

Změny fyziologických a imunitních parametrů včel v průběhu roku

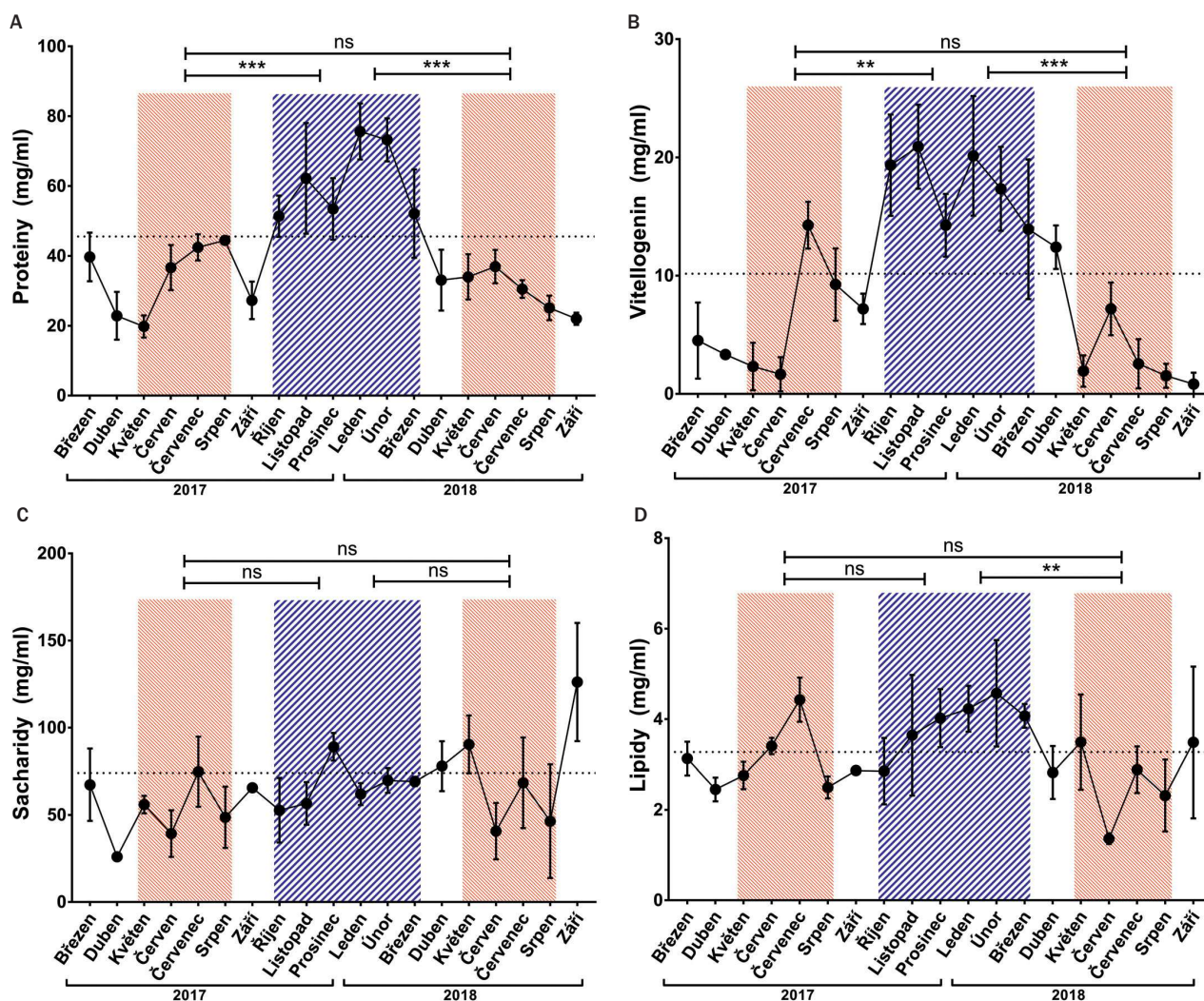
Již delší dobu je známo, že v mírném podnebném pásu se v závislosti na ročním období v úlu vyskytují dvě populace včel. Jedna je krátkověká (doba života cca 15–48 dnů), vyskytuje se v letních měsících a má za úkol shromáždit dostatečné zásoby. Druhá populace je pak dlouhověká (doba života až 8 měsíců) a díky nashromážděným zásobám přežívá nevlídné zimní období.

Rozdíl mezi těmito populacemi není pouze v úkolech, které zastávají, ale také ve stavbě a funkcích těl včel, které je tvoří. Například včely z letní generace mají zvýšenou hladinu juvenilního hormonu a zvětšené hltanové (hypofaryngeální) žlázy, zatímco u zimní generace je zase zvýšený obsah zásobního a antioxidačního proteinu vitel-

logeninu. Stejně tak je zvětšené i tukové těleso, které představuje zásobárnu živin nutných pro přežití nepříznivého období. Navíc se objevují i rozdíly v reakcích jednotlivých populací na imunitní podněty. Blíže o imunitě včel pojednává článek Imunitní reakce včel (Včelařství 9/2015, str. 300–301).

Krátkověká populace více spoléhá na buněčnou část imunitních reakcí, která je zprostředkována buňkami zvanými hemocyty, kolujícími uvnitř organismu v hemolymfě, což je tekutina podobná krvi. Naopak dlouhověká generace více využívá humorální (látkovou) část, jež je reprezentována hlavně krátkými bílkoviny produkovanými do hemolymfy z tukového tělesa, které jsou schopny zahubit pronikající patogeny a jsou nazývány antimikrobiální peptidy.

Informace, zda se v úlu vyskytuje letní, nebo zimní generace včel, je důležitá pro správnou péči o včelstvo. O tom, jestli



Obr. 1: Sezonní změny fyziologických parametrů ve včelí hemolymfě. Změna koncentrace proteinů (A), vitellogeninu (B), sacharidů (C) a lipidů (D) měřená v průběhu dvou letních sezon, znázorněných červeně šrafoványi oblastmi, a jedné zimní sezony, znázorněné modře šrafovanou oblastí. Pravidelné měsíční odběry byly prováděny v letech 2017 a 2018. Každý bod zobrazuje průměrnou hodnotu pro daný měsíc \pm směrodatnou odchylku. Tečkovaná čára ukazuje roční průměrnou hodnotu daného parametru. Hvězdičky značí statisticky významné rozdíly při porovnání jednotlivých období pomocí statistické metody one-way ANOVA za použití Dunn's srovnání jako post hoc testu. Ns = nesignifikantní; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

včelstvo přežije zimní období, se rozhoduje již začátkem podzimu, a proto jsou znalosti o podílu zimní generace v kolonii velmi důležité a mohou pomoci bránit ztrátám včel v zimě. Bohužel rozlišení daných populací na základě vnějších znaků je téměř nemožné.

Pro rozlišení jednotlivých populací jsme proto chtěli stanovit soubor fyziologických a imunitních parametrů měřitelných v hemolymfě. Abychom toho dosáhli, sledovali jsme u vybraného včelstva změny v různých parametrech v průběhu roku. U tohoto včelstva nebyly pozorovány klinické příznaky nemoci (nosematóza, virus deformovaných křídel atd.) ani parazitace (*Varroa destructor*). Odběry vzorků byly pokryty dvě letní a jedna zimní sezona (léto 2017, zima 2017/2018 a léto 2018). V případě stanovení fyziologických parametrů byly měřeny celkové hladiny proteinů, lipidů a sacharidů (bílkovin, tuků a cukrů) vyskytujících se v hemolymfě, zároveň byla sledována i hladina již zmíněného vitellogeninu (obr. 1). Z imunitních reakcí byly jako možné ukazatele rozlišující od sebe jednotlivé populace vytipovány antimikro-

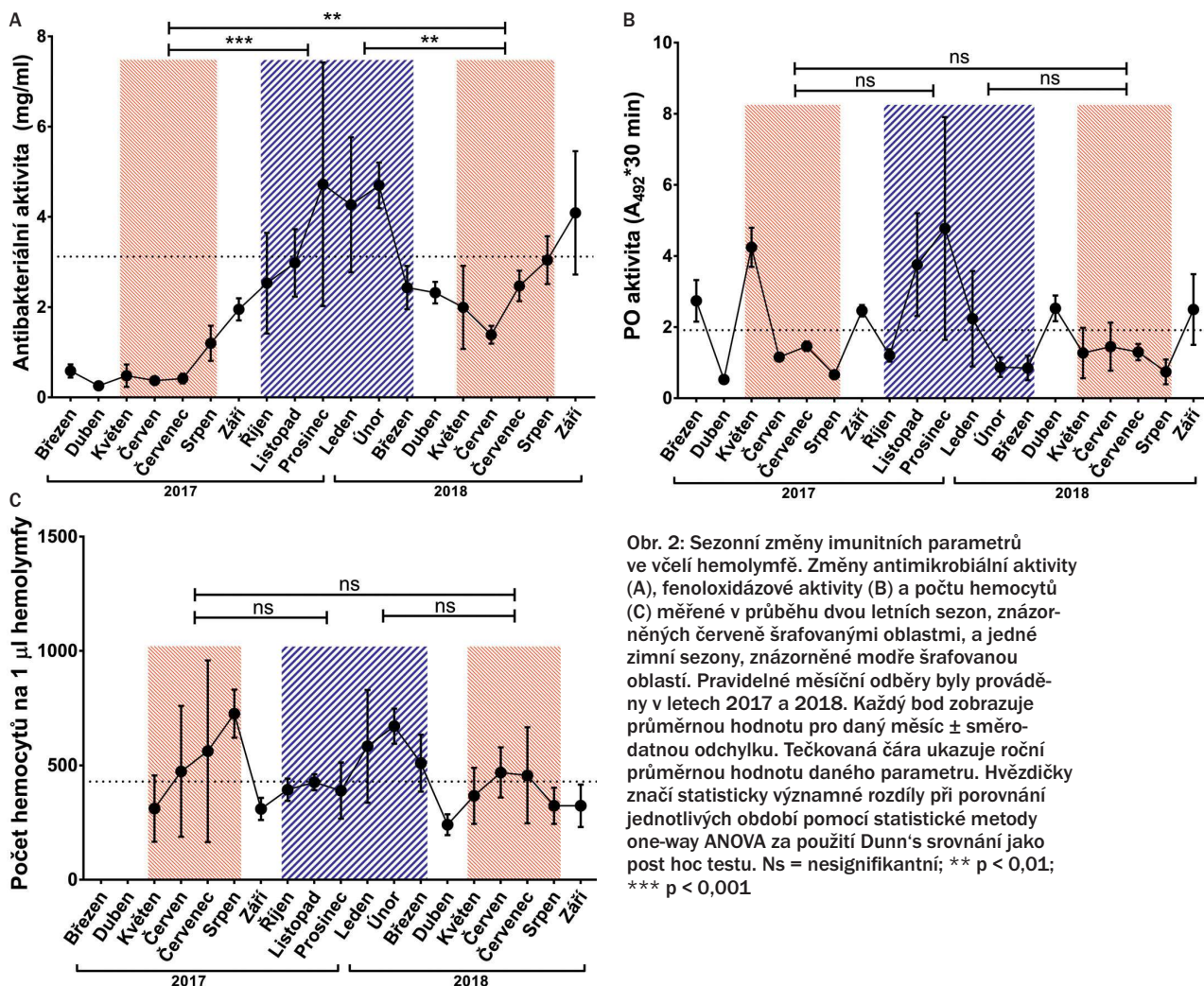
robiální aktivita, aktivita fenoloxidázové reakce a počet hemocytů (obr. 2).

V případě fyziologických parametrů je očividné zvýšení celkových proteinů a hladiny vitellogeninu v zimním období. Ostatní živiny (lipidy a sacharidy) měly vyrovnané hladiny v průběhu celého

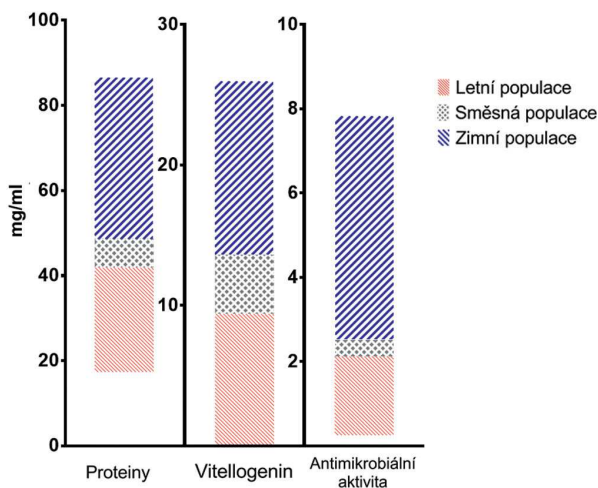
Mohla by vzniknout spolupráce mezi včelařskou veřejností a akreditovanými laboratořemi provádějícími měření na vzorcích zaslaných jednotlivými včelaři

pozorovaného období. Podobně bylo u zimní populace včel pozorováno zvýšení antimikrobiální aktivity. Tato aktivita byla měřena pomocí radiální difuze, což je postupně pronikání antimikrobiálních peptidů do gelu v kruhu kolem vyražené jamky naplněné hemolymfou. Gel je zakalen bakteriemi a pronikající antimikro-

biální peptidy vytvářejí projasněné zóny (inhibiční zóny), jejichž velikost je úměrná antimikrobiální aktivitě hemolymfy. Hodnoty byly vztaženy na kalibraci vytvořenou pomocí lysozymu (antimikrobiální enzym) a vyjádřeny jako jeho koncentrace potřebná pro vytvoření stejné inhibiční zóny. Fenoloxidázová aktivita (soubor procesů vedoucí k produkci melaninu), potřebná pro správnou funkci srážení hemolymfy (koagulační kaskády), je velice variabilní a vykazuje značné rozdíly mezi jednotlivými měřeními. Z toho důvodu byla shledána jako nevhodný parametr, na jehož základě by se měla určovat příslušnost k dané populaci včel. Počet hemocytů se také neukázal jako vhodný kandidát. I když je možné pozorovat lehké navýšení počtu hemocytů u letních populací, toto zvýšení není dostatečně statisticky významné (signifikantní) oproti populaci zimní. Na základě statistické metody zvané „analýza hlavních komponent“ tedy byly jako tři nevhodnější parametry využitelné pro rozlišení populací včel zvoleny celková hladina proteinů, obsah vitellogeninu a antimikrobiální aktivita hemolymfy. Také byla vytvořena rozmezí



Obr. 2: Sezonní změny imunitních parametrů ve včelí hemolymfě. Změny antimikrobiální aktivity (A), fenoloxidázové aktivity (B) a počtu hemocytů (C) měřené v průběhu dvou letních sezon, znázorněných červeně šrafovanými oblastmi, a jedné zimní sezony, znázorněné modře šrafovanou oblastí. Pravidelné měsíční odběry byly prováděny v letech 2017 a 2018. Každý bod zobrazuje průměrnou hodnotu pro daný měsíc \pm směrodatnou odchylku. Tečkovaná čára ukazuje roční průměrnou hodnotu daného parametru. Hvězdičky značí statisticky významné rozdíly při porovnání jednotlivých období pomocí statistické metody one-way ANOVA za použití Dunn's srovnání jako post hoc testu. ns = nesignifikantní; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.



Obr. 3: Grafické znázornění navržených fyziologických hodnot proteinů, vitellogeninu a antimikrobiální aktivity pro jednotlivé populace včel. Červené šrafování znázorňuje rozmezí hodnot typické pro krátkověkou populaci, modré šrafování pro dlouhověkou populaci a šedé tečkování pro směšnou populaci včel

pro jednotlivé parametry, která odpovídají letní, zimní, nebo smíšené populaci včel v úlu (obr. 3).

Jak již bylo řečeno, ve včelím úlu se vyskytují dvě fyziologicky a imunitně odlišné populace včel. Dosud byla za hlavní indikátor dlouhověkosti považována hladina vitellogeninu v hemolymfě. Naše studie se snažila prohloubit znalosti i o ostatních fyziologických a imunitních parametrech a jejich rozdílech u jednotlivých populací včel, jimž byla v minulosti věnována jen okrajová pozornost. Byla prokázána zvýšená hladina proteinů a lipidů u zimní populace včel. Hladina sacharidů v hemolymfě je stejně jako u většiny organismů v průběhu celého roku vyrovnaná, jelikož představují hlavní zdroj energie. Aby nedošlo k jeho vyčerpání, je nutné udržovat stálou koncentraci v hemolymfě a tím i stálé prostředí uvnitř těla včely. Na obrázku 1C je možné si všimnout velkého zvýšení hladiny cukrů v září roku 2018. Tento odběr byl ovšem prováděn po podání cukerného roztoku do včelstva jako náhrady za vytočený med. Na tomto příkladu je vidět, že pro stanovení populace je nutné pečlivě uvážit čas odběru vzorků z úlu.

Zvýšená hladina proteinů u zimní populace není způsobena jen přípravou energetických zásob na zimu, ale také zvýšenou produkcí antimikrobiálních peptidů. Tyto krátké bílkoviny, jako například apidaecin, abaecin či hymenoptaecin, by měly alespoň zčásti nahradit oslabenou buněčnou část imunitního systému. Zrání (maturace) a následné udržování hemocytů v hemolymfě je totiž energeticky vysoce náročný proces, a proto je v zimním období omezen na minimum. Vývoj hemocytů je zastaven i kvůli omezenému přísunu živin, kdy hlavním zdrojem potravy je med, který dostatečně nepokrývá živiny (nutrienty) nutné k jejich vývoji. Produkce antimikrobiálních peptidů probíhá beze změn, peptidy jsou energeticky mnohem úspornější než tvorba hemocytů, a jejich produkce je tedy v zimním období upřednostňována.

Vybrané parametry jsou relativně jednoduše měřitelné i u větších skupin vzorků. Proto by mohla například vzniknout spolupráce mezi včelařskou veřejností a akreditovanými laboratorními prováděcími měření na vzorcích zaslaných jednotlivými včelaři. Znalosti získané z výsledků těchto testů by následně mohla včelařská veřejnost využít,

aby přizpůsobila péči o slabší včelstva v průběhu zimního období. Například lze spojit dvě slabší kolonie do jedné a vytvořit tak včelstvo s mnohem vyšší šancí na přežití zimního období. Slabší včelstva by také mohla být přes zimu chráněna silnější vrstvou izolace pro udržení stálých teplotních podmínek uvnitř úlu. V nejzastříhanějších případech by mohlo být včelstvo včas zlikvidováno, aby se tak omezily finanční prostředky využitě na kolonii, která má velmi nízkou pravděpodobnost přežití. Samozřejmě, že všechny výsledky analýz a použité opatření budou v praxi muset být vztaženy k aktuálnímu zdravotnímu stavu včelstva.

Sledování parametrů dlouhověkosti je v tuto chvíli stále ve fázi výzkumu, nicméně do budoucna bychom mohli vyvinout metodiku „typických“ hodnot letní a zimní generace včel, což by se dalo využít v praxi. Měření navržených parametrů v kontrolních bodech roku, například v červnu pro letní generaci a v říjnu pro tu zimní, by mohla poskytnout odhad podílu dlouhověké generace přítomné v úlu. Tyto znalosti společně se správnou včelařskou praxí a udržováním čistoty včelnice a nástrojů mohou snížit ztráty včelstev během zimního období. Výsledky již byly publikovány v anglicky psaném odborném periodiku: *The Year of the Honey Bee (Apis mellifera L.) with Respect to Its Physiology and Immunity: A Search for Biochemical Markers of Longevity* (Kunc M.; Dobeš P.; Danihlík J.; Havlík J.; Titěra D.; Hyršl P. *Insects* 2019; 10:244; DOI: 10.3390/insects10080244). Výzkum byl podpořen grantem Ministerstva zemědělství České republiky NAZV QK1910286, který navazuje na znalosti získané výzkumem vlivu včelích nemocí a parazitů na imunitu včel.

Mgr. Martin Kunc Ph.D.

Ústav experimentální biologie,

Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity



Obr. 4: Odběr včel z úlu pro jednotlivé experimenty



Obr. 5: Zpracování včelích vzorků v laboratoři