

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

**Vliv pesticidových intoxikací na hladinu adipokinetického
hormonu u včely medonosné**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: Jana Baboučková

Vedoucí práce: RNDr. Radmila Čapková Frydrychová, Ph.D.

Školitel specialista: Ing. Petra Urajová, Ph.D.

Rok a místo vydání: České Budějovice, 2022

Baboučková, J., 2022: Vliv pesticidových intoxikací na hladinu adipokinetického hormonu u včely medonosné. [The effect of pesticide intoxication on adipokinetic hormone levels in the honey bee. Bachelor thesis, in Czech] – 25. p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

ANNOTATION

The aim of this bachelor thesis was to characterize the effect of the pesticides thiacloprid (a neonicotinoid insecticide) and Bt toxin (Cry toxin) on adipokinetic hormone (AKH) levels in the central nervous system of worker honey bees (*Apis mellifera* L.) and to determine whether AKH can be used as a marker for pesticide intoxication in honey bees. The results showed that AKH levels are increased after administration of high and very low doses, and this suggests that AKH indeed has application potential for e.g. veterinary government, agriculture, etc.

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně, pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použité literatury.

V Českých Budějovicích, dne 8. 12. 2022

.....

Jana Baboučková

PODĚKOVÁNÍ

V první řadě bych chtěla poděkovat mé školitelce RNDr. Radmile Čapkové Frydrychové, Ph.D., za odbornou pomoc a poskytnutí laboratoře a materiálu pro uskutečnění pokusů. Stejně tak Ing. Petře Urajové, Ph.D., za vedení a spolupráci v mikrobiologické laboratoři Centrum ALGATECH v Třeboni. Další velké díky patří laboratoři Fyziologie hmyzu ENTÚ, obzvlášť paní Ing. Heleně Štěrbové, za všechnu poskytnutou pomoc a cenné rady. Speciální díky však patří RNDr. Michale Sábové, Ph.D., za pečlivé seznámení s laboratorní prací, vytvoření přátelského pracovního prostředí, a hlavně za její trpělivost a ochotu. V neposlední řadě bych chtěla vyjádřit velké díky své rodině a kamarádům, za nepolevující podporu po celou dobu mého studia, výhradně v posledních měsících.

OBSAH

1	ÚVOD	1
1.1	Včela medonosná	1
1.1.1	Základní informace	1
1.1.2	Význam včel	1
1.2	Pesticidy	2
1.2.1	Insekticidy	3
1.3	Stres a antistresová reakce	5
1.3.1	Adipokinetický hormon u hmyzu	6
2	CÍLE PRÁCE	8
3	MATERIÁLY A METODIKA	9
3.1	Chov	9
3.2	Aplikace pesticidu, vyhodnocení behaviorálních změn a mortality	9
3.2.1	Koncentrace testovaných pesticidů	9
3.3	Pitva mozku	10
3.4	Stanovení hladiny AKH v CNS pomocí ELISA	10
3.5	Stanovení dávek pesticidu v pokusných vzorcích	11
3.6	Statistické zpracování výsledků	12
4	VÝSLEDKY	13
4.1	Analýza účinku thiaklopridu	13
4.1.1	Behaviorální změny a mortalita včel	13
4.1.2	Stanovení dávek thiaklopridu v pokusných vzorcích	13
4.1.3	Hladiny AKH v CNS	14
4.2	Analýza účinku Bt toxinu	15
4.2.1	Behaviorální změny a mortalita včel	15
4.2.2	Hladiny AKH v CNS	15
5	DISKUZE	17
6	ZÁVĚR	19
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	20

1 ÚVOD

1.1 Včela medonosná

1.1.1 Základní informace

Včela medonosná (*Apis mellifera* L.) patří mezi nejznámější zástupce společenského hmyzu. Rod *Apis* je řazen mezi blanokřídly hmyz (*Hymenoptera*) a spadá do čeledi včelovití (*Apidae*) (Veselý, 2013). Charakteristickým znakem všech včel je jejich eusocialita, s výjimkou včel samotárek. Za eusociální hmyz označujeme ty druhy, které žijí ve společenstvu a tvoří kolonie s reprodukční a nereprodukční kastou (Wilson, 1971). Reprodukční, neboli královská kasta, je tvořena královnou a králem, jako tomu je např. u termitů, nebo samotnou královnou, jako tomu je u včel, čmeláků nebo vos. Nereprodukční, neboli dělnickou kastu, tvoří dělnice, které v kolonii zastávají různé funkce podle jejich stáří – péče o potomstvo, úklid kolonie, obrana, shánění potravy. Ve společenstvu jsou přítomny alespoň dvě generace, které se překrývají, a kolonie je také sofistikovaně organizována. Každý jedinec efektivně vykonává svou práci, jako je např. péče o plod a larvy, zajišťování potravy, ochrana před predátory, výstavba a péče o úl. Tím zajišťuje plynulý chod a optimální podmínky pro celou kolonii (Canciani et al., 2019; Beshers a Fewell & Fewell, 2001).

1.1.2 Význam včel

Včely jsou známé pro svou produkci biologicky nezastupitelných surovin, jako je med, vosk, propolis, mateří kašička včelí jed, využívané hojně člověkem nejen v potravinářství, ale i pro své léčebné účinky. V některých kulturách představují včelí larvy nebo trubčí kukly chutné pokrmy (Nepraš, 1971; Titěra, 2013). Jejich hlavním významem je však úloha opylovačů (Ammar et al., 2019). Některé rostliny jsou opylovány pomocí větru a jiných abiotických činitelů, větší část rostlin je ale hmyzosnubná, a to až 80–90 % druhů. Z toho mají včely 95% zásluhu, zbytek pokryjí čmeláci, samotářské včely a jiný příležitostně opylující hmyz. U zemědělských plodin, jako je řepka olejná, jeteloviny, jako např. bob obecný a ovocné stromy, jsou díky včelám zaznamenány vyšší výnosy dokonce až od 30-50 %, oproti plodinám včelami neopylenými (Veselý, 2013). Nehledě na zisky z kulturních plodin, včely opylují i volně rostoucí entomogamní rostliny, čímž přispívají k udržení stability v přírodě a ochraně životního prostředí. Částečným nebo nedokonalým opylením může dojít, v daném území, k vymizení druhu ve prospěch například větrosnubné rostliny (Veselý, 2013). Pro člověka neméně významným odvětvím je včelaření, zájmová činnost lidí se zaběhlými tradicemi napříč generacemi, jejíž cílem je snaha o udržení populací včel. (Veselý, 2013). Včely a další opylující

hmyz v mnoha částech světa markantně ubývá a jsou na pokraji vyhynutí, a to v důsledku kombinovaných vlivů, jako je ztráta jejich přirozených stanovišť, intenzivní zemědělské postupy, monokultury, nadměrné využívání zemědělských chemikálií a změny klimatu, což má za následek ovlivnění nejen celkového výnosu plodin, ale také výživy. Výživné plodiny, jako je zelenina, ovoce či ořechy, budou v budoucnu nahrazovány základními potravinami jako je rýže, brambory a kukuřice, a to bude moci vést k nevyvážené stravě (Ammar, 2019). Podle slov generálního ředitele FAO Josého Grazziana de Silva, by nepřítomnost včel a jiných opylovačů mělo mít za následek vymizení například kávy, jablka, mandlí, rajčat a kakaa a mnoho dalších, které jsou závislé na opylení.

1.2 Pesticidy

Nepřímé dopady toxických látek na organismy jsou popisovány jako účinky zprostředkované přímými dopady na jiné druhy nebo prostředí. Lze je tedy považovat za účinky ekologické podstaty, kde přežití druhů závisí na komplikovaných interakcích zahrnujících trofické vztahy a neustálý boj o zdroje (Bernhardt et al., 2017).

Pesticidy jsou chemické sloučeniny, které se používají k hubení škůdců, včetně hmyzu, hlodavců, hub a nežádoucích rostlin (plevelů), (WHO, 2020). Většina těchto chemikálií slouží k tomu, aby narušila základní fyziologické aktivity cílového organismu (Bernhardt et al., 2017). Pesticidy působí dvěma způsoby, a to buď kontaktně, kdy chemikálie zůstává na povrchu rostliny nebo škůdce, nebo systémově. Kontaktní pesticidy působí tedy jen tam, kde byl pesticid aplikován. Naopak u systémových pesticidů, kdy dochází ke vstřebávání chemické látky do pletiva a tkáně rostliny (Cremllyn, 1985). Pesticid tedy může působit i na místech, na kterých rostlina nebyla přímo ošetřena. Systémové pesticidy jsou proto efektivnější variantou, a to i z hlediska působení přírodních vlivů. Nemohou být totiž spláchnuty srážkami nebo odneseny větrem (Cremllyn, 1985). Pesticidy se podle biologického účinku rozdělují na dvě základní skupiny, a to biocidy a přípravky na ochranu rostlin (POR), (Dvoržáková, 2020). Biocidy jsou látky či směsi určené k hubení, potlačení nebo odpuzování organismů. Účinným faktorem biocidů jsou nejen různé chemické látky, ale také toxiny produkované mikroorganismy. Za přípravky na ochranu rostlin jsou považovány veškeré pesticidní látky, které se používají k hubení a kontrole počtu škůdců, plevelů a různých chorob. Jedná se o různé chemické přípravky, feromony, repelenty, preparáty obsahující živé mikroorganismy, různé výtažky z bylin, ale i látky používané v potravinářství, jako je alkohol, ocet nebo jedlá soda (Hajšlová et al., 2005; Dvoržáková, 2020; EPA, 2022). Přípravky na ochranu rostlin jsou dále často děleny do různých skupin podle toho, jak a proti kterým organismům působí. Například herbicidy jsou

používány k potlačení plevelů nebo invazních rostlin, fungicidy působí proti houbám a zoocidy, proti živočišným škůdcům (EPA, 2022). Zoocidy se dále člení podle působení na jednotlivé skupiny živočichů. Rodenticidy působící proti hlodavcům, akaricidy proti roztočům, nematocidy proti hádčákům, moluskocidy proti plžům a mlžům a insekticidy proti hmyzu (Cremlyn, 1985). Mezi POR spadají také různé regulátory růstu, inhibitory klíčení, desikanty, které způsobují vysušení, a repelenty (Hajšlová et al., 2005).

1.2.1 Insekticidy

Podle původu rozdělujeme insekticidy na přírodní a syntetické. Přírodní insekticidy, tzv. bioinsekticidy, jsou získávané z přírodního zdroje, kterým mohou být rostliny (nikotin, pyrethrin), horniny (křemelina) či mikroorganismy, jako například bakterie *Bacillus thuringiensis* (Bt). Jedná se o grampozitivní bakterii produkující insekticidní proteiny zvané Cry toxiny. Tyto toxiny jsou užitečné jednak díky jejich rozmanitosti a specifitě pro hmyz, a jednak díky tomu, že jsou pro člověka neškodné (Pardo-López et al., 2009). Bt toxiny jsou přípravky na hubení cílového hmyzu, jako jsou například motýli, dvoukřídlí nebo brouci (Fu et al., 2018). U hmyzu jsou po intoxikaci molekuly toxinu vstřebány ve střevě, a poté jsou proteolyticky aktivovány proteázami středního střeva, kde se vážou na specifické receptory umístěné v buněčné membráně. To vede k proděravění střeva, celkové iontové nerovnováze v haemocoelu, septikémii a buněčné lýzi končící smrtí jedince (Pardo-López et al., 2009). Syntetické insekticidy jsou chemicky vyrobené látky, které se v přírodě nevyskytují a můžeme je dále dělit podle jejich chemické povahy. Například organofosfáty, které jsou v zemědělství hojně využívány jako insekticidy s různou mírou toxicity. Jejich chemické vlastnosti jsou velmi podobné nervovému plynu, které dokáží nevratně inhibovat aktivitu acetylcholinesterázy (enzym nervového systému), což má za následek nadměrnou stimulaci a dysfunkci nervového systému živočichů (Georgiadis et al., 2018). Karbamáty jsou N- substituované estery kyseliny karbamové (Karachaliou, 2018), využívané hlavně jako insekticidy, ale i jako fungicidy a herbicidy. Jejich biochemické vlastnosti inhibují enzym acetylcholinesterázu a způsobují tak stejné příznaky jako organofosfáty. Rozdíl mezi těmito dvěma chemikáliemi je ten, že karbamáty mají účinek reverzibilní, a jsou tedy méně nebezpečné (David et al., 2017). Dalšími hojně využívanými insekticidy jsou syntetické pyretroidy, které tvoří asi 25 % všech světově používaných pesticidů (Johri et al., 1997). Na rozdíl od pyrethrinů, vyskytujících se přirozeně v extraktu některých květů chryzantém jako přírodní insekticidní látka, jsou pyretroidy synteticky vyráběné chemikálie. I když jsou si strukturou velmi podobné, mají často toxičtější následky jak pro savce, tak i pro hmyz. U savců po intoxikaci dochází ke ztrátě

vědomí, křečím či nevolnostem. U bezobratlých mají pyretroidy vliv na nervovou soustavu, zatímco u včel dochází k regurgitaci (vyvržení) nasbíraného obsahu střev (ATSDR, 2014). Dalšími jsou chlorované organické sloučeniny, synteticky vyráběné chemikálie používané po celém světě. Jsou známé hlavně díky své vysoké toxicitě, pomalé degradaci a biokumulaci. U savců dochází k narušení endokrinního systému (Sohail et al., 2004). U včel dochází ke ztrátě aktivity, padání na záda, mávání křídly a abnormálním vratkým pohybům (ATSDR, 2014). Další velkou skupinou insekticidů jsou neonikotinoidní insekticidy, do kterých patří například imidakloprid, clothianidin, thiamethoxam, acetamiprid a thiakloprid. Neonikotinoidy jsou nejvýznamnější chemické látky v ochraně plodin. Jsou to přípravky, které ovlivňují nervový systém hmyzu, u něhož následně dochází k paralýze a smrti (Elbert et al., 2008). Stejně tak, jako u všech pesticidních látek se rezidua shromažďují v pylu a nektaru ošetřených rostlin a jsou rizikem pro všechny opylovače. V tomto důsledku existují domněnky, že právě neonikotinoidy hrají hlavní roli při markantním úbytku opylovačů. (Elbert et al., 2008). Patří mezi systémové insekticidy, které působí selektivně na vybrané škůdce. Tím mají relativně nízké riziko pro necílové savčí organismy a životní prostředí (Cresswell, 2011). Neonikotinoidy působí na postsynaptické acetylcholinové receptory (nAChR), které se nachází u hmyzu i u savců v několika typech. U hmyzu se tyto receptory nachází v centrální nervové soustavě, u savců v mozku, kosterním svalstvu, míše a autonomních gangliích. Toxicita neonikotinoidních insekticidů se u hmyzu a obratlovců liší díky rozdílné senzitivitě různých podtypů nAChR hmyzu a savců (Grupta et al., 2019).

V posledních letech se celý svět, a hlavně rozvojové státy, staly na pesticidech velmi závislými, jelikož díky nim vzrostl výnos a kvalita zemědělské produkce. Dnes se používají až na 95 % zemědělské půdy (Hajšlová et al., 2005) a jejich globální spotřeba od roku 1990 do roku 2020 stabilně rostla. K roku 2020 se spotřeba vyšplhala až na téměř 2,7 miliónu metrických tun, což je oproti roku 1990 nárůst až o 57 % (Fernández, 2022).

U pesticidů aplikovaných v současnosti je však snaha vyvíjet látky, jako právě organofosfátové sloučeniny, syntetické pyrethroidy, karbamáty a další, které se tolik nekumulují v prostředí a měly by mít lepší odbouratelnost (Hajšlová & Kocourek, 2007; Rezende-Teixeira et al., 2022). To ale neznamena, že nenesou žádná rizika. Problémem zůstává jejich nadměrné používání, které zatěžuje i ty organismy, na které tyto pesticidy nejsou aplikovány cíleně a narušují jejich fyziologické procesy. Z míst použití se uvolňují do celé biosféry, počínaje půdou, přes vzduch, vodu, ale i do rostlin a živočichů, včetně člověka (Dvoržáková, 2020). Kvůli významným rizikům, která mohou pesticidy představovat, je již

dnes jejich používání přísně kontrolováno. Požadavky na státy i v Evropské unii, se však liší v závislosti na jejich podnebí, kultuře, ale především na jejich společenské a vědecko-technické vyspělosti. Vyspělejší státy mají přísnější pravidla, kontroly a případně tvrdší sankce, než státy rozvojové (Handford et al., 2015). Pro povolení používání účinné látky má EU sedm hlavních oblastí, které kontroluje. Jedná se o fyzikální a chemické vlastnosti preparátu a postupy k jeho identifikaci, účinnost přípravku a jeho nepříznivé působení na ošetřené plodiny, rozklad a chování v životním prostředí, dopad na volně žijící, tedy necílové organismy, přímé vlivy na zdraví lidí a riziko pro spotřebitele ošetřovaných plodin (Dvoržáková, 2020). Ačkoli se chemikálie musí aplikovat podle předepsaných zásad tzv. správné zemědělské praxe (GAP) může dojít ke kontaminaci životního prostředí či k zasažení necílového organismu. Při ošetření ovocných stromků je odhadem využito jen 65 % postřiku, zbylých 35 % dopadne na zem nebo se už při aplikaci odpaří do atmosféry. Vše samozřejmě závisí na ekologických a meteorologických podmínkách (Bílková, 1985).

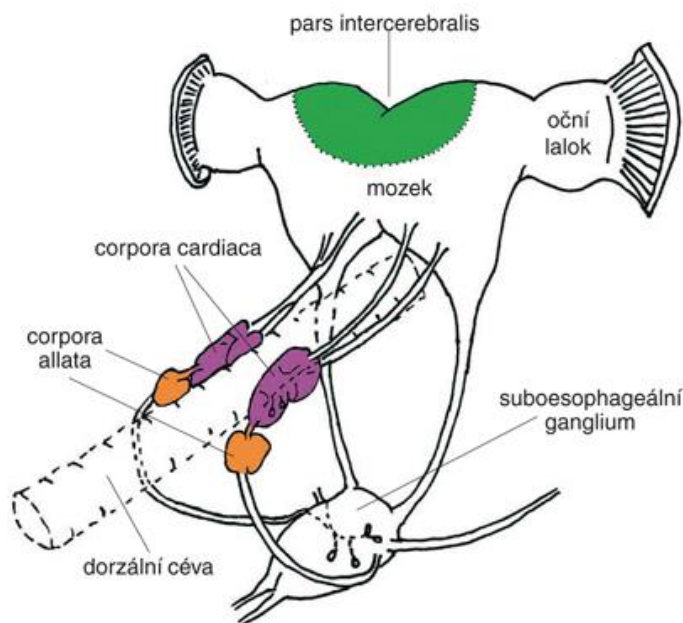
1.3 Stres a antistresová reakce

Stres je běžnou součástí života všech organismů. Během evoluce si však proti němu organismy dokázaly vytvořit obranné reakce, které umožňují dopad stresu odstranit nebo jej alespoň zmírnit (Hightower, 1991). Stres je stav narušení homeostázy, kterou je možno obnovit komplexním reparátorem fyziologických a behaviorálních adaptivních reakcí organismu (Chrousos, 2009). Za stresové faktory živočichů považujeme vlivy, jak vnější, tak vnitřní, které mohou být chemické, tj. medikamenty, pesticidy, kovy, smog, příliš vysoká koncentrace kyslíku, fyzikální, tj. teplota, zvuk, vibrace, záření, vítr a biologické, tj. parazité, choroby, poranění nebo predátoři (Hightower, 1991; Kodrík et al., 2015). Odezvou na působení těchto stresorů je právě antistresová reakce, která probíhá na několika úrovních, a to na molekulární, fyziologické, buněčné, ekologické a behaviorální (Adamo, 2012). Jde o velice ustálené reakce probíhající u většiny živočichů včetně nás lidí uniformě (Möstl & Palme, 2002). Podle toho, jak dlouho a v jakém množství stresový faktor na organismus působí, se u něj rozvíjejí různé fyziologické a patologické změny. Ty mohou vést k dočasnému nebo dlouhodobému porušení fyziologických mechanismů, někdy vedoucí až k úmrtí jedince (Yaribeygi et al., 2017). Tyto reakce jsou ovládány nervovou soustavou, která reaguje na stres okamžitě a endokrinní soustavou, která naopak funguje na základě vyplavování hormonů. Reakce endokrinní (hormonální) soustavy probíhají sice pomaleji, ale zato dlouhodobě v řádu minut až dnů (Hightower, 1991). U hmyzu se na antistresové reakci podílí nespočet procesů a kaskáda hormonů, mezi něž patří dopamin, oktopamin, allatostatin, corazonin nebo diuretický hormon.

Nejdůležitějším a nejznámějším hmyzím stresovým hormonem je adipokinetický hormon (Even et al., 2012).

1.3.1 Adipokinetický hormon u hmyzu

Adipokinetický hormon (AKH) se řadí do skupiny peptidických neurohormonů a je považován za nejdůležitější metabolický regulátore u hmyzu, (Even et al., 2012). Dnes je známo kolem 60 druhů adipokinetických hormonů. Jsou děleny do tzv. AKH/RPCH peptidických rodin (adipocinetic hormone/red pigment concentrating hormone family), které se mezi sebou liší především složením aminokyselin (Köllisch et al., 2000). Jedná se o peptidy skládající se z 8–10 aminokyselin, jejichž C konec je zakončen amidovou skupinou a na N konec kyselinou pyroglutamovou. K syntéze AKH dochází v endokrinní žláze *corpora cardiaca* (Obr. 1), což je párový neurohemální orgán, často přímo spojený s mozkem (Li et al., 2020). Z tohoto párového orgánu je AKH vyplavován do hemolymfy, která zaopatří jeho transport do cílových buněk nacházejících se většinou v tukovém tělese. Primární úlohou AKH je mobilizace energetických zásob, jako jsou lipidy a sacharidy z tukového tělesa hmyzu v situacích vysoké fyzické aktivity jako je let, aktivní pohyb či právě stres. Jelikož se ale jedná o hormony s tzv. pleiotropními účinky, zasahují i do mnoha dalších fyziologických reakcí, jako je zvyšování tlaku v hemolymfě, podpora činnosti srdce, pomoc při aktivaci imunitního systému nebo stimulaci pohybového aparátu (Kodrík, 2008; Marchal et al., 2018).



Obr. 1: Hmyzí mozek a vyznačená *corpora cardiaca* (Kodrík, 2014; kreslila H. Štěrbová).

1.3.1.1 AKH u včely medonosné

U včely medonosné je AKH jednoduchý peptid složený z devíti aminokyselin v pořadí pGlu–Leu–Thr–Phe–Thr–Ser–Ser–Trp–Gly–NH₂ (Marchal et al., 2018). Jeho přesná funkce ale není zcela známá. U některých poddruhů hraje úlohu v energetickém metabolismu (zvyšuje hladinu krevních cukrů v hemolymfě), u jiných tato funkce však zjištěna nebyla. Spekuluje se, zda včela má potřebu využívat AKH k mobilizaci energetických zdrojů, jelikož má, jak v úlu od včelaře nebo v přírodě, neustálý přístup k potravě a nedostává se tak do stresových situací. Tomu by odpovídala i velmi nízká hladina AKH, kterou včely přirozeně mají, oproti ostatním druhům hmyzu. U *A. mellifera* je známá jen jedna forma, značená jako Schgr-AKH-II. Kódové označení „II“ tato forma dostala, protože hormon byl jako první popsán u sarančete pustině (*Schistocerca gregaria*) s označením „I“ (Marchal et al., 2018)

2 CÍLE PRÁCE

Cílem této práce byla analýza změn hladiny adipokinetického hormonu u včely medonosné po aplikaci pesticidů, konkrétně thiaklopridu a Bt toxinu, a využitím toho následně určit, do jaké míry lze AKH využít jako marker intoxikací včel pesticidy.

3 MATERIÁLY A METODIKA

3.1 Chov

Včely pro pokusné účely byly získávány z včelnice Biologického centra AVČR v Českých Budějovicích. Jedná se o plemeno *Apis mellifera carnica*, tedy včela medonosná kraňská, u včelařů někdy nazývána jako „kraňka“, a patří mezi nejrozšířenější plemena včel v celé Evropě (Švamberský, 2000)

3.2 Aplikace pesticidu, vyhodnocení behaviorálních změn a mortality

Před aplikací pesticidu byly včely uspány pomocí oxidu uhličitého a poté rozprostřeny na led. Pesticidy byly podávány per os způsobem. Včely měly po dobu 24 hodin přístup k sacharózovému roztoku (50%) smíchaným s daným pesticidem. Poté byly včely ponechány na 24 hodin v tmavém inkubátoru při 37°C v ručně vyrobených kelímcích s dýchacími otvory, včelím voskem a s přístupem k vodě a potravě (Obr. 2). Po 24 hodinách byly u včel sledovány a zaznamenány jejich behaviorální změny a úmrtnost.



Obr. 2: Kelímek na včely po aplikaci pesticidu (Vlastní fotografie)

3.2.1 Koncentrace testovaných pesticidů

Pro thiakloprid byly použity dávky o koncentraci 5 000; 2 500; 1 000; 800; 700; 600; 500; 400; 250; 100; 50; 25; 12,5 a 6,25 ng/μl. Zásobní roztok o koncentraci 10 000 ng/μl byl získán smícháním komerčně vyráběného thiaklopridu (Sigma-Aldrich, kat.č. 37905) a acetonu.

Pro Bt toxin byly použity dávky o koncentraci 500; 250; 200; 100; 50; 25; 10; 1; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001 a 0,00001 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Valent Biosciences Corporation).

3.3 Pitva mozku

Jako první krok pitvy bylo odstříhnutí hlavičky pomocí malých nůžek. Hlava byla ponořena v ringerově roztoku na voskové destičce a pomocí pinzet došlo k otevření hlavové části. V následujícím kroku byl mozek, po kontrole přítomnosti endokrinního orgánu *corpora cardiaca*, pomocí pinzet celý vypreparován a vložen do mikrozkušavky (Eppendorf), obsahující 80% methanol. Zbytek těla byl zamražen na -80°C a využit k následným pokusům (viz kapitola 3.5).

3.4 Stanovení hladiny AKH v CNS pomocí ELISA

Reagencie a protilátky:

- Aplikační pufr (CB) – 0,1M bikarbonátový pufr (pH 9,6)
- Promývací pufr (WB^+) – 10 mM PBS (zásobní roztok $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , ředění na pracovní roztok 1:9 + 100 μl Tweenu 20 (Sigma-Aldrich) na 100 ml WB^+ (pH 7,5)
- 5% blokovací pufr – mléko Slim milk Powder (Sigma-Aldrich) – 1g na 20 ml WB
- ELISA substrát Sigma T444 (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine; Sigma-Aldrich, SLCG1025)
- 0,5 M kyselina sírová (PENTA, 20450-12500)
- Standard – Schgr – AKH II – 5 pmol/ μl (Pineda, Berlin, Německo)
- Primární protilátka: Rabbit anti-Schgr AKH-II antisérum (Pineda, Berlin, Německo), ředěna 1:5000
- Sekundární protilátka: Swine anti-rabbit IgG/HRP antibody (LabNet, LN0803235), ředěna 1:2000

Vypitvaný mozek, který byl již z pitvy naložen v 200 μl 80% methanolu, byl rozmělněn pomocí jehlového sonikátoru. Poté byl vzorek vložen do centrifugy (Eppendorf – Centrifuge 5424 R) na 5 minut při 10 000 g a 4°C . Po stočení byl odebrán supernatant do nové mikrozkušavky a tento proces byl za stejných podmínek zopakován. Oba supernatanty byly spojeny (400 μl) a vloženy přes noc do vakuové centrifugy (Concentrator 5301). Druhý den po

odpaření byly vzorky rozpuštěny ve 100 μ l CB a sonikovány pomocí vaničkového sonikátoru. Po této úpravě bylo možné vzorky již nanést na 96jamkovou destičku, kdy na každou destičku byl spolu se vzorky aplikován kontrolní vzorek (CB), pro pozdější kontrolu, kvůli případné kontaminaci, a vzorek o známé koncentraci adipokinetického hormonu (Schgr – AKH II) ředěný dvojkovou řadou s počáteční dávkou 5pmol/ μ l. Po ukončení aplikace do jamek byla destička zalepena folií a vložena na 24 hodin do tmy při 4°C .

Po 24 hodinách byla celá destička 3x promyta naředěným 200 μ l WB⁺ a pak byl do jamek nanesen blokovací pufr a destička byla inkubována 2 hodiny při 37°C. Po inkubaci byla destička opět 3x promyta WB⁺ (200 μ l) a do každé jamky nanesena primární protilátka (Rabbit – anti Schgr – AKH-II, ředěna 1:5000) o objemu 100 μ l. Následovala inkubace po dobu 1 hodiny při 37°C. Poté byla destička znovu 3x promyta roztokem WB⁺ (200 μ l) a byla nanesena sekundární protilátka (Swine anti-rabbit IgG/HRP, ředěna 1:2000), o objemu 100 μ l, s následnou inkubací po dobu 1 hodiny při 37°C a trojnásobnému promytí WB⁺ (200 μ l). Poté byl ke vzorkům na destičku nanesen substrát T444 (3 3'5 5'- tetramethylbenzidine), a kvůli fotosenzitivitě substrátu, byla destička zabalena do alobalu, a byla nechána v inkubátoru 40 minut při 37°C. Poté byla reakce zastavena pomocí 0,5 M kyseliny sírové. Hodnoty absorbance byly měřeny na ELISA čtečce při vlnové délce 450 nm.

3.5 Stanovení dávek pesticidu v pokusných vzorcích

Pro stanovení dávek thiaklopridu ve vzorcích byla použita metoda LCMS (liquid chromatography mass spektrometry). Ke stanovení Bt toxinu uvedenou metodu nebylo možno využít. Základem Bt toxinu jsou totiž Cry toxiny, které produkují bakterie *Bacillus thuringiensis*, a které tudíž nelze metodou LCMS (liquid chromatography mass spektrometry) detekovat a kvantifikovat.

Reagencie:

- 15%, 20%, 25%, 30% a 50% metanol (MeOH)

Jak již bylo zmíněno, po aplikaci insekticidů a následné pitvě mozků, byl zbytek včelího těla využit pro stanovení dávek insekticidu v pokusných vzorcích. Zbytky těl (bez hlav) musely být pro další pokus lyofilizované a následně zvážené. Poté byl každý vzorek zvlášť v mikrozkuřkách rozmělněn a po přidání 1 ml 70% metanolu rozmíchán na laboratorní třepačce. Poté byly vzorky vloženy do centrifugy na 5 minut o 13 400 otáčkách. Ze stočeného vzorku byl odebrán supernatant o objemu 750 μ l a k němu byly přidány 3 ml destilované vody.

Celý tento obsah byl důkladně promíchán a postupně umístěn do připravených kolonek (Supleco, Discovery DSC 18, 3 ml, 500 mg), které bylo předtím nutno aktivovat 100% metanolem a pročistit destilovanou vodou. Po přefiltrování vzorků byly kolonky opět promyty destilovanou vodou. Následně byly kolonky proplachovány metanolem v různých koncentracích. A to, následně 15%, 20%, 25% a 30% metanolem. Následně byly kolonky promyty dvakrát 50% MeOH a celý promytý obsah byl zachycen do kádinek, které byly umístěny pod kolonky. Následně byl z kádinek celý obsah přelit do srdcových baněk a po jedné vložen do vakuového odpařovače na 40°C. Po odpaření byly srdcové baňky vymyty 70% metanolem a obsah byl následně přenesen do skleněné mikrozkušavky. Následně byly vzorky analyzovány pomocí hmotnostního spektrometru Dionex UltiMate 3000 UHPLC.

3.6 Statistické zpracování výsledků

Ke zpracování výsledků a grafů byly použity programy GraphPad Software verze Prism 4 a Microsoft Excel 2013. V programu GraphPad Prism 4 byly pomocí standardních křivek přepočteny naměřené hodnoty. V tomto programu bylo provedeno i statistické vyhodnocení výsledků pomocí jednocestné ANOVY a Dunnetova post-testu.

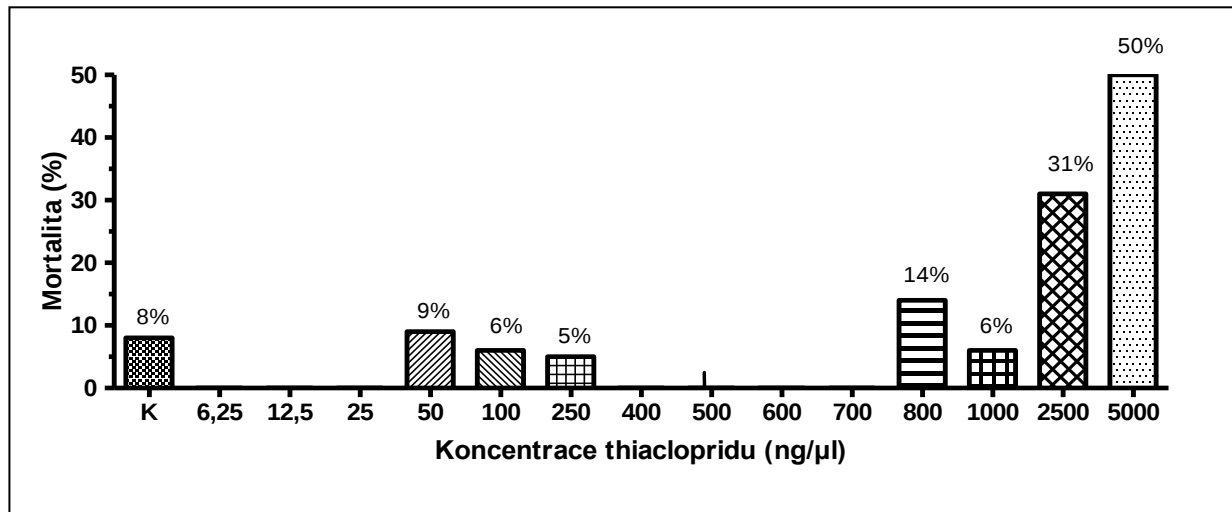
4 VÝSLEDKY

4.1 Analýza účinku thiaklopridu

4.1.1 Behaviorální změny a mortalita včel

Po 24 hodinách byly u včel pozorovány behaviorální změny. Behaviorální odezva k podanému thiaklopridu narůstala s jeho narůstající koncentrací. U vysokých koncentrací, tj. 500 až 5000 ng/μl, byly včely nadměrně aktivní, s výrazným třesem, případně katatonické. U středních koncentrací, tj. 50 až 400 ng/μl, docházelo k podobným projevům jako u vysokých koncentrací, jen s mírnějším průběhem. U velmi nízkých dávek, tj. 6,25 až 25 ng/μl, nebyly pozorovány téměř žádné změny, včely se mohly zdát zpomalenější, než tomu bylo u kontrolní skupiny, ale jinak bylo jejich chování srovnatelné.

Mortalita včel je vyobrazena v grafu (Obr. 3). U nízkých dávek thiaklopridu (6,25 do 100 ng/μl) byla mortalita pozorovaná spíše nahodile a nikdy nepřekračující cca 15%. Naproti tomu u velmi vysokých hodnot, tj. 2500 a 500 ng/μl, se míra mortality pohybuje v rozsahu 30% až 50%.

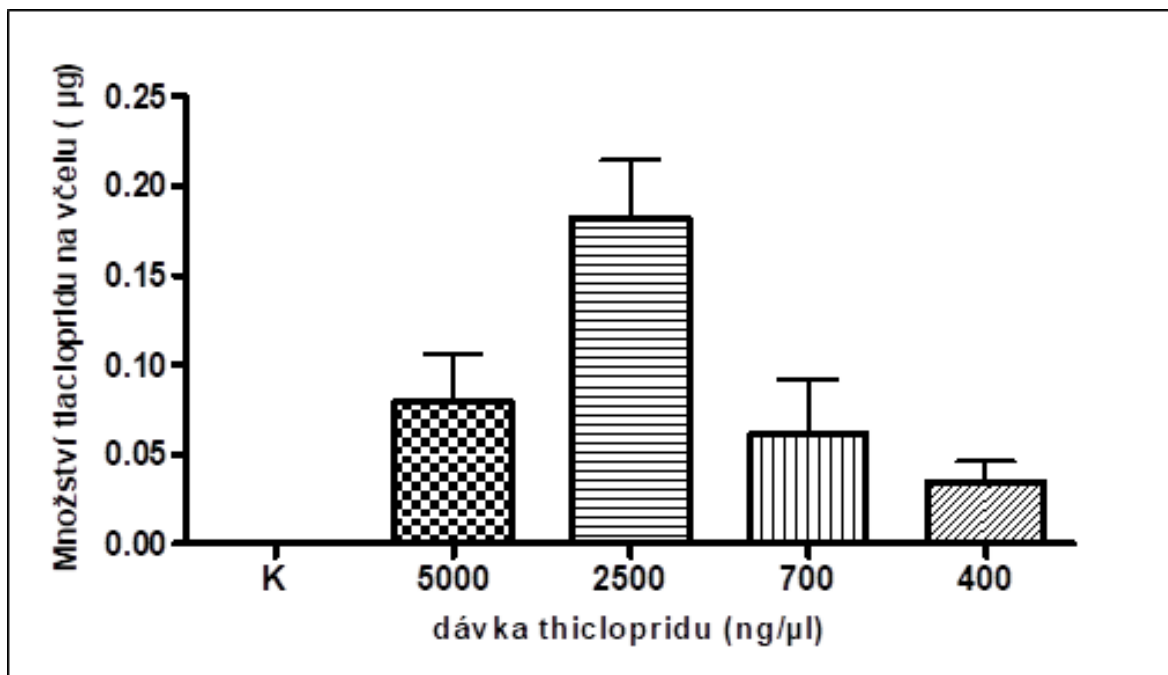


Obr. 3: Mortalita včel po aplikaci thiaklopridu

4.1.2 Stanovení dávek thiaklopridu v pokusných vzorcích

Dávky požitého thiaklopridu v tělech přeživších včel po intoxikaci byly následně ověřeny metodou LCMS (liquid chromatography mass spektrometry). Byly využity jedinci po aplikaci 5000, 2500, 700, 400 a 0 ng/μl thiaklopridu. S výjimkou koncentrace (tj. 2500 ng/μl) se v tělech jedinců zachycená dávka thiaklopridu proporcionálně, i když pouze

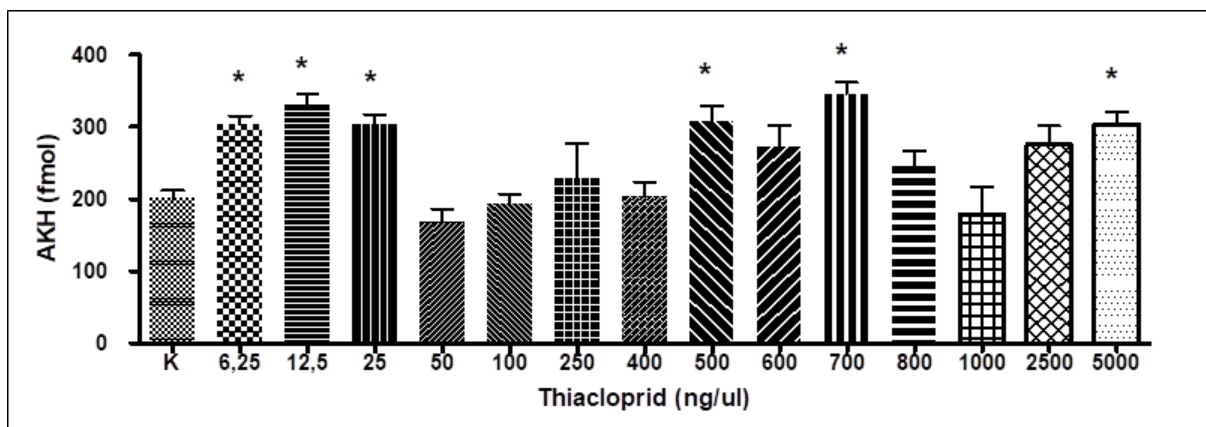
zhruba, snižovala se snižující se dávkou aplikovaného thiaklopridu (Obr. 4), tj. u 5000 ng/μl bylo naměřeno 0,080 μg; u 2500 ng/μl 0,180 μg; u 700 ng/μl 0,060 μg; u 400 ng/μl 0,034 μg.



Obr. 4: Stanovení dávky thiaklopridu v tělech intoxikovaných včelích vzorcích. Ke zpracování výsledků byla použita jednocestná ANOVA a Dunnettův post-test na 5% hladině významnosti (n=7-8).

4.1.3 Hladiny AKH v CNS

Hladina AKH byla stanovena pomocí metody ELISA, a to u přeživších jedinců jednotlivých pokusných vzorků. Pro vyhodnocení hladin AKH byly využity vypitvané mozky jedinců spolu s jejich *corporou cardiacou*. Získané výsledky prokázaly, že hladina AKH se zvyšuje po aplikaci nízkých nebo vysokých dávek thiaklopridu testované škály, tj. od 6,25 až 25 ng/μl nebo 500 až 5000 ng/μl. Byl přitom pozorován 1,5 až 1,7násobný nárůst, povětšinou se statistickou průkazností. Oproti tomu u středních dávek, tj. od 50 do 400 ng/μl nebyla ve srovnání s kontrolou změna pozorovaná (Obr. 5).



Obr. 5: Hladiny AKH po aplikaci thiaklopridu. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolní skupinou a testovanými skupinami byly vypočteny pomocí testu jednocestná ANOVA a Dunnetovým post-testem, při 5% hladině významnosti, a jsou označeny hvězdičkou; n=18-6

4.2 Analýza účinku Bt toxinu

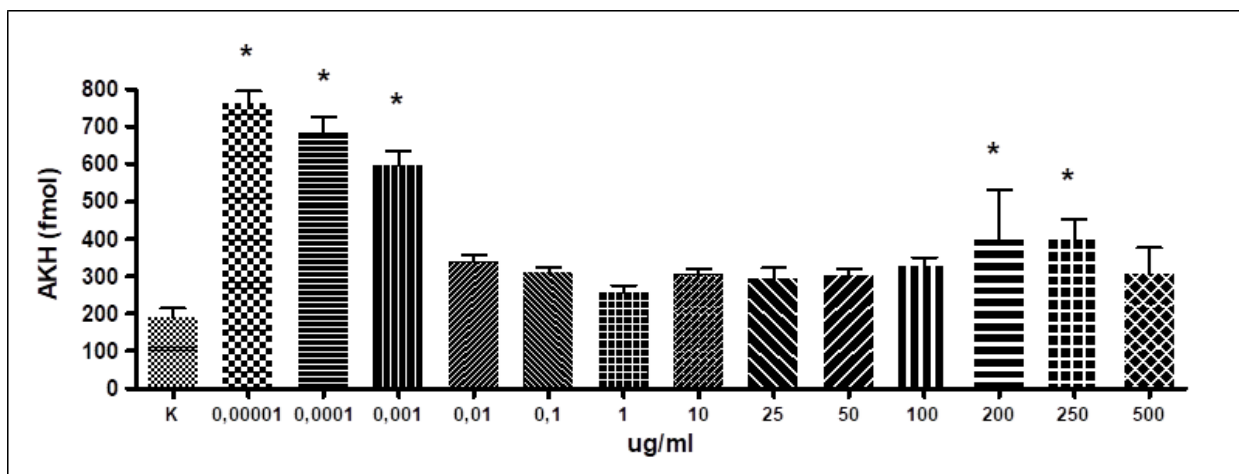
4.2.1 Behaviorální změny a mortalita včel

Stejně jako u thiaklopridu byly u včel pozorovány behaviorální změny po 24 hodinách od intoxikace Bt toxinem. U vysokých koncentrací (200 až 500 $\mu\text{g/ml}$) došlo u včel k podobné reakci, jako tomu bylo u thiaklopridu, tj. včely byly zrychlené, tremorické, ovšem bez pozorované katatonie. U středních koncentrací (0,01 až 100 $\mu\text{g/ml}$) docházelo u včel k nekoordinovaným pohybům a často zůstávaly bez pohybové aktivity na dně kelímku. U nízkých koncentrací (0,001 až 0,00001 $\mu\text{g/ml}$) byly včely zrychlené oproti kontrolní skupině, ale ne tolik, jako tomu bylo u vysokých dávek insekticidu, pohyby měly nekoordinované a zmatené.

Mortalita byla pozorována jen u koncentrace 0,01 $\mu\text{g/ml}$, a to 1 včela ze 7 testovaných.

4.2.2 Hladiny AKH v CNS

Hladina AKH byla stanovena, stejně jako u thiaklopridu, pomocí metody ELISA, a to u přeživších jedinců jednotlivých pokusných vzorků. Pro vyhodnocení hladin AKH byly využity vypitvané mozky jedinců spolu s jejich *corporou cardiacou*. Získané výsledky prokázaly (Obr. 6), že hladina AKH se zvyšuje po aplikaci nízkých nebo vysokých dávek Bt toxinu testované škály, tj. od 0,00001 až 0,001 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ nebo od 200 až 250 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Byl při tom pozorován 2 až 4násobný nárůst se statistickou průkazností. Střední koncentrace, tj. 0,1 až 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, vedly ke zvýšení hladiny AKH 1,3 až 1,8násobně, ovšem bez statistické průkaznosti (Obr. 6).



Obr. 6: Hladina AKH u intoxikovaných včel Bt toxinem. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolní skupinou a testovanými skupinami byly vypočteny pomocí testu jednocestná ANOVA a Dunnetovým post-testem, při 5% hladině významnosti a jsou označeny hvězdičkou; n=8-4.

5 DISKUZE

V této práci byla pozornost zaměřena na vliv pesticidních, konkrétně insekticidních, látek na hladinu AKH u včely medonosné (*Apis mellifera* L.), a zda lze využít adipokinetického hormonu jako jednoho z ukazatelů pro intoxikaci včel těmito chemickými látkami. Je totiž známo, že AKH u hmyzu zastává významnou roli ve stresových situacích (Kodrík et al., 2010). AKH byl studován na několika modelových organismech, a je třeba podotknout, že u každého reaguje na stresovou situaci jinak. Například po podání insekticidů u ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus*) se hladina AKH od kontrolní skupiny zvýšila (Kodrík & Socha, 2005), stejně tak tomu bylo u švába (*Periplaneta americana*) po ošetření včelím jedem (Bodláková et al., 2022). V další studii stoupla hladina AKH po aplikaci jedu vosičky lumčíka skladištního (*Habrobracon hebetor*) u švába amerického, a u dalšího přírodního toxinu, destruxinu A, byl výsledek stejný (Kabusová et al., 2019). Bylo zjištěno, že nedochází jen ke zvyšování hladiny, ale že stresové faktory mají na hladinu AKH i opačný efekt. Tj. například u ruměnici pospolné, kdy se hladina AKH naopak snížila, a to až 5krát oproti kontrole, kdy jednou možností poklesu mohlo být vyloučení AKH z CNS do hemolymfy (Broučková, 2020). Stejně došlo ke snížení hladiny AKH v CNS v případě včely medonosné (*Apis mellifera* L.) po aplikaci včelího jedu (Kainzová, 2021).

V mé práci došlo k prokazatelným nárůstům hladin AKH po intoxikaci oběma insekticidy, tj. thiaklopridu a Bt toxinu. U obou insekticidů byly naměřeny zvýšené hodnoty AKH po aplikaci vyšších koncentrací. Zajímavější jsou ale naměřené hodnoty u nízkých koncentrací podávaných insekticidů. U thiaklopridu se hladina u nižších koncentrací prokazatelně zvýšila, stejně jako u vysokých koncentrací. U nízkých koncentrací Bt toxinu se hladina AKH oproti kontrolní skupině prokazatelně zvýšila až 4krát. AKH by tedy mohl být efektivním markerem, jak pro intoxikace vysokými dávkami insekticidů, tak velmi nízkými dávkami insekticidů. Je třeba dodat, že intoxikace velmi nízkými dávkami insekticidů jsou prostým pohledem neidentifikovatelné, stejně tak nejsou zachytitelné ani běžnými biochemickými markery, jako je acetlycholinesteráza, hrající roli v nervosvalových a cholinergních synapsích (Boily et al., 2013), antioxidační enzymy glutathion S-transferáza a kataláza, tj. enzymy. Nevýhodou těchto markerů je ovšem jejich kolísající hladina v závislosti na věku jedinců (Shapira et al., 2001; Weirich et al., 2002; Yan et al., 2013). Dalším dosud používaným markerem je alkalická fosfatáza (ALP), zapojená do adsorpčních a transportních mechanismů prostřednictvím fosfátových skupin (Moss, 1992) či karboxylesterázy (CaEs), důležité

detoxikační enzymy, které jsou schopny hydrolyzovat esterové vazby za vzniku kyseliny a alkoholu jako metabolitů, významně se tedy podílejí na detoxikaci insekticidů (Ma et al., 2018). Výsledky ukazují, že všechny tyto biomarkery jsou velmi užitečnými a v kombinaci s AKH mohou být použity jako slibný nástroj pro charakterizaci expozice včel insekticidům (Decio et al., 2021).

Navzdory vysokým hladinám AKH u velmi nízkých koncentrací aplikovaných insekticidů, nebyly pozorovány žádné zásadní behaviorální změny ani mortalita. V tomto ohledu lze spekulovat o fungování adaptivní odezvy, tzv. hormeze, která je popisována jako nelineární dvoufázová reakce na určité množství fyzikálního, chemického nebo biologického činitele. Příliš vysoké a střední dávky látek mají na daný organismus tlumivé a toxické účinky, oproti tomu u nízkých dávek byly pozorovány účinky stimulační až prospěšné (Calabrese & Baldwin, 2003a). Jde o stav, kdy vystavení organismu subletálními dávkami stresoru, tedy dávkám nepostačujícím k usmrcení, se spustí adaptivní ochranné reakce pro následné vyšší dávky, které mohou organismus usmrtit (Mattson, 2008). Hormeze je studována u řady organismů ve spojitosti s imunitní odpovědí, různými metabolickými procesy, délkou života, atd. (Calabrese & Baldwin, 2003b; Calabrese, 2008), a byla pozorována po působení radiace (Macklis & Beresford, 1991), teplotního stresu, zánětlivými procesy (McClure et al., 2014; Le Bourg, 2015), nebo chemickými původci, jako jsou právě pesticidy (Duke et al., 2006). Mohli bychom tedy teoreticky uvažovat nad tím, že podávané velmi nízké chronické dávky pesticidů by mohly včely nějakým způsobem posílit, pokud bychom brali pouze koncept hormeze. V této úvaze musíme ale především zohlednit to, že včela je volně žijící živočich, na který má vliv spousta jiných negativních faktorů z okolního prostředí, které u včel celkově snižují jejich obranyschopnost. Včely jsou pod nátlakem chemických látek, které se jim chronicky ukládají nejen v organismu, ale například i v úlu (potrava, vosk, larvy), a mohou se tam kumulovat a tím narůstat jejich koncentrace (Pareja et al., 2011; Krupke et al., 2012). Proto, úvaha o hormeze, může být dále studována, ale z praktického hlediska o těchto výhodách, u včel konkrétně, prozatím mluvit asi nemůžeme.

6 ZÁVĚR

Tato práce ověřila, že hladiny AKH reagují na aplikaci pesticidů, konkrétně insekticidních přípravků thiaklopridu a Bt toxinu, a to na jejich nejen vysoké, ale i nízké dávky. Na základě těchto výsledků bylo potvrzeno, že lze AKH využít jako efektivní marker pro intoxikace pesticidy u včel.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Adamo, S. (2012). The effects of the stress response on immune function in invertebrates: An evolutionary perspective on an ancient connection. *Hormones and behavior*, 62(3), 324-330. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.02.012>

Ammar, D., Savinien, J., & Radisson, L. (2019). The makers' beehives: contemporary essays. *Proceedings of the 9th international conference on the internet of things*, 1-4. <https://doi.org/10.1145/3365871.3365887>

ATSDR. (2014). *ToxFAQs™ for pyrethrins and pyrethroids*. Agency for toxic substances and disease registry. Retrieved 2022-11-14, from <https://wwwn.cdc.gov/TSP/ToxFAQs/ToxFAQsDetails.aspx?faqid=786&toxid=153#>

Bernhardt, E., Rosi, E., & Gessner, M. (2017). Synthetic chemicals as agents of global change. *Frontiers in ecology and the environment*, 15(2), 84-90. <https://doi.org/10.1002/fee.1450>

Beshers a Fewell, S., & Fewell, J. (2001). *Models of division of labor in social insects*. Annual review of entomology. Retrieved 2022-11-14, from <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.ento.46.1.413>

Bílková, A. (1985). *Kontaminácia povrchových vod pesticidnými látkami*. Slovenská spoločnosť pre racionálnu výživu.

Bodláková, K., Černý, J., Štěrbová, H., Guráň, R., Zítka, O., & Kodrík, D. (2022). Insect body defence reactions against bee venom: Do adipokinetic hormones play a role?. *Toxins*, 14(1). <https://doi.org/10.3390/toxins14010011>

Boily, M., Sarrasin, B., DeBlois, C., Aras, P., & Chagnon, M. (2013). Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: laboratory and field experiments. *Environmental science and pollution research*, 20(8), 5603-5614. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1568-2>

Broučková, T. (2020). *Hmyzí antistresové reakce vůči přírodním toxinům* [Bakalářská práce]. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Přírodovědecká fakulta.

- Calabrese, E., & Baldwin, L. (2003a). The hormetic dose-response model is more common than the threshold model in toxicology. *Toxicological sciences*, 71(2), 246-250. <https://doi.org/10.1093/toxsci/71.2.246>
- Calabrese, E. (2004a). Hormesis: from marginalization to mainstream. *Toxicology and applied pharmacology*, 197(2), 125-136. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.02.007>
- Calabrese, E. (2008). Hormetic dose-response relationships in immunology: Occurrence, quantitative features of the dose response, mechanistic foundations, and clinical implications. *Critical reviews in toxicology*, 35(2-3), 89-295. <https://doi.org/10.1080/10408440590917044>
- Calabrese, E., & Baldwin, L. (2003b). Toxicology rethinks its central belief. *Nature*, 421(6924), 691-692. <https://doi.org/10.1038/421691a>
- Canciani, M., Arnellos, A., & Moreno, A. (2019). Revising the superorganism: An organizational approach to complex eusociality. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpsyg.2019.02653/full>
- Cremlyn, R. (1985). *Pesticidy* (1 ed.). SNTL Nakladatelství technické literatury.
- Cresswell, J. (2011). A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees. *Ecotoxicology*, 20(1), 149-157. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0566-0>
- David, S., Iliescu, D., Sandu, I., Paraschiv, D., & Teodorescu, C. (2017). Acute carbamate insecticide intoxication in forensic medicine, 1031-1034.
- Decio, P., Miotelo, L., Pereira, F., Roat, T., Marin-Morales, M., & Malaspina, O. (2021). Enzymatic responses in the head and midgut of africanized *Apis mellifera* contaminated with a sublethal concentration of thiamethoxam. *Ecotoxicology and environmental safety*, 223. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112581>
- Duke, S., Cedergreen, N., Velini, E., & Belz, R. (2006). Hormesis: is it an important factor in herbicide use and allelopathy?, (171, 29-33.
- Dvoržáková, M. (2020). *Fakta o pesticidech, aneb, co o nich asi nevíte...* (1 ed.). Potravinářská komora České republiky, Česká technologická platforma pro potraviny. https://eagri.cz/public/web/file/670604/Fakta_o_pesticidech.pdf

- Elbert, A., Haas, M., Springer, B., Thielert, W., & Nauen, R. (2008). Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest management science*, 64(11), 1099-1105. <https://doi.org/10.1002/ps.1616>
- EPA. (2022). *Types of pesticide ingredients*. US environmental protection agency. Retrieved 2022-11-11, from <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/types-pesticide-ingredients>
- Even, N., Devaud, J., & Barron, A. (2012). General stress responses in the honey bee. *Insects*, 3(4), 1271-1298. <https://doi.org/10.3390/insects3041271>
- Fernández, L. (2022). Agricultural consumption of pesticides worldwide from 1990 to 2020. <https://www.statista.com/statistics/1263077/global-pesticide-agricultural-use/#statisticContainer>
- Fu, Y., Yu, Z., Liu, S., Chen, B., Zhu, L., Li, Z., Chou, S., & He, J. (2018). c-di-GMP regulates various phenotypes and insecticidal activity of gram-positive *Bacillus thuringiensis*. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00045>
- Georgiadis, G., Mavridis, C., Belantis, C., Zisis, I., Skamagkas, I., Fragkiadoulaki, I., Heretis, I., Tzortzis, V., Psathakis, K., Tsatsakis, A., & Mamoulakis, C. (2018). Nephrotoxicity issues of organophosphates. *Toxicology*, 406-407, 129-136. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.07.019>
- Gupta, G., Miller, M., Malik, J., Doss, R., Dettbarn, W., & Milatovic, D. (2019). Biomarkers in toxicology: (Second Edition), 55–475.
- Hajšlová, J., Tichá, J., & Kocourek, V. (2005). *Rezidua pesticidů v ovoci a zelenině, možnosti minimalizace*. Vědecký výbor fyto-sanitární a životního prostředí. Retrieved 2022-11-09, from
- Hajšlová, J., & Kocourek, V. (2007). *Osud prostředků pro ochranu rostlin v potravním řetězci člověka*. Retrieved 2022-11-09, from
- Handford, C., Elliott, C., & Campbell, K. (2015). A review of the global pesticide legislation and the scale of challenge in reaching the global harmonization of food safety standards. <https://doi.org/10.1002/ieam.1635>
- Hightower, L. (1991). Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell*, 66(2), 191-197. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90611-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90611-2)

- Chrousos, G. (2009). Stress and disorders of the stress system. *Nature reviews endocrinology*, 5(7), 374-381. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2009.106>
- Johri, A., Saxena, A., Saxena, D., Lal, D., & Lal, R. (1997). Interaction of synthetic pyrethroids with microorganisms: A review. Faculty press 88 Regent st., Cambridge, England.
- Kainzová, K. (2021). *Vliv přírodních toxinů na včelu medonosnou* [Bakalářská práce]. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Přírodovědecká fakulta.
- Karbusová, N., Gautam, U., & Kodrík, D. (2019). Effect of natural toxins and adipokinetic hormones on the activity of digestive enzymes in the midgut of the cockroach *Periplaneta americana*. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 101(4). <https://doi.org/10.1002/arch.21586>
- Kodrík, D. (2008). Adipokinetic hormone functions that are not associated with insect flight. *Physiological entomology*, 33(3), 171-180. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2008.00625.x>
- Kodrík, D. (2014). Hormony a hormonální řízení antistresové odpovědi u hmyzu / Hormones and hormonal antistress response systems in insects. *Časopis ŽIVA*, 206.
- Kodrík, D., Bártů, I., & Socha, R. (2010). Adipokinetic hormone (Pyrp-AKH) enhances the effect of a pyrethroid insecticide against the firebug *Pyrrhocoris apterus*. *Pest management science*, 66(4), 425-431. <https://doi.org/10.1002/ps.1894>
- Kodrík, D., Bednářová, A., Zemanová, M., & Krishnan, N. (2015). Hormonal regulation of response to oxidative stress in insects—An update. *International journal of molecular sciences*, 16(10), 25788-25816. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.02.012>
- Kodrík, D., & Socha, R. (2005). The effect of insecticide on adipokinetic hormone titre in the insect body. *Pest Management Science*, 61(11), 1077-1082. <https://doi.org/10.1002/ps.1087>
- Köllisch, G., Lorenz, M., Kellner, R., Verhaert, P., & Hoffmann, K. (2000). Structure elucidation and biological activity of an unusual adipokinetic hormone from *Corpora cardiaca* of the butterfly, *Vanessa cardui*. *European journal of biochemistry*, 267(17), 5502-5508. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01611.x>
- Krupke, C., Hunt, G., Eitzer, B., Andino, G., Given, K., & Smagghe, G. (2012). Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. *Plos one*, 7(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029268>

- Le Bourg, É. (2015). Fasting and other mild stresses with hormetic effects in *Drosophila melanogaster* can additively increase resistance to cold. *Biogerontology*, 16(4), 517-527. <https://doi.org/10.1007/s10522-015-9574-z>
- Li, Z., Zhu, L., Yu, Z., Liu, L., Chou, S., Wang, J., & He, J. (2020). 6S-1 RNA Contributes to sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *Frontiers in microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.604458>
- Macklis, R., & Beresford, B. (1991). Radiation hormesis. *The journal of nuclear medicine*, (322), 350-359.
- Ma, M., Jia, H., Cui, X., Zhai, N., Wang, H., Guo, X., & Xu, B. (2018). Isolation of carboxylesterase (esterase FE4) from *Apis cerana cerana* and its role in oxidative resistance during adverse environmental stress. *Biochimie*, 144, 85-97. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.10.022>
- Marchal, E., Schellens, S., Monjon, E., Bruyninckx, E., Marco, H., Gäde, G., Vanden Broeck, J., & Verlinden, H. (2018). Analysis of peptide ligand specificity of different insect adipokinetic hormone receptors. *International journal of molecular sciences*, 19(2). <https://doi.org/10.3390/ijms19020542>
- Mattson, M. (2008). Hormesis defined. *Ageing research reviews*, 7(1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2007.08.007>
- McClure, C., Zhong, W., Hunt, V., Chapman, F., Hill, F., & Priest, N. (2014). Hormesis results in trade-offs with immunity. *Evolution*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/evo.12453>
- Moss, D. (1992). Perspectives in alkaline phosphatase research. *Clinical chemistry*, 38(12), 2486-2492. <https://doi.org/10.1093/clinchem/38.12.2486>
- Möstl, E., & Palme, R. (2002). Hormones as indicators of stress. *Domestic animal endocrinology*, 23(1-2), 67-74. [https://doi.org/10.1016/S0739-7240\(02\)00146-7](https://doi.org/10.1016/S0739-7240(02)00146-7)
- Nepraš, J. (1971). *České včelařství* (1 ed.). novinářské závody.
- Pardo-López, L., Muñoz-Garay, C., Porta, H., Rodríguez-Almazán, C., Soberón, M., & Bravo, A. (2009). Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Peptides*, 30(3), 589-595. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.07.027>

- Pareja, L., Colazzo, M., Pérez-Parada, A., Niell, S., Carrasco-Letelier, L., Besil, N., Cesio, M., & Heinzen, H. (2011). Detection of pesticides in active and depopulated beehives in Uruguay. *International journal of environmental research and public health*, 8(10), 3844-3858. <https://doi.org/10.3390/ijerph8103844>
- Rezende-Teixeira, P., Dusi, R., Jimenez, P., Espindola, L., & Costa-Lotufo, L. (2022). What can we learn from commercial insecticides? Efficacy, toxicity, environmental impacts, and future developments. *Environmental pollution*, 300. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.118983>
- Shapira, M., Thompson, C., Soreq, H., & Robinson, G. (2001). Changes in neuronal acetylcholinesterase gene expression and division of labor in honey bee colonies. *Journal of molecular neuroscience*, 17(1), 1-12. <https://doi.org/10.1385/JMN:17:1:1>
- Sohail, E., Waseem, A., Woong, L., Jin, L., & Imtiaz, H. (2004). Endocrine disrupting pesticides: a leading cause of cancer among rural people in Pakistan, 98-105. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15273660/>
- Švamberg, V. (2000). *Tajemný svět včel* (1 ed.). Víkend.
- Titěra, D. (2013). *Včelí produkty mýtů zbavené* (druhé). Brázda.
- Veselý, V. (2013). *Včelařství* (třetí). Brázda.
- Weirich, G., Collins, A., & Williams, V. (2002). Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*, 33(1), 3-14. <https://doi.org/10.1051/apido:2001001>
- Wilson, E. (1971). Social Insects. *Science*, 172(3981), 406-406. <https://doi.org/10.1126/science.172.3981.406>
- Yaribeygi, H., Panahi, Y., t Sahraei, H., Johnston, T., & Sahebkar, A. (2017). The impact of stress on body function: A review, 1072. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5579396/>