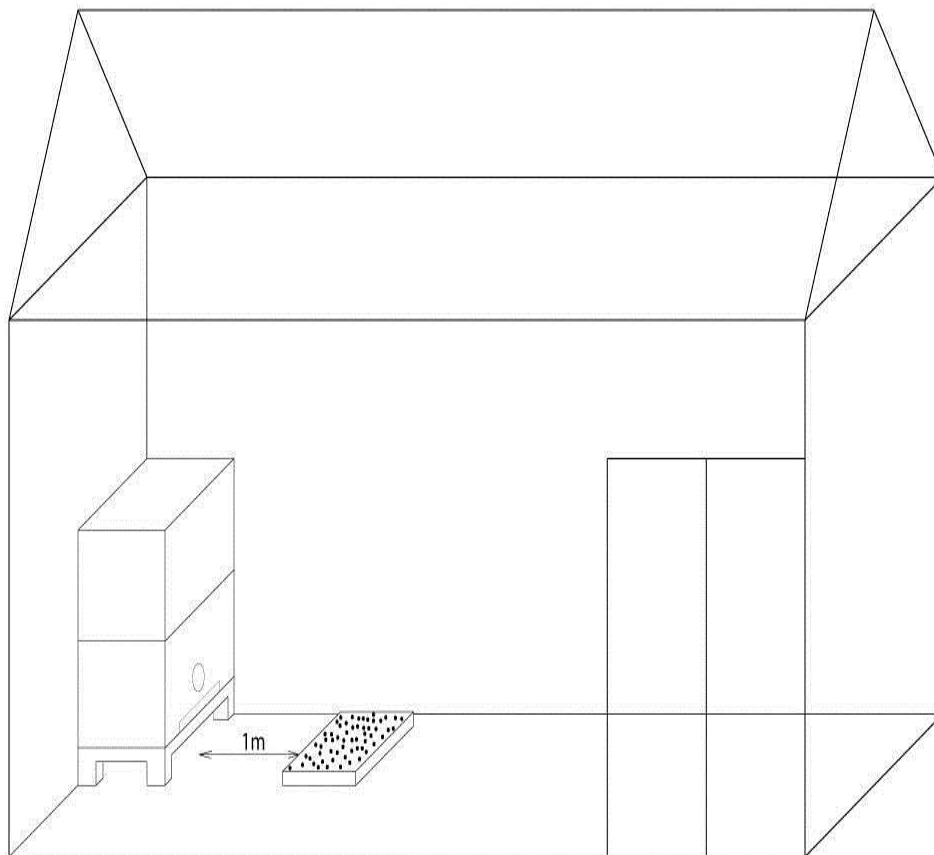
Roztok podávaný včelám – Do predvážených a popísaných mikroskúmaviek sme napipetovali 1080 µl cukorného roztoku a 120 µl sa pridávalo k roztoku s odpovedajúcou koncentraciou, tak aby nakoniec bolo v každej mikroskúmavke 1200 µl roztoku.

Kontrolný roztok podávaný včelám – Do troch mikroskúmaviek, ktoré boli vopred označené ako kontrola sa napipetoval cukorný roztok v množstve 1200 µl bez prídavku alkaloidov, len s odpovedajúcimi koncentráciami DMSO.

8.1.4 Postup preferenčných testov

Preferencia včiel bola testovaná na štyroch vopred vybraných alkaloidoch: nikotín, kofeín, gelsemín a senecionin (Sigma – Aldrich). Zdravá kolónia *Apis mellifera carnica* bola premiestnená do izolačného stanu (Obr. 4.) bez prírodného zdroja potravy, s výnimkou uloženej zásoby peľu a medu. Na takto oddelenej kolónii bol vykonaný preferenčný test. Umelé kvety boli vyrobené z mikroskúmvky Ependorf 1,5 ml s golierom zo žltého papiera o priemere 3 cm. Takto pripravené kvety boli naplnené 20% cukrovým roztokom a zodpovedajúcim množstvom roztoku s alkaloidom, ktorý bol pripravený sériovým riedením a tri skúmvky boli neplnené len 20 % cukrovým roztokom, ktorý slúžil ako kontrola. Každý kvet bol zvlášť navážený a hodnoty boli zaznamenané do sumarizačných tabuliek. Všetkých 75 mikroskúmviek bolo umiestených na polystyrénovej doske, na ktorej mali vopred určené náhodne vybrané miesta. Tieto miesta pre skúmvky boli náhodne vyberané pre každé opakovanie znova a tiež boli u každého opakovania vymieňané „kvety“ aby bolo možné zabrániť akémukoľvek feromónovému značeniu alebo zapamätaniu si miesta včelami a taktiež aby nedochádzalo k znečisteniu, ktoré mohlo ovplyvniť konečný výsledok. Pripravená polystyrénová doska s umelými kvetmi bola umiestnená vo vzdialenosti jedného metra od vstupu do úľa (obr. 1.). Každý z vybraných alkaloidov bol testovaný v 5 riedeniach a 3 opakovaniach na predkladanej doske a celý experiment bol vyhotovovaný zvlášť. Celý preferenčný pokus bol rozdelený na dva sety, A a B. Set A zahrňoval koncentrácie alkaloidov 0,5–4 µg/ml. Bol vykonaný v troch po sebe idúcich dňoch v šiestich opakovaniach, prvé ráno a druhé poobede. Set B zahrňoval koncentrácie vybraných alkaloidov 0,2–50 µg/ml. Bol vykonaný v dvoch po sebe idúcich dňoch, takže v štyroch opakovaniach, kde prvé prebehlo ráno a druhé poobede. Jednotlivé opakovania boli ukončené, keď v kvetoch s kontrolným roztokom kleslo množstvo na 0,5 ml. Následne bola celá doska odobraná, kvety vyzbierané a zvážené. Tieto navážky boli porovnané s váhou kvetov v prázdnom stave a s váhou naplnených pred testovaním. Dáta boli analyzované IBM SPSS Statistics pomocou t-testu.

Obr. 1.: Nákres preferenčního testu



8.2 Experiment – Umelý odchov larvičiek

8.2.1 Materiál

Roztoky a reagensie

- 15% roztok glycerolu
- NaCl
- K₂SO₄
- Materská kašička
- Kvasnicový extrakt
- Glukóza (Sigma)
- Fruktóza (Sigma)
- 96% etanol
- dd H₂O
- Oxytetracyklin (Sigma)

Prístroje

- Scaltec
- Analytické váhy
- Pipety Eppendorf
- Ohrevná platnička
- Inkubátor
- Flow box

Ďalší použitý materiál

- 48 - jamkové kultivačné doštičky
- Dentálne tampóny
- Materské mištičky
- Tenký štetec (na prelarvovanie)
- Pinzeta
- Špičky (rôzne veľkosti)
- Lupa
- Plastový box
- Chemické kadičky
- Skúmavky s uzáverom 10 ml

8.2.2 Príprava roztokov

dd H₂O – Voda bola zvolená ako ultračistá Millipore a bola pred testom autoklávovaná.

15% glycerol – Ak bol pripravovaných 100 ml 15 % glycerolu tak bolo do sterilnej fľaše so uzáverom naliatych 15 ml 100 % glycerolu a doliatych dd H₂O do 100 ml. Fľašu bola uzatvorená a poriadne premiešaná aby sa glycerol zmiešal s vodou.

Nasýtený roztok K₂SO₄ – Bol pripravený v chemickej kadičke tak, že sa v nej ohriala voda v ktorej sa postupne nechal rozpúšťať kryštalický K₂SO₄. V bode kedy sa prestal rozpúšťať sa do kadičky pridala lyžička K₂SO₄ a tento roztok sa použil v teste.

Nasýtený roztok NaCl – Bol pripravený v chemickej kadičke tak, že sa v nej ohriala voda v ktorej sa postupne nechal rozpúšťať kryštalický NaCl. V bode kedy sa prestal rozpúšťať sa do pridala lyžička NaCl a tento roztok sa použil v teste.

Zásobný roztok Oxytetracyklínu – Do prázdnej mikroskúmavky sme navážili 2 mg oxytetracyklínu, ktorý sa dolial do 1 ml DMSO a nechal sa rozpustiť.

Zásobný roztok Sangvinarínu – Do dvoch prázdnych mikroskúmaviek sme navážili 1 a 0,5 mg sangvinarínu, ktoré sa doliali do 1 ml DMSO a nechal sa rozpustiť.

8.2.3 Príprava kultivačnej doštičky

S doštičkami sme pracovali vo Flow boxe za maximálnej sterility. Najprv sme si pripravili vedľa Flow boxu všetky potrebné nástroje a roztoky.

Na prípravu sme použili zabalené sterilné 48 - jamkové doštičky, dentálne tampóny (narezané na menšie kusy, tak aby sa nám zmestili do jamky), materské misky (vysterilizované), pinzetu, nožnice, pipetu so špičkami, 15% glycerol, 96% etanol.

Pred tým než sa začali pripravovať doštičky všetko sa muselo dôkladne vydezinfikovať dezinfekčným prostriedkom a pred tým než sme čokoľvek vložili do Flow boxu muselo sa to ostrieknuť 96 % etanolom.

Do každej jamky na mikrotitračnej doštičke sme vložili kúsok dentálneho tampónu, ktorý sa zatlačil na dno doštičky. Následne sa do každej jamky napipetovalo 500 µl 15% glycerolu. Na takto pripravené jamky sa naskladali materské misky, do ktorých sa pred larvovaním napipetovalo určené množstvo diéty.

8.2.4 Príprava diéty

Boli pripravené tri rôzne diéty, A, B a C, ktoré sa líšili zložením a každá bola dávkovaná v určitej fáze vývoja včely. Do predvážených skúmaviek typu Falcon (15 ml) sme navážili vopred určené množstvo fruktózy, glukózy a kvasnicového extraktu v suchom stave. Takto pripravená diéta sa pred podávaním larvám doplnila do objemu 10ml dd H₂O a následne sa zmiešala s materskou kašičkou v pomere 1:1.

Dieta (v suchom stave):

	F	G	YE
A	1,2g	1,2g	0,2g
B	1,5g	1,5g	0,3g
C	1,8g	1,8g	0,4g

F - fruktóza; G - glukóza; YE - kvasnicový extrakt

8.2.5 Postup pri larvovaní a odchove larvičiek

Tento test bol vykonávaný vo viacerých opakovaniach, kvôli potvrdeniu výsledkov. Každý začiatok opakovania predstavoval prípravu štyroch doštičiek a odber larvičiek (Obr. 5). Tri zo štyroch doštičiek obsahovali okrem určenej diéty prídavok nejakej testovanej látky a štvrtá doštička fungovala ako kontrola, kde bola larvičkám podávaná potrava s prídavkom DMSO. DMSO bol v predošlých testoch vyhodnotený ako netoxický a neznižujúci mortalitu lariev pri daných koncentráciách (neskôr vyšlo najavo, že tomu tak byť nemusí). Vybrané látky predstavovali antibiotika (oxytetracyklín) v koncentrácií 20 µg/ml a sanguinarín, ktorý bol podávaný v koncentrácii 0,1 a 0,05 µg/ml. Tieto koncentrácie boli pripravené v DMSO a pridávané do diéty v množstve 10µl na 1ml diéty. V kontrolnom roztoku bol prídavok 10 µg/ml DMSO.

- 1. Deň** - Do každej jamky vopred pripravenej kultivačnej doštičky sme napipetovali 10µl diéty A (diéta A v suchom stave zmiešaná s dd H₂O do 10 ml), ktorá je zmiešaná s materskou kašičkou v pomere 1:1. Kŕmenie muselo byť ohriate vo vodnom kúpeli na teplotu 37 °C. Po napipetovaní diéty do každej jamky s čo najväčšou opatrnosťou sme prelarvovali larvičky z vybraného plástu za pomoci štetca. Po každej vybranej larvičke sa musel štetec očistiť 96% etanolom a následne dd H₂O. Takto pripravenú doštičku s larvičkami sme vložili do plastového boxu, kde bola pripravená kadička s nasýteným roztokom K₂SO₄, ktorý udržoval vlhkosť 96 % po dobu 7 dní. Plastový box sa uzavrel a vložil do inkubátora, ktorý sa nechal vopred predhriať na teplotu 36°C a táto teplota bola udržiavaná po celú dobu odchovu.
- 2. Deň** - V tento deň sa larvičky nekŕmili. Kontrolovala sa, len ich životaschopnosť. Ak bola nájdená nejaká larvička mŕtva, bola odstránená spolu s materskou miskou a dentálnym tampónom.
- 3. Deň** - Najprv bola skontrolovaná životaschopnosť larvičiek a následne boli nakŕmené určenou diétou. V tento deň im bolo podávaných 20 µl diéty B (diéta B v suchom stave zmiešaná s dd H₂O do 10 ml), ktorá je zmiešaná s materskou kašičkou v pomere 1:1. Kŕmenie muselo byť najprv predhriate vo vodnom kúpeli na 37°C a následne podané larvičkám. Po nakŕmení sa larvičky vrátili do boxu v inkubátore.
- 4. Deň** - Bola skontrolovaná životaschopnosť larvičiek a následne boli nakŕmené určenou diétou. V tento deň im bolo podávaných 30 µl diéty C (diéta C v suchom stave zmiešaná s dd H₂O do 10 ml), ktorá je zmiešaná s materskou kašičkou v pomere

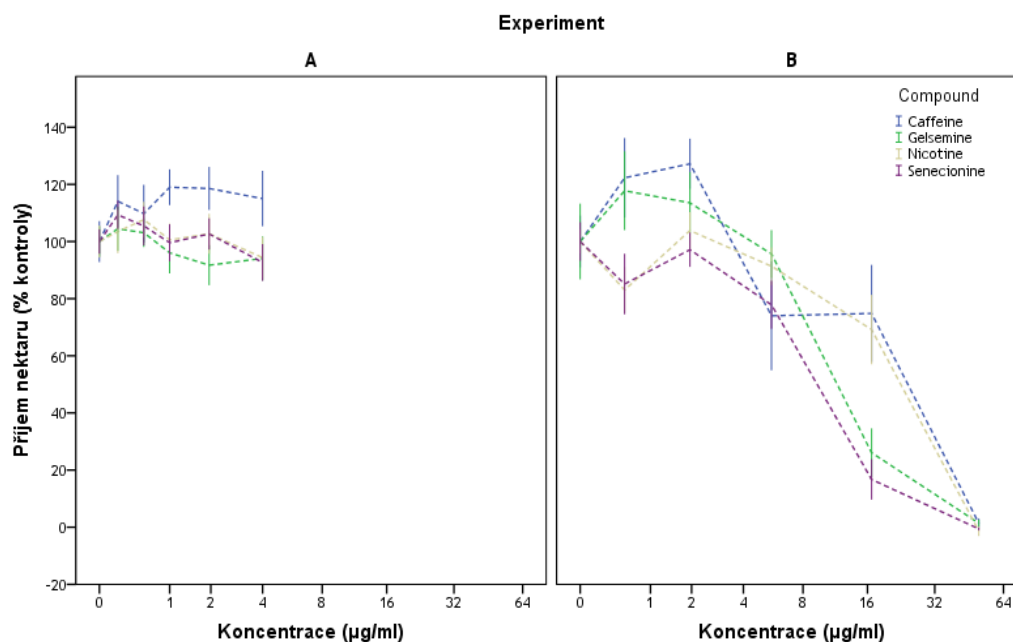
- 1:1. Kŕmenie muselo byť najprv predhriate vo vodnom kúpeli na 37°C a následne podané larvičkám. Po nakŕmení sa larvičky vrátili do boxu v inkubátore.
5. **Deň** - Najprv bola skontrolovaná životaschopnosť larvičiek a následne boli nakŕmené určenou diétou. V tento deň im bolo podávaných 40 µl diéty C (diéta C v suchom stave zmiešaná s dd H₂O do 10 ml), ktorá je zmiešaná s materskou kašičkou v pomere 1:1. Kŕmenie muselo byť najprv predhriate vo vodnom kúpeli na 37°C a následne podané larvičkám. Po nakŕmení sa larvičky vrátili do boxu v inkubátore.
6. **Deň** - Bola skontrolovaná životaschopnosť larvičiek a následne boli nakŕmené určenou diétou. V tento deň im bolo podávaných 60 µl diéty C (diéta C v suchom stave zmiešaná s dd H₂O do 10 ml), ktorá je zmiešaná s materskou kašičkou v pomere 1:1. Kŕmenie muselo byť najprv predhriate vo vodnom kúpeli na 37°C a následne podané larvičkám. Po nakŕmení sa larvičky vrátili do boxu v inkubátore.
7. **Deň** - Larvičky sa tento deň prestávali kŕmiť. Pod lupou bola skontrolovaná životaschopnosť larvičiek a následne boli vrátené do plastového boxu v inkubátore.
8. **Deň** - Bola pod lupou skontrolovaná životaschopnosť larvičiek. Počet preživších larvičiek bola zapísaná do tabuliek, ktoré boli následne vyhodnotené.

9. Výsledky

9.1 Výsledky preferenčného testu

Z výsledkov vyplýva, že všetky testované alkaloidy v umelom nektári vykazujú štatisticky významný ($P < 0,05$) repelentný účinok voči včelám v koncentráciách vyšších ako $17 \mu\text{g/ml}$. U senecioninu a kofeínu bol preukázaný repelentný účinok od koncentrácií vyšších ako $6 \mu\text{g/ml}$. V koncentrácií $1\text{--}3 \mu\text{g/ml}$, bolo viditeľné preferenčné správanie na niektorých kvetoch, ktoré obsahovali nepatrné množstvo kofeínu, gelseminu a nikotínu, ale nie senecioninu (graf 1). Kofeín, gelsemin a nikotín boli prijímané frekventovanejšie u včiel a to o 20, 19 a 10 %, respektíve viac ako kontrolný roztok. Tento účinok nebol štatisticky významný oproti kontrole s výnimkou kofeínu v koncentrácii $2 \mu\text{g/ml}$, ktorý bol prijímaný významne viac ($P < 0,05$). Naše výsledky ukazujú, že senecionin je pre včely repelentný, ale aj ostatné alkaloidy sa zdajú byť v nejakej oblasti pre včely atraktívne. Oba nezávislé experimenty ukázali podobný priebeh, s výnimkou gelseminu, kde oba nezávislé pokusy vykazujú voči kontrole repelentný či mierne preferenčný vplyv.

Graf 1.: Výsledky dvoch nezávislých experimentov vykonaných v 6–7 opakovaníach. Zvislé úsečky značia strednú chybu priemeru.



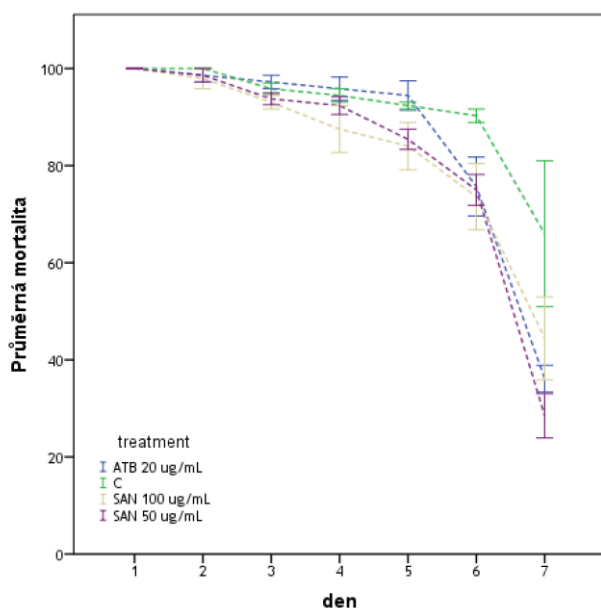
Prvý experiment, sa zameriava na rozmedzie koncentrácií $0,5\text{--}4 \mu\text{g/ml}$ za použitia dvojnásobného riedenia. Druhý experiment ukazuje, preferenčný účinok štyroch alkaloidov v širokom rozsahu koncentrácií $0,2\text{--}50 \mu\text{g/ml}$ pripravených trojnásobným riedením.

V kontrole bol zaznamenaný 100% príjem. Zvislé úsečky ukazujú, štatisticky významný rozdiel $P < 0,05$ kontroly.

9.2 Výsledky – Umelý odchov larvičiek

Z výsledkov zobrazených v grafe č. 2. vyplýva, že k poklesu životaschopnosti larvičiek dochádzalo už v druhom dni odchovu. K najväčšej úmrtnosti larvičiek došlo v šiestom dni a to u všetkých skupín okrem kontroly. V tejto skupine bol pokles menej výrazný. V posledný deň testu je viditeľná výrazná úmrtnosť u skupiny S 0,05 (s prídavkom sanguinarínu 0,05 $\mu\text{g/ml}$), kde bol nárast úmrtnosti larvičiek oproti prvému dňu o 71,5 %. Tento trend bol preukázaný aj u ostatných skupín a to o 63,9 % u skupiny ATB (oxytetracyklín), o 55,6 % u skupiny S 0,1 (sanguinarín) a o 34 % u kontrolnej skupiny.

Graf 2.: Mortalita larvičiek v *in vitro* pokuse v priebehu prvých siedmich dňoch (pri kŕmení). Zvislé úsečky značia strednú chybu priemeru.



C: kontrolná skupina; ATB: skupina s prídavkom antibiotík (oxytetracyklín) v koncentrácii 20 $\mu\text{g/ml}$. SAN 100 $\mu\text{g/mL}$: Skupina s prídavkom sanguinarínu v koncentrácii 0,1 $\mu\text{g/ml}$. SAN 50 $\mu\text{g/mL}$: Skupina s prídavkom sanguinarínu v koncentrácii 0,05 $\mu\text{g/ml}$.

10. Diskusia

Preferencia a repelencia prírodných látok:

Kofeín a nikotín ukazovali v nami zvolenom teste podstatne menší repelentný účinok na včely než ďalšie dve testované látky. Výrazná preferencia bola sledovaná najmä u kvetov, ktoré obsahovali nikotín a kofeín v koncentrácii 1–3 µg/ml.

Týmto boli potvrdené výsledky štúdie Köhler a kol. (2012), kde boli testované rôzne koncentrácie nikotínu taktiež v rôznych koncentráciách sacharózového roztoku. V ich výsledkoch bolo preukázané, že nektár s nikotínom má odpudivé účinky vo vysokých koncentráciách, ale robotnice ho telerovali ak bola koncentrácia cukru vyššia. Nikotín dodáva nektáru horkú chuť, ale bolo preukázané že včely majú slabé vnímanie chutí, pretože majú len desať chuťových receptorov, čo je v porovnaní s viac než šesťdesiatimi chuťovými receptormi uvedenými u iných druhov hmyzu málo (Robertson a Wanner, 2006). U včiel je taktiež menej pravdepodobné, že budú prijímať sacharózový roztok s prídavkom chinínu, ktorý je pre ne s rastúcou koncentráciou toxický (Wright a kol., 2010). U chinínu pridaného k roztoku sacharózy bola zistená inhibícia odozvy sacharózových receptorov, čo naznačuje, že horké látky, akou je nikotín, môžu spôsobiť prelinavosť so sladkou chuťou (de Brito, Sanchez a kol., 2005). Včely sú tolerantné k nektáru s vyšším prídavkom nikotínu (Kessler a kol., 2010), ale len pri požití pomerne veľkého množstva cukorného roztoku. Tieto vyššie koncentrácie sú zaznamenané v prírode sa vyskytujúcom nektári (Tadmor - Melamed a kol., 2004). Tento fakt bol preukázaný aj v štúdiu Köhler a kol. (2012), kde boli včelami prijímané koncentrácie vyššie než vyskytujúce sa prirodzene v kvetoch, ale len v závislosti na koncentrácii sacharózy v roztoku. Singaravelan a kol. (2005) zistili, že nízke koncentrácie nikotínu a kofeínu vyvolali u včiel značnú preferenciu potravy. Tento poznatok bol potvrdený aj v našom preferenčnom teste, kde bol nikotín, kofeín ale aj gelsemín preferovanejší než kontrolný roztok, ale iba v nízkych koncentráciách (1–3 µg/ml) a to o viac ako 20, 19 a 10 %. Čiastočne repelentný účinok sekundárnych metabolitov môže mať dôsledky na stav rastlín, napr. mory a kobyľky (opeľovači niektorých rastlín) sú viac odpudzované nektárom s obsahom nikotínu ako kontrolným sacharózovým roztokom obsahujúcim tento alkaloid (Kessler a Baldwin, 2006), čo môže súvisieť s koncentráciou cukrov v nektári. Môže to byť následkom vysokej koncentrácie sekundárnych metabolitov a nedostatkom alternatívnych zdrojov nektáru a to môže viesť k zníženej produkcii medu (Liu a kol., 2004).

Nikotín v roztoku sacharózy je toxický pre dospelé včely, po 48h od začiatku perorálneho podávania, v koncentrácii 12 mM (Detzel a Wink, 1993), čo je oveľa vyššia koncentrácia

k akej by sa mohli včely dostať v prirodzených podmienkach. V štúdií Köhler a kol. (2012) prirodzene sa vyskytujúce koncentrácie nikotínu nemali vplyv na mortalitu robotníčok zo silných skupín. V závislosti na dávke pôsobí taktiež na inhibíciu rastu rôznych baktérií a hubových patogénov (Pavia a kol., 2000). Bolo tiež preukázané, že zabíja aj niektoré druhy parazitov (Barbosa a kol., 1986) a má tiež antivírové účinky, čo bolo znázornené na víruse hepatitídy C, kde tento alkaloid inhiboval replikáciu vírusu (Yamashina a kol., 2008).

Nikotín pôsobí na endogénne nAChR prevládajúce v centrálnej a periférnej nervovej sústave takmer u všetkých živočíšnych druhov (Laviolette a van der Kooy, 2004). Ako odpudzujúca látka sa nikotín môže nájsť v rôznych častiach rastlín. Vo vysokej koncentrácii sa vyskytuje najmä vo vegetatívnych častiach rastliny (Ohnmeiss a Baldwin, 2000). Opakovaná expozícia nikotínu vyvoláva následne neuronálne zmeny v mezolimbickom systéme dopamínu v mozgu, čo následne vyvoláva u cicavcov nutkanie k vyhľadávaniu spomínaného sekundárneho alkaloidu (Laviolette a van der Kooy, 2004). Aj keď mechanizmus v súvislosti s hmyzom nie je doteraz objasnený, existujú určité náznaky, že bezstavovce, ako sú háďatka *Caenorhabditis elegans* (Schafer, 2004), a hmyz, ako je *Drosophila* (Bainton et al., 2000) prejavujú návykové správanie pokiaľ sú vystavené nízkej koncentrácii nikotínu. Vzhľadom k tomu je dôležité otestovať, či nikotín ukladaný rastlinami v nektári vyvoláva závislosť a aký je jeho vplyv na opeľovačov. U cicavcov charakterizuje doteraz vydaná literatúra závislosť ako progresívny nárast príjmu psychoaktívnych látok cez ich toxický účinok a aj po odňatí drogy po stanovenú dobu (Heyne a Wolffgramm, 1998). Avšak závislosť (ak existuje) u opeľovačov na látku akou je nikotín v nektári, je potrebné aj naďalej testovať. Je však potrebné poznamenať, že prirodzene sa vyskytujúce koncentrácie, nemajú vplyv na aktivitu včiel v kliečkach (Singaravelan a kol., 2006).

Kofeín pôsobí ako mierna posila a psychostimulant na cicavce, ako sú napr. potkany (Vitiello a Woods, 1997). Naproti tomu môže pôsobiť ako pesticíd (Bernays a kol., 2000), aj keď nie je veľmi účinný proti hmyzím škodcom kávy (Guerreiro a Mazzafera, 2000). Kofeín je v relatívne vysokých koncentráciách odpudivý a dokonca pre včely toxický (Detzel a Wink, 1993), čo bolo preukázané aj vo výsledkoch nášho testu, kde vykazoval repelentný efekt v koncentráciách vyšších ako 6 µg/ml. Výrazné preferenčné výsledky oproti kontrolnému roztoku vykazovali len nízke koncentrácie a to konkrétne koncentrácie 1–3 µg/ml. Vo svojej štúdií Singaravelan a kol. (2005) publikoval, že včely preferovali kofeín v 20% roztoku sacharózy v rozsahu koncentrácií vyskytujúcich sa prirodzene v nektári rastlín. V prirodzených podmienkach zbierajú včely nektár s obsahom kofeínu a dokonca dávajú prednosť alternatívnym zdrojom potravy (ISH - Am a Eisikowitch, 1998).

Detzel a Wink (1993) zistili, že včely boli odpudzované mnohými sekundárnymi metabolitmi a to hlavne vo vyšších koncentráciách, ktoré testovali. Rovnako tomu bolo aj v našom teste, kde všetky testované alkaloidy pôsobili repelentne v koncentráciách vyšších ako 17 µg/ml. Detzel a Wink (1993) skúmali hlavne vyššie koncentrácie vyskytujúce sa v peľi, oproti nášmu testu, kde boli skúmane koncentrácie vyskytujúce sa v nektári. Prítomnosť sacharidov (cukry a cukrové alkoholy), môže maskovať nepríjemnú chuť niektorých SC pre hmyz (Glandinning, 2000) Tieto sacharidy inhibujú odozvu buniek odpudzujúcou chuťou (Shields a Mitchell, 1995). Zdá sa, že sacharóza v koncentrácii 20 %, by mohla maskovať nepríjemnú chuť nízkych koncentrácií kofeínu a nikotínu (Singaravelan a kol., 2005).

Nami použité koncentrácie gelsemínu v teste A vykazovali u včiel výrazne repelentné účinky. Naproti tomu v teste B boli nižšie koncentrácie gelsemínu preferované a až koncentrácie vyššie ako 6 µg/mL vykazovali repelentný účinok.

Gelsemium sempervirens vylučuje alkaloid gelsemin, ktorý sa nachádza v nektári tejto rastliny. Predchádzajúce práce ukázali, že čmeliaky (*B. bimaculatus*) strávili menej času na kvetoch *G. sempervirens* a taktiež navštívili menší počet kvetov, kde bola koncentrácia alkaloidu v nektári zvýšená (Adler a Irwin, 2005 a 2006), čo naznačuje, že nektár s vyšším obsahom gelsemínu môže pôsobiť repelentne. Toto tvrdenie bolo taktiež potvrdené v štúdiu Gegear a kol. (2007), kde bolo zistené, že nektár s prídavkom gelsemínu pôsobí repelentne vo vyšších koncentráciách. Taktiež bola zistená závislosť koncentrácie sacharózy v roztoku na príjme alkaloidov. V tejto štúdiu bol najfrekvencovanejší prijímaný roztok 30% sacharózy s prídavkom gelsemínu v množstve 50 ng/µl. Náš experiment toto tvrdenie podporil až na test B, kde bol gelsemín preferovaný v nízkych koncentráciách. Manson a kol. (2010) testovali vplyv gelsemínu voči črevnému parazitovi čmeliakov *C. bombi*. Bolo zistené, že má priaznivé účinky na zdravie čmeliakov. Taktiež bolo preukázané, že umelý nektár obsahujúci prirodzene sa vyskytujúce koncentrácie alkaloidu znižuje intenzitu črevnej infekcie u opel'ovačov a to už po niekoľkých dňoch podávania tejto diéty. Tieto výsledky naznačujú, že nektár bohatý na alkaloidy môže pôsobiť ako mikrobicíd proti patogénom opel'ovačov, ale nemá priamy vplyv na celkovú životaschopnosť jedinca (Manson a kol., 2010). Účinky sekundárnych metabolitov rastlín voči interakcii hostiteľ – patogén nie sú úplne preštudované a preto sú mnohokrát zle pochopené (Cory a Hoover, 2006). Taktiež sa zdá, že niektoré rastlinné alkaloidy majú antiprotozoálne vlastnosti, ktoré sú účinné aj voči ľudským parazitom, ako sú napr. *Tripanosoma brucei rhodesiense*, ktorá je pôvodcom africkej spavej choroby (Freiburghaus et al., 1996). Dá sa povedať, že u čmeliakov má gelsemín podobné

účinky na *C. bombi*. Hoci mechanizmus nie je doposiaľ objasnený, predpokladom je, že značné koncentrácie alkaloidu spôsobujú u *C. bombi* zníženie rastu a replikácie (Manson a kol., 2010). Užívanie alkaloidov môže tiež zvýšiť črevné pH, ktoré by mohlo byť škodlivé voči patogénnym bunkám (Stiles a Paschke 1980). Tiež môže potrava bohatá na alkaloidy zvýšiť rýchlosť vylučovania patogénu. Je známe, že zvieratá, ktoré prijímajú sekundárne metabolity v potrave sa často vysporiadajú s vlastnou toxicitou prostredníctvom zrýchleného vylučovania (Wink a Theile 2002).

Väčšina svetových publikácií a vedeckých prác sa zameriava pri testoch na preferenciu včiel, a to hlavne na vplyv nikotínu a kofeínu. My sme testovali ešte ďalšie dve látky (gelsemin a senecionín). O týchto látkach existuje málo, respektíve žiadne publikácie, ktoré by objasnili ich vplyv a preferenciu u dospelých včiel. K účinku senecionínu, ako k jedinému, nebol doposiaľ vydaný ani jeden vedecký článok, čo nám neposkytuje možnosť naše výsledky porovnať s ďalšími štúdiami a potvrdiť alebo vyvrátiť naše tvrdenia. Môžeme teda podľa nášho experimentu tvrdiť, že senecionín má na včely výrazné repelentné účinky. Tieto účinky boli potvrdené ako v testoch A tak aj v testoch B.

Umelý odchov larvičiek:

Pri umelom odchove larvičiek boli použité dve koncentrácie sanginarínu a jedna koncentrácia antibiotík (oxytetracyklín), všetko testované v troch opakovaniach. U všetkých skupín však došlo k rapídному poklesu životaschopnosti a to už v 2. a 3. dni po prelarvovaní. Jedným z dôvodov môže byť prídavok DMSO ako rozpúšťadla v zásobných roztokoch alebo neopatrnosťou pri práci. K najväčšiemu úhynu došlo v skupine SAN 50 µg/ml, kde pokles činil až 71,5 % v priebehu siedmich dní.

Sanguinarín je relatívne netoxický pre ľudí a často používaný ako antibakteriálna látka v zubných pastách a ústnych vodách. Komerčne je dostupný v mnohých doplnkoch pre rôzne druhy zvierat s výnimkou včiel (Zhang a kol., 2005). Flesar a kol. (2010) testovali účinky, 26 prírodných látok a extraktov včetně sanginarínu a jeho antimikrobiálnej aktivity voči *P. larvae* (pôvodca moru včelieho plodu). V tomto teste vykazoval sanguinarín najsilnejšie účinkov. Bolo taktiež preukázané, že má potenciál k regulácii rastu *P. larvae* v *in vitro* podmienkach. Naproti týmto zisteniam došlo v našom teste k rapídному poklesu životaschopnosti a tým pádom sme neboli schopný potvrdiť tvrdenie, že je sanginarín netoxický voči larvám včiel. Je možné že došlo k toxickému pôsobeniu DMSO, čo mohlo byť spôsobené naviazaním vody, jeho oxidáciou, či zlou šaržou výrobku. Je vhodné tento pokus zopakovať bez prídavku DMSO, ale s prídavkom iného rozpustného roztoku.

11. Záver

V preferenčnom teste boli testované rôzne koncentrácie vybraných alkaloidov (nikotín, kofeín, gelsemin, senecionin), ktoré boli predkladané včelstvu za pomoci umelých kvetov. Tieto včely boli oddelené od ostatných jedincov a tiež prirodzenej pastvy vďaka izolačnému stanu.

V takto prevedenom experimente bolo preukázané, že včely preferujú viac 20% cukorný roztok než kofeín a gelsemín. Kofeín bol včelami preferovaný v oboch testoch, tak ako v rozmedzí koncentrácie setu A (0,5–4 µg/ml) tak aj v rozmedzí setu B (0,2–50 µg/ml). Nikotín a senecionin neboli v ani jednom z testov preferovanejšie ako kontrolný 20% cukorný roztok. Dalo by sa povedať, že v teste A (0,5–4 µg/ml) nebol nijak výrazne preferovaný ani gelsemin, ale v sete B (0,2–50 µg/ml) už vykazoval skoro rovnako vysokú preferenciu u včiel ako kofeín. Tieto výsledky, aj keď predtým niektoré už opublikované boli nami potvrdené. V budúcnosti pri ďalších testoch budeme používať novú metódu a plne randomizované experimentálne usporiadanie pre každé opakovanie, aby sa zabránilo značeniu a možnosti zapamätania si určitých miest včelami.

V druhom experimente pri umelom odchove larvičiek boli testované antibiotiká (oxytetracyklín) a sanguinarín v dvoch koncentráciách. Tieto látky boli podávané larvičkám v diéte presne určenej pre konkrétny deň. Larvičky boli odchovávané v umelo vytvorenom prostredí inkubátoru za maximálnej sterility. Naším cieľom bolo zistiť, či niektorá z podávaných látok bude na larvičky pôsobiť podporne.

V tomto experimente nebol preukázaný u žiadnej z testovaných látok antimikrobiálny účinok na organizmus. Naopak bolo zistené, že všetky pridávané látky spôsobujú u umelo odchovávaných larvičiek úmrtnosť. K najväčšej úmrtnosti došlo v skupine S 0,05 (sanguinarín) a to o 71,5 %. Nasledovala skupina s prídavkom antibiotík, S 0,1 (sanguinarín) a nakoniec kontrola, kde bola úmrtnosť 34,0 %.

Tieto výsledky nám neumožnili potvrdiť teórie o antimikrobiálnom účinku sanguinarínu. Mohlo to byť spôsobené rozpúšťaním pridávaných látok v roztoku DMSO, ktorý bol taktiež pridávaný do diéty u kontrolnej skupiny. S ohľadom na tieto výsledky navrhujeme pokračovať v testovaní vplyvu vybraných látok na životaschopnosť larvičiek, ale s použitím iného rozpúšťadla.

12. Zoznam použitej literatúry

- Adler L. S. & Irwin R. E. 2005. Ecological costs and benefits of defenses in nectar. *Ecology*, 86. 2968 – 2978.
- Adler L. S. & Irwin R. E. 2006. Comparison of pollen transfer dynamics by multiple floral visitors: experiments with pollen and fluorescent dye. *Ann. Bot.*, 97. 141 – 150.
- Adler L. S. 2001. The ecological significance of toxic nectar. *Oikos*. 91. 409 – 420
- Afik O., Dag A., Kerem Z., Shafir S. 2006. Analyses of Avocado (*Persea americana*) nectar properties and their perception by Honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of chemical ecology*. 32. 1949 – 1963.
- Aniszewski T. 2007. Alkaloids – secret of life, Alkaloid chemistry, biological, significance, applications and ecological role. 1st ed. Boston: Elsevier. 334s. ISBN - 13: 978 - 0 - 444 - 52736 - 3.
- Armenta S., Garrigues S., de al Guardia M. 2005. Solid - phase FT - Raman determination of caffeine in energy drinks. *Analytica Chimica Acta*. 547 (2). 197 – 203.
- Bainton R. J., Tsai L. T. Y., Singh C. M., Moore M. S., Neckameyer W. S. and Heberlein U. 2000. Dopamine modulates acute responses to cocaine, nicotine and ethanol in *Drosophila*. *Curr. Biol*. 10. 187 – 194.
- Balasundram N., Sundram K., Samman S. 2006. Phenolic compounds in plants and agriindustrial by - products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*. 99 (1). 191 – 203.
- Barbosa P., Saunders J. A., Kemper J., Trumbule R., Olechno J., Martinat P., 1986. Plant allochemicals and insect parasitoids – effects of nicotine on *Cotesia congregata* (Say) (Hymenoptera: Braconidae) and *Hyposoter annulipes* (Cresson) (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Journal of Chemical Ecology* 12. 1319 – 1328.
- Bennett R. N., Wallsrove R. 1994. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist*. 127 (4). 617 – 633.
- Bernays E. A., Oppenheim S., Chapman R. F., Kwon H. and Gould, F. 2000. Taste sensitivity of insect herbivores to deterrents is greater in specialists than in generalists: A behavioral test of the hypothesis with two closely related caterpillars. *J. Chem. Ecol.* 26. 547 – 563.

- Buck B. L., Altermann E., Svingerud T., Klaenhammer T. 2005. Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl. Environ. Microbiol.* 71. 8344 – 8351.
- Bulánková I. 2005. Léčivé rostliny na naši zahradě. Grada Publishing, a. s. 83s. ISBN 978 - 80 - 247 - 1274 - 1.
- Cook D., Mansom J. S., Gardner D. R., Welch K. D., Irwin R. E. 2013. Norditerpene alkaloid concentrations in tissues and floral rewards of larkspurs and impacts on pollinators. *Biochemical Systematics and Ecology.* 48. 123 – 131.
- Cory J. S., Hoover K. (2006) Plant - mediated effects in insect–pathogen interactions. *Trends Ecol. Evol.* 21. 278 – 286
- De Assis Junior E. M., Dos Santos Fernandes I. M., Santos C. S., De Mesquita L. X., Aparecido Pereira R., Borges Maracajá P., Soto - Blanco B. 2011. Toxicity of castor bean (*Ricinus communis*) pollen to honeybees. *Agriculture, Ecosystems and Environment.* 141. 221 – 223.
- De Brito Sanchez M. G., Giurfa M., de Paula Mota T. R., Gauthier M., 2005. Electrophysiological and behavioural characterization of gustatory responses to antennal ‘bitter’ taste in honeybees. *European Journal of Neuroscience* 22. 3161 – 3170.
- Detzel A., Wink M. 1993. Attraction, deterrance or intoxication of bees (*Apis mellifera*) by plant allelochemicals. *Chemoecology.* 4/1. 8 – 18.
- Drobníková V. 1983. Bakterie ve včelařství. *Včelařství.* 9. 202 – 203.
- Drobníková V. 1983. Kvasinky a plísně ve včelařství. *Včelařství.* 10. 223 – 225.
- Drobníková V. 1990. Mikroflóra a távení včel. *Včelařství.* 2. 28 – 29.
- Elliott S. E., Irwin R. E., Adler L. S., Williams N. M. 2008. The nectar alkaloid, gelsemine, does not affect offspring performance of a native solitary bee, *Osmia lignaria* (Megachilidae). *Ecological Entomology.* 33. 298 – 304.
- Engel P., Moran N. A. 2013. Functional and evolutionary insights into the simple yet specific gut microbiota of the honey bee from metagenomic analysis. *Gut Microbes,* 4(1). 60 – 65.
- Fattorusso E., Tagliatela - Scafati O. 2008. Modern Alkaloids: Structure, Isolation, Synthesis, and Biology. Wiley. 665s. ISBN 3527315217.
- Ferenčík M., Škárka B., Novák M., Turecký L. Biochémiá. 2000. Slovak Academic Press. 924s. ISBN 8088908574.

- Flesar J., Havlík J., Klouček P., Rada V., Titera D., Bednar M., Stropnický M., Kokoska L. 2010. In vitro growth-inhibitory effect of plant-derived extracts and compounds against *Paenibacillus* larvae and their acute oral toxicity to adult honey bees. *Veterinary Microbiology*. 145. 129 – 133.
- Freiburghaus F, Kaminsky R, Nkunya M. H. H., Brun R. 1996. Evaluation of African medicinal plants for their in vitro trypanocidal activity. *J Ethnopharmacol*. 55. 1 – 11
- Gaisler J., Kalač B., Kohoutek A., Komárek P., Kubáň V., Míka V., Odstrčilová V., Pozdíšek J. 2001. Fenolické látky v lučních rostlinách. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha. 172 s.
- Gegear R. J., Manson J. S., Thomson J. D. 2007. Ecological context influences pollinator deterrence by alkaloids in floral nectar. *Ecology Letters*. 10. 375 – 382.
- Gilliam M. 1997. Identification and role of non - pathogenic microflora associated with honey bee. *FEMS Microbiol. Lett*. 155. 1 – 10.
- Gilliam M., Prest D. B. 1972. Fungi isolated from intestinal contents of foraging worker honey bee. *J. Invertebr. Pathol*. 20. 101 – 103.
- Glendinning J. I. 2000. How do inositol and glucose modulate feeding in *Manduca sexta* caterpillars? *J. Exp. Biol*. 203. 1299 – 1315.
- Guerreiro O. and Mazzafera P. 2000. Caffeine does not protect coffee against the leaf miner *Perileucoptera coffeella*. *J. Chem. Ecol*. 26. 1447 – 1464.
- Haragsim O. 2007. Včelařské byliny. Grada Publishing, a. s., Praha 7. 108 s. ISBAN 978 - 80 - 247 - 6478 - 8.
- Haragsim O. 2013. Včelařské dřeviny a byliny. Grada Publishing, a. s. 200s. ISBN 978 - 80 - 247 - 4647 - 0.
- Heyne A. and Wolffgramm J. 1998. The development of addiction to D - amphetamine in an animal model: same principles as for alcohol and opiate. *Psychopharmacology* 140. 510 – 518.
- Inglis G.D., Sigler L., Goettel M. S. 1993. Aerobic microorganisms associated with alfalfa leafcutter bees (*Megachile rotundata*). *Microb. Ecol*. 26. 125 – 143.
- Ish - am G. and Eisikowitch D. 1998. Low attractiveness of avocado (*Persea americana* Mill.) flowers to honeybees (*Apis mellifera* L.) limits fruit set in Israel. *J. Hortic. Sci. Biotechnol*. 73. 195 – 204.
- Kačániová M., Pavličová S., Haščík P., Kociubinski G., Knazovická V., Sudzina M., Sudzinová J., Fikselová M. 2009. Microbial communities in bees, pollen and honey from Slovakia. *Acta Microbiol. Imm. H*. 56. 285 – 295.

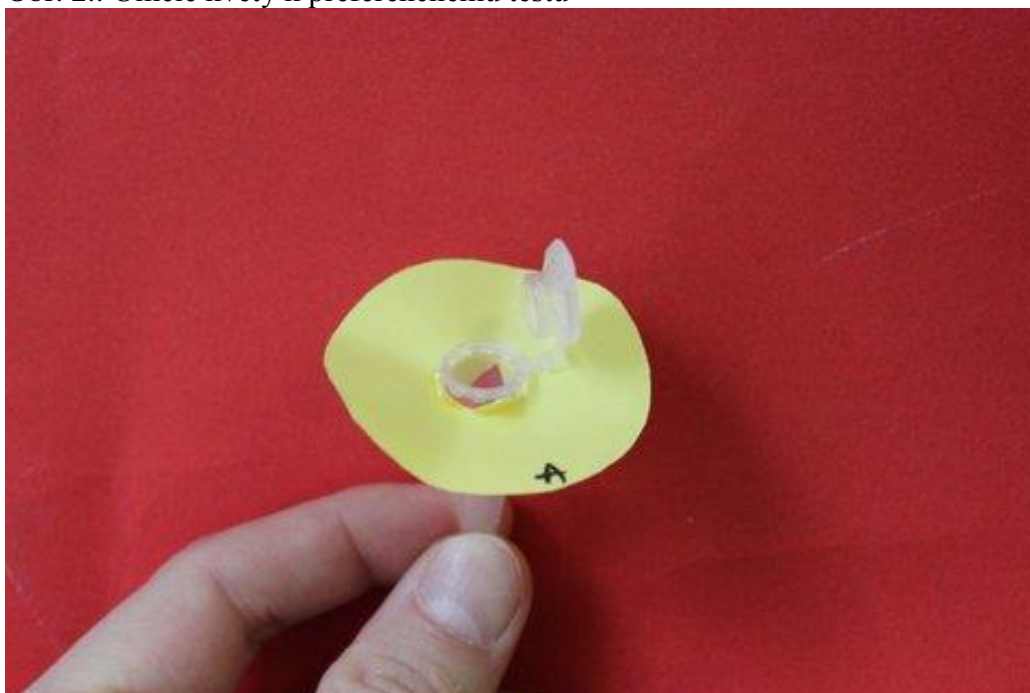
- Kaltenpoth M., Göttler W., Herzner G., Strohm E. 2005. Symbiotic bacteria protect wasp larvae from fungal infestation. *Curr. Biol.* 15. 475 – 479.
- Kessler D., Baldwin I. T. 2006. Making sense of nectar scents: the effects of nectar secondary metabolites on floral visitors of *Nicotiana attenuata*. *Plant Journal* 49. 840 – 854.
- Kessler D., Diezel C., Baldwin I. T. 2010. Changing pollinators as a means of escaping herbivores. *Current Biology* 20. 237 – 242.
- Köhler A., Pirk Ch. W. W., Nicolson S. W. 2012. Honeybees and nectar nicotine: Deterrence and reduced survival versus potential health benefits. *Journal of insect physiology.* 58. 286 – 292.
- Koreňová A. Prírodné látky a ich využitie pre zdravie. Slovenská technická univerzita v Bratislave [online]. [cit. 14 - 02 - 2014]. Dostupný z <http://www.fchpt.stuba.sk/docs/doc/pedagogika/chemia_a_biologia_2008.pdf#page=63>
- Kubišová S., Titěra D. 1988. Pyl ve výživě včel. Český svaz včelařů ve Státním zemědělském nakladatelství v Praze. 80 s.
- Lampeitl F. 1996. Chováme včely. Blesk. 173 s. ISBAN 80 - 85606 - 96 - 8.
- Lavolette S. R. and van der Kooy D. 2004. The neurobiology of nicotine addiction: Bridging the gap from molecules to behaviour. *Nat. Rev., Neurosci.* 5. 55 – 65.
- Liu F., Fu W., 2004. Plant with toxic nectar kills native honey bees in SW China. *American Bee Journal* 144. 707 – 708.
- Lucký Z. 1972. Nemoci včel. Státní pedagogické nakladatelství, n. p., Praha 1. 126 s.
- Macholán L. Sekundární metabolity. 1998. Masarykova univerzita. 147s. ISBN 802101735X.
- Manson J. S., Cook D., Gardner D. R., Irwin R. E. 2013. Does - dependent effects of nectar alkaloids in a montane plant - pollinator community. *Journal of Ecology.* 101. 1604 – 1612.
- Manson J. S., Otterstatter M. C., Thomas J. D. 2010. Consumption of nectar alkaloid reduces pathogen load in bumble bees. *Oecologia.* 162. 81 – 89.
- Moravcová J. Biologicky aktivní přírodní látky. Vysoká škola chemicko - technologická v Praze [online]. [cit. 15 - 01 - 2014]. Dostupný z <<http://www.vscht.cz/lam/new/bapl2003 - 01.pdf>>
- Ohnmeiss T. E. and Baldwin I. T. 2000. Optimal defense theory predicts the ontogeny of an induced nicotine defense. *Ecology* 81. 1765 – 1783.
- Ouwehand A.C., Salminen S., Isolauri E. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Anton.Leeuw.Int.J.G.* 82. 279 – 289.

- Pavia C.S., Pierre A., Nowakowski J., 2000. Antimicrobial activity of nicotine against a spectrum of bacterial and fungal pathogens. *Journal of Medical Microbiology*. 49. 674 – 675.
- Rada V., Havlík J., Flesar J. Biologicky aktivní látky ve výživě včel [online]. VUZV červen 2009 [cit. 2013 - 10 - 06]. Dostupne z <http://www.vuzv.cz/sites/Vcely.pdf>
- Reinhard A., Janke M., von der Ohe W., Kempf M., Theuring C., Hartmann T., Schreier P., Beuerle T. 2009. Feeding Deterrence and Detrimental Effects of Pyrrolizidine Alkaloids Fed to Honey Bees (*Apis mellifera*). *Journal of chemical ecology*. 35. 1086 – 1095.
- Robertson, H.M., Wanner, K.W., 2006. The chemoreceptor superfamily in the honey bee, *Apis mellifera*: Expansion of the odorant, but not gustatory, receptor family. *Genome Research* 16. 1395 – 1403.
- Schaffer W. R. 2004. Addiction research in a simple animal model: the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Neuropharmacology* 47. 123 – 131.
- Schönfeld A. 1955. Anatomie, morfologie a fyziologie včely medonosné. Československá akademie zemědělských věd ve Státním zemědělském nakladatelství Praha. 369 s.
- Shields V. D. C. and Mitchell B. K. 1995. The effect of phagostimulant mixtures on deterrent receptor(s) in two crucifer-feeding lepidopterous species. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B* 347. 459 – 464.
- Singaravelan N., Inbar M., Ne'eman G., Distal M., Wink M., Izhaki I. 2006. The effect of nectar - nicotine on colony fitness of caged honeybees. *Journal of Chemical Ecology*. 32, 1. 49 – 58.
- Singaravelan N., Man G., Inbar M., Izhaki I. 2005. Feeding responses of free - flying honeybees to secondary compounds mimicking floral nectars. *Journal of chemical ecology*. 31 (12). 2091 – 2804.
- Stiles B, Paschke JD (1980) Midgut pH in diVerent instars of 3 *Aedes* mosquito species and the relation between pH and susceptibility of larvae to a nuclear polyhedrosis virus. *J Invertebr Pathol* 35. 58 – 64.
- Tadmor - Melamed H., Markman S., Arieli A., Distl M., Wink M., Izhaki I., 2004. Limited ability of Palestine Sunbirds *Nectarinia osea* to cope with pyridine alkaloids in nectar of Tree Tobacco *Nicotiana glauca*. *Functional Ecology* 18. 844 – 850.
- Tan K., Guo Y. H., Nicolson S. W., Radloff S. E., Song Q. S., Hepburn H. R. 2007. Honeybee (*Apis cerana*) Foraging Responses to the Toxic Honey of *Tripterygium*

- hypoglaucom (Celastraceae): Changing Threshold of Nectar Acceptability. *Journal of chemical ecology*. 33. 2209 – 2217.
- Trna, J., Táborská, E. Přírodní polyfenolové antioxidanty. Lékařská fakulta Masarykovy univerzity [online]. [cit. 15 - 11 - 2013]. Dostupný z <<http://www.med.muni.cz/biochem/seminare/prirantiox.rtf>>
- Velišek J. *Chemie potravin* 2. 2009, 3. vyd. Tábor: OSSIS, 623 s. ISBN 978 - 80 - 86659 - 16 - 9.
- Veselý V. a kol. 1985. Včelařství. Státní zemědělské nakladatelství v Praze. 368 s.
- Vittello M. and Woods S. C. 1977. Caffeine: preferential consumption by rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 3. 147 – 149.
- Wink M, Theile V. 2002. Alkaloid tolerance in *Manduca sexta* and phylogenetically related sphingids (Lepidoptera: Sphingidae). *Chemoecology* 12. 29 – 46
- Wright G. A., Mustard J. A., Simcock N. K., Ross - Taylor A. A. R., McNicholas L. D., Popescu, A., Marion - Poll, F., 2010. Parallel reinforcement pathways for conditioned food aversions in the honeybee. *Current Biology* 20. 2234 – 2240.
- Yamashina S., Mizui T., Kon K., Ikejima K., Kitamura T., Takei Y., Watanabe, S. 2008. Effect of nicotine on innate antiviral pathways and HCV replication. *Gastroenterology* 134. A786 – A787.
- Zhang, F., Chen, B., Xiao, S., Yao, S., 2005. Optimization and comparison of different extraction techniques for sanguinarine and chelerythrine in fruits of *Macleaya cordata* (Willd). *R. Br. Sep. Purif. Technol.* 42. 283 – 290.

13. Obrazová príloha

Obr. 2.: Umelé kvety k preferenčnému testu



Vlastný zdroj.

Obr. 3.: Polyesterová doska s nainštalovanými umelými kvetmi



Vlastný zdroj.

Obr. 4.: Izolačný stan s vybraným úľom



Vlastný zdroj.

Obr. 5.: Pripravená miktoritračná doštička s larvičkami



Vlastný zdroj.

14. Zoznam tabuliek

Tab. 1.: Základné zloženie peľu

Tab. 2.: Rozbory nektáru niektorých rastlín

Tab. 3.: Nektár vybraných druhov rastlín obsahujúci sekundárne metabolity

Tab. 4.: Účinok nektáru niektorých rastlín na včely

15. Zoznam obrázkov

Obr. 1.: Nákres preferenčného testu

Obr. 2.: Umelé kvety k preferenčnému testu

Obr. 3.: Polyesterová doska s nainštalovanými umelými kvetmi

Obr. 4.: Pripravená mikrotitračná doštička s larvičkami

16. Zoznam skratiek

SC:	Sekundárne metabolity
PA:	Pyrolizidínové alkaloidy
HIV:	Human immunodeficiency virus
DNA:	Deoxiribonukleová kyselina
DMSO:	Dimethylsulfoxid
Dd H₂O:	Millipore ultračistá voda
nAChR:	Nikotínové receptory acetylcholínu