

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Parazitologie (N0511A030029)



Bc. Johanka Řezníková

Vliv *Lotmaria passim* na hladiny DWV u *Apis mellifera*

Effect of *Lotmaria passim* on DWV level in *Apis mellifera*

Diplomová práce

Školitel: prof. RNDr. Jan Tachezy, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Tomáš Erban, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Dominika Kadlečková, Ph.D.

Praha 2025

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci 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. Dále prohlašuji, že jsem v průběhu příprav a psaní závěrečné práce použila nástroje umělé inteligence podle pravidel stanovených v Opatření děkana č. 13/2023.

V Praze dne 29. 4. 2025

Bc. Johanka Řezníková



Poděkování

Především děkuji prof. RNDr. Janu Tachezemu, Ph.D. za vedení mé práce, RNDr. Tomáši Erbanovi, Ph.D. za poskytnutí znalostí a prostředků pro práci se včelami a RNDr. Dominice Kadlečkové, Ph.D. za zaučení do laboratorní praxe a za pomoc s analýzou vzorků. Z Tachezy lab děkuji RNDr. Petru Radovi Ph.D. za pomoc s elektronovou mikroskopií a Mgr. Michalu Havelkovi za pomoc s provedením a optimalizací ddPCR. Velký dík patří mým rodičům a přátelům za podporu během celého mého studia. Závěrem bych ráda poděkovala také svému snoubenci Martinu Guldanovi za trpělivost, pomocnou ruku a vytváření příznivého studijního prostředí.

Abstrakt

Včely medonosné mají celosvětový význam nejen pro své produkty, ale především jako opylovači. V současné době jsou však včelstva sužována patogeny, dopady měnící se krajiny a klimatickými změnami. Nové stresory, s nimiž se včely setkávají, mnohdy ústí v rozsáhlé úhyny, jejichž přesné okolnosti stále nejsou zcela objasněny. O přežití či úhynu včelstva zřejmě rozhoduje souhra mnoha faktorů a jejich postupné rozklíčování by mohlo napomoci zlepšení současné situace. Tato práce je zaměřena na koinfekci včely medonosné prvokem *Lotmaria passim* a roztočem *Varroa destructor*, jehož patogenita se úzce pojí s přenosem pro včely nebezpečných virů. Vliv *L. passim* na množství virů přenášené tímto roztočem nebyl prozatím nijak studován, ačkoli jde o běžného obyvatele trávicího traktu včel. Pro sledování vlivu dané koinfekce na viry přenášené roztočem byly navrženy dvě experimentální metody. První metoda byla ryze laboratorní, při které byly včely infikovány za definovaných podmínek, a druhá, při níž byl průběh infekce sledován v prostředí včelstva. Vzorky posbírané z těchto experimentů byly testovány kvantitativní PCR a abundance virů a *L. passim* byly porovnávány za účelem odhalení vzájemného vlivu. Pro analýzu byly vybrány dva významné včelí viry – DWV A a DWV B, o nichž je známo, že se na ztrátách včelstev podílejí.

Klíčová slova: včela medonosná, parazit, *Lotmaria*, *Varroa*, viry, DWV

Abstract

Honeybees are globally important not only for their products, but primarily as pollinators. However, colonies are increasingly threatened by pathogens, landscape changes, and climate change. These stressors contribute to large-scale colony losses, whose exact causes remain unclear. It is likely that colony survival or collapse results from a combination of multiple factors. Identifying these factors could help mitigate current losses. This study focuses on the co-infection of honeybees by the protozoan *Lotmaria passim* and the mite *Varroa destructor*, which is closely associated with the transmission of viruses harmful to bees. Although *L. passim* is a common inhabitant of the bee gut, its effect on virus levels transmitted by *Varroa* has not yet been studied. To assess the impact of this co-infection, two experimental approaches were used: a controlled laboratory infection under defined conditions, and monitoring of natural co-infection dynamics within a colony. Samples from both setups were analyzed using quantitative PCR, and the abundances of *L. passim* and selected viruses were compared to reveal potential interactions. The study focused on two significant honeybee viruses – DWV A and DWV B – both known to contribute to colony losses.

Key words: honeybee, parasite, *Lotmaria*, *Varroa*, viruses, DWV

Obsah

1	Úvod	- 4 -
2	Literární přehled	- 5 -
2.1	<i>Apis mellifera</i>	- 5 -
2.2	Včelstvo	- 6 -
2.3	Ztráty včelstev	- 7 -
2.3.1	Činitelé ztrát včelstev	- 7 -
2.3.2	Viry včel	- 9 -
2.4	<i>Varroa destructor</i>	- 14 -
2.4.1	Životní cyklus	- 15 -
2.4.2	Patogenita	- 16 -
2.4.3	Léčba varroózy	- 17 -
2.5	<i>Lotmaria passim</i>	- 17 -
2.5.1	Přenos	- 19 -
2.5.2	Patogenita	- 19 -
3	Cíle práce	- 20 -
4	Metody a materiál	- 21 -
4.1	Použité včely a včelstva	- 21 -
4.2	Příprava krmení	- 21 -
4.3	Zdroj <i>V. destructor</i>	- 22 -
4.4	Původ a kultivace <i>L. passim</i>	- 22 -
4.4.1	Příprava infekce <i>L. passim</i>	- 22 -
4.5	Klíčkový experiment	- 23 -
4.5.1	Příprava klíček	- 23 -
4.6	Úlový experiment	- 25 -
4.7	Izolace, axenizace a stabilizace <i>L. passim</i>	- 25 -
4.8	Elektronová mikroskopie <i>L. passim</i>	- 26 -
4.9	Homogenizace vzorku a izolace DNA	- 27 -
4.10	Izolace RNA	- 28 -
4.10.1	Izolace RNA ze včely	- 28 -
4.10.2	Izolace RNA z <i>V. destructor</i>	- 29 -
4.11	Reverzní transkripce	- 29 -

4.12	Kvantifikace <i>L. passim</i> pomocí qPCR.....	- 29 -
4.13	Kvantifikace <i>L. passim</i> pomocí ddPCR.....	- 31 -
4.14	Kvantifikace Viru deformovaných křídel pomocí qPCR	- 32 -
4.15	Referenční geny	- 33 -
4.16	Analýza dat a statistika	- 34 -
5	Výsledky.....	- 35 -
5.1	Klíčkový experiment	- 35 -
5.1.1	Sezóna 2022	- 36 -
5.1.2	Sezóna 2023	- 39 -
5.1.3	Sezóna 2024	- 41 -
5.2	Úlový experiment	- 43 -
5.2.1	Sezóna 2023	- 44 -
5.2.2	Sezóna 2024	- 47 -
5.3	Testování infekce <i>L. passim</i> u trubců	- 49 -
5.4	Testování citlivosti k infekci <i>L. passim</i> u včel v různých fázích sezóny	- 50 -
5.5	Porovnání kvantifikace <i>L. passim</i> pomocí qPCR a ddPCR	- 51 -
5.6	Axenizace <i>L. passim</i> – identifikace a morfologický popis	- 52 -
6	Diskuze	- 56 -
6.1	Klíčkový experiment	- 56 -
6.2	Úlový experiment	- 59 -
6.3	Infekce <i>L. passim</i> u trubců.....	- 60 -
6.4	Infekce <i>L. passim</i> u letní a zimní generace dělnic	- 60 -
6.5	Porovnání metod qPCR a ddPCR pro detekci <i>L. passim</i>	- 60 -
7	Závěr.....	- 62 -
8	Seznam literatury.....	- 63 -

Seznam zkratek

ABPV	virus akutní paralýzy včel (Acute bee paralysis virus)
AmFV	vláknitý virus včely medonosné (<i>Apis mellifera</i> filamentous virus)
BHI	brain heart infusion
BQCV	virus černání matečnicků (Black queen cell virus)
CBPV	virus chronické paralýzy včel (Chronic bee paralysis virus)
CCD	syndrom zhroucení včelstva (colony collapse disorder)
cDNA	komplementární DNA (complementary deoxyribonucleic acid)
CPD	sušení ke kritickému bodu (critical point drying)
Cq	cyklus kvantifikace (quantification cycle)
ddPCR	droplet digital polymerase chain reaction
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
dsDNA	dvouvláknová DNA (double-stranded deoxyribonucleic acid)
DWV	virus deformovaných křídel (Deformed wing virus)
EBV	Egyptský včelí virus
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
F	forward
IAPV	virus izraelské akutní paralýzy (Israeli acute paralysis virus)
KBV	kašmírský virus (Kashmir bee virus)
L	skupina experimentu infikovaná pouze <i>L. passim</i>
LSV	virus jezera Sinai (Lake Sinai virus)
LV	skupina experimentu infikovaná <i>L. passim</i> a <i>V. destructor</i>
NK	negativní kontrola
PBS	fosfátový pufr (phosphate-buffered saline)
PEM	Britton–Robinson pufr (PIPES, EGTA, MgSO ₄)
PLD	pod limitem detekce
qPCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
R	reverse
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
rPET	recyklovaný polyethylentereftalát
rRNA	ribozomální RNA (ribosomal ribonucleic acid)
RT	reverzní transkripce
SBV	virus pytlíčkovitého plodu (Sacbrood virus)
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
SQ	počáteční množství (starting quantity)
ssDNA	jednovláknová DNA (single-stranded deoxyribonucleic acid)
TE	tris/EDTA pufr
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
tris	tris(hydroxymethyl)aminometan
V	skupina experimentu infikovaná <i>V. destructor</i>

1 Úvod

Včela medonosná je jedním z opylovačů, na němž závisí značná část potravinové produkce, a tedy i ekonomiky (Levin, 1983; Klein *et al.*, 2007). Společně s dalšími opylovači také přispívá ke stabilitě rostlinných společenstev a ekosystému samotného. V současné době se však čím dál častěji setkáváme s úhyny těchto cenných živočichů. Podíl na tom má zejména proměna krajiny v důsledku lidského vlivu. Příkladem je pěstování rozsáhlých monokultur, z nichž se včelám nedostává potřebných živin, zastavování přírodních ploch a kontaminace krajiny pesticidy. Podstatný podíl na ztrátách včelstev mají zřejmě také včelí patogeny, jako *Varroa destructor* (Anderson a Trueman 2000) a virové či bakteriální infekce. Neopomenutelnou roli v problematice mizení včelstev má jistě i proměna klimatu, která na mnohých místech způsobuje například teplejší a sušší léta. Různé kombinace výše zmíněných faktorů se podepisuje na ztrátách včelích kolonií (Stanimirović *et al.*, 2019).

Včelaři aktuálně všemožnými prostředky bojují s invazí roztoče *V. destructor*, který včely oslabuje a podporuje rozvoj infekcí patogenních virů. Aktuálně nejvíce diskutovaným virem ve spojení se ztrátami včelstev je virus deformovaných křídel (DWV). Rozvoj infekce *V. destructor* spolu s rozvojem viróz a dalšími faktory mnohdy vede k vážnému narušení stability včelstva (Highfield *et al.*, 2009; Rosenkranz, Aumeier and Ziegelmann, 2010). Vědecká komunita se snaží přijít na důvod, proč rozvoj varroózy a virózy je pro jedno včelstvo fatální a jiné ho ustojí bez větších obtíží. Zároveň se svět potýká s neobjasnitelným syndromem mizejících včelstev – colony collapse disorder (CCD), během něhož dochází k neobjasněné ztrátě včelích dělnic a následnému kolapsu včelstva (vanEngelsdorp *et al.*, 2009; Dainat, vanEngelsdorp a Neumann, 2012). Faktorů zapojujících se do úmrtí včelstev je mnoho a jejich nezávislé zkoumání je obtížné (vanEngelsdorp *et al.*, 2009).

Tato práce je zaměřena na studium relativně nově popsáního, ale v těle včel běžného prvoka *Lotmaria passim*. Naší snahou bylo vysledovat možný vliv *L. passim* na rozvoj viróz působených roztoči *V. destructor*. Konkrétně jsme se zaměřili na virus deformovaných křídel (DWV). Pro oddělení faktoru infekce *L. passim* od dalších vlivů jsme se snažili vyvinout experimentální model, při němž by infikované včely byly chovány ryze v laboratorních podmínkách, bez interakce s okolím. Pro porovnání tohoto experimentu se stavem pro včelstvo přirozeným jsme vyvíjeli také experimentální postup, kde by námi sledované včely byly integrovány do předem vybraného včelstva. Je nutno však podotknout, že realizace těchto experimentů se plánům mnohdy vymykala a jejich optimalizace se projevila jako nelehký úkol.

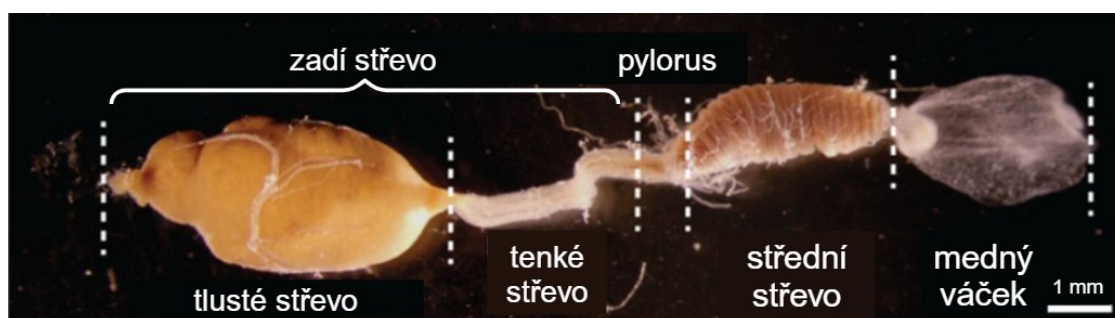
2 Literární přehled

2.1 *Apis mellifera*

Včelu medonosnou, *Apis mellifera* Linnaeus, 1758, řadíme mezi eusociální blanokřídly hmyz. Původní rozšíření tohoto druhu bylo omezeno na Evropu, Afriku a země Blízkého východu. Protože došlo k jejich domestikaci a hospodářskému využívání, byly šířeny i do dalších částí světa. Dnes je tento druh hojný na všech kontinentech kromě Antarktidy (Rojas-Sandoval, 2022).

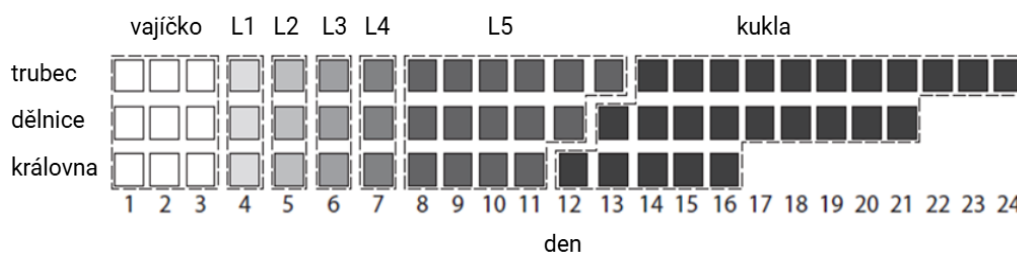
Tělo včely je členěno na hlavu, hrud' a zadeček a na povrchu je chráněno pevnou chitinovou ochrannou s trichomy. Na hlavě včely jsou soustředěny senzorní orgány jako složené oči a ommatidia, článkovaná tykadla a senzorní vlásky. Pomocí těchto orgánů včela získává informace o prostředí, v němž se vyskytuje. Hrud' včely se skládá ze tří článků a nese dva páry blanitých křídel a tři páry končetin. Zadeček se skládá ze sedmi článků a je kryt chitinovými tergity a sternity, které jsou propojeny pružnými vazami, což mu dodává značnou flexibilitu. Ta je nezbytná vzhledem ke zde uložené trávicí soustavě, která musí měnit svůj objem, ale i kvůli efektivní obraně prostřednictvím žihadla (Winston, 1991, pp. 13–19). Nespojité pláště zadečků bývají však i nevýhodou, jelikož vazivové spoje mezi chitinovými tergity mohou být využívány patogeny pro přístup do těla včely (Ramsey *et al.*, 2019).

Co se vnitřního uspořádání týká, bude představena především trávicí soustava (Obrázek 1). Od ústní dutiny pokračuje dlouhým jícnem ústícím do medního váčku, jež slouží jako zásobárna medu užívaného jako zdroj energie, případně slouží pro přenos nektaru a vody u včel zajišťujících zásobování včelstva. Za medným váčkem pokračuje trávicí soustava středním střevem, které je od medního váčku odděleno česlem a slouží jako primární centrum trávení. Od zadního střeva je odděleno pylorem, do nějž ústí malpighické trubice. V zadním střevě dochází k resorpci vody a shromažďování odpadů trávení. Tato funkce je pro včely zásadní v období zimy, kdy nemohou probíhat vyprazdňovací lety a včely tak s plným střevem čekají na jarní oteplení (Winston, 1991, pp. 32–33).



Obrázek 1. Medný váček a střevo včely medonosné (Engel *et al.*, 2016) – přeloženo.

U včel rozlišujeme haploidní trubce, kteří se vyvíjejí z neoplozených vajíček, diploidní dělnice a královnu (Mackensen, 1950). Vývoj dělnic trvá 21 dní, v případě královny pouhých 16 dní a trubci se vyvíjejí nejdéle – od nakladeného vajíčka po líhnutí trubce uplyne 24 dní (Obrázek 2). Všechna vajíčka, až na ojedinělé případy, klade královna. Z nakladeného vajíčka se vyvíjí larva, která následně prochází pěti instary. Následně pečující včely zavíčkují buňku plástve, v níž se larva vyvíjí, dojde k metamorfóze a nakonec k vylihnutí nového dospělce (Johnson, 2023, pp. 33–36; Šabacký, 1886, pp. 16).



Obrázek 2. Vývoj trubce, dělnice a královny na časové ose (Johnson, 2023 podle Cridge *et al.*, 2017) – přeloženo.

2.2 Včelstvo

Kvůli své organizaci analogické k organizaci fyziologických procesů živého organismu bývá včelstvo mnohými autory označováno za superorganismus. Běžně se populace včelstva skládá z jedné královny a desítek tisíc dělnic. Všechny dělnice jsou sestry, protože jsou potomky jediné královny, nicméně jejich genetika není totožná, jelikož se královna páří s vícero trubci. Populace trubců se pohybuje řádově ve stovkách jedinců, avšak jejich četnost ve včelstvu se snižuje s postupující sezónou (Šabacký, 1886, pp. 13–14; Seeley, 1989).

Úkolem trubců je pouze oplození královny, po němž následně hynou. Protože nejsou pro společenství ničím dalším přínosní, jsou brzy přeživší trubci ze včelstva dělnicemi vyháněni (Šabacký, 1886, pp. 12–14). Údělem královny je především páření s trubci a plození nových členů včelstva (Šabacký, 1886, pp. 12–14). Dále královna prostřednictvím svých feromonů podporuje sociální stabilitu společenství (Orlova a Hefetz, 2014). Potřebuje-li včelstvo novou královnu vychovávají si ji samotné dělnice z oplozeného vajíčka, pro nějž vystaví větší buňku než v případě dělnice a po dobu vývoje budoucí královnu krmí mateří kašičkou se specifickým složením (Šabacký, 1886, pp. 12–14; Beetsma, 1979). Dělnice ve včelstvu zastávají všechny funkce až na rozmnožování. Můžeme se však setkat s výjimkou. Dělnice nejsou schopné kopulace, ale dokáží zplodit haploidního trubce naklazením neoplozeného vajíčka (Šabacký, 1886, pp. 12–14).

Úloha dělnice se postupně mění s jejím věkem. Po vylíhnutí se takzvané mladušky starají převážně o čistotu úlu. Po pár dnech pečují také o potomstvo, krmí a zavíčkávají plod a podílí se na stavbě plástů. V druhé polovině svého života se věnují spíše obraně včelstva a shánění potřebných zásob (Lindauer a Watkin, 1953; Seeley, 1989). Běžná délka života dělnice se odvíjí od ročního období. V našich podmínkách jsou včely nejaktivnější od jara do podzimu a délka života dělnice se pohybuje mezi 6 a 8 týdny. Zato v období přezimování, přibližně od září do dubna, se délka života dělnic prodlužuje na 6 až 8 měsíců. Zimní generace dělnic se kromě délky života odlišuje také nastavením fyziologie. Zimní včely mají nižší hladiny juvenilního hormonu a jsou vytvářeny zásoby živin. V hemolymfě roste hladina lipidů i proteinů, obzvláště hladina vitelogeninu (Fluri *et al.*, 1982; Kunc *et al.*, 2019). V zimním období se hlavní úlohou dělnic stává zajištění přežití kolonie a královny (Šabacký, 1886, pp. 12–13; Seeley, 1989). Změny chování dělnic jsou způsobeny především změnami v produkci juvenilního hormonu, jelikož během stárnutí včely dochází ke zvyšování jeho hladiny. Avšak pokud by se dělba práce řídila pouze stářím, znamenalo by to značnou rigiditu systému. Produkce hormonů je proto ovlivňována i sociálním prostředím a potřebami včelstva. To dává včelstvu možnost flexibilně reagovat na vlivy prostředí, predace či nemoci. Při působení stresorů mohou mladé dělnice urychlit postup k vyletování ze včelstva za účelem doplnění zásob (Huang a Robinson, 1996). Není však pochyb o tom, že pokud dochází ke ztrátám létajících dělnic rychleji, než je včelstvo schopno produkovat nové, dochází postupně k depopulaci (vanEngelsdorp *et al.*, 2009).

2.3 Ztráty včelstev

Populace včel je na mnohých místech světa v současnosti ohrožena. Včelstva kolabují ze známých i neznámých důvodů. Vcelku dobře popsány jsou úhyny včel působené roztoči *V. destructor* (Martin, 2001a; Yang a Cox-Foster, 2007; Guzmán-Novoa *et al.*, 2010) a neustále jsou vyvíjeny mechanismy obrany proti tomuto invaznímu patogenu (Satta *et al.*, 2005; Maggi *et al.*, 2009). Včelíny po celém světě i přes tuto snahu dále jeho vlivem přichází o svá včelstva, což vede k obavám o včelařský průmysl a o opylování planých i hospodářských rostlin.

Včelaře dnes trápí také fenomén nevysvětlitelných zmizení včel, tzv. syndrom zhroucení včelstva (colony collapse disorder; CCD) (Stanimirović *et al.*, 2019). Přispění patogenů se ani v tomto případě nedá vyloučit. Stále není známo jaká kombinace stresorů ústí ve zmizení dospělé populace včelstva, ačkoliv práce na jejich odhalení je usilovná (vanEngelsdorp *et al.*, 2009; Dainat, vanEngelsdorp a Neumann, 2012). Včely, u jejichž včelstva probíhá CCD, mají narušenou fyziologii trávení a probíhá u nich aktivní imunitní odpověď (vanEngelsdorp *et al.*, 2009). Navenek se CCD projevuje úbytkem dospělých dělnic, což má za následek velké množství nezabezpečeného plodu ve včelstvu. Mrtvé dělnice však nejsou k nalezení uvnitř úlu, ani v jeho okolí, na rozdíl od úhynu zapříčiněným roztoči *Varroa*, bakteriemi či jinými patogeny. Tato včelstva bývají bohatě osídlena různými včelími parazity, což svědčí o jejich fyzickém i imunitním oslabení (vanEngelsdorp *et al.*, 2009). První záznamy o rozsáhlejší epidemii CCD se objevily v jižní Británii na ostrově Wight počátkem 20. století. Odtud se následně tento fenomén šířil dále po Anglii a Irsku. Již v té době byla provedena řada experimentů zaměřených na infekčnost a původce, avšak s nejednoznačnými výsledky (F., 1916). Za hlavní původce byly považovány klimatické podmínky v součinnosti s infekcemi mikrosporidií *Nosema apis* a dalších známých i neznámých patogenů (F., 1916; Bailey, 1964). Od té doby byly včelíny zasahované podobnými symptomy zaznamenávány především v USA (vanEngelsdorp *et al.*, 2009), ale i v Evropě (Dainat, vanEngelsdorp a Neumann, 2012).

Mimo záhadného CCD se u včel samozřejmě setkáváme i s běžnými kolapsy, při nichž jsou mrtví jedinci přítomní. Ke smrti včelstva mnohdy dochází na konci zimy, kdy se oslabení včelstva projeví neschopností nastartovat populaci pro novou sezónu (Genersch *et al.*, 2010). V těchto případech bývá nejčastějším činitelem oslabení včelstva *V. destructor* v kombinaci s přenášenými viry (Highfield *et al.*, 2009). K oslabení včel však přispívají i další faktory jako *Nosema* spp. (Higes *et al.*, 2008) či bakteriální infekce, klimatická nepřízeň a nedostatek nutričních zdrojů (Stanimirović *et al.*, 2019).

2.3.1 Činitelé ztrát včelstev

Parazité

Majoritní roli ve ztrátách včelstev dnes hraje *V. destructor* (Genersch *et al.*, 2010; Rosenkranz, Aumeier a Ziegelmann, 2010), který se přibližně od poloviny minulého století šíří ze svého původního areálu a stává se invazním prakticky ve všech koutech světa (Navajas, 2010; Traynor *et al.*, 2020; Phaboutdy a Ward, 2024). Tento ektoparazitický roztoč je považován za efektivního přenašeče virů a vyvolává těžké infekce kvůli přímé injekci infekčních dávek virů do těla včel. Zároveň podporuje rozvoj kolapsu včelstva oslabováním obranyschopnosti jednotlivců i celé kolonie (Amdam *et al.*, 2004; Berthoud *et al.*, 2010; Rosenkranz, Aumeier a Ziegelmann, 2010). Stále ale přetrvává předpoklad že kolonie vydrží

životaschopné do jara, pokud jsou populace roztočů před zimou udržovány na nízké úrovni a populace včel je dostatečně velká (Martin, 2001a). V tropických oblastech světa, kde včelstva nejsou oslabována obdobím zimy, pravděpodobně *V. destructor* nehraje tak zásadní roli (De Jong *et al.*, 1984). Podrobnější popis roztoče *V. destructor* a jeho vlivu na *A. mellifera* je uveden v kapitole 2.3.

Dalšími patogeny, kteří se podílí na ztrátách včelstev jsou mikrosporidie *Nosema apis* a *Nosema ceranae* (Fries, 1993). Nosemová infekce nemusí být nutně život ohrožující, jde však o vysoce virulentního parazita. U včel se může projevovat asymptomaticky, případně vyvolává průjemové onemocnění, které bývá označováno jako nose móza (Fries, 1993; MacInnis, Luong a Pernal, 2023). Není pochyb, že obzvláště v koinfekci s dalšími patogeny může *Nosema* přispět ke ztrátě včelstva. Z výsledků několika studií je patrné, že ve včelstvech s projevy CCD se objevují zvýšené hladiny *Nosema* spp. (Cox-Foster *et al.*, 2007; vanEngelsdorp *et al.*, 2009). I další práce podporují podíl *Nosema* na ztrátách kolonií (Higes *et al.*, 2008). Schüller *et al.* (2023) ve své práci shrnují podíl *Nosema* spp. na ztrátách včelstev následovně. Potvrzují, že tyto infekce mohou být pro včelstvo smrtelné. Ve srovnání s všudypřítomným vlivem *V. destructor* je ale považují za biologicky málo významné, alespoň prozatím (Schüller *et al.*, 2023). Je pravděpodobné že s rostoucí prevalencí *N. ceranae* se může nose móza stávat pro ztráty včelstev čím dál zásadnější (Runckel *et al.*, 2011).

Prostředí a pesticidy

Ztráty včelstev nejsou připisovány pouze patogenům. Je třeba uvažovat také efekt všudypřítomných chemikálií. K udržení vysoké produktivity hospodářských plodin je v dnešní době využívána paleta pesticidů, které působí nejen na škůdce, ale i na populace hospodářsky prospěšného hmyzu. Jako insekticidy jsou používány například organofosfáty, pyrethroidy a neonikotinoidy. Látky všech těchto skupin na hmyz působí neurotoxicky (Köhler a Triebskorn, 2013). Včely se s insekticidy dostávají do blízkého kontaktu při pohybu mimo včelstvo a spolu s pylem, nektarem a vodou si je zanášejí i do prostředí úlu (Mullin *et al.*, 2010). Největší pozornost je vědeckou komunitou aktuálně věnována neonikotinoidním insekticidům. Široce používanými neonikotinoidy jsou například imidakloprid, thiakloprid, acetamiprid, thiamethoxam, klothianidin a dinotefuran. Tyto látky se váží na nikotinoidní acetylcholinové receptory v nervovém systému hmyzu a působí spontánní nervové impulzy (Matsuda a Sattelle, 2004). Expozice neonikotinoidům může u včel vést k fyziologickým a behaviorálním změnám, například v učení, shánění potravy a plodnosti královen (Henry *et al.*, 2012; Dively *et al.*, 2015). Mohou vyvolávat i zvýšenou náchylnost k dalším stresorům a zvyšují riziko zimních ztrát. Ve studii zkoumající vliv klothianidinu a dinotefuranu na včelstvo byl popsán stav včelstva podobný CCD (Yamada, Yamada a Wada, 2012). Přetrvává tedy předpoklad, že neonikotinoidní insekticidy přispívají ke ztrátám včelstev, ačkoliv se neví jak významnou rolí (Dively *et al.*, 2015). Některé insekticidy, jako například pyrethroid permethrin nepůsobí vyšší úmrtnost včel, ale včely jsou odpuzovány ošetřenými rostlinami. Obecně platí doporučení postříkovat rostliny večer, kdy jsou opylovači nejméně aktivní, aby byl minimalizován možný kontakt (Pike *et al.*, 1982).

Stejně tak jsou nežádoucí účinky pozorovány i u používaných miticidů. Například kumafos, běžně používaný k likvidaci *Varroa* ve včelstvu, prokazatelně zhoršuje na čichu založené učení a paměť včel (Williamson, Baker a Wright, 2013). Škodlivost užívaných miticidů je podrobněji popsána v kapitole 2.4.3.

Kromě insekticidů a miticidů se včely potýkají i s dalšími pesticidy. Na jejich zdraví negativně působí i herbicidy jako je glyfosát, široce využívaný k likvidaci plevelů. U včely medonosné může

narušovat přirozenou skladbu střevního mikrobiomu, jenž hraje důležitou roli v obranyschopnosti (Motta, Raymann a Moran, 2018). Expozice glyfosátu narušuje také prostorovou orientaci včel (Balbuena *et al.*, 2015) a byl pozorován také negativní efekt na spánek včel, s čímž se pojí horší schopnost regenerace a celkový stres organismu (Vázquez *et al.*, 2020). Také fungicidy používané v zemědělství mohou mít dopad na zdraví včel. Po použití kombinace fungicidů propiconazol a chlorantraniliprol byla popsána zvýšená úmrtnost včel (Walker *et al.*, 2022).

Na zdraví včel a odolnosti včelstva se kromě chemikálií přítomných v prostředí podepisuje i podoba krajiny samotné. Lidé svou činností mění přirozenou strukturu krajiny a přetvářejí ji například na zastavěné plochy měst, nebo rozsáhlé monokultury. Zdroje, které včely využívají tak bývají hůře dostupné nebo méně rozmanité, což vede k nutričnímu stresu včel. Dochází ke změnám v přirozeném mikrobiomu včelích střev, k oslabení jednotlivců i včelstva a zvýšení náchylnosti vůči patogenům (Pasquale *et al.*, 2013; Castelli *et al.*, 2020). Zemědělská krajina bývá na zdroje bohatá a v okolí kvetoucích hospodářských plodin je udržováno značné množství včelstev. Pokud se však jedná o zemědělské monokultury, dochází k zásadnímu propadu po jejich odkvětu. Sezónnost kvetení následně nutí včely ke koncentraci na malých přirozených stanovištích (González-Varo a Vilà, 2017). V případě městské zástavby existují výjimky. Města bohatá na parky a zahrady mohou kvalitně naplňovat potřeby včel a případně i udržovat nižší hladiny patogenů (Tommasi *et al.*, 2004; Samuelson, Gill a Leadbeater, 2020).

Bakterie a viry

Z patogenních bakterií včel jsou nejznámější *Melissococcus plutonius* a *Paenibacillus larvae*. *Melissococcus plutonius* je gramm-pozitivní bakterie působící ve včelstvech hnilobu včelího plodu. Příznaky jsou typicky vidět v mladém nezavíčkovaném plodu. Zasažené 4 až 5 dní staré larvy jsou ve své buňce dislokovány, následně umírají, tmavnou a rozkládají se. Infikované včelstvo lze poznat i podle hnilobného zápachu (Bailey a Ball, 1991b, pp. 41–44). *Paenibacillus larvae* způsobuje mor včelího plodu, během něhož umírají a hnijí včelí larvy a kukly, většinou ve věku 10 až 15 dní po vyhlínutí z vajíčka. Obě tyto bakterie jsou patogenní pro plod, avšak dospělé včely neovlivňují. Pečující včely tak snadno během krmení infikují budoucí generaci (Bailey a Ball, 1991b, pp. 36–38). V případě hniloby i moru plodu může při přemnožení bakterií dojít k zásadnímu oslabení včelstva, což může vést až k jeho kolapsu. Úloha bakterií v CCD je doposud nejasná. Ve studii Cox-Foster *et al.* (2007) však pozorovali nárůst populace Gammaproteobakterií ve včelstvech s příznaky CCD. *Paenibacillus larvae* ani *Melissococcus plutonius* v kolabujících koloniích nebyl pozorován (Cox-Foster *et al.*, 2007).

Role virů v zimních ztrátách spočívá především v oslabování zimní generace včel. Jakmile začnou zimní včely jednotlivě umírat, dojde k narušení sociální stability celého včelstva. Především zásah do schopnosti termoregulace může být pro včelstvo v zimním období rozhodující (Dainat *et al.*, 2012).

2.3.2 Viry včel

V dnešní době nejvíce diskutované viry včel jsou přehledně shrnuté v Tabulce 1. U včel se virové infekce mohou projevovat například jako paralýzy, případně narušují schopnost učení, orientace či senzorické schopnosti. Infekce viry se mohou projevovat různými fyzickými deformacemi u dospělců nebo během vývoje včel, avšak většina včelích virů při běžných podmínkách působí asymptomaticky a k projevu dochází až při komplexnějším oslabení včelstva (Bailey a Ball, 1991a).

K přenosu virů dochází především orální cestou, trofalaxí nebo v mateří kašičce, sexuálně z trubců na matku a případně dochází také k vertikálnímu přenosu z královny na potomstvo (Chen *et al.*, 2006; Yue *et al.*, 2007). Přenos je možný také horizontálně mezi jednotlivými včelstvy, často v důsledku vykrádání zásob nebo náhodných vstupů cizích včel do včelstva (Peck a Seeley, 2019), a byl prokázán také přenos virů v prostředí přes kontaminovaný pyl na květech (Mazzei *et al.*, 2014). Některé viry jsou dnes hojně přenášeny roztoči *V. destructor*, a to mechanicky, případně i biologicky. Přímá injekce viru roztočem do těla včely mnohdy zesiluje symptomatické projevy, protože viry tak obejdou přirozené bariéry včeliho organismu (Bowen-Walker, Martin a Gunn, 1999; Yue *et al.*, 2007).

Tabulka 1. Přehled nejvýznamnějších včelích virů, včetně typu jejich genomu a jeho délky, taxonomie na úrovni čeledi a jejich patogenity (Kadlečková, 2024 – upraveno).

virus	genom	délka (kb)	taxonomie	zkratka	patogenita
Virus akutní paralýzy včel	+ssRNA	9.5	<i>Dicistroviridae</i>	ABPV	patogenní
Virus izraelské akutní paralýzy	+ssRNA	9.4	<i>Dicistroviridae</i>	IAPV	patogenní
Kašmírský virus včel	+ssRNA	9.5	<i>Dicistroviridae</i>	KBV	patogenní
Vláknitý virus včel	dsDNA	498.5	<i>neklasifikováno</i>	AmFV	patogenní
Virus černání matečniců	+ssRNA	8.5	<i>Dicistroviridae</i>	BQCV	patogenní
Virus deformovaných křídel	+ssRNA	10	<i>Iflaviridae</i>	DWV	patogenní
Virus pytlíčkovitosti plodu	+ssRNA	8.7	<i>Iflaviridae</i>	SBV	patogenní
Virus jezera Sinai	+ssRNA	5.9	<i>Sinairidae</i>	LSV	benigní?
Virus chronické paralýzy včel	+ssRNA	5.9	<i>neklasifikováno</i>	CBPV	patogenní

Virus deformovaných křídel

Virus deformovaných křídel (Deformed wing virus – DWV) je jednovláknový RNA virus z řádu *Picornavirales* a čeledi *Iflaviridae* (Lanzi *et al.*, 2006). V současnosti je považován za nejvýznamnějšího virového činitele ztrát včelích kolonií, obzvláště ve spojení se svým vektorem *V. destructor* (Highfield *et al.*, 2009; Genersch *et al.*, 2010; Dainat *et al.*, 2012). Nejde o virus specifický pouze pro *A. mellifera*. Byl popsán i u dalších druhů včel, u čmeláků *Bombus terrestris* a také u roztočů *V. destructor* (Genersch *et al.*, 2006; Gisder, Aumeier a Genersch, 2009). U *A. mellifera* byl DWV detekován jak u dělnic, tak i u královen (Chen, Pettis a Feldlaufer, 2005) a trubců, u dospělců i larválních stádií, prakticky ve všech tělních strukturách (Lanzi *et al.*, 2006; Yue *et al.*, 2007).

Infekce DWV bývají brány jako inaparentní neboli skryté, protože ve včelstvu mohou být stabilně přítomné vysoké hladiny viru bez zjevných příznaků. To dokazuje pokročilou adaptaci DWV na *A. mellifera* (Yue *et al.*, 2007). Během letní sezóny se hladiny DWV u asymptomatických dělnic pohybují v rozmezí 10^3 až 10^9 virových částic (Fievet *et al.*, 2006; Highfield *et al.*, 2009). Při závažnějších infekcích se včely líhnou s viditelnou deformací křídel, s menším zadečkem a často s vysunutým proboscisem (Obrázek 3). Samotné líhnutí silně infikovaných včel trvá déle a úmrtnost v průběhu líhnutí je zvýšena asi o 30 % (Koziy *et al.*, 2019). Podle Koziy *et al.* (2019) mají včely s projevem deformace křídel v těle přibližně $1,7 \times 10^6$ krát vyšší hladiny DWV než nedeformovaní jedinci. U včel se může projevit také paralýza, narušení orientace a schopnosti učení a celkové oslabení vedoucí

k časnému úhynu (Bailey a Ball, 1991a; Lanzi *et al.*, 2006; Iqbal a Mueller, 2007; Koziy *et al.*, 2019). Přesný mechanismus, jakým DWV poškozuje tělo včely je stále předmětem výzkumu. Koziy *et al.* (2019) ve své práci pozorovali u silně infikovaných včel hypoplazii hypofaryngeálních a mandibulárních žláz. Tyto žlázy jsou klíčové pro vývoj plodu a hormonální řízení organizace včelstva. Narušení jejich funkce tak může zasahovat do populace a výkonosti včelstva jako celku (Koziy *et al.*, 2019).



Obrázek 3. Fotky zaznamenávající rozdíl zdravé líhnoucí se včely (1 a 3) a deformované líhnoucí se včely (2 a 4), u níž jsou vidět deformovaná křídla a povystřčený proboscis během líhnutí. Na snímku č. 2 šipka ukazuje na přítomnou nymfu *Varroa* (Koziy *et al.*, 2019).

K přenosu DWV mezi včelami dochází horizontální či vertikální cestou i přes vektory. Horizontálně je DWV přenášen především orálně předáváním potravy, vzduchem a ve spermatu z trubce na matku (Yue *et al.*, 2007). Dokud přenos ve včelstvu probíhá pouze vertikálně a horizontálně, zůstávají infekce spíše asymptomatické. Viry jsou však na včely přenášeny také roztočem *V. destructor*. Tento ektoparazit během sání na dospělci či larvách uvolňuje viry přímo do hemolymfy hostitele, čímž je obcházena přirozená střevní bariéra. *Varroa* sáním na larvách včel podporuje rozvoj symptomů, jako je výše zmíněná deformace křídel nebo zmenšení zadečku. Je tomu tak pravděpodobně kvůli vysokým infekčním dávkám, které do těla včel vnáší a kvůli oslabování včelího organismu, které roztoč vyvolává (Bowen-Walker, Martin a Gunn, 1999). Podle Gisder *et al.* (2009) mají roztoči, kteří zapříčiní deformaci křídel u líhnoucích se včel v těle DWV nad hranicí 10^{10} až 10^{12} kopií viru. Neznamená to ale, že by se závažné infekce v nepřítomnosti roztoče nerozvíjely. Například studie Highfield *et al.* (2009) popisuje pozorované ztráty kolonií zapříčiněné DWV bez účasti *V. destructor*.

V současnosti jsou uznávány 4 varianty DWV: A, B, C a D. Zároveň však stále dochází k rekombinacím těchto variant (Mordecai, Wilfert, *et al.*, 2016). Stále není jasné, jak přesně se od sebe liší infekce jednotlivými typy DWV. V infikovaném včelstvu běžně převládá jedna z variant, od čehož se může odvíjet projev infekce a osud včelstva. Běžně převládá DWV A nebo DWV B. S postupující invazí *V. destructor* ale začíná převládat typ B (Doublet *et al.*, 2024; McAfee *et al.*, 2025). Přičemž převládající infekce DWV B pro včelstvo podle některých prací znamená bezpříznakový průběh, zatímco při převládnutí DWV A pravděpodobněji dochází ke kolapsu (Mordecai, Brettell, *et al.*, 2016). Proti tomu stojí například práce, která mluví o DWV A jako o převládajícím a o DWV B jako o virulentnějším typu (Lester *et al.*, 2022). Pravděpodobně záleží na souhře vícero faktorů, které nejsou doposud zcela prozkoumané. Před příchodem *V. destructor* spolu viry a včely stabilně koexistovaly a virulentní kmeny byly udržovány na nízkých hladinách. Infekce *V. destructor* u včel ale mnohonásobně zvýšili virové nálože a snadněji dochází k převládnutí virulentních kmenů (Martin *et al.*, 2012; Mordecai, Brettell, *et al.*, 2016; Doublet *et al.*, 2024). Předpokládá se, že varianta C se nemnoží v těle *V. destructor* (Mordecai, Wilfert, *et al.*, 2016). S tím může být spojen nárůst tohoto typu v období zimy mezi zimujícími včelami, bez přispění roztoče. Přesná role DWV C v zimních ztrátách nebyla doposud objasněna (Mordecai, Wilfert, *et al.*, 2016). Typ DWV D, také známý pod názvem Egyptský včelí virus (EBV), se dnes už nepodařilo ve včelách detekovat, nebo o tom podle práce de Miranda *et al.* (2022) alespoň neexistuje dostupný záznam. Typ D buďto vymizel, je vzácný a vyskytuje se jen v některých regionech, nebo se vyskytuje u jiných hostitelů (de Miranda *et al.*, 2022). Stále také není zcela objasněno, které typy DWV se v roztočích *Varroa* množí. Prozatím se předpokládá, že DWV B se replikuje v těle včely i roztoče. V případě DWV A některé studie mluví spíše proti možnosti jeho replikace v roztoči (Posada-Florez *et al.*, 2019; Gisder a Genersch, 2021). Novější práce Damayo *et al.* (2023) ale ukazuje, že *V. destructor* může být biologickým přenašečem DWV A i B, tedy že v těle roztoče dochází k množení obou těchto typů (Damayo *et al.*, 2023).

Virus akutní paralýzy včel

Virus akutní paralýzy včel (Acute bee paralysis virus – ABPV) patří stejně jako DWV do řádu *Picornavirales* (Bailey, Gibbs a Woods, 1963; Govan *et al.*, 2000). Jedná se o další virus přenášený roztočem *Varroa*, ačkoliv v tomto případě nebyl prokázán biologický přenos (Ball a Allen, 1988). Podobně jako v případě DWV i ABPV přetrvává v koloniích bezpříznakově, dokud je přenášen pouze přímo mezi včelami. Projev symptomů bývá spojován s koinfekcemi *V. destructor*, při nichž dochází k oslabení včelího organismu a přímé injekci viru do hemolymfy. Zřejmě je tak umožněn nárůst hladiny ABPV do úrovně působící vážné symptomu, jako je paralýza včel, neschopnost letu aztrnulost, línání a následná smrt jedince (Bailey, Gibbs a Woods, 1963; Ball a Allen, 1988; Bailey a Ball, 1991a, pp. 19–21). U včel s projevy paralýzy byla detekována kumulace tohoto viru v mozku a hypofaryngálních žlázách. Symptomy a smrt včely se tak pravděpodobně odvíjí od toho, jaké centrum je v mozku zasaženo a jakou měrou (Bailey a Milne, 1969). Podle Highfield *et al.* (2009) se ABPV přímo nepodílí na zimních ztrátách včelstev. Včelstvo má pravděpodobně mechanismus, jak se s přítomností této infekce vyrovnat. Rychlá letní reprodukce včel s sebou nese rychlý rozvoj, ale i následný rychlý pokles infekce ABPV (Highfield *et al.*, 2009; Runckel *et al.*, 2011).

Virus izraelské akutní paralýzy

Virus izraelské akutní paralýzy (Israeli acute paralysis virus – IAPV) je znám jako perzistentní infekce běžná ve včelích koloniích. K přenosu dochází orální cestou mezi dospělci, během krmení plodu a pravděpodobně i sexuálně z trubců na matku (Chen *et al.*, 2014). Byl popsán také mechanický přenos roztoči *V. destructor* (Di Prisco *et al.*, 2011). Práce Chen *et al.* (2014) ukázala, že se tento virus v těle včel koncentruje ve střevě, hypofaryngálních žlázách a v nervové soustavě. Tropismus k nervové soustavě souvisí také s projevem paralytických symptomů. Jejich projev je pravděpodobně podmíněný impulzem vnějších stresorů, například infekcí *V. destructor*. V kombinaci s dalšími stresory může IAPV vážně ohrožovat stabilitu včelstva (Chen *et al.*, 2014). Z průzkumů provedených v USA je patrné, že IAPV byl ve vysokých hladinách přítomný v koloniích s příznaky CCD. Od té doby jsou infekce IAPV v kombinaci s *V. destructor* s CCD často spojovány (Cox-Foster *et al.*, 2007).

Virus černání matečnicků

Virus černání matečnicků (Black queen cell virus – BQCV) působí akutní infekce (Bailey a Ball, 1991b), stejně jako ABPV. Je popsáno, že tento virus infikuje larvy včelích královen, způsobuje změnu jejich barvy a následnou smrt. U larev dělnic a trubců k těmto projevům nedochází (Bailey a Ball, 1991a, pp. 21–22). Tak jako bylo zmíněno výše v případě ABPV, i zde se předpokládá, že rychlá letní reprodukce včel vede k rychlému odstranění viru ze včelstva (Highfield *et al.*, 2009; Runckel *et al.*, 2011). K přenosu viru mezi včelami dochází především orální cestou, ale existují studie svědčící také o vertikálním přenosu (Chen *et al.*, 2006). Roztoč *V. destructor* pravděpodobně není biologickým vektorem BQCV. Vektorový přenos není dobře prozkoumán, je však možné že viry na hostitele přenáší alespoň mechanicky (Damayo *et al.*, 2023). Také od doby, kdy se *V. destructor* stal invazním parazitem, došlo podle práce Doublet *et al.* (2024) k nárůstu výskytu BQCV. V tomto případě však může jít jen o důsledek potlačené imunitní odpovědi vlivem *V. destructor* (Doublet *et al.*, 2024). Podle práce Bailey *et al.* (1983) může být pro včely velice závažná koinfekce BQCV a *Nosema* spp. Pokud se tato koinfekce rozvine v období zimy, výrazně se zvyšuje riziko, že včelstvo nevydrží do další sezóny (Bailey, Ball a Perry, 1983).

Virus pytlíčkovitého plodu

Virus pytlíčkovitého plodu (Sacbrood virus – SBV) je jednovláknový RNA virus z řádu *Picornavirales* a projevuje se smrtí včelích larev (Ghosh *et al.*, 1999). Virus se hromadí v těle dospělých včel, především v hypofaryngeálních žlázách, a na plod je přenášen především během krmení (Shen *et al.*, 2005). Nejcitlivější jsou 2 dny staré larvy. Pokud dojde k infekci v tomto věku, nejsou larvy po zavičkování schopny zakuklení. U plodu dochází k hromadění tekutiny, k postupnému tmavnutí a následnému zaschnutí. Pečující včely odstraňují mrtvý plod většinou do 2 dnů, a přestože po zaschnutí larev virus rychle ztrácí na infekčnosti, dochází k jeho přenosu na dospělé (Bailey a Ball, 1991a, pp. 17–19; Shen *et al.*, 2005). Pečující dělnice se zároveň brání přenosu na plod změnami svého chování. Infikované včely například přejdou od pečovatelské činnosti ke shánění potravy.

Může docházet k sezónním epidemiím, které obvykle rychle vymizí. Infekce tak ve včelstvu přetrvává od sezóny k sezóně především bezpříznakově u dospělých včel (Bailey a Ball, 1991a, pp. 17–19; Runckel *et al.*, 2011). Roztoč *V. destructor* pravděpodobně není biologickým vektorem SBV, i když může stále pasivně včely infikuje jako mechanický vektor (Shen *et al.*, 2005; Damayo *et al.*, 2023). Podle práce Doublet *et al.* (2024) i v případě tohoto viru došlo k nárůstu výskytu od doby rozšíření *V. destructor*, ačkoliv jde pravděpodobně jen o vedlejší efekt zhoršené obranyschopnosti včel.

Další viry

Virus chronické paralýzy včel (Chronic bee paralysis virus – CBPV) působí paralytické symptomy podobně jako ABPV. Jde o hojně se vyskytující virus, projevující se většinou asymptomaticky. Až v závažných případech se u infikovaných včel objevuje neschopnost létat, strnule roztažená křídla, zduřelý zadeček a línání chloupků. Právě línání a s tím spojený tmavý mastný vzhled včel je pro CBPV typický (Bailey, Gibbs a Woods, 1963; Bailey a Ball, 1991a, pp. 10–14). K projevům však dochází s větším časovým odstupem než v případě ABPV. Pravděpodobně díky tomu může docházet ke kumulaci silně infikovaných jedinců ve včelstvu, propuknutí epidemie a případně i ke smrti kolonie (Bailey, Gibbs a Woods, 1963). Od doby, kdy se rozšířil po světě *V. destructor*, došlo k nárůstu výskytu CBPV. Ačkoliv i v tomto případě spíše než přenos roztočem za to může obecné oslabení včel (Doublet *et al.*, 2024).

Vláknitý virus včel (*Apis mellifera* filamentous virus – AmFV) je jeden z mála popsáných včelích DNA virů a svou velikostí převyšuje ostatní popsané včelí viry (Gauthier *et al.*, 2015). I v tomto případě jde o virus poměrně běžný u dospělců i vývojových stádií včel. K jeho přenosu dochází především orální cestou, ale i vertikálně přes vajíčka a mechanicky při sání ektoparazitů (Gauthier *et al.*, 2015). Patogenita AmFV je stále málo prozkoumaná. Běžně se infekce projevují skrytě, podobně jako u ostatních včelích virů. U infikovaných jedinců se ale objevuje mléčně bílá hemolymfa a předpokládá se, že silné infekce AmFV vyčerpávají včelí organismus (Clark, 1978; Bailey, Ball a Perry, 1983; Bailey a Ball, 1991a, p. 22).

Kašmírský včelí virus (Kashmir bee virus – KBV) je virus blízce příbuzný ABPV a IAPV (de Miranda *et al.*, 2004). Virus KBV je pravděpodobně šířen především orálně mezi dospělými včelami a na plod během krmení. Je potvrzen i přenos přes roztoče *Varroa* (Shen *et al.*, 2005).

Virus jezera Sinai (Lake Sinai virus – LSV) je RNA virus ze skupiny *Sinairiviridae*. Jedná se o virus hojný a běžně detekovaný (Runckel *et al.*, 2011; McAfee *et al.*, 2025). Ukazuje se, že samotné LSV má velice rozmanitý genom a stále jsou popisovány nové typy (Daughenbaugh *et al.*, 2015). Byla zdokumentována kumulace tohoto viru ve střevě včely medonosné, což podporuje orální přenos infekce. K infekcím dochází také přes *V. destructor*, ačkoliv jde pravděpodobně pouze o mechanický přenos (Daughenbaugh *et al.*, 2015).

2.4 *Varroa destructor*

Varroa destructor Anderson & Trueman, 2000 je druh ektoparazitického roztoče, který byl teprve na začátku tohoto tisíciletí rozlišen od druhu *Varroa jacobsoni* (Anderson a Trueman, 2000). Jeho původním areálem rozšíření byla Asie a původním hostitelem byly asijské včely *Apis ceranae*. Vlivem globalizace postupně došlo k jeho zavlečení do dalších částí světa a ačkoliv Austrálie dlouho invazi odolávala, dnes už může být považován za prakticky kosmopolitní druh (Navajas, 2010; Traynor *et al.*, 2020; Phaboutdy a Ward, 2024). Na nových územích jako hostitele využívá *A. mellifera*. Tuto schopnost mají pouze 2 haplotypy *V. destructor*: haplotyp Korea a haplotyp Japonsko/Thajsko právě v rámci své schopnosti reprodukce na *A. mellifera* dokázaly expandovat i mimo Asii. V Evropě převládá haplotyp Korea, u nějž se předpokládá i vyšší virulence (Anderson a Trueman, 2000). *Apis mellifera* pro tyto roztoče představuje dokonce výhodnějšího hostitele než

A. ceranae. V případě *A. ceranae* dochází k rozmnožování *V. destructor* pouze na plodu trubců, zatímco u *A. mellifera* jsou schopni využívat také plod dělnic (Rath, 1999; Martin, 2001b).

Jedná se o poměrně velké roztoče, alespoň tedy v případě samic (Obrázek 4). U *Varroa* můžeme pozorovat zřetelný pohlavní dimorfismus. Zatímco samice jsou zploštělé, hnědé a dosahují až 1,5 mm, samci jsou kuloví, bezbarví a dosahují asi poloviční velikosti. Samice se svou barvou a dorzoventrálním zploštěním snaží o co nejmenší nápadnost, čímž se přizpůsobují životu na včelách i ve volném prostředí včelstva. Tělo *V. destructor* je rozděleno na idiosoma a gnathosoma, s jehož pomocí se samice přichytávají na tělo včely (Rosenkranz, Aumeier a Ziegelmann, 2010). Nejčastěji roztoče najdeme mezi tergity a sternity, kde napichují tenkou blanku, která jednotlivé články pojí. Roztoči *Varroa* se živí hemolymfou a tukovým tělesem, které trvale vysává (Ramsey *et al.*, 2019).



Obrázek 4. Dospělá samice *V. destructor* (Pakwan *et al.*, 2018) – upraveno.

2.4.1 Životní cyklus

V životním cyklu samic *V. destructor* rozlišujeme dvě fáze: foretickou a reprodukční. Během foretické fáze najdeme samice přichycené na těle včel ve volném prostředí včelstva i mimo něj. Během této fáze se roztoč vyživuje a vyčkává na přístup ke včelímu plodu. Samice cílí na plod ve fázi 5. instaru, těsně před zavíčováním, a umí jej rozpoznat. Když se samice dostane do buňky se včelím plodem, vyčkává na dně buňky na její zavíkování, potom přechází do reprodukční fáze. Na začátku reprodukční fáze naklade jedno neoplozené vajíčko, z nějž se vyvíjí haploidní samec. Následně jsou kladena i oplozená vajíčka, z nichž se líhnou diploidní samice. Vývoj probíhá přes fáze protonyfy a deutonymfy. Všichni roztoči přítomní v buňce se živí na vyvíjející se včele. Dospělá matka napichuje její kutikulu a na vzniklé rance se živí i její potomci. Na plodu dělnic obvykle vzniká až 5 samic, na plodu trubců až 6 (Martin, 1994; Rosenkranz, Aumeier a Ziegelmann, 2010). Růst populace roztočů ve včelstvu tak může být velice dynamický.

K rozšíření roztočů do dalších včelstev dochází nejběžněji při loupežích, když včely ze zdravého včelstva napadnou zamořené včelstvo. Právě včelstva kolabující vlivem *V. destructor* jsou totiž tak

slabá, že lákají k loupežím včely ze svého okolí (Peck a Seeley, 2019). Infekce se tak dynamicky šíří na blízka včelstva. Hospodářské včelíny mívají nevelké rozestupy mezi jednotlivými včelstvy, což podporuje přenos roztočů z jednoho včelstva na druhé zalétáváním (Nolan a Delaplane, 2017). Zároveň při oddělení roje od mateřského včelstva je částečně přenášena i populace roztočů na novou lokalitu (Wilde *et al.*, 2005).

2.4.2 Patogenita

Pro západní včely představuje *V. destructor* významnější problém než pro *A. ceranae*. A to až takový, že v západním světě je varroóza považována za jednu z hlavních příčin ztrát včelstev. Ve včelstvech *A. mellifera* páchají tito roztoči závažné škody, za což může pravděpodobně absence dlouhé doby koevoluce (Rath, 1999; Rosenkranz, Aumeier a Ziegelmann, 2010). Obecně se symptomy spojené s infekcemi *V. destructor* označují jako varroóza (Boecking a Genersch, 2008).

Škodlivost spočívá mimo jiné ve vyčerpávání včelího organismu odebíráním zdrojů (Amdam *et al.*, 2004; Rosenkranz *et al.*, 2010). Včely, jimž roztoči během ontogeneze odebírají hemolymfu, se líhnou menší a slabší. Jejich tělesná hmotnost je o jednotky procent, případně až o čtvrtinu nižší než u zdravých včel nezasažených roztoči (De Jong, De Jong a Gonçalves, 1982; Duay, de Jong a Engels, 2003). Odebírání zdrojů během ontogeneze vede ke snížení hladin důležitých proteinů, například vitelogeninu, také v dospělosti. To se promítá do životaschopnosti včel a do jejich schopnosti vypořádat se se stresory v podobě patogenů či zimního období. Právě v oblastech mírného pásu, kde se včelstva musí připravit na období zimy, můžeme často pozorovat jarní ztráty zapříčiněné roztoči *V. destructor* (Amdam *et al.*, 2004). Dalším faktorem podporujícím ničivost *V. destructor* je imunosuprese, kterou vyvolávají. Tak jako většina ektoparazitů, i tito modulují imunitu hostitele ve svůj prospěch, čímž ovšem dávají prostor i dalším patogenům, především virům a bakteriím (Yang a Cox-Foster, 2005).

Včely jejichž vývoj byl zasažen reprodukcí *V. destructor* se mnohdy líhnou drobnější, s menším zadečkem, deformovanými křídly a změněnou pigmentací. Tyto projevy se shodují s projevy virových infekcí, a skutečně podstatný podíl na škodlivosti varroózy mají přenášené viry (Berthoud *et al.*, 2010). Je jednoznačné, že viry jsou na včely přeneseny během sání hemolymfy. V jakých případech se však jedná pouze o mechanický přenos a v jakých se jedná o biologickou cestu přenosu je stále objektem intenzivního zkoumání. Biologický přenos byl prokázán pro DWV A i DWV B a BMLV (latentní virus *Bombyx mori*), naopak biologický přenos SBV a BQCV nebyl pozorován a u těchto virů tedy dál přetrvává předpoklad mechanického přenosu (Damayo *et al.*, 2023).

Roztoči i viry se ve včelstvu rapidně množí s postupující sezónou a bez залéčení dosahují maxima před zimou. To už bývají infikované včely natolik oslabené, že je prakticky nemožné udržet včelstvo životaschopné přes zimu do další sezóny (Genersch *et al.*, 2010; Francis, Nielsen a Kryger, 2013). Pokud však dojde ke včasnému zaléčení, má včelstvo čas na zotavení a šance na přežití zimy jsou významně vyšší. Jako včasné je běžně uváděno zaléčení před koncem léta, tj. než začne produkce zimní generace včel. Ochrana této generace včel je klíčová k přežití zimy (Martin, Ball a Carreck, 2010). I léčba však může selhávat a nezaručuje efektivní potlačení populace roztočů a hladin virů (Francis, Nielsen a Kryger, 2013).

2.4.3 Léčba varroózy

Na zdraví včel mohou mít negativní dopad i používaná léčiva, jejichž účelem je včelstva chránit před varroózou. Užívané miticidy působí intenzivněji na roztoče kvůli jejich malé velikosti a horším detoxifikačním schopnostem, ani pro včely ale nejsou zcela bezpečné. Běžně se aplikují tři skupiny léčiv: syntetické organické látky, přírodní produkty, nebo organické kyseliny. Mezi běžně užívané syntetické akaricidy patří pyrethroidní tau-fluvalinát, organofosfát kumafros a formamidin amitraz (Boncristiani *et al.*, 2012). Rezidua těchto syntetických léčiv se mohou hromadit ve včelím úlu, zejména v opakovaně využívaném vosku, a dochází tak k dlouhodobé expozici, což se může podepisovat na zdraví včel a zároveň může podporovat vznikající rezistence roztočů (Boncristiani *et al.*, 2012; Medici *et al.*, 2015; Rinkevich, 2020). V případě amitrazu a fluvalinátu byl prokázán negativní vliv na produkci medu a reprodukci včel (Ilyasov *et al.*, 2021). Kumafos prokazatelně zhoršuje učení a paměť včel založené na čichu (Williamson, Baker a Wright, 2013).

Z organických kyselin se nejčastěji používá kyselina šťavelová a mravenčí. Velkou výhodou těchto léčiv je, že ačkoliv se dají najít ve včelích produktech, jejich množství je pro člověka zanedbatelné. Na rozdíl od syntetických léčiv se proto dají používat i během odběru medu. Kyselina šťavelová je pro včely prakticky neškodná, při jejím běžném použití (Charrière a Imdorf, 2002; Aliano, Ellis a Siegfried, 2006). Totéž platí v případě kyseliny mravenčí, ačkoliv se objevily záznamy o drobném poškození plodu. Organické kyseliny jsou užitelsky přívětivé a předpokládá se že u roztočů nebude vznikat rezistence tak jako v případě syntetických léčiv (Pietropaoli a Formato, 2019).

Organické kyseliny se často používají v kombinaci s přírodními látkami jako menthol či thymol. Ačkoliv se jedná o přírodní látky, ani ony nemusí být ke včelám zcela šetrné (Ellis a Baxendale, 1997; Floris *et al.*, 2004). Stále je proto vidět snaha o objevení nových přírodních léčiv, která by efektivně likvidovala roztoče a na včely působila s minimální škodlivostí. Příkladem lze uvést výzkumy zabývající se léčbou esencemi oregana, rozmarýnu, šalvěje či hřebíčkovce (Ariana, Ebadi a Tahmasebi, 2002; Bava *et al.*, 2023).

Aktuálně se šíří názor, že ideální by bylo šlechtit včely k odolnosti vůči roztočům *V. destructor*. Namísto širokého používání léčiv, která jsou mnohdy škodlivá pro včely samotné, zvyšují rezistenci roztočů a hromadí se ve včelích produktech (Mondragón, Spivak a Vandame, 2005; Ramos-Cuellar *et al.*, 2022).

2.5 *Lotmaria passim*

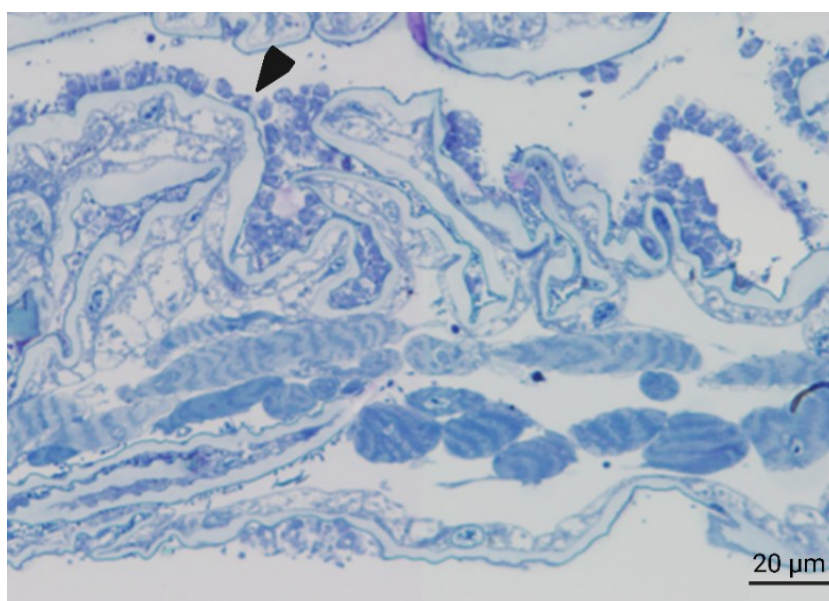
Výskyt zástupců skupiny Trypanosomatida v zažívacím traktu včely medonosné je znám již od začátku minulého století. Od té doby výzkumy ukázaly jejich kosmopolitní výskyt (Langridge a McGhee, 1967; Morimoto *et al.*, 2013; Ravoet *et al.*, 2013; Iller *et al.*, 2024). Dlouhou dobu panovala neshoda nad jejich taxonomickým členěním. Až do roku 2015 studie mluvily především o rodech *Crithidia* a *Leptomonas* (Langridge a McGhee, 1967). Dnes už rozlišujeme kromě rodu *Crithidia* také rod *Lotmaria* a u starších studií tak není jasné, kterým z těchto rodů se skutečně zaobíraly. První kompletnější popis *L. passim* najdeme v práci Schwarz *et al.* (2015). Oddělení rodů umožnila molekulární taxonomie, jež vystřídala metody určování vztahů na základě morfologie organismů. Neznamená to však, že by druh *L. passim* neměl svá morfologická specifika.

Na rozdíl od *Crithidia mellificae*, jejichž tělo se rozšiřuje distálně, je tělo *L. passim* v přední části širší a kapkovitě se zužuje. V přední části těla vystupuje z periflagelární kapsy bičík, jehož délka odpovídá minimálně délce těla lotmarie. Typickou formou *L. passim* je promastigot (Schwarz *et al.*, 2015) (Obrázek 5), který se přichycuje ke stěně střeva včel ve formě haptomonád (Obrázek 6). Držení na povrchu umožňují struktury podobné hemidesmozomům, které vznikají mezi stěnou střeva a bičíkem (Buendía-Abad *et al.*, 2022).



Obrázek 5. Promastigot *L. passim* ve skenovacím elektronovém mikroskopu (Schwarz *et al.*, 2015).

Lotmaria se vyskytuje hojněji v zadním střevě a méně v ileu, zatímco u *C. mellificae* je lokalizace opačná (Buendía-Abad *et al.*, 2022). Lokalizace *L. passim* s sebou nese mnohá úskalí. Prostředí zadního střeva je anaerobní a na živiny chudé, protože většina zdrojů z medu a pylu je absorbována již ve středním střevě. *Lotmaria* tak musí zásadně pozměnit svou genovou expresi, aby se s těmito podmínkami vyrovnala (Liu *et al.*, 2020).



Obrázek 6. Histologický řez rekta včely medonosné barvený methylenovou modří, pod šipkou lze vidět vrstvu buněk *L. passim* pokrývající stěnu rekta (Buendía-Abad *et al.*, 2022).

2.5.1 Přenos

S *L. passim* se setkáváme především u včel *A. mellifera*, ale řidčeji také u *A. cerana* (Schwarz *et al.*, 2015). Podle Arismendi *et al.* (2022) se *L. passim* vyskytuje u všech stádií včel, kromě vajíčka (Arismendi *et al.*, 2022; Michalczyk a Bancerz-Kisiel, 2024). Přenos *L. passim* mezi včelami nebyl doposud příliš detailně popsán. Pravděpodobně probíhá v prostředí včelstva samotného prostým kontaktem s dalšími jedinci či materiálem ve včelstvu (Arismendi *et al.*, 2022). Mohl by také probíhat obdobně jako v případě příbuzného rodu *Crithidia*, i něž se předpokládá fekálně-orální přenos, mnohdy na rostlinách, které včely opylují (Figueroa *et al.*, 2019). Přežití *Crithidia* na rostlině je ovlivňováno expozicí UV záření, teplotou a vlhkostí prostředí, nebo fytochemikáliemi na rostlinách. Pohyblivé však na rostlině při běžných podmínkách a bez vyschnutí přežijí asi 1 až 2 hodiny, což by byl dostatečný čas pro přenos na nového jedince. *Lotmaria*, jakožto blízký příbuzný, by tuto cestu přenosu mohla využívat obdobně (Figueroa *et al.*, 2019). Po přenosu na hostitele *L. passim* proliferuje ve střevě a skokově dosahuje plató mezi 7. a 15. dnem po infekci (Liu *et al.*, 2020).

2.5.2 Patogenita

Dříve byla *L. passim* považována za neškodnou (Langridge a McGhee, 1967). Recentnější výzkumy však naznačují, že by mohla mít patogenní potenciál, i když výsledky studií se různí. Výzkum MacInnis *et al.*, (2023) prokázal zvýšenou potřebu sacharidů u včel infikovaných *L. passim*. Přestože *L. passim* v tomto výzkumu působila dřívější úhyn včel, včely koinfikované *Nosema ceranae* i *L. passim* žily déle než včely infikované pouze *N. ceranae*. To může naznačovat dílčí pozitivní efekt infekce *L. passim* (MacInnis, Luong a Pernal, 2023). V experimentu Liu *et al.*, (2020) *L. passim* nepůsobila dřívější úhyn včel, ani se neprokázal významnější vliv na střevní mikrobiom. Ze sledování exprese vitelogeninu bylo však vyvozeno, že *Lotmaria* uvádí včely do špatného nutričního stavu. Snížená exprese vitelogeninu u včel také souvisí s dřívějším přechodem ke shánění potravy (MacInnis, Luong a Pernal, 2024). Vitelogenin zároveň hraje důležitou roli v životaschopnosti zimní generace včel a jeho snížení u jednotlivců by tak mohlo zasahovat do přezimování včelstva (Nelson *et al.*, 2007). Někteří autoři pozorovali kratší dožití u včel infikovaných *L. passim*. Přesný mechanismus úhynu však popsán nebyl (Gómez-Moracho *et al.*, 2020).

3 Cíle práce

Primárním cílem této práce bylo vyhodnotit, zda infekce *L. passim* může mít dopad na hladinu viru deformovaných křídel v těle včel *A. mellifera*. Za tímto účelem byly navrženy a optimalizovány infekční experimenty a diagnostické metody.

Specifické cíle práce:

1. Optimalizovat infekční experiment v laboratorních podmínkách (klíčkový experiment).
2. Optimalizovat infekční experiment v prostředí včelstva (úlový experiment).
3. Stanovit, zda má přítomnost *L. passim* v těle včel vliv na hladiny viru DWV.
4. Stanovit, zda se infekce *L. passim* vyskytuje u trubců.
5. Srovnat citlivost k infekci *L. passim* mezi letní a zimní generací včel.
6. Izolovat a axenizovat nový kmen *L. passim*.
7. Porovnat citlivost metod kvantitativní PCR (qPCR) a digitální droplet PCR (ddPCR) při detekci a kvantifikaci *L. passim*.

4 Metody a materiál

4.1 Použité včely a včelstva

Pro potřeby této práce byly používány včely *Apis mellifera carnica* (Pollmann, 1879) chované na včelnici Národního centra zemědělského a potravinářského výzkumu, v. v. i. (CARC) v Praze Ruzyni. Pro sběr experimentálních včel byla zvolena zdravá a neléčená včelstva, která v horizontu předchozích měsíců vykazovala minimální infestaci *V. destructor*. Infestace roztoči byla průběžně ověřována ze spadu na dně úlu. Tato včelstva byla vybrána tak, aby měla sesterské matky, čímž byla maximalizována genetická podobnost používaných včel.

V experimentech se pracovalo s líhnoucími se včelami, jejichž odběr probíhal přímo v moment líhnutí. Líhnoucí se včely byly kontrolovány na přítomnost roztočů *V. destructor*. Kontrolován byl jak povrch těla včely, tak vnitřek buňky, z níž včela vzešla. Z experimentů byly vyřazovány infikované včely, a také dělnice, které vykazovaly špatnou fyzickou kondici nebo abnormality v chování. Líhnoucí se včely byly odebrány z plodové buňky dříve, než se stihly nakrmit či přijít do kontaktu s dalšími včelami, aby byla minimalizována možnost kontaminace.

Trubci použití pro analýzu byli také sebráni přímo během líhnutí stejným postupem. Byli označeni barvou určenou ke značení matek a uloženi zpět do včelstva. Barevné značení umožňovalo dané jedince sebrat a testovat přesně ve známém věku.

4.2 Příprava krmení

Včely byly v průběhu experimentů krmeny dvěma typy roztoků: sirupovou dietou s 50 % sacharidů a 0,5 % pylu, nebo cukernou dietou s 20 % sacharidů a 0,5 % pylu.

Pyl byl do cukerné potravy přimícháván jakožto zdroj lipidů, proteinů, vitamínů a minerálů (Standifer *et al.*, 1978). Granule bio pylu (Naturalis) byly 12 hodin lyofilizovány a následně rozemlety na prášek pomocí kávového mlýnku. Práškový pyl byl smíchán s převařenou vodou tak, aby vznikl 5% zásobní roztok pylu. Následně byl roztok homogenizován ultrazvukovým sonikátorem Sonopuls HD 3200 (Bandelin). Výsledný roztok byl sterilizován v autoklávu a před použitím uchováván ve 4 °C.

Na 100 g cukerné potravy s obsahem 20 % sacharidů bylo použito:

- 10 g zásobního roztoku pylu (5 %)
- 20 g řepného cukru (Wiener Zucker)
- 70 g převařené vody

V případě sirupové diety obsahující 50 % sacharidů byl pro přípravu používán Apisirup 71/73 Natural Protect, který obsahuje 73,1 g sacharidů na 100 g. Složení používaného sirupu: fruktóza 42 %, glukóza 32 %, sacharóza 26 % a hydroxymethylfurfural 29 ppm. Na 100 g sirupové potravy bylo tedy použito:

- 68 g sirupu
- 10 g zásobního roztoku pylu (5 %)
- 22 g převařené vody

4.3 Zdroj *V. destructor*

Na včelnici bylo cíleně vybráno jedno včelstvo vykazující vysoké zamoření *V. destructor*. Jednalo se o přirozeně infikované včelstvo, jehož infekce nebyla léčena. Hladina *V. destructor* ve včelstvu byla podpořena doplňováním plodu trubců z jiných včelstev, u nějž bylo předpokládáno vyšší zamoření roztoči. Toto zdrojové včelstvo zamořené *V. destructor* bylo umístěno do síťového izolátoru, aby nedocházelo k šíření infekce po včelnici. Během experimentů sloužilo jako zdroj *V. destructor* a s nimi spojené virové infekce.

Ze zdrojového včelstva zamořeného *V. destructor* bylo odebráno 30 až 50 dospělých dělnic, které byly použity jako tzv. udržovací včely. Jednotlivé včely byly během sběru kontrolovány, aby na svém povrchu nenesly roztoče. U těchto včel byla očekávána dobře rozvinutá virová infekce. Skupina udržovacích včel byla uchovávána v krabici v termostatu při 35 °C a byla krmena 20% cukerným roztokem s pylem (0,5 %). K udržovacím včelám byli na 24 h přidáni roztoči posbíraní z líhnoucích se včel. Touto cestou byli roztoči infikováni viry a infekční dávky virů byly alespoň přibližně sjednoceny. Následně byli roztoči ze včel odebíráni pro použití v experimentu. Odběr roztočů nebyl možný bez usmrcení udržovacích včel. Včele byla oddělena hlava od těla a živí roztoči byli obrání pomocí pinzety a štětce. Pomocí štětce byli roztoči přímo přenášeni na experimentální včely.

Před zavedením skupiny udržovacích včel, které plynulo z postupných optimalizací, byli do experimentů vnášeni přímo foretičtí roztoči či roztoči z líhnoucích se včel.

4.4 Původ a kultivace *L. passim*

Pro experimentální infekce byla používána axenická kultura CZ-02 klon 1 (Pařízková, 2023). Tato kultura byla vymrazena ze stabilátu uloženého v kapalném dusíku a následně kultivována v Brain Heart Infusion (BHI) médiu při 27 °C. Kultura byla sterilně pasážována přibližně jednou za 10 až 14 dní v laminárním boxu.

Složení BHI média na 100 ml (Erban *et al.*, 2023):

- 3,7 g práškového BHI (Sigma)
- 100 µl heminu o koncentraci 10 ng/ml
- 10 ml inaktivovaného fetálního hovězího séra (10 %) (Fetal bovine serum – Sigma)

4.4.1 Příprava infekce *L. passim*

Pro přípravu infekční dávky byly používány kultury *L. passim* (CZ-02 klon 1) kultivované po 10 až 17 pasáží od izolace. Infekční dávka byla připravována z kultury přibližně 10 dní po přeočkování, kdy koncentrace buněk dosahovala 10^7 buněk/ml kultury. Infekční dávka parazitů ve výsledném podání byla 10^6 *L. passim*/ml potravy.

Koncentrace buněk v kultuře byla počítána pomocí Bürkerovy komůrky. Z kultury bylo odebráno 10 µl a organismy byly usmrceny smícháním s 90 µl 10% roztoku formalínu ve fosfátovém pufru (PBS). Po pečlivém promíchání byla touto směsí naplněna Bürkerova komůrka. Po spočtení buněk byla kultura rozředěna médiem na 1×10^7 buněk/ml a 100 µl takto ředěné kultury bylo smícháno s cukerným roztokem a pylem tak, aby výsledné krmení obsahovalo 20 % cukru (Pařízková, 2023).

Modelový příklad:

- Koncentrace buněk v kultuře podle výpočtu v Bürkerově komůrce je $2,25 \times 10^7$ buněk/ml.
- Kultura byla médiem naředěna na 1×10^7 buněk/ml.
- Na 1 ml potravy bylo tedy použito 100 μ l kultury *L. passim* (10^7 buněk/ml), 300 μ l 67% roztoku cukru, 100 μ l zásobního roztoku pylu (5 %) a 500 μ l převařené vody.

4.5 Klíčkový experiment

Experiment zahrnoval celkem 4 skupiny: negativní kontrolu bez podání infekce (NK) a tři skupiny s infekcemi – pouze *L. passim* (L), *L. passim* i *V. destructor* (LV), pouze *V. destructor* (V).

Vybírané líhnoucí se včely byly ukládány do sběrné krabičky vyložené papírovými ubrousky, aby se včely během sběru neporanily. Ze sběrných krabiček byly včely následně rozděleny do 4 skupin. Včely byly uloženy do připravených klíček (vizte 4.5.1) a všem skupinám bylo podáno krmení.

Skupiny L a LV byly krmeny 20% roztokem cukru s pylem a infekční dávkou *L. passim* (vizte 4.4.1), po dokončení infekce byl cukerný roztok nahrazen sirupovou dietou (vizte 4.2). Skupiny NK a V byly krmeny pouze 20% roztokem cukru s pylem a krmení bylo následně stejně jako skupiny LV a L nahrazeno sirupovou dietou. Všem skupinám bylo každý den podáváno čerstvé krmení. Skupiny byly po dobu experimentu uloženy v termostatu při 35 °C.

Viry byly na včely skupin LV a V přenášeny prostřednictvím roztočů *V. destructor*. Mezi lety kvůli optimalizaci docházelo k postupným úpravám. Nejdříve byli využíváni foretičtí roztoči z dospělých včel (sezóna 2022), později roztoči z líhnoucích se včel (sezóna 2023), a nakonec roztoči z líhnoucích se včel předem držení na skupině udržovacích včel (sezóna 2024). V případě poslední zmíněné varianty byla v den založení klíčkového experimentu paralelně založena také skupina tzv. udržovacích včel, na které byli přidáni roztoči z líhnoucích se dělnic (vizte 4.3). Po 24 h od založení klíčkového experimentu byli ke skupinám LV a V přidáni roztoči z udržovacích včel za účelem přenosu infekce DWV a tyto roztoči byli ponecháni na experimentálních včelách až do ukončení pokusu. Zbylé udržovací včely byly zamraženy pro pozdější analýzu. Roztoči infikované skupiny LV a V byli uloženi do termostatu odděleně od skupin L a NK.

Včely z klíčkového experimentu byly sbírány ve věku 5 a 10 dní od vylíhnutí. Poslední den experimentu byli zamraženi také přeživší roztoči pro případnou doplňkovou analýzu. Předčasně mrtvé včely byly z následné analýzy vyloučeny.

4.5.1 Příprava klíček

Pro klíčkové experimenty byly použity 2 typy klíček: Typ 1 – velké boxy s uzavíratelným víkem (Obrázek 7), a Typ 2 plastové misky z recyklovaného polyethylentereftalátu (rPET) (Obrázek 8). Typ 1 byly použity v sezoně 2022. Typ 2 byl použit v sezónách 2023 a 2024.

Klíčka typu 1 (Obrázek 7) byla zhotovena z velkých boxů s uzavíratelným víkem. Dno boxu bylo vyloženo hrubou destičkou a stěny byly potaženy roztaveným panenským včelím voskem z neošetřených včelstev za účelem zvýšení přirozenosti prostředí. Přívod vzduchu byl zajištěn děrováním ve víku, které bylo pro zlepšení izolace vybaveno filtrem. Krmení bylo včelám podáváno v upraveném ptačím krmítku, které bylo připevněno na stěně boxu. Infekční dávka *L. passim* byla podávána prostřednictvím injekční stříkačky, která byla prostrčena připraveným otvorem ve stěně krabičky naproti krmítku.



Obrázek 7. Klíčka typu 1 (Pařízková, 2023).

Pro přípravu klíček typu 2 (Obrázek 8) byly použity malé plastové (rPET) misky o objemu 250 ml s oddělitelným víčkem. Jako klíčky následně tyto misky sloužily dnem vzhůru. Vnitřek klíčky byl pokryt vrstvou rozpuštěného bio včelího vosku. Dvě víčka byla spojena, ve středu vystřižena a prostor mezi nimi byl vyplněn jemnou plastovou sítkou. Víčka následně sloužila jako podlážka a zajišťovala dostatečný přívod vzduchu a odvětrávání, aby bylo zamezeno rozvoji plísní. Zároveň tudy mohla případně odtékat vylitá potrava. Krmení probíhalo skrze dvě 1ml injekční stříkačky, které byly umístěny do otvorů na svrchní straně klíčky. Stříkačky byly vytaheny co možná nejvýše k okraji krabičky, protože včely se nejvíce zdržovaly právě zde.



Obrázek 8. Klíčka typu 2.

4.6 Úlový experiment

Obdobně jako v případě klíčkového experimentu byly i zde sbírány zdravé líhnoucí se včely. Včely byly ihned rozdělovány do dvou skupin značených červenou a modrou barvou. Ke značení včel byly používány nitrocelulóзовé acetonové barvy běžně užívané ke značení matek. Barva byla nanášena vatovou tyčinkou na svrchní stranu hrudi jedince. Do každé skupiny bylo sebráno 60 až 80 líhnoucích se dělnic. Obě skupiny byly následně krmeny 20% roztokem řepného cukru s pylem. Červené skupině byla do krmení přimíchávána infekční dávka *L. passim*, zatímco modrá skupina byla ponechána neinfikovaná. Krmení i infekce byly připravovány v souladu s kapitoly 4.2 a 4.4.1. Po dobu infekce *L. passim*, která se mezi lety lišila (vizte 5.2), byly včely chovány v termostatu při 35 °C.

Po uplynutí doby infekce *L. passim* byly obě skupiny přesunuty do dvou předem vybraných včelstev. Do včelstva zamořeného *V. destructor* (vizte 4.3) byla přesunuta ½ včel z červené skupiny a ½ včel z modré skupiny. Zbylé poloviny včel z obou skupin byly přemístěny do předem vybraného zdravého včelstva, které vykazovalo minimální spad roztočů *Varroa*. Tímto způsobem byly vytvořeny obdobné 4 skupiny jako ve výše popsaném klíčkovém experimentu:

- Skupina LV – Červeně značené líhnoucí se včely infikované *L. passim* a následně umístěné do včelstva zamořeného *V. destructor*.
- Skupina V – Modře značené líhnoucí se včely následně umístěné do včelstva zamořeného *V. destructor*.
- Skupina L – Červeně značené líhnoucí se včely infikované *L. passim* a následně umístěné do zdravého včelstva.
- Skupina NK – Modře značené líhnoucí se včely následně umístěné do zdravého včelstva.

Značené včely byly ve věku 10 dní ze včelstev vybírány na suchý led a následně zamrazeny v –80 °C. Cílem bylo ze včelstev vybrat alespoň 15 včel z každé skupiny. Zároveň byly odebrány náhodné dospělé dělnice z obou zdrojových včelstev (kontrolní vzorky).

4.7 Izolace, axenizace a stabilizace *L. passim*

Nový kmen *L. passim* byl izolován ze střev *A. mellifera* podle dříve zavedeného postupu (Buendía-Abad *et al.*, 2021). Pro kultivaci byla použita destička s 24 jamkami. Do každé jamky byly přidány 2 ml kultivačního média BHI a penicilin-streptomycin (Gibco) ve finálních koncentracích 300 jednotek/ml (penicilin) a 300 µg/ml (streptomycin).

Z plodového rámmu bylo sebráno 30 dělnic. Včely byly usmrceny uložením do –60 °C na 1 min. Povrch těla usmrcených včel byl očištěn 70% ethanolem. Následně byl sterilním skalpelem a pinzetou oddělen zadeček a pomocí dvou sterilních pinzet bylo vytaženo střevo. Střevo, která se podařilo vyjmout bez poškození, byla po jednom přenesena do jednotlivých jamek destičky s připraveným médiem. Po vložení do média byla střeva pomocí pinzet roztrhána. Takto připravená destička byla inkubována ve 27 °C. Po 24 hodinách byly jednotlivé jamky mikroskopicky prohlédnuty. Z jamek, které byly vyhodnoceny jako pozitivní na přítomnost trypanosomatid, byl odebrán 1 ml izolátu do zkumavek Nunclon Delta Surface (Thermo Fisher Scientific) obsahujících 4 ml čerstvého BHI média. Do zkumavek byla přidána směs antibiotik penicilin-streptomycin, amikacin, ampicilin ve finálních koncentracích 300 µg/ml a 5-fluorositosin ve finální koncentraci 10 µg/ml. Po axenizaci byla z kultury izolována DNA

a byla potvrzena přítomnost *L. passim* pomocí PCR. Tato kultura byla použita pro zhotovení preparátů pro elektronovou mikroskopii.

Z kultury byly vytvořeny stabiláty pro budoucí použití. V mrazící zkumavce Cryogen Tube 1,2 ml (CLEARLine) byl 1 ml kultury promíchán s dimethyl sulfoxidem (DMSO, finální koncentrace 5 %), který slouží jako kryoprotektivum. Takto připravená kultura byla uložena do mrazícího boxu s isopropanolem zajišťujícím pomalé mražení (1 °C/min) a uložena do -80 °C. Po zmrznutí byla zkumavka uložena do kapalného dusíku v kryobance katedry Parazitologie Přírodovědecké fakulty UK pod názvem „Izolát Ruzyně 2022“.

4.8 Elektronová mikroskopie *L. passim*

Pro skenovací elektronovou mikroskopii (SEM) byly preparáty připraveny následovně:

- Kultura byla zafixována v BHI médiu obsahujícím 1% formaldehyd (30 min ve 37 °C).
- Následně byla kultura centrifugována 5 min při 900 × g.
- Pelet byl promyt v PBS (5 min při 900 × g).
- Pelet byl opatrně resuspendován v pufru PEM (10mM PIPES, 1mM EGTA, 0,1Mm MgSO₄, pH 6,9).
- Suspenze buněk byla nanášena na čistá krycí sklíčka, která takto byla inkubována 20 min při pokojové teplotě do částečného zaschnutí bez přesušení. Případné přebytky suspenze byly odsáty.
- Sklíčka potažená kulturou byla fixována přes noc 2,5% glutaraldehydem v kakodylátovém pufru (0,1 M, pH 7,2) při 4°C.
- Následující den byla sklíčka promyta kakodylátovým pufrem (0,1M, pH 7,2) 3 × 15 min.
- Připravená sklíčka byla převezena do Laboratoře elektronové mikroskopie na Přírodovědecké fakultě UK, kde byly vzorky dále odborně zpracovány následujícím způsobem:
- Post-fixace byla provedena inkubací v 1% OsO₄ v kakodylátovém pufru (0,1 M) po dobu 1 hodiny.
- Sklíčka byla promyta v destilované vodě 3 × 5 min. Následně proběhlo odvodňování ve vzestupné řadě ethanolu: 35 %, 50 %, 70 %, 80 %, 96 % a 100 % v každém ředění po dobu 5 minut.
- Následovalo sušení nad kritickým bodem CO₂ pomocí CPD 030 (Bal-Tec) a proces poprašování vzorku zlatem (2 nm) pomocí SCD 050 (Bal-Tec).

Vzorky byly prohlíženy mikroskopem JEOL JSM-IT 200.

Pro transmisní elektronovou mikroskopii (TEM) byly preparáty připraveny následovně:

- Z vybrané kultury *L. passim* byly odebrány 3 ml. Ty byly rozděleny do dvou zkumavek (1,5 ml) a centrifugovány 10 min při 800 × g.
- Supernatant byl odlit a pelet byl opatrně promyt 1,5 ml PBS (10 min při 800 × g). Supernatant byl odlit.
- Fixáž byla připravena v podobě 4% formaldehydu a 2,5% glutaraldehydu v 0,1M kakodylátového pufru.
- Pelety byly zality fixáží a takto byly ponechány 24 hodin ve 4 °C.

- Následující den byl fixovaný vzorek promýván v kakodylátovém pufru (0,1 M, pH 7,2) po dobu 3×15 min.
- Připravený vzorek byl převezen do Laboratoře elektronové mikroskopie na Přírodovědecké fakultě UK, kde byl dále odborně zpracován následujícím postupem:
- Post-fixace byla provedena v 1% OsO₄ v kakodylátovém pufru (0,1 M) po dobu 1 hodiny a následovalo promytí destilovanou vodou (3×5 min).
- Vzorek byl odvodněn ve vzestupné řadě ethanolu: 35 %, 50 %, 70 %, 80 %, 96 % a 100 %, v každém ředění po dobu 5 minut. A následně také ve 100% acetonem po dobu 3×5 min.
- Takto připravený vzorek byl zalit pryskyřicí Araldite – Poly/Bed® 812 ředěné 100% acetonem. Objemové díly směsí a doba převádění do pryskyřice vizte v Tabulce 2.

Tabulka 2. Objemové díly směsí a doba převádění do pryskyřice.

aceton : pryskyřice	čas (hodiny)
2 : 1	2
1 : 1	4
1 : 3	12
čistá pryskyřice	3×12

- Polymerace bločků byla provedena po dobu 48 hodin při 65 °C.
- Z bločků byly zhotoveny ultratenké řezy (70 nm) na ultramikrotomu Ultracut E (Reichert-Jung) diamantovým nožem Diatome 45°. Řezy byly následně kontrastovány 2,5% vodným roztokem octan uranylu po dobu 1 hodiny a roztokem citrátu olova dle Reynoldse (Reynolds, 1963) po dobu 15 minut.

Pro vizualizaci byl použit mikroskop JEOL JEM-1011, struktury byly zobrazeny pomocí kamery Veleta a softwaru iTEM 5.1 (Olympus Soft Imaging Solution GmbH).

4.9 Homogenizace vzorku a izolace DNA

Každá včela byla pomocí sterilní pinzety vyjmuta ze zkumavky, ve které byla zamražená. Pomocí druhé pinzety z ní byli obrání roztoči. Manipulace se vzorkem byla prováděna na ledu, aby nedocházelo k jeho degradaci. Včela zbavená roztočů byla přenesena do 2ml homogenizační zkumavky (Bertin Technologies) s keramickými kuličkami (2,8 mm). Do zkumavky bylo přidáno 280 µl PBS. Následně byl vzorek homogenizován pomocí homogenizátoru MINILYS (Bertin Technologies) po dobu 1 minuty při rychlosti 5000 rpm (rychlost 3 podle manuálu přístroje).

Pro izolaci DNA byl používán QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN). Izolace probíhala následujícím postupem:

- K homogenátu bylo přidáno 200 µl lyzačního pufru (AL) a 20 µl proteázy K. Vzorek byl pečlivě promíchán pomocí vortexu, krátce stočen na minicentrifuze a následně 30 min inkubován při 56 °C.

- Po uplynutí inkubace bylo ke vzorku přidáno 200 μ l ethanolu (96 %), vzorek byl pomocí vortexu promíchán a následně centrifugován 30 s při $6000 \times g$. Zbytky včelího těla, u nichž nedošlo k homogenizaci tak byly koncentrovány na dno zkumavky.
- Supernatant byl přenesen do izolační kolonky. Kolonka byla následně centrifugována 1 min při $6000 \times g$.
- Spodní sběrná část kolonky byla vyhozena a nahrazena novou. Do kolonky bylo přidáno 500 μ l promývacího pufru 1 (AW1). Kolonka byla centrifugována 1 min při $6000 \times g$.
- Spodní sběrná část kolonky byla vyhozena a nahrazena novou. Do kolonky bylo přidáno 500 μ l promývacího pufru 2 (AW2). Kolonka byla centrifugována 3 min při $20000 \times g$. Následně byla stáčena ještě jednou 1 min při $20000 \times g$, aby byl vzorek maximálně vyčištěn od AW2.
- Kolonka byla přemístěna do sterilní zkumavky a bylo přidáno 200 μ l elučního pufru (AE). Vzorek byl 1 min inkubován při pokojové teplotě a následně 1 min eluován z kolonky centrifugací při $6000 \times g$.

Kvantita a čistota DNA byla stanovena pomocí spektrofotometru NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific). Čistota byla hodnocena skrze poměry absorbancí ve vlnových délkách $\lambda = 260/280$. Hraniční hodnota absorpance při $\lambda = 260/280$ pro použitelnost vzorku byla stanovena jako 1,7. Vzorky byly pro další použití uloženy do -80°C .

4.10 Izolace RNA

Pro izolaci RNA byl používán protokol TRIzol™ Reagent (Invitrogen).

4.10.1 Izolace RNA ze včely

Do 600 μ l TRIzolu bylo přidáno 140 μ l vzorku ihned po homogenizaci (vizte 4.9). Izolace probíhala následujícím postupem:

- Vzorek byl v TRIzolu inkubován 5 min, následně bylo přidáno 120 μ l chloroformu a takto byl vzorek inkubován při pokojové teplotě další 2 min.
- Po uplynutí doby inkubace byl vzorek centrifugován 15 min při $12000 \times g$.
- Supernatant obsahující RNA byl přenesen do sterilní zkumavky. Vzorek byl pečlivě promíchán s 300 μ l isopropanolu a následně inkubován 10 min při pokojové teplotě.
- Po uplynutí doby inkubace byl vzorek centrifugován 10 min při $12000 \times g$.
- Supernatant by opatrně odsán, tak aby nedošlo k uvolnění peletu na dně zkumavky. K peletu bylo přidáno 600 μ l ethanolu (75 %). Následně byl vzorek stáčen 5 min při $7500 \times g$.
- Supernatant by opatrně odsán, tak aby nedošlo k uvolnění peletu na dně zkumavky. Pelet byl na vzduchu vysoušen po dobu 5 až 10 minut tak, aby se odpařil zbývající ethanol, ale nedošlo k vysušení vzorku.
- Následně byl pelet rozpuštěn při 55°C v 50 μ l sterilní destilované vody (RNase DNase-free).

Po dokončení izolace byla kvantita a čistota RNA měřena pomocí spektrofotometru, stejně jako bylo popsáno v kapitole 4.9 a vzorky byly uloženy do -80°C .

4.10.2 Izolace RNA z *V. destructor*

Pro homogenizaci roztočů byly používány stejné zkumavky a homogenizátor MINILIS, jaké byly zmíněny v kapitole 4.9. Homogenizace probíhala ve 200 μ l TRIzolu při rychlosti 5000 rpm (rychlost 3 podle manuálu přístroje) a doba homogenizace byla snížena na 10 s.

Izolace RNA z roztoče probíhala obdobně jako v případě izolace ze včely, se sníženými objemy přidávaných reagensů. Isopropanolu bylo přidáváno 100 μ l, 75% ethanolu 200 μ l a vzorek byl následně eluován pouze do 10 μ l destilované vody (RNase DNase-free).

4.11 Reverzní transkripce

Reverzní transkripce (RT) je proces, během něhož je sekvence RNA přepisována do sekvence komplementární cDNA. Reverzní transkripce byla prováděna u všech izolovaných RNA vzorků za použití iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad) ve sterilním prostředí laminárního boxu. Vzorky obsahující RNA byly uchovávány na ledu, aby se zamezilo degradaci. K transkribovaným vzorkům byla pokaždé zařazena jedna negativní kontrola bez templátu a jedna negativní kontrola bez reverzní transkriptázy. Získaná cDNA byla uložena do -80°C . Reverzní transkripce probíhala následujícím postupem:

- Vzorek byl naředěn na koncentraci RNA 160 ng/ μ l.
- Do 200 μ l zkumavky s vypouklým víčkem byla namíchána reakce o celkovém objemu 20 μ l obsahující 5 μ l templátu (160 ng/ μ l), 4 μ l 5x iScript Reaction Mix, 1 μ l iScript Reverse Transcriptase a 10 μ l vody.
- Zkumavka s 20 μ l reakce byla vložena do termocykleru a inkubována
5 min při 25°C (příprava)
20 min při 46°C (reverzní transkripce)
1 min při 95°C (teplotní inaktivace reverzní transkriptázy)

4.12 Kvantifikace *L. passim* pomocí qPCR

Hladina infekce *L. passim* byla stanovována pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR). Pro kvantifikaci *L. passim* byl používán Luna[®] Universal qPCR Master Mix v kombinaci s TaqMan probou s fluorescenčním barvivem FAM (6-karboxyfluorescein). Používané primery i proba (Tabulka 3) byly navrženy pomocí softwaru Primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012). Amplifikován byl úsek sekvence cytochromu b o délce 93 bp.

Tabulka 3. Primery a proba používané při kvantifikaci *L. passim* qPCR a ddPCR.

	sekvence 3' $\rightarrow$ 5'
F – primer	CACTACCTCATATTCAATAACATAGCC
R – primer	TGATGTCTTATTGAGGTCTAACTGT
proba	6FAM – AACACCAATAACTGGTACTGTTGCT – BHQ1

Pro provedení absolutní kvantifikace cílové DNA ve vzorku, byla konstruována standardní křivka. Jako templát standardu byl používán úsek cytochromu b (GenBank ID: KM980180.1) v plazmidu pMX s restrikčními místy BamHI a EcoRI (Obrázek 9), který byl syntetizován firmou Thermo Fisher GeneArt.

Následně byla vytvořena desítková ředící řada obsahující 10^6 až 10^2 kopií genu/ μ l. K ředění byl použit TE pufr (10mM Tris a 1mM EDTA). Těchto 5 vzorků bylo využíváno pro konstrukci standardní křivky.

3' BamHI[GGATCC]AAATGCAAAACGATCACAAAAACCATCCGAGCTCATAAAATAATGT
AAGCAAAATAAGTGCATAACTATACTAATATTAACAAATGGTAATAATACATGTAG
CACATGTAATTTTAATAGTGTAATAATCATTTATAAACTCACTACCTCATATTCAATAACAT
AGCCAAACACCAATAACTGGTACTGTTGCTAAAAATATTGCTAAAAACAGTTAGACCTCAA
TAAGACATCAT EcoRI[GAATTC] 5'

Obrázek 9. Sekvence standardu cytochrom b *L. passim* (GenBank ID:KM980180.1).

■ = zvýraznění sekvencí primerů a proby, __ = amplifikovaný segment

Příprava reakce pro qPCR probíhala ve dvou laminárních boxech, aby nedocházelo ke kontaminacím. V prvním laminárním boxu byla připravena reakční směs. Na 1 reakci bylo použito:

- 5 μ l Master Mix Luna
- 0,4 μ l forward (F) primeru (10 μ M)
- 0,4 μ l reverse (R) primeru (10 μ M)
- 0,2 μ l proby (5 μ M)
- 2 μ l vody (RNase DNase-free)

Následně ve druhém laminárním boxu, určeném pro práci s nukleovými kyselinami, byla reakční směs po 8 μ l napipetována do 96 jamkové destičky a byly přidány 2 μ l templátu. V případě plazmidového standardu byl do reakce přidáván pouze 1 μ l templátu a 1 μ l vody. Vždy byla připravena také negativní kontrola bez templátu. Každý vzorek, včetně standardu a negativní kontroly, byl připravován v technickém duplikátu. Destička s kompletními reakcemi byla přelepena transparentní fólií a analyzována na termocykleru CFX96 Touch Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad) (Tabulka 4).

Tabulka 4. Podmínky amplifikace při kvantifikaci *L. passim* pomocí qPCR.

krok	teplota	čas	počet cyklů
počáteční denaturace	95 °C	60 s	40 ×
denaturace	95 °C	15 s	
nasedání primerů a elongace	60 °C	30 s	

Standardní křivka byla vynesena, jako logaritmus vstupní koncentrace DNA proti cyklu kvantifikace (C_q). Hodnota C_q určuje počet cyklů potřebných k vytvoření fluorescenčního signálu, při němž amplifikace dosahuje exponenciálního nárůstu. Standardní křivka při qPCR na *L. passim* dosahovala korelačního koeficientu r^2 0,996 až 0,999. Výsledné hodnoty C_q jednotlivých technických duplikátů byly porovnány a vzorek byl přeměřen, pokud se lišily o více než 0,5.

4.13 Kvantifikace *L. passim* pomocí ddPCR

Porovnání qPCR a ddPCR proběhlo na vzorkách ze včel, ředěných na koncentraci 10 ng/μl. K porovnání byl použit také standard užívaný pro konstrukci standardní křivky při qPCR připravený desítkovou ředící řadou (10^6 až 10^0). Cirkulární molekuly nejsou pro kvantifikaci pomocí ddPCR vhodné, proto byla předem provedena linearizace plazmidové DNA. Restrikční reakce o objemu 40 μl obsahovala:

- 4 μl templátu (10^6 kopií/μl)
- 4 μl FastDigest pufru (Thermo Fisher Scientific)
- 1 μl enzymu BamHI (Thermo Fisher Scientific)
- 1 μl enzymu EcoRI (Thermo Fisher Scientific)
- 30 μl vody

Restrikční reakce probíhala 1 hodinu při 37 °C a následně byla 10 min inaktivována při 95 °C. Z výsledného produktu linearizované DNA byla zhotovena desítková ředící řada.

Příprava vzorků pro ddPCR probíhala v laminárním boxu. Každá 22 μl reakce obsahovala:

- 11 μl ddPCR Supermix for Probes (Bio-Rad)
- 0,99 μl F primeru (10 μM)
- 0,99 μl R primeru (10 μM)
- 0,55 μl proby (5 μM)
- 3,47 μl vody
- 5 μl templátu

Měření bylo provedeno s použitím TaqMan sondy a primerů, využívaných také pro kvantifikaci pomocí qPCR. Každý vzorek byl připravován v technickém tetraplikátu a vždy byl zařazen také tetraplikát negativní kontroly bez templátu. Připravené reakce byly přikryty neprůsvitnou hliníkovou fólií a uloženy na led. Takto byly přeneseny do ddPCR laboratoře. Zde byly připravené reakce po 20 μl napipetovány do destičky pro tvorbu kapek. Následovalo přidání 70 μl oleje. Destička byla zakryta gumičkou a umístěna do QX200 Droplet Generator (Bio-Rad). Vytvořené kapky byly opatrně po 40 μl přeneseny do 96 jamkové destičky. Destička byla přetažena hliníkovou fólií a uložena do termocykleru C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad) (Tabulka 5). Kvantifikace pozitivních kapek byla následně provedena v QX200 Droplet Reader (Bio-Rad).

Tabulka 5. Podmínky amplifikace při kvantifikaci *L. passim* pomocí ddPCR.

krok	teplota	čas	počet cyklů
počáteční denaturace	95 °C	10 min	40 ×
denaturace	94 °C	30 s	
nasedání primerů a elongace	60 °C	1 min	
deaktivace enzymů	98 °C	10 min	
ukončení reakce	12 °C	10 min	

4.14 Kvantifikace Viru deformovaných křídel pomocí qPCR

Pro qPCR na viry DWV byl využíván gen RNA-dependentní RNA polymerázy (RdRp) a délka amplionu odpovídala 156 bp. Pro kvantifikaci DWV A i DWV B byl používán stejný F primer a rozlišné R primery (Tabulka 6) (Kevill *et al.*, 2017; Kadlečková, 2020).

Tabulka 6. Primery používané při kvantifikaci DWV (Kevill *et al.*, 2017).

		sekvence 5' → 3'
DWV A	R – primer	CTCATTAAGTGTGTCGTTGAT
	F – primer	TACTAGTGCTGGTTTTTCCTTT
DWV B	R – primer	CTCATTAAGTGAGTTGTTGTC

Za účelem absolutní kvantifikace DWV byl používán plazmidový standard (Kevill *et al.*, 2017) (Obrázek 10). Ze standardu byla vytvořena desítková ředící řada obsahující 10^8 až 10^2 kopií genu/ μ l, která byla využívána ke konstrukci standardní křivky. Pro ředění byl použit TE pufr (10mM Tris a 1mM EDTA).

A

5' GGTTTAGATGGGTTTGATTTCGATATCTTGGGATACTAGTGCTGGTTTTTCCTTTGTCTTCA
TTAAAGCCACCTGGAACATCAGGTAAGCGATGGTTGTTTGATATTGAGCTACAAGATTCCG
GGATGTTATCTCTTGCCTGGAATGCGTCCCGAACTTGAGATTCAATTATCAACGACACAG
TTAATGAGGAAAAAGGGAATAAAACCTCACACTATATTCACGGATTGTTTAAAAGATACT
TGTTCCTGTTGAAAAATGTAGAATACCTGGTAAGACTAGAAATATTTAGTATAAGTCCG
GTACAGTTTACTATACCGTTTCGACAGTATTACTTAGACTTTATGGCATCCTATCGAGCTG
CACGAC 3'

B

5' TTTGGATGGCTTTGATTCAATATCCTGGAATTACTAGTGCTGGTTTTTCCTTTATCTTCATT
AAAACCGCCAGGCTCTTCTGGTAAGCGATGGTTGTTTGATATTGAATTACAAGATTACAGG
ATGTTATCTTTTGAGAGGGATGAGACCTGAACTTGAGATACAGTTGACAACAACCTCAGTT
AATGAGGAAGAAGGGAATAAAGCCTCATACTATATTCACGGATTGTTTGAAAGATACAT
GTTTCCTGTGGAAAAATGCAGAATACCTGGTAAGACTAGAAATATTTAGTATAAGTCCCG
TCCAATTACGATTCC 3'

Obrázek 10. Sekvence zaklonovaných fragmentů genomů DWV používaných jako standard pro qPCR.

A = Sekvence standardu pro DWV A (GenBank ID: NC004830.2), B = Sekvence standardu pro DWV B (GenBank ID: AY251269.2), _ = amplifikovaný segment, ■ = zvýraznění sekvencí primerů

Příprava reakce pro qPCR probíhala ve dvou laminárních boxech. V prvním laminárním boxu byla připravena směs SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix, primerů a vody. Na jednu 10 µl reakci bylo použito:

- 5 µl SYBR Green Supermix (Bio-Rad)
- 0,375 µl F primeru (10 µM)
- 0,375 µl R primeru (10 µM)
- 3,25 µl vody (RNase DNase-free)

Následně v druhém laminárním boxu byl mix napipetován po 9 µl do bílé 96 jamkové destičky a byl přidán 1 µl templátu. I zde byla vždy připravena negativní kontrola bez templátu a každý vzorek, včetně standardu a negativní kontroly byl připravován v technickém duplikátu. Destička s kompletními reakcemi byla přelepena transparentní folií a následovalo měření v přístroji CFX96 Touch Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad) (Tabulka 7).

Tabulka 7. Podmínky amplifikace při kvantifikaci DWV pomocí qPCR.

krok	teplota	čas	počet cyklů
počáteční denaturace	95 °C	30 s	40 ×
denaturace	95 °C	15 s	
nasedání primerů	58,5 °C	15 s	
elongace	72 °C	15 s	
finální extenze	72 °C	0,5 s	

Výsledné hodnoty C_q jednotlivých duplikátů byly porovnány a pokud se hodnoty lišily o více než 0,5, byl vzorek přeměřen. Standardní křivka byla konstruována jako logaritmus vstupní koncentrace DNA proti C_q. Korelační koeficient standardní křivky při qPCR na DWV A dosahoval hodnot $r^2 = 0,990$ až 0,998 a v případě DWV B $r^2 = 0,990$ až 0,999.

4.15 Referenční geny

Referenční geny byly kvantifikovány pro zjištění úspěšnosti izolace nukleových kyselin a reverzní transkripce. Na základě hodnot C_q referenčního genu byly následně normalizovány výsledky kvantifikace *L. passim* a DWV. Pro DNA vzorky byl používán gen pro včelí 18S rRNA (Xu *et al.*, 2018). Pro jeho kvantifikaci ve vzorku byl používán Luna® Universal qPCR Master Mix v kombinaci s TaqMan probou, tak jako v případě qPCR na *L. passim* (vizte 4.12). V případě cDNA vzorků byl užíván gen pro včelí β aktin (Kevill *et al.*, 2017). K jeho kvantifikaci byl používán SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix a reakce byla připravována tak jako pro měření DWV (vizte 4.14). V případě 18S rRNA byly podmínky amplifikace stejné jako při kvantifikaci *L. passim*. Pro detekci β aktinu v cDNA byly používány podmínky amplifikace odlišné (Tabulka 8). Používané primery a probu vizte v Tabulce 9. V případě referenčních genů nebyla prováděna absolutní kvantifikace. Pro potřeby normalizace dat byly používány pouze hodnoty C_q.

Tabulka 8. Podmínky amplifikace při kvantifikaci β aktinu v cDNA pomocí qPCR.

krok	teplota	čas	počet cyklů
počáteční denaturace	95 °C	30 s	40 ×
denaturace	95 °C	10 s	
extenze	60 °C	25 s	
finální extenze	65 °C	0,5 s	

Tabulka 9. Primery a proba používané při kvantifikaci referenčních genů β aktinu a 18S rRNA.

		sekvence 5' → 3'
β aktin (Kevill <i>et al.</i> , 2017)	F – primer	CCTGGAATCGCAGATAGAATGC
	R – primer	AAGAATTGACCCACCAATCCATAC
18S rRNA (Xu <i>et al.</i> , 2018)	F – primer	TAAGTGGCATTATGTGGTACGTC
	R – primer	CCTCGACACTCAGTGAAGAGC
	proba	Cy5 – AGCTCCTYGCGGGCGGTCCAA – BHQ1

4.16 Analýza dat a statistika

Kvantifikace cílového genu byla realizována s použitím standardní křivky, díky čemuž byly získávány informace o přesné kvantitě cílového genu ve vzorku (starting quantity – SQ). Hodnota SQ udávala počet kopií cílového genu ve vzorku před začátkem PCR. Při použití cDNA, tedy při kvantifikaci DWV, byla koncentrace cDNA známá. Do každé reakce bylo použito 40 ng cDNA. Při kvantifikaci *L. passim* však bylo do reakce vnášeno pokaždé jiné množství DNA. Výsledné SQ tedy bylo následně přepočteno na 1 ng použité DNA nebo cDNA (SQ_{ng}), aby bylo možné výsledky porovnávat. Tato hodnota byla následně normalizována podle C_q referenčního genu (C_{qref}) jako $Q = (\emptyset C_{qref} / C_{qref}) \times SQ_{ng}$. Výsledkem byla normalizovaná hodnota Q (quantity) odpovídající počtu kopií cílového genu na 1 ng použité DNA nebo cDNA. Za účelem porovnání získaných dat s dalšími studiemi byl počet kopií cílového genu přepočítáván také na celé tělo včely či roztoče, jako $Q \times$ počet nanogramů izolovaných z daného jedince. Toto číslo je však spíše orientační a není proto používáno pro statistické vyhodnocení.

Jako limit detekce pro DWV i pro *L. passim* byla považována hodnota $SQ < 10^2$ (Highfield *et al.*, 2009; Taylor, Laperriere a Germain, 2017), což přibližně odpovídá $C_q > 30$. Pod touto hodnotou SQ byla hladina infekce považována za neprůkaznou. V kapitole 4 nejsou takové hodnoty označovány jako 0, protože nelze tvrdit, že se cílový gen ve vzorku nevyskytoval. Namísto toho jsou označovány zkratkou PLD, tedy Pod Limitem Detekce.

Po provedení normalizace byly hodnoty Q_{log} v každé skupině podrobeny testu normálního rozdělení pomocí Shapiro-Wilk testu. Následně byly provedeny statistické testy signifikance s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$. Podle typu dat byl prováděn t-test nebo jednofaktorová ANOVA. Výsledek statistického testu je prezentován *p*-hodnotou (*p*).

5 Výsledky

Pro zjištění interakce *L. passim* s DWV byly navrženy dva typy experimentů, které byly postupně optimalizovány. Prvním typem byl klíčkový experiment, provedený v laboratorních podmínkách. Druhým typem byl úlový experiment, jenž probíhal částečně v laboratoři a částečně v prostředí včelstva. Kromě těchto dvou interakčních pokusů byl proveden také test infekce *L. passim* letní a zimní generace včel. Do všech experimentů na počátku vstupovaly námi sebrané zdravé líhnoucí se včely. Kromě vzorků z experimentů samotných byly analyzovány také dospělé včely z přirozeného prostředí včelstva (neovlivněné záměrnou infekcí) aby bylo známo, jaká byla aktuální infekční situace na včelnici. Z prostředí včelstva byli také odebráni 10 dní staří trubci za účelem zjištění infekce *L. passim*.

Ze získaných vzorků byla izolována DNA pro kvantifikaci *L. passim* a RNA pro kvantifikaci virů DWV A a DWV B. Získaná RNA byla pomocí reverzní transkripce přepsána do formy cDNA. U jednotlivých vzorků, které byly úspěšně izolovány i transkribovány, byla provedena absolutní kvantifikace *L. passim* a DWV pomocí qPCR. Neboť byla prováděna absolutní kvantifikace, byly používány plasmidové standardy o známém počtu kopií cílového genu. Na základě standardu byla při každém měření konstruována standardní křivka jako logaritmus vstupní koncentrace DNA proti hodnotě C_q. Zároveň byla v každém vzorku měřena hladina referenčního genu, kterým byl zvolen 18S rRNA (Xu *et al.*, 2018) pro DNA vzorky a β aktin pro cDNA vzorky ze včel (Chen *et al.*, 2006; Scharlaken *et al.*, 2008; vanEngelsdorp *et al.*, 2009) a *V. destructor* (Cabrera Cordon *et al.*, 2013).

V případě kvantifikace *L. passim* bylo zároveň provedeno porovnání detekce metodami qPCR a ddPCR. Naším cílem byla optimalizace kvantifikace *L. passim* prostřednictvím ddPCR a srovnání detekční citlivosti této metody s metodou qPCR.

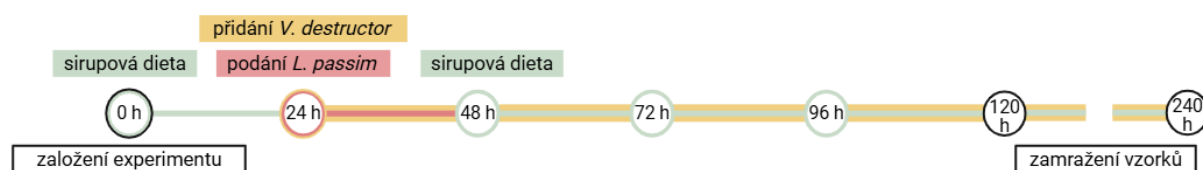
5.1 Klíčkový experiment

Klíčkový experiment byl navržen s cílem sledovat vliv infekce *L. passim* na hladiny DWV v těle včely za předem definovaných podmínek. Pro experiment byly používány líhnoucí se včely, které vzešly bez infekce *V. destructor* ze zdravého včelstva. Líhnoucí se včely byly následně rozdělovány do 4 skupin: LV (infekce *L. passim* i viry), L (infekce *L. passim*), V (infekce viry) a NK (kontrolní skupina bez infekce). Viry byly do těla včel (V a LV) vnášeny roztoči *V. destructor*. Infekční dávka *L. passim* byla včelám (LV a L) podána ve směsi s potravou. Po dokončení experimentu byla u včel ze skupin LV, V a NK provedena kvantifikace DWV a kvantifikace *L. passim* byla provedena u skupin L, LV a NK. Tento experiment byl postupně optimalizován během tří po sobě jdoucích let (2022-2024).

Pro následnou analýzu byly sbírány také včely z prostředí zdrojových včelstev. Analyzovány byly včely líhnoucí se bez infekce *V. destructor* i včely infikované. Ze včelstva zamořeného *V. destructor* byly dále analyzovány dospělé dělnice a také roztoči z dospělých a líhnoucích se včel.

5.1.1 Sezóna 2022

Pro založení klíčkového experimentu bylo v sezóně 2022 použito 105 líhnoucích se včel. Každá ze skupin LV, V a L byla zastoupena 30 dělnicemi a skupina NK 15 dělnicemi. Prvních 24 hodin experimentu byla včelám podávána čistá sirupová dieta, aby se adaptovaly na nové prostředí. Po 24 hodinách byla sirupová dieta nahrazena cukernou dietou, do níž byla u skupin LV a L přidána *L. passim*. Infekční dávka *L. passim* byla včelám podávána po dobu 24 h a následně byla všem skupinám opět podávána sirupová dieta (Obrázek 11). Po prvním adaptačním dni byli ke skupinám LV a V také přidáni roztoči (Obrázek 11), kteří pocházeli z dospělých včel včelstva zamořeného *V. destructor*. Roztoči byli ke včelám přidáváni v poměru 3 foretičtí roztoči na 1 včelu v kličce. Naším záměrem bylo sebrat 15 včel ze skupin LV, V a L 5. den po vylíhnutí a zbylých 15 včel z každé skupiny mělo být sebráno 10. den spolu se skupinou NK.



Obrázek 11. Časový harmonogram infekcí v klíčkovém experimentu 2022 (vytvořeno v programu BioRender).

Provedení klíček typu 1 používaných v tomto roce se ukázalo jako neefektivní. Krmení se vylévalo z ptačích krmítek a cukerný roztok olepoval těla včel, které následně umíraly. K takovým průběžným úmrtím docházelo ve všech skupinách. Nejvíce včel však umíralo ve skupinách V a LV. Kvůli časným úmrtím včel se podařilo sebrat skupiny LV a V pouze 5. den a do 10. dne vydržely pouze skupiny L a NK (Tabulka 10).

Tabulka 10. Souhrn sebraných vzorků z klíčkového experimentu (2022).

LV = infekce *L. passim* a *V. destructor*, V = infekce *V. destructor*, L = infekce *L. passim*, NK = kontrolní neinfikované včely

vzorky z klíčkového experimentu	počet vzorků (sebrané 5. den)	počet vzorků (sebrané 10. den)
včely skupiny LV	16	0
včely skupiny V	10	0
včely skupiny L	15	13
včely skupiny NK	0	10

U vzorků klíčkového experimentu (2022) byla primárně provedena kvantifikace *L. passim*, za účelem zjištění úspěšnosti infekce. Tato analýza ukázala, že z 26 testovaných 5 dní starých včel skupin LV a L byla infekce *L. passim* úspěšná pouze u 5 jedinců (19 %) a hladiny *L. passim* byly nízké, až na hranici detekce (Tabulka 11). Infekce u 10denních včel byla v průměru o řád vyšší než u 5denních včel, avšak byly infikovány pouze 3 včely ze 6 testovaných (50 %). Vzhledem k nízké účinnosti infekce *L. passim* nebyla kvantifikace virů u vzorků klíčkového experimentu v této sezóně provedena.

Tabulka 11. Detekce *L. passim* pomocí qPCR ve včelách klíčového experimentu (2022).

n = počet testovaných vzorků, + počet pozitivních vzorků, Ø (ng) = geometrický průměr počtu kopií/ng DNA, Ø (včela) = geometrický průměr počtu kopií v těle včely (přibližný přepočet), PLD = hladina pod limitem detekce, LV = infekce *L. passim* a *V. destructor*, L = infekce *L. passim*, NK = kontrolní neinfikované včely

typ vzorků	n	<i>Lotmaria</i>		
		+	Ø (ng)	Ø (včela)
L (10denní včely)	6	3	$1,2 \times 10^2$	$7,5 \times 10^5$
L (5denní včely)	10	2	4,3	$5,0 \times 10^4$
LV (5denní včely)	16	3	3,2	$3,7 \times 10^4$
NK (10denní včely)	8	0	PLD	PLD

Kontrolní vzorky klíčového experimentu

Paralelně s klíčovým experimentem byly odebrány kontrolní vzorky ze zdrojových včelstev, z nichž pocházely včely a roztoči pro klíčový experiment (Tabulka 12). Ze včelstva použitého jako zdroj zdravých líhnoucích se včel pro experiment byla část líhnoucích se včel analyzována pro kontrolu jejich infekce. Dále byly ze včelstva zamořeného *V. destructor* analyzovány infikované líhnoucí se včely, na nich nalezení roztoči, i starší dělnice a jejich roztoči.

Tabulka 12. Souhrn kontrolních vzorků klíčového experimentu v roce 2022.

kontrolní vzorky ze zdravého včelstva	počet vzorků
zdravé líhnoucí se včely	12
kontrolní vzorky ze včelstva zamořeného <i>V. destructor</i>	počet vzorků
líhnoucí se včely infikované <i>V. destructor</i>	29
roztoči z líhnoucích se včel	86
dospělé včely infikované <i>V. destructor</i>	10
roztoči z dospělých včel	7

U líhnoucích se včel byla provedena kvantifikace DWV i *L. passim*. U žádné z 12 analyzovaných dělnic nebyly detekovány viry ani *L. passim* v měřitelných hladinách (Tabulka 13). U včel líhnoucích se s infekcí *V. destructor* byla pouze u jedné včely ze 6 prokázána koinfekce DWV A i B, zbylé vzorky byly prosté DWV. Kvantifikace DWV byla provedena také u 10 roztočů z líhnoucích se dělnic včelstva zamořeného *Varroa*. U nich byly hladiny virů nízké, až na hraně měřitelnosti. Pomocí qPCR se podařilo prokázat přítomnost DWV pouze u 2 (20 %) roztočů z líhnoucích se včel, z nichž jeden vykazoval smíšenou infekci DWV A a DWV B (Tabulka 13).

Tabulka 13. Detekce DWV A, B a *L. passim* pomocí qPCR v kontrolních vzorcích líhnoucích se včel a roztočů z líhnoucích se včel (2022).

n = počet testovaných vzorků, + počet pozitivních vzorků, Ø (ng) = geometrický průměr počtu kopií/ng DNA, Ø (vč/ro) = geometrický průměr počtu kopií v těle včely či roztoče (přibližný přepočet), PLD = hladina pod limitem detekce, N = neměřeno

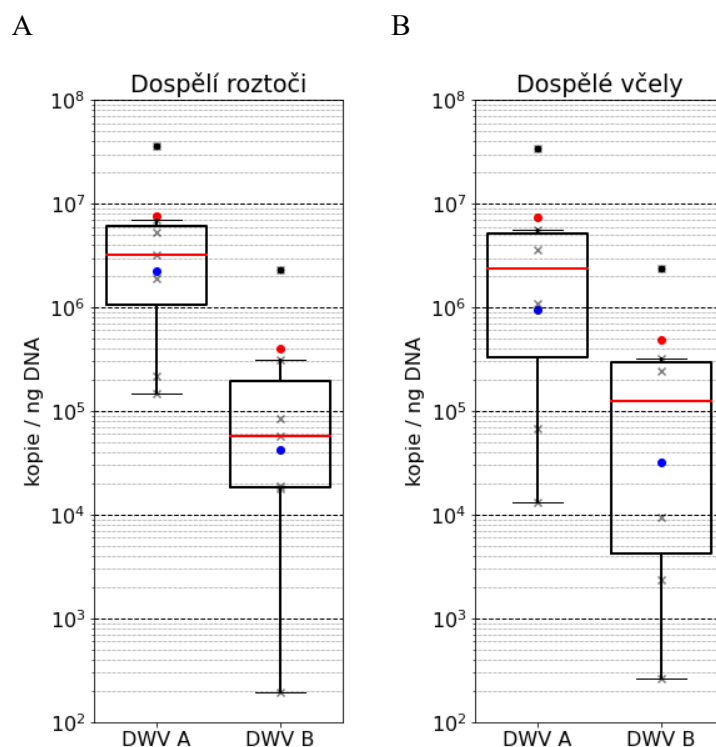
typ vzorků	n	DWV A			DWV B			Lotmaria		
		+	Ø (ng)	Ø (vč/ro)	+	Ø (ng)	Ø (vč/ro)	+	Ø (ng)	Ø (vč/ro)
zdravé líhnoucí se včely	12	0	PLD	PLD	0	PLD	PLD	0	PLD	PLD
líhnoucí se včely infikované <i>Varroa</i>	6	1	15,7	$5,0 \times 10^6$	1	4,3	$1,4 \times 10^6$	N	N	N
roztoči <i>Varroa</i> z líhnoucích se včel	10	2	12,63	$1,5 \times 10^4$	1	$7,4 \times 10^2$	$2,0 \times 10^6$	N	N	N

Ze včelstva zamořeného *V. destructor* byly analyzovány také dospělé dělnice a jejich roztoči (Tabulka 14 a Obrázek 12), kteří byli srovnatelní s těmi použitými pro infekce skupin LV a V. Hladina DWV byla měřena u 6 dospělých dělnic a 7 roztočů. U roztočů bylo průměrně detekováno $2,2 \times 10^6$ kopií viru DWV A/ng cDNA a v případě DWV B bylo průměrně detekováno $4,2 \times 10^4$ kopií viru/ng cDNA. Takto vysoké hladiny virů v použitých roztočích mohly vyústit v infekci, která byla pro organismus mladých včel letální. U dělnic byla hladina DWV infekce téměř srovnatelná s infekcemi roztočů.

Tabulka 14. Detekce DWV A a DWV B pomocí qPCR v kontrolních vzorcích dospělých včel a z nich sebraných roztočů (2022).

n = počet testovaných vzorků, + počet pozitivních vzorků, Ø (ng) = geometrický průměr počtu kopií/ng DNA, Ø (vč/ro) = geometrický průměr počtu kopií v těle včely/roztoče (přibližný přepočet)

typ vzorů	n	DWV A			DWV B		
		+	Ø (ng)	Ø (vč/ro)	+	Ø (ng)	Ø (vč/ro)
dospělé včely infikované <i>Varroa</i>	6	6	$9,4 \times 10^5$	$1,9 \times 10^{11}$	6	$3,2 \times 10^4$	$6,6 \times 10^9$
roztoči <i>Varroa</i> z dospělých včel	7	7	$2,2 \times 10^6$	$5,7 \times 10^9$	7	$4,2 \times 10^4$	$7,0 \times 10^7$



Obrázek 12. Hladina DWV A a DWV B u dospělých forezních roztočů (graf A) a u dospělých včel (graf B), z nichž tyto roztoči pocházeli.

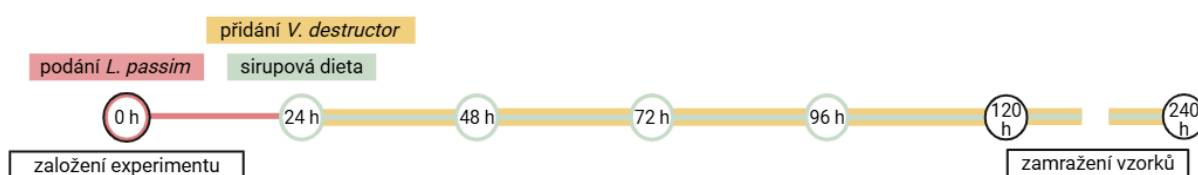
● = průměr, ● = geometrický průměr, — = medián, × = vzorek

Za účelem optimalizace experimentu bylo rozhodnuto, že v příští sezóně budou provedeny následující změny:

- Bude použit jiný typ klícky a krmítka, aby nedocházelo k vylévání potravy.
- Pro přenos DWV budou použiti roztoči z líhnoucích se včel a budou přidáváni pouze 2 na 1 včelu v klícce, aby byla snížena infekční dávka virů.
- Infekční dávka *L. passim* bude včelám podávána ihned od prvního dne, aby byla zvýšena šance na uchycení infekce.

5.1.2 Sezóna 2023

V této sezóně byl experiment založen s 80 líhnoucími se včelami a každá ze 4 skupin byla zastoupena 20 dělnicemi. Včely byly po dobu experimentu chovány v klíčkách typu 2 a *L. passim* byla včelám podávána již od 1. dne (Obrázek 13). Infekce DWV byla zprostředkována roztoči sebranými z líhnoucích se včel včelstva zamořeného *V. destructor*, kteří byli ke skupinám V a LV přidáváni v poměru 2 roztoči na 1 včelu. Experiment proběhl podle předpokladu a většina včel přežila do 10. dne (Tabulka 15).



Obrázek 13. Časový harmonogram infekcí v klíčkovém experimentu 2023 (vytvořeno v programu BioRender).

Tabulka 15. Souhrn vzorků z klíčkového experimentu v roce 2023.

LV = infekce *L. passim* a *V. destructor*, V = infekce *V. destructor*, L = infekce *L. passim*, NK = kontrolní neinfikované včely

typ vzorků	počet vzorků (sebrané 10. den)
včely skupiny LV	15
včely skupiny V	14
včely skupiny L	12
včely skupiny NK	12
roztoci <i>Varroa</i> ze skupin LV a V	15

U vzorků sebraných 10. den byly kvantifikovány viry DWV a *L. passim* (Tabulka 16). V žádném ze vzorků skupin LV a V (25 vzorků) nebyly detekovány viry. Stejně tak nebyly detekovány viry DWV ani v roztočích sebraných ze skupin LV a V.

V případě infekcí *L. passim* bylo dosaženo výsledků srovnatelných s předchozím rokem. Z 24 testovaných včel ze skupin LV a L byla *L. passim* detekována u 11 jedinců (46 %) a hladiny *L. passim* byly nízké (Tabulka 16).

Tabulka 16. Detekce DWV A, B a *L. passim* pomocí qPCR ve vzorcích klíčkového experimentu (2023).

n = počet testovaných vzorků, + počet pozitivních vzorků, Ø (ng) = geometrický průměr počtu kopií/ng DNA, Ø (vč/ro) = geometrický průměr počtu kopií v těle včely/roztoce (přibližný přepočet), PLD = hladina pod limitem detekce, N = neměřeno, LV = infekce *L. passim* a *V. destructor*, V = infekce *V. destructor*, L = infekce *L. passim*, NK = kontrolní neinfikované včely

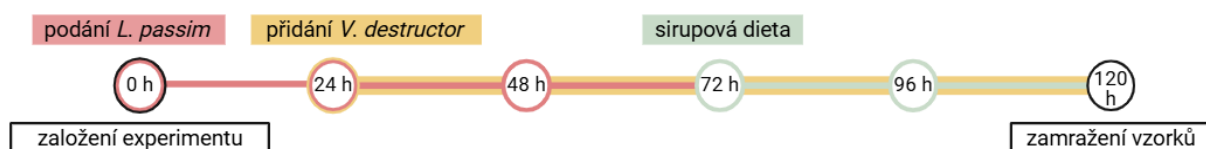
typ vzorků	n	DWV A			DWV B			<i>Lotmaria</i>		
		+	Ø (ng)	Ø (vč/ro)	+	Ø (ng)	Ø (vč/ro)	+	Ø (ng)	Ø (vč/ro)
LV	15	0	PLD	PLD	0	PLD	PLD	10	41	$1,9 \times 10^5$
V	10	0	PLD	PLD	0	PLD	PLD	N	N	N
L	9	N	N	N	N	N	N	1	4	$1,5 \times 10^4$
NK	6	0	PLD	PLD	0	PLD	PLD	0	PLD	PLD
<i>Varroa</i> (LV a V)	10	0	PLD	PLD	0	PLD	PLD	N	N	N

Pro optimalizaci experimentu byly navrženy další změny:

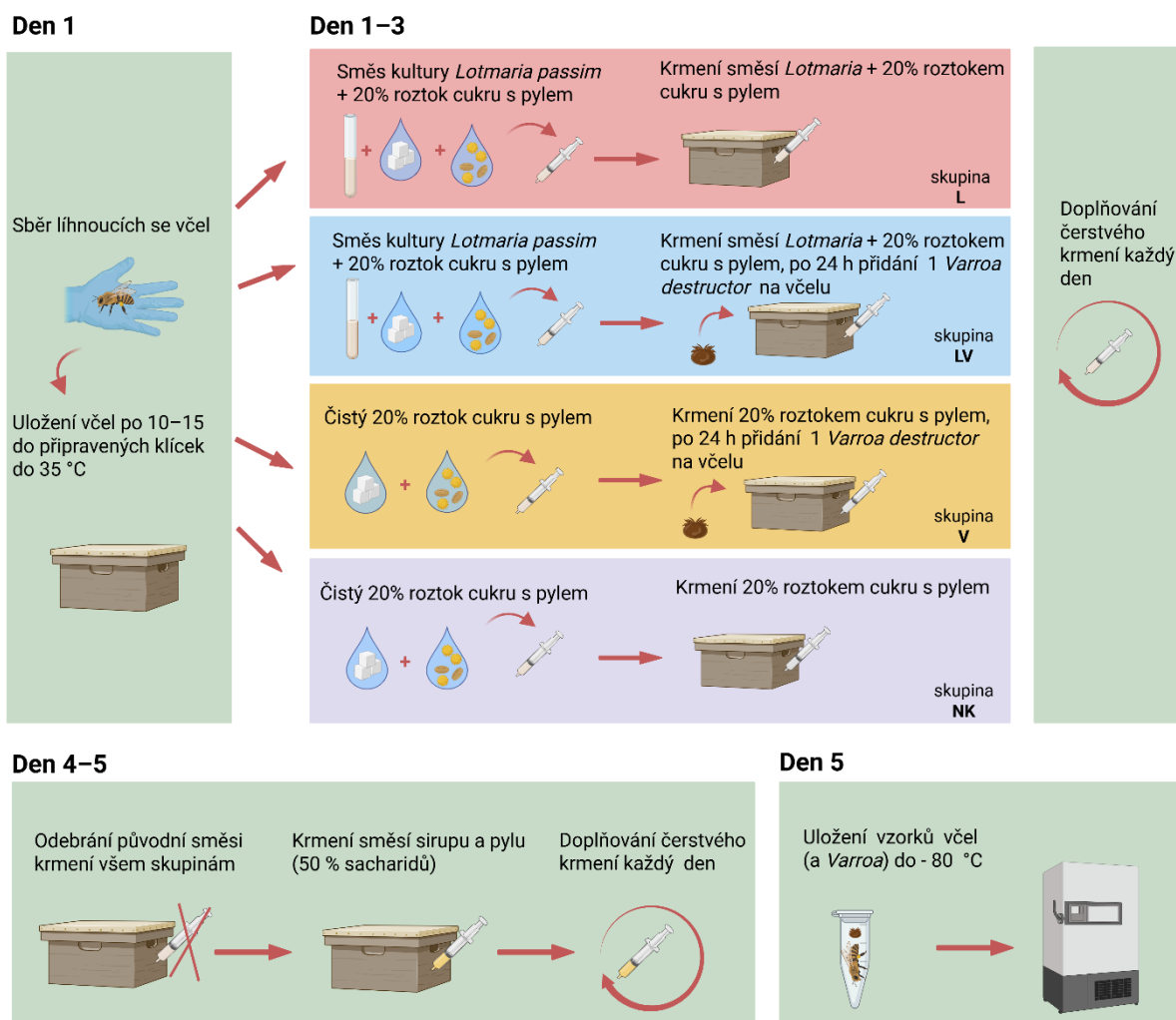
- K přenosu DWV budou použiti roztoci z líhnoucích se včel, kteří budou před experimentem infikováni viry na dospělých včelách z *Varroa* zamořeného včelstva – skupina udržovacích včel (vizte 4.3).
- Doba podávání infekční dávky *L. passim* bude prodloužena z 24 h na 72 h za účelem zvýšení úspěšnosti a intenzity infekce.

5.1.3 Sezóna 2024

V této sezóně byl experiment založen se 105 líhnoucími se včelami. Každé ze skupin L, LV a V byla zastoupena 30 dělnicemi a skupina NK 15 dělnicemi. Virové infekce byly v tomto roce na včely přenášeny roztoči z udržovacích včel. Jednalo se o roztoče, kteří byli těsně po vylihnutí přeneseni na dospělé včely ze včelstva zamořeného *V. destructor*. Po 24 hodinách inkubace s těmito udržovacími včelami byli roztoči přeneseni na včely ze skupin V a LV klíčkového experimentu. Schématické finálního provedení klíčkového experimentu vizte na Obrázku 14 a 15.



Obrázek 14. Časový harmonogram infekcí v klíčkovém experimentu 2024 (vytvořeno v programu BioRender).



Obrázek 15. Schéma průběhu klíčkového experimentu 2024 (vytvořeno v programu BioRender).

Již 5. den experimentu začaly včely ze skupin LV a V umírat. Experiment byl tudíž ukončen a vzorky byly odebrány 5. den na místo zamýšleného 10. dne (Tabulka 17). V době zamražení byly včely 4 dny po přidání *V. destructor* a 5 dní po prvním podání infekce *L. passim* (Obrázek 14).

Tabulka 17. Souhrn vzorků z klíčkového experimentu v roce 2024.

LV = infekce *L. passim* a *V. destructor*, V = infekce *V. destructor*, L = infekce *L. passim*, NK = kontrolní neinfikované včely

vzorky z klíčkového experimentu	počet vzorků (sebrané 5. den)
včely skupiny LV	23
včely skupiny V	29
včely skupiny L	24
včely skupiny NK	16
kontrolní vzorky	počet vzorků
udržovací včely	10

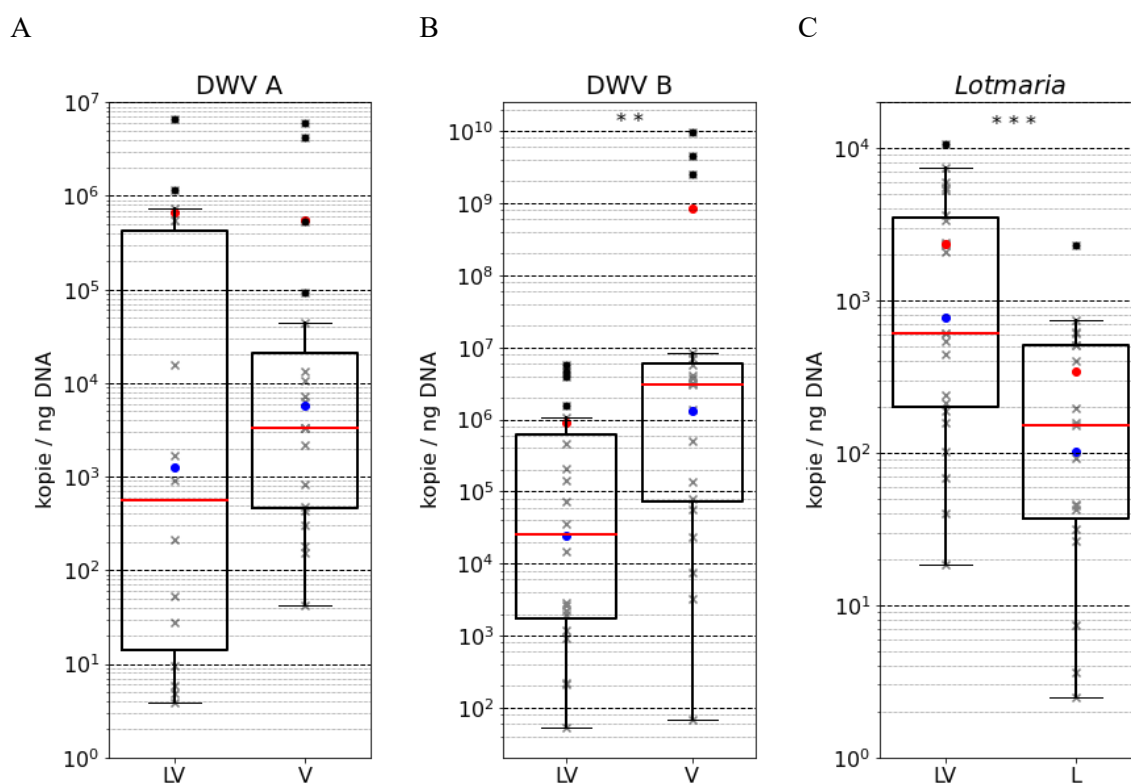
Kvantifikace *L. passim* byla provedena u skupin L, LV a NK a kvantifikace DWV byla provedena u skupin LV, V a NK (Tabulka 18). *Lotmaria* byla včelám podávána po dobu 3 dní již od vylíhnutí v infekční dávce 10^6 buněk na 1 ml potravy. Z 23 včel ve skupině LV a 19 včel skupiny L bylo 100 % včel pozitivních. Ve skupině LV bylo celkem testováno 23 včel, z nichž 14 (61 %) bylo pozitivních na DWV A a 20 (86 %) na DWV B. Ve skupině V bylo celkem testováno 24 včel, z nichž bylo 20 (83 %) pozitivních na DWV A a 20 (83 %) na DWV B, u 90 % byla prokázána koinfekce DWV A a B. V této sezóně vykazovala i skupina NK infekci DWV A a B, byť velice slabou v porovnání se skupinami infikovanými roztoči. Kvantifikace DWV u udržovacích včel prokázala rozvinutou virovou infekci ve včelstvu zamořeném *V. destructor*. Průměrné hladiny DWV u udržovacích včel odpovídaly přibližně 4×10^4 kopií/ng DNA.

Tabulka 18. Detekce DWV A, B a *L. passim* pomocí qPCR ve vzorcích klíčkového experimentu (2024).

n = počet vzorků, + počet pozitivních vzorků, Ø = geometrický průměr počtu kopií/ng DNA, Ø (včela) = geometrický průměr počtu kopií v těle včely (přibližný přepočet), PLD = hladina pod limitem detekce, N = neměřeno, LV = infekce *L. passim* a *V. destructor*, V = infekce *V. destructor*, L = infekce *L. passim*, NK = kontrolní včely

typ vzorků	n	DWV A			DWV B			<i>Lotmaria</i>		
		+	Ø (ng)	Ø (včela)	+	Ø (ng)	Ø (včela)	+	Ø (ng)	Ø (včela)
LV	23	14	$1,3 \times 10^3$	$1,8 \times 10^7$	20	$2,5 \times 10^4$	$3,8 \times 10^8$	23	$7,8 \times 10^2$	$3,9 \times 10^6$
V	24	20	$5,8 \times 10^3$	$5,1 \times 10^7$	20	$1,3 \times 10^6$	$1,1 \times 10^{10}$	N	N	N
L	19	N	N	N	N	N	N	19	$1,0 \times 10^2$	$5,8 \times 10^5$
NK	11	4	5,3	$5,4 \times 10^4$	6	10,2	$8,8 \times 10^4$	0	PLD	PLD
udržovací včely	9	6	$6,3 \times 10^4$	$1,6 \times 10^9$	9	$1,6 \times 10^4$	$3,8 \times 10^8$	N	N	N

Hladiny virů DWV A i DWV B byly vyšší ve skupině V, tedy ve skupině bez přítomnosti *L. passim* (Obrázek 16). *Lotmaria* byla hojnější u včel skupiny infikované i *V. destructor* (LV), ve srovnání se skupinou bez *V. destructor* (L) (Obrázek 16). Normální rozdělení dat bylo ověřeno pomocí Shapiro-Wilk testu a skupiny mezi sebou byly porovnány pomocí dvouvýběrového nepárového t-testu. Ve skupině V byla signifikantně vyšší hladina DWV B než ve skupině LV ($p = 0,0024$). Pro DWV A tento fenomén nebyl prokázán ($p = 0,149$). Ve skupině L bylo signifikantně méně *L. passim*, než ve skupině LV ($p = 0,00054$).



Obrázek 16. Porovnání hladin DWV a *L. passim* pomocí qPCR u skupin infikovaných viry prostřednictvím *V. destructor*, *L. passim* a oběma typy infekčních agens z klíčkového experimentu 2024.

A = hladina DWV A, B = hladina DWV B, C = hladina *L. passim*, LV = infekce *L. passim* i *V. destructor*, V = infekce *V. destructor*, L = infekce *L. passim*, ● = průměr, ● = geometrický průměr, — = medián, × = vzorek, * * ($p \leq 0.01$), * * * ($p \leq 0.001$)

5.2 Úlový experiment

V sezóně 2023 byla ke klíčkovému experimentu navržena alternativní varianta, tzv. úlový experiment. V tomto pokusu by bylo možné pozorovat vliv *L. passim* na hladiny DWV v přirozeném prostředí včelstva. Včely byly barevně značeny (Obrázek 17), infikovány *L. passim* a následně umísťovány do 2 vybraných včelstev (včelstvo infikované *V. destructor* a zdravé včelstvo). Ve věku 10 dní byly ze včelstev opět vybírány a záměrem bylo sebrání alespoň 15 jedinců z každé skupiny. Experiment byl realizován ve 2 po sobě jdoucích sezónách.



Obrázek 17. Modře značená dělnice umístěná do vybraného zdravého včelstva.

5.2.1 Sezóna 2023

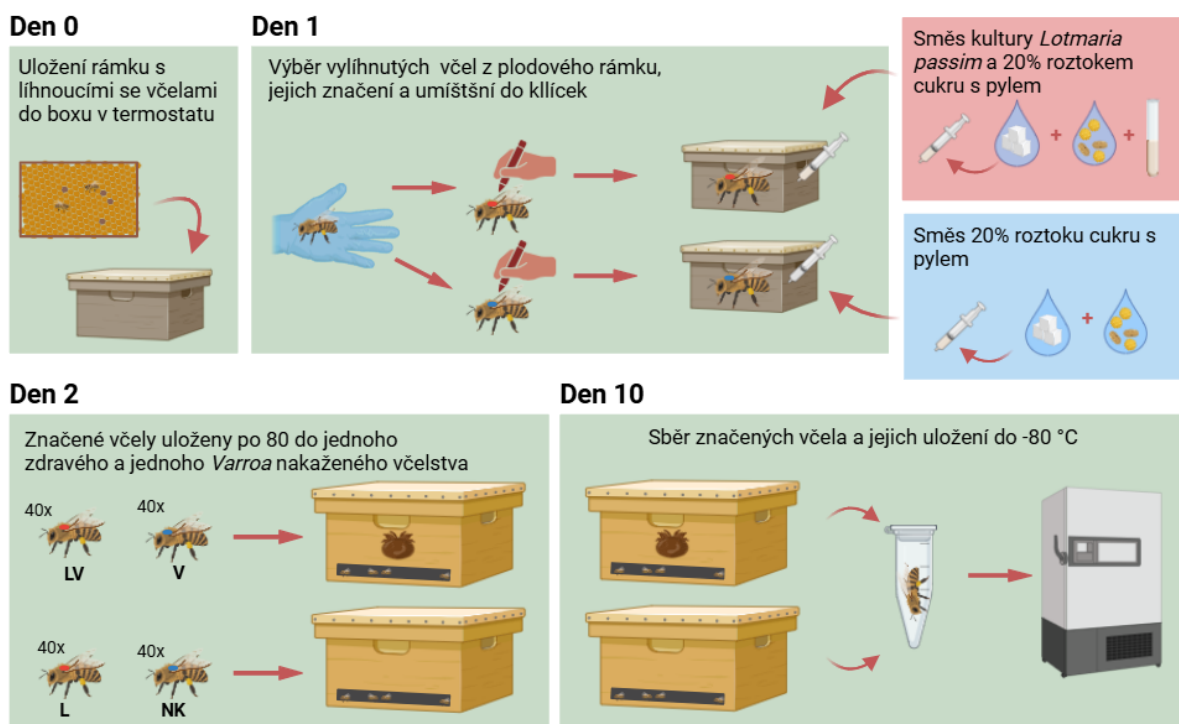
V této sezóně nebyly včely pro experiment sbírány přímo během líhnutí, protože bylo potřeba sebrat větší množství včel ve srovnání s klíčkovým experimentem. Namísto toho byl vybrán rámeček s líhnoucím se plodem, který byl uložen na 15 hodin do termostatu (35 °C). Vylíhnuté včely byly z rámečku následně vybrány a označeny červenou a modrou barvou. Celkem bylo v sezóně 2023 sebráno 160 včel. Červená skupina (80 včel) byla 24 hodin krmena 20% roztokem cukru s pylem a infekční dávkou *L. passim*. Modré skupině bylo podáno stejné krmení bez *L. passim*. Včely byly chovány v klíčkách typu 2 v termostatu při 35 °C. Po uplynutí 24 hodin byla polovina včel z červené a modré skupiny umístěna do včelstva zamořeného *V. destructor* a zbytek včel z obou skupin byl umístěn do zdravého včelstva. Vznikly tak 4 skupiny (LV, V, L, NK) srovnatelné se skupinami klíčkového experimentu. Schéma provedení úlového experimentu v tomto roce vizte na Obrázku 18.

V sezóně 2023 se podařilo nasbírat přes 15 dělnic v každé skupině a před samotným experimentem bylo z obou použitých včelstev odebráno také 200 náhodných dospělých dělnic pro následnou analýzu (Tabulka 19). Včely z prostředí sloužily jako kontrola původního stavu včelstva.

Tabulka 19. Souhrn vzorků z úlového experimentu v roce 2023.

LV = infekce *L. passim* a *V. destructor*, V = infekce *V. destructor*, L = infekce *L. passim*, NK = kontrolní neinfikované včely

vzorky z úlového exp.	počet vzorků
včely skupiny LV	17
včely skupiny V	22
včely skupiny L	19
včely skupiny NK	15
kontrolní vzorky	počet vzorků
včely ze zdravého včelstva	200
včely ze včelstva zamořeného <i>V. destructor</i>	200



Obrázek 18. Schéma průběhu úlového experimentu v roce 2023 (vytvořeno v programu BioRender).

U sebraných vzorků byla provedena kvantifikace DWV A, B a *L. passim* (Tabulka 20). Ve skupině LV ani L se nepodařilo detekovat *L. passim* a nebylo tak možné pozorovat jakýkoliv vliv na hladiny virů. Předpokládaným důvodem neuchycení infekce bylo, že vylihnuté včely se dostatečně nakrmily na plodovém rámpce a následujících 24 hodin nepřijaly dostatek potravy obsahující *L. passim* a infekční dávka tak nebyla dostačující.

Hladiny virů odpovídaly předpokladům. Z 20 testovaných jedinců ze skupin LV a V bylo DWV A i B detekováno ve 100 %, přičemž hladiny DWV A byly řádově nižší než DWV B (Obrázek 19). Mezi skupinami LV a V nebyl pozorován signifikantní rozdíl v zastoupení virů, vzhledem k nepřítomnosti *L. passim*.

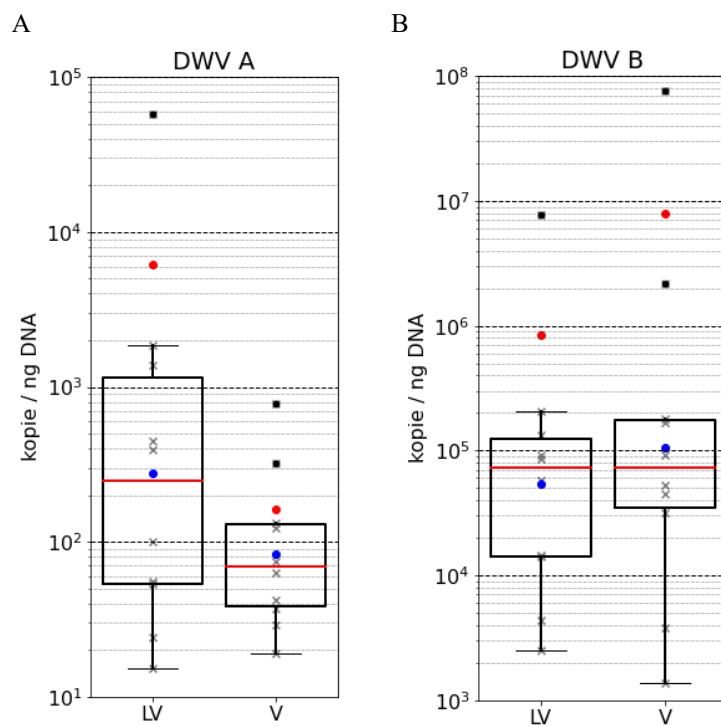
Tabulka 20. Detekce DWV A, B a *L. passim* pomocí qPCR ve vzorcích úlového experimentu (2023).

n = počet testovaných vzorků, + počet pozitivních vzorků, Ø (ng) = geometrický průměr počtu kopií/ng DNA, Ø (včela) = geometrický průměr počtu kopií v těle včely (přibližný přepočet), PLD = hladina pod limitem detekce, N = neměřeno, LV = infekce *L. passim* a *V. destructor*, V = infekce *V. destructor*, L = infekce *L. passim*, NK = kontrolní neinfikované včely

typ vzorků	n	DWV A			DWV B			<i>Lotmaria</i>		
		+	Ø (ng)	Ø (včela)	+	Ø (ng)	Ø (včela)	+	Ø (ng)	Ø (včela)
LV	10	10	$2,8 \times 10^2$	$5,5 \times 10^4$	10	$5,4 \times 10^4$	$1,3 \times 10^9$	0	PLD	PLD
V	10	10	83,4	$3,5 \times 10^4$	10	$1,1 \times 10^5$	$2,0 \times 10^9$	N	N	N
L	8	1	3,9	$2,7 \times 10^4$	4	4,6	$1,3 \times 10^5$	0	PLD	PLD
NK	5	0	PLD	PLD	4	8,6	$1,5 \times 10^5$	0	PLD	PLD

Za účelem zajištění infekce *L. passim* byly pro příští sezónu navrženy následující úpravy:

- Líhnoucí se včely budou odebírány a značeny přímo během líhnutí, tak jako v klikovém experimentu.
- Doba podávání infekční dávky *L. passim* bude prodloužena z 24 h na 72 h.



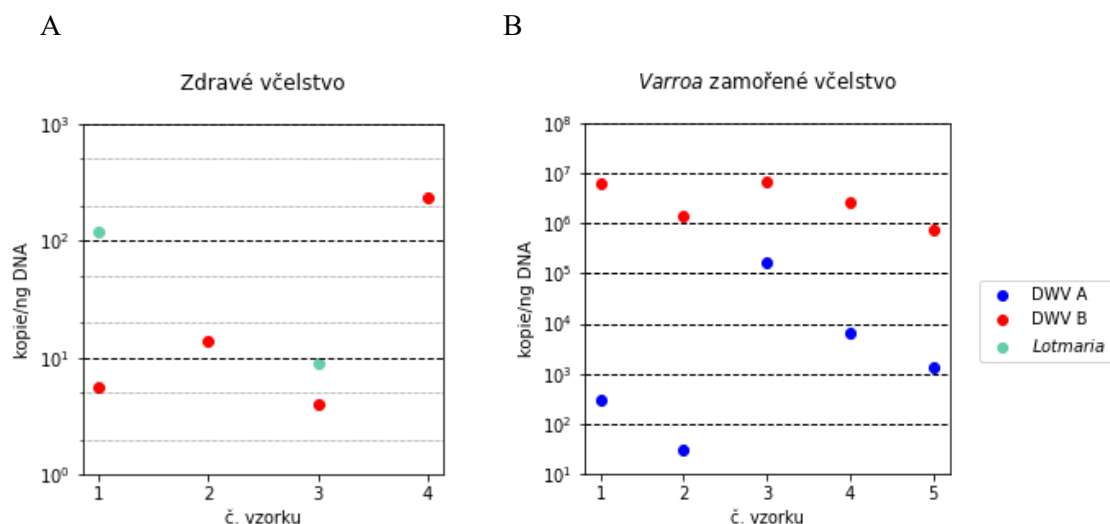
Obrázek 19. Hladina DWV A (graf A) a DWV B (graf B) u skupin LV (*L. passim* i *V. destructor*) a V (infekce *V. destructor*) z úlového experimentu 2023.

● = průměr, ● = geometrický průměr, — = medián, × = vzorek

Kvantifikace DWV A, B a *L. passim* byla provedena také u 100 náhodně sebraných včel ze zdrojových včelstev (Tabulka 21). Pro analýzu bylo použito z každého včelstva 50 jedinců. Včely však nebyly testovány jednotlivě, ale v 5 směsných vzorcích po 10 jedincích. Cílem bylo zjistit, v jakém prostředí se po dobu pokusu experimentální včely vyskytovaly. Ve zdravém včelstvu byly detekovány pouze *L. passim* a DWV B, v hladinách na hranici detekčního limitu (Tabulka 21 a Obrázek 20). Ve včelstvu zamořeném *V. destructor*, které bylo použito jako zdroj virů byly ve vysokých hladinách detekovány viry DWV A i B, zatímco *L. passim* nebyla vůbec prokázána (Tabulka 21 a Obrázek 20).

Tabulka 21. Detekce DWV A, B a *L. passim* pomocí qPCR v 5 směsných vzorcích po 10 včelách ze zdrojových včelstev (2023). n = počet testovaných vzorků, + počet pozitivních vzorků, Ø = geometrický průměr počtu kopií/ng DNA, Ø (včela) = geometrický průměr počtu kopií v těle včely (přibližný přepočet), PLD = hladina pod limitem detekce

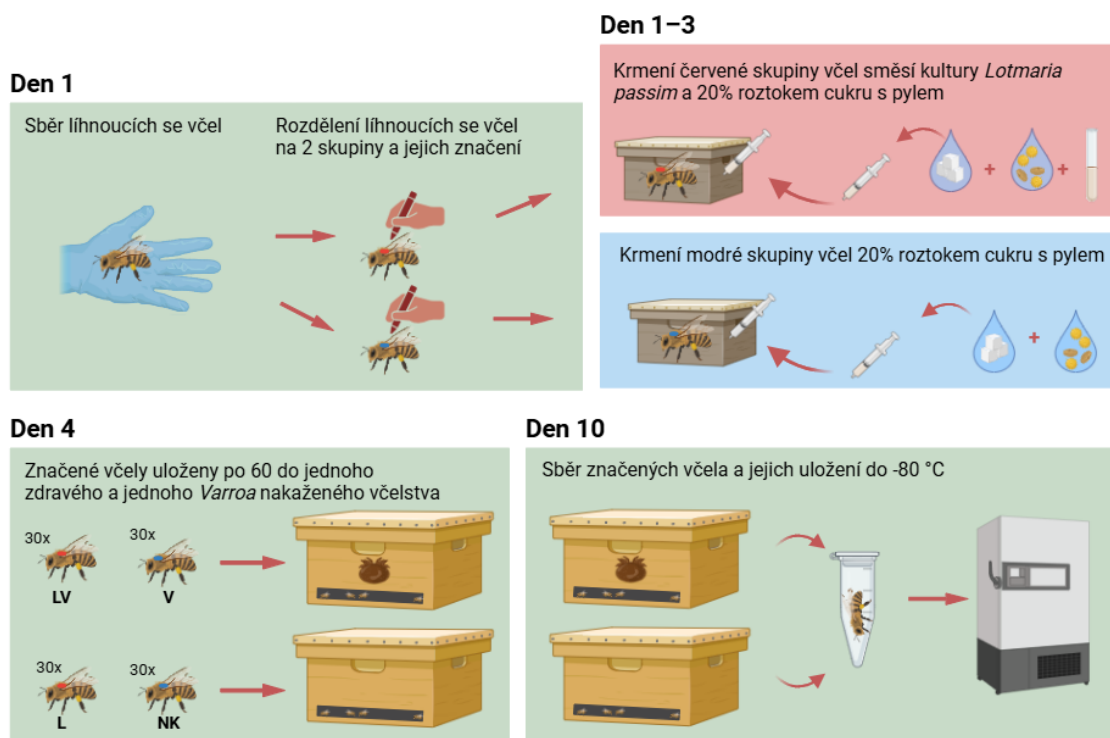
typ vzorků	n	DWV A			DWV B			Lotmaria		
		+	Ø (ng)	Ø (včela)	+	Ø (ng)	Ø (včela)	+	Ø (ng)	Ø (včela)
včelstvo infikované <i>Varroa</i>	5	5	$1,7 \times 10^3$	$4,9 \times 10^6$	5	$2,6 \times 10^6$	$7,5 \times 10^9$	0	PLD	PLD
zdravé včelstvo	5	0	PLD	PLD	4	16,4	$5,9 \times 10^4$	2	32,7	$2,2 \times 10^4$



Obrázek 20. Hladina DWV A, DWV B a *L. passim* ve zdravém zdrojovém včelstvu (graf A) a ve zdrojovém včelstvu zamořeném roztoči *V. destructor* (graf B).

5.2.2 Sezóna 2024

Úlový experiment byl v této sezóně založen se 120 včelami. Každá ze 4 skupin (LV, V, L a NK) byla tedy na začátku experimentu zastoupena 30 jedinci. Líhnoucí se včely byly odebírány a značeny přímo během líhnutí a infekční dávka *L. passim* byla červené skupině (LV a L) podávána ihned od vylíhnutí po dobu 72 h. V těchto 72 h byla modrá skupina (V a NK) krmena stejnou cukrovou dietou bez infekční dávky *L. passim*. Včely byly po tuto dobu (72 h) chovány v termostatu při 35 °C v klíčkách typu 2. Schéma provedení úlového experimentu v sezóně 2024 vizte na Obrázku 21.



Obrázek 21. Schéma úlového experimentu v roce 2024 (vytvořeno v programu BioRender).

Ze zdravého včelstva bylo sebráno více jak 50 % značených dělnic. Ze skupiny L bylo nalezeno 21 včel a ze skupiny NK 18 včel (Tabulka 22). Ve včelstvu zamořeném *V. destructor* však byly nalezeny pouze 3 včely ze skupiny LV (Tabulka 22). Zbylé včely ze skupiny V a LV nebyly nalezeny ve včelstvu ani v jeho okolí. Vzhledem k chybějícím skupinám LV a V nebyly vzorky úlového experimentu v této sezóně vyhodnocovány.

Z každého včelstva bylo také sebráno přes 200 kontrolních vzorků dospělých dělnic a ze včelstva zamořeného *V. destructor* umístěného v izolátoru bylo odebráno i 50 umírajících včel (Tabulka 22). Jednalo se o jedince, kteří se vyčerpaní a neschopní letu pohybovali po dně izolátoru.

Tabulka 22. Souhrn kontrolních vzorků a vzorků z úlového experimentu v roce 2024.

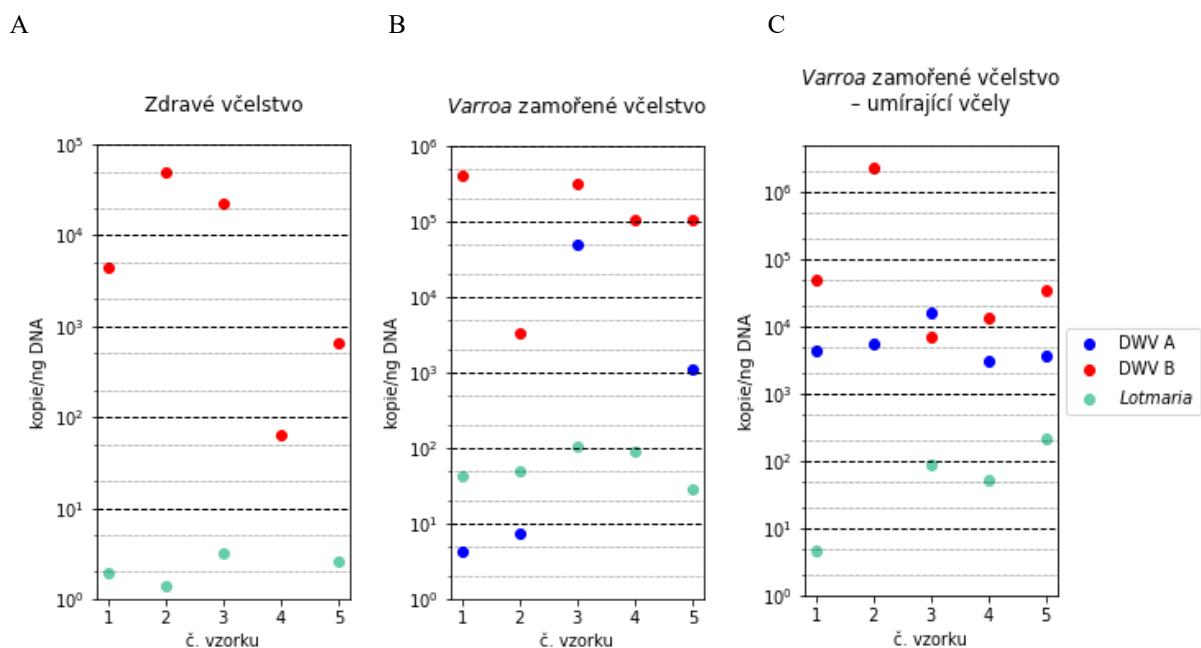
LV = infekce *L. passim* a *V. destructor*, V = infekce *V. destructor*, L = infekce *L. passim*, NK = kontrolní neinfikované včely

vzorky z úlového exp.	počet vzorků
včely skupiny LV	3
včely skupiny V	0
včely skupiny L	21
včely skupiny NK	18
kontrolní vzorky	počet vzorků
náhodné včely ze zdravého včelstva	200
náhodné včely ze včelstva zamořeného <i>Varroa</i>	200
umírající včely ze včelstva zamořeného <i>Varroa</i>	50

U kontrolních včel byly kvantifikovány hladiny virů DWV i *L. passim* (Tabulka 23), pomocí čehož byl zmapován stav infekcí ve zdrojových včelstvech. Stejně jako v předchozím roce nebyly včely testovány jednotlivě, ale v 5 směsných vzorcích po 10 jedincích. Ve zdravém včelstvu byl detekován pouze DWV B v průměrných hladinách 10^3 kopie/ng cDNA a *L. passim* v hladinách na hranici detekce (Obrázek 22). Ve včelstvu zamořeném *V. destructor* i v umírajících včelách byly detekovány DWV A, DWV B i *L. passim*. Hladiny DWV B a *L. passim* byly u zamořeného včelstva vyšší, než v případě včel ze zdravého včelstva (Obrázek 22). U umírajících včel byly pozorovány zvýšené hladiny DWV A oproti životaschopným včelám zamořeného včelstva, hladiny DWV B a *L. passim* byly u těchto dvou skupin srovnatelné.

Tabulka 23. Detekce DWV A, B a *L. passim* pomocí qPCR v 5 směsných vzorcích po 10 včelách ze zdrojových včelstev (2024). n = počet testovaných směsných vzorků (po 10 včelách), + počet pozitivních vzorků, Ø = geometrický průměr počtu kopií/ng DNA, Ø (včela) = geometrický průměr počtu kopií v těle včely (přibližný přepočet), PLD = hladina pod limitem detekce

typ vzorků	n	DWV A			DWV B			<i>Lotmaria</i>		
		+	Ø (ng)	Ø (včela)	+	Ø (ng)	Ø (včela)	+	Ø (ng)	Ø (včela)
zdravé včelstvo	5	0	PLD	PLD	5	$2,9 \times 10^3$	$3,8 \times 10^7$	4	2,2	$1,1 \times 10^3$
včelstvo infikované <i>Varroa</i>	5	4	$2,1 \times 10^2$	$1,7 \times 10^5$	5	$8,6 \times 10^4$	$9,4 \times 10^8$	5	57,1	$3,1 \times 10^4$
včelstvo infikované <i>Varroa</i> – umírající včely	5	5	$5,5 \times 10^3$	$1,1 \times 10^8$	5	$5,2 \times 10^4$	$6,3 \times 10^8$	4	46,7	$7,1 \times 10^3$



Obrázek 22. Hladina DWV A, DWV B a *L. passim* ve zdravém zdrojovém včelstvu (graf A), ve včelstvu zamořeném *V. destructor* (graf B) a v umírajících včelách ze zamořeného včelstva (graf C). Analyzováno bylo 5 směsných vzorků po 10 včelách.

Normální rozdělení dat bylo ověřeno pomocí Shapiro-Wilk testu a statistická významnost získaných dat byla zjištěna provedením dvouvýběrového nepárového t-testu. *Lotmaria* se vyskytovala významně hojněji ve včelstvu zamořeném *V. destructor*, než ve zdravém včelstvu ($p = 0,00001$).

5.3 Testování infekce *L. passim* u trubců

V průběhu sběru vzorků v sezóně 2023 bylo nalezeno a označeno 20 líhnoucích se trubců (Obrázek 23). Ti byli následně ze zdravého včelstva vybíráni ve věku 10 dní a byla u nich provedena kvantifikace *L. passim*. Cílem této analýzy bylo ověřit, zda se *L. passim* vyskytuje kromě dělnic také u trubců. V žádném z těchto 20 jedinců však nebyla *L. passim* detekována. Ve včelstvu, z něhož trubci pocházeli, byly ve stejném roce *L. passim* detekovány ve 2 směsných vzorcích, byť v nízkých hladinách (Obrázek 20, graf A).



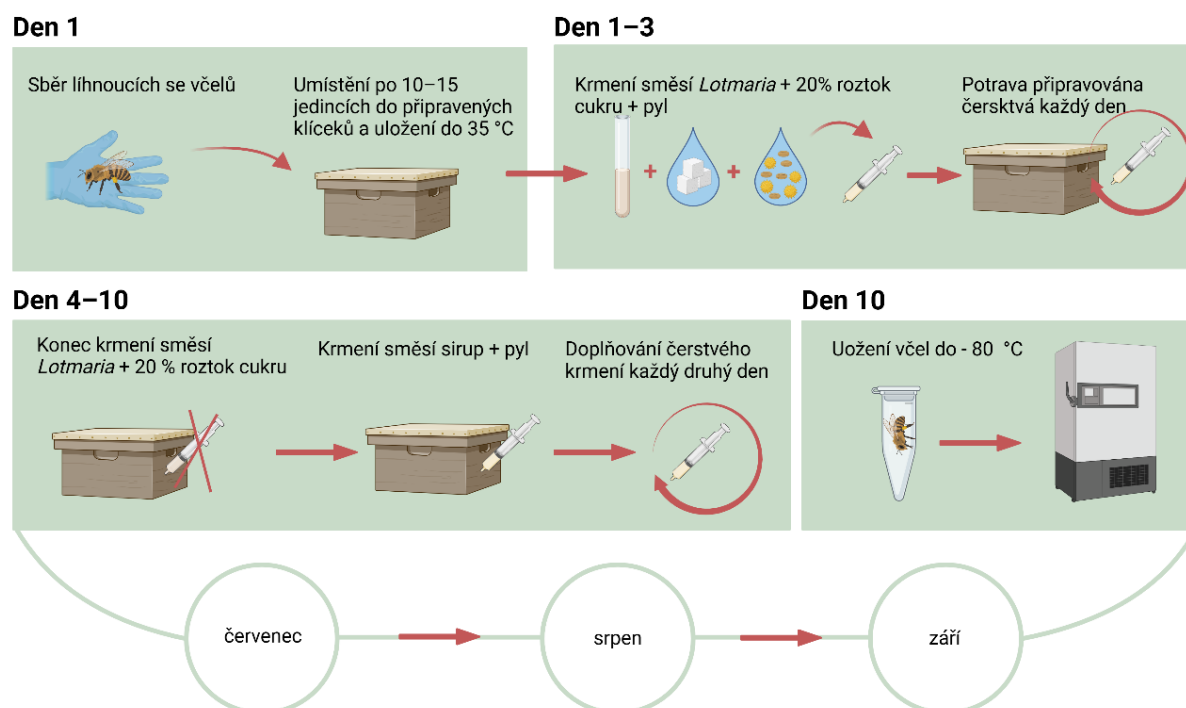
Obrázek 23. Plodový rámek s líhnoucími se trubci a jeden žlutě značený trubec.

5.4 Testování citlivosti k infekci *L. passim* u včel v různých fázích sezóny

Pro zjištění, zda je rozdíl v citlivosti na infekce *L. passim* u zimní a u letní generace včel, byl v sezóně 2024 zařazen další experiment, který byl opakován ve 3 po sobě jdoucích měsících. Jako letní včely byly použity dělnice líhnoucí se na konci července. Dále byly použity včely líhnoucí se na konci srpna, tedy v době přechodu letní generace na zimní, a poslední experiment by zakládán se včelami líhnoucími se na konci září. U zářijových dělnic se předpokládalo, že se nastavení jejich organismu blíží zimní generaci včel.

Každý měsíc byla provedena infekce *L. passim* u 10 až 15 dělnic, která byla včelám podávána po dobu 3 dnů a 10. den od vylihnutí byly včely sebrány a zamrazeny (Obrázek 24). Z každé skupiny byla *L. passim* kvantifikována u 10 jedinců (Tabulka 24 a Obrázek 25).

U výsledných dat Q_{log} každé skupiny bylo prokázáno normální rozdělení pomocí Shapiro-Wilk testu. Následně byl proveden jednofaktorový test ANOVA, jehož výsledek prokázal, že mezi infekcemi v jednotlivých měsících nebyl signifikantní rozdíl ($p = 0.82$). Takže včely v různých fázích sezóny byly obdobně citlivé k nákaze *L. passim*.

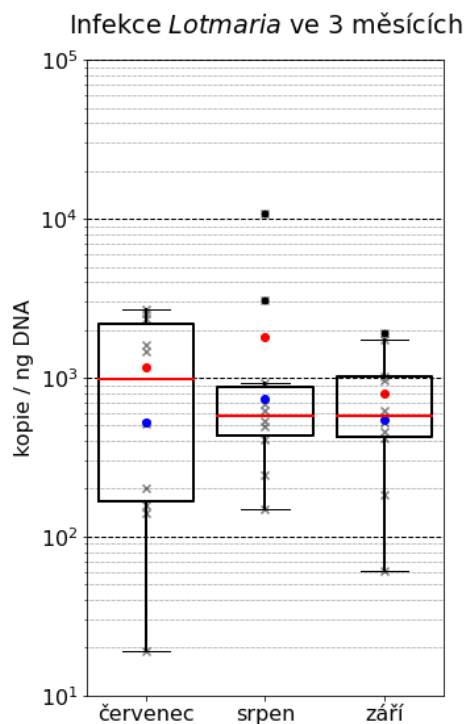


Obrázek 24. Schéma provedení infekce *L. passim* u líhnoucích se včel ve třech po sobě jdoucích měsících (vytvořeno v programu BioRender).

Tabulka 24. Detekce *L. passim* pomocí qPCR ve vzorkách dělnic letní a zimní generace.

n = počet testovaných vzorků, + počet pozitivních vzorků, $\bar{O}$ (ng) = geometrický průměr počtu kopií/ng DNA, $\bar{O}$ (včela) = geometrický průměr počtu kopií v těle včely (přibližný přepočít)

typ vzorů	n	<i>Lotmaria</i>		
		+	$\bar{O}$ (ng)	$\bar{O}$ (včela)
červenec	10	10	$5,2 \times 10^2$	$1,9 \times 10^6$
srpen	10	10	$7,4 \times 10^2$	$2,0 \times 10^6$
září	10	10	$4,5 \times 10^2$	$1,7 \times 10^6$



Obrázek 25. Hladina *L. passim* ve včelách infikovaných na konci července, srpna a září.

● = průměr, ● = geometrický průměr, — = medián, × = vzorek

5.5 Porovnání kvantifikace *L. passim* pomocí qPCR a ddPCR

Metoda ddPCR poskytuje informaci o absolutním počtu kopií cílové DNA ve vstupním vzorku, bez potřeby standardní křivky. Zároveň by metoda ddPCR měla být citlivější než qPCR (Hindson *et al.*, 2011). Proto bylo do práce zařazeno porovnání citlivosti qPCR a ddPCR při kvantifikaci *L. passim*. K porovnání citlivosti byl použit plazmidový standard (cytochrom b v plazmidu pMX), který byl v práci již používán při absolutní kvantifikaci *L. passim* pomocí qPCR. Standard byl linearizován a desítkovou ředící řadou bylo připraveno 7 vzorků v koncentracích od 10^6 po 10^0 kopií/ μ l. V těchto 7 vzorkách byl cílový gen kvantifikován pomocí qPCR i ddPCR (Tabulka 25). Následně byla porovnána citlivost qPCR a ddPCR také kvantifikací *L. passim* ve vybraných vzorcích DNA ze včel (Tabulka 26).

Ve vzorku s obsahem cytochromu b 10^0 kopií/ μ l byly pomocí ddPCR detekovány 3,3 kopie/ μ l, zatímco pomocí qPCR nebyla *L. passim* detekována (Tabulka 25). Obdobné výsledky byly získány při kvantifikaci *L. passim* ve vzorcích ze včel. Pomocí ddPCR byla *L. passim* detekována ve všech 7 vybraných vzorcích, zatímco metodou qPCR se podařilo *L. passim* detekovat pouze ve 2 vzorcích a ve 3 byla prokázána pod limitem detekce (Tabulka 26). Po provedení obou porovnání lze tedy konstatovat, že metoda ddPCR je vhodná pro kvantifikaci při nízkých koncentracích cílového genu ve vzorku (10^0 – 10^1 kopií/ μ l DNA).

Při použití vysokých koncentrací cílového genu ve vzorku (10^5 – 10^6 kopií/ μ l DNA) nebylo metodou ddPCR možno získat kvantitativní data. Došlo k přesycení olejových kapek, takže všechny byly hodnoceny jako pozitivní a kvantita cílového genu nemohla být vyhodnocena. Pomocí qPCR byla kvantifikace možná i při takto vysokých koncentracích (Tabulka 25). Při detekci cílového genu ve středních koncentracích (10^2 – 10^4 kopií/ μ l DNA) metoda ddPCR stabilně podávala nižší hodnoty kvantifikace než metoda qPCR (Tabulka 25 a 26).

Tabulka 25. Porovnání citlivosti qPCR a ddPCR za použití standardu (cytochrom b).

ND = data nezískána, PLD = pod limitem detekce

standard	qPCR		ddPCR kopie/μl DNA
	kopie/μl DNA	Cq	
10 ⁶	836779,1	19,8	ND
10 ⁵	99056,7	23,0	ND
10 ⁴	15320,9	24,6	12886,7
10 ³	2685,2	26,7	1298,3
10 ²	172,5	30,0	156,6
10 ¹	PLD (5,9)	34,3	23,2
10 ⁰	ND	ND	3,3

Tabulka 26. Porovnání citlivosti qPCR a ddPCR za použití DNA izolované ze včel.

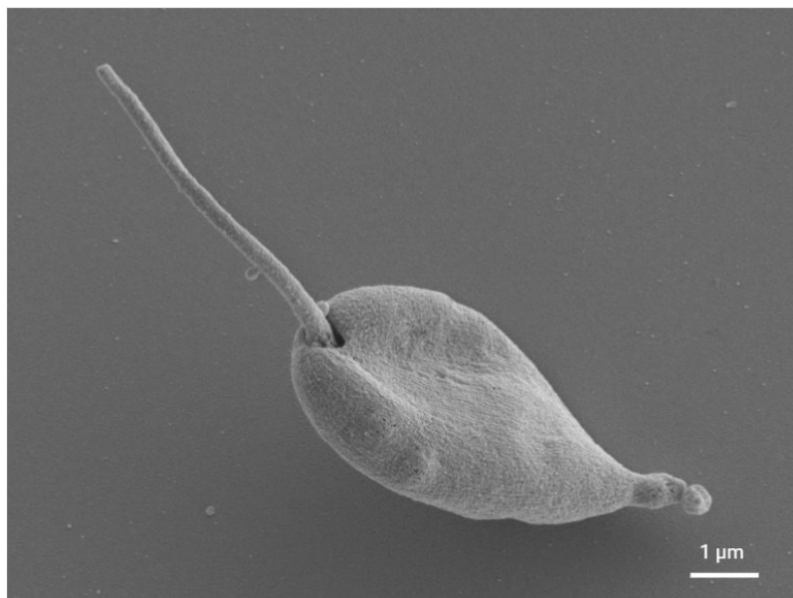
ND = data nezískána, PLD = pod limitem detekce

číslo vzorku	qPCR		ddPCR kopie/μl DNA
	kopie/μl DNA	Cq	
1	PLD (9,6)	32,9	8,0
2	ND	ND	0,5
3	978,2	28,3	293,1
4	11307,2	24,9	8273,9
5	PLD (53,0)	32,3	28,5
6	ND	ND	0,5
7	PLD (1,0)	38,2	1,7

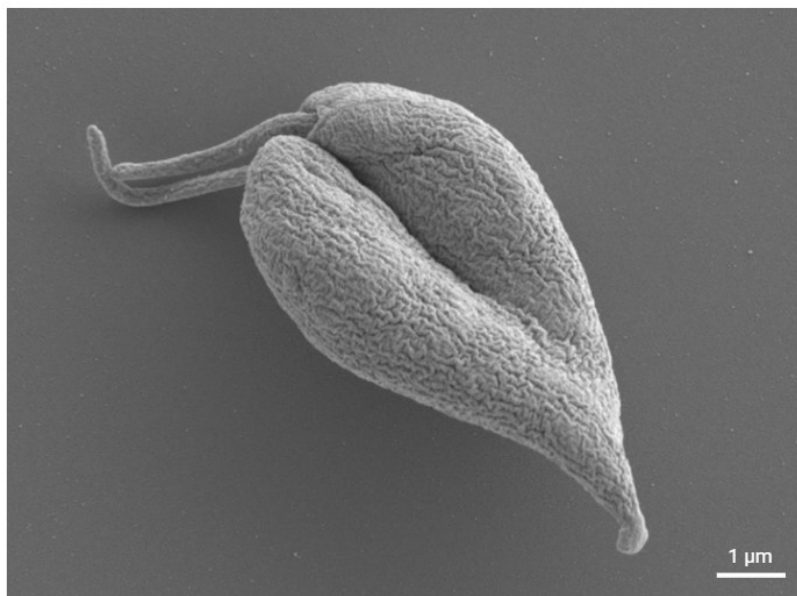
5.6 Axenizace *L. passim* – identifikace a morfologický popis

Izolace a axenizace nového kmene *L. passim* byla do práce zařazena, aby mohlo být v budoucnu provedeno srovnávací studium s dosavadními izolovanými kmeny a aby bylo rozšířeno portfolio dostupných izolátů. Pro izolaci *L. passim* byla použita střeva z 24 dělnic odebraných ze zdravého včelstva a vzorky střev byly inkubovány při 27 °C v BHI médiu. Ve 3 vzorcích z 24 byla po 24 hodinách kultivace mikroskopicky detekována přítomnost trypanosomatidů. Byly připraveny 3 oddělené kultury a po 72 hodinách od izolace zůstala životaschopná pouze jedna. Tato kultura byla dále kultivována při 27 °C a axenizována. Po axenizaci byly připraveny stabiláty, uložené pod názvem „Izolát Ruzyně 2022“ v kapalném dusíku. Přítomnost *L. passim* v izolované kultuře byla potvrzena pomocí PCR a elektronové mikroskopie.

Na snímcích ze skenovacího elektronového mikroskopu je zachycen promastigot *L. passim* (Obrázky 26 a 27). Přední bičík vystupuje z periflagelární kapsy a na jeho povrchu jsou zachyceny vezikuly. Na Obrázku 26 je patrný typický kapkovitý tvar *L. passim* a na Obrázku 27 je zachycena *L. passim* během dělení.



Obrázek 26. Promastigot *L. passim* na snímku ze skenovacího elektronového mikroskopu.



Obrázek 27. Dělicí se promastigot *L. passim* na snímku ze skenovacího elektronového mikroskopu.

Vnitřní uspořádání *L. passim* lze pozorovat na snímcích z transmisního elektronového mikroskopu (Obrázky 28 a 29). Na snímcích je patrný bičík vystupující z periflagelární kapsy a zřetelně je vidět také vnitřní struktura bičíku – axonema. U báze bičíku lze pozorovat kinetoplast. Pod povrchem buňky je patrná mitochondrie a černě zbarvené vezikuly pravděpodobně odpovídají glykosomům. Místa zřetelné šrafování na povrchu buňky zachycuje strukturu subpelikulárních mikrotubulů.



Obrázek 28. Promastigot *L. passim* na snímku z transmisního elektronového mikroskopu.

B = bičík, J = jádro, K = kinetoplast, M = mitochondrie, PK = periflagelární kapsa, MT = subpelikulární mikrotubuly, G = glykosom

Na Obrázku 29 je zachycena *L. passim* v průběhu dělení. Je zde zřetelné dělicí se jádro, zatímco kinetoplast i bičík jsou již zdvojené. Na tomto snímku je viditelný blízký kontakt báze bičíku s kinetoplastem. I zde je dobře zřetelná mitochondrie pod povrchem buňky, glykosomy a struktura subpelikulárních mikrotubulů.



Obrázek 29. Dělicí se promastigot *L. passim* na snímku z transmisního elektronového mikroskopu.

B = bičík, J = jádro, K = kinetoplast, M = mitochondrie, PK = periflagelární kapsa, MT = subpelikulární mikrotubuly, G = glykosom

6 Diskuze

Ztráty včelstev celosvětově představují rostoucí problém vzhledem k současné expanzi zemědělství a zvyšující se potřebě opylování (Klein *et al.*, 2007; Aizen a Harder, 2009). Za ztrátami včelstev stojí kombinace mnoha faktorů, které se vědecká komunita snaží zmapovat a odhalit vztahy mezi nimi. Jedině tak bude možné situaci efektivně řešit. Tato práce je zaměřena na interakci mezi střevním parazitem *L. passim* a včelími viry asociovanými s ektoparazitickým roztočem *V. destructor*. Pro zjednodušení pozorované interakce byl sledován pouze virus DWV, který se ztrátami včelích kolonií jednoznačně souvisí a z virových infekcí mu bývá připisován největší význam (Highfield *et al.*, 2009; Dainat *et al.*, 2012). Pro sledování interakce mezi hladinami *L. passim* a DWV byly navrženy dva experimentální postupy: klíčkový a úlový experiment.

Do obou typů experimentů na začátku vstupovaly zdravé líhnoucí se včely. Tyto včely byly sbírány přímo během líhnutí a na začátku naší práce byly testovány na přítomnost *L. passim* a DWV, aby bylo ověřeno, zda jsou prosté infekcí. U žádné z líhnoucích se včel nebyl pomocí qPCR detekován DWV ani *L. passim*. Pro účely experimentu byly tyto včely považovány za infekce prosté, ačkoliv nelze vyloučit přítomnost DWV v hladinách nedetekovaných metodou qPCR.

Nepřítomnost DWV v larvách a včelách ze zdravých včelstev nezasažených roztoči *V. destructor* potvrzují také další práce (Lanzi *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2010). V dnešní době je však téměř nemožné najít včelstvo absolutně prosté *V. destructor*. Infekce DWV v larvách a kuklách jsou dokumentovány především ve včelstvech infikovaných *V. destructor* (Chen *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2010). Nebývá však uváděno, zda konkrétní analyzovaný jedinec byl, nebo nebyl parazitován *V. destructor* (Chen *et al.*, 2005). Je pravděpodobné, že ve včelstvech silněji zamořených *V. destructor* je virus skutečně všudypřítomný a DWV je infikován i roztoči neparazitovaný plod. Viry mohou být na plod přeneseny infikovanými pečujícími dělnicemi při krmení či matkou při snůšce (Yue a Genersch, 2005; Yue *et al.*, 2007). V naší práci však byly používány líhnoucí se včely ze zdravých včelstev a dá se tak předpokládat, že líhnoucí se včely byly skutečně zdravé. Ačkoliv v klíčkovém experimentu 2024 byla prokázána slabá přítomnost virů ve skupině NK, což bylo pravděpodobně dáno rezidui infekce v líhnoucích se včelách použitých pro experiment.

V líhnoucích se včelách testovaných v této práci nebyla detekována *L. passim*. Toto zjištění je v souladu také s další prací, která sledovala přítomnost *L. passim* v líhnoucích se včelách (Pařízková, 2023). Naproti tomu jiné studie ukazují běžný výskyt *L. passim* v larválních stádiích včel (Arismendi *et al.*, 2022; Michalczyk *et al.*, 2024) i v čerstvě vylíhnutých včelách (Arismendi *et al.*, 2022). Ačkoliv není jasné, čím je tento rozpor dán, je možné že se infekce u plodu a líhnoucích se včel odvíjí od stavu infekce v celé kolonii. Pokud by byla hladina *L. passim* ve včelstvu obecně vysoká, infekce by byla spíše rozšířena také na plod prostřednictvím pečujících dělnic. Pokud je infestace včelstva nízká, bylo by možné pozorovat líhnoucí se jedince bez infekce *L. passim*, jak tomu bylo v naší práci.

6.1 Klíčkový experiment

Prvním typem zaváděného pokusu byl tzv. klíčkový experiment, který byl provedený v definovaných laboratorních podmínkách. Líhnoucí se včely byly během něj rozděleny do 4 skupin: L (skupina s infekcí *L. passim*), LV (skupina s infekcí *L. passim* i *V. destructor*), V (skupina s infekcí *V. destructor*) a NK (kontrolní skupina bez infekce). Infekce *L. passim* byla včelám podávána spolu s krmením, tak jako by ji pravděpodobně získaly v přirozeném prostředí (Arismendi *et al.*, 2022).

Virové infekce byly na včely přenášeny aplikací roztočů *V. destructor*, kteří jsou významnými vektory DWV (Bowen-Walker, Martin a Gunn, 1999; Martin, Ball a Carreck, 2010). Klíčový experiment byl optimalizován v průběhu 3 sezón (2022-2024).

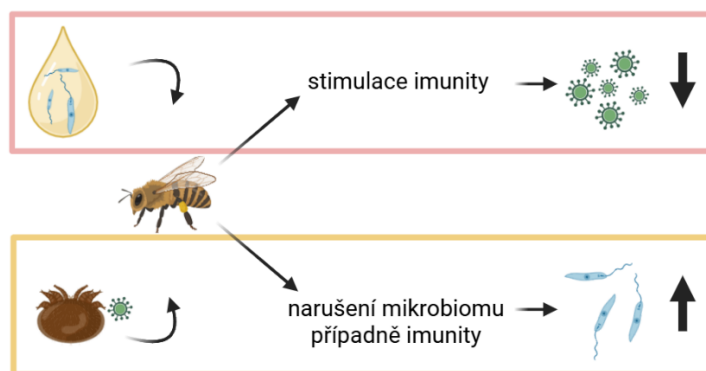
Během první sezóny (2022) nebyl experiment ukončen podle plánovaného schématu kvůli předčasným úmrtím včel. Úmrtí byla částečně přikládána nevhodnému provedení krmítek, z nichž se krmení vylévalo a olepovalo těla včel. Částečně však byla pravděpodobně zaviněna příliš vysokou infekční dávkou virů, protože nejvíce úmrtí bylo pozorováno ve skupinách s *V. destructor* (V a LV). V těle roztočů použitých pro přenos infekce dosahovala průměrné koncentrace $5,7 \times 10^9$ kopií viru v případě DWV A a 7×10^7 kopií viru v případě DWV B. Například v práci Posada-Florez *et al.* (2019), kde byli foretičtí roztoči také používáni v infekčních experimentech, bylo průměrně detekováno asi 5×10^7 kopií DWV A na roztoče. Infekce DWV A u námi použitých roztočů byla tedy o 3 řády vyšší a pro čerstvě vylíhnuté včely pravděpodobně letální. Kvantifikace DWV byla provedena také u roztočů z líhnoucích se včel a zde byly průměrné hodnoty infekce výrazně nižší, průměrně $1,5 \times 10^5$ kopie viru/tělo roztoče. Navíc byly viry detekovány pouze u 20 % testovaných roztočů z líhnoucích se včel. Slabá virová nálož mladých roztočů je pravděpodobně dána mírou infekce jejich matky (Piou *et al.*, 2022) a zároveň stavem infekce u hostitelské včely (Nordström, 2003).

V následující sezóně (2023) byl použit jiný typ klícek (typ 2) a viry byly do včel vnášeny pomocí *V. destructor* z líhnoucích se včel. Experiment byl zakončen plánovaný 10. den a skupiny byly otestovány na DWV a *L. passim*. Náš předpoklad, že i minimální dávka virů postačí k rozvinutí infekce u včel, se však nepotvrdil a virus DWV ve skupinách V a LV nebyl vůbec detekován. Stejně tak nebyly viry detekovány ani v roztočích použitých pro přenos infekce. Lze se domnívat, že *V. destructor* obsahovali příliš nízké hladiny virů, nedostatečné k rozvinutí infekce, a i na konci experimentu byly hladiny virů nulové či nedetekovatelné. Případně je možné že *V. destructor* při vstupu do experimentu nenesli žádné viry (Nordström, 2003). Rok 2023 byl však slabý na sběr roztočů z líhnoucích se včel a bylo obtížné nalézt dostatek roztočů pro experiment samotný. Roztoči tedy nemohli být analyzováni před založením experimentu, ale pouze po jeho ukončení.

V poslední sezóně (2024) byly včely infikovány roztoči z udržovacích včel. Roztoči infikovaní na udržovacích včelách se ukázali jako efektivní přenašeči virů. U skupin LV a V byla prokázána rozvinutá virová infekce. Je však pravděpodobné, že virová nálož byla i v této sezóně příliš vysoká, protože experiment musel být ukončen již 5. den. I přes dřívější ukončení experimentu však bylo možné sledovat výsledek koinfekce DWV a *L. passim*. Po provedené analýze a následném statistickém vyhodnocení je patrné, že přítomnost *L. passim* v těle včel může ovlivňovat hladiny viru. U skupiny LV byly detekovány signifikantně nižší hladiny DWV B než u skupiny V ($p = 0,0024$). V případě DWV A byla pozorována podobná závislost, byť slabší a nesignifikantní ($p = 0,149$). O důvodu snížené virové zátěže u včel infikovaných *L. passim* lze prozatím pouze spekulovat. Jedním z možných vysvětlení je, že *L. passim* je v určitých hladinách pro včely prospěšným symbiontem. Takové úvahy však nelze podpořit žádnou předchozí prací. Studie hovoří v případě infekcí *L. passim* především o hladovění včel (Liu *et al.*, 2020; MacInnis, Luong a Pernal, 2023) a o zkracování délky života dělnic (Gómez-Moracho *et al.*, 2020; Buendía-Abad *et al.*, 2021). Jedna studie však naznačuje podobný efekt *L. passim* na hladiny viru, byť v kontextu AmFV a nikoliv DWV (Hartmann *et al.*, 2015). Možným vysvětlením tohoto pozorování by snad mohla být *L. passim* zapříčiněná stimulace imunitní odpovědi po osídlení střeva. Pozorovaný negativní vliv *L. passim* na hladiny virů je však zajímavým výsledkem a jistě by si zasloužil další prozkoumání. Vhodné by bylo zopakovat koinfekční experimenty s větším množstvím vzorků a se zaměřením také na další viry mimo DWV.

Data z klíčového experimentu 2024 rovněž ukázala, že vyšší virová zátěž se pojí se silnějšími infekcemi *L. passim*. Ve skupině LV byly pozorovány signifikantně vyšší hladiny *L. passim* než ve skupině L ($p = 0,00054$). Tato závislost byla prokázána také u kontrolních směsných vzorků náhodných včel ze zdravého a *V. destructor* zamořeného včelstva. Ve včelstvu s rozvinutou virovou infekcí byla *L. passim* signifikantně hojnější než ve zdravém včelstvu ($p = 0,00001$). Toto pozorování může být dáno prostým oslabením imunity včel, kterou působí infekce *V. destructor* a DWV (Yang a Cox-Foster, 2005; Di Prisco *et al.*, 2016). Dalším možností je, že změny ve složení střevního mikrobiomu vytvořily prostředí vhodnější pro růst infekce *L. passim* (Schwarz, Moran a Evans, 2016). Není jasné, jakou měrou do složení mikrobiomu zasahuje samotná parazitace *V. destructor* (Sandionigi *et al.*, 2015; Marche *et al.*, 2019) v porovnání s přenášenou virovou infekcí (Quyen a Lanh, 2024). Ze studií však vyplývá pozitivní korelace mezi intenzitou infekce DWV a narušením přirozeného mikrobiomu (Marche *et al.*, 2019).

Výsledky plynoucí z klíčového experimentu se mohou zdát rozporuplné. Mohlo by se však jednat o prostý antagonistický vztah, při němž by infekce *V. destructor*/viry u mladé včely narušovala imunitní odpověď a strukturu mikrobiomu (Yang a Cox-Foster, 2005), díky čemuž by docházelo k namnožení *L. passim*. Rozvinutá infekce *L. passim* by však mohla stimulovat imunitu včely (Schwarz a Evans, 2013) a potenciálně tak tlumit virové infekce (Obrázek 30). Stimulace včelí imunity v případě infekcí *Crithidia/Lomtaria* již byla popsána a nejvyšší intenzity by měla dosahovat během 72 hodin po infekci (Schwarz a Evans, 2013). Tedy v době, kdy byly včely v našich experimentech infikovány viry. Příkladem antagonismu infekcí lze uvést defensin, jehož produkce by měly být stimulována infekcemi *Crithidia/Lomtaria* (Schwarz a Evans, 2013), ale suprimována infekcí *V. destructor* (Yang a Cox-Foster, 2005). Interakce infekcí však byla sledována pouze u 5denních dělnic a je pravděpodobné, že se charakter interakce v čase mění.



Obrázek 30. Schéma vzájemné interakce infekcí pozorované v klíčovém experimentu 2024 (vytvořeno v programu BioRender).

Výhodou klíčových pokusů je možnost definovat a regulovat faktory působící na včely. Plastové boxy a prostředí termostatu však vytváří pro včely silně nepřirozené prostředí, což může vyvolávat stres. Stres může být u včel v klíčcích vyvoláván také nepřítomností matky a nedostatečnou velikostí sociální skupiny (Amdam, 2011; Schilcher *et al.*, 2022). Zároveň jsou včely chovány bez kontaktu s prostředím úlu a pečujícími dělnicemi a nepřijímají tak nezbytně potřebné složky přirozeného mikrobiomu (Powell *et al.*, 2014; Raymann a Moran, 2018). Faktory jako stres a složení mikrobiomu mohou zásadně ovlivňovat výsledky (Schwarz, Moran a Evans, 2016), proto byl navržen také druhý experimentální postup, tzv. úlový experiment.

6.2 Úlový experiment

Naším záměrem bylo zavedení testovacího systému, jenž by byl srovnatelný s klíčovým experimentem, ale v němž bychom mohli vybrané včely chovat v přirozeném prostředí včelstva. V úlovém experimentu byly viry přenášeny na včely až v prostředí včelstva zamořeného roztoči *V. destructor*, zatímco infekce *L. passim* proběhla za laboratorních podmínek před umístěním do včelstev.

V sezóně 2023 se ze včelstev podařilo vybrat požadovaný počet vzorků, při pozdější analýze se však ukázalo, že infekce *L. passim* se u včel neuchytila. Je pravděpodobné, že se včely dostatečně nakrmily na plodovém rámu, na němž byly ponechány po vylihnutí. Následně by tak nemusely přijmout dostatečné množství potravy s infekční dávkou *L. passim*. Tento postup byl pro další sezónu upraven, tak, aby potrava obsahující *L. passim* byla první, kterou včely přijmou. Infekce viry zprostředkovaná chovem ve včelstvu zamořeném *V. destructor* se ukázala jako efektivní. Ačkoliv byly do včelstva vnášeny zdravé včely sbírané v moment líhnutí, a tedy s předpokladem absence DWV, ve stáří 10 dní vykazovaly vysoké hladiny DWV. V případě DWV B bylo u včel (skupin LV a V) dosaženo průměrné infekce $1,6 \times 10^9$ kopií viru na včelu. V případě DWV A byly hladiny výrazně nižší a pohybovaly se okolo $4,4 \times 10^4$ kopií viru na včelu. Dělnice bez zřetelných obtíží přežívaly i s takto závažnou infekcí DWV B. Symptomy infekce se pravděpodobně projevují až při řádově vyšších hladinách. Například v práci Highfield *et al.* (2009) byla u symptomatických dělnic detekována virová nálož přesahující 10^{10} kopií viru na včelu.

V létě roku 2024 byl úlový experiment opakován. Po 10 dnech se ze zdravého včelstva podařilo vybrat vzorky skupiny L a NK v potřebném počtu, ve včelstvu zamořeném *V. destructor* však nebyly nalezeny téměř žádné včely skupin LV a V. Důvod pro zmizení označených experimentálních včel není jasný. Označené včely nebyly nalezeny ani v okolí včelstva. Je možné, že tyto včely byly místními dělnicemi rozpoznány a vyhnány ještě před umístěním včelstva do izolátoru, které proběhlo až 4. den experimentu. Nic takového však nebylo pozorováno v případě zdravého včelstva, ani u včelstev použitých v sezóně 2023. Rovněž je možné, byť velice nepravděpodobné, že barevné značení z těla včel opadalo, případně bylo sundáno okolními včelami. Úlový experiment tedy nebyl v průběhu dvou sezón optimalizován. V budoucnu by však bylo možné zařadit další opatření, která by šanci na jeho dokončení zvýšila. Například by bylo možné vybírat včely nejen 10. den ale také 5. den po jejich vylihnutí. Tato cesta se osvědčila v klíčovém experimentu.

Kontrolní vzorky z prostředí včelstev

Analýzy infekcí v obou letech ukázaly absenci DWV A ve zdravém včelstvu bez infekce *V. destructor*. Hladiny DWV B však byly i ve zdravém včelstvu poměrně vysoké. V sezóně 2023 byla průměrná infestace DWV B $5,9 \times 10^4$ kopií viru na včelu. V roce 2024 byla průměrná hladina DWV B ve zdravém včelstvu ještě o 3 řády vyšší. Setkáváme se však se studiemi, které ukazují ve včelstvech bez *V. destructor* přítomnost DWV A i B (Sircoulomb *et al.*, 2025). Jiné studie však ve zdravém včelstvu nedetekovaly žádné viry DWV (Lanzi *et al.*, 2006). Lze předpokládat, že hladiny DWV jsou ve včelstvu ovlivňovány infekcemi včelstev v okolí, kvůli horizontálnímu přenosu DWV při kontaktu včel (Chen *et al.*, 2006a). Hladina virů ve včelstvu by tak kromě infekce *V. destructor* odrážela také situaci na celé dané včelnici.

Ve včelstvu zamořeném *V. destructor* byly viry DWV A i DWV B přítomné ve vysokých hladinách, DWV B se však v obou letech ukázal jako hojnější. Průměrné hladiny DWV A odpovídaly asi $1,1 \times 10^6$ kopií viru na včelu a v případě DWV B asi $2,6 \times 10^9$. Tak jako v této práci, i podle rozsáhlé studie mapující rozšíření a zastoupení DWV A a DWV B napříč Evropou vychází typ B jako běžnější a ve včelstvech hojnější (Sircoulomb *et al.*, 2025). Ačkoliv poměr zastoupení typu A a typu B se výrazně liší mezi jednotlivými lokalitami (Sircoulomb *et al.*, 2025). Také další práce podporují trend převládající prevalence DWV B u Evropských včel (Kevill *et al.*, 2021; Paxton *et al.*, 2022).

6.3 Infekce *L. passim* u trubců

O infekcích *L. passim* u trubců neexistují žádné dostupné údaje. Naším cílem proto bylo ověřit, zda se *L. passim* vyskytuje také u trubců v prostředí zdravého včelstva. *Lotmaria* však nebyla detekována v žádném z dvaceti testovaných desetidenních trubců. Je možné, že prevalence *L. passim* ve včelstvu nebyla dostatečně vysoká pro její detekci ve 20 jedincích testovaných v této práci. Je však také možné, že trubci nejsou vhodnými hostiteli pro *L. passim*. Avšak u samců samotářských včel *Osmia cornuta* byla detekována *C. mellificae* a dokonce byla prokázána vyšší citlivost samců vůči tomuto patogenu (Strobl *et al.*, 2019). Na základě těchto zjištění by se dalo předpokládat, že také samci *A. mellifera* budou schopni přijetí infekce *L. passim*.

6.4 Infekce *L. passim* u letní a zimní generace dělnic

Dosavadní studie se příliš neshodují na rozdílech prevalence *L. passim*/*C. mellificae* u včel zimní a letní generace (Runckel *et al.*, 2011; D'Alvise *et al.*, 2018). Práce Runckel *et al.* (2011) ukazuje spíše na vyšší intenzitu infekce *C. mellificae* v zimním období. Výskyt *L. passim* by se mohl odvíjet od fyziologického nastavení dělnic. Je však také možné, že případný hojnější výskyt *L. passim* v období zimy by mohl plynout z vyššího namnožení v době kdy se dělnice nevyprazdňují.

V naší práci byla infekce *L. passim* podána včelám vylíhnutým v posledním týdnu července, následně v posledním týdnu srpna, a nakonec v posledním týdnu září. Předpokladem bylo, že včely líhnoucí se na konci září lze považovat za fyziologicky srovnatelné se zimní generací. V podmínkách střední Evropy by se zimní generace včel měla zakládat právě od srpna do října (Fluri *et al.*, 1982).

Z námi zjištěných dat plyne, že citlivost včel k infekci *L. passim* je v červenci, srpnu i září zcela srovnatelná. Pokud by se tedy prevalence ve včelstvech v zimním období lišila, podle námi pozorovaných výsledků by to nemělo být dáno samotnými změnami ve fyziologii včel. Případně je možné, že včely, které byly ihned od vylíhnutí po dobu 10 dnů chované v prostředí laboratoře nepodléhají takovým fyziologickým změnám jako dělnice vyskytující se v prostředí včelstva a z toho důvodu by dopad fyziologických změn nemohl být pozorován. Bylo by vhodné výsledky ověřit experimentem realizovaným v prostředí včelstva.

6.5 Porovnání metod qPCR a ddPCR pro detekci *L. passim*

Většina vzorků byla v této práci analyzována metodou qPCR. Kvantifikace DWV byla prováděna s použitím SYBR Green, který se nespecificky váže na dvouvláknovou DNA. Aby měření s použitím SYBR Green bylo průkazné, je třeba qPCR optimalizovat, což již bylo ověřeno v předchozích pracích

s použitím stejných primerů (Kadlečková, 2020; Kevill *et al.*, 2017). Pro kvantifikaci *L. passim* byla používána specificky navržená proba TaqMan s fluoroforem FAM. Sondy TaqMan mají v porovnání se SYBR Green několik výhod. Značí pouze konkrétní zvolenou sekvenci, díky čemuž jsou specifičtější a dají se používat při multiplex kvantifikaci (Tajadini, Panjehpour a Javanmard, 2014). Mnohé vzorky však byly pomocí qPCR kvantifikovány pod limitem detekce. Proto bylo provedeno porovnání detekční schopnosti qPCR s metodou ddPCR, která by měla být citlivější (Hindson *et al.*, 2011; Taylor, Laperriere a Germain, 2017).

Metoda ddPCR je poměrně novým typem PCR, při níž je vzorek rozdělován do kapek v olejové emulzi. Uvnitř každé kapky následně probíhá samostatná PCR a po amplifikaci je v kapkách jednotlivě měřena fluorescence. Na základě hodnot fluorescence je vyhodnocena četnost pozitivních a negativních kapek pro stanovení koncentrace cílové DNA v původním vzorku (Hindson *et al.*, 2011). Z tohoto mechanismu kvantifikace by měla plynout vysoká citlivost ddPCR. Uvádí se, že by tato metoda měla ve vzorku spolehlivě detekovat i jednotky kopií cílového genu (Hindson *et al.*, 2011). Na rozdíl od qPCR metoda ddPCR poskytuje informaci o absolutním počtu kopií cílové DNA ve vstupním vzorku bez potřeby standardní křivky. Zároveň v porovnání ddPCR a klasické qPCR je nutno zmínit rozdílnost ceny a nároků na čas. Metoda qPCR je výrazně levnější a méně časově náročná.

Schopnost detekce jednotek cílového genu pomocí ddPCR byla v této práci potvrzena (Tabulka 25). Pokud koncentrace cílového genu ve vzorku byla velmi nízká, tj. řádově odpovídala 10^0 až 10^1 kopií/ μ l DNA, potom se ukázala ddPCR jako citlivější metoda kvantifikace, což také odpovídá výsledkům dalších studií (Zhao *et al.*, 2016; Taylor, Laperriere a Germain, 2017). Například studie Taylor *et al.* (2017) označuje ddPCR za přesnější, pokud je u vzorku hodnota $C_q \geq 29$. Metoda qPCR se však ukázala jako užitečná pro vysoké koncentrace cílového genu. Jak ukázaly naše výsledky, ddPCR není schopná s příliš vysokou koncentrací cílové DNA ($>10^5$ kopií/ μ l DNA) pracovat. Dojde k přehlcení kapek, všechny jsou vyhodnocovány jako pozitivní a není tak možné zjistit poměr negativních a pozitivních kapek, který je pro vyhodnocení kvantifikace nezbytný. Aby byla kvantifikace pomocí ddPCR proveditelná, musí být vysoce pozitivní vzorek ředěn na nižší koncentrace. Po zjištění přílišné positivity vzorku a jeho ředění by tedy měření bylo opakováno, což může být překážkou vzhledem k finanční náročnosti metody. Pozoruhodným zjištěním byly rozdílné výsledky získané v případě středně pozitivních vzorků (10^2 až 10^4 kopií/ μ l DNA), kdy ddPCR zjišťovala nižší koncentraci cílového genu než qPCR. Naše práce však není jediná, která získávala takové výsledky (Yang *et al.*, 2014). Například v práci Yang *et al.* (2014) získávali pomocí ddPCR nižší hodnoty ve srovnání s qPCR u všech porovnávaných vzorků. V případě vzorků izolovaných ze včel by tyto rozdíly pravděpodobně mohly působit přítomné kontaminanty (Yang *et al.*, 2014; Taylor, Laperriere a Germain, 2017). Pozorovaný rozdíl v případě plazmidového standardu je však nejasný. Menší náchylnost na vliv kontaminantů přítomných ve vzorku je uváděna jako jedno z pozitiv metody ddPCR (Zhao *et al.*, 2016; Taylor, Laperriere a Germain, 2017).

Další výhodou ddPCR v porovnání s qPCR je provedení absolutní kvantifikace bez potřeby standardní křivky. Tím se stírá rozdílnost standardních křivek připravovaných každou laboratoří zvlášť a získávaná data mohou být snáze porovnatelná mezi jednotlivými vědeckými týmy (Zhao *et al.*, 2016; Taylor, Laperriere a Germain, 2017). Jako nevýhoda ddPCR bývá uváděna především vyšší časová náročnost a vyšší cena měření (Yang *et al.*, 2014).

7 Závěr

Tato práce byla zaměřena na zjištění vlivu *L. passim* na hladiny virů DWV. Za tímto účelem byly navrženy a optimalizovány dva typy infekčních experimentů. Klíčový experiment realizovaný v laboratorních podmínkách se podařilo optimalizovat do funkční podoby. Z výsledků tohoto experimentu jednoznačně plyne, že infekce *V. destructor* a s ní spojená přítomnost DWV v těle včely podporuje rozvoj infekce *L. passim*, pravděpodobně kvůli narušení obranyschopnosti a mikrobiomu jedince. Z výsledků však plyne také potenciálně negativní vztah mezi hladinou *L. passim* a DWV B. Ve skupině koinfikované *L. passim* a viry se DWV B vyskytoval v signifikantně nižších hladinách, než u včel bez infekce *L. passim*. Potenciálně by to znamenalo, že pokud se mladá včela brzy infikuje *L. passim*, je její imunita více stimulována k antivirové obraně. Jedná se o zajímavé výsledky, které by si jistě zasloužily další ověření. A to například úlovým experimentem, který byl navržen pro sledování interakce *L. passim* s DWV v prostředí včelstva. Úlový experiment se však během dvou sezón nepodařilo optimalizovat. Ve vazbě na tento experiment však byly analyzovány kontrolní vzorky ze včelstev a získaná data potvrdila pozitivní efekt infekcí *V. destructor*/virů na hladiny *L. passim* zjištěný z klíčového experimentu.

Dále byly začleněny také 2 dílčí cíle zaměřující se na *L. passim* bez interakce s viry. Výskyt *L. passim* byl ověřován u trubců *A. mellifera*, kterým se v tomto ohledu žádná nám známá dosavadní studie nevěnovala. Ani u jednoho z testovaných trubců se nepodařilo *L. passim* detekovat, což mohlo být dáno její nízkou prevalencí ve včelstvu. Jednoznačně by však bylo vhodné provedení dalších testů, aby byla prověřena případná rezistence trubců vůči infekci tímto parazitem. Druhým dílčím cílem práce bylo porovnání infekce *L. passim* u letní a zimní generace včel, přičemž naše výsledky neukázaly žádný signifikantní rozdíl v citlivosti k infekci.

Dílčím metodickým cílem bylo porovnání metody qPCR, pomocí níž byla v této práci prováděna kvantifikace, s metodou ddPCR. Z výsledků porovnání se metoda ddPCR jeví jako užitečnější pro kvantifikaci při nízkých hladinách cílového genu pro budoucí studie. Pro případná další srovnávací studie byl také izolován a axenizován nový kmen *L. passim*, přičemž izolace byla úspěšně provedena ze střeva dělnice *A. mellifera*. Přítomnost *L. passim* v izolátu byla ověřena pomocí PCR a elektronové mikroskopie. Kultura je uložena v kryobance katedry parazitologie pro další využití.

Závěrem lze konstatovat, že realizace experimentů v tak komplexním prostředí, jakým je včelstvo, není jednoduchá. V tomto ohledu jsou přístupnější variantou experimenty vedené v prostředí laboratoře. Z dat, která se nám z těchto experimentů podařilo získat je zřetelná interakce mezi *L. passim* a virovými infekcemi. Výsledky klíčového experimentu však mohou být ovlivněny méně přirozenými podmínkami a bylo by potřebné je doplnit daty z průběhu koinfekce v přirozeném prostředí včelstva.

8 Seznam literatury

- Aizen, M.A. a Harder, L.D. (2009) 'The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination', *Current Biology*, 19(11), pp. 915–918. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.03.071>.
- Aliano, N.P., Ellis, M.D. a Siegfried, B.D. (2006) 'Acute contact toxicity of oxalic acid to *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and their *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) hosts in laboratory bioassays', *Journal of Economic Entomology*, 99(5), pp. 1579–1582. Dostupné na: <https://doi.org/10.1603/0022-0493-99.5.1579>.
- Amdam, G.V. *et al.* (2004) 'Altered physiology in worker honey bees (Hymenoptera: Apidae) infested with the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae): A factor in colony loss during overwintering?', *Journal of Economic Entomology*, 97(3), pp. 741–747. Dostupné na: <https://doi.org/10.1093/jee/97.3.741>.
- Amdam, G.V. (2011) 'Social context, stress, and plasticity of aging', *Aging Cell*, 10(1), pp. 18–27. Dostupné na: <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00647.x>.
- Anderson, D.L. a Trueman, J.W.H. (2000) '*Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species', *Experimental & Applied Acarology*, 24(3), pp. 165–189. Dostupné na: <https://doi.org/10.1023/A:1006456720416>.
- Ariana, A., Ebadi, R. a Tahmasebi, G. (2002) 'Laboratory evaluation of some plant essences to control *Varroa destructor* (Acari: Varroidae)', *Experimental & Applied Acarology*, 27(4), pp. 319–327. Dostupné na: <https://doi.org/10.1023/A:1023342118549>.
- Arismendi, N. *et al.* (2022) 'The trypanosome *Lotmaria passim* prevails in honey bees of different ages and stages of development', *Journal of Apicultural Research*, 61(1), pp. 63–69. Dostupné na: <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1828239>.
- Bailey, L. (1964) 'The "Isle of Wight disease": the origin and significance of the myth', *Bee World*, 45(1), pp. 32–37. Dostupné na: <https://doi.org/10.1080/0005772X.1964.11097032>.
- Bailey, L. a Ball, B.V. (1991a) '3 - Viruses', in L. Bailey and B.V. Ball (eds) *Honey Bee Pathology (Second Edition)*. London: Academic Press, pp. 10–34. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-073481-8.50007-2>.
- Bailey, L. a Ball, B.V. (1991b) '4 - Bacteria', in L. Bailey and B.V. Ball (eds) *Honey Bee Pathology (Second Edition)*. London: Academic Press, pp. 35–52. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-073481-8.50008-4>.
- Bailey, L., Ball, B.V. a Perry, J.N. (1983) 'Association of viruses with two protozoal pathogens of the honey bee', *Annals of Applied Biology*, 103(1), pp. 13–20. Dostupné na: <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1983.tb02735.x>.
- Bailey, L., Gibbs, A.J. a Woods, R.D. (1963) 'Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus)', *Virology*, 21(3), pp. 390–395. Dostupné na: [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(63\)90200-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(63)90200-9).
- Bailey, L. a Milne, R.G. (1969) 'The multiplication regions and interaction of Acute and Chronic bee-paralysis viruses in adult honey bees', *Journal of General Virology*, 4(1), pp. 9–14. Dostupné na: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-4-1-9>.

- Balbuena, M.S. *et al.* (2015) 'Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation', *Journal of Experimental Biology*, 218(17), pp. 2799–2805. Dostupné na: <https://doi.org/10.1242/jeb.117291>.
- Ball, B.V. a Allen, M.F. (1988) 'The prevalence of pathogens in honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*', *Annals of Applied Biology*, 113(2), pp. 237–244. Dostupné na: <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1988.tb03300.x>.
- Bava, R. *et al.* (2023) 'Essential oils for a sustainable control of honeybee varroosis', *Veterinary Sciences*, 10(5), p. 308. Dostupné na: <https://doi.org/10.3390/vetsci10050308>.
- Beetsma, J. (1979) 'The Process of Queen-Worker Differentiation in the Honeybee', *Bee World*, 60(1), pp. 24–39. Dostupné na: <https://doi.org/10.1080/0005772X.1979.11097727>.
- Berthoud, H. *et al.* (2010) 'Virus infections and winter losses of honey bee colonies (*Apis mellifera*)', *Journal of Apicultural Research*, 49(1), pp. 60–65. Dostupné na: <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.08>.
- Boecking, O. a Genersch, E. (2008) 'Varroosis – the ongoing crisis in bee keeping', *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 3(2), pp. 221–228. Dostupné na: <https://doi.org/10.1007/s00003-008-0331-y>.
- Boncristiani, H. *et al.* (2012) 'Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees *Apis mellifera*', *Journal of Insect Physiology*, 58(5), pp. 613–620. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.12.011>.
- Bowen-Walker, P.L., Martin, S.J. and Gunn, A. (1999) 'The transmission of Deformed wing virus between honeybees (*Apis mellifera* L.) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud', *Journal of Invertebrate Pathology*, 73(1), pp. 101–106. Dostupné na: <https://doi.org/10.1006/jipa.1998.4807>.
- Buendía-Abad, M. *et al.* (2021) 'Workflow of *Lotmaria passim* isolation: Experimental infection with a low-passage strain causes higher honeybee mortality rates than the PRA-403 reference strain', *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 14, pp. 68–74. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2020.12.003>.
- Buendía-Abad, M. *et al.* (2022) 'First description of *Lotmaria passim* and *Crithidia mellificae* haptomonad stages in the honeybee hindgut', *International Journal for Parasitology*, 52(1), pp. 65–75. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2021.06.005>.
- Cabrera Cordon, A.R. *et al.* (2013) 'Variable induction of vitellogenin genes in the varroa mite, *Varroa destructor* (Anderson & Trueman), by the honeybee, *Apis mellifera* L, host and its environment', *Insect Molecular Biology*, 22(1), pp. 88–103. Dostupné na: <https://doi.org/10.1111/imb.12006>.
- Castelli, L. *et al.* (2020) 'Impact of nutritional stress on honeybee gut microbiota, immunity, and *Nosema ceranae* infection', *Microbial Ecology*, 80(4), pp. 908–919. Dostupné na: <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01538-1>.
- Charrière, J.-D. a Imdorf, A. (2002) 'Oxalic acid treatment by trickling against *Varroa destructor*: recommendations for use in central Europe and under temperate climate conditions', *Bee World*, 83(2), pp. 51–60. Dostupné na: <https://doi.org/10.1080/0005772X.2002.11099541>.

- Chen, Y. *et al.* (2006) 'Prevalence and transmission of honeybee viruses', *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), pp. 606–611. Dostupné na: <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.606-611.2006>.
- Chen, Y., Evans, J. a Feldlaufer, M. (2006) 'Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*', *Journal of Invertebrate Pathology*, 92(3), pp. 152–159. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.03.010>.
- Chen, Y., Higgins, J. a Feldlaufer, M. (2005) 'Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of Deformed wing virus infection in the honeybee (*Apis mellifera* L.)', *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), pp. 436–441. Dostupné na: <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.436-441.2005>.
- Chen, Y., Pettis, J.S. a Feldlaufer, M.F. (2005) 'Detection of multiple viruses in queens of the honey bee *Apis mellifera* L.', *Journal of Invertebrate Pathology*, 90(2), pp. 118–121. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.08.005>.
- Chen, Y.P. *et al.* (2014) 'Israeli acute paralysis virus: epidemiology, pathogenesis and implications for honey bee health', *PLOS Pathogens*, 10(7). Dostupné na: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004261>.
- Clark, T.B. (1978) 'A filamentous virus of the honey bee', *Journal of Invertebrate Pathology*, 32(3), pp. 332–340. Dostupné na: [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(78\)90197-0](https://doi.org/10.1016/0022-2011(78)90197-0).
- Cox-Foster, D. *et al.* (2007) 'A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder', *Science*, 318(5848), pp. 283–287. Dostupné na: <https://doi.org/10.1126/science.1146498>.
- Cridge, A.G. *et al.* (2017) 'The honeybee as a model insect for developmental genetics', *genesis*, 55(5). Dostupné na: <https://doi.org/10.1002/dvg.23019>.
- Dainat, B. *et al.* (2012) 'Dead or alive: Deformed wing virus and *Varroa destructor* reduce the life span of winter honeybees', *Applied and Environmental Microbiology*, 78(4), pp. 981–987. Dostupné na: <https://doi.org/10.1128/AEM.06537-11>.
- Dainat, B., vanEngelsdorp, D. a Neumann, P. (2012) 'Colony collapse disorder in Europe', *Environmental Microbiology Reports*, 4(1), pp. 123–125. Dostupné na: <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2011.00312.x>.
- D'Alvise, P. *et al.* (2018) 'The impact of winter feed type on intestinal microbiota and parasites in honey bees', *Apidologie*, 49(2), pp. 252–264. Dostupné na: <https://doi.org/10.1007/s13592-017-0551-1>.
- Damayo, J.E. *et al.* (2023) 'Virus replication in the honey bee parasite, *Varroa destructor*', *Journal of Virology*, 97(12). Dostupné na: <https://doi.org/10.1128/jvi.01149-23>.
- Daughenbaugh, K.F. *et al.* (2015) 'Honey bee infecting Lake Sinai viruses', *Viruses*, 7(6), pp. 3285–3309. Dostupné na: <https://doi.org/10.3390/v7062772>.
- De Jong, D., De Jong, P.H. a Gonçalves, L.S. (1982) 'Weight loss and other damage to developing worker honeybees from infestation with *Varroa Jacobsoni*', *Journal of Apicultural Research*, 21(3), pp. 165–167. Dostupné na: <https://doi.org/10.1080/00218839.1982.11100535>.

De Jong, D., Gonçalves, L.S. a Morse, R.A. (1984) 'Dependence on climate of the virulence of *Varroa jacobsoni*', *Bee World*, 65(3), pp. 117–121. Dostupné na: <https://doi.org/10.1080/0005772X.1984.11098789>.

Di Prisco, G. *et al.* (2011) '*Varroa destructor* is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee, *Apis mellifera*', *Journal of General Virology*, 92(1), pp. 151–155. Dostupné na: <https://doi.org/10.1099/vir.0.023853-0>.

Di Prisco, G. *et al.* (2016) 'A mutualistic symbiosis between a parasitic mite and a pathogenic virus undermines honey bee immunity and health', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(12), pp. 3203–3208. Dostupné na: <https://doi.org/10.1073/pnas.1523515113>.

Dively, G.P. *et al.* (2015) 'Assessment of chronic sublethal effects of imidacloprid on honey bee colony health', *PLOS ONE*, 10(3). Dostupné na: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118748>.

Doublet, V. *et al.* (2024) 'Shift in virus composition in honeybees (*Apis mellifera*) following worldwide invasion by the parasitic mite and virus vector *Varroa destructor*', *Royal Society Open Science*, 11(1), p. 231529. Dostupné na: <https://doi.org/10.1098/rsos.231529>.

Duay, P., de Jong, D. a Engels, W. (2003) 'Weight loss in drone pupae (*Apis mellifera*) multiply infested by *Varroa destructor* mites', *Apidologie*, 34(1), pp. 61–65. Dostupné na: <https://doi.org/10.1051/apido:2002052>.

Ellis, M.D. a Baxendale, F.P. (1997) 'Toxicity of seven monoterpenoids to tracheal mites (Acari: Tarsonemidae) and their honey bee (Hymenoptera: Apidae) hosts when applied as fumigants', *Journal of Economic Entomology*, 90(5), pp. 1087–1091. Dostupné na: <https://doi.org/10.1093/jee/90.5.1087>.

Engel, P. *et al.* (2016) 'The bee microbiome: Impact on bee health and model for evolution and ecology of host-microbe interactions', *mBio*. Edited by G.B. Hurst and R.J. Collier, 7(2). Dostupné na: <https://doi.org/10.1128/mBio.02164-15>.

Erban, T. *et al.* (2023) 'Imidacloprid increases the prevalence of the intestinal parasite *Lotmaria passim* in honey bee workers', *Science of The Total Environment*, 905, p. 166973. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166973>.

F. (1916) 'Isle of Wight disease in bees', *Nature*, 97(2425), pp. 161–161. Dostupné na: <https://doi.org/10.1038/097161a0>.

Fievet, J. *et al.* (2006) 'Localization of deformed wing virus infection in queen and drone *Apis mellifera* L.', *Virology Journal*, 3, p. 16. Dostupné na: <https://doi.org/10.1186/1743-422X-3-16>.

Figueroa, L.L. *et al.* (2019) 'Bee pathogen transmission dynamics: deposition, persistence and acquisition on flowers', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286(1903), p. 20190603. Dostupné na: <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.0603>.

Floris, I. *et al.* (2004) 'Comparison between two thymol formulations in the control of *Varroa destructor*: effectiveness, persistence, and residues', *Journal of Economic Entomology*, 97(2), pp. 187–191. Dostupné na: <https://doi.org/10.1093/jee/97.2.187>.

Fluri, P. *et al.* (1982) 'Changes in weight of the pharyngeal gland and haemolymph titres of juvenile hormone, protein and vitellogenin in worker honey bees', *Journal of Insect Physiology*, 28(1), pp. 61–68. Dostupné na: [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(82\)90023-3](https://doi.org/10.1016/0022-1910(82)90023-3).

Francis, R.M., Nielsen, S.L. a Kryger, P. (2013) 'Varroa-virus interaction in collapsing honey bee colonies', *PLOS ONE*, 8(3). Dostupné na: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057540>.

Fries, I. (1993) 'Nosema apis — a parasite in the honey bee Colony', *Bee World*, 74(1), pp. 5–19. Dostupné na: <https://doi.org/10.1080/0005772X.1993.11099149>.

Gauthier, L. et al. (2015) 'The *Apis mellifera* filamentous virus genome', *Viruses*, 7(7), pp. 3798–3815. Dostupné na: <https://doi.org/10.3390/v7072798>.

Genersch, E. et al. (2006) 'Detection of Deformed wing virus, a honey bee viral pathogen, in bumble bees (*Bombus terrestris* and *Bombus pascuorum*) with wing deformities', *Journal of Invertebrate Pathology*, 91(1), pp. 61–63. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.10.002>.

Genersch, E. et al. (2010) 'The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies', *Apidologie*, 41(3), pp. 332–352. Dostupné na: <https://doi.org/10.1051/apido/2010014>.

Ghosh, R.C. et al. (1999) 'The nucleotide sequence of sacbrood virus of the honey bee: an insect picorna-like virus.', *Journal of General Virology*, 80(6), pp. 1541–1549. Dostupné na: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-6-1541>.

Gisder, S., Aumeier, P. a Genersch, E. (2009) 'Deformed wing virus: replication and viral load in mites (*Varroa destructor*)', *Journal of General Virology*, 90(2), pp. 463–467. Dostupné na: <https://doi.org/10.1099/vir.0.005579-0>.

Gisder, S. a Genersch, E. (2021) 'Direct evidence for infection of *Varroa destructor* mites with the bee-pathogenic Deformed wing virus variant B, but not variant A, via fluorescence in situ hybridization analysis', *Journal of Virology*, 95(5). Dostupné na: <https://doi.org/10.1128/jvi.01786-20>.

Gómez-Moracho, T. et al. (2020) 'Experimental evidence of harmful effects of *Crithidia mellificae* and *Lotmaria passim* on honey bees', *International Journal for Parasitology*, 50(13), pp. 1117–1124. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.06.009>.

González-Varo, J.P. a Vilà, M. (2017) 'Spillover of managed honeybees from mass-flowering crops into natural habitats', *Biological Conservation*, 212, pp. 376–382. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2017.06.018>.

Govan, V.A. et al. (2000) 'Analysis of the complete genome sequence of Acute bee paralysis virus shows that it belongs to the novel group of insect-infecting RNA viruses', *Virology*, 277(2), pp. 457–463. Dostupné na: <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0616>.

Guzmán-Novoa, E. et al. (2010) '*Varroa destructor* is the main culprit for the death and reduced populations of overwintered honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Ontario, Canada', *Apidologie*, 41(4), pp. 443–450. Dostupné na: <https://doi.org/10.1051/apido/2009076>.

Hartmann, U. et al. (2015) 'Dynamics of *Apis mellifera* filamentous virus (AmFV) infections in honey bees and relationships with other parasites', *Viruses*, 7(5), pp. 2654–2667. Dostupné na: <https://doi.org/10.3390/v7052654>.

Henry, M. et al. (2012) 'A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees', *Science*, 336(6079), pp. 348–350. Dostupné na: <https://doi.org/10.1126/science.1215039>.

Higes, M. *et al.* (2008) 'How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse', *Environmental Microbiology*, 10(10), pp. 2659–2669. Dostupné na: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01687.x>.

Highfield, A.C. *et al.* (2009) 'Deformed wing virus implicated in overwintering honeybee colony losses', *Applied and Environmental Microbiology*, 75(22), pp. 7212–7220. Dostupné na: <https://doi.org/10.1128/AEM.02227-09>.

Hindson, B.J. *et al.* (2011) 'High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number', *Analytical Chemistry*, 83(22), pp. 8604–8610. Dostupné na: <https://doi.org/10.1021/ac202028g>.

Huang, Z.-Y. a Robinson, G.E. (1996) 'Regulation of honey bee division of labor by colony age demography', *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 39(3), pp. 147–158. Dostupné na: <https://doi.org/10.1007/s002650050276>.

Iller, M. *et al.* (2024) 'Phylogenetic analysis of the trypanosomatid parasite *Lotmaria passim* in honey bees (*Apis mellifera*) in Poland', *Journal of Veterinary Research*, 68(1), pp. 123–127. Dostupné na: <https://doi.org/10.2478/jvetres-2024-0018>.

Ilyasov, R. *et al.* (2021) 'Effect of miticides amitraz and fluvalinate on reproduction and productivity of honey bee *Apis mellifera*', *Uludag Bee Journal*, 21(1), pp. 21–30. Dostupné na: <https://doi.org/10.31467/uluaricilik.883775>.

Iqbal, J. a Mueller, U. (2007) 'Virus infection causes specific learning deficits in honeybee foragers', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1617), pp. 1517–1521. Dostupné na: <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.0022>.

Johnson, B.R. (2023) *Honey bee biology*. Princeton University Press.

Kadlečková, D. (2020) *Rozdíly ve viromu včel u různých populací včely medonosné (Apis mellifera)*.

Kadlečková, D. (2024) *Virome of Honey Bee*. Doctoral thesis. Charles University.

Kevill, J.L. *et al.* (2017) 'ABC assay: Method development and application to quantify the role of rhree DWV master variants in overwinter colony losses of European honey bees', *Viruses*, 9(11), p. 314. Dostupné na: <https://doi.org/10.3390/v9110314>.

Kevill, J.L. *et al.* (2021) 'Deformed wing virus variant shift from 2010 to 2016 in managed and feral UK honey bee colonies', *Archives of Virology*, 166(10), pp. 2693–2702. Dostupné na: <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05162-3>.

Klein, A.-M. *et al.* (2007) 'Importance of pollinators in changing landscapes for world crops', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1608), pp. 303–313. Dostupné na: <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>.

Köhler, H.-R. a Triebkorn, R. (2013) 'Wildlife ecotoxicology of pesticides: Can we track effects to the population level and beyond?', *Science*, 341(6147), pp. 759–765. Dostupné na: <https://doi.org/10.1126/science.1237591>.

Koziy, R.V. *et al.* (2019) 'Deformed wing virus infection in honey bees (*Apis mellifera* L.)', *Veterinary Pathology*, 56(4), pp. 636–641. Dostupné na: <https://doi.org/10.1177/0300985819834617>.

- Kunc, M. *et al.* (2019) 'The year of the honey bee (*Apis mellifera* L.) with respect to its physiology and immunity: A search for biochemical markers of longevity', *Insects*, 10(8). Dostupné na: <https://doi.org/10.3390/insects10080244>.
- Langridge, D.F. a McGhee, R.B. (1967) '*Crithidia mellificae* n. sp. an acidophilic trypanosomatid of the honey bee *Apis mellifera*', *The Journal of Protozoology*, 14(3), pp. 485–487. Dostupné na: <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1967.tb02033.x>.
- Lanzi, G. *et al.* (2006) 'Molecular and biological characterization of Deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera* L.)', *Journal of Virology*, 80(10), pp. 4998–5009. Dostupné na: <https://doi.org/10.1128/JVI.80.10.4998-5009.2006>.
- Lester, P.J. *et al.* (2022) 'Viral communities in the parasite *Varroa destructor* and in colonies of their honey bee host (*Apis mellifera*) in New Zealand', *Scientific Reports*, 12. Dostupné na: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12888-w>.
- Levin, M.D. (1983) 'Value of bee pollination to U.S. agriculture', *Bulletin of the Entomological Society of America*, 29(4), pp. 50–51. Dostupné na: <https://doi.org/10.1093/besa/29.4.50>.
- Lindauer, M. a Watkin, B. (1953) 'Division of labour in the honeybee colony', *Bee World*, 34(4), pp. 63–73. Dostupné na: <https://doi.org/10.1080/0005772X.1953.11094788>.
- Liu, Q. *et al.* (2020) 'Trypanosomatid parasite dynamically changes the transcriptome during infection and modifies honey bee physiology', *Communications Biology*, 3(1), pp. 1–8. Dostupné na: <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0775-x>.
- MacInnis, C.I., Luong, L.T. a Pernal, S.F. (2023) 'A tale of two parasites: Responses of honey bees infected with *Nosema ceranae* and *Lotmaria passim*', *Scientific Reports*, 13(1). Dostupné na: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-49189-9>.
- MacInnis, C.I., Luong, L.T. a Pernal, S.F. (2024) 'Effects of *Nosema ceranae* and *Lotmaria passim* infections on honey bee foraging behaviour and physiology', *International Journal for Parasitology*, 55(5), pp. 213–223. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2024.12.003>.
- Mackensen, O. (1950) 'Viability and sex determination in the honey bee (*Apis mellifera* L.)', *Genetics*, 36(5), pp. 500–509. Dostupné na: <https://doi.org/10.1093/genetics/36.5.500>.
- Maggi, M.D. *et al.* (2009) 'First detection of *Varroa destructor* resistance to coumaphos in Argentina', *Experimental and Applied Acarology*, 47(4), pp. 317–320. Dostupné na: <https://doi.org/10.1007/s10493-008-9216-0>.
- Marche, M.G. *et al.* (2019) 'Quantitative variation in the core bacterial community associated with honey bees from *Varroa*-infested colonies', *Journal of Apicultural Research*, 58(3), pp. 444–454. Dostupné na: <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1589669>.
- Martin, S.J. (1994) 'Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in worker brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions', *Experimental and Applied Acarology*, 18(2), pp. 87–100. Dostupné na: <https://doi.org/10.1007/BF00055033>.
- Martin, S.J. (2001a) 'The role of *Varroa* and viral pathogens in the collapse of honeybee colonies: a modelling approach', *Journal of Applied Ecology*, 38(5), pp. 1082–1093. Dostupné na: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2664.2001.00662.x>.
- Martin, S.J. (2001b) '*Varroa destructor* reproduction during the winter in *Apis mellifera* colonies in UK', *Experimental & Applied Acarology*, 25(4), pp. 321–325. Dostupné na: <https://doi.org/10.1023/a:1017943824777>.

Martin, S.J. *et al.* (2012) 'Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite', *Science*, 336(6086), pp. 1304–1306. Dostupné na: <https://doi.org/10.1126/science.1220941>.

Martin, S.J., Ball, B.V. a Carreck, N.L. (2010) 'Prevalence and persistence of deformed wing virus (DWV) in untreated or acaricide-treated *Varroa destructor* infested honey bee (*Apis mellifera*) colonies', *Journal of Apicultural Research*, 49(1), pp. 72–79. Dostupné na: <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.10>.

Matsuda, K. a Sattelle, D.B. (2004) 'Mechanism of selective actions of neonicotinoids on insect nicotinic acetylcholine receptors', *New Discoveries in Agrochemicals: American Chemical Society Symposium Series.*, pp. 172–182. Dostupné na: <https://doi.org/10.1021/bk-2005-0892.ch016>.

Mazzei, M. *et al.* (2014) 'Infectivity of DWV associated to flower pollen: Experimental evidence of a horizontal transmission route', *PLOS ONE*, 9(11). Dostupné na: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113448>.

McAfee, A. *et al.* (2025) 'Regional patterns and climatic predictors of viruses in honey bee (*Apis mellifera*) colonies over time', *Scientific Reports*, 15, p. 286. Dostupné na: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-79675-7>.

Medici, S.K. *et al.* (2015) 'The presence of synthetic acaricides in beeswax and its influence on the development of resistance in *Varroa destructor*', *Journal of Apicultural Research*, 54(3), pp. 267–274. Dostupné na: <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1145407>.

Michalczyk, M., Sokół, R. a Bancierz-Kisiel, A. (2024) 'Presence of *Lotmaria passim*, *Crithidia mellificae* and *Nosema* spp. in differently aged *Apis mellifera* brood', *Journal of Apicultural Research*, 63(2), pp. 287–296. Dostupné na: <https://doi.org/10.1080/00218839.2022.2055265>.

de Miranda, J.R. *et al.* (2004) 'Complete nucleotide sequence of Kashmir bee virus and comparison with acute bee paralysis virus', *Journal of General Virology*, 85(8), pp. 2263–2270. Dostupné na: <https://doi.org/10.1099/vir.0.79990-0>.

de Miranda, J.R. *et al.* (2022) 'Cold case: The disappearance of Egypt bee virus, a fourth distinct master strain of Deformed wing virus linked to honeybee mortality in 1970's Egypt', *Virology Journal*, 19, p. 12. Dostupné na: <https://doi.org/10.1186/s12985-022-01740-2>.

Mondragón, L., Spivak, M. a Vandame, R. (2005) 'A multifactorial study of the resistance of honeybees *Apis mellifera* to the mite *Varroa destructor* over one year in Mexico', *Apidologie*, 36(3), pp. 345–358. Dostupné na: <https://doi.org/10.1051/apido:2005022>.

Mordecai, G.J., Wilfert, L., *et al.* (2016) 'Diversity in a honey bee pathogen: first report of a third master variant of the Deformed wing virus quasispecies', *The ISME Journal*, 10(5), pp. 1264–1273. Dostupné na: <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.178>.

Mordecai, G.J., Brettell, L.E., *et al.* (2016) 'Superinfection exclusion and the long-term survival of honey bees in *Varroa*-infested colonies', *The ISME Journal*, 10(5), pp. 1182–1191. Dostupné na: <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.186>.

Morimoto, T. *et al.* (2013) 'Molecular detection of protozoan parasites infecting *Apis mellifera* colonies in Japan', *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), pp. 74–77. Dostupné na: <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2012.00385.x>.

Motta, E.V.S., Raymann, K. a Moran, N.A. (2018) 'Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(41), pp. 10305–10310. Dostupné na: <https://doi.org/10.1073/pnas.1803880115>.

Mullin, C.A. *et al.* (2010) 'High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: Implications for honey bee health', *PLOS ONE*, 5(3). Dostupné na: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009754>.

Navajas, M.J. (2010) 'Tracking the colonisation history of the invasive species *Varroa destructor*', in M.W. Sabelis and J. Bruin (eds) *Trends in Acarology*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 375–378. Dostupné na: https://doi.org/10.1007/978-90-481-9837-5_61.

Nelson, C.M. *et al.* (2007) 'The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization', *PLOS Biology*, 5(3), p. e62. Dostupné na: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050062>.

Nolan, M.P. a Delaplane, K.S. (2017) 'Distance between honey bee *Apis mellifera* colonies regulates populations of *Varroa destructor* at a landscape scale', *Apidologie*, 48(1), pp. 8–16. Dostupné na: <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0443-9>.

Nordström, S. (2003) 'Distribution of deformed wing virus within honey bee (*Apis mellifera*) brood cells infested with the ectoparasitic mite *Varroa destructor*', *Experimental & Applied Acarology*, 29(3), pp. 293–302. Dostupné na: <https://doi.org/10.1023/A:1025853731214>.

Orlova, M. a Hefetz, A. (2014) 'Distance from the queen affects workers' selfish behaviour in the honeybee (*A. mellifera*) colony', *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 68(10), pp. 1693–1700. Dostupné na: <https://doi.org/10.1007/s00265-014-1777-9>.

Pařízková, K. (2023) *Trypanosomatida včel a jejich interakce s polutanty*. Univerzita Karlova.

Pasquale, G.D. *et al.* (2013) 'Influence of pollen nutrition on honey bee health: Do pollen quality and diversity matter?', *PLOS ONE*, 8(8). Dostupné na: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072016>.

Paxton, R.J. *et al.* (2022) 'Epidemiology of a major honey bee pathogen, deformed wing virus: potential worldwide replacement of genotype A by genotype B', *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 18, pp. 157–171. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2022.04.013>.

Peck, D.T. a Seeley, T.D. (2019) 'Mite bombs or robber lures? The roles of drifting and robbing in *Varroa destructor* transmission from collapsing honey bee colonies to their neighbors', *PLOS ONE*, 14(6). Dostupné na: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218392>.

Phaboutdy, E. a Ward, M. (2024) 'Investigation of landscape risk factors for the recent spread of varroa mite (*Varroa destructor*) in European honeybee (*Apis mellifera*) colonies in New South Wales, Australia', *Geospatial Health*, 19. Dostupné na: <https://doi.org/10.4081/gh.2024.1282>.

Pietropaoli, M. a Formato, G. (2019) 'Acaricide efficacy and honey bee toxicity of three new formic acid-based products to control *Varroa destructor*', *Journal of Apicultural Research*, 58(5), pp. 824–830. Dostupné na: <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1656788>.

Pike, K.S. *et al.* (1982) 'Effects of permethrin on mortality and foraging behavior of honey bees in sweet corn', *Environmental Entomology*, 11(4), pp. 951–953. Dostupné na: <https://doi.org/10.1093/ee/11.4.951>.

Piou, V. *et al.* (2022) 'Transmission of deformed wing virus between *Varroa destructor* foundresses, mite offspring and infested honey bees', *Parasites & Vectors*, 15(1), p. 333. Dostupné na: <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05463-9>.

Posada-Florez, F. *et al.* (2019) 'Deformed wing virus type A, a major honey bee pathogen, is vectored by the mite *Varroa destructor* in a non-propagative manner', *Scientific Reports*, 9(1), p. 12445. Dostupné na: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47447-3>.

Powell, J.E. *et al.* (2014) 'Routes of acquisition of the gut microbiota of the honey bee *Apis mellifera*', *Applied and Environmental Microbiology* [Preprint]. Dostupné na: <https://doi.org/10.1128/AEM.01861-14>.

Quyen, D.V. a Lanh, P.T. (2024) 'The gut microbiome in Deformed wing virus (DWV) - uninfected and infected *Apis cerana* honeybees suggests the role of gut microbiota in combating viral infections', *ACADEMIA JOURNAL OF BIOLOGY*, 46(3), pp. 113–124. Dostupné na: <https://doi.org/10.15625/2615-9023/20923>.

Ramos-Cuellar, A.K. *et al.* (2022) 'Genotype, but not climate, affects the resistance of honey bees (*Apis mellifera*) to viral infections and to the mite *Varroa destructor*', *Veterinary Sciences*, 9(7), p. 358. Dostupné na: <https://doi.org/10.3390/vetsci9070358>.

Ramsey, S.D. *et al.* (2019) '*Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(5), pp. 1792–1801. Dostupné na: <https://doi.org/10.1073/pnas.1818371116>.

Rath, W. (1999) 'Co-adaptation of *Apis cerana* Fabr. and *Varroa jacobsoni* Oud.', *Apidologie*, 30(2–3), pp. 97–110. Dostupné na: <https://doi.org/10.1051/apido:19990202>.

Ravoet, J. *et al.* (2013) 'Comprehensive bee pathogen screening in Belgium reveals *Crithidia mellificae* as a new contributory factor to winter mortality', *PLOS ONE*, 8(8). Dostupné na: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072443>.

Raymann, K. a Moran, N. (2018) 'The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers', *Current Opinion in Insect Science*, 26. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.012>.

Rinkevich, F.D. (2020) 'Detection of amitraz resistance and reduced treatment efficacy in the varroa mite, *Varroa destructor*, within commercial beekeeping operations', *PLOS ONE*, 15(1). Dostupné na: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227264>.

Rojas-Sandoval, J. (2022) '*Apis mellifera* (European honeybee)', *CABI Compendium*, CABI Compendium, p. 6359. Dostupné na: <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.6359>.

Rosenkranz, P., Aumeier, P. a Ziegelmann, B. (2010) 'Biology and control of *Varroa destructor*', *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, pp. S96–S119. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.016>.

Runckel, C. *et al.* (2011) 'Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema*, and *Crithidia*', *PLOS ONE*, 6(6). Dostupné na: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020656>.

Šabacký, F. (1886) *Včelařství*. J.F. Šašek. Dostupné na: <http://archive.org/details/vcelarstvi-sabacky> (Accessed: 24 February 2022).

Samuelson, A.E., Gill, R.J. a Leadbeater, E. (2020) 'Urbanisation is associated with reduced *Nosema* sp. infection, higher colony strength and higher richness of foraged pollen in

honeybees', *Apidologie*, 51(5), pp. 746–762. Dostupné na: <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00758-1>.

Sandionigi, A. *et al.* (2015) 'Towards a better understanding of *Apis mellifera* and *Varroa destructor* microbiomes: introducing as a novel phylogenetic diversity analysis tool', *Molecular Ecology Resources*, 15(4), pp. 697–710. Dostupné na: <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12341>.

Satta, A. *et al.* (2005) 'Formic acid-based treatments for control of *Varroa destructor* in a Mediterranean area', *Journal of Economic Entomology*, 98(2), pp. 267–273. Dostupné na: <https://doi.org/10.1093/jee/98.2.267>.

Scharlaken, B. *et al.* (2008) 'Reference gene selection for insect expression studies using quantitative real-time PCR: The head of the honeybee, *Apis mellifera*, after a bacterial challenge', *Journal of Insect Science*, 8(1), p. 33. Dostupné na: <https://doi.org/10.1673/031.008.3301>.

Schilcher, F. *et al.* (2022) 'In vitro rearing changes social task performance and physiology in honeybees', *Insects*, 13(1), p. 4. Dostupné na: <https://doi.org/10.3390/insects13010004>.

Schüler, V. *et al.* (2023) 'Significant, but not biologically relevant: *Nosema ceranae* infections and winter losses of honey bee colonies', *Communications Biology*, 6, p. 229. Dostupné na: <https://doi.org/10.1038/s42003-023-04587-7>.

Schwarz, R.S. *et al.* (2015) 'Characterization of two species of Trypanosomatidae from the honey bee *Apis mellifera*: *Crithidia mellificae* Langridge and McGhee, and *Lotmaria passim* n. gen., n. sp', *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62(5), pp. 567–583. Dostupné na: <https://doi.org/10.1111/jeu.12209>.

Schwarz, R.S. a Evans, J.D. (2013) 'Single and mixed-species trypanosome and microsporidia infections elicit distinct, ephemeral cellular and humoral immune responses in honey bees', *Developmental & Comparative Immunology*, 40(3), pp. 300–310. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.03.010>.

Schwarz, R.S., Moran, N.A. a Evans, J.D. (2016) 'Early gut colonizers shape parasite susceptibility and microbiota composition in honey bee workers', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(33), pp. 9345–9350. Dostupné na: <https://doi.org/10.1073/pnas.1606631113>.

Seeley, T.D. (1989) 'The honey bee colony as a superorganism', *American Scientist*, 77(6), pp. 546–553. Dostupné na: <https://doi.org/10.2307/27856005>.

Shen, M. *et al.* (2005) 'Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (Kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic varroa mite', *Journal of General Virology*, 86(8), pp. 2281–2289. Dostupné na: <https://doi.org/10.1099/vir.0.80824-0>.

Sircoulomb, F. *et al.* (2025) 'Genotype B of Deformed wing virus and related recombinant viruses become dominant in European honey bee colonies', *Scientific Reports*, 15(1), p. 4804. Dostupné na: <https://doi.org/10.1038/s41598-025-86937-5>.

Standifer, L.N. *et al.* (1978) 'Supplemental feeding of honey bee colonies', *Agriculture Information Bulletin* [Preprint], (413). Dostupné na: <https://doi.org/10.22004/ag.econ.309296>.

- Stanimirović, Z. *et al.* (2019) 'Looking for the causes of and solutions to the issue of honey bee colony losses', *Acta Veterinaria*, 69(1), pp. 1–31. Dostupné na: <https://doi.org/10.2478/acve-2019-0001>.
- Strobl, V. *et al.* (2019) 'Trypanosomatid parasites infecting managed honeybees and wild solitary bees', *International Journal for Parasitology*, 49(8), pp. 605–613. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2019.03.006>.
- Tajadini, M., Panjehpour, M. a Javanmard, S.H. (2014) 'Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes', *Advanced Biomedical Research*, 3, p. 85. Dostupné na: <https://doi.org/10.4103/2277-9175.127998>.
- Taylor, S.C., Laperriere, G. a Germain, H. (2017) 'Droplet Digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: from variable nonsense to publication quality data', *Scientific Reports*, 7(1), p. 2409. Dostupné na: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02217-x>.
- Tommasi, D. *et al.* (2004) 'Bee diversity and abundance in an urban setting', *The Canadian Entomologist*, 136(6), pp. 851–869. Dostupné na: <https://doi.org/10.4039/n04-010>.
- Traynor, K.S. *et al.* (2020) '*Varroa destructor*: a complex parasite, crippling honey bees worldwide', *Trends in Parasitology*, 36(7), pp. 592–606. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.04.004>.
- vanEngelsdorp, D. *et al.* (2009) 'Colony collapse disorder: a descriptive study', *PLOS ONE*, 4(8). Dostupné na: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006481>.
- Vázquez, D.E. *et al.* (2020) 'Sleep in honey bees is affected by the herbicide glyphosate', *Scientific Reports*, 10(1), p. 10516. Dostupné na: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67477-6>.
- Walker, E.K. *et al.* (2022) 'Acute toxicity of fungicide–insecticide–adjuvant combinations applied to almonds during bloom on adult honey bees', *Environmental Toxicology and Chemistry*, 41(4), pp. 1042–1053. Dostupné na: <https://doi.org/10.1002/etc.5297>.
- Wilde, J. *et al.* (2005) 'Distribution of *Varroa destructor* between swarms and colonies', *Journal of Apicultural Research*, 44(4), pp. 190–194. Dostupné na: <https://doi.org/10.1080/00218839.2005.11101177>.
- Williamson, S.M., Baker, D.D. a Wright, G.A. (2013) 'Acute exposure to a sublethal dose of imidacloprid and coumaphos enhances olfactory learning and memory in the honeybee *Apis mellifera*', *Invertebrate Neuroscience*, 13(1), pp. 63–70. Dostupné na: <https://doi.org/10.1007/s10158-012-0144-7>.
- Winston, M.L. (1991) *The biology of the honey bee*. Harvard University Press.
- Xu, G. *et al.* (2018) 'Triplex real-time PCR for detection of *Crithidia mellificae* and *Lotmaria passim* in honey bees', *Parasitology Research*, 117(2), pp. 623–628. Dostupné na: <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5733-2>.
- Yamada, T., Yamada, K. a Wada, N. (2012) 'Influence of dinotefuran and clothianidin on a bee colony', *Japanese Journal of Clinical Ecology*, 21(1), pp. 10–23.
- Yang, R. *et al.* (2014) 'Comparison of next-generation droplet digital PCR (ddPCR) with quantitative PCR (qPCR) for enumeration of *Cryptosporidium* oocysts in faecal samples',

International Journal for Parasitology, 44(14), pp. 1105–1113. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.08.004>.

Yang, X. a Cox-Foster, D. (2007) 'Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence and microbial challenge', *Parasitology*, 134(3), pp. 405–412. Dostupné na: <https://doi.org/10.1017/S0031182006000710>.

Yang, X. a Cox-Foster, D.L. (2005) 'Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: Evidence for host immunosuppression and viral amplification', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(21), pp. 7470–7475. Dostupné na: <https://doi.org/10.1073/pnas.0501860102>.

Ye, J. *et al.* (2012) 'Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction', *BMC bioinformatics*, 13, p. 134. Dostupné na: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>.

Yue, C. *et al.* (2007) 'Vertical-transmission routes for deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera*)', *Journal of General Virology*, 88(8), pp. 2329–2336. Dostupné na: <https://doi.org/10.1099/vir.0.83101-0>.

Yue, C. a Genersch, E. (2005) 'RT-PCR analysis of Deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*)', *Journal of General Virology*, 86(12), pp. 3419–3424. Dostupné na: <https://doi.org/10.1099/vir.0.81401-0>.

Zhao, Y. *et al.* (2016) 'Comparison of droplet digital PCR and quantitative PCR assays for quantitative detection of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*', *PLOS ONE*, 11(7). Dostupné na: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159004>.