

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Dominika Kadlečková

Virom včely medonosné (*Apis mellifera*)
Honey bee (*Apis mellifera*) virome

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel:
RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D.

Praha, 2018

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.

V Praze, 9. 5. 2018

.....

Dominika Kadlečková

Chtěla bych poděkovat vedoucí mé bakalářské práce RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D., za její ochotu, pomoc a čas který mi poskytla při vypracování této práce. Také moc děkuji RNDr. Tomáši Erbanovi, Ph.D. a RNDr. Martině Salákové, Ph.D. za jejich připomínky.

Obsah

Abstrakt	II
Seznam použitých zkratek	III
1 Úvod	1
2 Virom	2
3 Včela medonosná a jiní opylovači	4
3.1 Stručná anatomie a fyziologie včely medonosné.....	5
4 Neviroví patogeni včely medonosné	8
5 Typy virových infekcí u včel	10
6 Přenos virů	11
7 Viry včely medonosné	12
7.1 Taxonomie.....	12
7.2 <i>Picornavirales</i>	14
7.2.1 <i>Dicistroviridae</i>	14
Acute bee paralysis virus (ABPV).....	14
Israeli acute paralysis virus (IAPV).....	15
Kashmir bee virus (KBV).....	16
Black queen cell virus (BQCV).....	16
<i>Aphid</i> Lethal Paralysis virus (ALPV) strain Brookings.....	16
7.2.2 <i>Iflaviridae</i>	16
Deformed wing virus (DWV) komplex.....	17
Sacbrood virus (SBV).....	18
Slow bee paralysis virus (SBPV).....	19
Moku virus (MK)	19
7.3 <i>Tymovirales</i>	20
7.3.1 <i>Tymoviridae</i>	20
Bee macula – like virus (BeeMLV).....	20
7.4 Nezařazené	20
Invertebrate iridescent virus (IIV)	20
<i>Apis mellifera</i> filamentous virus (AmFV)	20
Chronic bee paralysis virus (CBPV).....	21
Lake Sinai virus (LSV) komplex	22
Cloudy wing virus (CWV)	23
7.5 Známé interakce mezi viry	23
7.6 Rozšíření.....	24
8 Interakce virů s patogeny včely	27
8.1 <i>Varroa destructor</i>	27
8.2 <i>Nosema spp.</i>	28
9 Metody studia viromu	30
10 Závěr	32
11 Literatura	33

Abstrakt

Mikrobiom zahrnuje všechny mikroorganismy (houby, bakterie, archea, prvoky, viry) žijící ve stejném prostoru ve stejném čase. Jeho součástí je virom skládající se nejenom z virů infikující jejich hostitele, ale i virů dalších organismů v hostiteli žijících a od virů odvozených genetických elementů. Mikrobiom je důležitou součástí daného organismu a hraje řadu rolí ve vývoji a životě hostitele. Virom může mít nejenom vliv na hostitele přímo, ale i přes jiné složky mikrobiomu.

Tato práce se věnuje viromu *Apis mellifera*, celosvětově chovanému opylovači. Viry jsou jedním z faktorů zodpovědných za vysoké ztráty včelstev, a proto je tato práce zaměřena hlavně na viry s prokazatelnou patologií a jejich interakce s jinými patogeny včel, které způsobují značné škody na těchto opylovačích.

Klíčová slova: virom, včela medonosná, *Apis mellifera*, včelí viry, ztráty včelstev

Abstract

Microbiome is composed of all microorganism (fungi, bacteria, archea, protozoa, virus) sharing the same space at the same time. Virome which consists of viruses either of the host or viruses of other microorganisms and of genetic elements derived from viruses, is part of the microbiome. Microbiome plays a role in a number of processes which are vital for development and survival of the host. Virome can affect host either directly or indirectly by interaction with other parts of microbiome.

This thesis is focused on virome of *Apis mellifera*, globally managed pollinator. Viral diseases are one of the factors responsible for high colony losses of this pollinator and therefore this work is mostly dedicated to those viruses which were confirmed as pathogens of *Apis mellifera*. Also, their interaction with other pathogens of *Apis mellifera*, which leads to great losses of these pollinators will be discussed.

Key words: virome, honey bee, *Apis mellifera*, honey bee viruses, colony losses

Seznam použitých zkratek

Zkratka	Anglický termín	Český termín
ABPV	Acute bee paralysis virus	Virus akutní paralýzy včel
ABV	<i>Apis mellifera</i> bunyavirus	Bunyavirus <i>Apis mellifera</i>
AFV	<i>Apis mellifera</i> flavivirus	Flavivirus <i>Apis mellifera</i>
ALPV	<i>Aphid</i> lethal paralysis virus	Virus letální paralýzy mšice
AmFV	<i>Apis mellifera</i> filamentous virus	Filamentární virus <i>Apis mellifera</i>
AMR	<i>Apis mellifera</i> rhabdovirus	Rhabdovirus <i>Apis mellifera</i>
BeeMLV	Bee macula- like virus	-
BQCV	Black queen cell virus	Virus černání matečnicků
CBPSV	Chronic bee paralysis satellite virus	Satelitní virus chronické paralýzy včel
CBPV	Chronic bee paralysis virus	Virus chronické paralýzy včel
CCD	Colony collapse disorder	Syndrom zhroucení včelstev
CWV	Cloudy wing virus	Virus zakalených křídel
DWV	Deformed wing virus	Virus deformovaných křídel
EBV	Egypt bee virus	Egyptský včelí virus
eIF4G	Eukaryotic initiation factor 4G	Eukaryotický iniciační faktor 4G
FMDV	Foot and mouth disease virus	Virus slintavky a kulhavky
HIV	Human immunodeficiency virus	Virus lidské imunitní nedostatečnosti
HPG	Hypopharyngeal glands	Hltanové žlázy
IAPV	Israeli acute paralysis virus	Izraelský virus akutní paralýzy
IGR	Intergenic region	Mezigenová oblast
IIV	Invertebrate iridescent virus	Iridescentní virus bezobratlých
IRES	Internal ribosomal entry site	Vnitřní místo pro nasednutí ribozomu
KBV	Kashmir bee virus	Kašmírský včelí virus
KV	Kakugo virus	Kakugo virus
L protein	Leader protein	-
LSV	Lake Sinai virus	Virus jezera Sinai
MK	Moku virus	Moku virus
NGS	Next generation sequencing	Sekvenování nové generace
NK	Nucleic acid	Nukleová kyselina
ORF	Open reading frame	Otevřený čtecí rámec
PCR	Polymerase chain reaction	Polymerázová řetězová reakce
RdRp	RNA – dependent RNA – polymerase	RNA – dependentní RNA – polymeráza
RISC	RNA – induced silencing complex	-
RNAi	RNA interference	RNA interference
RT	Reverse transcription	Reverzní transkripce
SBPV	Slow bee paralysis virus	Virus pomalé paralýzy včel
SBV	Sacbrood virus	Virus pytlíčkovitého plodu
siRNA	Small- interfering RNA	-
UTR	Untranslated region	Nepřekládaná oblast
VdMLV	<i>Varroa destructor</i> macula- like virus	-
VDV	<i>Varroa destructor</i> virus	Virus <i>Varroa destructor</i>
VTLV	<i>Varroa</i> Thymo – like virus	-
VTP	<i>Varroa</i> saliva toxic protein	Toxický protein slin <i>Varroa</i>
WL	Wintering losses	Ztráty zazimovaných včelstev

1 Úvod

V posledních letech dochází nejenom k úbytku opylovačů, ale i vysokým ztrátám včelstev. To je závažné vzhledem k jejich významu, jak pro potravinářskou produkci, tak udržení diversity rostlin. Tyto úbytky a ztráty jsou dány množstvím faktorů a patogenní organismy a interakce mezi nimi jsou jedním z nich. Také patogeni nově zanesení do dosud naivní populace mohou vyvolat závažnější projevy a větší ztráty než u původního hostitelského druhu.

Většina virů identifikovaných v *Apis mellifera* byla studována ve vztahu k onemocněním, která způsobují a kvůli studiu jejich podílu na ztrátách včelstev. Některé viry se vyskytují v různých druzích opylovačů a je důležité zjistit, kdo je primárním hostitelem. Studium těchto virů je tedy důležité nejenom pro ochranu chovaných včel, ale i volně se vyskytujících opylovačů. Recentně bylo objeveno několik nových virů, ale zatím není mnoho známo o jejich biologii, včetně toho, jaký vliv mají na svého hostitele. Avšak řada včelích virů objevených již dříve není dosud asociována s žádným onemocněním hostitele.

Vzhledem k tomu že koinfekce více virů, tak případně koinfekce virů s jinými patogeny jsou u včel spíše pravidlem než výjimkou, je důležité studovat jejich vztahy. Zatímco některé interakce mohou být velmi škodlivé a vést k velkým ztrátám včelstev, u jiných není známa interakce nebo mohou dokonce poskytovat i ochranný efekt.

Cíle práce:

Cílem této práce je podat přehled o známých virech včely medonosné včetně cest šíření, onemocnění, které způsobují, taxonomicky je zařadit a porovnat jejich geografické rozšíření. Zaměřit se i na známé interakce virů navzájem nebo s různými dalšími patogeny včel a vliv těchto interakcí na hostitele. Stručně bude uveden i princip metod detekce virů u včel.

2 Virom

Mikrobiom můžeme definovat jako veškeré mikroorganismy (bakterie, archea, jednobuněčná eukaryota, viry, houby) nacházející se ve stejném čase na stejném místě. U hmyzu se výraz mikrobiom někdy používá nesprávně pro označení komunity bakterií. Virová složka mikrobiomu, také nazývaná virom, se skládá z virů, které mohou infikovat jak hostitelovy buňky, tak ostatní složky mikrobiomu (bakteriální virom, archeální virom) a od virů odvozených genetických elementů přítomných v hostitelském genomu. Poznání obrovského významu mikrobiomu přineslo zavedení nových pojmů. Na organismus se nyní nepohlíží jako na samostatnou entitu, ale byl zavedený pojem holobiont, který označuje soubor interagujících organismů fungující a podléhající evoluci jako celek, zahrnující jak hostitele, tak mikrobiom. Pojem hologenom pak označuje genetickou informaci holobionta (Bordenstein & Theis, 2015).

Mikrobiom má vliv na značné množství procesů v organismu. U některých organismů může být vitální pro vývoj orgánu nebo rozmnožení daného organismu (Koropatnick *et al.*, 2004; Pannebakker *et al.*, 2007). Mikrobiom se podílí na vývoji střeva a ovlivňuje hematopoézu (Khosravi *et al.*, 2014; Stappenbeck *et al.*, 2002), také hraje důležitou roli při vývoji a regulaci imunitního systému (Lee & Mazmanian, 2010). Mikroorganismy také ovlivňují chování hostitele, buď přímým propojením s nervovým systémem, nebo přes imunitní systém, ale jsou důležité i pro vývoj nervového systému a sociálního chování (Sampson & Mazmanian, 2015). Podílí se na obraně hostitele proti patogenním mikroorganismům produkcí antimikrobiálních látek, kompeticí o zdroje a zabráněním adheze na povrch (Buffie & Pamer, 2013). Mikroorganismy ve střevě produkují množství látek, které mohou přestupovat do oběhu, ale podílí se i na trávení a u některých živočichů umožňují dostatečný nutriční příjem z jinak chudé diety (Gündüz & Douglas, 2009).

Všechny složky mikrobiomu jsou důležité a jsou propojeny komplexní sítí interakcí. Celý systém je dynamický a složení mikrobiomu se mění s řadou faktorů. Nejenom, že mikrobiom ovlivňuje hostitele, ale i hostitel je schopný, do určité míry, ovlivnit složení svého mikrobiomu. Na viry bylo po dlouhou dobu pohlíženo převážně jako na patogeny, i když některé mutualistické vztahy s hostitelem byly známy. Dnes se ukazuje, že virom hraje nezbytnou roli v životě holobionta. Jeden z nejznámějších příkladů jsou integrované polydnaviry u některých parazitických vosiček, které jim umožňují potlačit imunitu larvy, do které kladou svoje vajíčka a jsou tak nezbytné pro jejich rozmnožení a vývoj. Někteří hostitelé vosiček však žijí v symbióze s bakterií obsahující bakteriofága, jehož toxin poskytuje ochranný efekt larvám před vývojem vosiček (Oliver *et al.*, 2009).

Chronické virové infekce stimulují imunitní systém živočicha, ale jsou též schopné ovlivnit transkripci v infikovaných i neinfikovaných buňkách (Canny *et al.*, 2014). Některé viry jsou schopné chránit hostitele proti jinému viru. Například GB – virus C (také znám jako hepatitis G virus), běžná bezpříznaková infekce člověka, zmírňuje progres onemocnění HIV- 1 (z angl. Human immunodeficiency virus) nejspíše tím, že ovlivňuje aktivaci T – lymfocytů (Bhattarai & Stapleton, 2012). Virom je schopen bránit hostitele i proti nevirovým onemocněním a ovlivňuje multifaktoriální onemocnění jako je alergie, Crohnova nemoc nebo diabetes 1 typu (Foxman & Iwasaki, 2011). Virom často nemá vliv přímo na hostitele, ale na jinou část mikrobiomu. Důležitou částí viromu jsou bakteriofágy schopné řídit složení a fungování bakteriomu, také tvoří na sliznici obranu proti invazi patogenních bakterií (Barr *et al.*, 2013).

Díky schopnosti integrace do hostitelského genomu mají viry velmi těsný vztah k hostiteli. Endogenní virové elementy, většinou retrovirového původu, mohou být zdrojem regulačních elementů, nebo jsou jejich proteiny využívány hostitelem (Feschotte & Gilbert, 2012), např. tvorba placenty u savců je umožněna díky *syncytinu* původně *env* genu retroviru (Dupressoir *et al.*, 2009). Endogenní retrovirové elementy mohou navodit rezistenci proti infekci obdobným virem. Myší produkt *FVI* genu odvozený od *gag* genu, dnes již se nevyskytujícího viru, účinně brání infekci vzdáleně příbuzným myším lyfotropním virem nejspíše interakcí s jeho kapsidovým proteinem (Hilditch *et al.*, 2011).

Včely mají poměrně jednoduchý bakteriom, s 8-10 symbiotických druhů tvořících až 95 % veškeré bakteriální populace v jedinci (Sabree *et al.*, 2012). Řada těchto bakterií je důležitá pro výživu, zpracovávají řadu substrátů z pylu včetně těžko degradovatelných složek, jako je buněčná stěna (Kešnerová *et al.*, 2017). Také stimulují produkci hormonů, které poté ovlivní vývoj včely (Zheng *et al.*, 2017). Jsou důležité pro vývoj a stimulaci imunitního systému (Emery *et al.*, 2017) a mohou poskytovat ochranný efekt proti některým patogenům (Kwong *et al.*, 2017; Schwarz *et al.*, 2016). Složení bakteriomu může být ovlivněno řadou faktorů jako jsou patogeni, pesticidy aj. (Hubert *et al.*, 2017; Kakumanu *et al.*, 2016). Kromě bakterií přítomných v jedinci jsou bakterie které se nacházejí často v úlu, které by se mohly podílet na zachování skladované potravy (Anderson *et al.*, 2014).

3 Včela medonosná a jiní opylovači

Včely (*Apis spp.*) a čmeláci (*Bombus spp.*) (*Arthropoda: Insecta: Hymenoptera: Apidae*) spolu s dalšími hmyzími opylovači hrají nezbytnou roli v ekosystému. Zhruba 75 % druhů plodin těží z interakcí s opylovači a tyto plodiny tvoří okolo 35 % z celkové potravinářské produkce (Klein *et al.*, 2007). Tyto plodiny jsou významné díky tomu, že jsou hlavním zdrojem některých vitaminů, antioxidantů a jiných důležitých látek (Eilers *et al.*, 2011). Kromě produkce včelích produktů jako je med, pyl, jed aj., jsou velmi důležití pro udržení biodiverzity rostlin (Biesmeijer *et al.*, 2006; Klein *et al.*, 2018).

Počet včelstev se sice za posledních 50 let celosvětově zvýšil o 45 %, ale intenzifikace zemědělství vede k větším nárokům na počet opylovačů neboť došlo k zvýšení nároků o více než 300 % (Aizen & Harder, 2009). I když volně se vyskytující opylovači nejsou tak dobře monitorováni, byl zaznamenán jejich úbytek. Úbytky volně se vyskytujících opylovačů jsou též významné, neboť se ukazuje jejich důležitost. Právě oni mohou být efektivnějšími opylovači pro určité druhy rostlin (Garibaldi *et al.*, 2013; Mallinger & Gratton, 2015). V některých oblastech Severní Ameriky se udává úbytek hojnosti čmeláků během posledních 20 let až o 96% (Cameron *et al.*, 2011) a u volně se vyskytujících včel za posledních 120 let až o 50 % (Burkle *et al.*, 2013). V Evropě je až 80 % druhů čmeláků ohrožených alespoň v jedné ze sledovaných zemí a 30 % druhů ve všech sledovaných zemích (Kosior *et al.*, 2007). Obecně se soudí, že tyto úbytky jsou způsobeny řadou faktorů a jejich synergickými a aditivními interakcemi (Goulson *et al.*, 2015). Jedním z těchto faktorů je zavedení chovného druhu opylovače, které může negativně ovlivnit stávající populaci kompeticí o zdroje nebo představením nového patogenu (Goulson, 2003; Santamaria *et al.*, 2018).

K velkým ztrátám včelstev docházelo již v minulosti, některé z nich byly podobné ztrátám, které vidíme dnes. Velké ztráty včelstev v Coloradu v letech 1891 a 1896 byly nazvány Květnová nemoc (z angl. May disease) a v průběhu dalších let byly ztráty popsány i v jiných zemích a nazvány různě např. „disappearing syndrome“ v Austrálii nebo „Isle of Wight disease“ ve Velké Británii (Underwood & vanEngelsdorp, 2007). V roce 2006 byl poprvé v USA popsán syndrom zhroucení včelstev (z angl. Colony collapse disorder (CCD)). Typickou charakteristikou CCD je náhlé zmizení dělnic z kolonie, zatímco královna a vývojová stádia přežívají. Mrtví jedinci pak nejsou k nalezení v okolí ani uvnitř úlu (vanEngelsdorp *et al.*, 2009). Kritickým obdobím pro včelstva je zima, kdy se spoléhají na zásoby a musí udržet dostatek jedinců pro pokračování kolonie v dalším období. V některých zemích byly zaznamenány zvýšené ztráty

během tohoto období, které zčásti závisí na kompetenci včelaře. Pokud tedy zazimovaná včelstva z různých příčin nepřežijí zimu, je tento jev nazýván ztráty zazimovaných včelstev (z angl. wintering losses (WL)) (Genersch *et al.*, 2010; van der Zee *et al.*, 2012). Mezi lety 2012-2014 se zimní úmrtnost ve sledovaných evropských zemích pohybovala od 2 % do 32 % (Jacques *et al.*, 2017). Ve Spojených státech amerických jsou průměrné zimní ztráty za posledních 10 let 24,6 % (Kulhanek *et al.*, 2017). Ztráty včelstev jsou multifaktoriální a bylo identifikováno přes 60 různých faktorů které na nich mají podíl, včetně virových infekcí, výživy a vlivu pesticidů (vanEngelsdorp *et al.*, 2009, 2010). Zdá se však, že *Varroa destructor* (*Arthropoda: Arachnida: Mesostigmata: Varroidae*) je jedním z nejdůležitějších faktorů zodpovědných za ztráty (Kielmanowicz *et al.*, 2015).

3.1 *Stručná anatomie a fyziologie včely medonosné*

Včely jsou sociální hmyz žijící v koloniích skládající se obvykle z více než 20 000 jedinců. Jsou haplodiploidními organismy, kdy se oplozená (diploidní) vajíčka vyvíjejí v královnu nebo dělnice, zatímco z neoplozených (haploidní) vznikají trubci. V kolonii jsou tedy tři kasty, z nichž dělnice jsou nejpočetnější. Vylíhnutí dospělého jedince předchází vývojové stádium vajíčka, larvy a kukly a procházejí tedy proměnou dokonalou. Diploidní vajíčka jsou zpočátku schopné dát vznik jak královně, tak dělnici, což záleží hlavně na kvalitě potravy, kterou jsou krmeny. Pokud jsou larvy krmeny po celou dobu mateří kašičkou, dají vznik královně, která má rychlejší vývoj, dorůstá větších rozměrů a žije déle. Pokud jsou larvy krmeny mateří kašičkou pouze zpočátku svého vývoje, vyvíjejí se z nich dělnice (Haydak, 1970).

Několik dní poté, co se královna prokouše z buňky, opouští úl a je oplodněna, sperma poté uchovává ve spermatéce. Zbytek jejího života klade vajíčka a dělnice se o ní starají. Dělnice během roku žijí okolo 30 dní a procházejí behaviorálním vývojem. Znamená to, že se s věkem mění jejich úloha v kolonii a ta je doprovázena i změnou v anatomii a fyziologii jedince. Nejprve čistí a uzavírají komůrky (uklízečka), poté se starají o larvy a matku (krmička a kojička), později se podílí na stavbě a udržování včelího úlu (stavitelka). Okolo 3 týdne života začnou plnit úlohy, které vyžadují opuštění úlu, jako je ventilace, střežení vchodu a sběr potravy (strážkyně a létavka). Tento behaviorální vývoj je velmi plastický, včely tak mohou měnit svoje úlohy podle potřeb kolonie, bez ohledu na jejich věk (Page & Peng, 2001). Pokud včely v dané oblasti zimují vyvíjejí se dělnice žijící až 8 měsíců (zimní včely), jejichž fyziologie je v některých aspektech podobná té královně (Erban *et al.*, 2013). Mají však sníženou expresi některých složek energeticky náročného imunitního systému, což by mohlo být příčinou zvýšené náchylnosti k virovým a dalším infekcím (Steinmann *et al.*, 2015).

Tělo včely podporované exoskeletem (kutikula) lze rozdělit na několik částí: hlava, hrud', zadeček a tělní přívěšky. Včely mají otevřenou cévní soustavu, kde hřbetní céva pumpuje hemolymfu, která se rozlévá do hemocoelu a volně omývá tkáň. K dýchání včely využívají systém vzdušnic. První část trávicí soustavy včely se skládá z hltanu, jícnu a medového váčku, jehož obsah může být regurgitován. Druhá část trávicí soustavy je v kontaktu s množstvím patogenů a její epitel je důležitou anatomickou bariérou proti jejich průniku. Do poslední části ústí malpighické trubice zodpovědné za vylučování odpadních látek a osmoregulaci. Včela má množství žláz, které jsou důležité jak pro fyziologii jedince, tak pro fungování kolonie (vylučování feromonů nebo zpracování např. vosku, medu). Tyto žlázy se liší nejenom dle kasty ale i stáří jedinců. Např. hltanová žláza (z angl. hypopharyngeal glands (HPG)) velmi vyvinutá u dělnic, produkuje nejdříve množství proteinů do mateří kašičky, ale později v jejich životě se zmenší a produkuje enzymy metabolismu cukrů. Mandibulární žlázy královny produkují feromon, který je zodpovědný za zabránění vývoje ovarii dělnic, zato u dělnic mandibulární žláza produkuje lipidovou složku mateří kašičky (Fujita *et al.*, 2013).

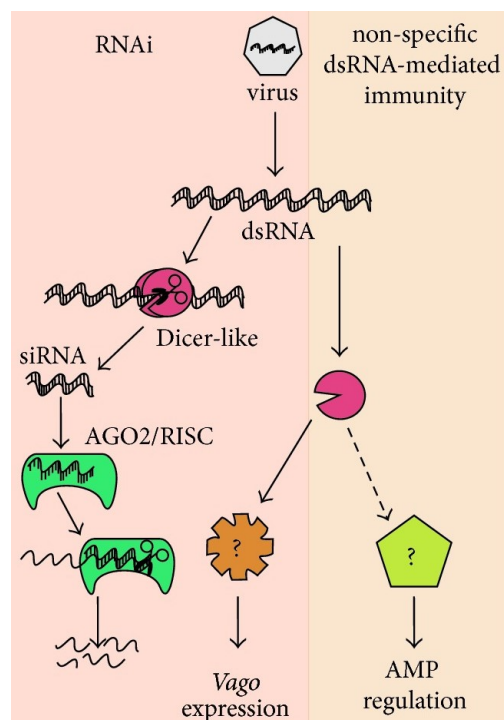
Tukové tělísko je unikátní orgán hmyzu, do kterého je skladována energie a probíhají v něm nejrůznější metabolické dráhy. Také zde probíhá syntéza a sekrece proteinů do hemolymfy např. lipophorinů zodpovědných za transport lipidů. U včely se v tukovém tělísku kromě adipocytů nachází eonocyty, které jsou důležité pro syntézu některých proteinů a lipidů kutikuly, ale hrají roli i v metabolismu lipidů (Arrese & Soulages, 2010).

Nervová soustava včel se skládá z několika propojených ganglií. Nervový systém vykazuje jistou decentralizaci, tj. některé chování (např. lokomoce) je do určité míry řízeno tělními ganglii. Mozek je poté tvořen nadjícnovým a podjícnovým ganglionem. Nadjícnový ganglion je možné rozdělit na tři části: proto-, deuto- a tritocerebrum. Protocerebrum je důležité pro funkci zraku a obsahuje houbovitá tělíska a centrální komplex. Houbovitá tělíska, velké u sociálního hmyzu, se podílí na paměti (hlavně čichové, ale ne výhradně), rozhodování a integraci senzorických / motorických signálů. Mnohem větší kontrolu nad řízením chování má centrální komplex, který je zodpovědný i za lokomoci, orientaci a je pokládán za důležité integrační centrum zrakových a motorických drah (Wessnitzer & Webb, 2006).

Imunitní systém včely se skládá z buněčné a humorální složky. Buněčná imunita je zprostředkovávána buňkami hemolymfy, hlavně hemocyty a zahrnuje fagocytózu, nodulaci a enkapsidaci. Důležitou složkou humorální imunity je fenoloxidázová kaskáda a koagulace. Kromě melaninu s jeho toxickými meziprodukty, jsou další složky humorální imunity lysozymy, antimikrobiální peptidy a cytokiny, sekretovány hemocyty a tukovým tělískem. Včely

nemají pouze imunitu na úrovni jedince, ale i sociální imunitu, kdy chování jedinců v kolonii omezuje šíření patogena. Příkladem je odstraňování mrtvých dospělců nebo larev / kulek parazitovaných či vykazujících příznaky onemocnění (DeGrandi-Hoffman & Chen, 2015).

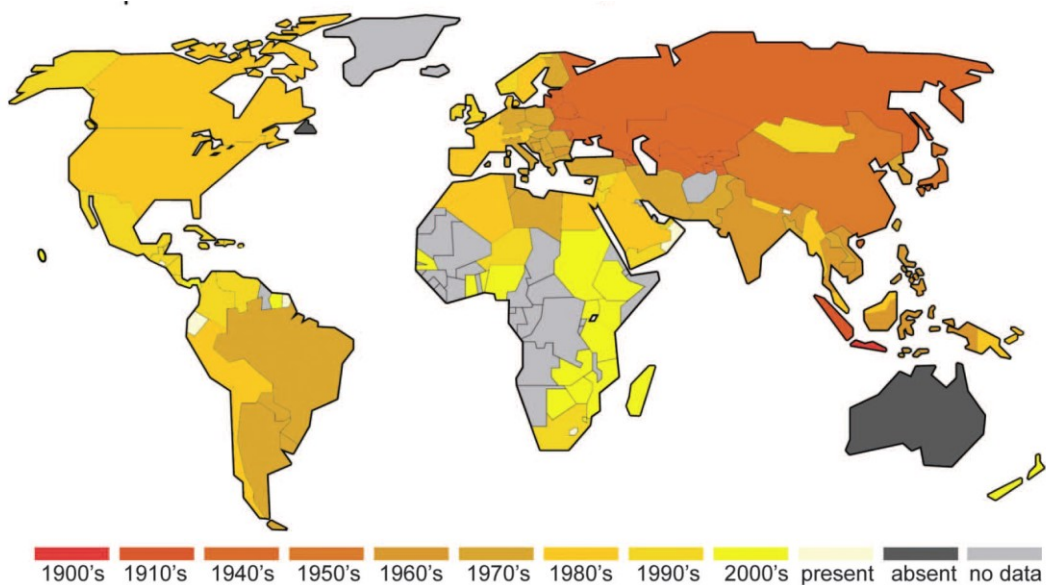
Byla identifikována řada drah, které hrají roli v antivirové obraně (Brutscher *et al.*, 2015). Zatímco některé dráhy jsou aktivovány při obraně proti řadě patogenů, jiné jsou specificky iniciované pouze určitým patogenem, avšak iniciace závisí i na dalších faktorech (např. vývojové stádium) (Doublet *et al.*, 2017). Nejdůležitější mechanismus obrany proti virovým infekcím u včely je RNA interference (RNAi) (obrázek 1). Pokud se v buňce vyskytne dvouřetězcová DNA je rozpoznána RNasou III (u včely Dicer – like), která ji rozstříhá na 21-22 bp dlouhé duplexy které se nazývají siRNA (z angl. small – interfering RNA). Ty jsou poté vázány Argonautem (AGO2), endoribonukleázou a katalytickou složkou RISC (z angl. RNA – induced silencing complex). V komplexu poté zůstává pouze jedno vlákno siRNA, které navede celý komplex ke komplementární virové sekvenci, která je poté rozštěpena (Brutscher *et al.*, 2015). Kromě RNAi, dvouřetězcová RNA aktivuje další dráhy, které jsou pravděpodobně důležité pro obranu proti virové infekci, neboť Dicer – like by mohl fungovat jako receptor dvouřetězcové RNA a vyvolat obdobnou obranu, jako je produkce interferonu u savců, tedy zvýšení exprese genů některých drah, ale i RNA helikáz a proteinů důležitých pro transport dvouřetězcové RNA (Brutscher *et al.*, 2017).



Obrázek 1. RNA interference (RNAi). Dvouřetězcová RNA (dsRNA) viru je zpracovávána Dicer – like a vznikají siRNA (small – interfering RNA). Ty jsou vázány Argonautem (AGO2), složkou RISC (RNA – induced silencing complex), který je zodpovědný za degradaci virové RNA. Kromě vyvolání RNAi má dsRNA vliv in a jiné dráhy. Například zvyšuje expresi antimikrobiálních peptidů (AMP) nebo zahajuje expresi Vago, který ovlivňuje virovou replikaci. Převzato z (Brutscher *et al.*, 2015).

4 Neviroví patogeni včely medonosné

Varroa je nejvýznamnější ektoparazit včely medonosné vyskytující se dnes téměř celosvětově. Tento ektoparazit přešel na populace včely medonosné během minulého století (do Evropy v 70. letech) z asijské včely *Apis cerana*, u které nezpůsobuje velké škody (Boecking & Genersch, 2008; Wilfert *et al.*, 2016). Výskyt a přibližný čas rozšíření znázorňuje obrázek 2. Samice *Varroa* střídá během životního cyklu dvě fáze: foretická, kdy sají hemolymfu na dospělých jedincích, a reprodukční fáze probíhající při vývoji včely v komůrce. Pro reprodukční fázi je do včelí komůrky samice *Varroa* přenesena z dospělé včely před zavíčováním (Boot *et al.*, 1994). Samice poté klade nejprve haploidní vajíčko, ze které se vyvine samec a poté několik diploidních samicích vajíček (Martin, 1994). Z komůrky se poté vynoří dospělá včela s oplozenými samicemi *Varroa*. V foretickém stádiu ale *Varroa* preferuje infekci dělnic, které se starají o larvy než starších nebo velmi mladých včel (Piccolo *et al.*, 2010). Infekce *Varroa* má závažný dopad jak na jedince, tak na celou kolonii (pro přehled Rosenkranz *et al.*, 2010).



Obrázek 2. Rozšíření *Varroa destructor*. Převzato z (Wilfert *et al.*, 2016).

Dvě mikrosporidie (Houby: *Microsporidia*: *Nosema*), *Nosema apis* a *Nosema ceranae*, jsou globálně rozšířené a infikují dospělé jedince. *N. ceranae*, původně parazit asijské včely *A. cerana*, byl přenes na *Apis mellifera* (Klee *et al.*, 2007). Mezi oběma mikrosporidii probíhá kompetice, nejspíše díky stejnému tropismu nebo v důsledku aktivace imunitního systému, a infekce jedné má negativní efekt na průběh infekce druhou mikrosporidií. Tento efekt je ale asymetrický a infekce *N. ceranae* má větší vliv na *N. apis* než *N. apis* na *N. ceranae*. To by mohlo vysvětlit, proč na některých územích převažuje *N. ceranae* (Natsopoulou *et al.*, 2015). Recentně byla také popsána nová mikrosporidie, *N. neumanni*, která byla v Ugandě mnohem

častější než *N. ceranae* nebo *N. apis* (Chemurot *et al.*, 2017). Pozřené spory těchto patogenů napadají buňky střevního epitelu a destrukují je (Higes *et al.*, 2007; Huang & Solter, 2013). *N. ceranae* i *N. apis* jsou pro *A. mellifera* nejspíše stejně virulentní, i když některé studie naznačují, že *N. ceranae* může být virulentnější než *N. apis* (Huang *et al.*, 2015; Natsopoulou *et al.*, 2016).

Houby rodu *Aspergillus* jsou oportunní patogeni, kteří jsou schopni způsobovat chorobu zkamenění včelího plodu. U larev včel bylo identifikováno několik patogenních zástupců (*Aspergillus flavus*, *A. nomius*, *A. phoenicis*), *A. flavus* byl nalezený u dospělců (Foley *et al.*, 2014). Znamější je ale choroba zvápenatění včelího plodu, způsobována houbou *Ascosphaera apis*. Projevuje se u larev. *A. apis*, je globálně rozšířená a propuknutí infekce je spojováno s různými stresory (Evison, 2015).

Bakterie u včelích larev vyvolávají dvě závažná bakteriální onemocnění. Původce jsou gram – pozitivní bakterie *Melissococcus plutonius* a *Paenibacillus larvae* které způsobují hnilobu a mor včelího plodu (Forsgren, 2010; Genersch, 2010).

Crithidia mellificae a *Lotmaria passim* jsou globálně rozšířené zástupci skupiny *Kinetoplastida*, ale nově popsaná *L. passim*, dříve zaměňována za *C. mellificae*, má vyšší prevalenci (Schwarz *et al.*, 2015). I když není mnoho známo o jejich patologii, mohli by mít podíl na CCD a WL (Cornman *et al.*, 2012; Ravoet *et al.*, 2013).

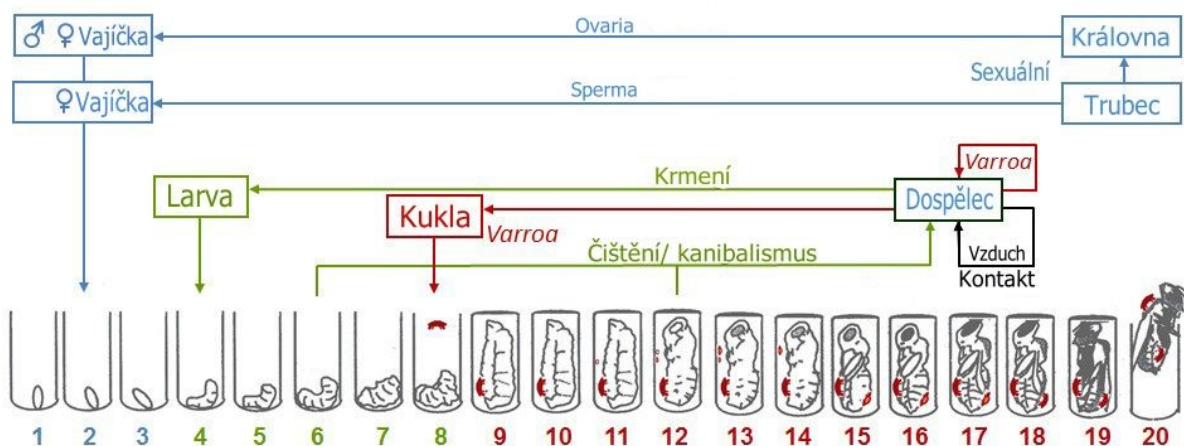
5 Typy virových infekcí u včel

Virové infekce u včel jsou několika typů. Otevřená infekce je charakterizována produkcí viru a viditelnými příznaky onemocnění. Otevřená infekce může být dále členěna na akutní nebo chronickou. Akutní infekce je typicky krátkodobá, s produkcí vysokého počtu virových částic a přítomností jasně patrných příznaků onemocnění. Zvláštním typem akutní infekce je infekce inaparentní, kdy také dochází ke krátkodobé vysoké produkci virových částic, ale příznaky onemocnění nejsou přítomné. Při chronické infekci dochází k dlouhodobé produkci virových částic, a to buď po celý život hostitele nebo, častěji, během určitého vývojového stádia, a zároveň jsou i patrné příznaky onemocnění (de Miranda & Genersch, 2010).

Při skryté infekci detekujeme virus, ale příznaky onemocnění nejsou patrné. Ale i tento druh infekce může mít negativní dopad na hostitele. Virus přetrvává v hostiteli skrz různá vývojová stádia a je posléze schopen přejít do otevřené infekce. Při latentní skryté infekci nedochází k produkci virových částic, virus je integrován do hostitelského genomu nebo je udržován v buňkách jako epizom, avšak tento druh infekce zatím nebyl u včelích virů popsán. U perzistentní infekce dojde k ustanovení rovnováhy mezi virem a hostitelem, produkuje se jen malé množství virových částic (de Miranda & Genersch, 2010). Zatím není přesně objasněn mechanismus a zřejmě ani všechny faktory, díky kterým dojde k přechodu ze skryté do otevřené infekce, ale byly identifikovány některé faktory jako dieta, pesticidy a jiní patogeni, které mají vliv na replikaci a virulenci virů včel (McMenamin *et al.*, 2016).

6 Přenos virů

Přenos viru může probíhat dvěma způsoby: horizontálně a vertikálně (shrnutí na obrázku 3). Horizontální přenos lze rozdělit na přímý a nepřímý. Při přímém dochází k šíření viru mezi infikovaným a zdravým jedincem jedné generace. Díky sociálnímu uspořádání včelstva a nahlučení mnoha jedinců dochází mezi jedinci v kolonii, ale i mezi různými koloniemi a dalšími opylovači k intenzivním kontaktům, díky kterým se viry rychle šíří a to orálně, vzduchem a i přímým kontaktem. Orální cesta je nejčastější a potrava je důležitým zdrojem viru pro jedince v kolonii. Larvy jsou krmeny dospělými jedinci, kteří ale potravu sdílí i mezi sebou. Některé viry jsou schopné se replikovat ve žlázách důležitých pro zpracování potravy (hlavně HPG) a sekrety těchto žláz mohou být zdrojem virů v potravě. Další způsob přímého horizontálního přenosu je venereální (sexuální). Některé viry byly detekovány ve spermatu trubců, ale není známo, jak velký podíl má tento přenos na šíření infekce v kolonii (Amiri *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2006b). Pokud se na přenosu podílí vektor, který přenáší virus mezi jedinci, jedná se o horizontální přenos nepřímý. Nejvýznamnější vektor včelích virů je *Varroa*, který sají na hemolymfě včel. Virus může zůstat na sacím ústrojí *Varroa* po sání na nakažené včele nebo je regurgitován ze střeva a může tak nakazit zdravého jedince. Při vertikálním přenosu je virus přenesen na potomky jedince, virus se nachází buď na povrchu (transovum) nebo uvnitř (transovarian) vajíčka. Je často obtížné prokázat tento způsob přenosu, právě i z důvodu sociálního chování včel, které poskytuje množství cest, jak vývojová stádia nakazit. Způsob přenosu viru ovlivňuje jeho virulenci. Zatímco důsledkem horizontálního přenosu je otevřená infekce s vysokou produkcí viru, vertikální přenos obvykle vyústí v perzistentní infekci charakterizovanou nižší virulencí (Chen *et al.*, 2006a).



Obrázek 3. Možné cesty přenosu virů u *A. mellifera*.

Mezi dospělými jedinci může být virus přenesen kontaktem, sdílením potravy nebo vektorem. Mohou se také nakazit čištěním komůrek. Mladé včely jsou nakaženy krmením nebo díky vektoru. Možná je také vertikální cesta přenosu. Královna kromě jiných může být nakažena při sexuálním styku. Upraveno dle (de Miranda *et al.*, 2011).

7 Viry včely medonosné

Velká většina virů objevená u včel jsou RNA viry, které díky vyšší chybovosti svých RNA polymeráz mají vyšší mutační rychlost a jejich populace jsou proto polymorfni, označované jako quasi druhy. To znamená, že populace sestává z velkého množství geneticky odlišných variant. Díky tomu může docházet k častým změnám vlastností virů, jako je jejich tropismus a hostitelská specifita (Domingo *et al.*, 2012). Chov *A. mellifera* vytváří dobré podmínky pro pomnožení virů. Takové infikované chovy pak mohou být zdrojem infekce pro další chovy i pro volně se vyskytující opylovače, kteří s nimi přichází do kontaktu a sdílí zdroje potravy („spill – over“). Přenos virů je však možný i v opačném směru, tedy od volně žijících druhů do chovných včelstev. Často tedy mají tyto viry široké hostitelské spektrum což znemožňuje jednoduché určení původního hostitele a jsou nebezpečím pro volně se vyskytující opylovače (McMahon *et al.*, 2015; Santamaria *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2010).

Další skupina virů, která by mohla mít vztah s *A. mellifera* jsou viry rostlin. Často je možné najít jejich sekvence ve včelách, ty ale mohou pocházet pouze z pylu (Galbraith *et al.*, 2018; Granberg *et al.*, 2013). Ale jeden z těchto rostlinných virů je schopen replikace v *A. mellifera* (Li *et al.*, 2014). A i když *A. mellifera* nemusí být hostitelem, ale alespoň pro některé z těchto virů může fungovat jako vektor a šířit viry mezi rostlinami při opylování (Darzi *et al.*, 2018).

7.1 Taxonomie

Do současné doby bylo v *A. mellifera* identifikováno nejméně 31 virů. S nástupem nových technologií bylo objeveno a stále je objevována řada virů nových. Nedávno byly nalezeny v *A. mellifera*, kromě jiných, viry patřící do čeledi *Rhabdoviridae* (*Apis mellifera* rhabdovirus 1,2 (AMR- 1,2)), *Bunyaviridae* (*Apis mellifera* bunyavirus 1 (ABV- 1)) a *Flaviviridae* (*Apis mellifera* flavivirus (AFV)) (Remnant *et al.*, 2017). Taxonomické zařazení dále zmiňovaných virů je shrnuto v tabulce 1.

Množství virů patří do řádu *Picornavirales*, který má šest čeledí. V *A. mellifera* byly nalezeny viry patřící do čeledi *Dicistroviridae* a *Iflaviridae*. Kromě nich do tohoto řádu patří čeledi *Marnaviridae*, *Picornaviridae*, *Polycipiviridae*, *Secoviridae* a dva nezařazené rody *Bacillarnavirus* a *Labyrnavirus*. Čeleď *Dicistroviridae* má tři rody a 15 druhů. Do rodu *Aparavirus* se řadí příbuzné viry Acute bee paralysis virus (ABPV), Kashmir bee virus (KBV) a Israeli acute paralysis virus (IAPV). Black queen cell virus (BQCV), původně člen rodu *Cripavirus*, je řazen do rodu *Triatovirus*. Do rodu *Cripavirus* spadá *Aphid* lethal paralysis virus (ALPV) (Runckel *et al.*, 2011; Valles *et al.*, 2017a). Čeleď *Iflaviridae* má jediný rod *Iflavirus* a 15 druhů.

Jsou do něj řazeny Slow bee paralysis virus (SBPV), Sacbrood virus (SBV) a Moku virus (MK). Do tohoto rodu patří také Deformed wing virus komplex skládající se z několika kmenů jako Kakugo virus (KV), Egypt bee paralysis virus (EBV), *Varroa destructor* virus 1 (VDV-1) a Deformed wing virus (DWV) (Valles *et al.*, 2017b).

Řád *Tymovirales* má pět čeledí, z nichž ve včelách byl nalezen virus řazený do čeledi *Tymoviridae*. Dosud ale Bee macula – like virus (BeeMLV) není řazen do žádného z popsanych rodů v této čeledi (de Miranda *et al.*, 2011, 2015).

Čeď *Iridoviridae*, nezařazená do žádného známého řádu, obsahuje dvě podčeledi *AlphaIridovirinae* se třemi rody a podčeď *Betavirinae* se dvěmi rody: *Chloriridovirus* a *Iridovirus*. Invertebrate iridescent virus 6 (IIV- 6) je řazen do rodu *Iridovirus* zatímco IIV- 24 není dosud řazen do žádného rodu (Chinchar *et al.*, 2017). *Apis mellifera* filamentous virus (AmFV) je další dosud nezařazený virus. Některé jeho proteiny jsou podobné proteinům zástupců čeledi *Baculaviridae* a proteinům jiných velkých DNA virů jako *Poxviridae* / *Herpesviridae* a je možné že některé geny získal tento virus horizontálním genovým přenosem (Gauthier *et al.*, 2015). Chronic bee paralysis virus (CBPV), díky sdíleným charakteristikám v organizaci genomu s *Alphanodaviridae* a podobností polymerázy s *Tombusviridae*, by mohl tvořit novou skupinu blízkou oběma čeledím (Olivier *et al.*, 2008a). Také viry Lake Sinai virus (LSV) komplexu jsou dosud nezařazené. Díky příbuznosti nestrukturních proteinů s CBPV by s ním mohli tvořit novou skupinu, i když jsou v některých aspektech výrazně odlišné (Runckel *et al.*, 2011).

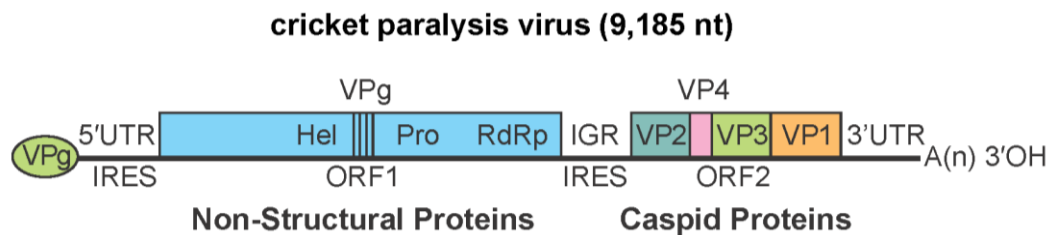
Tabulka 1. Taxonomický přehled vybraných virů *Apis mellifera*.

Řád	Čeď	Rod	Název	Zkratka
<i>Picornavirales</i>	<i>Dicistroviridae</i>	<i>Aparavirus</i>	Acute bee paralysis virus	ABPV
			Israeli acute paralysis virus	IAPV
			Kashmir bee virus	KBV
		<i>Triatovirus</i>	Black queen cell virus	BQCV
	<i>Cripavirus</i>	<i>Aphid</i> lethal paralysis virus	ALPV	
	<i>Iflaviridae</i>	<i>Iflavirus</i>	Deformed wing virus komplex	DWV komplex
			Sacbrood virus	SBV
			Slow bee paralysis virus	SBPV
Moku virus			MK	
<i>Tymovirales</i>	<i>Tymoviridae</i>	Nezařazené	Bee macula – like virus	BeeMLV
Nezařazené	<i>Iridoviridae</i>	<i>Iridovirus</i>	Invertebrate iridescent virus 6	IIV-6
		Nezařazené	Invertebrate iridescent virus 24	IIV-24
	Nezařazené	Nezařazené	<i>Apis mellifera</i> filamentous virus	AmFV
			Chronic bee paralysis virus	CBPV
			Lake Sinai virus	LSV
			Cloudy wing virus	CWV

7.2 *Picornavirales*

7.2.1 *Dicistroviridae*

Genom *Dicistroviridae* je tvořen jednořetězcovou RNA pozitivní polarity o velikosti 8-10 kb, se dvěma otevřenými čtecími rámci (z angl. open reading frame (ORF)), čímž se liší od většiny zástupců *Picornavirales*, které mají pouze jeden ORF. Neobalený virion, o velikosti 30 nm, má icosahedrální pseudo T=3 symetrii (obrázek 5). Genom (obrázek 4) má na 5' konci kovalentně připojený protein VPg, důležitý pro stabilitu genomu, replikaci a translaci, a na 3' konci polyA. 5' nepřekládaná oblast (z angl. untranslated region (UTR)) obsahuje vnitřní místo pro nasednutí ribozomu (z angl. internal ribosomal entry site (IRES)), zodpovědné za translaci nestrukturních proteinů (helikáza, proteáza, RNA – dependentní RNA – polymeráza (RdRp)). Druhý ORF je od něj oddělen mezigenovou oblastí (z angl. intergenic region (IGR)), také obsahující IRES. Tento ORF kóduje strukturní proteiny (VP1-VP4). Oba ORF jsou translatovány jako polyprotein a štěpeny virovou proteázou (Bonning & Miller, 2010; Gall *et al.*, 2008; Valles *et al.*, 2017a).



Obrázek 4. Struktura genomu *Cricket paralysis viru* (CPV) modelového viru rodu *Cripavirus*.

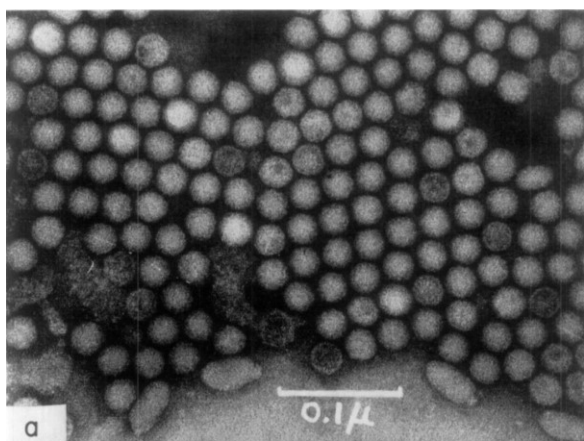
Hel – helikáza, *Pro* – proteáza, *RdRp* – RNA dependentní RNA polymeráza, *VP1-VP4* – kapsidové proteiny, *UTR* – untranslated region, *IRES* – internal ribosomal entry site, *IGR* – intergenic region. Převzato z (Valles *et al.*, 2017a).

Některé viry čeledi *Dicistroviridae* kódují protein (A1), který tlumí RNAi proti danému viru. Například protein A1 *Drosophila C* viru váže virovou dvouřetězcovou RNA a brání jejímu zpracování (van Rij *et al.*, 2006), zatímco u příbuzného Cricket paralysis viru, A1 zabraňuje RNAi vazbou AGO2 (Watanabe *et al.*, 2017). Oba tyto viry mají konzervovaný motiv před ORF A1 proteinu. Tento motiv byl identifikovaný i u IAPV, ABPV a KBV a předpokládá se, že tyto viry kódují proteiny stejné funkce (Chen *et al.*, 2014).

Acute bee paralysis virus (ABPV)

ABPV přetrvává v dospělých a vývojových stádiích jako perzistentní infekce. U dospělých jedinců se akutní otevřená infekce projeví třesem, paralýzou a ztrátou schopnosti letu, postupným tmavnutím a ztrátou ochlupení. Příznaky je možné vidět u jednotlivých včel, avšak masivní výskyt postižených jedinců v úlu není obvykle zaznamenán, neboť postižení jedinci rychle umírají (Bailey *et al.*, 1963; Maori *et al.*, 2007a). Pokud jsou larvy nakaženy větším množstvím

viru, často umírají před uzavřením komůrky, pokud ale jedinec infekci přežije a dokončí vývoj, virus ho infikuje perzistentně (Bailey & Ball, 1991). Vyšší prevalence viru v kuklách / larvách ve srovnání s dospělými jedinci naznačuje možnost, že jsou pro ABPV permissivnějším hostitelem (Sanpa & Chantawannakul, 2009). Replikace viru probíhá v různých tkáních, včetně nervové a byl také nalezen v HPG (Bailey & Milne, 1969; Furgala & Lee, 1966). Virus se šíří se mezi jedinci potravou (Chen *et al.*, 2006a), vertikálně (Ravoet *et al.*, 2015a) a byl nalezen i ve spermatu trubců (Yue *et al.*, 2006). *Varroa* také přenáší ABPV mezi jedinci a zhoršuje průběh infekce která se poté projeví jako otevřená (Ball, (1989).



Obrázek 5. Snímek kapsidy *Acute bee paralysis virus* v elektronovém mikroskopu. Převzato z (Bailey *et al.*, 1963).

Israeli acute paralysis virus (IAPV)

Včely infikované IAPV vykazují, kromě příznaků podobné těm, které vyvolává ABPV, i změny chování u chronicky infikovaných včel. Virus má negativní vliv na orientaci, navigaci a prostorovou paměť včel. To se projevuje jejich vylétáváním z úlu i v době nepříznivých povětrnostních podmínek a také neschopností se do úlu vrátit (Li *et al.*, 2013). U dospělých jedinců vyvolává virus jak otevřenou, tak skrytou infekci. Virus je možné najít i v larvách a kuklách. Vzhledem k charakteru příznaků není překvapivý nervový tropismus viru (Chen *et al.*, 2014). Mezi jedinci je přenášen skrz potravu včetně sekretů HPG, ve kterých se virus vyskytuje ve vysokých koncentracích. Kromě potravy je šířen i transovariálně (Chen *et al.*, 2014) a je efektivně přenášen díky *Varroa*, což často vyústí v otevřenou infekci (Di Prisco *et al.*, 2011).

Část IAPV genomu byla nalezena v genomu některých jedinců a bylo zjištěno, že části genomu hostitele, spolu s jinými defektními formami IAPV genomu, mohou být enkapsidovány (Maori *et al.*, 2007a). Přesný způsob vzniku těchto defektních forem a jejich přítomnosti v hostitelském genomu není jasný, ale předpokládá se, že příčinou je změna templátu v průběhu virové replikace. Jedná se tedy o rekombinace mezi virovou RNA a RNA hostitele, nebo RNA retrotranspozonomu. Rekombinace s retrotranspozonomem umožní integraci do genomu včely v DNA

formě, a je možné nalézt ve včele od IAPV odvozené sekvence a proteiny. Tato integrovaná forma omezuje replikaci IAPV, nejspíše díky RNAi, a poskytuje tak jedinci rezistenci proti další infekci tímto virem (Maori *et al.*, 2007b).

Kashmir bee virus (KBV)

KBV přetrvává v populaci jako skrytá infekce ve všech vývojových stádiích. Tato infekce však může přejít do akutní infekce bez specifických příznaků, včely však umírají během několika dní (Bailey & Woods, 1977; Dall, 1985). Virus se replikuje v tkáni střeva, epidermis, tracheálním epitelu, hemocytech a oenocytech, ale na rozdíl od příbuzného IAPV a ABPV nebyl nalezen v nervové tkáni (Dall, 1987). Tento virus je přenášen potravou (Shen *et al.*, 2005a). *Varroa* také slouží jako vektor pro KBV a po přenosu viru parazitem dochází k projevům otevřené infekce (Chen *et al.*, 2004; Todd *et al.*, 2007).

Black queen cell virus (BQCV)

Otevřená infekce BQCV probíhá u larev a kukel královny, larvy mění barvu z přirozené bílé na světle žlutou, jejich pokožka tuhne a po smrti larvy tmavnou (obrázek 10). Název získal virus podle zčernání komůrky, ve které se nachází nakažená larva (Bailey & Woods, 1977). Virus může způsobovat inaparentní infekci u vývojových stádiích dělnic a trubců (Leat *et al.*, 2000) a častěji než u larev, se vyskytuje u dospělců, kde vyvolává perzistentní infekci, která je důležitá pro koloběh viru (Tentcheva *et al.*, 2004). BQCV je přenášen potravou a transovariálně, ale byl nalezen i ve *Varroa* (Chen *et al.*, 2006b; Mondet *et al.*, 2014).

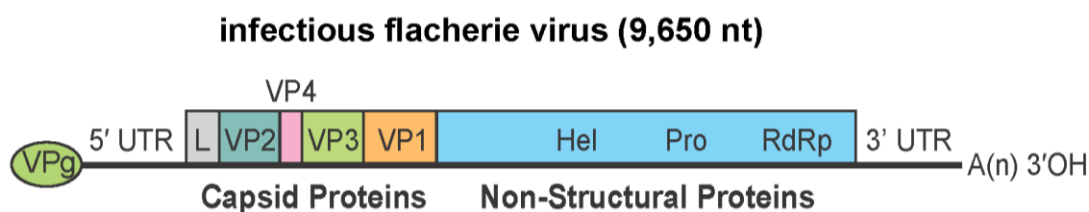
Aphid Lethal Paralysis virus (ALPV) strain Brookings

ALPV je virus mšic, způsobující u nich nekontrolovatelné pohyby a paralýzu. Různé kmeny byly nalezeny i v jiných hostitelích, jako např. kmen Brookings u včely (Liu *et al.*, 2014; Runckel *et al.*, 2011). Virus je schopný se ve včelách replikovat, ale není u nich dosud známý žádný klinický projev infekce tímto virem (Ravoet *et al.*, 2013). Mezi jedinci je přenášen orální cestou a vertikálně (Ravoet *et al.*, 2013, 2015a).

7.2.2 *Iflaviridae*

Genom virů čeledi *Iflaviridae* je tvořen jednořetězcovou RNA pozitivní polarity o velikosti 9-11 kb. Neobalené viry mají velikost kapsidy 22-30 nm a icosahedrální pseudo T=3 symetrii (obrázek 7). Genom (obrázek 6) má 3' polyA a na 5' konci kovalentně připojený VPg. Translace polyproteinu je zahájena z IRES na 5' UTR (Gall *et al.*, 2008; Valles *et al.*, 2017b). Před geny pro kapsidové proteiny se nachází Leader (L) protein, který je velmi variabilní i v jinak blízké příbuzných virech (DWV komplex). Analýza DWV L proteinu odhalila podobnost

katalytického místa s L proteiny *Aphthopicornavirů* (známý zástupce virus slintavky a kulhavky; z angl. Foot and mouth disease virus (FMDV)) (Lanzi *et al.*, 2006). V nich je L protein zodpovědný za štěpení hostitelského iniciačního faktoru eIF4G (z angl. eukaryotic initiation factor 4G) a brání tak translaci hostitelských mRNA, zatímco translace virových proteinů pokračuje díky přítomnosti IRES. U FMDV se zdá, že je L protein důležitý i pro patogenitu viru, působí proti interferonové obraně hostitele a zvyšuje translaci z IRES (Hinton *et al.*, 2002).



Obrázek 6. Struktura genomu *Infectious flacherie virus* (IFV) modelového viru rodu *Iflavirus*.

Hel – helikáza, *Pro* – proteáza, *RdRp* – RNA dependentní RNA polymeráza, *L* – leader protein, *VP1-VP4* – kapsidové proteiny, *UTR* – untranslated region, *IRES* – internal ribosomal entry site. Převzato z (Valles *et al.*, 2017b).

Deformed wing virus (DWV) komplex

Pro DWV komplex jsou zatím popsány tři hlavní skupiny variant, mezi nimiž může probíhat rekombinace. Původně popsáný virus pojmenovaný DWV tvoří spolu s EBV (Bailey *et al.*, 1979) a KV (Rortais *et al.*, 2006) jeden genotyp (DWV- A). Druhý genotyp (DWV- B) se dříve nazýval VDV-1 (Ongus *et al.*, 2004) a byl popsán i třetí genotyp (DWV- C) (Mordecai *et al.*, 2016a).

DWV- A způsobuje akutní infekci u larválních stádií, pro něž může být smrtelná nebo se vyvíjejí s deformovanými křídly (obrázek 10), rozšířeným zadečkem až na hrud' a změněnou barvou (Lanzi *et al.*, 2006). Virus často vyvolává inaparentní infekci charakterizovanou vysokými koncentracemi viru či infekci chronickou. V kuklách dělnic je možné najít větší koncentraci viru než v dospělých jedincích s deformitami křídel, zatímco v trubcích se nachází jen nízké koncentrace. Různá vývojová stádia a kasty jsou tedy schopné bránit se infekci s odlišnou účinností (Chen *et al.*, 2005). Chronická infekce ovlivňuje chování a některé formy učení (Iqbal & Mueller, 2007). Infekce DWV- A také zkracuje délku života zimních včel, které jsou vitální pro přezimování kolonie (Dainat *et al.*, 2012).

Některé příznaky by se daly vysvětlit schopností viru se replikovat v nervové tkáni, jako jsou např. houbovitá tělíska (Shah *et al.*, 2009). Jak infekce způsobuje poruchy ve vývoji není objasněno, ale v jedincích, kteří se vyvinuly s deformovanými křídly, byla pozorována změna exprese orthologů *Drosophila* homeobox genů, které kódují transkripční faktory důležité pro vývoj (Ryabov *et al.*, 2014). Mezi jedinci se virus šíří potravou, venereálně a transovariálně

(Amiri *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2006b; Yue *et al.*, 2007). Virus je také přenášen díky *Varroa* a může vyústit v projevy otevřené infekce (Bowen-Walker *et al.*, 1999; Shen *et al.*, 2005b).

I když byl zpočátku DWV- A považován za nejvíce virulentní z této skupiny virů a zodpovědný za ztráty včelstev (Martin *et al.*, 2012), v laboratorních podmínkách infekce DWV- B zkracovala život jedinců více než DWV- A (McMahon *et al.*, 2016). Recentně Brettell a kol. (2017) ukázali, že genotypy DWV- B a DWV- C jsou také schopny způsobovat poruchy ve vývoji včel a to stejně často jako DWV- A a mohou se podílet i na ztrátách včelstev (Kevill *et al.*, 2017; Natsopoulou *et al.*, 2017).

Genom DWV virů lze rozdělit na několik funkčních jednotek: 5' UTR, oblast kódující L protein a strukturní proteiny a třetí obsahující geny pro nestrukturní proteiny. Mezi těmito oblastmi probíhá rekombinace a vzniklé kmeny je možné najít v populaci (minimální prevalence 85 %). Rekombinantní by pak mohli mít výhodu oproti původním kmenům (Dalmon *et al.*, 2017). Nestrukturní proteiny DWV- A umožní lepší replikaci v *A. mellifera* zatímco kmeny nesoucí strukturní DWV- B by mohli být lépe přenášeni roztočem *Varroa* (Moore *et al.*, 2011; Zioni *et al.*, 2011). Mohli by také získat výhodu oproti původním kmenům, pokud by rekombinace proběhla v místě, na něž je mířena RNAi. Rekombinantní kmen s nízkou virulencí by mohl být selektován díky *Varroa* který vyžaduje, aby živá včela opustila komůrku pro dokončení svého životního cyklu. Pokud by takovýto kmen převládl v kolonii, poskytoval by jí pak ochranný efekt zabráněním superinfekce (z angl. superinfection exclusion) virulentnější formou viru (Dalmon *et al.*, 2017; Mordecai *et al.*, 2016b).

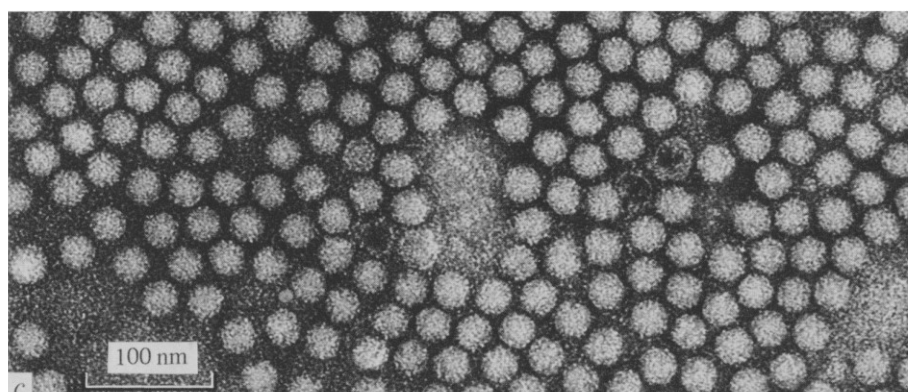
Sacbrood virus (SBV)

SBV způsobuje u larev akutní otevřenou infekci, zatímco u dospělých jedinců způsobuje infekci perzistentní. Nakažené larvy se nesvléknou a hromadí tak mezi novou a původní larvální pokožkou ekdysoidální tekutinu s množstvím virových částic. Larvy v důsledku infekce nejdříve změň barvu na bledě žlutou, po smrti zhnědnou a vyschnou (Bailey *et al.*, 1964) (obrázek 10). Dospělci jsou nejspíše nakaženi při odstraňování mrtvých larev z úlu, ale k infekci je nutná vysoká dávka a virus po smrti hostitele nezůstává dlouho infekční (Bailey, 1969) a to je zřejmě důvodem perzistentní infekce dospělců, která je důležitá pro přenos viru na larvy. Kromě vertikálního přenosu (Ravoet *et al.*, 2015a) bylo množství viru nalezeno v HPG a larvy jsou pak nakaženy výměškou těchto žláz při krmení (Bailey, 1969). I mezi dospělými jedinci by mohl být přenášen potravou a pomocí *Varroa* (Shen *et al.*, 2005a).

Při infekci dochází ke změně exprese některých genů: zvýšení antimikrobiálních peptidů a snížení, kromě jiných, některých enzymů aktivující fenoloxidázovou kaskádu, které by mohli vyústit v supresi melanizace. Antimikrobiálních peptidy, vedoucí k redukci v bakteriálních populacích i po smrti jedince, a inhibice melanizace by mohli být adaptací na způsob přenosu při odstraňování mrtvých jedinců (Ryabov *et al.*, 2016).

Slow bee paralysis virus (SBPV)

SBPV vyvolává perzistentní infekci, která se může měnit na akutní při koinfekci včel s *Varroa*, který slouží jako vektor (Santillán-Galicia *et al.*, 2010). Při akutní infekci včely po deseti dnech ochrnou včelám dva přední páry končetin a umírají během dalších dvou dnů (Bailey & Woods, 1974). Tento virus byl detekovaný ve čmelácích častěji než ve včelách, což naznačuje, že by mohli být původním hostitelem tohoto viru (McMahon *et al.*, 2015). SBPV způsobuje u čmeláků skrytou infekci, která se při stresu (např. hladovění) projeví jejich předčasným úmrtím (Manley *et al.*, 2017). Předpokládá se šíření tohoto viru společným zdrojem potravy, ale nevylučuje se i možnost přenosu vzduchem (Manley *et al.*, 2017; McMahon *et al.*, 2015).



Obrázek 7. Snímek *Slow bee paralysis viru* z elektronové mikroskopie. Převzato z (Bailey & Woods, 1974).

Moku virus (MK)

MK je virus příbuzný SBPV. Má široké hostitelské spektrum a byl detekovaný ve vysokých koncentracích v sociální vosičce *Vespula pensylvanica*, která by mohla být původní hostitelem a rezervoárem viru. Přenos na včely se předpokládá přes sdílení zdrojů potravy nebo krmením *Varroa*, ve kterém byl virus také nalezen. Tento virus existuje jako quasi druh lišící se hostitelskou specifitou a patogenitou (Mordecai *et al.*, 2016c).

7.3 *Tymovirales*

7.3.1 *Tymoviridae*

Bee macula – like virus (BeeMLV)

BeeMLV (také *Varroa destructor macula – like virus (VdMLV)*) (de Miranda *et al.*, 2011) má 6,5 kb dlouhý jednořetězcový RNA genom a obsahuje tři překrývající se ORF. První z nich kóduje velký polyprotein nestrukturních proteinů (methyl – transferáza, endo – peptidáza, RdRp, helikáza). Z druhého ORF vzniká kapsidový protein, který je translatován ze sub-genomové RNA, a ze třetího vzniká protein neznámé funkce, který byl však identifikovaný ve všech dosud charakterizovaných hmyzích virů čeledi *Tymoviridae*. Kromě vertikálního přenosu (Ravoet *et al.*, 2015a) byl virus nalezen ve *Varroa*, včetně jeho sub-genomových RNA, a je tedy možné, že je jím přenášen (de Miranda *et al.*, 2015).

7.4 *Nezařazené*

Invertebrate iridescent virus (IIV)

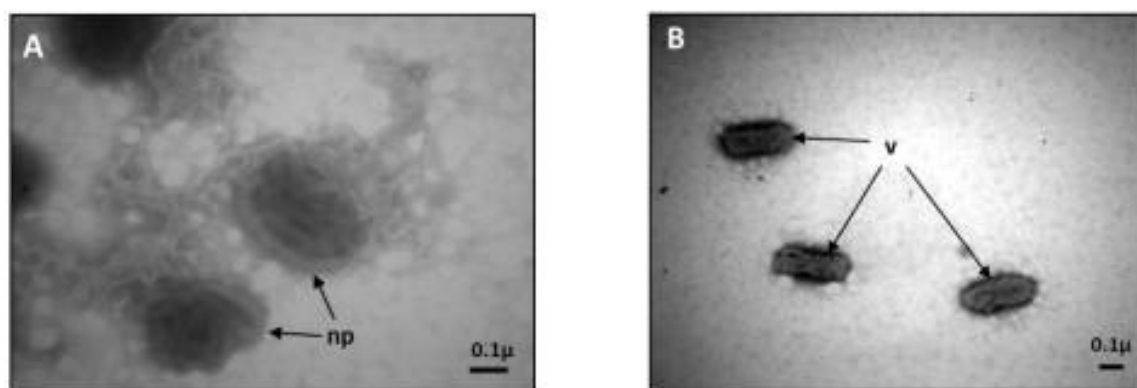
Viry čeledi *Iroviridae* mají lineární dsDNA genom o délce 103–220 kbp. Kapsida icosahedrální symetrie, o rozměrech 150-200 nm na šířku, může být v některých případech obalená membránou, která zvyšuje infektivitu viru. Rod *Iridovirus* obsahuje viry členovců, které mají často široké hostitelské spektrum (Chinchar *et al.*, 2017).

IIV- 24 také znám jako *Apis iridescent virus* byl charakterizovaný v *A. cerana*, u které vyvolává otevřenou infekci, v jejímž důsledku dochází k velkým ztrátám jedinců. V *A. mellifera* se replikuje a vyvolává inaparentní infekci (Bailey & Ball, 1978; Bailey *et al.*, 1976). Pomocí proteomických technik bylo identifikováno množství fragmentů proteinu patřící viru IIV- 6 (také znám jako *Chilo iridescent virus*) ve všech testovaných koloniích trpících CCD a autoři ho označili za možnou příčinu CCD (Bromenshenk *et al.*, 2010). Jak se později ukázalo, tato studie použila při proteomickém vyhodnocení špatnou databázi a mohly tak být včelí proteiny identifikovány jako proteiny patogenů (Foster, 2011). Chybné závěry výše zmíněné studie podporuje další práce Tokarz a kol. (2011) kteří neprokázali výskyt IIV- 24 a IIV- 6 ani ve zdravých koloniích, ani u jedinců z koloních se CCD.

Apis mellifera filamentous virus (AmFV)

AmFV má cirkulární dvouřetězcový DNA genom dlouhý 500 kbp a je podobný jiným velkým DNA virům. ORF se nacházejí rovnoměrně rozložené na obou vláknech a zabírají 65 % genomu (Gauthier *et al.*, 2015). Dlouhá nukleokapsida 3 000 x 40 nm se posléze skládá a vytváří obalený virion o velikosti 450 x 170 nm (Sitaropoulou *et al.*, 1989) (obrázek 8). I když je

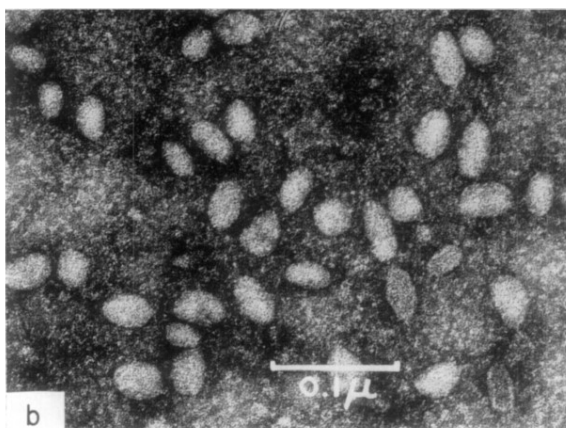
tento virus považován za málo patogenní, je schopný vzácně způsobovat otevřenou akutní infekci. Původně bylo onemocnění vyvolané tímto virem popsáno jako včelí riketsiósa. Onemocnění se projeví celkovým oslabením kolonie, kdy lze nalézt mrtvé a lezoucí jedince a vyskytují se i tmavě zbarvené larvy. Charakteristickým příznakem je mléčně zbarvená hemolymfa. K jejímu zakalení dochází v důsledku destrukce buněk a přítomnosti vysoké virové nálože (Clark, 1978). Během prvního týdnu po vylíhnutí včely z komůrky má včela ve svém těle vysoké koncentrace viru. Včely jsou nakaženy orální cestou a virus se poté dostává ze střeva do hemocoelu a infekce je inaparentní. Později se ustanoví rovnováha a inaparentní infekce přechází do infekce perzistentní (Hartmann *et al.*, 2015). Kromě dospělých jedinců je možné perzistentní infekci nalézt i u larev nebo kukel. AmFV se přenáší potravou, venereálně a transovariálně (Gauthier *et al.*, 2015).



Obrázek 8. Snímky *Apis mellifera filamentous virus* z elektronové mikroskopie. (A) nukleokapsida (np) (B) virion (v). Převzato z (Gauthier *et al.*, 2015).

Chronic bee paralysis virus (CBPV)

CBPV je neobalený virus se segmentovaným jednořetězcovým RNA genomem pozitivní polaritativity a asymetrickou kapsidou o šířce 20 nm a délce 30-65 nm (Bailey *et al.*, 1968) (obrázek 9). Původně bylo identifikováno 5 segmentů genomu, tři z nich jsou identické se segmenty Chronic bee paralysis satellite virus (CBPSV), prvního objeveného satelitního viru u hmyzu (Bailey *et al.*, 1980). Oba segmenty specifické pro CBPV mají čepičku na 5' konci a blokovaný 3' konec nejspíše formou vlásky, jako u čeledi *Alphanodaviridae* (Olivier *et al.*, 2008a). První segment RNA- 1 o délce 3,7 kb kóduje nestrukturní proteiny jako RdRp, který vykazuje podobnost s polymerázou *Tombusviridae*. Má i shodné přerušení sekvence stop kodonem, v důsledku čehož je polymeráza translatována pomocí změny čtecího rámce (Olivier *et al.*, 2008a). Další ORF z RNA- 1 by mohl kódovat methyltransferázu – guanylyltransferázu (Kuchibhatla *et al.*, 2014). Z 2,3 kb dlouhé RNA- 2 jsou přepisovány proteiny pSP a hSP tvořící kapsidu, jejíž přesná struktura není ale dosud známa (Chevin *et al.*, 2015).



Obrázek 9. Snímek z elektronové mikroskopie kapsidy Chronic bee paralysis viru. Převzato z (Bailey *et al.*, 1963).

U dospělých jedinců virus přetrvává jako perzistentní infekce (Ribière *et al.*, 2002). Při otevřené akutní infekci vyvolává u dospělců dva symptomy; první zahrnuje třes těla, křídel a dále oteklý zadeček s rozevřenými křídly, druhým syndromem je ztráta ochlupení a tmavnutí (obrázek 10), odlišnost takto napadených jedinců vyvolává útoky ostatních členů kolonie. Konečným příznakem je ztráta schopnosti letu, třes a úmrtí (Bailey, 1965; Rinderer & Rothenbuhler, 1976). Virus je možné detekovat i ve vajíčkách, larvách a kuklách, ale koncentrace jsou nízké a žádné změny v důsledku této infekce nebyly zjištěny (Blanchard *et al.*, 2007). Replikace viru v nervové tkáni by mohl vysvětlit původ některých příznaků. Virus byl, kromě jiných míst, nalezen v houbových tělíškách a centrálním komplexu (Olivier *et al.*, 2008b). CBPV je přenášen potravou, kontaktem, vertikálně a byl nalezen i ve *Varroa* (Bailey *et al.*, 1983a; Blanchard *et al.*, 2007; Celle *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2006b; Ravoet *et al.*, 2015a).

Lake Sinai virus (LSV) komplex

LSV je neobalený virus, který má jednořetězcový RNA genom pozitivní polarity o délce 5,5 kb a kapsidu s ikosahedrální symetrií o velikosti 27 nm (Daughenbaugh *et al.*, 2015; Runckel *et al.*, 2011). Na RNA byly identifikovány tři ORF z nichž je exprimovaná RdRp, kapsidový protein a pravděpodobně i methyltransferáza – guanylyltransferáza (Kuchibhatla *et al.*, 2014; Runckel *et al.*, 2011). Virus vykazuje velký polymorfismus, z jednoho jedince může být izolováno až několik různých kmenů viru (Ravoet *et al.*, 2015b). O jejich patogenitě není mnoho známo. Některé kmeny se nacházejí častěji v koloniích trpících CCD (Cornman *et al.*, 2012), ale je možné, že tento virus je přítomný u včel bez patologických projevů. Nalezené koncentrace tohoto viru u včel jsou výrazně nižší než koncentrace jiných virů (Roberts *et al.*, 2017). Mezi jedinci je přenášen potravou, vertikálně a možná *Varroa*, ve kterém byl detekován (Daughenbaugh *et al.*, 2015; Ravoet *et al.*, 2015b, 2015a).

Cloudy wing virus (CWV)

CWV má malou 17 nm icosahedrální kapsidu a jednořetězcový RNA genom pozitivní polarity. Virus se nejčastěji izoluje z hlavy a hrudi včel. Infekce se projevuje předčasným úmrtím a zakalením křídel, ale vzhledem k tomu, že tyto symptomy byly pozorované i u včel, u kterých virus detekovaný nebyl, není jistý vztah infekce tímto virem a daných projevů. CWV se přenáší kontaktem a do určité míry i vzduchem na krátké vzdálenosti (Bailey *et al.*, 1980). Virus byl detekován i v muškách (*Braula coeca*) kradoucí včelám potravu a včelích larvách uzavřených v komůrce, předpokládá se tedy přenos i orální cestou (Carreck *et al.*, 2010).



Obrázek 10. Rozdílné příznaky otevřené akutní infekce různých virů.

Vlevo nahoře včely napadené Chronic bee paralysis virem se symptomem druhého typu. Vpravo nahoře je komůrka s vývojovým stádiem královny napadené Black queen cell virem. Larva s otevřenou infekcí Sacbrood virem vlevo dole a vpravo dole dospělá včela s charakteristickým příznakem infekce Deformed wing viru. Převzato z ([URL1]; [URL2]; [URL3]).

7.5 **Známé interakce mezi viry**

Kolonie, ale i včela samotná, může být infikována několika viry zároveň. Interakce mezi viry mohou probíhat přímo, přímo mezi jejich geny nebo jejich genovými produkty, nebo na úrovni kompetice o hostitelské faktory. Nepřímá interakce probíhá vlivem prostředí, ve kterém žijí (DaPalma *et al.*, 2010).

CBPSV je schopný množení v hostiteli pouze v přítomnosti CBPV, který mu poskytuje protein nutný pro jeho replikaci. O tento protein pak nejspíše probíhá mezi nimi kompetice a při koinfekci vzniká méně CBPV částic (Ball *et al.*, 1985). Mezi viry DWV komplexu dochází po ustanovení jednoho kmene v kolonii zábraně další infekci příbuzným virem (Mordecai *et al.*,

2016b). V tkáňové kultuře také perzistentní infekce DWV- A brání replikaci příbuzného SBV, ale nemá tento efekt na IAPV nebo KBV (Carrillo-Tripp *et al.*, 2016). Také byly nalezeny pouze malá množství nebo žádná množství MK v jedincích, ve kterých byly vysoké koncentrace DWV- A / B a je možné že má podobný vztah i s jinými viry čeledi *Iflaviridae* (Mordecai *et al.*, 2016c).

7.6 Rozšíření

Zatímco některé viry včel jsou rozšířeny globálně, jiné byly detekovány jen na určitých územích. Není dosud jasné, zda tyto rozdíly odráží dosud neznámý faktor vázaný na danou lokalizaci, který ovlivňuje distribuci určitých druhů virů, nebo se jedná o „chybu“ danou metodou či časem testování výskytu virů (Allen & Ball, 1996; Ellis & Munn, 2005). Austrálie je jediná země, kde se *Varroa* nevykytuje. To umožňuje studium vlivu jeho rozšíření na distribuci a prevalenci virů (Roberts *et al.*, 2017).

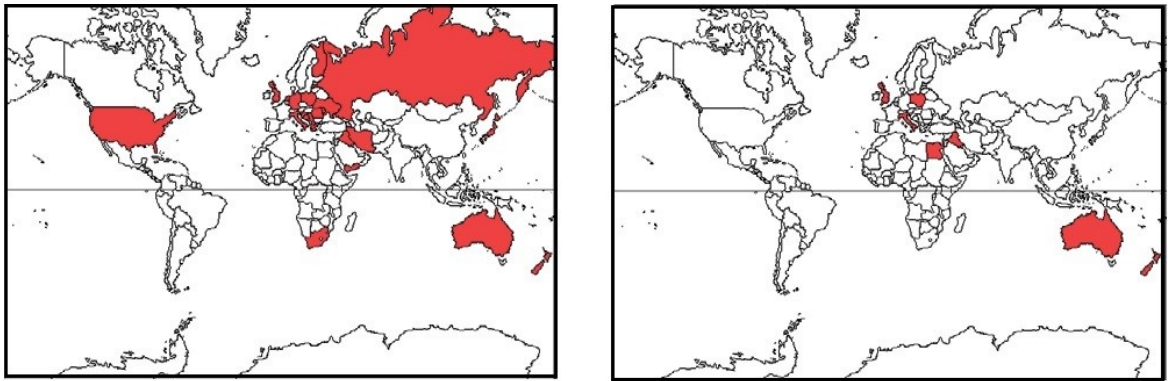
ABPV – IAPV se vyskytují globálně. ABPV je nejvíce rozšířený v evropských zemích, kde se jeho prevalence pohybuje okolo 15-20 % (Blanchard *et al.*, 2014; Porrini *et al.*, 2016; Ryba *et al.*, 2012). V Rakousku byla jeho prevalence až 68 % a byl zde druhým nejčastěji se vyskytujícím virem po DWV- A (Berényi *et al.*, 2006), oproti tomu v Belgii je jeho prevalence velmi nízká (3,3 %) (Ravoet *et al.*, 2013). ABPV je také častý v Jižní Americe (Molineri *et al.*, 2017; Teixeira *et al.*, 2008) a Spojených státech amerických (Traynor *et al.*, 2016). IAPV se nachází častěji než ABPV v Kanadě (Desai *et al.*, 2015), ale také v Číně a Austrálii (Ai *et al.*, 2012; Roberts *et al.*, 2017). V Japonsku je IAPV třetím nejčastěji se vyskytujícím virem s prevalencí 66 % (Morimoto *et al.*, 2012). KBV byl před rozšířením *Varroa*, druhým nejčastěji se vyskytujícím virem na Novém Zélandu a jeho výskyt byl zaznamenán i v dalších zemích (Ellis & Munn, 2005; Mondet *et al.*, 2014). Ve Spojených státech amerických byla jeho prevalence v roce 2010 6,5 % a v roce 2014 vzrostla na 15,5 %. V jiných zemích má ale nízkou prevalenci např. 1,7 % ve Španělsku (Granberg *et al.*, 2013; Nielsen *et al.*, 2008) a v řadě států nebyl nalezený vůbec např. v Rakousku, České republice, Argentině, Číně, Japonsku (Gajger *et al.*, 2014; Molineri *et al.*, 2017; Morimoto *et al.*, 2012; Ryba *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013).

BQCV je globálně rozšířený virus, často s vysokou prevalencí. Například v Severní Americe, v některých zemích Jižní Ameriky, Evropy a Japonsku prevalence dosahují 70 % a více procent (Antúnez *et al.*, 2006; Morimoto *et al.*, 2012; Porrini *et al.*, 2016; Traynor *et al.*, 2016). V Austrálii a na Novém Zélandu je BQCV nejčastěji se vyskytujícím virem s prevalencí 65 % a 91 % (Mondet *et al.*, 2014; Roberts *et al.*, 2017). Oproti tomu v některých zemích Evropy

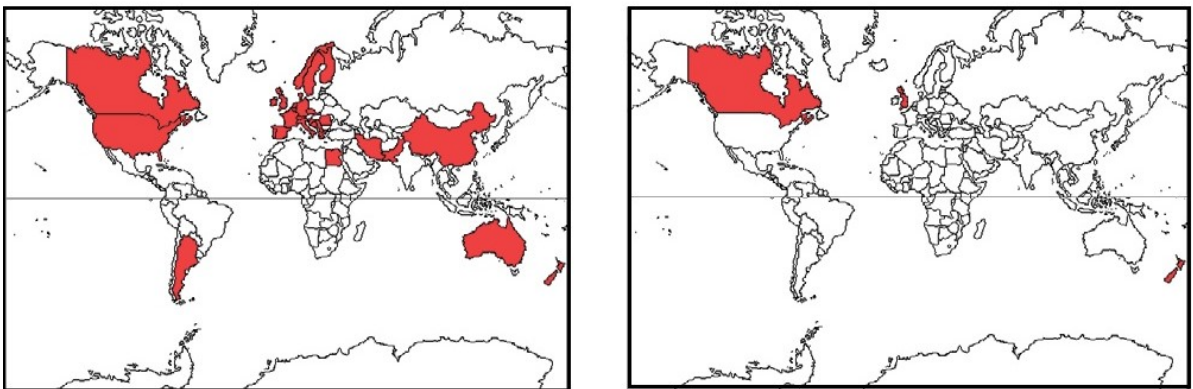
a Jižní Ameriky je jeho prevalence výrazně nižší (8 % v Argentině, 13,5 % v Belgii a 11 % v České republice) (Molineri *et al.*, 2017; Ravoet *et al.*, 2013; Ryba *et al.*, 2012).

U. A. mellifera nejčastěji nalézané viry jsou ty patřící do DWV komplexu. Ve většině sledovaných zemí virus DWV- A má nejvyšší prevalenci (až 90 %) ze všech virů (Ai *et al.*, 2012; Berényi *et al.*, 2006; Desai *et al.*, 2015; Gajger *et al.*, 2014; Traynor *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2013). I když je i v jiných zemích tento virus také nejprevalentnější, je jeho výskyt výrazně nižší např. v Argentině 35 % (Molineri *et al.*, 2017) nebo v České republice 31 % (Ryba *et al.*, 2012). Oproti tomu v Itálii je nejčastěji se vyskytujícím BQCV (Porrini *et al.*, 2016), v Belgii byl častěji než DWV- A nalezen BeeMLV (Ravoet *et al.*, 2013). V Austrálii, kde není rozšířen *Varroa*, se DWV nevyskytuje vůbec nebo velmi sporadicky a jen v určitých oblastech (Roberts *et al.*, 2017). To, že *Varroa* ovlivňuje výskyt a prevalenci virů, bylo možné sledovat při jeho rozšíření na Nový Zéland. V koloniích, kde se *Varroa* vyskytoval nejdéle, byla prevalence DWV- A 85-100 %, zatímco v oblastech bez výskytu tohoto parazita se DWV- A téměř nevyskytoval. Na Novém Zélandu též pozorovali snížení výskytu KBV jako důsledek šíření *Varroa* a DWV- A. K vytlačování KBV došlo pravděpodobně díky selekci méně virulentního viru. KBV, ale i ABPV a IAPV, jsou velmi virulentní při přenosu pomocí *Varroa*. Pokud však včela umírá v komůrce, ani *Varroa* nemůže dokončit svůj životní cyklus. Zároveň vysoká úmrtnost vyvíjejících se včel vede ke kolapsu celé kolonie. Dochází tak k vytlačení ABPV– IAPV– KBV a jejich nahrazení viry DWV komplexu (Mondet *et al.*, 2014).

SBV je globálně rozšířený (Ellis & Munn, 2005). Jeho asijský sérotyp je nejrozšířenější virus *A. cerana* a předpokládá se, že může být zodpovědný za její velké ztráty (Ai *et al.*, 2012). V Austrálii je jeho prevalence 35 % (Roberts *et al.*, 2017) a podobná prevalence byla zaznamenána i v jiných zemích (Berényi *et al.*, 2006; Gajger *et al.*, 2014; Morimoto *et al.*, 2012; Porrini *et al.*, 2016). CBPV je globálně rozšířený, ale jeho prevalence je většinou nízká (Desai *et al.*, 2015; Ellis & Munn, 2005; Molineri *et al.*, 2017; Ravoet *et al.*, 2013). Avšak ve Spojených státech amerických, kde byl sledován jeho výskyt v průběhu 4 let, se jeho prevalence meziročně zdvojnásobovala z 0,7 % v roce 2010 na 16,4 % v roce 2014 (Traynor *et al.*, 2016). O prevalenci dalších virů je jen málo informací. CBPSV se vyskytuje pouze sporadicky a CWV, AmFV a SBPV byly také nalezeny pouze v některých zemích (Ellis & Munn, 2005). Rozšíření těchto virů dokumentuje obrázek 11 a 12.



Obrázek 11. Geografické rozšíření *Apis Mellifera filamentous virus* (vlevo) a *Chronic bee paralysis satellite virus* (vpravo). Převzato z (Ellis & Munn, 2005).



Obrázek 12. Geografické rozšíření *Cloudy wing virus* (vlevo) a *Slow bee paralysis virus* (vpravo). Převzato z (Ellis & Munn, 2005).

Pro nově charakterizované viry zatím nejsou informace o jejich rozšíření, ale například různé kmeny LSV komplexu, popsané poprvé ve Spojených státech amerických v roce 2011, (Runckel *et al.*, 2011) byly nalezeny také v Belgii (Ravoet *et al.*, 2013), Turecku (Tozkar *et al.*, 2015), Španělsku (Granberg *et al.*, 2013) a Austrálii (Roberts *et al.*, 2017).

8 Interakce virů s patogeny včely

Spolu s virovými infekcemi může být hostitel infikován i jiným patogenem. Tito patogeni poté mohou mít vliv na průběh a výsledek virové infekce a také virová infekce může mít vliv na tohoto patogena. Interakce mohou být synergetické, kdy je jejich společný dopad větší než pouze jejich součet, nebo naopak antagonistický. I když je nejvíce známo o interakcích virů s *Nosema spp.* a *Varroa*, včely hostí množství dalších patogenů, které mohou mít s viry nějaký vztah. Například je možné pozorovat vyšší koncentrace AmFV, pokud nejsou jedinci infikováni kinetoplastidami *C. mellifica* nebo *L. passim* (Hartmann *et al.*, 2015). Právě studium dalších interakcí v jejich komplexitě, které umožňuje studium viromu a mikrobiomu, může přinést mnoho dalších zajímavých a důležitých poznatků.

Paraziti samotní mají také vlastní viry. I když bylo ve *Varroa* nalezeno množství včelích virů, zatím nebyly spojené s žádným patologickým projevem u tohoto parazita. Některé viry však byly nalezeny výhradně u *Varroa*: VDV- 2, nejvíce příbuzný virům DWV komplexu z čeledi *Iflaviridae*, VDV- 3, podobný zatím nezařazeným virům s jednořetězcový RNA genomem pozitivní polarity, jako je *Ixodes scapularis* associated virus 1 a 2 (Levin *et al.*, 2016) a *Varroa* Thymo – like virus (VTLV) patřící do řádu *Tymovirales* bez dalšího zařazení (de Miranda *et al.*, 2015). VTLV byl ale recentně nalezen i v *A. mellifera* a není tedy jisté, jaká je jeho hostitelská specifická (Galbraith *et al.*, 2018). V *A. mellifera* byl také nedávno objevený ABV- 1, který je podobný *Leptomonas moramango* leishbunyavirus 1, viru kinetoplastida, který také žije v hmyzím hostiteli. Předpokládá se tedy, že by ABV- 1 mohl napadat *C. mellifica* nebo *L. passim* (Remnant *et al.*, 2017).

8.1 *Varroa destructor*

Ve *Varroa* bylo nalezeno množství včelích virů, ale jestli je virus schopný replikace ve vektoru je často obtížné určit. Nález replikačních intermediátů jako je vlákno negativní polarity pro *Picornavirales* nebo sub-genomové RNA pro BeeMLV ve *Varroa* není jednoznačným průkazem, že zde dochází k replikaci, neboť tyto produkty mohou pocházet z hemolymfy včely. Malé množství nestruturních proteinů ABPV, BeeMLV a DWV- A / B ve srovnání s množstvím jejich kapsidových proteinů, také nesvědčí o probíhající replikaci v parazitovi (Erban *et al.*, 2015). Není tedy dosud jasné, zda jsou některé viry schopné se replikovat ve *Varroa*, avšak zcela jistě dochází tímto parazitem k jejich přenosu a tato forma přenosu často zhoršuje průběh virové infekce. Jaký je přesně mechanismus, kterým přenos přes *Varroa* iniciuje projevy otevřené infekce je částečně objasněný pro viry DWV komplexu.

Přenos díky *Varroa* může vyústit ve snížení virové diversity a výběru virulentního kmene viru DWV komplexu (Martin *et al.*, 2012). Je možné, že za tento výběr je zodpovědná preferenční replikace jednoho kmene ve *Varroa*, který díky této výhodě převládne po vstříknutí do hemolymfy včely. Podobná ztráta diversity však byla pozorována i po vstříknutí viru injekcí, což by argumentovalo opět proti replikaci viru ve *Varroa* (Ryabov *et al.*, 2014). Navíc byl ve slinách *Varroa* objeven protein (*Varroa* saliva toxic protein (VTP)), který při vstříknutí do dělnic *A. cerana* způsobí jejich rychlé úmrtí, ale nemá stejný vliv na jejich trubce. Pokud tedy dojde k napadení dělnice *A. cerana*, ta v komůrce zemře a *Varroa* spolu s ní („mutual destruction“). Dochází tedy k preferenční infekci trubic a nedojde ke kolapsu kolonie. VTP u dělnic i trubic *A. mellifera* nevyvolává úmrtí, ale bylo prokázáno, že dochází ke zvýšení koncentrace DWV- A, pokud je jím jedinec infikovaný, a v důsledku toho pak k projevům otevřené akutní infekce. Mechanismus účinku tohoto proteinu, který neobsahuje zatím žádnou známou doménu, není znám (Zhang & Han, 2018).

Také vliv *Varroa* na imunitní systém hostitele, by mohl být možnou příčinou přechodu do otevřené infekce. Jaký efekt má přítomnost *Varroa* na imunitní systém včely, ale není jasný. Zatímco některé studie naznačují, že parazitace *Varroa* vyúští v imunosupresi (Yang & Cox-Foster, 2005), jiné tento efekt na hostitele nepozorovali, nebo naopak našli zvýšenou expresi genů některých drah imunitního systému (Kuster *et al.*, 2014). Tyto rozdílné výsledky lze vysvětlit tím, že různá vývojová stadia využívají odlišné dráhy, které by ale mohly být závislé i na dalších faktorech. Změna exprese různých genů může být také reakcí na zranění nebo na přítomnost jiných patogenů, které jím byly zaneseny do hemolymfy (Koleoglu *et al.*, 2017).

8.2 *Nosema spp.*

Jaký má efekt infekce *Nosemou spp.* na infektivitu virů byl studovaný u BQCV a AmFV (Bailey *et al.*, 1983b; Bailey L. *et al.*, 2008). U viru AmFV prvně pozorovaný efekt *N. ceranae* na infekci nebyl později potvrzen (Hartmann *et al.*, 2015), ale koinfekce BQCV s *N. ceranae* působí synergicky a způsobuje vysokou mortalitu včel (Doublet *et al.*, 2015a). Podobně u CBPV bylo zjištěno, že se při koinfekci s *N. ceranae* zvyšuje koncentrace viru a efekt na mortalitu včel je synergický (Toplak *et al.*, 2013). Při infekci jedince již nakaženého *N. ceranae* virem DWV- A bylo možné pozorovat nižší koncentrace viru. Pokud však byl jedinec prvotně infikovaný DWV- A, neměla na jeho koncentrace infekce *N. ceranae* vliv a opačně DWV- A neměl vliv na množství spor, které *N. ceranae* vyprodukovala, a to nezávisle na pořadí infekce. Je tedy možné, že jde asymetrickou antagonistickou interakci (Doublet *et al.*, 2015b).

Mechanismus, jakým způsobem *Nosema spp.* ovlivňují průběh virové infekce není znám, ale jedním z možných vysvětlení je usnadnění přístupu viru ze střeva do hemolymfy díky poškození střevního epitelu parazitem. *Nosema spp.* také ovlivňuje imunitní systém hostitele. Zatímco Chaimanee a kol. (2012) pozoroval, že *N. ceranae* způsobuje imunosupresi snížením exprese antimikrobiálních peptidů, Sinpoo a kol. (2018) pozoroval naopak, jejich zvýšení. Antagonistická interakce mezi *N. ceranae* a DWV- A by se mohla odehrávat díky aktivaci imunitního systému nebo kompeticí o zdroje. Například změna střevního epitelu díky infekci *Nosema spp.* by mohla způsobit, že nejsou tyto buňky nadále permissivní pro danou virovou infekci (Doublet *et al.*, 2015b).

9 Metody studia viromu

Klinické příznaky virových infekcí u včel nejsou jednoznačné ve smyslu určení původce a viry mohou vyvolávat inaparentní nebo perzistentní infekce, a proto se pro detekci virů využívají metody molekulární biologie. Nejčastěji se využívá metoda amplifikační: polymerázová řetězová reakce (PCR), která je pro detekci RNA virů předcházena reverzní transkripcí (RT). Omezením PCR metody je nutnost použití specifických primerů, jejichž pomocí je ale obtížné zachytit rekombinanty a varianty virů, které jsou v populaci včelích virů časté (Kevill *et al.*, 2017; de Miranda *et al.*, 2013).

Množství nových virů bylo objeveno se zavedením metod sekvenování nové generace (z angl. next generation sequencing (NGS)) umožňující analýzu velkého množství DNA / RNA fragmentů ve vzorku. Tento metagenomický přístup, který nevyžaduje znalost cílové sekvence, umožňuje identifikovat jak nové, tak již charakterizované viry, bez ohledu na typ jejich genomu a variabilitu. Jeden z problémů je, že pouze malé množství materiálu v analyzovaném vzorku je virového původu. Je proto nutné odstranit neviróvé NK a / nebo obohatit vzorek o virové NK, aby bylo možné nalézt i viry, které se ve vzorku nacházejí v malých koncentracích (Kumar *et al.*, 2017). Během těchto kroků může docházet ke ztrátě některých virů nebo vnášení chyb ve smyslu změn v počtech různých virových sekvencí. Zcela zásadní je tedy optimalizace přípravy materiálu pro NGS. Problém je obrovská jak sekvenční, tak morfologická diverzita virů. Není tedy možné použít konzervované sekvence pro jejich amplifikaci jako u bakterií. Metody, které spoléhají na fyzikální vlastnosti virionu, mohou odstranit určitou skupinu virů (velké viry při filtraci, nebo při použití chloroformu, kdy ztráta membrán u některých obalených virů vede k destabilizaci kapsidy). Často jsou také využívány nukleázy díky přítomnosti kapsidy, která zabrání degradaci virové NK a pomůže odstranit neviróvé NK. Tato metoda obohacení ale nemusí být dostatečně efektivní a není možné ji použít, pro virus ještě neuzavřený do kapsidy (Conceição-Neto *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2017). NGS techniky jsou také náročné na zpracování dat. Obtížné je též identifikovat nový virus, pokud jeho sekvence nemá žádnou homologii s již existujícími viry (Liu *et al.*, 2011).

Pomocí NGS bylo objeveno množství nových včelích virů (Galbraith *et al.*, 2018; Remnant *et al.*, 2017), ale i nové varianty již popsáných virů (Mordecai *et al.*, 2016a). Metoda NGS studium viromů může být tedy využita pro detailnější studium interakcí patogenů, objasnění primárního hostitele, objasnění cest přenosu a vlivu interakcí patogenů na hostitele, jakožto i vlivu prostředí na složení viromu. Také krátké RNA vznikající při RNAi mohou poskytnou

nové informace o virových infekcích. Byly využity například pro porovnání složení virové populace v koloniích s CCD oproti zdravým koloniím (Chejanovsky *et al.*, 2014), nebo byl ze sekvencí siRNA viru sestaven kompletní genom viru (Fung *et al.*, 2018). Mohou také sloužit jako průkaz pro vstup a replikaci viru v hostitelských buňkách (Remnant *et al.*, 2017) a i přesto, že jsou závislé na odpovědi hostitele proti infekci, mohou být citlivější než jiné používané metody (Fung *et al.*, 2018).

10 Závěr

Tato práce se věnuje známým virům nacházející se v *A. mellifera*. Dosud byla většina těchto známých virů studována ve vztahu k nemocem *A. mellifera*. Většina z nich vyvolává skrytou infekci, která se ale za určitých podmínek může projevit, často při koinfekci s *Varroa*. Ten může způsobit projevy otevřené infekce, přenášet viry v kolonii, ale ovlivňuje i prevalenci a geografické rozšíření těchto virů. Na průběh virové infekce mohou mít vliv i jiní patogeni, i když mechanismy jakými tyto interakce probíhají nejsou plně objasněny.

V posledních letech byla objevena řada nových virů, díky novým technologiím, ale i díky intenzivnějšímu výzkumu v této oblasti. Zatím ale není známo, jestli mají na svého hostitele, *A. mellifera*, nějaký vliv. Některé z těchto virů by ale mohli infikovat spíše některého patogena *A. mellifera*, než přímo včelu samotnou. Také bylo ukázáno, že se včela podílí na přenosu rostlinných virů a rozšiřuje se tak seznam virů, které mají prokazatelný vztah se včelou.

Kromě vlivu *Varroa* a *Nosema*, interakce virů s dalšími objevenými patogeny nebyly dosud studované. Důležitou složkou je bakteriom, který má řadu rolí jak v životě, tak vývoji jedince, ale jaký efekt má virom včel na včelí bakteriom a bakteriom na virom není známo. Tyto interakce by mohly probíhat nepřímo stimulací imunitního systému nebo přímo, např. pomocí bakteriofágů. Interakce ve viromu samotném jsou také důležitou součástí pro pochopení komplexních vztahů v mikrobiomu a jeho vlivu na hostitele. Viry dalších patogenů *A. mellifera* by také mohly být využity na biologickou kontrolu těchto infekcí. Recentně také vystupuje do popředí studium imunitního systému hostitele, jeho reakce na virovou infekci a způsoby úniku imunitnímu dohledu.

11 Literatura

- Ai, H., Yan, X., & Han, R. (2012). Occurrence and prevalence of seven bee viruses in *Apis mellifera* and *Apis cerana* apiaries in China. *J. Invertebr. Pathol.* **109**, 160–164.
- Aizen, M.A., & Harder, L.D. (2009). The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination. *Curr. Biol.* **19**, 915–918.
- Allen, M., & Ball, B. (1996). The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee World* **77**, 141–162.
- Amiri, E., Meixner, M.D., & Kryger, P. (2016). Deformed wing virus can be transmitted during natural mating in honey bees and infect the queens. *Sci. Rep.* **6**.
- Anderson, K.E., Carroll, M.J., Sheehan, T., Mott, B.M., Maes, P., & Corby-Harris, V. (2014). Hive- stored pollen of honey bees: Many lines of evidence are consistent with pollen preservation, not nutrient conversion. *Mol. Ecol.* **23**, 5904–5917.
- Antúnez, K., D'Alessandro, B., Corbella, E., Ramallo, G., & Zunino, P. (2006). Honeybee viruses in Uruguay. *J. Invertebr. Pathol.* **93**, 67–70.
- Arrese, E.L., & Soulagés, J.L. (2010). Insect fat body: Energy, metabolism and regulation. *Annu. Rev. Entomol.* **55**, 207–225.
- Bailey, L. (1965). Paralysis of the honey bee, *Apis mellifera* Linnaeus. *J. Invertebr. Pathol.* **7**, 132–140.
- Bailey, L. (1969). The multiplication and spread of Sacbrood virus of bees. *Ann. Appl. Biol.* **63**, 483–491.
- Bailey, L., & Ball, B.V. (1978). *Apis* iridescent virus and “clustering disease” of *Apis cerana*. *J. Invertebr. Pathol.* **31**, 368–371.
- Bailey, L., & Ball, B.V. (1991). 3 - Viruses. In: *Honey bee pathology* (Second Edition), (London: Academic Press), pp. 10–34.
- Bailey, L., & Milne, R.G. (1969). The multiplication regions and interaction of Acute and Chronic bee paralysis viruses in adult honey bees. *J. Gen. Virol.* **4**, 9–14.
- Bailey, L., & Woods, R.D. (1974). Three previously undescribed viruses from the honey bee. *J. Gen. Virol.* **25**, 175–186.
- Bailey, L., & Woods, R.D. (1977). Two more small RNA viruses from honey bees and further observations on Sacbrood and Acute bee paralysis viruses. *J. Gen. Virol.* **37**, 175–182.
- Bailey, L., Gibbs, A.J., & Woods, R.D. (1963). Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology* **21**, 390–395.
- Bailey, L., Gibbs, A.J., & Woods, R.D. (1964). Sacbrood virus of the larval honey bee (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology* **23**, 425–429.
- Bailey, L., Gibbs, A.J., & Woods, R.D. (1968). The purification and properties of Chronic bee-paralysis virus. *J. Gen. Virol.* **2**, 251–260.
- Bailey, L., Ball, B.V., & Woods, R.D. (1976). An iridovirus from bees. *J. Gen. Virol.* **31**, 459–461.
- Bailey, L., Carpenter, J.M., & Woods, R.D. (1979). Egypt bee virus and Australian isolates of Kashmir bee virus. *J. Gen. Virol.* **43**, 641–647.
- Bailey, L., Ball, B.V., Carpenter, J.M., & Woods, R.D. (1980). Small virus- like particles in honey bees associated with Chronic paralysis virus and with a previously undescribed disease. *J. Gen. Virol.* **46**, 149–155.
- Bailey, L., Ball, B.V., & Perry, J.N. (1983a). Honeybee paralysis: Its natural spread and its diminished incidence in England and Wales. *J. Apic. Res.* **22**, 191–195.
- Bailey, L., Ball, B.V., & Perry, J.N. (1983b). Association of viruses with two protozoal pathogens of the honey bee. *Ann. Appl. Biol.* **103**, 13–20.
- Bailey, L., Ball Brenda V., & Perry J. N. (2008). The prevalence of viruses of honey bees in Britain. *Ann. Appl. Biol.* **97**, 109–118.
- Ball B.V. (1989) *Varroa jacobsoni* as a virus vector, In: Cavalloro R. (Ed.), *Present status of Varroa in Europe and Progress in the Varroa Mite Control*, E.C. Experts' Group Meeting, Udine, Italy, pp. 241–244.
- Ball, B.V., Overton, H.A., Buck, K.W., Bailey, L., & Perry, J.N. (1985). Relationships between the multiplication of Chronic bee- paralysis virus and its associate particle. *J. Gen. Virol.* **66**.
- Barr, J.J., Auro, R., Furlan, M., Whiteson, K.L., Erb, M.L., Pogliano, J., Stotland, A., Wolkowicz, R., Cutting, A.S., Doran, K.S., et al. (2013). Bacteriophage adhering to mucus provide a non- host- derived immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 10771–10776.
- Berényi, O., Bakonyi, T., Derakhshifar, I., Köglberger, H., & Nowotny, N. (2006). Occurrence of six honeybee viruses in diseased Austrian apiaries. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 2414–2420.
- Bhattarai, N., & Stapleton, J.T. (2012). GB virus C: The good boy virus? *Trends Microbiol.* **20**, 124–130.
- Biesmeijer, J.C., Roberts, S.P.M., Reemer, M., Ohlemüller, R., Edwards, M., Peeters, T., Schaffers, A.P., Potts, S.G., Kleukers, R., Thomas, C.D., et al. (2006). Parallel declines in pollinators and insect- pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science* **313**, 351–354.
- Blanchard, P., Ribière, M., Celle, O., Lallemand, P., Schurr, F., Olivier, V., Iscache, A.L., & Faucon, J.P. (2007). Evaluation of a real- time two- step RT- PCR assay for quantitation of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome in experimentally- infected bee tissues and in life stages of a symptomatic colony. *J. Virol. Methods* **141**, 7–13.
- Blanchard, P., Carletto, J., Siede, R., Schurr, F., Thiéry, R., & Ribière, M. (2014). Identification of Kashmir bee virus in France using a new RT- PCR method which distinguishes closely related viruses. *J. Virol. Methods* **198**, 82–85.
- Boecking, O., & Genersch, E. (2008). Varroosis – the ongoing crisis in bee keeping. *J. Für Verbraucherschutz Leb.* **3**, 221–228.

- Bonning, B.C., & Miller, W.A. (2010). *Dicistroviruses*. *Annu. Rev. Entomol.* **55**, 129–150.
- Boot, W.J., Beetsma, J., & Calis, J.N.M. (1994). Behaviour of *Varroa* mites invading honey bee brood cells. *Exp. Appl. Acarol.* **18**, 371–379.
- Bordenstein, S.R., & Theis, K.R. (2015). Host biology in light of the microbiome: Ten principles of holobionts and hologenomes. *PLoS Biol.* **13**, e1002226.
- Bowen-Walker, P.L., Martin, S.J., & Gunn, A. (1999). The transmission of Deformed wing virus between honeybees (*Apis mellifera* L.) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. *J. Invertebr. Pathol.* **73**, 101–106.
- Brettell, L.E., Mordecai, G.J., Schroeder, D.C., Jones, I.M., da Silva, J.R., Vicente-Rubiano, M., & Martin, S.J. (2017). A comparison of Deformed wing virus in deformed and asymptomatic honey bees. *Insects* **8**, 28.
- Bromenshenk, J.J., Henderson, C.B., Wick, C.H., Stanford, M.F., Zulich, A.W., Jabbour, R.E., Deshpande, S.V., McCubbin, P.E., Seccomb, R.A., Welch, P.M., *et al.* (2010). Iridovirus and microsporidian linked to honey bee colony decline. *PLoS ONE* **5**.
- Brutscher, L.M., Daughenbaugh, K.F., & Flenniken, M.L. (2015). Antiviral defence mechanisms in honey bees. *Curr. Opin. Insect Sci.* **10**, 71–82.
- Brutscher, L.M., Daughenbaugh, K.F., & Flenniken, M.L. (2017). Virus and dsRNA- triggered transcriptional responses reveal key components of honey bee antiviral defense. *Sci. Rep.* **7**.
- Buffie, C.G., & Pamer, E.G. (2013). Microbiota- mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 790–801.
- Burkle, L.A., Marlin, J.C., & Knight, T.M. (2013). Plant- pollinator interactions over 120 years: Loss of species, co- occurrence, and function. *Science* **339**, 1611–1615.
- Cameron, S.A., Lozier, J.D., Strange, J.P., Koch, J.B., Cordes, N., Solter, L.F., & Griswold, T.L. (2011). Patterns of widespread decline in North American bumble bees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 662–667.
- Canny, S.P., Goel, G., Reese, T.A., Zhang, X., Xavier, R., & Virgin, H.W. (2014). Latent Gammaherpesvirus 68 infection induces distinct transcriptional changes in different organs. *J. Virol.* **88**, 730–738.
- Carreck, N., V Ball, B., & Martin, S. (2010). The epidemiology of Cloudy wing virus infections in honey bee colonies in the UK. *J. Apic. Res.* **49**, 66–71.
- Carrillo-Tripp, J., Dolezal, A.G., Goblirsch, M.J., Miller, W.A., Toth, A.L., & Bonning, B.C. (2016). *In vivo* and *in vitro* infection dynamics of honey bee viruses. *Sci. Rep.* **6**, 22265.
- Celle, O., Blanchard, P., Olivier, V., Schurr, F., Cougoule, N., Faucon, J.-P., & Ribière, M. (2008). Detection of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome and its replicative RNA form in various hosts and possible ways of spread. *Virus Res.* **133**, 280–284.
- Clark, T.B. (1978). A Filamentous virus of the honey bee. *J. Invertebr. Pathol.* **32**, 332–340.
- Conceição-Neto, N., Zeller, M., Lefrère, H., De Bruyn, P., Beller, L., Deboutte, W., Yinda, C.K., Lavigne, R., Maes, P., Ranst, M.V., *et al.* (2015). Modular approach to customise sample preparation procedures for viral metagenomics: a reproducible protocol for virome analysis. *Sci. Rep.* **5**.
- Cornman, R.S., Tarpay, D.R., Chen, Y.P., Jeffreys, L., Lopez, D., Pettis, J.S., vanEngelsdorp, D., & Evans, J.D. (2012). Pathogen webs in collapsing honey bee colonies. *PLoS ONE* **7**.
- Dainat, B., Evans, J.D., Chen, Y.P., Gauthier, L., & Neumann, P. (2012). Dead or alive: Deformed wing virus and *Varroa destructor* reduce the life span of winter honeybees. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 981–987.
- Dall, D.J. (1985). Inapparent infection of honey bee pupae by Kashmir and Sacbrood bee viruses in Australia. *Ann. Appl. Biol.* **106**, 461–468.
- Dall, D.J. (1987). Multiplication of Kashmir bee virus in pupae of the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.* **49**, 279–290.
- Dalmon, A., Desbiez, C., Coulon, M., Thomasson, M., Le Conte, Y., Alaux, C., Vallon, J., & Moury, B. (2017). Evidence for positive selection and recombination hotspots in Deformed wing virus (DWV). *Sci. Rep.* **7**.
- DaPalma, T., Doonan, B.P., Trager, N.M., & Kasman, L.M. (2010). A systematic approach to virus – virus interactions. *Virus Res.* **149**, 1–9.
- Darzi, E., Smith, E., Shargil, D., Lachman, O., Ganot, L., & Dombrovsky, A. (2018). The honeybee *Apis mellifera* contributes to Cucumber green mottle mosaic virus spread *via* pollination. *Plant Pathol.* **67**, 244–251.
- Daughenbaugh, K.F., Martin, M., Brutscher, L.M., Cavigli, I., Garcia, E., Lavin, M., & Flenniken, M.L. (2015). Honey bee infecting Lake Sinai viruses. *Viruses* **7**, 3285–3309.
- DeGrandi-Hoffman, G., & Chen, Y.P. (2015). Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. *Curr. Opin. Insect Sci.* **10**, 170–176.
- Desai, S., Kumar, S., & Currie, R. (2015). Occurrence, detection, and quantification of economically important viruses in healthy and unhealthy honey bee (*Hymenoptera: Apidae*) colonies in Canada. *Can. Entomol.* **148**, 22–35.
- Di Prisco, G., Pennacchio, F., Caprio, E., Boncristiani, H.F., Evans, J.D., & Chen, Y.P. (2011). *Varroa destructor* is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Gen. Virol.* **92**, 151–155.
- Domingo, E., Sheldon, J., & Perales, C. (2012). Viral quasispecies evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **76**, 159–216.

- Doublet, V., Labarussias, M., de Miranda, J.R. de, Moritz, R.F.A., & Paxton, R.J. (2015a). Bees under stress: Sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. *Environ. Microbiol.* **17**, 969–983.
- Doublet, V., Natsopoulou, M.E., Zschiesche, L., & Paxton, R.J. (2015b). Within- host competition among the honey bees pathogens *Nosema ceranae* and Deformed wing virus is asymmetric and to the disadvantage of the virus. *J. Invertebr. Pathol.* **124**, 31–34.
- Doublet, V., Poeschl, Y., Gogol-Döring, A., Alaux, C., Annoscia, D., Aurori, C., Barribeau, S.M., Bedoya-Reina, O.C., Brown, M.J.F., Bull, J.C., *et al.* (2017). Unity in defence: Honeybee workers exhibit conserved molecular responses to diverse pathogens. *BMC Genomics* **18**.
- Dupressoir, A., Vernochet, C., Bawa, O., Harper, F., Pierron, G., Opolon, P., & Heidmann, T. (2009). *Syncytin- A* knockout mice demonstrate the critical role in placentation of a fusogenic, endogenous retrovirus- derived, *envelope* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 12127–12132.
- Eilers, E.J., Kremen, C., Greenleaf, S.S., Garber, A.K., & Klein, A.-M. (2011). Contribution of pollinator- mediated crops to nutrients in the human food supply. *PLoS ONE* **6**, e21363.
- Ellis, J.D., & Munn, P.A. (2005). The worldwide health status of honey bees. *Bee World* **86**, 88–101.
- Emery Olivier, Schmidt Konstantin, & Engel Philipp (2017). Immune system stimulation by the gut symbiont *Frischella per- rara* in the honey bee (*Apis mellifera*). *Mol. Ecol.* **26**, 2576–2590.
- Erban, T., Jedelsky, P., & Titera, D. (2013). Two- dimensional proteomic analysis of honeybee, *Apis mellifera*, winter worker hemolymph. *Apidologie* **44**, 404–418.
- Erban, T., Harant, K., Hubalek, M., Vitamvas, P., Kamler, M., Poltronieri, P., Tyl, J., Markovic, M., & Titera, D. (2015). In- depth proteomic analysis of *Varroa destructor*: Detection of DWV-complex, ABPV, VdMLV and honeybee proteins in the mite. *Sci. Rep.* **5**.
- Evison, S.E. (2015). Chalkbrood: Epidemiological perspectives from the host– parasite relationship. *Curr. Opin. Insect Sci.* **10**, 65–70.
- Feschotte, C., & Gilbert, C. (2012). Endogenous viruses: Insights into viral evolution and impact on host biology. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 283–296.
- Foley, K., Fazio, G., Jensen, A.B., & Hughes, W.O.H. (2014). The distribution of *Aspergillus spp.* opportunistic parasites in hives and their pathogenicity to honey bees. *Vet. Microbiol.* **169**, 203–210.
- Forsgren, E. (2010). European foulbrood in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* **103**, S5–S9.
- Foster, L.J. (2011). Interpretation of data underlying the link between Colony collapse disorder (CCD) and an Invertebrate iridescent virus. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **10**.
- Foxman, E.F., & Iwasaki, A. (2011). Genome- virome interactions: Examining the role of common viral infections in complex disease. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 254–264.
- Fujita, T., Kozuka-Hata, H., Ao-Kondo, H., Kunieda, T., Oyama, M., & Kubo, T. (2013). Proteomic analysis of the royal jelly and characterization of the functions of its derivation glands in the honeybee. *J. Proteome Res.* **12**, 404–411.
- Fung, E., Hill, K., Hogendoorn, K., Glatz, R.V., Napier, K.R., Bellgard, M.I., & Barrero, R.A. (2018). *De novo* assembly of honey bee RNA viral genomes by tapping into the innate insect antiviral response pathway. *J. Invertebr. Pathol.* **152**, 38– 47.
- Furgala, B., & Lee, P.E. (1966). Acute bee paralysis virus, a cytoplasmic insect virus. *Virology* **29**, 346–348.
- Gajger, I.T., Kolodziejek, J., Bakonyi, T., & Nowotny, N. (2014). Prevalence and distribution patterns of seven different hon- eybee viruses in diseased colonies: A case study from Croatia. *Apidologie* **45**, 701–706.
- Galbraith, D.A., Fuller, Z., Brockmann, A., Frazier, M., Gikungu, M.W., Kapheim, K.M., Kerby, J.T., Kocher, S.D., Losyev, O., Muli, E., *et al.* (2018). Investigating the viral ecology of global bee communities with high- throughput metagenomics. *BioRxiv*, 243139.
- Gall, O.L., Christian, P., Fauquet, C.M., King, A.M.Q., Knowles, N.J., Nakashima, N., Stanway, G., & Gorbalenya, A.E. (2008). *Picornavirales*, a proposed order of positive- sense single- stranded RNA viruses with a pseudo T = 3 virion archi- tecture. *Arch. Virol.* **153**, 715.
- Garibaldi, L.A., Steffan-Dewenter, I., Winfree, R., Aizen, M.A., Bommarco, R., Cunningham, S.A., Kremen, C., Carvalheiro, L.G., Harder, L.D., Afik, O., *et al.* (2013). Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. *Science* **339**, 1608–1611.
- Gauthier, L., Cornman, S., Hartmann, U., Cousserans, F., Evans, J.D., de Miranda, J.R., & Neumann, P. (2015). The *Apis mellifera* filamentous virus genome. *Viruses* **7**, 3798–3815.
- Genersch, E. (2010). American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* **103**, S10–S19.
- Genersch, E., Ohe, W. von der, Kaatz, H., Schroeder, A., Otten, C., Büchler, R., Berg, S., Ritter, W., Mühlen, W., Gisder, S., *et al.* (2010). The German bee monitoring project: A long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie* **41**, 332–352.
- Goulson, D. (2003). Effects of introduced bees on native ecosystems. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **34**, 1–26.
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., & Rotheray, E.L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesti- cides, and lack of flowers. *Science* **347**, 1255957.

- Granberg, F., Vicente-Rubiano, M., Rubio-Guerri, C., Karlsson, O.E., Kukielka, D., Belák, S., & Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2013). Metagenomic detection of viral pathogens in Spanish honeybees: Co- infection by *Aphid* lethal paralysis, Israel acute paralysis and Lake Sinai viruses. *PLoS ONE* **8**.
- Gündüz, E.A., & Douglas, A.E. (2009). Symbiotic bacteria enable insect to use a nutritionally inadequate diet. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **276**, 987–991.
- Hartmann, U., Forsgren, E., Charrière, J.-D., Neumann, P., & Gauthier, L. (2015). Dynamics of *Apis mellifera* filamentous virus (AmFV) infections in honey bees and relationships with other parasites. *Viruses* **7**, 2654–2667.
- Haydak, M.H. (1970). Honey bee nutrition. *Annu. Rev. Entomol.* **15**, 143–156.
- Higes, M., García-Palencia, P., Martín-Hernández, R., & Meana, A. (2007). Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *J. Invertebr. Pathol.* **94**, 211–217.
- Hilditch, L., Matadeen, R., Goldstone, D.C., Rosenthal, P.B., Taylor, I.A., & Stoye, J.P. (2011). Ordered assembly of murine leukemia virus capsid protein on lipid nanotubes directs specific binding by the restriction factor, Fv1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 5771–5776.
- Hinton, T.M., Ross-Smith, N., Warner, S., Belsham, G.J., & Crabb, B.S. (2002). Conservation of L and 3C proteinase activities across distantly related *Aphthoviruses*. *J. Gen. Virol.* **83**, 3111–3121.
- Huang, W.-F., & Solter, L.F. (2013). Comparative development and tissue tropism of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. *J. Invertebr. Pathol.* **113**, 35–41.
- Huang, W.-F., Solter, L., Aronstein, K., & Huang, Z. (2015). Infectivity and virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in commercially available North American honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* **124**, 107–113.
- Hubert, J., Bicianova, M., Ledvinka, O., Kamler, M., Lester, P.J., Nesvorna, M., Kopecky, J., & Erban, T. (2017). Changes in the bacteriome of honey bees associated with the parasite *Varroa destructor*, and pathogens *Nosema* and *Lotmaria passim*. *Microb. Ecol.* **73**, 685–698.
- Chaimanee, V., Chantawannakul, P., Chen, Y.P., Evans, J.D., & Pettis, J.S. (2012). Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. *J. Insect Physiol.* **58**, 1090–1095.
- Chejanovsky, N., Ophir, R., Schwager, M.S., Slabezki, Y., Grossman, S., & Cox-Foster, D. (2014). Characterization of viral siRNA populations in honey bee Colony collapse disorder. *Virology* **454–455**, 176–183.
- Chemurot, M., De Smet, L., Brunain, M., De Rycke, R., & de Graaf, D.C. (2017). *Nosema neumanni* n. sp. (Microsporidia, Nosematidae), a new microsporidian parasite of honeybees, *Apis mellifera* in Uganda. *Eur. J. Protistol.* **61**, 13–19.
- Chen, Y.P., Higgins, J.A., & Feldlaufer, M.F. (2005). Quantitative real- time reverse transcription- PCR analysis of Deformed wing virus infection in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 436–441.
- Chen, Y.P., Evans, J., & Feldlaufer, M. (2006a). Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.* **92**, 152–159.
- Chen, Y.P., Pettis, J.S., Collins, A., & Feldlaufer, M.F. (2006b). Prevalence and transmission of honeybee viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 606–611.
- Chen, Y.P., Pettis, J.S., Corona, M., Chen, W.P., Li, C.J., Spivak, M., Visscher, P.K., DeGrandi-Hoffman, G., Boncristiani, H., Zhao, Y., et al. (2014). Israeli acute paralysis virus: Epidemiology, pathogenesis and implications for honey bee health. *PLoS Pathog.* **10**, e1004261.
- Chen, Y.P., Pettis, J.S., Evans, J.D., Kramer, M., & Feldlaufer, M.F. (2004). Transmission of Kashmir bee virus by the ectoparasitic mite *Varroa destructor*. *Apidologie* **35**, 441–448.
- Chevin, A., Coutard, B., Blanchard, P., Dabert-Gay, A.-S., Ribière-Chabert, M., & Thiéry, R. (2015). Characterisation of structural proteins from Chronic bee paralysis virus (CBPV) using mass spectrometry. *Viruses* **7**, 3329–3344.
- Chinchar, V.G., Hick, P., Ince, I.A., Jancovich, J.K., Marschang, R., Qin, Q., Subramaniam, K., Waltzek, T.B., Whittington, R., Williams, T., et al. (2017). ICTV virus taxonomy profile: *Iridoviridae*. *J. Gen. Virol.* **98**, 890–891.
- Iqbal, J., & Mueller, U. (2007). Virus infection causes specific learning deficits in honeybee foragers. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **274**, 1517–1521.
- Jacques, A., Laurent, M., Consortium, E., Ribière-Chabert, M., Saussac, M., Bougeard, S., Budge, G.E., Hendriks, P., & Chauzat, M.-P. (2017). A pan- European epidemiological study reveals honey bee colony survival depends on beekeeper education and disease control. *PLoS ONE* **12**, e0172591.
- Kakumanu, M.L., Reeves, A.M., Anderson, T.D., Rodrigues, R.R., & Williams, M.A. (2016). Honey bee gut microbiome is altered by in- hive pesticide exposures. *Front. Microbiol.* **7**.
- Kešnerová, L., Mars, R.A.T., Ellegaard, K.M., Troilo, M., Sauer, U., & Engel, P. (2017). Disentangling metabolic functions of bacteria in the honey bee gut. *PLoS Biol.* **15**, e2003467.
- Kevill, J.L., Highfield, A., Mordecai, G.J., Martin, S.J., & Schroeder, D.C. (2017). ABC Assay: Method development and application to quantify the role of three DWV master variants in overwinter colony losses of European honey bees. *Viruses* **9**.
- Khosravi, A., Yáñez, A., Price, J.G., Chow, A., Merad, M., Goodridge, H.S., & Mazmanian, S.K. (2014). Gut microbiota promotes haematopoiesis to control bacterial infection. *Cell Host Microbe* **15**, 374–381.
- Kielmanowicz, M.G., Inberg, A., Lerner, I.M., Golani, Y., Brown, N., Turner, C.L., Hayes, G.J.R., & Ballam, J.M. (2015). Prospective large- scale field study generates predictive model identifying major contributors to colony losses. *PLoS Pathog.* **11**.

- Klee, J., Besana, A.M., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Tam, D.Q., Chinh, T.X., Puerta, F., Ruz, J.M., Kryger, P. (2007). Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.* **96**, 1–10.
- Klein, A.-M., Vaissière, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., & Tscharntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. Biol. Sci.* **274**, 303–313.
- Klein, A.-M., Boreux, V., Fornoff, F., Mupepele, A.-C., & Pufal, G. (2018). Relevance of wild and managed bees for human well-being. *Curr. Opin. Insect Sci.* **26**, 82–88.
- Koleoglu, G., Goodwin, P.H., Reyes-Quintana, M., Hamiduzzaman, M.M., & Guzman-Novoa, E. (2017). Effect of *Varroa destructor*, wounding and *Varroa* homogenate on gene expression in brood and adult honey bees. *PLoS ONE* **12**, e0169669.
- Koropatnick, T.A., Engle, J.T., Apicella, M.A., Stabb, E.V., Goldman, W.E., & McFall-Ngai, M.J. (2004). Microbial factor-mediated development in a host-bacterial mutualism. *Science* **306**, 1186–1188.
- Kosior, A., Celary, W., Olejniczak, P., Fijał, J., Król, W., Solarz, W., & Płonka, P. (2007). The decline of the bumble bees and cuckoo bees (*Hymenoptera: Apidae: Bombini*) of Western and Central Europe. *Oryx* **41**, 79–88.
- Kuchibhatla, D.B., Sherman, W.A., Chung, B.Y.W., Cook, S., Schneider, G., Eisenhaber, B., & Karlin, D.G. (2014). Powerful sequence similarity search methods and in-depth manual analyses can identify remote homologs in many apparently “orphan” viral proteins. *J. Virol.* **88**, 10–20.
- Kulhanek, K., Steinhauer, N., Rennich, K., Caron, D.M., Sagili, R.R., Pettis, J.S., Ellis, J.D., Wilson, M.E., Wilkes, J.T., Tarpy, D.R., et al. (2017). A national survey of managed honey bee 2015–2016 annual colony losses in the USA. *J. Apic. Res.* **56**, 328–340.
- Kumar, A., Murthy, S., & Kapoor, A. (2017). Evolution of selective-sequencing approaches for virus discovery and virome analysis. *Virus Res.* **239**, 172–179.
- Kuster, R.D., Boncristiani, H.F., & Rueppell, O. (2014). Immunogene and viral transcript dynamics during parasitic *Varroa destructor* mite infection of developing honey bee (*Apis mellifera*) pupae. *J. Exp. Biol.* **217**, 1710–1718.
- Kwong, W.K., Mancenido, A.L., & Moran, N.A. (2017). Immune system stimulation by the native gut microbiota of honey bees. *R. Soc. Open Sci.* **4**.
- Lanzi, G., de Miranda, J.R., Boniotti, M.B., Cameron, C.E., Lavazza, A., Capucci, L., Camazine, S.M., & Rossi, C. (2006). Molecular and biological characterization of Deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera* L.). *J. Virol.* **80**, 4998–5009.
- Leat, N., Ball, B., Govan, V., & Davison, S. (2000). Analysis of the complete genome sequence of Black queen-cell virus, a picorna-like virus of honey bees. *J. Gen. Virol.* **81**, 2111–2119.
- Lee, Y.K., & Mazmanian, S.K. (2010). Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science* **330**, 1768–1773.
- Levin, S., Sela, N., & Chejanovsky, N. (2016). Two novel viruses associated with the *Apis mellifera* pathogenic mite *Varroa destructor*. *Sci. Rep.* **6**.
- Li, J.L., Cornman, R.S., Evans, J.D., Pettis, J.S., Zhao, Y., Murphy, C., Peng, W.J., Wu, J., Hamilton, M., Boncristiani, H.F., et al. (2014). Systemic spread and propagation of a plant-pathogenic virus in European honeybees, *Apis mellifera*. *MBio* **5**, e00898-13.
- Li, Z., Chen, Y.P., Zhang, S., Chen, S., Li, W., Yan, L., Shi, L., Wu, L., Sohr, A., & Su, S. (2013). Viral infection affects sucrose responsiveness and homing ability of forager honey bees, *Apis mellifera* L. *PLoS ONE* **8**.
- Liu, S., Vijayendran, D., & Bonning, B.C. (2011). Next generation sequencing technologies for insect virus discovery. *Viruses* **3**, 1849–1869.
- Liu, S., Vijayendran, D., Carrillo-Tripp, J., Miller, W.A., & Bonning, B.C. (2014). Analysis of new aphid lethal paralysis virus (ALPV) isolates suggests evolution of two ALPV species. *J. Gen. Virol.* **95**, 2809–2819.
- Mallinger, R.E., & Gratton, C. (2015). Species richness of wild bees, but not the use of managed honeybees, increases fruit set of a pollinator-dependent crop. *J. Appl. Ecol.* **52**, 323–330.
- Manley, R., Boots, M., & Wilfert, L. (2017). Condition-dependent virulence of Slow bee paralysis virus in *Bombus terrestris*: Are the impacts of honeybee viruses in wild pollinators underestimated? *Oecologia* **184**, 305–315.
- Maori, E., Lavi, S., Mozes-Koch, R., Gantman, Y., Peretz, Y., Edelbaum, O., Tanne, E., & Sela, I. (2007a). Isolation and characterization of Israeli acute paralysis virus, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel: Evidence for diversity due to intra- and inter-species recombination. *J. Gen. Virol.* **88**, 3428–3438.
- Maori, E., Tanne, E., & Sela, I. (2007b). Reciprocal sequence exchange between non-retro viruses and hosts leading to the appearance of new host phenotypes. *Virology* **362**, 342–349.
- Martin, S.J. (1994). Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in worker brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions. *Exp. Appl. Acarol.* **18**, 87–100.
- Martin, S.J., Highfield, A.C., Brettell, L., Villalobos, E.M., Budge, G.E., Powell, M., Nikaido, S., & Schroeder, D.C. (2012). Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science* **336**, 1304–1306.
- McMahon, D.P., Fürst, M.A., Caspar, J., Theodorou, P., Brown, M.J.F., & Paxton, R.J. (2015). A sting in the spit: Widespread cross-infection of multiple RNA viruses across wild and managed bees. *J. Anim. Ecol.* **84**, 615–624.
- McMahon, D.P., Natsopoulou, M.E., Doublet, V., Fürst, M., Weging, S., Brown, M.J.F., Gogol-Döring, A., & Paxton, R.J. (2016). Elevated virulence of an emerging viral genotype as a driver of honeybee loss. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **283**.

- McMenamin, A.J., Brutscher, L.M., Glenny, W., & Flenniken, M.L. (2016). Abiotic and biotic factors affecting the replication and pathogenicity of bee viruses. *Curr. Opin. Insect Sci.* **16**, 14–21.
- de Miranda, J.R. de, Bailey, L., Ball, B.V., Blanchard, P., Budge, G.E., Chejanovsky, N., Chen, Y.P., Gauthier, L., Genersch, E., de Graaf, D.C. de, *et al.* (2013). Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. *J. Apic. Res.* **52**, 1–56.
- de Miranda, J.R., & Genersch, E. (2010). Deformed wing virus. *J. Invertebr. Pathol.* **103**, S48–S61.
- de Miranda, J.R., Gauthier, L., Ribière, M., & Chen, Y.P. (2011). Honey bee viruses and their effect on bee and colony health. *Honey Bee Colony Health Chall. Sustain. Solut.* 71–102.
- de Miranda, J.R., Cornman, R.S., Evans, J.D., Semberg, E., Haddad, N., Neumann, P., & Gauthier, L. (2015). Genome characterization, prevalence and distribution of a Macula-like virus from *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. *Viruses* **7**, 3586–3602.
- Molineri, A.I., Pacini, A., Giacobino, A., Bulacio-Cagnolo, N., Aignasse, A., Zago, L., Fondevila, N., Ferrufino, C., Merke, J., Orellano, E., *et al.* (2017). Prevalence of honey bee (*Apis mellifera*) viruses in temperate and subtropical regions from Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* **49**, 166–173.
- Mondet, F., de Miranda, J.R., Kretzschmar, A., Le Conte, Y., & Mercer, A.R. (2014). On the front line: Quantitative virus dynamics in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies along a new expansion front of the parasite *Varroa destructor*. *PLoS Pathog.* **10**.
- Moore, J., Jironkin, A., Chandler, D., Burroughs, N., Evans, D.J., & Ryabov, E.V. (2011). Recombinants between Deformed wing virus and *Varroa destructor* virus-1 may prevail in *Varroa destructor*-infested honeybee colonies. *J. Gen. Virol.* **92**, 156–161.
- Mordecai, G.J., Wilfert, L., Martin, S.J., Jones, I.M., & Schroeder, D.C. (2016a). Diversity in a honey bee pathogen: First report of a third master variant of the Deformed wing virus quasispecies. *ISME J.* **10**, 1264–1273.
- Mordecai, G.J., Brettell, L.E., Martin, S.J., Dixon, D., Jones, I.M., & Schroeder, D.C. (2016b). Superinfection exclusion and the long-term survival of honey bees in *Varroa*-infested colonies. *ISME J.* **10**, 1182–1191.
- Mordecai, G.J., Brettell, L.E., Pachori, P., Villalobos, E.M., Martin, S.J., Jones, I.M., & Schroeder, D.C. (2016c). Moku virus; a new *Iflavirus* found in wasps, honey bees and *Varroa*. *Sci. Rep.* **6**.
- Morimoto, T., Kojima, Y., Yoshiyama, M., Kimura, K., Yang, B., & Kadowaki, T. (2012). Molecular identification of Chronic bee paralysis virus infection in *Apis mellifera* colonies in Japan. *Viruses* **4**, 1093–1103.
- Natsopoulou, M.E., McMahon, D.P., Doublet, V., Bryden, J., & Paxton, R.J. (2015). Interspecific competition in honeybee intracellular gut parasites is asymmetric and favours the spread of an emerging infectious disease. *Proc. R. Soc. B.* **282**, 20141896.
- Natsopoulou, M.E., Doublet, V., & Paxton, R.J. (2016). European isolates of the *Microsporidia* *Nosema apis* and *Nosema ceranae* have similar virulence in laboratory tests on European worker honey bees. *Apidologie* **47**, 57–65.
- Natsopoulou, M.E., McMahon, D.P., Doublet, V., Frey, E., Rosenkranz, P., & Paxton, R.J. (2017). The virulent, emerging genotype B of Deformed wing virus is closely linked to overwinter honeybee worker loss. *Sci. Rep.* **7**.
- Nielsen, S.L., Nicolaisen, M., & Kryger, P. (2008). Incidence of Acute bee paralysis virus, Black queen cell virus, Chronic bee paralysis virus, Deformed wing virus, Kashmir bee virus and Sacbrood virus in honey bees (*Apis mellifera*) in Denmark. *Apidologie* **39**, 310–314.
- Oliver, K.M., Degnan, P.H., Hunter, M.S., & Moran, N.A. (2009). Bacteriophages encode factors required for protection in a symbiotic mutualism. *Science* **325**, 992–994.
- Olivier, V., Blanchard, P., Chaouch, S., Lallemand, P., Schurr, F., Celle, O., Dubois, E., Tordo, N., Thiéry, R., Houlgatte, R., *et al.* (2008a). Molecular characterisation and phylogenetic analysis of Chronic bee paralysis virus, a honey bee virus. *Virus Res.* **132**, 59–68.
- Olivier, V., Massou, I., Celle, O., Blanchard, P., Schurr, F., Ribière, M., & Gauthier, M. (2008b). *In situ* hybridization assays for localization of the Chronic bee paralysis virus in the honey bee (*Apis mellifera*) brain. *J. Virol. Methods* **153**, 232–237.
- Ongus, J.R., Peters, D., Bonmatin, J.-M., Bengsch, E., Vlak, J.M., & van Oers, M.M. (2004). Complete sequence of a picorna-like virus of the genus *Iflavirus* replicating in the mite *Varroa destructor*. *J. Gen. Virol.* **85**, 3747–3755.
- Page, R.E., & Peng, C.Y.-S. (2001). Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Exp. Gerontol.* **36**, 695–711.
- Pannebakker, B.A., Loppin, B., Elemans, C.P.H., Humblot, L., & Vavre, F. (2007). Parasitic inhibition of cell death facilitates symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 213–215.
- Piccolo, F.D., Nazzi, F., Vedova, G.D., & Milani, N. (2010). Selection of *Apis mellifera* workers by the parasitic mite *Varroa destructor* using host cuticular hydrocarbons. *Parasitology* **137**, 967–973.
- Porrini, C., Mutinelli, F., Bortolotti, L., Granato, A., Laurenson, L., Roberts, K., Gallina, A., Silvester, N., Medrzycki, P., Renzi, T., *et al.* (2016). The status of honey bee health in Italy: Results from the nationwide bee monitoring network. *PLoS ONE* **11**.
- Ravoet, J., Maharramov, J., Meeus, I., De Smet, L., Wenseleers, T., Smaghe, G., & de Graaf, D.C. (2013). Comprehensive bee pathogen screening in Belgium reveals *Crithidia mellificae* as a new contributory factor to winter mortality. *PLoS ONE* **8**.
- Ravoet, J., De Smet, L., Wenseleers, T., & de Graaf, D.C. (2015a). Vertical transmission of honey bee viruses in a Belgian queen breeding program. *BMC Vet. Res.* **11**.

- Ravoet, J., De Smet, L., Wenseleers, T., & de Graaf, D.C. (2015b). Genome sequence heterogeneity of Lake Sinai virus found in honey bees and *Orf1/RdRP*-based polymorphisms in a single host. *Virus Res.* **201**, 67–72.
- Remnant, E.J., Shi, M., Buchmann, G., Blacquièrre, T., Holmes, E.C., Beekman, M., & Ashe, A. (2017). A diverse range of novel RNA viruses in geographically distinct honey bee populations. *J. Virol.* **91**, e00158-17.
- Ribièrre, M., Triboulot, C., Mathieu, L., Aurières, C., Faucon, J.-P., & Pépin, M. (2002). Molecular diagnosis of Chronic bee paralysis virus infection. *Apidologie* **33**, 339–351.
- van Rij, R.P., Saleh, M.-C., Berry, B., Foo, C., Houk, A., Antoniewski, C., & Andino, R. (2006). The RNA silencing endonuclease Argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* **20**, 2985–2995.
- Rinderer, T.E., & Rothenbuhler, W.C. (1976). Characteristic field symptoms comprising honeybee hairless- black syndrome induced in the laboratory by a virus. *J. Invertebr. Pathol.* **27**, 215–219.
- Roberts, J.M.K., Anderson, D.L., & Durr, P.A. (2017). Absence of Deformed wing virus and *Varroa destructor* in Australia provides unique perspectives on honeybee viral landscapes and colony losses. *Sci. Rep.* **7**, 6925.
- Rortais, A., Tentcheva, D., Papachristoforou, A., Gauthier, L., Arnold, G., Colin, M.E., & Bergoin, M. (2006). Deformed wing virus is not related to honey bees' aggressiveness. *Virol. J.* **3**, 61.
- Rosenkranz, P., Aumeier, P., & Ziegelmann, B. (2010). Biology and control of *Varroa destructor*. *J. Invertebr. Pathol.* **103**, S96–S119.
- Runckel, C., Flenniken, M.L., Engel, J.C., Ruby, J.G., Ganem, D., Andino, R., & DeRisi, J.L. (2011). Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema*, and *Crithidia*. *PLoS ONE* **6**.
- Ryabov, E.V., Wood, G.R., Fannon, J.M., Moore, J.D., Bull, J.C., Chandler, D., Mead, A., Burroughs, N., & Evans, D.J. (2014). A virulent strain of Deformed wing virus (DWV) of honeybees (*Apis mellifera*) prevails after *Varroa destructor*- mediated, or *in vitro*, transmission. *PLoS Pathog.* **10**.
- Ryabov, E.V., Fannon, J.M., Moore, J.D., Wood, G.R., & Evans, D.J. (2016). The *Iflaviruses* Sacbrood virus and Deformed wing virus evoke different transcriptional responses in the honeybee which may facilitate their horizontal or vertical transmission. *PeerJ* **4**.
- Ryba, S., Titera, D., Schodelbauerova-Traxmandlova, I., & Kindlmann, P. (2012). Prevalence of honeybee viruses in the Czech Republic and coinfections with other honeybee disease. *Biologia (Bratisl.)* **67**, 590–595.
- Sabree, Z.L., Hansen, A.K., & Moran, N.A. (2012). Independent studies using deep sequencing resolve the same set of core bacterial species dominating gut communities of honey bees. *PLoS ONE* **7**.
- Sampson, T.R., & Mazmanian, S.K. (2015). Control of brain development, function, and behaviour by the microbiome. *Cell Host Microbe* **17**, 565–576.
- Sanpa, S., & Chantawannakul, P. (2009). Survey of six bee viruses using RT-PCR in Northern Thailand. *J. Invertebr. Pathol.* **100**, 116–119.
- Santamaria, J., Villalobos, E.M., Brettell, L.E., Nikaido, S., Graham, J.R., & Martin, S. (2018). Evidence of *Varroa*- mediated deformed wing virus spill- over in Hawaii. *J. Invertebr. Pathol.* **151**, 126–130.
- Santillán-Galicia, M.T., Ball, B.V., Clark, S.J., & Alderson, P.G. (2010). Transmission of Deformed wing virus and Slow paralysis virus to adult bees (*Apis mellifera* L.) by *Varroa destructor*. *J. Apic. Res.* **49**, 141–148.
- Schwarz, R.S., Moran, N.A., & Evans, J.D. (2016). Early gut colonizers shape parasite susceptibility and microbiota composition in honey bee workers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 9345–9350.
- Schwarz R.S., Bauchan G.R., Murphy C.A., Ravoet J., Graaf D.C., & Evans J.D. (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. *J. Eukaryot. Microbiol.* **62**, 567–583.
- Shah, K.S., Evans, E.C., & Pizzorno, M.C. (2009). Localization of Deformed wing virus (DWV) in the brains of the honeybee, *Apis mellifera* Linnaeus. *Virol. J.* **6**, 182.
- Shen, M., Cui, L., Ostiguy, N., & Cox-Foster, D. (2005a). Intricate transmission routes and interactions between picorna- like viruses (Kashmir bee virus and Sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic *Varroa* mite. *J. Gen. Virol.* **86**, 2281–2289.
- Shen, M., Yang, X., Cox-Foster, D., & Cui, L. (2005b). The role of *Varroa* mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and Deformed wing virus (DWV) in honey bees. *Virology* **342**, 141–149.
- Singh, R., Levitt, A.L., Rajotte, E.G., Holmes, E.C., Ostiguy, N., vanEngelsdorp, D., Lipkin, W.I., dePamphilis, C.W., Toth, A.L., & Cox-Foster, D.L. (2010). RNA viruses in hymenopteran pollinators: Evidence of inter- taxa virus transmission *via* pollen and potential impact on non-*Apis* hymenopteran species. *PLoS ONE* **5**, e14357.
- Sinpo, C., Paxton, R.J., Disayathanoowat, T., Krongdang, S., & Chantawannakul, P. (2018). Impact of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* on individual worker bees of the two host species (*Apis cerana* and *Apis mellifera*) and regulation of host immune response. *J. Insect Physiol.* **105**, 1–8.
- Sitaropoulou, N., Neophytou, E.P., & Thomopoulos, G.N. (1989). Structure of the nucleocapsid of a Filamentous virus of the honey bee (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* **53**, 354–357.
- Stappenbeck, T.S., Hooper, L.V., & Gordon, J.I. (2002). Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes *via* Paneth cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 15451–15455.
- Steinmann, N., Corona, M., Neumann, P., & Dainat, B. (2015). Overwintering is associated with reduced expression of immune genes and higher susceptibility to virus infection in honey bees. *PLoS ONE* **10**, e0129956.

- Teixeira, E.W., Chen, Y.P., Message, D., Pettis, J., & Evans, J.D. (2008). Virus infections in Brazilian honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* **99**, 117–119.
- Tentcheva, D., Gauthier, L., Zappulla, N., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M.E., & Bergoin, M. (2004). Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 7185–7191.
- Todd, J.H., de Miranda, J.R., & Ball, B.V. (2007). Incidence and molecular characterization of viruses found in dying New Zealand honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with *Varroa destructor*. *Apidologie* **38**, 354–367.
- Tokarz, R., Firth, C., Street, C., Cox-Foster, D.L., & Lipkin, W.I. (2011). Lack of evidence for an association between Iridovirus and Colony collapse disorder. *PLoS ONE* **6**.
- Toplak, I., Jamnikar Ciglenečki, U., Aronstein, K., & Gregorc, A. (2013). Chronic bee paralysis virus and *Nosema ceranae* experimental co- infection of winter honey bee workers (*Apis mellifera* L.). *Viruses* **5**, 2282–2297.
- Tozkar, C.Ö., Kence, M., Kence, A., Huang, Q., & Evans, J.D. (2015). Metatranscriptomic analyses of honey bee colonies. *Front. Genet.* **6**.
- Traynor, K.S., Rennich, K., Forsgren, E., Rose, R., Pettis, J., Kunkel, G., Madella, S., Evans, J., Lopez, D., & vanEngelsdorp, D. (2016). Multiyear survey targeting disease incidence in US honey bees. *Apidologie* **47**, 325–347.
- Underwood, R., & vanEngelsdorp, D. (2007). Colony collapse disorder: Have we seen this before? *Bee Cult.* **35**, 13–18.
- Valles, S.M., Chen, Y.P., Firth, A.E., Guérin, D.M.A., Hashimoto, Y., Herrero, S., de Miranda, J.R., Ryabov, E., and ICTV Report Consortium (2017a). ICTV virus taxonomy profile: *Dicistroviridae*. *J. Gen. Virol.* **98**, 355–356.
- Valles, S.M., Chen, Y.P., Firth, A.E., Guérin, D.M.A., Hashimoto, Y., Herrero, S., de Miranda, J.R., Ryabov, E., and ICTV Report Consortium (2017b). ICTV virus taxonomy profile: *Iflaviridae*. *J. Gen. Virol.* **98**, 527–528.
- vanEngelsdorp, D., Evans, J.D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B.K., Frazier, M., Frazier, J., Cox-Foster, D., Chen, Y.P., et al. (2009). Colony collapse disorder: A descriptive study. *PLoS ONE* **4**.
- vanEngelsdorp, D., Speybroeck, N., Evans, J.D., Nguyen, B.K., Mullin, C., Frazier, M., Frazier, J., Cox-Foster, D., Chen, Y.P., Tarpy, D.R., et al. (2010). Weighing risk factors associated with bee Colony collapse disorder by classification and regression tree analysis. *J. Econ. Entomol.* **103**, 1517–1523.
- Watanabe, M., Iwakawa, H., Tadakuma, H., & Tomari, Y. (2017). Biochemical and single- molecule analyses of the RNA silencing suppressing activity of CrPV- 1A. *Nucleic Acids Res.* **45**, 10837–10844.
- Wessnitzer, J., & Webb, B. (2006). Multimodal sensory integration in insects- towards insect brain control architectures. *Bioinspir. Biomim.* **1**, 63.
- Wilfert, L., Long, G., Leggett, H.C., Schmid-Hempel, P., Butlin, R., Martin, S.J.M., & Boots, M. (2016). Deformed wing virus is a recent global epidemic in honeybees driven by *Varroa* mites. *Science* **351**, 594–597.
- Yang, X., & Cox-Foster, D.L. (2005). Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: Evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 7470–7475.
- Yang, B., Peng, G., Li, T., & Kadowaki, T. (2013). Molecular and phylogenetic characterization of honey bee viruses, *Nosema* microsporidia, protozoan parasites, and parasitic mites in China. *Ecol. Evol.* **3**, 298–311.
- Yue, C., Schröder, M., Bienefeld, K., & Genersch, E. (2006). Detection of viral sequences in semen of honeybees (*Apis mellifera*): Evidence for vertical transmission of viruses through drones. *J. Invertebr. Pathol.* **92**, 105–108.
- Yue, C., Schröder, M., Gisder, S., & Genersch, E. (2007). Vertical- transmission routes for Deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera*). *J. Gen. Virol.* **88**, 2329–2336.
- van der Zee, R., Pisa, L., Andonov, S., Brodschneider, R., Charriere, J.-D., Chlebo, R., Coffey, M.F., Dahle, B., Gajda, A., Gray, A., et al. (2012). Managed honey bee colony losses in Canada, China, Europe, Israel and Turkey, for the winters of 2008-9 and 2009-10. *J. Apic. Res. Bee World* **51**, 100–114.
- Zhang, Y., & Han, R. (2018). A saliva protein of *Varroa* mites contributes to the toxicity toward *Apis cerana* and the DWV elevation in *A. mellifera*. *Sci. Rep.* **8**.
- Zheng, H., Powell, J.E., Steele, M.I., Dietrich, C., & Moran, N.A. (2017). Honeybee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 4775–4780.
- Zioni, N., Soroker, V., & Chejanovsky, N. (2011). Replication of *Varroa destructor* virus 1 (VDV-1) and a *Varroa destructor* virus 1–Deformed wing virus recombinant (VDV-1– DWV) in the head of the honey bee. *Virology* **417**, 106–112.
- Webové stránky:*
- Moore, P.A., Wilson, M.E., & Skinner, J.A. Honey bee viruses, the deadly *Varroa* mite associates. In: *eXtension* [online]. Copyright © 2018 eXtension. All rights reserved. [cit. 05.05.2018]. Dostupné z: <http://articles.extension.org/pages/71172/honey-bee-viruses-the-deadly-varroa-mite-associates>
- Schwartz, S. Mite- virus alliance could be bringing down honeybees In: *ScienceNews* [online]. Copyright © 2018 Society for Science [cit. 05.05.2018]. Dostupné z: <https://www.sciencenews.org/blog/science-ticker/mite-virus-alliance-could-be-bringing-down-honeybees>
- Snyder, R. BQCV (Black Queen Cell Virus) In: *Beeinformed* [online]. Copyright © 2018 Bee Informed Partnership [cit. 05.05.2018]. Dostupné z: <https://beeinformed.org/2013/12/04/bqcv-black-queen-cell-virus/>