

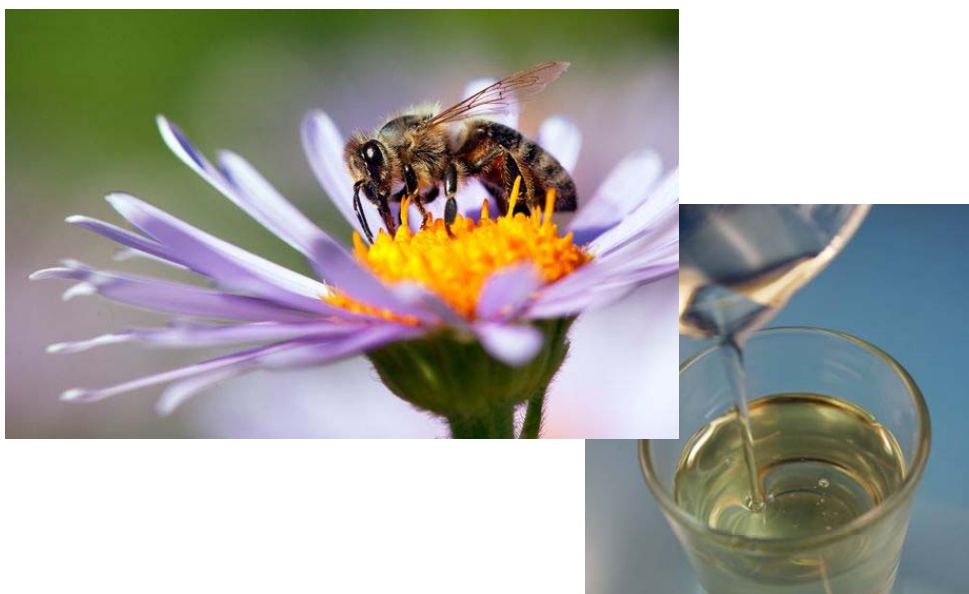


Fakulta zemědělská  
a technologická  
Faculty of Agriculture  
and Technology

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

## **Metodika přípravy krmiva pro včely s přídavkem induktorů imunitní reakce**

Metodika byla vypracována jako výstup projektu NAZV QK1910356 - Zlepšení zdravotního stavu včelstev pomocí indukce přirozených obranných mechanismů



Autoři: Ing. Karel Beneš, Ph.D., Ing. Pavel Beran, Ph.D.,  
Ing. Dagmar Stehlíková, Ph.D., doc. Ing. Michael Rost, Ph.D.,  
prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

České Budějovice, 2023



**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Fakulta zemědělská a technologická**

---

**Metodika přípravy krmiva pro včely s přidavkem induktorů imunitní reakce**

Metodika byla vypracována jako výstup projektu NAZV QK1910356 - Zlepšení zdravotního stavu včelstev pomocí indukce přirozených obranných mechanismů

Ing. Karel Beneš, Ph.D.  
Ing. Pavel Beran, Ph.D.  
Ing. Dagmar Stehlíková, Ph.D.  
doc. Ing. Michael Rost, Ph.D.  
prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

České Budějovice, 2023

Metodika přípravy krmiva pro včely s přidavkem induktorů imunitní reakce  
Beneš K. a kol., 2023

Katedra genetiky a biotechnologií, FZT JU v Českých Budějovicích, České  
Budějovice 2023  
[www.zf.jcu.cz](http://www.zf.jcu.cz), <http://biocentrum.zf.jcu.cz>

Vypracováno za podpory projektu NAZV QK1910356 - Zlepšení zdravotního stavu  
včelstev pomocí indukce přirozených obranných mechanismů

Recenzenty metodiky byli:

RNDr. Vojtěch Vyhnálek, CSc. – EIA SERVIS s.r.o.  
MVDr. Leoš Čeleda, CSc. – ÚVS SVS Praha

*Text: ©2023 Čurn V., Beneš K.*  
Vydáno bez jazykové úpravy  
ISBN: 978-80-7694-042-0

ISBN 978-80-7694-042-0



## **Obsah**

<b>Obsah .....</b>	<b>5</b>
<b>Uvedení problému a cíl metodiky .....</b>	<b>7</b>
<b>Vlastní popis metodiky .....</b>	<b>8</b>
<b>Úvod.....</b>	<b>8</b>
<b>Krmivo obohacené kyselinou p-kumarovou .....</b>	<b>11</b>
<b>Krmivo obohacené o ergosterol.....</b>	<b>15</b>
<b>Srovnání novosti postupů .....</b>	<b>19</b>
<b>Popis uplatnění metodiky .....</b>	<b>19</b>
<b>Ekonomické aspekty .....</b>	<b>20</b>
<b>Seznam publikací předcházející metodice .....</b>	<b>21</b>
<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>21</b>



## **Uvedení problému a cíl metodiky**

Včela medonosná přirozeně opyluje velké množství rostlinných druhů, a včelí snůška je tak velmi různorodá a nutričně vyvážená. Výživový stav včelstva je základním předpokladem pro produktivní včelstvo, odolné vůči stresovým faktorům (Brodschneider a Crailsheim 2010). Naproti tomu v podmínkách intenzivního zemědělství se setkáváme s úbytkem krajinných prvků bohatých na nektarodárné a pylodárné rostliny a naopak s rozsáhlými plochami monokultur, které včelám neposkytují potřebné živiny v průběhu celého vegetačního období. Rozmanitost flóry v dosahu včelstev je tak jedním z předpokladů pro zdravé a produktivní včelstvo (Evans et al. 2018). Ve výživě včel hraje podstatnou roli přírodní strava včel a fytochemikálie v ní obsažené. Sacharidy z nektaru a medu jsou základním zdrojem energie, oproti tomu je pyl jediným zdrojem bílkovin, lipidů, vitamínů a minerálů, nezbytných pro vývoj plodu a dospělých včel (Degrandi-Hoffman et al. 2008). Současné studie, porovnávající vliv medu a cukerné stravy, potvrzují význam přirozené stravy pro správnou funkci organismu včel (Wheeler a Robinson 2014; Mao et al. 2013) právě s ohledem na obsah fytochemikálií. Ty jsou představovány chemicky rozmanitými organickými sloučeninami, jako jsou např. alkaloidy, terpenoidy, fenoly, organické kyseliny a aminy. Fytochemikálie mají nezastupitelný význam jako látky, které ovlivňují expresi genů spojených s imunitou a rezistencí vůči pesticidům a dalším toxickým xenobiotikům (Liao et al. 2017; Palmer-Young et al. 2017). Schopnost těchto látek indukovat expresi genů kódujících detoxikační a imunitní enzymy zřejmě umožňuje včelám rychle reagovat na toxická xenobiotika a další stresory, s kterými se setkává, a zčásti tak kompenzovat redukované množství těchto genů v genomu. Pestrá včelí strava, její různorodost a nutriční vyváženost je základním předpokladem pro produktivní včelstvo, odolné vůči stresovým faktorům. Současné studie, porovnávající vliv medu a cukerné stravy, potvrzují význam přirozené stravy pro správnou funkci organismu včel a zdůrazňují pozitivní vliv fytochemikálií na expresi genů kódujících detoxikační enzymy. Přidávání fytochemikálií do cukerné stravy by tak mohl být jedním ze způsobů, jak posílit zdravotní stav včelstev (Liao et al. 2017).

***Cílem této metodiky je přestavení metodického postupu pro přípravu krmiva obohaceného o kyselinu p-kumarovou a další biologicky aktivní látky, jako induktorů přirozených obranných mechanismů včely medonosné.***

## Vlastní popis metodiky

### Úvod

Včela medonosná přirozeně opyluje velké množství rostlinných druhů, a včelí snůška je tak velmi různorodá a nutričně vyvážená. Výživový stav včelstva je tak základním předpokladem pro produktivní včelstvo, odolné vůči stresovým faktorům. V řadě studií je zdůrazňován význam přirozené a pestré včelí potravy, jako faktoru, který má významný vliv na vitalitu a fitness včelstva (Brodschneider a Crailsheim 2010; Wheeler a Robinson 2014; Evans et al. 2018). Intenzivní zemědělská výroba vede k úbytku krajinných prvků bohatých na nektarodárné a pylodárné rostliny a jejich nahrazení rozsáhlými plochami monokultur, které včelám nemusí poskytovat veškeré potřebné živiny.

Významnou biologicky aktivní složkou přirozené včelí stravy jsou fytochemikálie obsažené v pylu a nektaru. Význam fytochemikálií je ale širší a u včely byl popsán indukční efekt kyseliny p-kumarové obsažené v pylových zrnech na geny pro detoxikační enzymy či přímý baktericidní efekt některých fytochemikálií. Flavonol kvercetin, známý pro své antioxidační účinky, a kyselina p-kumarová zvyšují toleranci včel vůči pesticidům. Podáním kyseliny p-kumarové ve stravě byla také zvýšena exprese genů pro antimikrobiální peptidy, jež mají klíčovou funkci při imunitní reakci na mikrobiální infekci (Johnson et al. 2012). Tolerance a odbourávání chemických látek jsou umožněny především enzymy, které zprostředkovávají inaktivaci nebo rychlou eliminaci xenobiotik (Wink 2018). Hlavní skupiny enzymů, které zprostředkovávají odbourávání xenobiotik, jsou cytochromy P450, karboxyl/cholinesterázy, glutathion-S-transferázy a transportní proteiny (Gong a Diao 2017). V genomu včely je ale oproti jiným druhům hmyzu silně redukovaný počet detoxikačních genů. Včela *Apis mellifera* je vybavena pouze 46 geny pro P450, 10 pro GTS a 24 geny pro CCE. Navzdory redukovanému počtu detoxikačních genů není ale včela medonosná výrazně citlivější k pesticidům v porovnání s jinými druhy hmyzu (Hardstone a Scott 2010).

Částečné nahrazování přirozené stravy včel cukernými směsmi, případně bílkovinným krmivem je běžnou praxí řady včelařů. Přirozená strava včel však není pouze zdrojem základních živin, ale také prospěšných mikroorganismů (Dharampal et al. 2019; Raymann a Moran 2018) a fytochemikálií, které značně ovlivňují expresi genů spojených s imunitou a rezistencí vůči pesticidům a dalším toxickým xenobiotikům (Liao et al. 2017; Palmer-Young et al. 2017). Schopnost těchto látek indukovat expresi genů kódujících detoxikační a imunitní enzymy zřejmě umožňuje



včelám rychle reagovat na toxická xenobiotika a další stresory, s kterými se setkává, a zčásti tak kompenzovat redukované množství těchto genů v genomu. Přidávání fytochemikálií do cukerné stravy by tak mohl být jedním ze způsobů, jak posílit zdravotní stav včelstev (Liao et al. 2017). Jak již bylo zmíněno jednou z významných fotochemikálií je kyselina p-kumarová (Mitton et al. 2019). Kyselina p-kumarová (derivát kyseliny skořicové) je v přírodě poměrně rozšířená. Nachází se v arašídech, rajčatech, mrkvi, bazalce a česneku ale i jiných potravinářsky využívaných rostlinách. Zároveň je tato kyselina součástí pylu a stává se tak složkou medu, a tedy součástí jak bílkovinné, tak sacharidové složky včelí potravy. V pylu pak tato kyselina hraje jednu z detoxifikačních rolí vedoucí k regulaci imunitní odezvy a detoxifikačních procesů (Mao et al. 2013; Mao et al. 2015). V nízkých koncentracích je to neškodná látka, její zastoupení je ovšem výrazně ovlivněno výskytem pylodárných rostlin v okolí včelnice. Pokud je včelí pastva v dosahu včel zastoupena chudší druhovou základnou, dost často to může vést k nižšímu titru této koncentrace v plástovém pylu, což může negativně ovlivnit jak rozvoj včelího plodu v průběhu předjaří, jara, ale i léta. Stejně tak její nižší výskyt v medných zásobách, zejména v zásobách podaných včelařem, které jsou buď založené na rafinovaném řepném cukru (sacharóza) anebo na invertním sirupu (glukózo-fruktózový sirup) pak může negativně ovlivnit vitalitu a dlouhověkost zimní generace včel. I přes pozitiva invertního sirupu (jedná se o směs glukózy a fruktózy, tudíž včely nemusí vynakládat energii na rozštěpení sacharózy z řepného cukru pomocí enzymu invertáza), umělá krmiva neobsahují pyl.

Řada studií poukazuje i na význam střevního mikrobiomu a mikroorganismů přítomných v přirozeném prostředí včel, potravě a včelích produktech. Střevní mikrobiom hraje zřejmě nejen zásadní roli v ochraně včely před patogenními mikroorganismy, ale také ovlivňuje expresi antimikrobiálních peptidů, které jsou klíčovou součástí vrozené imunity včel. Detailní studie prováděná na bezžihadlových včelách druhu *Scaptotrigona depilis* ukázala na závislost regulérního vývoje včelího plodu na přítomnosti kvasinek rodu *Zygosaccharomyces*, které jsou zřejmě zdrojem sterolů, prekursorů ecdysonu. Byl navržen i model, na jehož základě lze vysvětlit roli kvasinek a vláknitých hub, které syntézou těkavých látek stimulují (*Candida*), nebo naopak inhibují (*Monascus*) růst kvasinek rodu *Zygosaccharomyces* tak, aby byla zajištěna mikrobiální rovnováha a udržen vzájemně prospěšný vztah (Paludo et al. 2019). U včely medonosné, *Apis mellifera*, není doposud vztah mezi kvasinkami a vláknitými houbami objasněn.

Na základě těchto poznatků bylo připraveno krmivo pro včely na bázi invertního cukru obohacené o kyselinu p-kumarovou a ergosterol (resp. suchou biomasu kvasinek rodu *Zygosaccharomyces*). Význam přirozené stravy možnosti suplementace krmiva kyselinou p-kumarovou a vliv fytochemikálií na vitalitu včel zmiňuje řada prací (Vočadlova et al. 2020; Mao et al. 2013; Mitton et al. 2019; Liao et al. 2017; Mao et al. 2015, Hýbl et al. 2021). Obdobně role ergosterolů a jejich producentů (kvasinek) byla uvedena ve studii Paludo et al. (2018).

## **Krmivo obohacené kyselinou p-kumarovou**

Řešení, které jsme zvolili v této metodice je založeno na přimíchávání nízké (a především bezpečné) koncentrace kyseliny p-kumarové a ergosterolu do krmiva. Přestože se může zdát, že se jedná o velmi malé množství, je nutné si uvědomit, že ani v přírodě se nevyskytuje velké a koncentrované množství této kyseliny, ale její obsah se liší dle lokality a rostliny, ze které pyl pochází. V průběhu života včelí dělnice přijímá potravu, která obsahuje dávku kyseliny p-kumarové na úrovni 400-600  $\mu\text{M}$  (hodnota se týká medu - nižší hodnoty a pylu - vyšší hodnoty). Suplementace byla založena na dodání kyseliny p-kumarové v titru, který odpovídá průměrné koncentraci v plástovém pylu, tedy 600  $\mu\text{M}$

Suplementace by tedy byla založena na dodání kyseliny p-kumarové v titru, který odpovídá průměrné koncentraci v plástovém pylu, tedy 600  $\mu\text{M}$  (jedná se přibližně o 0,0984 g kyseliny p-kumarové na 1l sirupu).

### ***Postup přípravy krmiva obohaceného kyselinou p-kumarovou***

#### **Krmivo bylo připraveno dle následujícího postupu:**

- smíchat 4,9 ml 96% ethanolu a 19,7 ml demineralizované vody (výsledná koncentrace ethanolu 20 %)
- roztok s ethanolem zahřát na 48°C
- poté za stálého míchání přidat 98,5 mg kyseliny p-kumarové, vypnout ohřev a míchat do úplného rozpuštění (do 5 minut)
- následně ještě vlažný roztok vmíchat do 1 L invertního sirupu
- míchání v sirupu nechat běžet do doby, než bude směs homogenní
  
- Celkově se k 1 L invertního sirupu přidává 24,6 ml roztoku 20% ethanolu obsahujícím 98,5 mg kyseliny p-kumarové.

Výsledný roztok má objem 1024,6 ml s koncentrací kyseliny 0,096 mg/ml, což je výrazně méně než je maximální rozpustnost ve vodě (1 mg/ml) a tudíž nemůže dojít při nízkých teplotách k vykrystalizování přidané kyseliny p-kumarové z invertního sirupu.

## ***Metoda detekce a kvantifikace kyseliny p-kumarové***

Metodický postup detekce a kvantifikace kyseliny p-kumarové je uveden za účelem dostupnosti jednoduché metody pro hodnocení množství kyseliny p-kumarové v aditivovaném včelím krmivu (invertním cukru s přidavkem kyseliny p-kumarové), verifikace deklarovaného množství aditiva v krmivu, hodnocení homogenity připraveného krmiva a jeho stability. Je uveden i metodický postup pro stanovení kyseliny p-kumarové v přirozeném včelím krmivu – pylu.

### **Stanovení kyseliny p-kumarové ve vzorku aditivovaného včelího krmiva - extrakce:**

Kyselina p-kumarová je stanovena z ethanolového extraktu. Příprava extraktů: vzorky krmiva (invertního cukru obohaceného kyselinou p-kumarovou (500 ml) jsou napipetovány do 50 ml Erlenmeyerovy baňky, ke vzorku je přidáno 5 ml 96 % ethanolu, vzorky jsou důkladně protřepány na vortexu, inkubovány při 50°C a poté při 4000g centrifugovány. Supernatant je použit pro HPLC analýzu

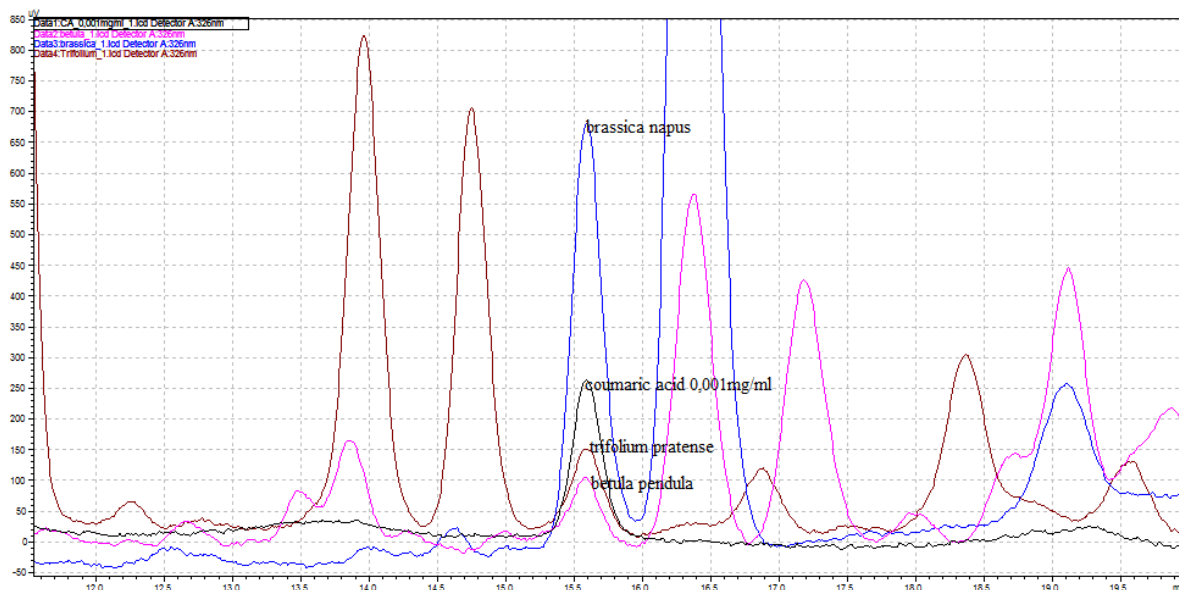
### **Stanovení kyseliny p-kumarové ve vzorku pylu - extrakce:**

Kyselina p-kumarová je stanovena z ethanolového extraktu pylu. Příprava extraktů: vzorky pylu (300 mg) jsou naváženy do 50 ml Erlenmeyerovy baňky, jsou přidány 3 ml 96 % ethanolu, vzorky jsou důkladně protřepány na vortexu, 60 min sonikovány při 50°C a poté při 4000g centrifugovány. Supernatant je použit pro HPLC analýzu.

### **HPLC analýza kyseliny p-kumarové:**

HPLC analýza je prováděna na kapalinovém chromatografu, detekce je při 326 nm na UV-Vis detektoru. Pro separaci je použita kolona C18 (4,6 × 250 mm, 5-micron particle size), nástřik 20 µl vzorku, izokratická eluce, mobilní fáze A : B = 85 : 15 (MP A: kyselina fosforečná, pH=3,2; MP B: acetonitril), průtok 1 ml/min s retenčními časy cca 15,5 minut. Koncentrace kyseliny p-kumarové je vypočtena dle plochy píku standardu (kys. p-kumarová 0,001 mg/ml).

Ukázka chromatografického profilu po analýze vzorků na přítomnost kyseliny p-kumarové, retenční čas je cca 15,5 minuty.



Analýzy byly prováděny z nepurifikovaných ethanolových extraktů pylu a použitá metoda separace byla schopná jasně odlišit kyselinu p-kumarovou od ostatních metabolitů přítomných v analyzovaném extraktu. Metoda HPLC analýzy byla vyvinuta pro analýzu hrubých extraktů, používá odlišné mobilní fáze než např. práce Bayram et al. (2021), Geetha et al. (2011) či Isidorov et al. (2009). Retenční čas kyseliny p-kumarové byl cca 15,5 minuty, tedy o něco delší než u výše zmiňovaných prací, ale delší doba analýzy umožnila jasné rozdělení látek a peak odpovídající kyselině p-kumarové byl je zřetelně viditelný i u vzorků pylu s jejím nízkým zastoupením. Z výsledků je patrné, že obsah kyseliny p-kumarové se ve vzorcích pylu výrazně liší. Nejnižší obsah byl u pylu břízy a jetele, naopak pyl řepky obsahuje tuto fenolickou látku ve značném množství



## **Krmivo obohacené o ergosterol**

Výsledky analýz ukazují, že významným zdrojem kyseliny p-kumarové je řepka. Z tohoto pohledu je ale nutno zohlednit více faktorů, nejen obsah kyseliny p-kumarové. Dalšími faktory mohou být rezidua pesticidů ovlivňující mikrobiální komunitu v úlovém prostředí. Vzhledem významu mikroorganismů jsme u včelstev z oblasti s vyšším podílem monokultury brukve řepky olejky a z oblasti bez řepky izolovali z plástvového pylu mikroorganismy, které dle naší hypotézy hrají klíčovou roli v detoxikačních reakcích. Homogenizované vzorky plástvového pylu byly rozetřeny na selektivní kultivační půdy pro růst hub a kvasinek a výsledné spektrum izolovaných kmenů mikroorganismů bylo značně odlišné v závislosti na habitatu. Z plástvového pylu z oblasti z vyšší diverzitou a bez řepky olejky byly na rozdíl od ostatních vzorků izolovány i houby rodu *Talaromyces* a kvasinky rodu *Zygosaccharomyces* u nichž byl zjištěn vysoký obsah ergosterolu (Javůrková 2021). Výsledky odpovídají i zjištěním ze studie (Paludo et al. 2019), kde byl potvrzen výskyt stejných hub a kvasinek a kvasinky byly uvažovány jako klíčový producent ergosterolu jako prekursoru hormonu ekdysonu, který ovlivňuje svlékání larev, a tedy přeměnu včelího plodu v dospělé včely.

Celkem bylo izolováno a charakterizováno 20 kmenů kvasinek rodu *Zygosaccharomyces*. U těchto kmenů byl stanoven obsah ergosterolu, tak, aby byla získána vstupní data pro přípravu aditivovaných krmiv. Produkce ergosterolu byla stanovena pomocí metody HPLC. Koncentrace ergosterolu byla vyhodnocena v přepočtu na navážku suché biomasy. Produkce ergosterolu u kvasinek *Z. mellis* se pohybovala v rozmezí 0,26-0,36 mg/g suché biomasy kvasinek, produkce ergosterolu u kvasinek *Z. rouxii* byla v rozmezí 0,13-0,36 mg/g suché biomasy.

### ***Postup přípravy krmiva obohaceného o ergosterol***

#### **Krmivo bylo připraveno dle následujícího postupu:**

- Kvasinky byly naočkovány do tekutých médií (30G, pH 6; 50 ml/Erlenmayerova baňka) a inkubovány při 30°C 48 hodin za nepřetržitého třepání.
- Obsah baněk byl následně centrifugován a supernatant odstraněn. Biomasa kvasinek byla promyta fyziologickým roztokem a přenesena na Petriho misky.
- Kvasinky byly následně sušeny 6 hodin při 105°C a suchý produkt byl rozmělněn na prášek.

- Pro krmení dospělých včel byla použita suchá směs kvasinek.
- Příprava invertního cukru se suchou biomasou kvasinek – k 1L invertního cukru byly přidány 4 g suché biomasy kvasinek.

Složení 30G média pro kultivaci kvasinek:

30% glukóza (30G); pH 6,0

Chemikálie	Množství [g/1000 ml H <sub>2</sub> O]
Glukóza	300 g
Yeast extract	30 g
Malt extract	30 g
Agar	20 g



## ***Metoda detekce a kvantifikace ergosterolu***

Metodický postup detekce a kvantifikace ergosterolu je uveden za účelem dostupnosti jednoduché metody pro hodnocení množství ergosterolu v aditivovaném včelím krmivu (invertním cukru s přidavkem ergosterolu), verifikace deklarovaného množství aditiva v krmivu, hodnocení homogenity připraveného krmiva a jeho stability.

Kromě ergosterolu byla metoda navržena také pro další metabolity, cholesterol a 24-methylencholesterol.

### **Stanovení ergosterolu ve vzorku biomasy kvasinek - extrakce:**

Kvasinky byly naočkovány do tekutých médií (30G, pH 6; 50 ml/Erlenmayerova baňka) a inkubovány při 30°C 48 hodin za nepřetržitého třepání. Obsah baněk byl následně centrifugován a supernatant odstraněn. Biomasa kvasinek byla promyta fyziologickým roztokem a přenesena na Petriho misky sušena 6 hodin při 105°C a suchý produkt byl rozmělněn na prášek. Mokrý i suchá biomasa byla zvážena.

Po vysušení byla suchá biomasa včetně hliníkových misek přenesena do vialek, jemně rozmělněna a přelita 10 ml metanolu. Vialky byly umístěny do ultrazvukového sonikátoru a sonikovány 20 minut. Následně byly vialky ponechány přes noc při pokojové teplotě a následující den byl extrakt použit pro analýzu.

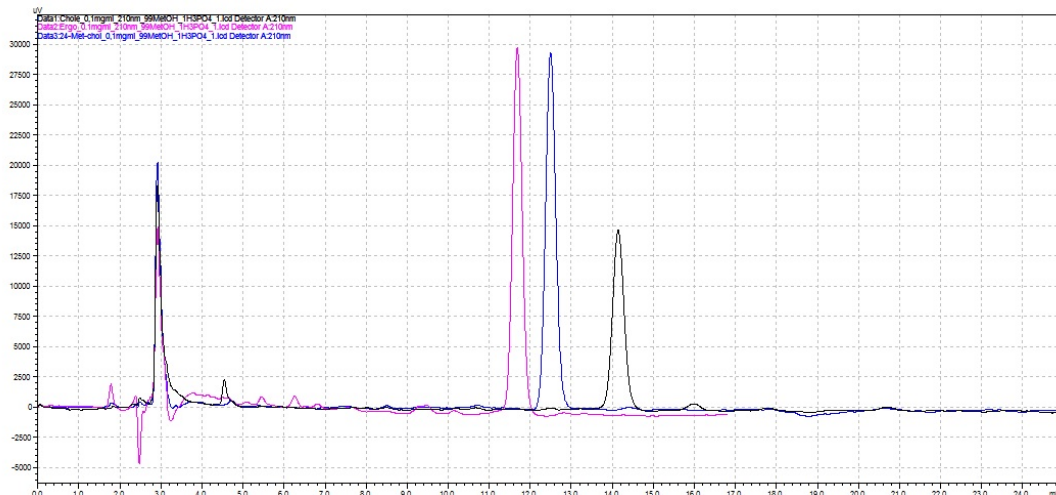
### **HPLC analýza ergosterolu:**

Příprava kalibrační křivky: standardy sledovaných metabolitů – ergosterol, cholesterol a 24-methylencholesterol byly připraveny v koncentracích 0,01; 0,05; 0,1 a 0,5 mg/ml v metanolu.

Hrubé extrakty a standardy byly analyzovány na HPLC chromatografu (Shimadzu, Nexera series) za následujících podmínek: typ kolony C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm; složení mobilní fáze a) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH3 b) metanol, v poměru a:b = 1:99 izokraticky; průtok 1 ml/min; nástřik 10 µl a celkový čas analýzy 20 minut. Detekce všech metabolitů probíhala při vlnové délce 210 nm na UV-VIS detektoru. Vyhodnocení chromatogramů bylo provedeno pomocí programu LabSolutions (Shimadzu). Koncentrace ergosterolu byla vypočtena dle plochy píku standardu.

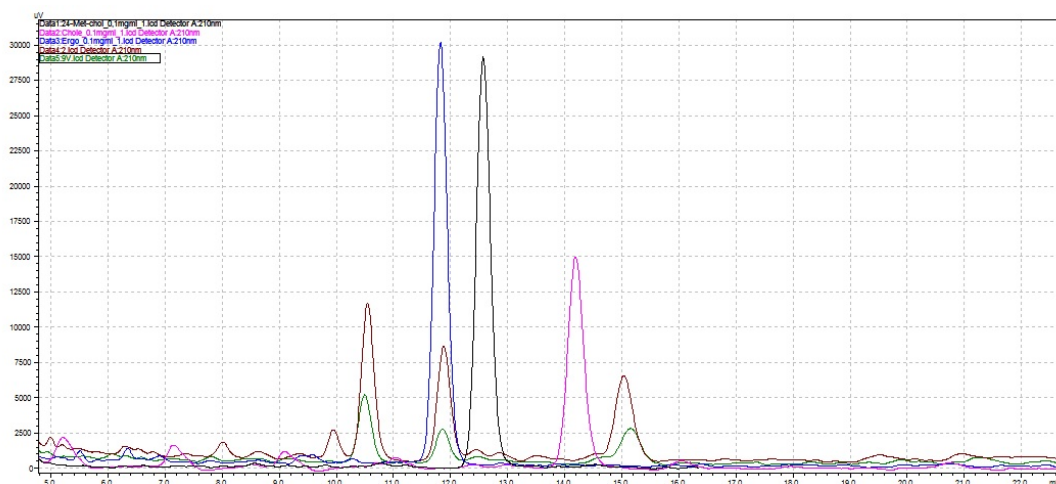
### **Příklad výstupů HPLC analýzy:**

Retenční časy (RT) jednotlivých metabolitů byly cca 11,8 minut pro ergosterol, cca 12,5 minut pro 24-methylencholesterol a cca 14,2 minut pro cholesterol. Chromatogram se standardy o koncentraci 0,1 mg/ml je na následujícím obrázku.



Chromatogram analýzy HPLC standardů o koncentraci 0,1 mg/ml: růžový pík – ergosterol, modrý pík – 24-methylencholesterol, černý pík – cholesterol.

Na následujícím obrázku je chromatogram se standardy měřených metabolitů v porovnání se zástupci nejlepšího producenta *Z. rouxii* (hnědá křivka) a producenta s nejnižšími hodnotami ergosterolu (zelená křivka).



Jak je z chromatogramu patrné, jediným z analyzovaných metabolitů, který byl v kvasinkách nalezen, byl ergosterol. Cholesterol ani 24-methylencholesterol naměřeny nebyly. Ostatní píky naznačují přítomnost jiných metabolitů, které však nebyly identifikovány.

## **Srovnání novosti postupů**

Předkládanou metodiku s názvem “ Metodika přípravy krmiva pro včely s přidavkem induktorů imunitní reakce“ lze hodnotit jako novou metodiku, neboť v současné době není k dispozici ucelená metodika a dosud dostupné informace o vlivu fytoosterolů, kyseliny p-kumarové či ergosterolu jsou jen dílčí a rozptýlené ve vědeckých publikacích, které se zabývají problematikou vlivu biologicky aktivních látek na včely, interakce těchto látek s xenobiotiky a problematiky změn v genové expresi genů pro detoxikační enzymy včel. Komplexní metodický postup přípravy obohaceného krmiva k dispozici není.

Řada fotochemikálií, včetně kyseliny p-kumarové ovlivňuje expresi genů spojených s imunitou a rezistencí vůči xenobiotikům. Schopnost těchto látek indukovat expresi genů kódujících detoxikační a imunitní enzymy zřejmě umožňuje včelám rychle reagovat na xenobiotika a další stresory, s kterými se setkává, a zčásti tak kompenzovat redukované množství těchto genů v genomu. Pestrá včelí strava, její různorodost a nutriční vyváženost je základním předpokladem pro produktivní včelstvo, odolné vůči stresovým faktorům. Přidávání fytochemikálií do cukerné stravy by tak mohl být jedním ze způsobů, jak posílit zdravotní stav včelstev.

Předkládaná metodika pak popisuje význam fotochemikálií, význam pestré přirozené včelí stravy, důvody vedoucí k myšlence obohacování včelího krmiva na bázi invertního cukru o tyto biologicky aktivní látky. Metodika uvádí i postup přípravy obohaceného krmiva a analytické metody pro detekci aditiv v krmivu, tak aby byla možná kontrola – verifikace deklarovaného množství aditiva v krmivu, hodnocení homogenity připraveného krmiva a jeho stability.

## **Popis uplatnění metodiky**

Využití metodiky pro přípravu krmiva pro včely s přidavkem induktorů imunitní reakce je možné na pracovištích/provozech, které se zabývají výrobou a distribucí cukerných krmiv včetně invertního cukru pro včelaře. Metodika v první části zahrnuje teoretický úvod do problematiky. V praktické části jsou uvedeny postupy pro přípravu obohaceného krmiva a hodnocení množství aditiv v krmivu včetně ukázek vzorových analýz.

Uživatelé metodiky jsou výrobci a distributoři krmiv pro včely a včelaři. Metodika bude uplatněna prostřednictvím firmy LockBohemia, předního výrobce invertních cukrů. S tímto subjektem byla uzavřena smlouva o uplatnění metodiky.

## **Ekonomické aspekty**

Postupy uvedené v této metodice mají značný ekonomický význam z pohledu významu včel jako opylovatelů a producenta včelích produktů. Nedokonalá či absentující schopnost detoxifikace xenobiotik se projevuje i jejich vyšší toxicitou vedoucí k oslabení či úhynu včelstva. Tato problematika je samozřejmě daleko komplexnější, významným faktorem je pestrá výživa včel, stresory působící na včelstva, nenarušený střevní mikrobiom a přítomnost prospěšných mikroorganismů v přirozeném prostředí včel a potravě. Nedostatky ve výživě včel se snaží suplementovat tato metodika, kdy krmivo obohacené o látky běžně se vyskytující v přirozené potravě může napomoci vyrovnat jejich absenci v uměle dodávaném pouze cukerném krmivu.

Pomocí tohoto metodického postupu lze dodat včelám látky chybějící ve včelím krmivu a látky přítomné jako aditiva pozitivně ovlivňují expresi genů pro detoxifikační enzymy a aktivitu detoxifikačních enzymů. Metodický postup rovněž obsahuje návody a postupy pro analytiku a stanovení množství aditiv v připraveném krmivu. Cena obohaceného krmiva představuje navýšení ceny za 15 kg krmiva – dávky na jedno včelstvo o cca 450 Kč. V širším kontextu ale použití obohaceného krmiva může vést k stimulaci detoxifikačních enzymů, schopnosti včel detoxifikovat xenobiotika, omezení jejich negativního vlivu a vitální včelstva pak mohou poskytovat své nedocenitelné ekosystémové služby.

## Seznam publikací předcházející metodice

- Hýbl M., Mráz P., Šipoš J., Hoštičková I., Bohatá A., Čurn V., Kopec T. (2021): Polyphenols as Food Supplement Improved Food Consumption and Longevity of Honey Bees (*Apis mellifera*) Intoxicated by Pesticide Thiacloprid. *Insects* 12: 572.
- Rost M., Beneš K., Hoštičková I., Žáková H., Javůrková P., Zahradník V., Čurn V., 2022. Obohacování krmiv pro včely o induktory imunitní reakce. *Úroda* 12, roč. LXIX, 2022, vědecká příloha, s. 387-394. ISSN 0139-6013.

## Seznam použité literatury

- Bayram N.E., Gercek Y.C., Çelik S., Mayda N., Kostić A.Ž., Dramićanin A.M., Özkök A. (2021): Phenolic and free amino acid profiles of bee bread and bee pollen with the same botanical origin-similarities and differences. *Arab. J. Chem.* 14: 103004.
- Brodschneider R., Crailsheim K. (2010): Nutrition and health in honey bees. *Apidologie* 41: 278–294.
- Degrandi-Hoffman G., Wardell G., Ahumana-Segura F., Rinderer T., Danka R., Pettis J. (2008): Comparisons of pollen substitute diets for honey bees: consumption rates by colonies and effects on brood and adult populations. *J Apic Res Bee World* 47: 265–270.
- Dharampal P. S., Carlson C., Currie C. R., Steffan S. A. (2019): Pollen-borne microbes shape bee fitness. *Proc R Soc B* 286: 20182894.
- Evans E., Smart M., Cariveau D., Spivak M. (2018): Wild, native bees and managed honey bees benefit from similar agricultural land uses. *Agric Ecosyst Environ* 268: 162–170.
- Geetha N.P., Mahesh M., Bettadaiah B.K., Kini R.K., Prakash H.S. (2011): HPLC Method for Determination of p-coumaric acid from the Medicinal Herb *Leptadina reticulata*. *International Journal of Phytomedicine* 3: 319–324.
- Gong Y., Diao Q. (2017): Current knowledge of detoxification mechanisms of xenobiotic in honey bees. *Ecotoxicology* 26: 1–12.
- Hardstone M. C., Scott J. G. (2010). Is *Apis mellifera* more sensitive to insecticides than other insects? *Pest Manag Sci* 66: 1171–1180.
- Hýbl M., Mráz P., Šipoš J., Hoštičková I., Bohatá A., Čurn V., Kopec T. (2021): Polyphenols as Food Supplement Improved Food Consumption and Longevity of Honey Bees (*Apis mellifera*) Intoxicated by Pesticide Thiacloprid. *Insects* 12: 572.
- Isidorov V., Isidorova A., Szczepaniak L., Lazarek U. (2009): Gas chromatographic–mass spectrometric investigation of the chemical composition of beebread. *Food Chem* 115: 1056–1063.
- Javůrková P. (2021): Morfologická a molekulární charakterizace kvasinek rodu *Zygosaccharomyces* asociovaných se včelami. Diplomová práce, ZF JU.

- Johnson R.M., Mao W., Pollock H.S., Niu G., Schuler M.A., May R. (2012): Ecologically Appropriate Xenobiotics Induce Cytochrome P450s in *Apis mellifera*. *PLoS One* 7: 1–9.
- Liao L.-H., Wu W.-Y., Berenbaum M.R. (2017): Impacts of dietary phytochemicals in the presence and absence of pesticides on longevity of honey bees (*Apis mellifera*). *Insects* 8: 1–13.
- Mao W., Schuler M.A., Berenbaum M.R. (2013): Honey constituents up-regulate detoxification and immunity genes in the western honey bee *Apis mellifera*. *Proc Natl Acad Sci* 110: 8842–8846.
- Mao W., Schuler M.A., Berenbaum M.R. (2015): Task-related differential expression of four cytochrome P450 genes in honeybee appendages. *Insect Mol Biol* 24: 582–588.
- Mitton G., Szawarski N., Mitton F., Iglesias A., Eguaras M., Ruffinengo S., Maggi M. (2019): Impacts of dietary supplementation with p-coumaric acid and indole-3-acetic acid on survival and biochemical response of honey bees treated with tau-fluvalinate. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 189: 109917.
- Palmer-Young E. C., Tozkar C. O., Schwarz R. S., et al. (2017): Nectar and pollen phytochemicals stimulate honey bee (Hymenoptera: Apidae) immunity to viral infection. *J Econ Entomol* 110: 1959–1972.
- Paludo C.R., Menezes C., Silva-Junior E.A. (2018): Stingless Bee Larvae Require Fungal Steroid to Pupate. *Sci Rep* 8: 1122.
- Paludo C. R., Pishchany G., Andrade-Dominguez A., Silva-Junior E. A., Menezes C., Nascimento F. S., Currie C. R., Kolter R., Clardy J., Pupo M. T. (2019): Microbial community modulates growth of symbiotic fungus required for stingless bee metamorphosis. *PLoS ONE* 14: e0219696.
- Raymann K., Moran N. A. (2018): The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. *Current Opinion in Insect Science* 26: 97–104.
- Vočadlova K., Rost M., Čurn V. (2020): Ztráta přirozeného prostředí a nedostatečná výživa včel – možné příčiny ovlivňující schopnost detoxikace xenobiotik a úhyny včelstev. *Veterinářství* 70:486-489.
- Wheeler M. M., ROBINSON G. E. (2014): Diet-dependent gene expression in honey bees: honey vs. sucrose or high fructose corn syrup. *Sci Rep* 4: 5726.
- Wink M. (2018): Plant secondary metabolites modulate insect behavior-steps toward addiction? *Front Physiol* 9: 1–9.



Název: Beneš K. a kol. (2023): Metodika přípravy krmiva pro včely s  
přídavkem induktorů imunitní reakce

Autorský kolektiv: Ing. Karel Beneš, Ph.D.  
Ing. Pavel Beran, Ph.D.  
Ing. Dagmar Stehlíková, Ph.D.  
doc. Ing. Michael Rost, Ph.D.  
prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Vydal: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Fakulta zemědělská a technologická  
Studentská 1668  
370 05 České Budějovice

Vydáno bez jazykové úpravy

Metodika je dostupná na:  
<http://biocentrum.zf.jcu.cz/docs/lab/Methodiky>

Metodika byla schválena na základě Osvědčení SVS/2024/023344-G, jako  
uplatněná metodika s doporučením pro její využití v zemědělské praxi.

Kontakt na autory: [curn@fzt.jcu.cz](mailto:curn@fzt.jcu.cz)

ISBN: 978-80-7694-042-0

ISBN 978-80-7694-042-0



9 788076 940420