

# Mikrobiota trávicího traktu včel a příbuzného hmyzu a faktory ovlivňující její složení

Autoreferát doktorské disertační práce

Ing. Zuzana Hroncová

Praha 2016

Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů

Česká zemědělská univerzita  
v Praze  
Kamýcká 129  
165 21, Praha 6 - Suchbátův

[www.af.czu.cz](http://www.af.czu.cz)



Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů

**ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE**  
**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Ing. Zuzana Hroncová**

.....  
Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky

**Mikrobiota trávicího traktu včel a příbuzného hmyzu a faktory  
ovlivňující její složení**

**Microbiota of the digestive tract of bees and related insects and  
the influencing factors**

.....  
autoreferát doktorské disertační práce

Studijní program: Zootechnika

Studijní obor:      Obecná zootechnika

Školitel:           **doc. Ing. Jaroslav Havlík, Ph.D.**  
Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky

Konzultant         **Ing. Jiří Killer, Ph.D.**  
Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v. v. i.

Oponenti:          RNDr. Jana Prodelalová, Ph.D. (VÚVeL, Brno) doc. Ing.  
Lukáš Kalous, Ph.D. (KZR, FAPPZ, ČZU v Praze)  
Mgr. Jiří Danihlík, Ph.D. (PřF, UPOL, Olomouc)

Obhajoba doktorské disertační práce se koná dne: 25.11.2016  
v 10:00 hod. na: Fakultě agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů ČZU  
v Praze. S doktorskou disertační prací je možno se seznámit na děkanátě  
FAPPZ ČZU v Praze.

**Praha 2016**

## **Summary**

This thesis consists of six research chapters, out of which, five have already been published in research journals, 1 is in the process of submission and the last chapter presents original unpublished confidential data in the process of manuscript preparation.

The research presented in this thesis concerns the complex mechanisms of bees and wasps immune system focused on microbiota as component of immunity. As shown in the introduction, highly social and managed species of bees like honey bees and bumble bees, play key roles in natural and agricultural ecosystems worldwide. Recent losses of bees have been attributed to pesticide exposure, poor nutrition, increased parasite loads and habitat degradation. Over the past several years, governments, beekeepers, and the general public worldwide have become concerned by increased losses of honey bee colonies, calling for more research on how to keep colonies healthy. Our main aim was to explore the complex mechanisms of bees and related species gut bacterial populations, their links to insect immunity and investigate the opportunities for an intervention. Part of our aim was to characterise the bumble bee and wasp gut microbiota using 16S RNA sequencing in a search for potentially novel bacterial species.

We have explained how microbiome interacts with the host and showed that major members of these communities appear to benefit the host. Also we have demonstrated effect of ontogenetic stage and age of bees on the development of microbiota. On the other hand geographic location does not have impact on bacterial diversity. The simple gut communities of social bees present ideal model systems to investigate the underlying evolutionary and genetic processes of such interactions. Information based on our results may help in the design of proper probiotic supplementation strategies with respect to physiological conditions in the honey bee gut.

## Obsah

<b>1</b>	<b>LITERÁRNÍ REŠERŠE</b> .....	2
<b>2</b>	<b>VĚDECKÉ HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE</b> .....	4
<b>3</b>	<b>MATERIÁL A METODY</b> .....	5
3.1	Identifikace a charakterizace nových bakteriálních druhů .....	5
3.2	Vliv prostředí, vývojových fází včel na vývoj mikrobioty a sledování mikrobiálních změn mezi jednotlivci v rámci jednoho úlu .....	6
3.3	Vliv přírodního alkaloidu a probiotických kmenů bakterií na životaschopnost infikovaných včel .....	7
3.4	Včelí preference vůči vybraným alkaloidům .....	8
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE</b> .....	10
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	15
<b>6</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	16
<b>7</b>	<b>SEZNAM PUBLIKACÍ K ŘEŠENÉ PROBLEMATICE</b> .....	22

# 1 LITERÁRNÍ REŠERŠE

Populace důležitých opylovačů, jako jsou včely a čmeláci, zaznamenaly v celosvětovém měřítku pokles a musí čelit výraznému tlaku mikrobiálních a parazitických epidemií, jako je mor a hniloba včelího plodu, *nosematosa* či varoáza. Intenzifikace zemědělství a ztráta divoce rostoucích rostlinných zdrojů se řadí mezi hlavní přispívající faktory. V oblastech s intenzivním zemědělstvím byla průkazně snížena pestrost potenciálních zdrojů potravy pro opylovače a tím byl zaznamenán pokles aktivity řady enzymů. Byl prokázán vliv subletálních dávek pesticidů na imunitu včel (Wu et al., 2011). Intenzivní zemědělství je na opylovačích závislé do velké míry, protože zajišťují 12 % celkové evropské zemědělské výroby potravin a jejich případné úbytky vedou k výrazným ekonomickým ztrátám (Gallai et al., 2009). Výše uvedené poklesy mohou být způsobeny poruchou imunity. Vrozená imunita hmyzu se liší od imunity obratlovců. Hmyz nemá lymfocyty nebo jinou protilátku na bázi humorálního imunitního systému. Má však jiné obranné systémy, jako jsou antimikrobiální peptidy nebo sociální imunita - vzorce chování v kolonii, zřízené za účelem zamezení působení chorob.

V poslední době se zvažuje možnost, že jedním z důležitých mechanismů, které mohou hrát roli v imunitním systému, jsou symbiotické bakterie nacházející se v zažívacím traktu. Zatímco včely a čmeláci mají odlišnou bakteriální skladbu, která závisí na způsobu života a zdroji výživy (Edwards, 1980, Harris, 1991), vosy nemají charakteristický střevní bakteriální profil, což poukazuje na široké spektrum bakteriálních profilů (Reeson et al., 2003).

Naopak čmeláci hostí velmi specifickou mikrobiotu, která je velmi podobná té včelí. Zatímco většina důkazů naznačuje, že střevní bakteriální společenství čmeláků je vysoce konzervativní s relativně nízkou rozmanitostí (Martinson et al., 2011, Koch and Schmid-Hempel, 2011), bylo také prokázáno, že může dojít ke změně a vyšší variabilitě jako reakci na infekční tlak (Cariveau et al., 2014, Koch et al., 2012). Rozmanitost a složení bakteriálního spektra je u čmeláků také ovlivněno nutričním stavem (Dillon et al., 2010) a věkem hostitele (Koch et al., 2012).

Je známo, že také včely zachovávají v těle stereotypní populace bakterií a jiných mikrobů (Moran et al., 2012). Evropská včela, *Apis mellifera*, obsahuje až  $10^9$  bakteriálních buněk, skládající se z 8 hlavních bakteriálních skupin, které tvoří až 95 % celkového počtu bakterií (Moran et al., 2012). Jedná se o skupiny druhů *Gilliamella*

*apicola* a *Frischella perrara* patřících do gammaproteobakterií (Kwong and Moran, 2013, Mohr and Tebbe, 2006), a skupinu betaproteobakterií s nejčastěji se vyskytující bakterií *Snodgrassella alvi* (Martinson et al., 2012, Engel and Moran, 2013a, Corby-Harris et al., 2014a, Kwong and Moran, 2013, Moran et al., 2012, Koch et al., 2013, Engel et al., 2014). Alphaproteobakterie se dělí na dvě skupiny Alpha1 and Alpha2 (Babendreier et al., 2007). Přítomnost a variabilita laktobacilů je nejvíce zkoumána a patří mezi nejčastěji se vyskytující skupinu, pozůstávající z Firm 4 a 5 (Mohr and Tebbe, 2006, Ahn et al., 2012). Poslední skupinu bakterií tvoří bifidobakterie (Bottacini et al., 2012). Na rozdíl od obratlovců, jsou u včel tyto bakterie považovány za potenciální probiotika, kterým se při podávání v dostatečném množství, připisuje zdravotní přínos pro hostitele (Forsgren et al., 2010). Nejnovější studie zaměřené na mikrobiotu trávicího traktu opylovačů zjistily, že objasnění úlohy symbiotických bakterií u včel, které nejsou ohrožené včelařskými postupy, nám mohou poskytnout detailnější pohled na evoluci mikrobiálních druhů a jejich hostitele. Příznivý vliv těchto bakterií potvrzují i fakta, že vykazují antibakteriální aktivitu u hmyzu, čímž zlepšují odolnost vůči nemocem dospělých včel a larev (Forsgren et al., 2010, Vasquez et al., 2012).

Zajímavé je i zjištění preferenčního chování včel, které často vyhledávají nektar nebo pyl z květů, které jsou zdrojem látek s prokazatelnými antimikrobiálními vlastnostmi. Bylo navrženo několik hypotéz k vysvětlení role sekundárních metabolitů v nektaru. Mohou odrazovat zloděje nektaru (Johnson et al., 2006), zabránit jeho mikrobiální degradaci (Herrera et al., 2009), zvýšit efektivitu opylovačů (Adler, 2000, Kessler and Baldwin, 2007), hmyz může využívat jejich účinky v procese tzv. samoléčby (Baracchi et al., 2015, Gherman et al., 2014), nebo dokonce vyvolat návykové chování (Renwick, 2001). Vliv rostlinných alkaloidů na kondici včelích kolonií byl testován v několika studiích (Manson et al., 2013, Gegear et al., 2007, Köhler et al., 2012, Reinhard et al., 2009, Singaravelan et al., 2005) a ty naznačují, že alkaloidy poskytují za určitých podmínek zdravotní výhody slabým koloniím. Tyto studie jsou důležité proto, že strava má významný vliv na patogenní infekce a spotřeba sekundárních metabolitů může buď zvýšit, nebo snížit závažnost infekcí (Manson et al., 2010). Proto je potřeba objasnit roli potenciálně probiotických mikroorganismů a vybraných sekundárních metabolitů z rostlin v imunitě dospělých včel a larev.

## 2 VĚDECKÉ HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

### Hypotézy práce

- Sociální hmyz (vosy, včely, čmeláci) mají svoji charakteristickou komensální mikrobiotu zastoupenou m.j. zástupci bifidobakterií.
- Včelí mikrobiota se mění s vývojovým stádiem a lokalitou kolonie a existují dosud nepopsané rozdíly mezi jednotlivci v rámci úlu.
- Včely preferují nektar s malým procentem rostlinných alkaloidů.
- Včelí mikrobiota může být modulována krmením nativních bakteriálních izolátů nebo antimikrobiálních látek, což vede ke změně v kondici včelích kolonií.

### Cíle práce

Naším hlavním cílem bylo prozkoumat vazby střevní bakteriální populace včel a příbuzných druhů, a jejich propojení s imunitou.

- Charakterizovat střevní mikrobiotu čmeláků a vos pomocí 16S rRNA sekvenace se zaměřením na hledání nových druhů bakterií.
- Posoudit vliv prostředí, vývojových fází v průběhu roku, věku včel na vývoj mikrobioty.
- Zjistit možnosti ovlivnění těchto vztahů prostřednictvím suplementace.

### 3 MATERIÁL A METODY

#### 3.1 Identifikace a charakterizace nových bakteriálních druhů

Při popisu a charakterizaci nových taxonů prokaryot hrají zásadní roli výsledky tzv. genotypových a fenotypových analýz, které jsou porovnávány s nejbližšími příbuznými taxony. Jde v podstatě o zjištění míry difference alespoň části genomu (genotypu) a souboru konkrétních znaků a vlastností (fenotypu) nového a nejbližšího taxonu, případně nejbližších příbuzných taxonů.

Nejbližší příbuzné taxony nových druhů jsou v první fázi odhaleny mírou sekvenční podobnosti genu pro 16S rRNA (RNA malé podjednotky ribozomu 16S)  $\leq 98,65\%$ . Sekvence tohoto genu náleží mezi zásadní a nezbytnou genotypovou charakteristiku nových taxonů. Obdobně mezi další podstatné genotypové charakteristiky náleží stanovení difference alespoň dvou alternativních genetických markerů v podobě sekvencí variabilních fragmentů vhodných kódujících genů. Nezbytnou genotypovou analýzou je stanovení, a následné porovnání, C + G (% zastoupení Cytosinu a Guaninu v genomu). Mezi fenotypové analýzy náleží stanovení (ne)schopnosti využívat jako zdroj energie různé organické uhlíkaté látky nejčastěji v podobě sacharidů (monosacharidů, disacharidů, oligosacharidů apod.), (ne)schopnost syntetizovat různé enzymy (obě skupiny analýz náleží mezi biochemické), dále pak stanovení konečných produktů metabolismu (u bakterií s fermentativním metabolismem v podobě organických kyselin s krátkým řetězcem), fyziologických charakteristik (schopnost kultivace za aerobních, mikroaerofilních či anaerobních podmínek; teplotní a pH rozmezí růstu) a morfologických charakteristik (velikost a morfologie buněk, kolonií, přítomnost spor, ale také Gram-pozitivita či negativita). Nezbytná kategorie fenotypových analýz je reprezentována tzv. chemotaxonomickými metodami, kam náleží např. stanovení profilu celulárních mastných kyselin či chemické struktury peptidoglykanu.

Všechny výše zmíněné komparativní genotypové a fenotypové analýzy potvrdily u bakteriálních izolátů z trávicího traktu laboratorně chovaných čmeláků a volně žijících vos, na základě míry sekvenční podobnosti 16S rRNA genu předběžně klasifikovaných jako *Lactobacillus* sp. a *Vagococcus* sp., status nových druhů pojmenovaných *Lactobacillus bombi* sp. nov. a *Vagococcus entomophilus* sp. nov.



### **3.2 Vliv prostředí, vývojových fází včel na vývoj mikrobioty a sledování mikrobiálních změn mezi jednotlivci v rámci jednoho úlu**

V prvním experimentu byla porovnáována mikrobiota různých stádií včel (larva 1-denní, 3-denní, 6-denní, kukla bílá, kukla černá, mladuška, létavka, trubec), odebíraných ze 4 stanovišť ve třech opakováních. V druhém pokusu byly sledovány mikrobiální změny mezi jednotlivci ve stádiu 6-denní larvy a černé kukly v rámci jednoho úlu, kteří měli společnou matku i otce nebo pouze společnou matku (Page et al., 1989, Page and Laidlaw, 1988).

#### **Elektroforéza v gradientovém denaturačním gelu (DGGE) a sekvenování**

Bakteriální DNA byla izolována ze vzorků trávicího traktu včel komerčními kity (ZR Faecal DNA MiniPrep kit). Pomocí elektroforézy v gradientovém denaturačním gelu (DGGE) s použitím univerzálních bakteriálních primerů amplifikujících variabilní oblast genu pro 16S rRNA (150 bp), byly izolovány hlavní bakteriální druhy (Mrazek et al., 2008). Gely byly srovnány pomocí BioNumerics 6.6 software (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Bandy zájmu byly vyřezány, bakteriální sekvenace porovnány s databází GenBank pomocí BLASTn algoritmu a identifikovány pomocí sekvenování (3100 Avant Genetic Analyser). Jejich sekvence byly vloženy do genové banky NCBI a na základě maximální věrohodnosti byly zkonstruovány fylogenetické stromky (FigTree software), které graficky znázorňují příbuzenské vztahy v rámci jejich druhu.

#### **Kvantitativní PCR (qRT-PCR)**

Vybrané bakteriální skupiny (Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Gammaproteobacteria) byly kvantifikovány pomocí qRT-PCR analýzy s použitím specifických primerů pro vybranou skupinu (De Gregoris et al., 2011).

#### **Statistická analýza**

Pro objasnění vztahů mezi umístěním kolonie a vývojovým stádiem včel a jejich vliv na rozmístění bakteriálních kmenů byla použita RDA analýza (Software CANOCO 4.5). Výsledky byly graficky zpracovány pomocí programů IBM SPSS Statistics ver. 23 (IBM, Armonk, USA) a MS Excel (Microsoft Corporation, WA, USA).

### **3.3 Vliv přírodního alkaloidu a probiotických kmenů bakterií na životaschopnost infikovaných včel**

Experiment proběhl v červnu 2015 ve včelíně na Kývalce u Brna. Oddělky byly vytvářeny z včelstev s plodnými matkami pro získání plodu ve stejném stádiu, odebrány byly vždy tři plodové plásty. Oddělek tvořil čerstvě zakladený plást, doplněný po stranách 2 plásty s líhnoucím se plodem, zásobní plást, přimetené včely z 3 dalších plodových plástů, zralý matečník ve stádiu do 24 hodin před líhnutím a izolační přepážka; celkem tedy 4 rámkové v zatepleném nástavku. Kvůli eliminaci zalétávání byly jednotlivé oddělky umístěny několik metrů od sebe. Následně byla ponechána lhůta 24 hodin na stabilizaci včelstva. Aplikace sangvinarinu probíhala v sirupu nebo postřikem plástů rozprašovačem (probiotika). Aplikované látky se tedy dostaly do zásob a cirkulovaly ve včelstvu.

#### **Příprava a aplikace sangvinarinu a mixu vybraných nepatogenních bakterií**

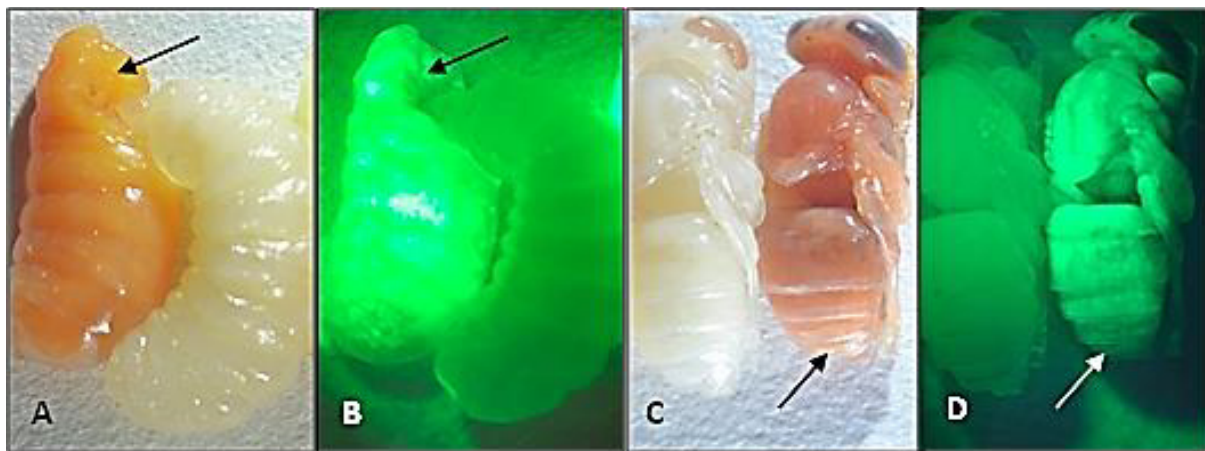
V experimentu byl podáván přírodní antimikrobiální alkaloid sangvinarin ve formě obohaceného extraktu z *Macleaya cordata* (40 % sangvinarinu). Tento alkaloid v předchozích testech vykazoval velmi dobrou toleranci u včel a antimikrobiální aktivitu proti vegetativním stádiím moru včelího a plodu. Extrakt ve formě prášku byl smíchán s fruktózovým sirupem a zkrmován pokusným včelstvím, kde jako kontrola sloužil roztok sacharózy (1:1 s vodou).

Kmeny bakterií *Lactobacillus apis* (NCBI: KM068134), *Lactobacillus melliventris* (KM068135) a *Gilliamella apicola* (KM068136) izolovány z trávicího traktu (Hroncova et al., 2015), původně charakterizovány týmy Killer et al. (2013); Kwong a Moran (2013); Olofsson et al. (2014), byly nakultivovány v MRS. Roztok byl aplikován postřikem za použití rozprašovače na pokusné plásty (KTJ =  $1,1 \times 10^7$  bakterií *Lactobacillus melliventris* na ml,  $2,2 \times 10^8$  *Lactobacillus apis* na ml a  $1,4 \times 10^6$  *Gilliamella apicola* na ml).

#### **Navození infekčního tlaku**

Pro experimentální nákazu hlísticemi byl sbírán izolovaný plod ( $0,155 \pm 0,015$  g) na vlhký filtrační papír, živý plod byl bezprostředně po odběru vystaven nákaze hlísticemi. Infekce probíhala přirozenou cestou hlísticí *Heterorhabditis bacteriophora* nebo *Steinernema feltiae* na izolovaném nesegmentovaném včelím plodu v dávce 1-20

infekčních jedinců hlístic na jednu larvu hostitele při teplotě 25 °C na Petriho miskách. V každé experimentální skupině bylo nasazeno 20 včelích plodů, celý experiment byl 2x zopakován. Nákaza proběhla úspěšně, u infikovaných larev došlo ke změně zabarvení díky červenému pigmentu symbiotických bakterií *Photorhabdus luminescens*. Kadavery také vykazovaly bioluminiscenci (Obr. 1) způsobenou *P. luminescens*, jak bylo ověřeno luminometrem (signál  $10000 \pm 150$  RLU po odečtu slepého vzorku).



**Obr. 1.** Bakterie jsou lokalizovány v trávicím traktu a způsobují septikemii. Fotografie zobrazuje neinfikované a infikované (šipky) larvy, kukly a jejich vývoj za denního světla (A, C) a fluorescence (B, D).

### Statistická analýza

Mortalita včelích larev a kukel byla statisticky vyhodnocena pomocí Statistica 12 software (StatSoft, USA). Pro vyhodnocení účinku testovaných probiotik a sangvinarinu vůči kontrole byl využit Dunnettův test.

### 3.4 Včelí preference vůči vybraným alkaloidům

Preference včel byly testovány na čtyřech předem vybraných alkaloidech: nikotin, kofein, gelsemin a senecionin (Sigma - Aldrich) se 7 koncentracemi (0–0,5–1–2–5,5–17–50 µg/ml roztoku se sacharózou). Zdravá kolonie *Apis mellifera* byla přemístěna do izolačního stanu bez přírodního zdroje potravy, s výjimkou uložené zásoby pylu a

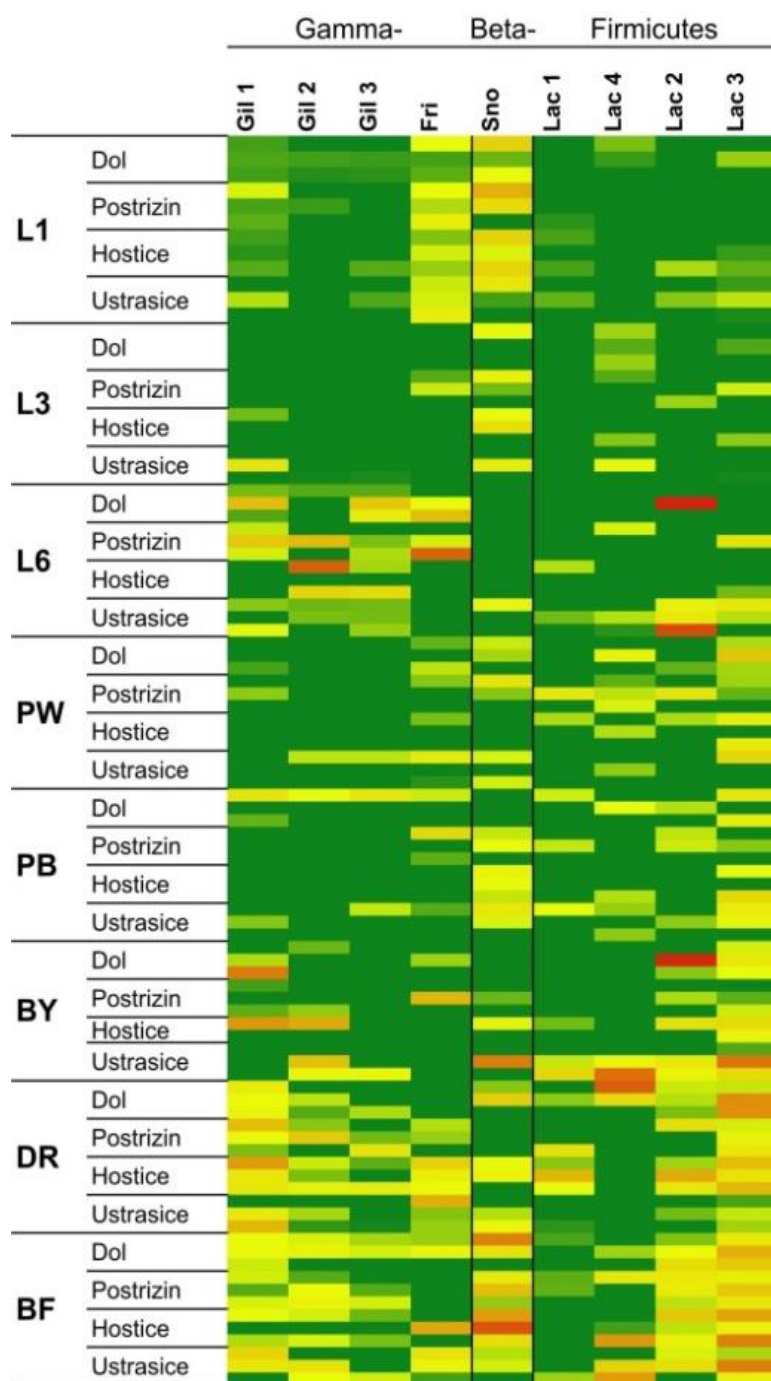
medu. Umělé květiny byly vyrobeny z Eppendorf 1,5 ml s límcem ze žlutého papíru o průměru 3 cm a byly naplněny 20% cukerným roztokem a odpovídajícím množstvím roztoku s alkaloidem, který byl připraven sériovým ředěním a tři zkumavky sloužily jako kontrola pouze s 20% cukerným roztokem. Všech 75 umělých květů bylo umístěno na polystyrénovou desku. Tato místa byla náhodně vybírána pro každé opakování znovu a také byly u každého opakování vyměňovány "květy", aby bylo možné zabránit jakémukoli feromonovému značení nebo zapamatování si míst včelami, které by mohlo ovlivnit konečný výsledek. Připravená polystyrenová deska s umělými květinami byla umístěna ve vzdálenosti jednoho metru od vstupu do úlu. Každý z vybraných alkaloidů byl testován v 5 ředěních a 3 opakováních na předkládané desce. Jednotlivé opakování byly ukončeny, když v květech s kontrolním roztokem kleslo množství na 0,5 ml. Následně byla celá deska odebrána, květiny vybrány a zváženy. Data byla analyzována IBM SPSS Statistics pomocí Dunnettova testu.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

Naším cílem bylo prozkoumat vazby střevní bakteriální populace včel a příbuzných druhů, jejich propojení s imunitou a v rámci toho charakterizovat střevní mikrobiotu čmeláků a vos pomocí 16S rRNA sekvenace se zaměřením na hledání nových druhů bakterií. Vosa útočná (*Vespula germanica*) nemá charakteristický střevní bakteriální profil (Reeson et al., 2003). Kromě toho, srovnání s ostatními vosami a včelami naznačuje, že změny sociálního životního stylu mohou mít větší vliv na vývoj střevní mikrobioty než výživa (Kaltenpoth, 2011). V rámci experimentu byly popsány tři nové kmeny bakterií izolované z vosy (*Vespula vulgaris*), představující nové druhy rodu *Vagococcus*. Výsledky dokazují širokou škálu genotypových, fenotypových a fylogenetických analýz prokazujících, že bakteriální kmeny VOSTP2<sup>T</sup>, VOSTP5 a VOSTP6 jsou novým druhem, pro který byl navrhnout název *Vagococcus entomophilus* sp. nov. Také byl izolován a detailně charakterizován nový zástupce rodu *Lactobacillus*, vyskytující se v trávicím traktu čmeláků. Námi zkoumaní čmeláci (*Bombus terrestris*) byli chováni v laboratořích Zemědělského výzkumu, Ltd. (Troubsko, Česká republika) v roce 2012. Nedávné studie ale potvrdily, že střevní mikrobiota divokých a umělých chovů čmeláků obsahuje základní skupiny bakterií (Neisseriaceae, Orbaceae, Lactobacillaceae a Bifidobacteriaceae). U divokých *B. terrestris* byly objeveny i bakterie nepatřící do těchto skupin (Meeus et al., 2015, Parmentier et al., 2016). Námi nově popsané druhy (*Lactobacillus bombi*) jsou zástupci rodu *Lactobacillus*, který se řadí mezi hlavní skupiny osidlující trávicí trakt čmeláků.

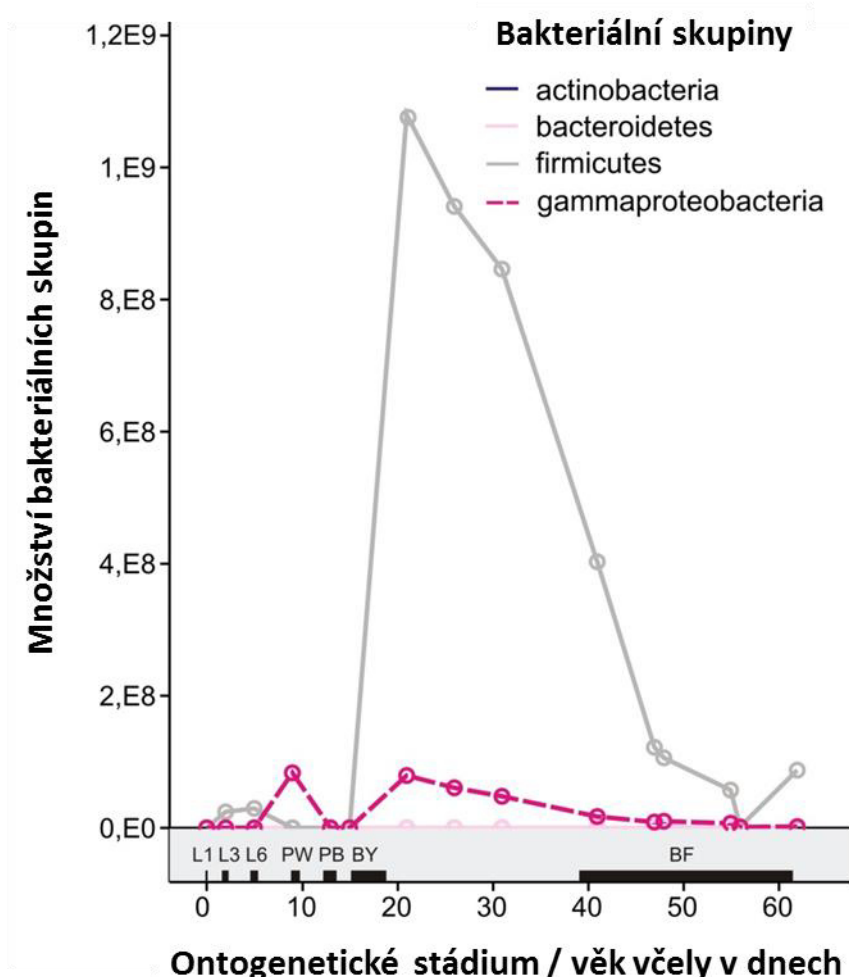
Naším dalším cílem bylo posoudit vliv prostředí, vývojových fází v průběhu roku, věku včel na vývoj mikrobioty. Nejnižší počty bakterií jsme zaznamenali v trávicím traktu 1-denních larev (Forsgren et al., 2010, Vasquez et al., 2012, Vojvodic et al., 2013), kde mírně převládala skupina gammaproteobakterií ( $3,3 \times 10^5$  kopií genů/gram trávicího traktu) nad skupinou Firmicutes ( $1,3 \times 10^5$ ). Zásadní rozdíly v bakteriálním složení v průběhu vývoje byly odhaleny zejména u šestidenních larev odebraných těsně po posledním krmení.

V barevném spektru (Obr. 2), které odráží intenzitu bandů, můžeme pozorovat menší zastoupení kmenů *Snodgrassella alvi* a naopak výrazně vyšší variabilitu laktobacilů a gammaproteobakterií.



**Obr. 2.** Heatmap zobrazující relativní hustotu vybraných dominantních bandů z gelu denaturační elektroforézy v barevném spektru. Vzorky jsou řazeny podle vývojového stádia (1, 3 a 6 denní larvy (L1, L3, L6), bílé a černé kukly (PW, PB), mladušky, létavky a trubce (BY, BF, DR)) v rámci 4 stanovišť.

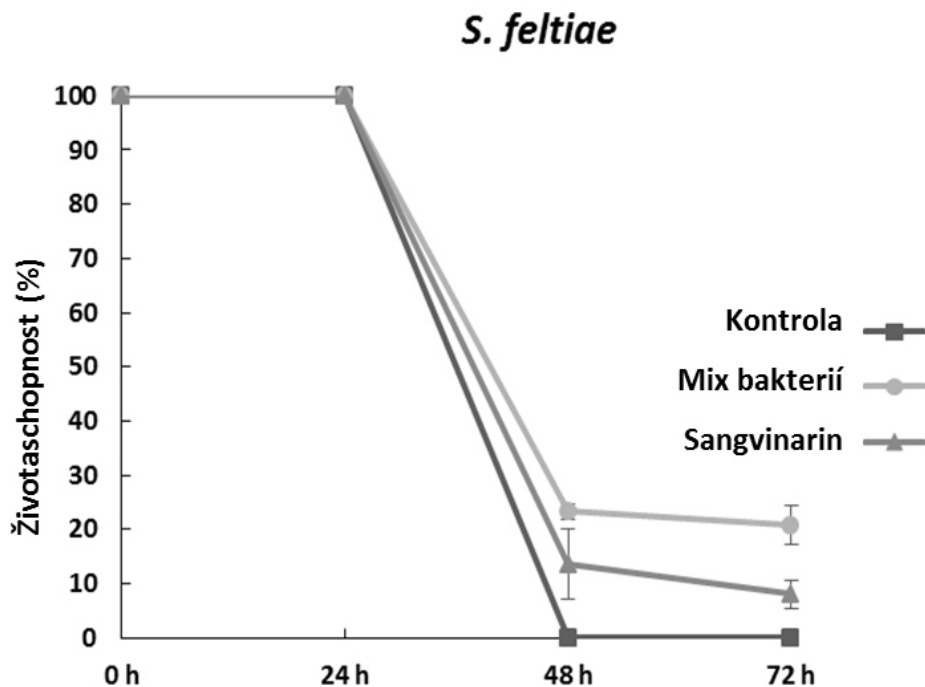
Výrazná variabilita všech pozorovaných kmenů se objevuje až u létavek a trubců. Toto zjištění podporují také výsledky qPCR, což můžeme vidět na obrázku 3, kde do stádia černé kukly převládá skupina gammaproteobakterií, kdežto po vylíhnutí se tento poměr mění ve prospěch laktobacilů.



**Obr. 3.** Graf zobrazuje množství (kopie 16S rRNA genu na gram trávicího traktu) vybraných bakteriálních skupin celého trávicího traktu včel daného vývojového stádia ((1, 3 a 6 denní larvy (L1, L3, L6), bílé a černé kukly (PW, PB), mladušky, létavky a trubce (BY, BF, DR)).

Můžeme konstatovat, že mikrobiota se zásadně mění v průběhu vývoje a není závislá na stanovišti (Jeyaprakash et al., 2003, Mohr and Tebbe, 2006, Cox-Foster et al., 2007), ale je přísně druhově specifická. Stanoviště ovlivňuje zřejmě zejména bakteriální spektrum létavek, nikoliv ale kolonie jako takové.

Všechna námi doposud zjištěná fakta o variabilitě bakteriálních kmenů v průběhu stáří včely medonosné nám pomohla vybrat takové kmeny laktobacilů a gammaproteobakterií, které mohou hrát zásadní roli ve zdraví včel. Izoláty kmenů *Lactobacillus apis*, *melliventris* a *Gilliamella apicola* byly nakultivovány a následně podávány v pokusu spolu s přírodním alkaloidem sangvinarinem. V rámci experimentu jsme zjišťovali možnosti ovlivnění bakteriálních vztahů u včel prostřednictvím suplementace. Pro posouzení obecného vlivu podávaných látek na stav imunity jsme 20 včelích larev a kulek z každé pokusné skupiny + kontroly podrobili laboratorní nákaze entomopatogenními hlísticemi *Heterorhabditis bacteriophora* a *Steinernema feltiae*. Infekce proběhla úspěšně u larválního stádia, které je ze všech stádií nejčastěji napadáno patogeny (Bailey and Ball, 1991, Seeley, 1995, Vojvodic et al., 2010, Rauch et al., 2009). Výsledky mortality po 48 hodinách od aplikace sangvinarinu nebo mixu bakterií ukazují na významný protektivní účinek obou přípravků (Obrázek 4), kdy došlo k lepšímu přežívání po experimentální nákaze hlísticemi. Jedná se o první experiment, kdy byla použita nematobakteriální infekce pro ověření imunitního statutu včel.

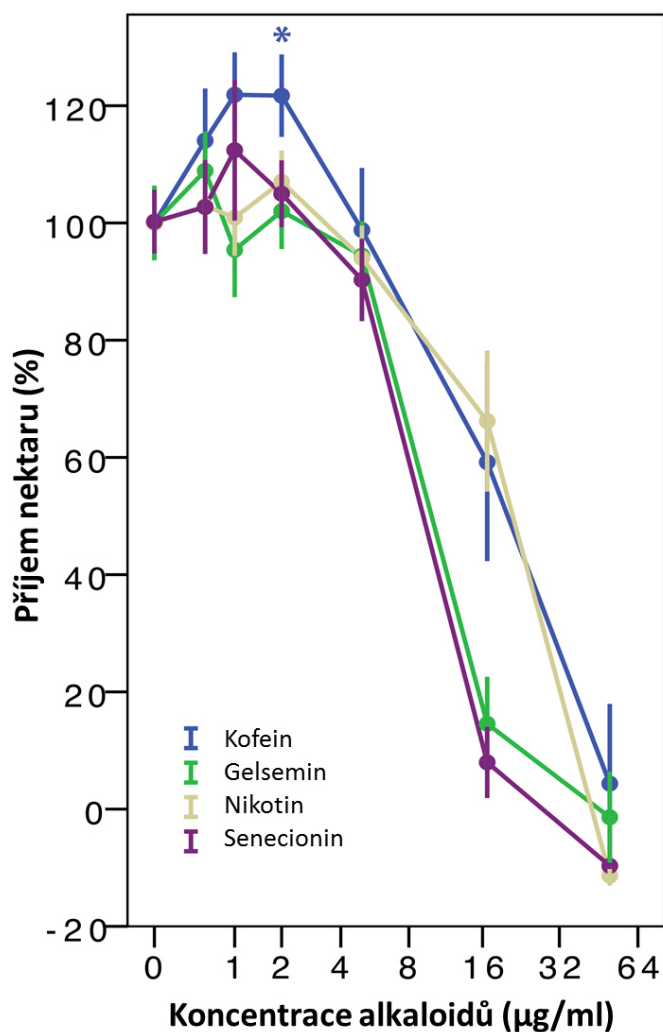


**Obr. 4.** Imunostimulační účinek sangvinarinu a mixu nepatogenních bakterií (*Lactobacillus apis*, *Lactobacillus melliventris*, *Gilliamella apicola*) na larvy infikované *Steinernema feltiae*.

(\* =  $P < 0,01$ , \*\* =  $P < 0,05$ ).



Byla potvrzena hypotéza, že včely preferují nektar s malým procentem rostlinných alkaloidů. Včely v preferenčním pokusu s přírodními alkaloidy preferovaly kofein s koncentrací 2  $\mu\text{g/ml}$  nektaru o 22 % více než květy s 20% roztokem sacharózy (kontrola), což je v souladu s literaturou (Singaravelan et al., 2005). U koncentrací vyšších než 5,5  $\mu\text{g/ml}$  působily všechny zkoumané látky repelentně ( $P < 0,05$ ) (Obrázek 5).



**Obr. 5.** Průměrná spotřeba nektaru s obsahem alkaloidů na základě jejich koncentraci (\* =  $P < 0,05$ ).

Kofein a nikotin byly včelami lépe tolerovány než testovaný gelsemin a senecionin. Výsledky tohoto experimentu podporují teorii, že dlouhodobá preference vůči kofeinu a nikotinu je založena na závislosti, spíše než teorii o neúmyslné samoléčbě (Baracchi et al., 2015, Gherman et al., 2014). Domníváme se, že je to poprvé, kdy byl v preferenčních studiích použit senecionin (jako volné báze).

## 5 ZÁVĚR

Nové výsledky prezentované v této práci vedly k většímu porozumění přirozeným vztahům mezi mikroorganismy a jejich hostitelem. Část výzkumu byla zaměřena na střevní mikrobiotu čmeláků a vos, se zaměřením na hledání nových druhů bakterií. Byly identifikovány a charakterizovány druhy *Vagococcus entomophilus* u vosy a *Lactobacillus bombi* v trávicím traktu čmeláků.

Největší pozornost byla věnována charakterizaci střevní mikrobioty jako součástí imunitního systému včel. Včely hostí v trávicím traktu přesně definované bakteriální skupiny. V práci jsme se snažili objasnit, jak mikrobiom interaguje s hostitelem a prokázat, že hlavní členy těchto komunit ho pozitivně ovlivňují. Byla potvrzena hypotéza, že včely mají svoji charakteristickou mikrobiotu, jejíž variabilita se mění s vývojovým stádiem. Naopak se nepotvrdilo, že bakteriální spektrum závisí na lokalitě kolonie. Také bylo zjištěno, že existují dosud nepopsané rozdíly mezi jednotlivci v rámci úlu. Včely tedy mohou být ideálním modelem pro zkoumání evolučních a genetických vztahů a včelí mikrobiota může být modulována krměním nativních bakteriálních izolátů nebo antimikrobiálních látek, jakými jsou rostlinné alkaloidy, které jsou do určité koncentrace pro včely atraktantem. Informace založené na našich výsledcích mohou v budoucnu pomoci ovlivňovat imunitu včel prostřednictvím suplementace (pomocí doplňků obsahujících potenciálně probiotické kmeny bakterií nebo rostlinné alkaloidy). Vztah opylovačů a jejich mikroorganismů je však vzhledem k jejich velkému množství a druhovému zastoupení velmi komplikovaný. Přestože některé výsledky ukazují pozitivní přínos pro včelstva, nemůžeme je prozatím považovat za spolehlivý důkaz účinnosti. Podání potenciálně probiotických druhů v nevhodnou dobu může být dokonce teoreticky škodlivý a účinek se obvykle projevuje po aplikaci komplexních preparátů (mix bakterií) než-li jednotlivých izolovaných kmenů. Neexistují informace o délce účinku a o tom, zda preparáty působí shodně na slabé i silné kolonie, což bude předmětem dalšího zkoumání.

## 6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ADLER, L. S. 2000. The ecological significance of toxic nectar. *Oikos*, 91, 409-420.
- AHN, J.-H., HONG, I.-P., BOK, J.-I., KIM, B.-Y., SONG, J. & WEON, H.-Y. 2012. Pyrosequencing Analysis of the Bacteria Communities in the Guts of Honey Bees *Apis cerana* and *Apis mellifera* in Korea. *Journal of Microbiology*, 50, 735-745.
- BABENDREIER, D., JOLLER, D., ROMEIS, J., BIGLER, F. & WIDMER, F. 2007. Bacterial community structures in honeybee intestines and their response to two insecticidal proteins. *Fems microbiology ecology*, 59, 600-610.
- BAILEY, L., BALL, B. V. 1991. Honeybee pathology. 2<sup>nd</sup>. Ed. Pub. Academic Press.
- BARACCHI, D., BROWN, M. J. F., CHITTKA, L. 2015. Weak and contradictory effects of self-medication with nectar nicotine by parasitized bumblebees. *F1000Research*, 4.
- BOTTACINI, F., MILANI, C., TURRONI, F., SÁNCHEZ, B., FORONI, E., DURANTI, S., SERAFINI, F., VIAPPIANI, A., STRATI, F. & FERRARINI, A. 2012. *Bifidobacterium asteroides* PRL2011 genome analysis reveals clues for colonization of the insect gut. *PLoS One*, 7, e44229.
- CARIVEAU, D. P., POWELL, J. E., KOCH, H., WINFREE, R., MORAN, N. A. 2014. Variation in gut microbial communities and its association with pathogen infection in wild bumble bees. *The ISME journal*, 8, 2369-2379.
- CORBY-HARRIS, V., MAES, P. & ANDERSON, K. E. 2014. The Bacterial Communities Associated with Honey Bee (*Apis mellifera*) Foragers. *Plos One*, 9.
- COX-FOSTER, D. L., CONLAN, S., HOLMES, E. C., PALACIOS, G., EVANS, J. D., MORAN, N. A., QUAN, P. L., BRIESE, T., HORNIG, M., GEISER, D. M., MARTINSON, V., VANENGELSDORP, D., KALKSTEIN, A. L., DRYSDALE, A., HUI, J., ZHAI, J. H., CUI, L. W., HUTCHISON, S. K., SIMONS, J. F., EGHOLM, M., PETTIS, J. S., LIPKIN, W. I. 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*, 318, 283-287.

- DE GREGORIS, T. B., ALDRED, N., CLARE, A. S., BURGESS, J. G. 2011. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. *Journal of microbiological methods*, 86, 351-356.
- DILLON, R. J., WEBSTER, G., WEIGHTMAN, A. J., CHARNLEY, A. K. 2010. Diversity of gut microbiota increases with aging and starvation in the desert locust. *Antonie van Leeuwenhoek*, 97, 69-77.
- EDWARDS, R. 1980. Social wasps. Their biology and control. Rentokil Ltd. ISBN 0-906564-01-8.
- ENGEL, P., KWONG, W. K. & MORAN, N. A. 2013. *Frischella perrara* gen. nov., sp. nov., a gammaproteobacterium isolated from the gut of the honeybee, *Apis mellifera*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63, 3646-3651.
- ENGEL, P., STEPANAUSKAS, R. & MORAN, N. A. 2014. Hidden diversity in honey bee gut symbionts detected by single-cell genomics. *PLoS genetics*, 10, e1004596.
- FORSGREN, E., OLOFSSON, T. C., VASQUEZ, A., FRIES, I. 2010. Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus larvae* in honey bee larvae. *Apidologie*, 41, 99-108.
- GALLAI, N., SALLES, J. M., SETTELE, J., VAISSIERE, B. E. 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*, 68, 810-821.
- 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.
- GHERMAN, B. I., DENNER, A., BOBIȘ, O., DEZMIREAN, D. S., MĂRGHITAȘ, L. A., SCHLÜNS, H., MORITZ, R. F. A., ERLER, S. 2014. Pathogen-associated self-medication behavior in the honeybee *Apis mellifera*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 68, 1777-1784.
- HARRIS, R. J. 1991. Diet of the wasps *Vespula vulgaris* and *V. germanica* in honeydew beech forest of the South Island, New Zealand. *New Zealand journal of zoology*, 18, 159-169.
- HERRERA, C. M., CANTO, A., POZO, M. I., BAZAGA, P. 2009. Inhospitable sweetness: nectar filtering of pollinator-borne inocula leads to impoverished, phylogenetically

- clustered yeast communities. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, rspb20091485.
- HRONCOVA, Z., HAVLIK, J., KILLER, J., DOSKOCIL, I., TYL, J., KAMLER, M., TITERA, D., HAKL, J., MRAZEK, J., BUNESOVA, V. 2015. Variation in Honey Bee Gut Microbial Diversity Affected by Ontogenetic Stage, Age and Geographic Location. *PloS one*, 10, e0118707.
- JEYAPRAKASH, A., HOY, M. A., ALLSOPP, M. H. 2003. Bacterial diversity in worker adults of *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata* (Insecta : Hymenoptera) assessed using 16S rRNA sequences. *Journal of Invertebrate Pathology*, 84, 96-103.
- JOHNSON, S. D., HARGREAVES, A. L., BROWN, M. 2006. Dark, bitter-tasting nectar functions as a filter of flower visitors in a bird-pollinated plant. *Ecology*, 87, 2709-2716.
- KALTENPOTH, M. 2011. Honeybees and bumblebees share similar bacterial symbionts. *Molecular Ecology*, 20, 439-440.
- KESSLER, D., BALDWIN, I. T. 2007. Making sense of nectar scents: the effects of nectar secondary metabolites on floral visitors of *Nicotiana attenuata*. *The Plant Journal*, 49, 840-854.
- KILLER, J., DUBNA, S., SEDLACEK, I., SVEC, P. 2013. *Lactobacillus apis* sp. nov., from the stomach of honeybees (*Apis mellifera*) having *in vitro* inhibitory effect on causative agents of American and European Foulbrood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 64, 152–157.
- KOCH, H., ABROL, D. P., LI, J. L. & SCHMID-HEMPEL, P. 2013. Diversity and evolutionary patterns of bacterial gut associates of corbiculate bees. *Molecular Ecology*, 22, 2028-2044.
- KOCH, H., CISAROVSKY, G., SCHMID-HEMPEL, P. 2012. Ecological effects on gut bacterial communities in wild bumblebee colonies. *Journal of Animal Ecology*, 81, 1202-1210.

- KOCH, H., SCHMID-HEMPEL, P. 2011. Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 19288-19292.
- KWONG, W. K., MORAN, N. A. 2013. Cultivation and characterization of the gut symbionts of honey bees and bumble bees: description of *Snodgrassella alvi* gen. nov., sp. nov., a member of the family Neisseriaceae of the Betaproteobacteria, and *Gilliamella apicola* gen. nov., sp. nov., a member of Orbaceae fam. nov., Orbales ord. nov., a sister taxon to the order 'Enterobacteriales' of the Gammaproteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 2008-2018.
- KÖHLER, A., PIRK, C. 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.
- MANSON, J. S., COOK, D., GARDNER, D. R., IRWIN, R. E. 2013. Dose-dependent effects of nectar alkaloids in a montane plant–pollinator community. *Journal of Ecology*, 101, 1604-1612.
- MANSON, J. S., OTTERSTATTER, M. C., THOMSON, J. D. 2010. Consumption of a nectar alkaloid reduces pathogen load in bumble bees. *Oecologia*, 162, 81-89.
- MARTINSON, V. G., DANFORTH, B. N., MINCKLEY, R. L., RUEPPELL, O., TINGEK, S., MORAN, N. A. 2011. A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Molecular Ecology*, 20, 619-628.
- MARTINSON, V. G., MOY, J. & MORAN, N. A. 2012. Establishment of Characteristic Gut Bacteria during Development of the Honeybee Worker. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 2830-2840.
- MEEUS, I., PARMENTIER, L., BILLIET, A., MAEBE, K., VAN NIEUWERBURGH, F., DEFORCE, D., WÄCKERS, F., VANDAMME, P., SMAGGHE, G. 2015. 16S rRNA amplicon sequencing demonstrates that indoor-reared bumblebees (*Bombus terrestris*) harbor a core subset of bacteria normally associated with the wild host. *PloS one*, 10, e0125152.

- MOHR, K. I., TEBBE, C. C. 2006. Diversity and phylotype consistency of bacteria in the guts of three bee species (Apoidea) at an oilseed rape field. *Environmental Microbiology*, 8, 258-272.
- MORAN, N. A., HANSEN, A. K., POWELL, J. E., SABREE, Z. L. 2012. Distinctive Gut Microbiota of Honey Bees Assessed Using Deep Sampling from Individual Worker Bees. *Plos One*, 7.
- MRAZEK, J., STROSOVA, L., FLIEGEROVA, K., KOTT, T., KOPECNY, J. 2008. Diversity of insect intestinal microflora. *Folia Microbiologica*, 53, 229-233.
- OLOFSSON, T. C., ALSTERFJORD, M., NILSON, B., BUTLER, É., VÁSQUEZ, A. 2014. *Lactobacillus apinorum* sp. nov., *Lactobacillus mellifer* sp. nov., *Lactobacillus mellis* sp. nov., *Lactobacillus melliventris* sp. nov., *Lactobacillus kimbladii* sp. nov., *Lactobacillus helsingborgensis* sp. nov., and *Lactobacillus kullabergensis* sp. nov., isolated from the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, ijs-0.
- PAGE, R. E., LAIDLAW, H. H. 1988. Full sisters and super sisters: a terminological paradigm. *Animal behaviour*, 36, 944-945.
- PAGE, R. E., ROBINSON, G. E., FONDRK, M. K. 1989. Genetic specialists, kin recognition and nepotism in honey-bee colonies. *Nature*, 338, 576-579.
- PARMENTIER, L., MEEUS, I., MOSALLANEJAD, H., DE GRAAF, D. C., SMAGGHE, G. 2016. Plasticity in the gut microbial community and uptake of Enterobacteriaceae (Gammaproteobacteria) in *Bombus terrestris* bumblebees' nests when reared indoors and moved to an outdoor environment. *Apidologie*, 47, 237-250.
- RAUCH, S., ASHIRALIEVA, A., HEDTKE, K., GENERSCH, E. 2009. Negative correlation between individual-insect-level virulence and colony-level virulence of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American foulbrood of honeybees. *Applied and environmental microbiology*, 75, 3344-3347.
- REESON, A. F., JANKOVIC, T., KASPER, M. L., ROGERS, S., AUSTIN, A. D. 2003. Application of 16S rDNA-DGGE to examine the microbial ecology associated with a social wasp *Vespa germanica*. *Insect molecular biology*, 12, 85-91.

- 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.
- RENWICK, J. A. A. 2001. Variable diets and changing taste in plant–insect relationships. *Journal of chemical ecology*, 27, 1063-1076.
- SEELEY, T. D. 1995. The Wisdom of the Hive Harvard University Press. *Cambridge, MA*.
- SINGARAVELAN, N., NEE'MAN, G., INBAR, M., IZHAKI, I. 2005. Feeding responses of free-flying honeybees to secondary compounds mimicking floral nectars. *Journal of chemical ecology*, 31, 2791-2804.
- VASQUEZ, A., FORSGREN, E., FRIES, I., PAXTON, R. J., FLABERG, E., SZEKELY, L., OLOFSSON, T. C. 2012. Symbionts as Major Modulators of Insect Health: Lactic Acid Bacteria and Honeybees. *Plos One*, 7.
- VOJVODIC, S., JENSEN, A. B., JAMES, R. R., BOOMSMA, J. J., EILENBERG, J. 2010. Opposing temperature-dependent mortality after infection with an obligate and facultative fungal pathogen of honeybees. *Vet. Microbiol*, 149, 200-205.
- VOJVODIC, S., REHAN, S. M., ANDERSON, K. E. 2013. Microbial Gut diversity of Africanized and European honey Bee larval instars. *PloS one*, 8, e72106.
- WU, J. Y., ANELLI, C. M., SHEPPARD, W. S. 2011. Sub-Lethal Effects of Pesticide Residues in Brood Comb on Worker Honey Bee (*Apis mellifera*) Development and Longevity. *Plos One*, 6.



## 7 SEZNAM PUBLIKACÍ K ŘEŠENÉ PROBLEMATICE

### Vědecké publikace s IF

KILLER, J. – SVEC, P. – SEDLACEK, I. – CERNOHLAVKOVA, J. – BENADA, O. – **HRONCOVA, Z.** – HAVLIK, J. – VLKOVA, E. – RADA, V. – KOPECNY, J. – KOFRONOVA, O. 2014. *Vagococcus entomophilus* sp nov., from the digestive tract of a wasp (*Vespula vulgaris*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 731-737. ISSN: 1466-5026.

KILLER, J. – VOTAVOVA, A. – VALTEROVA, I. – VLKOVA, E. – RADA, V. – **HRONCOVA, Z.** 2014b. *Lactobacillus bombi* sp. nov., from the digestive tract of laboratory-reared bumblebee queens (*Bombus terrestris*). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64, 2611-2617. ISSN: 1466-5026.

**HRONCOVA, Z.** – HAVLIK, J. – KILLER, J. – DOSKOCIL, I. – TYL, J. – KAMLER, M. – TITERA, D. – HAKL, J. – MRAZEK, J. – BUNESOVA, V. 2015. Variation in Honey Bee Gut Microbial Diversity Affected by Ontogenetic Stage, Age and Geographic Location. *PloS one*, 10, e0118707. ISSN: 1932-6203.

HYRSL, P. – DOBES, P. – VOJTEK, L. – **HRONCOVA, Z.** – TYL, J. – KILLER, J. 2016. Plant alkaloid sanguinarine and novel potential probiotic strains *Lactobacillus apis*, *Lactobacillus melliventris* and *Gilliamella apicola* promotes resistance of honey bees to nematobacterial infection. *Bulletin of Insectology*. ISSN: 1721-8861. V oponentském řízení (po první revizi).

### Recenzované vědecké publikace

**HRONCOVÁ, Z.** – HAVLÍK, J. – STANKOVÁ, L. – HÁJKOVÁ, S. – TITĚRA, D. – RADA, V. 2016. Repellence and attraction of *Apis mellifera* foragers by nectar alkaloids. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 47, 14-17.

### Odborné publikace

HAVLÍK, J. – **HRONCOVÁ, Z.** Med ve výživě i léčbě. *Výživa a potraviny*, 2013, roč. 68, č. 3, s. 79-81. ISSN: 1211-846X.

**HRONCOVÁ, Z.** – HAVLÍK, J. – KILLER, J. – KAMLER, M. Podtyp: Článek v nerecenzovaném časopise (mimo kategorie RIV); Vztahy včel a mikroorganismů. 2014, Včelařství, roč. 67, č. 1, s. 7-9. ISSN:0042-2924.

**HRONCOVÁ, Z.** – DOBEŠ, P. – HAVLÍK, J. – HYRŠL, P. – KAMLER, M. Podtyp: Článek v nerecenzovaném časopise (mimo kategorie RIV); Představujeme výsledky projektu NAZV QJ1210047 - Vývoj nových prostředků pro podporu imunity včel, prevenci a léčbu včelích onemocnění (2012-2016). 2015, Včelařství, roč. 68, č. 6, s. 192-193. ISSN:0042-2924.

### **Příspěvky na konferencích**

**HRONCOVÁ, Z.** – HAVLÍK, J. – KILLER, J. – DOSKOČIL, I. – RADA, V. – KAMLER, M. – TYL, J. – TITĚRA, D. Podtyp: Příspěvek ve sborníku (mimo kategorie RIV); Occurrence of *Bifidobacterium asteroides* in honey bee gut during development. 2013, CD - XXXXIII. International Apicultural Congress Apimondia, 29.9. — 4.10. 2013 Kyjev, Ukraine.

HAVLÍK, J. – JENŠOVSKÝ, J. – DOSKOČIL, I. – **HRONCOVÁ, Z.** – KAMLER, M. – TYL, J. – TITĚRA, D. Podtyp: Příspěvek ve sborníku (mimo kategorie RIV); Effect of alkaloids presence in artificial nectar on foraging preferences of honey bees. 2013, CD - XXXXIII. International Apicultural Congress Apimondia, 29.9. — 4.10. 2013 Kyjev, Ukraine.

HÁJKOVÁ, Š. – **HRONCOVÁ, Z.** – HAVLÍK, J. – DOSKOČIL, I. Podtyp: Příspěvek ve sborníku (mimo kategorie RIV); Vliv subletálních dávek imidaklopridu na přežití larev včely medonosné (*Apis mellifera*) *in vitro*. 2014, In: Kubík Š. & Barták M. (eds), 6<sup>th</sup> Workshop on biodiversity, Jevany. Česká zemědělská univerzita v Praze, s. 12 - 19. ISBN: 978-80-213-2527-2.

HYRSL, P. – DOBEŠ, P. – VOJTEK, L. – BERKA, J. – HURYCHOVÁ, J. – HAVLÍK, J. – KAMLER, M. – **HRONCOVÁ, Z.** – KILLER, J. – TYL, J. – TITĚRA, D. Podtyp: Příspěvek ve sborníku (mimo kategorie RIV); Plant alkaloid and probiotics increase resistance of honeybees to nematobacterial infection. 2015, New Challenges for Biological Control, 15<sup>th</sup> Meeting of the IOBC-WPRS Working Group, 7.-11.6.2015, Riga, Latvia, s. 1, poster.

DOBEŠ, P. – VOJTEK, L. – **HRONCOVÁ, Z.** – TYL, J. – KILLER, J. – ČERNOCH, P. – HYRSL, P. Podtyp: Příspěvek ve sborníku (mimo kategorie RIV); Honey bee immunity: Its modulation by dietary supplements and probiotics. 2016, Book of Abstract, 49<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, 24.7.-28.7.2016 France, s. 104.

**HRONCOVÁ, Z.** – HAVLÍK, J. – KILLER, J. – DOSKOČIL, I. – TYL, J. Podtyp: Příspěvek ve sborníku (mimo kategorie RIV); Occurrence of Gammaproteobacteria in honey bee gut infected by *Paenibacillus larvae*. 2016, Book of Abstract, 49<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, 24.7.-28.7.2016 France, s. 104.