

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Ester Martišková

Fyziologické změny v ontogenezi a mezi kastami včely medonosné
(*Apis mellifera*)

Physiological changes during honeybee (*Apis mellifera*) ontogenesis and
between castes

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Tomáš Erban, Ph.D.

Praha, 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci na téma „Fyziologické změny v ontogenezi a mezi kastami včely medonosné (*Apis mellifera*)“ zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 16. 8. 2019

Ester Martišková

Poděkování

Ráda bych velmi poděkovala svému školiteli, panu RNDr. Tomáši Erbanovi, Ph.D. z Výzkumného ústavu rostlinné výroby v Ruzyni, za veškerou poskytnutou pomoc a velkou trpělivost, kterou se mnou měl během vypracovávání této práce.

Abstrakt

Tato práce je zaměřena na popis jednotlivých změn ve fyziologii včely medonosné *Apis mellifera* během jejího vývoje. Zároveň porovnává jejich rozdíly mezi jednotlivými kastami.

Při vývoje *Apis mellifera* dochází ke složitým přestavbám celého organismu. Proto je, zvláště v brzkých stádiích, nutné zajistit velký přísun energie. Larvy potřebují hojný zdroj živin, aby rychle rostly a měly dostatečnou zásobu pro stádium kukly, během kterého nastává nová reorganizace těla. Nově vylíhlé včely si pak potřebují co nejdříve zvyknout na nové prostředí a zapojit se zaujmout svou roli v úlu. Matky potřebují neustálý přísun energie, aby mohly co nejdéle klást vajíčka. Trubci se soustředí hlavně na úspěšné páření s matkou.

Život *Apis mellifera* je ovlivněn i dalšími faktory, převážně různými nemocemi a patogeny.

Výsledky této práce mohou dát ucelenou představu o tom, co stojí za složitým vývojem včelího jedince a dát námět k předmětu dalšího zkoumání. V biologii včel je stále spousta neobjasněných a neprozkoumaných skutečností, které by se daly studovat a pomohly nám tak lépe pochopit jejich důležitost pro přírodu.

Klíčová slova: *Apis mellifera*, vývoj včel, fyziologické změny, kasty, nemoci, *Varroa destructor*

Abstract

This work is focused on describing the individual differences in physiology of honeybee *Apis mellifera* during its development. It also compares the differences between the individual caste.

A lot of complex rebuilding of the whole organism takes place during the development of *Apis mellifera*. Because of that, especially in the early stages, it is important to ensure a great supply of energy. Larvae need to acquire an abundant source of nutrients, so they can grow fast and have a sufficient storage for the pupal stage, during which the new body reorganization takes place. Newly emerged bees then need to quickly get accustomed to the new environment and assume their role in the hive. Queens need a constant supply of energy, so they can lay eggs for as long as possible. Drones focus mainly on mating with the queen.

The life of *Apis mellifera* is also influenced by other factors, primarily by numerous diseases and pathogens.

The results of this work can give a comprehensive idea about the complex development of an individual bee and give a lot of further research. There are still a lot of unanswered and unexplored realities in biology of bees, that could be a topic of study and help us better understand their importance for nature.

Key words: *Apis mellifera*, development of bee, physiological changes, castes, diseases, *Varroa destructor*

Obsah

1	Úvod	1
2	Představení a zařazení.....	2
2.1	Taxonomické zařazení včely	2
2.2	Stručné představení včely	2
3	Životní cyklus	3
4	Fyziologické změny a jejich rozdíly.....	5
4.1	Proteiny	5
4.2	Enzymy	8
4.3	Hormony.....	8
5	Vývoj klíčových orgánů a tkání	10
5.1	Mozek	10
5.2	Tykadla	11
5.3	HPG (hypofaryngeální žlázy)	11
5.4	Slinný systém.....	11
5.5	Mateří kašička (royal jelly)	12
5.6	Tukové tělísko	12
5.7	Hemolymfa.....	12
6	Vývoj jedince	14
6.1	Vajíčko	14
6.1.1	Embryo do 24 hodin	14
6.1.2	Embryo do 48 hodin	14
6.1.3	Embryo do 72 hodin	14
6.1.4	Embryo po 72 hodinách	14
6.2	Larva	14
6.3	Kukla.....	15

6.4	Dělnice.....	16
6.4.1	Létavka	16
6.4.2	Zimní dělnice	16
6.5	Trubec.....	16
6.6	Matka	17
7	Vztah včel a mikroorganismů	18
7.1	Mikrobiom	18
7.2	<i>Varroa destructor</i>	18
7.3	<i>Nosema spp.</i>	19
7.4	Nemoci včel	19
7.4.1	Syndrom zhroucení včelstev (CCD, colony collapse disorder).....	19
7.4.2	Mor včelího plodu (AFB, American foulbrood)	20
7.4.3	Hniloba včelího plodu (EFB, European foulbrood)	20
7.4.4	Rozpad včelího plodu	20
8	Metody	22
9	Závěr.....	23
10	Literatura.....	24
10.1	Periodická (články v časopisech)	24
10.2	Knižní	28

1 Úvod

Tato literární rešerše se bude zaměřovat na popis fyziologických změn během vývoje *Apis mellifera* a stručný souhrn nemocí, které ji mohou během něj ohrožovat. Krátce se zmíní i o využívaných metodách během výzkumu.

Přestože mají včely obrovský význam pro celý ekosystém, není toho o fungování jejich fyziologie moc známo. Protože do nedávné doby nebyly technologické vymoženosti na takové úrovni a v takovém rozsahu, jako jsou dnes, jakýkoliv výzkum pracující na molekulární úrovni byl obtížnější a méně komplexní. V posledních letech se to ale začíná měnit a přibývá stále více studií, které se zabývají problematikou právě třeba vývoje včel. A nejenom včel samotných, ale i velkého množství jejich parazitů a nemocí, které začínají stále více zamořovat kolonie včel a způsobují velké škody.

Včely nekonají pouze jen přínosnou práci v podobě opylování květin, ale tvoří i mnoho produktů, které mají velké spektrum využití. Ať už se jedná o sladký med, který má mnoho blahodárných účinků, nebo včelí vosk, který

Cílem této práce je tak ukázat, že v oblasti fyziologie i mimo ji, nabízí včely mnoho námětů k pozorování a bádání. Složitou cestou, plnou změn a rozdílů, vzniká jedinec, který má, navzdory své velikosti, ohromnou a nezastupitelnou úlohu v životě nás všech.

2 Představení a zařazení

2.1 Taxonomické zařazení včely

Říše: živočišná (*Animalia*)
Kmen: členovci (*Arthropoda*)
Třída: hmyz (*Insecta*)
Řád: blanokřídli (*Hymenoptera*)
Čeleď: včelovití (*Apidae*)
Rod: včela (*Apis*)
Druh: včela medonosná (*Apis mellifera*)

(Engel, 1999)

Včela medonosná, latinsky *Apis mellifera*, patří do řádu blanokřídleho hmyzu a tvoří rod *Apis* (Tautz, 2007), do kterého se řadí mimo jiné druhy *Apis cerana*, *Apis dorsata*, *Apis florea* (Žďárek, 2013). Mezi některé její poddruhy, které se vyskytují v Evropě, patří *Apis mellifera ligustica*, *Apis mellifera caucasica*, *Apis mellifera germanica* či *Apis mellifera carnica* (Engel, 1999). Žije převážně na území Evropy, Afriky a Středního východu (Feng et al., 2014).

2.2 Stručné představení včely

Je významným představitelem sociálního hmyzu a to nejen z hlediska výzkumu, ale především díky prospěšnosti. Svým opylováním napomáhají biodiverzitě a rozmnožování užitkových rostlin (Tautz, 2007), med a propolis mají různé antibakteriální a antioxidační účinky, jejich jed se využívá ve farmakologii pro léčebné účely (Bogaerts et al., 2009). Proteiny mateří kašičky pomáhají. Toto spektrum využití vedlo ke vzniku fenoménu včelařství, o kterém by se v České republice díky své oblíbenosti a rozšíření dalo mluvit jako o malém kulturním dědictví (Erban et al., 2018). Ale i přesto jsou včely, zvláště v posledních letech, v ohrožení. Převážně kvůli lidské činnosti, jako je hojné používání pesticidů a narušování habitatů, vyššímu nárůstu parazitů a šíření nemocí se jejich počty se zmenšují (Engel P. et al, 2016).

3 Životní cyklus

Kolonie včel je tvořena jednou matkou, která klade vajíčka, a 20 000 - 50 000 dělnicemi, které se starají o matku a práce spojené s úlem. Matka klade oplozená vajíčka, ze kterých se líhnou nové, diploidní, dělnice. Z nakladených neoplozených vajíček se zase vylíhnou haploidní trubci, kteří se starají o oplození matky. Z vajíčka se vylíhne larva, která se po pár dnech zakuklí a po následné proměně je na světě nová dělnice (Tautz, 2007).

Vajíčka dělnic jsou ukládána do pravidelných šestibokých voskových buněk (Tautz, 2007), vajíčka matek mají speciální větší buňku, matečník, a trubci mají buňky na okraji plástu, trubčiny (Žďárek, 2013). Během 3 dnů se v nich vyvíjí larva, která je po dobu 5–6 dnů pořádně krmena. Podle druhu potravy se zde určí, v jakou kastu se vyvine (Chan et al., 2008). Aby se stala matkou, je po celou dobu krmena mateří kašičkou. Pokud je krmena hlavně pylem, nektarem a medem, stane se dělnicí (Martins et al., 2010). Larva prochází 5 instary (Tautz, 2007), v posledním instaru se začne obalovat hedvábným zámotkem a po krátkém stádiu předkukly je z ní kukla. Tady dochází k přestavbě celého těla na podobu, která trvá asi týden (Žďárek, 2013). Okolní teplota má v této fázi také důležitou roli, například může ovlivnit chování budoucí včely (Zheng et al., 2011). Nakonec se nová včela prokouše zavíčkovanou buňkou ven (Žďárek, 2013). Celý vývoj trvá u matek 16 dní, u dělnic 21 dní a u trubců 24 dní (Martins et al., 2010).

Nová dělnice je neplodná (Chan et al., 2006), žije většinou 4–6 týdnů (Seehuus et al., 2006). Postupně v úlu vystřídá různé profese, které mění se stárnutím nebo podle potřeby kolonie (Fujita et al., 2010). Čistička uklízí buňky jako prevenci proti šíření nemocí. Uklízečka odklízí z úlu mrtvá těla. Krmička má kvůli krmení larev a matky silně vyvinuté hypofaryngeální žlázy. Stavitelka ze směsi voskových šupinek a slin staví pláсты tvořené buňkami. Skladnice odebírají náklad od létavek, vytvářejí med a ukládají ho do zásobních buněk. Strážkyně brání vstup úlu proti vetřelcům (Žďárek, 2013). Létavky bývají několikátýdenní staré dělnice (Baker et al., 2012). Sbírají nektar, pyl, vodu a propolis (Amdam et al., 2004) a prozkoumávají okolí (Žďárek, 2013).

Trubci jsou větší než dělnice, mají zavalitější tělo, nemají žihadlo, voskové ani hltanové žlázy. Dožívají se kolem 40–50 dnů, umírají po spáření s matkou. V úlu jich je asi 300–600 (Žďárek, 2013).

Matka se dožívá 3-5 let (Tautz, 2007), má obrovské mandibulární žlázy, ze kterých vylučuje látku, kterou láká trubce nebo ovládá dělnice. Několik trubců ji oplodní během svatebního letu, ze získaného spermatu si utvoří ve spermatéce zásobu na několik let (Žďárek, 2013).

Zhruba každý rok v období konce jara dochází k obměně genetické výbavy kolonie, kdy matka naklade vajíčko nové budoucí matky, která je do měsíce připravena zhostit se své úlohy, zatímco stará matka s částí kolonie úl opustí a založí si nový na jiném místě. Na přelomu léta a podzimu se líhnou odolnější zimní dělnice, nastane konec plodování a kolonie se připraví na přezimování (Žďárek, 2013).

Protože jsou včely sociální hmyz, hraje u nich důležitou roli komunikace, díky které si předávají potřebné informace. Na úrovni jedinců jsou významné především jejich včelí tance, kterými si sdělují místa s potravou nebo lokaci nového úlu. Komunikace na úrovni jedinců až kolonie je pak po stránce olfaktorické tvořena širokým spektrem feromonů, které mají úlohy obranné, rozeznávací či řídicí (Žďárek, 2013).

4 Fyziologické změny a jejich rozdíly

Během vývoje včely dochází k velkému množství fyziologických změn, což se odráží v množství různých organických i anorganických sloučenin, které se těmto změn účastní. Každé stádium včely má svá specifika, kterým odpovídá míra exprese jednotlivých proteinů.

Už se podařilo identifikovat mnoho proteinů a chemických látek, u velké části z nich je však stále nejasná jejich funkce. Proto je zde stručně vyjmenováno jen pár nejhlavnějších z nich.

Mezi hlavní zastoupené proteiny, enzymy a hormony patří:

4.1 Proteiny

- Vitellogenin - Hlavní protein hemolymfy produkovaný tukovým tělískem. Má zásobní a rozmnožovací funkci (Erban et al., 2013), stimuluje embryogenezi trubců (Fang, et al., 2014) a je prekurzorem proteinu vaječného žloutku vitellinu. Jako hlavní přenašeč zinku má i důležitou antioxidační funkci v imunitním systému včely, čímž nejspíše napomáhá v prodlužování jejího života (Erban et al., 2013). U matky je neustále syntetizován (Seehuus et al., 2006), u zimní dělnice pak ve větší míře než u letní dělnice (Erban et al., 2013). U mladých dělnic, hlavně krmiček, se jeho syntéza zvyšuje a váže se na jejich hypofaryngeální žlázy (Amdam et al., 2003).
- Ferritin - Větší množství u vylíhnutého dospělce, pravděpodobně důležitá složka imunitního systému a přizpůsobení se novým stimulům (Erban et al., 2016).
- GSTs (glutathione S-transferase sigma class) - Součást antioxidační obrany proti reaktivním formám kyslíku (ROS), které jsou vedlejší produkty aerobního metabolismu, převážně během metamorfózy. Bývá přítomen u všech stádií vývoje (Erban et al., 2016).
- OBPs (odorant-binding proteiny) - Proteiny chemosenzorických orgánů, které zvyšují rozpustnost hydrofobních odorantů. Z 21 identifikovaných genů jich je 9 exprimováno v tykadlech, kde se exprese liší podle kasty. Zbytek je exprimován různých tkáních (Erban et al., 2014).
 - Obp10 - Přítomen od kukly a nejvyšší hladiny dosahuje u vylíhlých dospělců, poté začíná ubývat (Erban et al., 2014).
 - Obp13 a Obp14 - Nejvíce exprimovány u pozdní larvy a kukly (Erban et al., 2014), vysoká hodnota také u letních i zimních dělnic (Erban et al., 2016).
 - Obp15 – Expresse od larvy (Erban et al., 2014) po letní dělnice (Erban et al., 2016).

- CSPs (chemosensory proteiny) - Proteiny s širokým spektrem funkcí v různých stádiích vývoje (Erban et al., 2016).
 - Csp1– Velká exprese v dospělosti, převážně v abdominálních skleritech (Foret et al., 2007).
 - Csp2 - Expese skoro po celý život, ale v malém množství (Foret et al., 2007).
 - Csp3 - Výskyt u pozdní larvy, u červenooké kukly se jeho hladina zvyšuje podle ztmavování hlavy. Má tedy velkou roli v maturaci kutikuly (Erban et al., 2016). Expese i v dospělosti (Foret et al., 2007).
 - Csp4 – Expese v olfaktorických tkáních (Foret et al., 2007).
 - Csp5 – Výskyt jen u pozdních embryí a v ovariích preimagiální matky (Foret et al., 2007).
 - Csp6 - Zvýšená expese před svlékáním dospělce a v ovariích matky, Expese v dospělosti možná má nějaké imunitní funkce (Foret et al., 2007).

- HEX (hexameriny) - Jedná se o skupinu převážně zásobních proteinů (Erban et al., 2016), které jsou během larválního vývoje syntetizovány tukovým tělískem a sekretovány do hemolymfy (Martins, et al, 2012). Během přechodu do stádia kukly dojde tukovým tělískem k jejich vychycení z hemolymfy a uložení v cytoplazmě trofocytů ve formě granulí. Během tohoto stádia slouží jako hlavní zásoba aminokyselin a energie pro dokončení proměny (Martins, Anhezini et al., 2011). Jejich hladina se jejich spotřebou postupně snižuje (Martins, et al, 2012). U larev matek je jejich produkce nízká, protože získávají dostatek energie z mateří kašičky (Martins et al., 2010). Pravděpodobně se účastní i stavby kutikulární tkáně (Danty et al., 1998). Nálezy v oenocytech poukazují na další funkce, jako například spracování lipidů, larvální růst, produkci feromonů a vývojovou signalizaci (Martins, et al, 2012).
 - Hex70a - V dospělosti je pořád transkribován u všech kast (Danty et al., 1998), nejvíce u dělnic a trubců, u matky pak méně (Martins et al., 2010). Přítomen je převážně v jádrech testes i ovarií, kde může plnit proliferační a regulační funkci. Roli může mít i u formování kutikuly (Martins, Anhezini et al., 2011). Během ekdyze dochází ke snížení jeho hladiny (Martins et al., 2010).
 - Hex70b - Většina je využita během metamorfózy (Erban et al., 2016), u dělnic i trubců krátce po vylíhnutí zmizí, u matky ještě chvíli přetrvává (Danty et al., 1998).
 - Hex70c - Podobně jako u hex70b je většinou spotřebován do vylíhnutí jedince a v dospělosti z hemolymfy rychle mizí (Erban et al., 2016). Ve srovnání s ostatními proteiny se téměř nevyskytuje v gonádách larvy ani kukly (Martins et al., 2010).

- Hex80 - Nachází se především v hemolymfě trubců, ze které mizí před začátkem přeměny (Danty et al., 1998).
- Hex110 - Jako první mizí z hemolymfy, většinou před dokončením metamorfózy (Danty et al., 1998). Má velkou úlohu ve spermatogenezi a produkci vajíček, proto je hodně transkribován zvláště u kladoucí matky (Martins et al., 2010).
- HSP (heat shock proteiny) - Proteiny, které se starají hlavně o správnou konformaci a uspořádání nově nasyntetizovaných proteinů, převážně během vývoje kukly (Erban et al., 2016). S kontrolou syntézy proteinů pomáhají i imunitnímu systému při infekci patogenů. Zlepšují zpracování komplexních feromonů během sběru nebo zasnubních tanců (Woltedji et al., 2012).
 - Hsp60 - Funguje jako molekulární chaperon, zabraňuje agregaci proteinů a katalyzuje skládací proteiny (Woltedji et al., 2012).
 - Hsp90 - Nachází se v tykadlech, kde pomáhá s olfaktorickou komunikací pomocí interakce s receptory steroidních hormonů (Woltedji et al., 2012).
 - Hspβ1 - Primárně se vyskytuje v brzkých stádiích vývoje. Jako molekulární chaperon pomáhá s údržbou buňky a sekretorickou aktivitou hypofaryngeálních žláz. Po vystavení stresorům se zvyšuje jejich exprese (Woltedji et al., 2013).
- TLR (toll-like receptor 13) - Má důležitou roli ve funkci vrozené imunity, po rozpoznání patogenních látek spouští příslušné signální dráhy (Erban et al., 2016).
- Cirkadiální clock-controlled protein - Zvýšená hladina exprese u kukly, s věkem se postupně snižuje. Je součástí juvenil-hormon binding proteinů (Erban et al., 2016).
- Proteiny zajišťující transport lipidů
 - V hemolymfě je přenos lipidů zprostředkován především lipoproteiny lipophoriny (Erban et al., 2016). U všech kast je jejich hladina stejná (Chan et al., 2006).
 - Apolipophorin (apoLp-I) – U dospělého podobné kukle (Erban et al., 2016).
 - Apolipophorin III (apoLp-III) - U dospělého se stará o transport diacylglycerolu z lipidových zásob tukového tělíska k létacím svalům. Stimuluje produkci antimikrobiálních peptidů v hemolymfě a zvyšuje fagocytózu hemocytů (Erban et al., 2016).
 - FABPs (fatty acid binding proteiny)- Lipidové chaperony exprimované hojně u larev dělnic, s věkem se jejich hladina snižuje. Jsou součástí metabolických a zánětlivých drah (Erban et

al., 2016). Při metabolismu mastných kyselin zajišťují transport vnitrobuněčných proteinů, přenos signálu nebo regulace genové exprese (Woltedji et al., 2013).

- Transferrin 1 - Glykoprotein, který řídí hladinu železa v těle, snižuje oxidativní stres a podobně jako vitellogenin zvyšuje imunitu včely, čímž napomáhá dlouhověkosti především zimních dělnic (Erban et al., 2013).
- JHE (juvenil hormon esteráza) - Velká role v metabolické dráze pro produkci juvenilního hormonu (Erban et al., 2014).

4.2 Enzymy

- α -glucosidase - Účastní se metabolismu sacharidů, převážně trehalózy, hlavního cukru hemolymfy (Erban et al., 2013).
- E4-like protein - Esteráza, která by mohla mít úlohu ve snižování hladiny juvenilního hormonu u zimních včel (Erban et al., 2013).
- Chitinase-like idgf4-like protein (imaginal disk growth factor) - Jedná se o hmyzí růstový faktor a je jedním z vývojových proteinů larvy (Erban et al., 2013). Slinnými žlázami je sekretován do medu a mateří kašičky (Fujita et al., 2010), hodně v extraktech PcG, málo v TG, hodně slabě detekovatelné v HPG (Fujita et al., 2012).
- GILT-like (gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase-like) - Snižování disulfidických vazeb proteinů, v imunitní odpovědi (Erban et al., 2013).
- PO (fenoloxidáza) – V aktivované formě se účastní dráhy syntézy melaninu a imunitní reakce proti mikroorganismům. Malá hladina u larvy je asi důvodem slabě vyvinutého imunitního systému a absence pigmentace (Chan et al., 2006). Stálá exprese u matky, zvýšená u zimních dělnic. U letních dělnic hladina klesá s věkem (Erban et al., 2013).
- GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenáza) – Oxidací glukózy pomáhá produkovat energii. Účastní se tak velkého spektra buněčných drah (Erban et al., 2014).

4.3 Hormony

- JH (juvenilní hormon) - Hormon, který je u hmyzu zodpovědný za udržování larválního stádia (Cunha et al., 2005). Účastní se kastovní diferenciaci a dělby práce (Fujita et al., 2012) a reguluje produkci vitellogeninu (Amdam et al., 2004). Vyšší hladina vede k vývoji matky, nižší k vývoji dělnice (Martins et al., 2010). Jeho hladina klesá spolu s ekdysteroidy při přechodu předkukly

na kuklu (Cunha et al., 2005). U létavek jeho zvýšená exprese zabraňuje tvorbě vitellogeninu (Amdam et al., 2004).

- JH III – Zajišťuje regulaci růstu, vývoje a rychlosti přerodu z mladé krmičky na starší létavku (Kešnerová et al., 2017).

5 Vývoj klíčových orgánů a tkání

5.1 Mozek

Složitému vývojovému cyklu včely odpovídá i složitá a rozdílná aktivita mozku, která odráží potřeby daného stádia jedince. Každé stádium má své specializované kinázové kaskády a fosforylační sítě, které se starají o hladký průběh a funkci neurobiologické aktivity mozku. Především fosforylační signalizace je důležitá, reguluje podle potřeby široké spektrum biologických úloh centrálního nervového systému a zvyšuje přenos signálu. Fosforylované glycerofosfolipidy slouží jako rezervoár druhých posílů. Wnt signalizační dráha zprostředkovávající přenosy signálů a podporuje interakci mozku s okolím (Bezabih et al., 2017).

U mladých včel je zpočátku konstrukce neurální sítě na minimální potřebné úrovni, ještě není plně vyvinutá. Postupně začíná docházet k posílení produkce proteinů metabolismu sacharidů, nukleosidů a lipidů, vezikulárním transportem a přenosem signálu, aby se zajistil potřebný přísun energie pro dokončení přestavby mozku (Han et al., 2017). Při přeměně krmičky na létavku dochází k velké syntéze proteinů, aby došlo k potřebným změnám struktury mozku (Bezabih et al., 2017).

Starší včely mají hodně membránových proteinů a fosfoproteinů, aby pokryly přenos a zpracování velkého množství signálů z prostředí. S věkem se také zvyšuje počet lysosomů, do kterých jsou lysosomální cestou vedeny staré neurony kvůli buněčné smrti (Han et al., 2017). Má více proteinů spojených s cAMP signalizací (jako cAMP-dependent protein kináza, PKA), fosforylace má tedy důležitou roli při regulaci olfaktorického učení a paměti (Bezabih et al., 2017).

Z druhu *Apis mellifera ligustica* byl vyšlechtěn speciální druh včely, Royal Jelly bee, který má větší výnos mateří kašičky. Krmičky a létavky mají větší důraz na výdrž, efektivitu sběru a zásoby energie, došlo k up-regulaci SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion-protein attachment-protein receptor) proteinů vezikulárního transportu, endocytózy a Wnt signalizační dráhy pro posílení výměny signálních molekul mezi neurony. Více fosfoproteinů spojených s přenosem neurotransmiterů a jejich recyklací. Zvýšená fosfatidylinositolová signalizace, zlepšující plasticitu synapsí, a posílený metabolismus kyseliny arachidonové, která při tom vzniká. To všechno zvyšuje jejich nervovou citlivost a ulehčuje krmení larev a sbírání potravy (Han et al., 2017).

Včely mají dobrou olfaktorickou paměť, kterou využívají především pro zapamatování si chutí a vůní potravy navštívených květů. Dokážou si vypěstovat reflex, kdy se jim při rozpoznání vůně automaticky vysune sosák (proboscis extension reflex). To samozřejmě vyžaduje vlastní úpravu mozkových procesů pro adaptaci na nové stimuly. Například up-regulace různých biosyntetických procesů, proteinů

růstových faktorů či metabolismů, například sacharidů, aby byla dodána energie potřebná pro vývoj nervového systému a došlo k správnému utvoření synapsí (Da Silva Menegasso et al., 2017).

5.2 Tykadla

Orgány sloužící jako nástroj pro měření rychlosti letu, vnímání pachů a detekci jejich směru. Chemické signály jsou přijímány pomocí olfaktorických sensil, které se liší podle kasty. Trubci jich mají nejvíc (18 600), nejméně pak má matka (3 000). Existuje široké spektrum feromonů, které se starají komunikaci a sociální organizaci v kolonii. O zpracování pohlavních feromonů se starají poreplate sensily, které jsou početné na tykadlech trubců. OBSs pomáhají s detekcí a přenosem odorantů a feromonů, antioxidanty je chrání před poškozením, HSPs zase asistují při jejich zpracování a udržení hladiny metabolických procesů (Woltedji et al., 2012).

U dělnic je hladina olfaktorických proteinů vysoká, potřebují je pro efektivnější práci létavek a produkci medu. Trubci zase mají olfaktorický systém citlivější a rozsáhlejší, pravděpodobně kvůli lepšímu výkonu při kompetici o matku. Potřebují vysokou expresi proteinů metabolismu mastných kyselin, aby zvládly zpracovat sexuální feromony matky (Woltedji et al., 2012).

5.3 HPG (hypofaryngeální žlázy)

Jedná se o dlouhé párovité exokrinní žlázy, které u mladých krmiček produkují mateří kašičku, u létavek pak enzymy metabolismu sacharidů (Fujita et al., 2012). Jsou napojené na acini, které mají mnoho buněk produkujících sekret. Začínají se vyvíjet po vylíhnutí dělnice. Do 2 týdnů jsou plně vyvinuté a bývají výrazně velké, s věkem se však začínají zmenšovat (Feng et al., 2009).

Obsahují velkou hladinu proteinů spojených s metabolismem sacharidů a produkcí energie, především v brzkých stádiích je jejich exprese vysoká, protože je zapotřebí hodně energie na dělení buněk a sekreční syntézu. Důležitou jsou během vývoje i skládací proteiny Hsp. Už den po vylíhnutí obsahují proteiny mateří kašičky (MRJPs, major royal jelly proteiny). Žlázy létavek produkují enzymy pro zpracování nektaru na med, například α -glucosidázu nebo glukóza oxidázu, která zlepšuje skladnost medu. Jejich metabolismus je zpomalen a jejich aktivita začíná klesat (Feng et al., 2009).

5.4 Slinný systém

Tvoří ho dvě sekretorické žlázy - postcerebrální žláza (PcG, postcerebral gland) a hrudní žláza (TG, thoracic gland). Do medu a mateří kašičky sekretují protein idgf4, který nejspíš ovlivňuje fyziologický stav kolonie. V PcG je vysoká exprese enzymů metabolismu sacharidů, aldolasy a acetyl-CoA acyltransferasy 2, především u létavek je jejich hladina vyšší. To proto, že každá kolonie sekretuje vlastní unikátní sacharidové sloučeniny, kterými jedinci značí příslušnost k dané kolonii. Vylučuje se zde

i primární feromon včel, ethyl oleat (EO). V TG je zase vyšší exprese proteinů spojených se zpracováním signálů z okolí a s energetickým metabolismem (Fujita et al., 2010).

5.5 Mateří kašička (royal jelly)

Mateří kašička je látka tvořená proteiny HPG a lipidy mandibulárních žláz (Fujita et al., 2012). Krmičky ji podávají larvám jako zdroj živin a obranných látek. Larvy dělnic a trubců jsou krmeny jen první 3 dny, larvy matek pak po celou dobu, i v období dospělosti (Han, Li et al., 2011).

Mezi její nejvýraznější proteiny patří MRJPs (major royal jelly proteiny). Jedná se o skupinu proteinů, které jsou hlavním zdrojem energie potřebné pro vývoj (Feng et al., 2014).

- MRJP 1 (royalactin) - Hlavní faktor diferenciacce larvy v matku (Fujita et al., 2012). Je zdrojem mnoha výživných aminokyselin (Han, Li et al., 2011), účastní se tvorby vláknitých struktur mozku (Feng et al., 2014). Má hojné využití v kosmetickém i lékařském průmyslu (Han, Li, et al., 2011).
- MRJP 2 a MRJP 3 mají především protizánětlivé a antimikrobiální účinky (Han, Li et al., 2011).

Mnoho proteinů mateří kašičky hraje roli v imunitní ochraně jedince a metabolismu sacharidů.

Proteiny jako TCTP (translationally controlled tumor protein), který pomáhá buňce během růstu a chrání ji před stresem, a RC (regucalcin), který se stará u hladinu vápníku v buňce, jsou nejspíše jedním z důvodů dlouhověkosti matky (Han, Li et al., 2011).

5.6 Tukové tělísko

Jedná se o tukovou tkáň v abdomenu včely, která je složena z několika typů tukových buněk a je obklopena hemolymfou. U larvy se součástí metabolismu lipidů a sacharidů, syntézy a sekreci proteinů a jejich ukládání do hemolymfy (Martins, et al, 2012).

5.7 Hemolymfa

Hemolymfa funguje jako primární transport živin, hormonů a iontů po těle včely. Její složení se mění podle vývojových stádií, kast i ročního období (Wolteđji et al., 2013). Převážně se ale skládá z vody, sacharidů, lipidů, hormonů, proteinů, hemocytů či antimikrobiálních peptidů (Zewdu et al., 2017). Je hlavním místem rozpoznávání mikroorganismů a obrany proti nim (Bogaerts et al., 2009).

Hemolymfa larvy je zaměřená na proteiny pomáhající s jejím růstem a vývojem a imunitní ochranou. Slouží u ní jako hlavní zásoba živin, obzvláště po přechodu na kuklu (Wolteđji et al., 2013).

Kukla má naopak více proteinů spojených s metabolismem mastných kyselin nebo aminokyselin, aby zvládla přečkat nekrmivé období (Wolteđji et al., 2013).

Po vylíhnutí je hladina proteinů nízká, protože byly použity pro rekonstrukci organismu. Je kladen větší důraz na proteiny řídící vývoj tkání, adaptaci imunitního systému a energetický metabolismus (Zewdu et al., 2017).

6 Vývoj jedince

6.1 Vajíčko

Vývoj embrya ve vajíčku trvá asi 3 dny. Během nich je po celou dobu přítomen hlavní proteom, který se účastní vývoje, syntézy proteinů, metabolismu energie a transportu molekul. Tedy různé chaperony, proteasy, HSPs, ATP syntázy či cytochromy. Dochází i k formování imaginálních terčů (Fang, et al., 2014).

6.1.1 Embryo do 24 hodin

Zvyšuje se hladina proteinů iniciujících proliferaci buněk pro organogenezi. Živiny dodávají MRJPs, vitellogenin, ferritin a MRJPs, které obstarávají i diferenciaci kast a vývoj mozku (Fang, et al., 2014).

6.1.2 Embryo do 48 hodin

Pomalou začíná se začíná vyvíjet mozek, nervy, tracheje, malpighické trubice, stomodeum. Up-regulace proteinů transportujících signály a biomateriál, chránících před oxidativním stresem, řídící buněčný cyklus a metabolismus energie. S formováním orgánů pomáhají cytoskeletární proteiny. Aktivuje se biosyntéza aminoacyl-tRNA a metabolismus beta-alaninu pro zajištění správného vývoje (Fang, et al., 2014).

6.1.3 Embryo do 72 hodin

Formují se základní orgány reprodukčního, nervového, dýchacího, trávicího a oběhového systému. Dochází k aktivaci metabolismu mastných kyselin a transportu RNA (Fang, et al., 2014).

6.1.4 Embryo po 72 hodinách

Je utvořeno tělo larvy, larvální kutikula, základní orgány, ústní část a hindgut. Vysokou energetickou spotřebu kompenzují aktivované metabolismy mastných kyselin a lipidů, RNA transport, degradace žloutku. Cytoskeletární proteiny pomáhají dotvářet strukturu orgánů a těla (Fang, et al., 2014).

6.2 Larva

Protože u larvy dochází k rychlému růstu a vývoji, je zvýšená exprese proteinů dodávajících potřebné množství energie (Li et al., 2010). Je zde více transmembránových transportérů, tukové tělísko neustále syntetizuje hexameriny a lipoproteiny (Chan et al., 2008), které řídí růst (Feng et al., 2014).

Ke kastovní diferenciaci dochází přibližně po 3 dnech díky různé míře exprese proteinů (Li et al., 2010).

Larva matky exprimuje mnohem více proteinů energetického a sacharidového metabolismu, které tak pomáhají při utváření charakteristických znaků matky. Patří sem například transketolázy, aldehyd

dehydrogenázy, enolázy a β -podjednotky ATP-syntázy. Proteiny metabolismu aminokyselin a mastných kyselin pomáhají matce rychle růst a metamorfovat. Protein Leonardo pomáhá zakládat struktury olfaktorického učení, které matka využívá v dospělosti (Li et al., 2010).

Budoucí dělnice má ve srovnání s larvou matky nižší počet up-regulovaných proteinů, začínají se i později aktivovat (Li et al., 2010).

Expresí *idgf4* zase urychluje tvorbu imaginálních disků a tím i organogenezi (Li et al., 2010). Pro správné dělení buněk, udržení jejich tvaru a zajištění vnitrobuněčného transportu je posílena syntéza cytoskeletárních proteinů (Wolteđji et al., 2013). Rychlý růst má za následek vyšší výskyt reaktivních forem kyslíku (ROS), které organismu způsobují oxidativní škody. Proto se syntetizuje více antioxidantů, jako třeba thioredoxin peroxidáza 1 nebo GSTs. Po 5 dnech začnou larvy exprimovat proteiny, které se starají o skladování živin, aby měly dostatečnou zásobu pro stádium kukly (Li et al., 2010). V té době nastává i snížení exprese některých proteinů, převážně metabolických drah, protože už není nutná velká energetická poptávka pro vývoj (Wolteđji et al., 2013).

Reakce na okolní stimuly obstarávají proteiny OBP. Expresí transferrinu 1 pomáhá s utvářením vrozeného imunitního systému (Wolteđji et al., 2013).

6.3 Kukla

Jednotlivé fáze kukleného stádia se liší zabarvením očí, které postupně červenají a nakonec zhnědnou, a thoraxu, který melanizuje až ke konci. Fáze červenooké kukly bývá právě pro svou rozpoznatelnost využívána pro výzkum různých fyziologických změn po vystavení různým faktorům (Erban et al., 2014).

Je nutná vysoká produkce energie pro zajištění rychlou a správnou formaci všech orgánů a struktur. Posílená aktivita FABP pomáhá s transportem energie k cílovým tkáním. Vyšší hladina peroxiredoxinu souvisí s antioxidační ochranou. U červenooké kukly, tedy fáze blízko líhnutí, jsou nejpočetnější proteiny skládací, transportní, transkripce, translace, metabolismu sacharidů či proteiny účastníci se tvorby buněčných membrán (Erban et al., 2014).

Dochází k formování hlavy a jejích orgánů. Díky zvýšené biosyntéze a pestrosti tvořených proteinů po 13. dnu od počátku vývoje včely se zvyšuje hmotnost hlavy. Kolem 19. dnu značí složení proteinů rekonstrukci neuronů a olfaktorických systémů, pomáhají s tím i HPG a slinné žlázy. Vývoj hlavy při vyšší teplotě znamená v dospělosti vyšší míru aktivity včely (Zheng et al., 2011).

6.4 Dělnice

Značná část proteinů byla spotřebována za předchozího stádia. Proteiny jsou místo na výstavbu organismu zaměřeny spíše na posílení jeho imunity a interakci s prostředím (Erban et al., 2016). Tedy především proteiny typu ferritin, GST, TLR (Zewdu et al., 2017). První 2 týdny se krmí dělnice pylem, který jim zvyšuje hladinu Hex70a, který na oplátku podporuje expresi vitellogeninu. Vytváří si tak zásoby pro starší věk nebo pro případ nouze (Martins et al., 2010). Velkou roli hraje v tomto stádiu JH, který řídí fyziologické změny a chování jedince. Mladé včely pracující v úlu mají jeho hladinu menší než starší létavky (Žďárek, 2013). Množství JH je tak negativně ovlivněno množstvím vitellogeninu v hemolymfě (Martins et al., 2010). S udržením výkonu při létání pomáhá arginin kináza, která v místech kontrakce udržuje vysoké hladiny ATP (Wolstedji et al., 2012).

6.4.1 Létavka

Protože vykonávají ve srovnání s dělnicemi úlu náročnější aktivity, jak z fyzického, tak z riskantního hlediska, jsou jejich fyziologické funkce „okleštěny“ na minimum. Díky tomu i při případné smrti dělnice mimo úl nedojde u kolonie k přílišné ztrátě zdrojů, které do dělnice vložila. Jejich organismus jako celek začíná chátrat, dochází k opotřebování křídel a zhoršení kvality letu (Amdam et al., 2004).

Nárůst JH způsobuje apoptózu buněk hemocytů (Amdam et al., 2003), což spolu s nižším počtem imunocytů znamená snížený imunitní systém (Amdam et al., 2004). Vzniká více oxidativních škod na mozku, kterému začíná ubývat aktivita (Baker et al., 2012). Mají méně vitellogeninu (Amdam et al., 2004), hex70a a celkové hladiny proteinů hemolymfy (Martins et al., 2010). Mají zmenšené HPG, které produkují α -glukosidázu, sloužící přeměně nektaru na med (Fujita et al., 2010).

Přežívají hlavně z nektaru a zásoby uskladněných proteinů z období mladší dělnice (Martins et al., 2010).

6.4.2 Zimní dělnice

Vysoká syntéza vitellogeninu a proteinů spojených s ochranou proti patogenům a oxidativnímu stresu napomáhá dělnicím přečkat náročné zimní období a oproti letním dělnicím přežít i mnoho měsíců (Erban et al., 2013). Jejich aktivita je během zimy snižena, proto je u nich snižena hladina většiny proteinů spojených s činností letní dělnice.

6.5 Trubec

Jsou krmeni do prvního týdne po vylíhnutí. Poté odlétávají na shromážděště v okolí úlu, kde dochází ke svatebním letům s novou matkou, kterou pak oplodní (Žďárek, 2013).

Převážně vysoké hladiny proteinů funkce tykadel a syntézy feromonů. Hodně proteinů cytoskeletárních, skládacích a ochranných. Tykadla jsou hustě pokryta olfaktorickými disky, které zvyšují citlivost na feromon matky (Woltedji et al., 2012).

6.6 Matka

Její mandibulární žlázy produkují signální feromony, které regulují chování a reprodukční schopnost dělnic a lákají trubce. Oproti dělnicím má velké množství funkčních ovariol, ze kterých produkuje vajíčka, která oplozuje ze zásoby spermatu od trubců. Neúčastní se žádných prací spojených s úlem, není k tomu uzpůsobená (Žďárek, 2013).

Má relativně malou hladinu hexamerinů (Chan et al., 2006), zato velkou hladinu juvenilního hormonu (Martins et al., 2010). Neustále je u ní syntetizován vitellogenin (Seehuus et al., 2006).

7 Vztah včel a mikroorganismů

7.1 Mikrobiom

Také včely mají svůj střevní mikrobiom, který plní převážně svou úlohu v imunitním systému včely. Složení mikrobiomu je utvářeno v krátkém období po vylíhnutí včely, kdy dojde k vystavení organismu novému prostředí úlu, kterému se včela rychle přizpůsobí. Bakterie si včely předávají vzájemně svým sociálním chováním, případně je získávají z potravy (Hubert et al., 2017).

Střeva obsahují asi 8 druhů bakterií:

- Ileum hindgut obývají převážně 3 druhy gram negativních *Proteobacteria*: *Snodgrassella alvi*, *Gilliamella apicola*, *Frischella perrara* (Moran, 2015).
- V rektu hindgut jsou 3 druhy gram pozitivních bakterií: 2 z kmenu Firmicutes (*Lactobacillus mellis*, *Lactobacillus helsingborgensis*) a 1 rodu Actinomycetes (*Bifidobacterium asteroides*) – Pomáhají hostiteli s katabolismem sacharidů (Moran, 2015).
- Shluky 2 druhů *Alphaproteobacteria*: druhu *Bartonellaceae* a druhu *Acetobacteraceae* (*Parasaccharibacter apium*) (Moran, 2015). – U larev zvyšují odolnost proti *Nosema spp.* (Hubert et al., 2017).

Ve foregut je jich relativně málo, především *Lactobacillus kunkeei* a *Acetobacteraceae*. Vyskytují se většinou i v jídle, které asi pomáhají uchovávat (Moran, 2015).

Některé druhy, jako *Serratia marcescens* nebo *Hafnia alvi*, se objevují poté, co je organismus včely nakažen nějakým patogenem (Moran, 2015).

Množství a pestrost těchto bakterií je ovlivněna pesticidy a antibiotiky. Ve Spojených státech mělo v roce 2005 používání antibiotika tylosinu dopad na malou stresovou odolnost včel, což mohlo být jednou z příčin jejich hojného umírání v zimě 2006-2007 (Moran, 2015).

Kromě přátelských bakterií mohou tělo včely obývat i nebezpeční parazité, které na ní mohou zanechat četné škody a nebezpečná onemocnění. Mezi některé z nich patří následující

7.2 *Varroa destructor*

Jedná se o původního parazita *Apis cerana* (Erban et al., 2015), ale kolem 70. let minulého století se začal ve velké míře vyskytovat u *Apis mellifera* (Hubert et al., 2016). Živí se hemolymfou různých stádií včel (Hubert et al., 2017), dostávají od ní tak nejen proteiny, ale i viry a bakterie, které mohou šířit dál. Dospělé včely mají obecně pestřejší složení mikrobiomu než larvy, proto mají na nich parazitující

Varroa také větší diversitu bakterií (Hubert et al., 2016). Svému hostiteli snižují jeho hmotnost, imunitu, obsah živin a přenášejí na ně další nemoci (Erban et al., 2015). Navýšené počty *Lactobacilli* nebo *Snodgrassella alvi* ve střevě nakažené včely se snaží proti vetřelci bojovat tvorbou větší vrstvy ochranného biofilmu (Hubert et al., 2017).

Varroa destructor mohou doprovázet i další nebezpečné bakterie, například *Enterococcus* (Hubert et al., 2017), *Morganella* či nebezpečná *Spiroplasma*, která se začne šířit brzo po rozšíření *Varroa* (Hubert et al., 2016).

Včele může proti *Varroa* pomoci hlavně prevence. Pravidelné čištění sebe nebo ostatních a zbavování se nakažených mrtvých těl (Wu et al., 2017).

7.3 *Nosema spp.*

Další původní endoparazit *Apis cerana*, *Nosema ceranae*. Jako *Nosema apis* se u *Apis mellifera* přenáší převážně fekálně-orální cestou dospělými včelami. Množí se v epitelálních buňkách midgut. Hostiteli zvyšuje produkci energetického metabolismu, aby si obstarala dostatek energie. Nakažené včely dospívají dříve do role létavek, mají horší navigační schopnosti a jsou vystaveny většímu oxidativnímu stresu. Vyšlechtěná linie tolerantních včel se proti *Nosema* brání programovanou buněčnou smrtí nakaženého epitelu střev a jeho defekací (Kurze et al., 2016).

Mezi další včelí parazity patří ještě například *Lotmaria passim*, jednobuněčný eukaryotický bičíkovec, který interaguje se střevními buňkami, které ničí tvorbou hemidesmosomů (Hubert et al., 2017), nebo *Arsenophonus*, vnitrobuněčný parazit, který se nachází v reprodukčních orgánech, v hemolymfě na pylu květin (Hubert et al., 2016).

7.4 Nemoci včel

Patogeny mohou u včel způsobovat řadu nemocí. Ve stručnosti si představíme některé z nich.

7.4.1 Syndrom zhroucení včelstev (CCD, colony collapse disorder)

VanEngelsdorp definoval 61 faktorů způsobujících tuto nemoc, avšak není známo, který z těchto faktorů lze považovat za hlavní příčinu nemoci (Erban et al., 2018). První zmínky se o ní objevily už okolo roku 1869, ke konci 19. století způsobila v Coloradu úbytek ohromného množství včel. V nedávné době způsobila podobné škody po celých Spojených státech, v zimě v letech 2006/2007 a 2007/2008 uhynuly celé kolonie. Nemoc provázely symptomy jako rychlá ztráta dospělých dělnic v nakažených i okolních úlech, absence kleptoparazitismu a mrtvých těl ve včelíně (VanEngelsdorp et al., 2009).

7.4.2 Mor včelího plodu (AFB, American foulbrood)

Bakteriální onemocnění způsobené grampozitivní bakterií *Paenibacillus larvae* (dříve *Bacillus larvae*). Způsobuje rozklad larvy na kašovitou hmotu s hnilobným zápachem. Odolné spory jsou přenášeny dělnicemi, které zaletí do cizích zamořených kolonií a ukradnou jejich kontaminovaný med. Larvy se nejčastěji nakazí do 36 hodin po vylíhnutí z vajíčka, kdy stačí velmi malé množství spor. Později je nutné mnohem více spor a k infekci tak nedochází (Erban et al., 2018), extrakty z trávícího traktu dělnic jejich klíčení inhibují (Erban, Tyl et al., 2017). Infekce se projevuje zpravidla až po zavíčkování buňky, avšak existují i kmeny způsobující úhyn ještě předtím (Erban et al., 2018).

7.4.3 Hniloba včelího plodu (EFB, European foulbrood)

Jedná se o bakteriální onemocnění, způsobené grampozitivní bakterií *Melissococcus plutonius* (Erban et al., 2018). Onemocnění způsobuje problémy hlavně na jaře, a to u slabých kolonií či u kolonií s malými zásobami. Uvnitř kolonie dochází k přenosu bakterie od nakažených larev směrem k nenakaženým, mezi koloniemi se *Melissococcus* šíří pomocí kradeného nakaženého jídla (Erban, Hortova et al., 2017).

Často dochází k nárůstu počtu bakterií včelího mikrobiomu, nejspíše jako snaha s patogenem bojovat (Erban, Hortova et al., 2017). Jedná se například o *Gilliamella apicola*, *Frischella perrara* (Moran, 2015) nebo *Lactobacillus kunkeei* (Erban, Hortova et al., 2017). U včel, u kterých se neprojeví klinické symptomy, to byly zase třeba *Snodgrassella alvi* či *Lactobacillus helsingborgensis* (Moran, 2015).

7.4.4 Rozpad včelího plodu

Roku 1950 tuto nemoc objevil H.Katznelson. Dochází u ní k úhynu a rozpadu plodu na prášek ještě před zavíčkováním buňky. Původce označil jako *Bacillus pulvifaciens*, který byl později E.Generschem v roce 2006 zařazen jako *Paenibacillus larvae subsp. pulvifaciens* (Erban et al., 2018).

Zdraví včel mohou zhoršovat i role pesticidů, jejichž cílem je kontrola škodného hmyzu, patogenů či plevele. Od 80. let se pesticidy za tímto účelem používají ve Spojených státech v souvislosti s kontrolou nemoci *Varroa destructor*. Tyto pesticidy snižují život dělnic, které byly těmito přípravkům vystaveny ve stádiích larvy nebo kukly. Například pesticid Coumaphos, jehož zvýšená hladina ve vosku snižuje přežití jak dělnic, tak i matky. Případná rezistence včel na Coumaphos vyvolává křížovou rezistenci i na další organofosfáty a pyrethroidy. Včely oproti jinému hmyzu nemají mnoho detoxifikačních enzymů, které by dodávaly křížovou rezistenci na pesticidy, jakékoliv vylepšení enzymů tak velmi zvýší schopnost tolerance (VanEngelsdorp et al., 2009).

Za vhodných podmínek by sice bylo možné i vyšlechtění včel odolných vůči pesticidům, ale znamenalo by riziko při zvýšené koncentraci spor pro méně odolná včelstva (Erban et al., 2018), což se ve výsledku jeví jako neefektivní řešení.

8 Metody

U studie fyziologie včel se využívají různé metody, převážně z oblasti proteomiky, bioinformatiky či molekulární genetiky. Pro zobecnění by se dalo říct, že každému výzkumu předchází získání materiálu, který bude předmětem vyhodnocování. Včelí jedinci jsou ze studovaných kolonií odchyceni podle předmětu studia v různých stádiích vývoje, kastovní příslušnosti nebo fyziologickém stavu anebo využiti jako následné referenční vzorky. Odebírají se jim pak vzorky tkání, tělních tekutin nebo DNA. Proteiny prochází elektroforézou zmapují se. K identifikaci se využívají různé predikační programy a výsledek se porovnává s referenčními databázemi.

Nejpoužívanější metody analýzy proteinů jsou 1-DE (one-dimensional electrophoresis) a 2-DE (two-dimensional electrophoresis) gelová elektroforéza, případně 2-DLC (two-dimensional liquid chromatography) gel-free elektroforéza, nejčastěji v kombinaci s MS/MS (tandem mass spectrometry) nebo MALDI-TOF/MS (matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry) spektrometrií. Tyto metody se liší především ve své rozlišovací schopnosti. 2-DE je zaměřena na detekci malých, velkých nebo hydrofobních proteinů, lépe se ale dají identifikovat. Oproti tomu 2-DLC má širší identifikační záběr a je plně automatizován, na druhou stranu snadněji některé nálezy přehlédne nebo špatně identifikuje. Pro dosažení nejpřesnějších výsledků je nejspíš nejvhodnější kombinování jednotlivých metod, aby se pokrylo co nejvíce jejich slabých míst (Bogaerts et al., 2009). Nejčastěji se používají při analýze složení hemolymfy a produktů exokrinních žláz. Nové generace spektrometrických přístrojů už jsou schopny rychle a přesně identifikovat velké množství proteinů a jsou tedy hlavním pomocníkem při zkoumání embryogeneze a změn tkáňových struktur včel. V poslední době dochází hlavně ke zkoumání složení mnohých parazitů a bakterií a rozdíků, které způsobují ve fyziologii nakažených jedinců. Výsledky by měly pomoci najít způsob, jak včely proti nim bezpečně bránit.

Při práci s DNA a RNA se nejčastěji používají amplifikační metody PCR (polymerase chain reaction) jako je qPCR (quantitative polymerase chain reaction) či RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction). Sledují se převážně změny v expresy genů při vývoji i nákaze. Celý genom *Apis mellifera* byl poprvé popsán v roce 2006 (Weinstock et al., 2007).

9 Závěr

Cílem práce bylo stručně popsat, k jakým fyziologickým změnám dochází během různých stádií vývoje včely medonosné, *Apis mellifera*, a jaké jsou odlišnosti mezi příslušníky jednotlivých kast. Obecně by se dalo říct, že složení velkého spektra proteinů a jejich množství v těle včely odpovídá potřebám organismu v daném stupni vývoje. Během embryogeneze a larválního stádia se zaručuje správné formování těla a dodávání velkého množství energie. Larva nabývá na velikosti a ukládá si zásoby živin. To znamená posílení cest energetického metabolismu a zásobních proteinů. Kukla spotřebovává hodně energie a zdrojů pro kompletní přestavbu těla. S tím souvisí hlavně metabolismus mastných kyselin, transportní proteiny a ochrana před oxidativním stresem. Nově vylíhnutá dělnice se potřebuje přizpůsobit na nový způsob života a nové vjemy. Formuje si imunitní systém a posiluje olfaktorické systémy. Většinu živin použila v minulém stádiu, proto potřebuje dohnat jejich ztrátu a zabezpečit se na stáří. Pro konání různých povolání se jí přizpůsobují orgány, chování a exprese potřebných látek. Ke konci života se už u ní vyskytují jen ty nejnужnější funkce. Trubci mají jediný hlavní úkol, oplodnit matku. Nejsou proto vybaveni pro běžné úkony dělnic, ale specializují se pro úspěšné splnění svého cíle. A jelikož na matce v podstatě závisí existence a přežití kolonie, má zajištěný neustálý přísun energie a zdrojů pro kladení vajíček. Po celý život si udržuje vysokou hladinu vitellogeninu, který jí dodává odolnost, a vylučuje silné feromony, kterými ovládá ostatní dělnice.

Počty včel jsou poslední dobou ohrožovány přemnožením nebezpečných parazitů, jako je především *Varroa destructor*. Jejich studium pomáhá porozumět mechanismům jejich šíření a přenášení, pro včely často smrtelných, nemocí. To by mohlo zlepšit prevenci a tím i kvalitu života a chovu.

Jelikož je zkoumání vývoje včel pořád relativně v začátcích, je tu pořád velký prostor pro podrobné zkoumání celého spektra vlastností včel. Ať už se to týká jejich vývoje, reakcí na různé choroby nebo ekologické změny.

10 Literatura

10.1 Periodická (články v časopisech)

1. AMDAM, Gro V., SIMÕES, Zilá L. P., HAGEN, Arne, NORBERG, Kari, SCHRØDER, Knut, MIKKELSEN, Øyvind, KIRKWOOD, Thomas B.L, OMHOLT, Stig W. 2004, Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Experimental Gerontology*, **39**(5), 767-773.
2. AMDAM, Gro V., NORBERG, Kari, HAGEN, Arne, OMHOLT, Stig W. 2003, Social exploitation of vitellogenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**(4), 1799-1802.
3. BAKER, Nicholas, WOLSCHIN, Florian, AMDAM, Gro V. 2012, Age-related learning deficits can be reversible in honeybees *Apis mellifera*. *Experimental Gerontology*, **47**(10), 764-772.
4. BEZABIH, Gebreamlak, CHENG, Han, HAN, Bin, FENG, Mao, XUE Yu, HU, Yu, LI Jianke. 2017, Phosphoproteome Analysis Reveals Phosphorylation Underpinnings in the Brains of Nurse and Forager Honeybees (*Apis mellifera*). *Scientific Reports*, **7**(1), 1-16.
5. BOGAERTS, Annelies, BAGGERMAN, Geert, VIERSTRAETE, Evy, SCHOOF, Liliane, VERLEYEN, Peter. 2009, The hemolymph proteome of the honeybee: Gel-based or gel-free?. *PROTEOMICS*, **9**(11), 3201-3208.
6. CUNHA, Adriana D., NASCIMENTO, Adriana M., GUIDUGLI Karina R., SIMÕES, Zilá L.P., BITONDI, Márcia M.G. 2005, Molecular cloning and expression of a hexamerin cDNA from the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology*, **51**(10), 1135-1147.
7. DANTY, Emmanuelle, GERARD, Arnold, BURMESTER, Thorsten, HUET, Jean-Claude, HUET, Dominique, PERNOLLET, Jean-Claude, MASSON, Claudine. 1998, Identification and developmental profiles of hexamerins in antenna and hemolymph of the honeybee, *Apis mellifera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **28**, 387-397.
8. DA SILVA MENEGASSO, Anally Ribeiro, PRATAVIEIRA, Marce, DE SALDANHA DA GAMA FISCHER, Juliana, CARVALHO, Paulo Costa, ROAT, Thaisa Cristina, MALASPINA, Osmar, PALMA, Mario Sergio. 2017, Profiling the proteomics in honeybee worker brains submitted to the proboscis extension reflex. *Journal of Proteomics*, **151**, 131-144.
9. ENGEL, Michael S. 1999, The Taxonomy of Recent and Fossil Honey Bees (Hymenoptera: Apidae; *Apis*). *Journal of Hymenoptera Research*, **8**(2), 165-196.

10. ENGEL, Philipp, KWONG, Waldan K., MCFREDERICK, Quinn, et al. 2016, The Bee Microbiome: Impact on Bee Health and Model for Evolution and Ecology of Host-Microbe Interactions. *MBio*, **7**(2), 1-9.
11. ERBAN, Tomas, HARANT, Karel, HUBALEK, Martin, et al. 2015, In-depth proteomic analysis of *Varroa destructor*: Detection of DWV-complex, ABPV, VdMLV and honeybee proteins in the mite. *Scientific Reports*, **5**(1), 2306-2320.
12. ERBAN, Tomas, HARANT, Karel, KAMLER, Martin, MARKOVIC, Martin, TITERA, Dalibor. 2016, Detailed proteome mapping of newly emerged honeybee worker hemolymph and comparison with the red-eye pupal stage. *Apidologie*, **47**(6), 805-817.
13. ERBAN, Tomas, JEDELSKY, Petr L., TITERA, Dalibor. 2013, Two-dimensional proteomic analysis of honeybee, *Apis mellifera*, winter worker hemolymph. *Apidologie*, **44**(4), 404-418.
14. ERBAN, Tomas, LEDVINKA, Ondrej, KAMLER, Martin, TYL, Jan, et al. 2017, Honeybee (*Apis mellifera*)-associated bacterial community affected by American foulbrood: detection of *Paenibacillus* larvae via microbiome analysis. *Scientific Reports*, **7**(1), 1-10.
15. ERBAN, Tomas, LEDVINKA, Ondrej, KAMLER, Martin, HORTOVA, Bronislava, et al. 2017, Bacterial community associated with worker honeybees (*Apis mellifera*) affected by European foulbrood. *PeerJ.*, **5**, 1-28.
16. ERBAN, Tomas, PETROVA, Dagmar, HARANT, Karel, JEDELSKY, Petr L., TITERA, Dalibor. 2014, Two-dimensional gel proteome analysis of honeybee, *Apis mellifera*, worker red-eye pupa hemolymph. *Apidologie*, **45**(1), 53-72.
17. ERBAN, Tomas, KAMLER, Martin, MARKOVIČ, Martin, et al. 2018, Proč studovat virulenci bakterie *Paenibacillus* larvae, obávaného původce moru včelího plodu? *Veterinářství*, **68**(1), 38-44.
18. FANG, Yu, FENG, Mao, HAN, Bin, LU, Xiaoshan, RAMADAN, Haitham, LI Jianke. 2014, *In-depth Proteomics Characterization of Embryogenesis of the Honey Bee Worker (Apis mellifera ligustica)*, **13**(9), 2306-2320.
19. FENG, Mao, FANG, Yu, LI, Jianke. 2009, Proteomic analysis of honeybee worker (*Apis mellifera*) hypopharyngeal gland development. *BMC Genomics*, **10**(1), 1-12.
20. FENG, Mao, RAMADAN, Haitham, HAN, Bin, FANG, Yu, LI, Jianke. 2014, Hemolymph proteome changes during worker brood development match the biological divergences between western honey bees (*Apis mellifera*) and eastern honey bees (*Apis cerana*). *BMC Genomics*, **15**(1), 1-13.
21. FORÊT, Sylvain, WANNER, Kevin W., MALESZKA, Ryszard. 2007, Chemosensory proteins in the honey bee: Insights from the annotated genome, comparative analyses and expressional profiling. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **37**(1), 19-28.

22. FUJITA, Toshiyuki, KOZUKA-HATA, Hiroko, UNO, Yuko, NISHIKORI, Kenji, MORIOKA, Mizue, OYAMA, Masaaki, KUBO, Takeo. 2010, Functional analysis of the honeybee (*Apis mellifera* L.) salivary system using proteomics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **397**(4), 740-744.
23. FUJITA, Toshiyuki, KOZUKA-HATA, Hiroko, AO-KONDO, Hiroko, KUNIEDA, Takekazu, OYAMA, Masaaki, KUBO, Takeo. 2012, Proteomic Analysis of the Royal Jelly and Characterization of the Functions of its Derivation Glands in the Honeybee. *Journal of Proteome Research*, **12**(1), 404-411.
24. HAN, Bin, FANG, Yu, FENG, Mao, et al. 2017, Brain Membrane Proteome and Phosphoproteome Reveal Molecular Basis Associating with Nursing and Foraging Behaviors of Honeybee Workers. *Journal of Proteome Research*, **16**(10), 3646-3663.
25. HAN, Bin, LI, Chenxi, ZHANG, Lan, FANG, Yu, FENG, Mao, LI, Jianke. 2011, Novel Royal Jelly Proteins Identified by Gel-Based and Gel-free Proteomics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**(18), 10346-10355.
26. HUBERT, Jan, BICIANOVA, Martina, LEDVINKA, Ondrej, KAMLER, Martin, LESTER, Philip J., NESVORNA, Marta, KOPECKY, Jan, ERBAN, Tomas. 2017, Changes in the Bacteriome of Honey Bees Associated with the Parasite *Varroa destructor*, and Pathogens *Nosema* and *Lotmaria passim*. *Microbial Ecology*, **73**(3), 685-698.
27. HUBERT, Jan, KAMLER, Martin, NESVORNA, Marta, LEDVINKA, Ondrej, KOPECKY, Jan, ERBAN, Tomas. 2016, Comparison of *Varroa destructor* and Worker Honeybee Microbiota Within Hives Indicates Shared Bacteria. *Microbial Ecology*, **72**(2), 448-459.
28. CHAN, Queenie W.T., FOSTER, Leonard J. 2008, Changes in protein expression during honey bee larval development. *Genome Biology*, **9**(10), 1-14.
29. CHAN, Queenie W. T., HOWES, Charles G., FOSTER, Leonard J. 2006, *Quantitative Comparison of Caste Differences in Honeybee Hemolymph*, **5**(12), 2252-2262.
30. KEŠNEROVÁ, Lucie, MARS, Ruben A. T., ELLEGAARD, Kirsten M., TROILO, Michaël, SAUER, Uwe, ENGEL, Philipp, RELMAN David. 2017, Disentangling metabolic functions of bacteria in the honey bee gut. *PLOS Biology*, **15**(12), 1-51.
31. KURZE, Christoph, DOSSELLI, Ryan, GRASSL, Julia, LE CONTE, Yves, KRYGER, Per, BAER, Boris, MORITZ, Robin F.A. 2016, Differential proteomics reveals novel insights into *Nosema*–honey bee interactions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **79**, 42-49.
32. LI, Jianke, WU, Jing, BEGNA RUNDASSA, Desalegn, SONG, Feifei, ZHENG, Aijuan, FANG, Yu, DELPRATO, Anna Maria. 2010, Differential Protein Expression in Honeybee (*Apis mellifera* L.) Larvae: Underlying Caste Differentiation. *PLoS ONE*, **5**(10), 1-11.

33. MARTINS, Juliana Ramos, BITONDI, Márcia Maria Gentile. 2012, Nuclear Immunolocalization of Hexamerins in the Fat Body of Metamorphosing Honey Bees. *Insects*, **3**(4), 1039-1055.
34. MARTINS, Juliana R., ANHEZINI, Lucas, DALLACQUA, Rodrigo P., SIMÕES, Zilá L.P., BITONDI, Márcia M.G., DEARDEN, Peter K. 2011, A Honey Bee Hexamerin, HEX 70a, Is Likely to Play an Intracellular Role in Developing and Mature Ovarioles and Testioles. *PLoS ONE*, **6**(12), 1-11.
35. MARTINS, Juliana R, NUNES, Francis M.F., CRISTINO, Alexandre S., SIMÕES, Zilá L.P, BITONDI, Márcia M.G. 2010, The four hexamerin genes in the honey bee: structure, molecular evolution and function deduced from expression patterns in queens, workers and drones. *BMC Molecular Biology*, **11**(1), 1-20.
36. MORAN, Nancy A. 2015, Genomics of the honey bee microbiome. *Current Opinion in Insect Science*, **10**, 22-28.
37. SEEHUUS, Siri-Christine, NORBERG, K., GIMSA, U., KREKLING, T., AMDAM, Gro, V. 2006, Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**(4), 962-967.
38. TRAPP, Judith, MCAFEE, Alison, FOSTER, Leonard J. 2017, Genomics, transcriptomics and proteomics: enabling insights into social evolution and disease challenges for managed and wild bees. *Molecular Ecology*, **26**(3), 718-739.
39. VanENGELSDORP, Dennis, EVANS, Jay D., SAEGERMAN, Claude, et al. 2009, Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. *PLoS ONE*, **4**(8), 1-17.
40. WEINSTOCK, George, ROBINSON, Gene E., GIBBS, Richard A. L. et al. 2007, Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, **443**(7114), 931-949.
41. WOLTEDJI, Dereje, FANG, Yu, HAN, Bin, FENG, Mao, LI, Rongli, LU, Xiaoshan, LI, Jianke. 2013, Proteome Analysis of Hemolymph Changes during the Larval to Pupal Development Stages of Honeybee Workers (*Apis mellifera ligustica*). *Journal of Proteome Research*, **12**(11), 5189-5198.
42. WOLTEDJI, Dereje, SONG, Feifei, ZHANG, Lan, GALA, Alemayehu, HAN, Bin, FENG, Mao, FANG, Yu, LI, Jianke. 2012, Western Honeybee Drones and Workers (*Apis mellifera ligustica*) Have Different Olfactory Mechanisms than Eastern Honeybees (*Apis cerana cerana*). *Journal of Proteome Research*, **11**(9), 4526-4540.
43. WU, Jiang-Li, ZHOU, Chun-Xue, WU, Peng-Jie, XU, Jin, GUO, Yue, Qin, XUE, Fei, GETACHEW, Awwarar, XU, Shu, Fa. 2017, Brain metabolomic profiling of eastern honey bee (*Apis cerana*) infested with the mite *Varroa destructor*. *PLOS ONE*, **12**(4), 1-14.
44. ZEWDU, Ararso, CHUAN, Ma, YUPING, Qi, FENG, Mao, HAN, Bin, HU, Han, MENG, Lifeng, LI, Jianke. 2017, Proteome Comparisons between Hemolymph of Two Honeybee Strains (*Apis mellifera ligustica*) Reveal Divergent Molecular Basis in Driving Hemolymph Function and High Royal Jelly Secretion. *Journal of Proteome Research*, **17**(1), 1-41.

45. ZHENG, Aijuan, LI, Jianke, BEGNA, Desalegn, FANG, Yu, FENG, Mao, SONG, Feifei, SAMAKOVLIS, Christos. 2011, Proteomic Analysis of Honeybee (*Apis mellifera* L.) Pupae Head Development. *PLoS ONE*, **6**(5), 1-12.

10.2 Knižní

46. TAUTZ, Jürgen. Fenomenální včely: biologie včelstva jako superorganismu. 2. vydání. Praha: Ve spolupráci s Českým svazem včelařů vydalo nakl. Brázda, 2009, ISBN 978-80-209-0379-2, 19–280.
47. ŽĎÁREK, Jan. Hmyzí rodiny a státy. Praha: Academia, 2013, ISBN 978-80-200-2225-7, 157–301.