

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



**Bc. Dominika Kadlečková**

Rozdíly ve viromu včel u různých populací včely medonosné (*Apis mellifera*)  
The differences in the virome of different populations of honey bees (*Apis mellifera*)

Typ závěrečné práce:

Diplomová práce

Vedoucí práce/Školitel:

RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D.

Praha, 2020

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 10. 8. 2020

.....

Podpis

## Poděkování

Ráda bych poděkovala všem, kdo se podíleli na tvorbě této práce. Za pomoc s bioinformatikou částí bych chtěla poděkovat Wardu Deboutte, Ph.D., a RNDr. Jaroslavu Nunváři, Ph.D. Také bych chtěla poděkovat každému, kdo poskytl nebo se podílel na sběru vzorků včel a poskytl patogeny pro tuto práci. Díky také patří RNDr. Martině Salákové, Ph.D., za její vedení v průběhu laboratorní práce a mé školitelce RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D., za veškerou jejich pomoc a nekonečnou trpělivost. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat každému, kdo přečetl a pomohl mi opravit a napsat tuto diplomovou práci, včetně výše zmíněných i RNDr. Tomáši Erbanovi, Ph.D., za odbornou konzultaci. Práce byla vypracována zčásti za podpory grantu CELSA s názvem „*Metagenomic analysis of the virome of the honey bee (Apis mellifera) in the Czech Republic*”.

# Obsah

<b>Abstrakt</b> .....	<b>II</b>
<b>Seznam použitých zkratk</b> .....	<b>IV</b>
<b>Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Přehled literatury</b> .....	<b>2</b>
1.1. Včely.....	2
1.1.1. Parazité.....	3
1.2. Virové infekce .....	4
1.2.1. Specifita přenosu .....	5
1.2.2. Charakteristika průběhu virové infekce.....	6
1.2.3. Picornavirales .....	9
1.2.4. Tymovirales.....	13
1.2.5. Nezařazené .....	14
1.3. Interakce .....	17
1.3.1. Virus-virus.....	17
1.3.2. <i>Varroa</i> -virus .....	18
1.3.3. Ostatní patogeny– virus.....	20
1.3.4. Viry parazitů.....	20
<b>2. Cíle práce</b> .....	<b>22</b>
<b>3. Materiál a metody</b> .....	<b>23</b>
3.1. Původ vzorků.....	23
3.2. Studium viromu .....	24
3.2.1. Příprava vzorků pro NGS .....	24
3.2.2. Bioinformatické zpracování .....	27
3.3. Přítomnost patogenů a charakterizace poddruhu včel .....	29
3.3.1. Izolace totální DNA/ RNA .....	29
3.3.2. Detekce nevirových patogenů pomocí PCR.....	30
3.3.3. Taxonomie přítomných poddruhů <i>A. mellifera</i> .....	31
<b>4. Výsledky</b> .....	<b>32</b>
4.1. Poddruhy <i>Apis mellifera</i> .....	32
4.2. Úroveň parazitace .....	33
4.3. Virom.....	34
4.3.1. Globální parametry sekvenačních knihoven a dat.....	34
4.3.2. Shlukování dat.....	38
4.4. Viry <i>Apis mellifera</i> .....	40
4.4.1. LSV .....	45
4.4.2. DWV .....	47
<b>5. Diskuze</b> .....	<b>50</b>
<b>6. Souhrn</b> .....	<b>57</b>
<b>7. Seznam použité literatury</b> .....	<b>58</b>
<b>8. Přílohy</b> .....	<b>A</b>

## Abstrakt

Včela medonosná (*Apis mellifera*), hlavní komerční opylovač, má nezastupitelnou roli v zemědělské produkci. U *A. mellifera* bylo do dnes objeveno velké množství virů, o řadě z nich zatím není známo, zda jsou pro tento druh opylovačů patogenní. U jiných se ukazuje, že koinfekce s jinými patogeny, jako je *Varroa destructor*, mohou mít pro tento druh fatální následky. Cílem této studie bylo jednak ověřit robustnost metody vypracované v laboratoři pro detekci viromu včel a charakterizovat složení viromu u různých skupin zdravých včelstev v České republice. V neposlední řadě i analyzovat parazitaci včel dalšími patogeny a korelovat jejich přítomnost s detekovanými viry.

V této studii bylo identifikováno velké množství virových sekvencí pocházejících z nejrůznějších čeledí. Celkové složení viromu bylo nejvíce podmíněno včelstvem, ze kterého byly včely získány. Velkou váhu na tomto vztahu hrály přítomné bakteriofágy. Oproti tomu analýza jednotlivých virů, u kterých je známo že infikují včelu, naznačila, že u jednotlivců ve včelstvu bude prevalence a virová nálož různých virů odlišná. To vyvrátilo předpoklad, že při přítomnosti virové nákazy je infikovaná většina jedinců v úle. Byla také nalezena velká diverzita Lake Sinai virů. Mezi některými viry bylo možné pozorovat závislosti, buď na přítomnost jiného viru, nebo jiného nevirového patogenu. Tyto identifikované interakce je nutné dále prozkoumat a ověřit metodami umožňující kvantifikaci patogenů.

Klíčová slova:

Včela medonosná, *Apis mellifera*, virom, Deformed wing virus, Lake Sinai virus, NGS, *Varroa destructor*, *Nosema ceranae*, Česká republika

## Abstract

European honey bee (*Apis mellifera*) is major pollinator for agriculture and vital for food production. Large number of viruses infecting *A. mellifera* have been discovered over the years, but it isn't yet known if they are pathogenic for their host. However, presence of non-viral pathogens like *Varroa destructor* can greatly increase their virulence and have fatal consequences for the colony. The aim of this study was to test and verify robustness of the method for virome detection on healthy honey bees from the Czech Republic. Last but not least we aimed to detect non-viral parasites and correlate their presence with detected viruses.

We have successfully identified large number of viral sequences from different viral families. Viral composition was found to be influenced mainly by colony from where the honey bees were collected. That was mainly given by a large amount of bacteriophages in the samples. However, analysis of individual viruses, known to infect honey bee, indicated that viral prevalence and viral loads of specific viruses is quite different among individual honey bees from the same colony. Interestingly we were able to find highly diverse Lake Sinai viruses. We were able to observe correlations either between individual viruses or viral other non-viral pathogens. Further analysis is needed to confirm and explore these correlations by methods which allows for quantitative analyses of detected pathogens.

Key words:

Honey bee, *Apis mellifera*, virome, Deformed wing virus, Lake Sinai virus, NGS, *Varroa destructor*, *Nosema ceranae*, Czech Republic

## Seznam použitých zkratek

ABPV	Acute bee paralysis virus	Virus akutní paralýzy včel
AKI komplex	ABPV-KBV-IAPV	-
ALPV	<i>Aphid</i> lethal paralysis virus	Virus letální paralýzy mšic
AmFV	<i>Apis mellifera</i> filamentous virus	Filamentární virus <i>Apis mellifera</i>
BeeMLV	Bee Macula-like virus	-
BQCV	Black queen cell virus	Virus černání matečnicků
BRV	Bee/ <i>Apis</i> Rhabdovirus	-
CBPV	Chronic bee paralysis virus	Virus chronické paralýzy včel
DWV	Deformed wing virus	Virus deformovaných křídel
IAPV	Israeli acute bee paralysis virus	Izraelský virus akutní paralýzy
IRES	Internal ribosomal entry site	Vnitřní místo pro nasednutí ribozomu
KBV	Kashmir bee virus	Kašmírský včelí virus
LSV	Lake Sinai virus	-
NGS	Next generation sequencing	Sekvenování nové generace
NK	Nucleic acid	Nukleová kyselina
ORF	Open reading frame	Otevřený čtecí rámec
RdRp	RNA- dependent RNA-polymerase	RNA- dependentní RNA-polymeráza
SBV	Sacbrood virus	Virus pytlíčkovitého plodu
UTR	Untranslated region	Nepřekládaná oblast
VDV	<i>Varroa destructor</i> virus	Virus <i>Varroa destructor</i>

## Úvod

Opylovači jsou nezbytní pro produkci zemědělských plodin. Včela medonosná (*Apis mellifera*), je hlavním komerčně chovaným opylovačem. Ale pouze tento opylovač nemůže pokrýt nárůst poptávky. Navíc pro určité plodiny mohou být vhodné jiní opylovači, a tedy komerční chování jednoho druhu není dostatečné. Ukazuje se také, že jak volně žijící opylovači, tak chované včely sdílí řadu patogenů a jejich zdraví bude úzce propojeno.

Velkým problémem jsou zejména ztráty včelstev. Tyto ztráty byly pozorované již v minulosti, přičemž v některých případech byl důvod známý, v jiných nikoliv. V tomto století byl popsán ve Spojených státech syndrom zhroucení včelstev (z ang. Colony collapse disorder), kdy záhadně z kolonie zmizí dělnice (vanEngelsdorp *et al.*, 2009). Zejména v Evropě jsou sledovány především ztráty včel přes zimu, kdy kolonie nepřežije toto kritické období, kdy jsou včely nejzranitelnější (Gray *et al.*, 2019).

I když byla identifikována řada faktorů podílejících se na ztrátách, jejich výčet se liší dle metod použitých v dané studii nebo dle geografické polohy. Jedním z hlavních faktorů je roztoč *Varroa* a jeho interakce s virovými onemocněními, nebezpečná kombinace, která může být ještě znásobena přítomností jiných faktorů (pesticidy, jiné patogeny, dieta, aj.). Právě různé kombinace stresorů a jejich synergetický nebo aditivní vztah mohou být zodpovědné za aktuální ztráty včelstev. Míra těchto ztrát je často odlišná podle státu, chovatele nebo daného roku v závislosti na specifické kombinaci stresorů, kterým byla včelstva vystavena.

Studium virů je tedy důležité pro charakterizaci zdravotního stavu včelstev a jejich případné spojitosti se ztrátami, protože řada těchto virů infikujících včely může stát za úhynem včel, zejména v kombinaci s parazitací a jinými environmentálními vlivy. Ale některé viry napadající *A. mellifera* nemusí být nutně spojeny s patologií a mohly by pomocí komplexních sítí v celém mikrobiomu být dokonce prospěšné.

Vzhledem ke komplexnosti a obsáhlosti tématu není možné všechny základní informace o *A. mellifera* vložit do této diplomové práce, ale je možné je dohledat v mé bakalářské práci (Kadlečková, 2018).



# 1. Přehled literatury

## 1.1. Včely

Druh *Apis mellifera* prošel značnou ekologickou a geologickou diverzifikací, která byla provázena i morfologickými změnami. Dnes známe řadu poddruhů *A. mellifera* lišících se nejen morfologií, ale i distribucí a chováním (Ruttner, 1988). Můžeme rozlišit přinejmenším 27 morfologicky a geograficky odlišných poddruhů, které lze rozdělit do několika linií; Evropské (linie C, M), Asijské (O, Y) a Africké (A). U těchto poddruhů došlo k adaptaci na dané podmínky (teplota, vlhkost, zimování, období květu aj.), ale dnes dochází k preferenčnímu chovu pouze některých poddruhů díky jejich vlastnostem (*A. mellifera carnica* a *A. mellifera ligustica*) a to vede k vymizení původních populací (Ruttner, 1988). Přesný dopad tohoto trendu není jasný, ale existují snahy i o zachování původních populací včel (Requier *et al.*, 2019).

Jeden z poddruhů, který je velmi populární, díky jejich mírnému charakteru a schopnosti se adaptovat na různé klimatické podmínky, je *A. mellifera ligustica* (Spinola 1806). Toto plemeno linie C, přezdívané také včela italská nebo 'vlaška', je původem z Apeninského poloostrova a je dnes nejvíce rozšířeným poddruhem (Ruttner, 1988). Podobným dnes populárním poddruhem je *A. mellifera carnica* (Pollmann 1879). Stejně jako včela italská je včela kraňská řazena do C linie a pochází ze severozápadní části Slovinska (Kraňsko). Výsledkem rozsáhlého šlechtění těchto poddruhů je řada ekotypů. Často jsou udržovány a rozlišovány jejich různé chovné linie (např. Singr a Vigor). Pro podmínky střední Evropy je vhodný hlavně karpatský a alpský ekotyp (Ruttner, 1988).

*A. mellifera mellifera* (Linnaeus 1758), přezdívaná také včela tmavá (černá, severská nebo 'Nigra') náleží do M linie, a původně obývala velkou část Evropy až po Rusko a Velkou Británii. Dnes je tento poddruh velmi prokřížen s jinými poddruhy kvůli výraznému obranému chování a náchylnosti k parazitaci, a v některých zemích centrální Evropy téměř úplně vymizel (Ruttner, 1988). Existují však snahy o zachování tohoto, vůči chladu odolného, poddruhu („The B4 project“ ve Velké Británii nebo mezinárodní „SICAMM“ Societas internationalis pro conservatione *Apis melliferae melliferae*) a jsou chováni kříženci s jinými poddruhy (v České republice přezdívané zemské včely). Další populární poddruh včely je 'Buckfast' včela pocházející z Velké Británie. Tento poddruh má původ v *A. mellifera ligustica*, která byla následně křížena s řadou jiných poddruhů (*A. mellifera mellifera*, *A. mellifera cecropia*, *A. mellifera anatoliaca*, *A. mellifera sahariensis* a *A. mellifera monticola*) (Okuyama *et al.*, 2018).

Je již dlouho známo, že některé poddruhy včel mají různý stupeň rezistence k různým parazitacím. Není dosud jisté, že se tato vlastnost vztahuje i na patogeny virové, i když takové ojedinělé pozorování bylo již publikované (Ravoet *et al.*, 2015a). Vzhledem k tomu, že *Varroa destructor* ovlivňuje viry přítomné u včel, je zajímavé, že *Varroa* obsahuje řadu virů patogenních pro *A. mellifera*, i pokud parazituje na *A. cerana*, ale k infekci těmito viry nedochází (Wang *et al.*, 2019). Zajímavé je, že lze identifikovat viry přítomné u *Varroa* v závislosti na tom, na kterém druhu včel roztoč parazituje. Vztahy virů přítomných ve *Varroa* by mohly ovlivnit i to, které viry se na včelu přenesou a které nikoliv (Levin *et al.*, 2019).

### 1.1.1. Parazité

Včely 'hostí' řadu jiných organismů, které na nich parazitují. Jedny z patogenních a dlouho známých organismů jsou bakterie, které způsobují mor a hnilobu včelího plodu (*Paenibacillus larvae* a *Melissococcus plutonius*) (Forsgren *et al.*, 2018). Mikrosporidie (Houby: Microsporidia: Nosema) jsou také známé a celosvětově rozšířené patogenní organismy, pro *A. mellifera*. *Nosema ceranae*, jejímž původním hostitelem je *A. cerana* (Pasca *et al.*, 2019). Původně převládala parazitace *A. mellifera* mikrosporidii *Nosema apis*. Je také známo několik organismů ze třídy Kinetoplastida jako *Crithidia mellificae* a *Lotmaria passim*, které jsou globálně rozšířené, ale jejichž dopad na hostitele není dosud objasněný (Schwarz *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2020).

Jedním z nejdůležitějších faktorů pro ztráty včel je roztoč *Varroa destructor* (Arthropoda: Arachnida: Mesostigmata: Varroa), původní parazit *A. cerana*, který se rozšířil na *A. mellifera*. Zatímco u *A. cerana* nepůsobí velké škody, u *A. mellifera* může být parazitace včelstev bez léčebného zásahu devastující (Nazzi & Le Conte, 2016; Lin *et al.*, 2018). Dnes je tento parazit téměř celosvětově rozšířen, s výjimkou několika izolovaných územích jako Austrálie nebo Newfoundland (Wilfert *et al.*, 2016).

## 1.2. Virové infekce

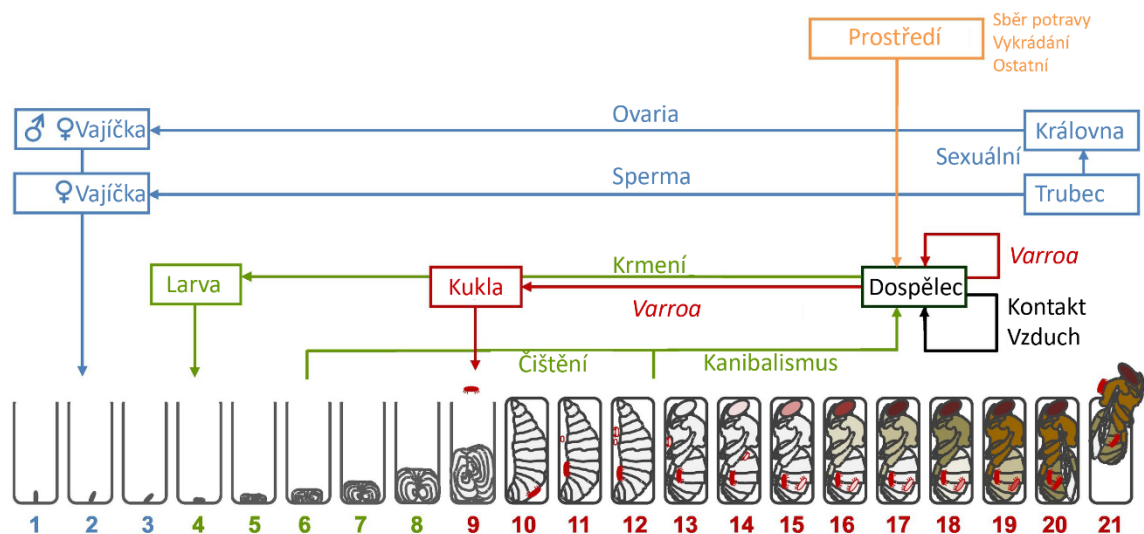
Ukazuje se, že diverzita včelích virů je obrovská. O řadě těchto virů máme pouze informace o sekvenci jejich genomu. Některé z těchto virů nalezené u včel vykazují podobnost s viry nalezenými u jiných druhů živočichů, např. dsRNA Partiti-like virus čeledi *Partitiviridae* příbuzný jiného viru stejné čeledi, který byl nedávno identifikovaný ve členovci, nebo dva ssDNA Circo-like viry podobné *Circovirum* netopyřů a vážek (Galbraith *et al.*, 2018). Byly také nalezeny viry patřící do čeledi *Rhabdoviridae* jak v *A. mellifera* tak ve *Varroa*, *Bunyaviridae* v *A. mellifera* a řada nových *Picornavirales* a jim příbuzných virů (Remnant *et al.*, 2017; Roberts *et al.*, 2018). Vzhledem k velkému množství objevených virů jsou dále podrobněji popsány pouze některé viry.

Řada virů popsaných u *A. mellifera*, které byly považovány za striktně včelí viry, byly nalezeny posléze i v řadě jiných hmyzích hostitelů (viz. Přehledová tabulka 1). Pojem včelí viry tedy zahrnuje viry, o kterých je známo že infikují *A. mellifera*, i když zatím nemusí být spojeny s patologií, a nejsou výhradně viry *A. mellifera*. Tento fenomén znesnadňuje určení původního hostitele daného viru. Zároveň byla prokázána schopnost mnoha těchto virů se replikovat v buňkách jiných druhů hostitelů. Infekce těchto hostitelů může mít odlišný průběh (Levitt *et al.*, 2013; Tapia-González *et al.*, 2019; Alger *et al.*, 2019a). Právě díky sdílení patogenů mezi chovanými včelami a volně žijícími druhy je pravděpodobné, že úroveň parazitace chovaných druhů může ovlivnit složení a přítomnost patogenů u jiných hmyzích druhů v dané oblasti (Lope *et al.*, 2019).

Ukazuje se též, že sdílené zdroje potravy jsou jedním z hlavních mechanismů, jak jsou viry mezi opylovači přenášeny. Nejenom že jsme schopni včelí viry detekovat na rostlinách (Alger *et al.*, 2019b), ale můžeme pozorovat i zvýšenou prevalenci virů v populacích volně žijících opylovačů v oblastech infikovaných včelích chovů (Alger *et al.*, 2019a). Kromě přítomnosti infikovaných včel má vliv na prevalenci virů i složení flóry v dané oblasti. Flóra může mít odlišný vliv na různé viry, ať už v důsledku antivirotického efektu metabolitů, či jen z důvodu různé ochoty virů ulpívání na rostlinách (Aurori *et al.*, 2016; Alger *et al.*, 2019b). Pěstování jednoho druhu plodin a ztráta diverzity flóry v okolí úlů tedy nemusí mít jen dopad na dietu opylovačů, ale mohla by přímo ovlivnit složení jejich virové populace. (Alger *et al.*, 2019a; Alger *et al.*, 2019b).

### 1.2.1. Specifita přenosu

Díky množství kontaktů a velké hustotě jedinců ve včelstvu je horizontální přímý přenos velmi častý, jedná se o přenos kontaktem, vzduchem, venerálně (sexuálně) a potravou (obrázek 1). Právě potrava je jedna z velmi důležitých a častých forem přenosu. Vedle sdílení potravy mezi jedinci se jedná i o krmení larev a královny. Infikovaní jedinci mohou zpracovávat pyl a nektar a infikovat tak zásoby potravy. Pokud se na přenosu podílí vektor, jedná se o přenos horizontální nepřímý. Právě proto rozšíření *Varroa*, vektoru pro mnoho včelích virů, působí problémy, protože vedle přenosu viru se přenosem viru parazitem mění i patogenita viru a charakter infekce (Gisder *et al.*, 2018). Zatímco horizontální přenos zhoršuje patogenitu i průběh, výhradně vertikální přenos z matky na potomky vede ke snížení virulence. I když je obtížné nesporně prokázat jeho existenci, předpokládá se, že řada virů využívá i této cesty pro přenos. Možnost více způsobů přenosu by mohla být pro virus výhodná. Například by v závislosti na podmínkách mohl být preferován vždy jiný způsob přenosu (Chen *et al.*, 2006; Hails *et al.*, 2008).



Obrázek 1- Přehled možných cest přenosu virů ve včelstvech. Orální cesta nákazy je jedna z nejčastějších a včely se mohou nakazit buď krmením nebo díky hygienickému chování. Modře je zvýrazněná cesta vertikálního přenosu na potomky. Roli při přenosu některých virů hraje i *Varroa* a byl pozorován přenos vzduchem nebo kontaktem. Oranžově označená možnost získat virus ze zdroje mimo včelstvo, například při sběru potravy nebo díky vykrádáním jejich zásob. Ukázáno na vývojovém stádiu dělnic. Upraveno podle (Traynor *et al.*, 2020).

### 1.2.2. Charakteristika průběhu virové infekce

U virových infekcí včel je obtížné je zařadit do tradičních kategorií užívaných pro humánní viry, jako lytická, latentní nebo perzistentní infekce. Pro zkoumání těchto virových infekcí hmyzu existuje jen málo *in vivo* a *in vitro* systémů, a není tedy ani mnoho výstupů pokusů z těchto modelových systémů. Tradičně jsou tedy u včelích virů užívány termíny otevřená a skrytá infekce (de Miranda & Genersch, 2010).

Otevřená infekce je charakterizována vysokou produkcí virových částic a přítomností příznaků infekce. Lze ji rozdělit na dvě kategorie. Otevřená akutní infekce je charakterizovaná krátkým produktivním průběhem končící vyčištěním viru nebo smrtí hostitele. Chronická infekce má podobné charakteristiky, ale přetrvává v hostiteli po dobu jeho určitého vývojového stadia nebo po celý život. Při skryté infekci nejsou oproti otevřené infekci, nejsou pozorovány zjevné symptomy onemocnění, ale i tyto infekce mohou mít dopad na hostitele. Virus je i při této formě infekce stále přítomný, má schopnost způsobit otevřenou infekci, přetrvává skrz vývojová stadia a je často přenášen vertikálně. Definice příznaků při infekci daným virem ale není jednoduchá a určení přesných hranic mezi těmito typy infekcí není snadné (Hails *et al.*, 2008; de Miranda & Genersch, 2010).

I když nepozorujeme žádné zjevné příznaky virové infekce, je možné, že tato infekce může mít vliv na mortalitu jedinců a zhroutení kolonie. Jeden z málo objasněných důsledků je vliv skryté infekce na kognici včel. Byly pozorovány například změny hygienického chování jak infikovaného jedince, tak ostatních jedinců k němu, nebo snížená schopnost se učit, což lze vysvětlit přítomností některých virů v nervovém systému (Iqbal & Mueller, 2007; Li *et al.*, 2013; Natsopoulou *et al.*, 2016). Nezávisle na replikaci viru v nervovém systému byl pozorován efekt zrychleného průchodu behaviorálním vývojem v reakci na stres vyvolaný parazitací jak virového, tak nevirového původu. Toto by mohla být adaptivní strategie včel, kdy infikovaný jedinec stráví více času mimo úl, ale zároveň by mohla skýtat výhodu pro virus ve formě jeho rozšíření mimo napadený úl (Natsopoulou *et al.*, 2016; Benaets *et al.*, 2017). Tyto vlivy mohou být závažné, protože ovlivňují nejenom jedince, ale celou kolonii. Může dojít k rozrušení rovnováhy mezi jednotlivými kastami včel a infikovaní jedinci, kromě jejich sníženého výkonu, dále šíří virus. Tato nestabilita může ovlivnit celkový zdravotní stav kolonie a její schopnost odolávat dalším stresovým faktorům (Benaets *et al.*, 2017).

Velmi zajímavá je i pozorovaná skutečnost, že vysoká koncentrace virových částic ve těle včel nemusí vyústit v otevřenou infekci, ale probíhá inaparentní nebo mezi jedinci se stejným

titrem virů mohou být velké rozdíly co do závažnosti příznaků (Remnant *et al.*, 2019). To vše nasvědčuje tomu, že přechod do otevřené infekce ovlivňuje řada faktorů.

Jedním z těchto faktorů mohou být pesticidy, které mohou ještě zhoršovat efekt jiné parazitace a podpořit namnožení virů do vysokých titrů (DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2013; Coulon *et al.*, 2018). Výsledek a průběh infekce ovlivňuje i cesta přenosu (Yue & Genersch, 2005), ale dopad stejných cest přenosu je u různých virů také odlišný (Bailey *et al.*, 1983). Ukazuje se, že i kvalitní dieta může zabránit vysoké mortalitě způsobené virovou infekcí (Dolezal *et al.*, 2019). Existují i náznaky, že průběh infekce ovlivňuje i tkáňový tropismus viru (Gisder *et al.*, 2018), a varianta infikujícího viru (např. DWV komplex kapitola 1.2.3.1). Je tedy zřejmé, že existuje velký počet faktorů, které ovlivňují průběh virové infekce a na výsledku se podílí i interakce těchto faktorů. Právě infekce *Varroa* je názorným příkladem rizikového faktoru s vícenásobným mechanismem vlivu: parazit funguje nejen jako vektor pro řadu virů, ale často i způsobí přechod infekce skryté do otevřené (viz přehledová tabulka 1.)

Tabulka 1- Přehledová tabulka významných virů včely medonosné. Interakce virů s patogeny jsou označovány jako P pozitivní a N negativní vztah, v případě *Varroa* je za interakcí určeno, jestli dochází k otevřené infekci v důsledku parazitace (P/O). Několik virů bylo nalezeno ve velkém množství u dalších hostitelů mimo *A. mellifera* a jsou proto označovány ++. Přenos vertikální cestou je obtížné prokázat a byly označeny + pokud byl nalezen virus v královně i vajíčku. Neprůkazné nebo rozporuplné informace jsou označeny ~. Citovaná verze v příloze (kap. 8).

Virus (zkratka)	Taxonomie	Genom	Přenos				Interakce			Infekce			Mimo <i>A. mellifera</i>
			Orální	Kontakt	<i>Varroa</i>	Vertikální	<i>Varroa</i>	<i>Nosema</i>	Jiné	Larva	Kukla	Dospěl.	
Deformed wing virus (DWV) komplex	Picornavirales <i>Iflaviridae</i>	+ssRNA	+	-	+	+	P/O	N	?	+/-	+/+	+/+	++
Sacbrood virus (SBV)	Picornavirales <i>Iflaviridae</i>	+ssRNA	+	-	~	+	~/-	-	?	+/+	+/-	+/-	+
Black queen cell virus (BQCV)	Picornavirales <i>Dicistroviridae</i>	+ssRNA	+	-	-	+	-/-	P	?	+/-	+/+	+/-	++
Acute bee paralysis virus (ABPV)	Picornavirales <i>Dicistroviridae</i>	+ssRNA	+	-	+	+	P/O	?	?	+/~	+/+	+/+	++
Israeli acute bee paralysis virus (IAPV)	Picornavirales <i>Dicistroviridae</i>	+ssRNA	+	-	+	+	P/O	?	?	+/~	+/+	+/+	++
Kashmir bee virus (KBV)	Picornavirales <i>Dicistroviridae</i>	+ssRNA	+	-	+	+	P/O	?	?	+/~	+/+	+/+	++
Bee Macula-like virus (BeeMLV)	Tymovirales Nezařazené	+ssRNA	?	?	+	+	?	?	?	?	?	+/?	+
Chronic bee paralysis virus (CBPV)	Nezařazené	+ssRNA segment.	+	+	~	+	-/-	P	?	+/~	+/~	+/+	+
Lake Sinai virus (LSV) komplex	Nezařazené	+ssRNA	+	?	~	+	-/-	?	?	?	?	+/?	+
<i>Apis mellifera</i> filamentous virus (AmFV)	Nezařazené	dsDNA	+	-	-	+	-/-	-	Kinetoplastida N	+/-	+/-	+/+	+
			?- neznámé ~-neprůkazné				Interakce/Otevřená infekce P-pozitivní N-negativní			Přítomnost/projev			

### 1.2.3. Picornavirales

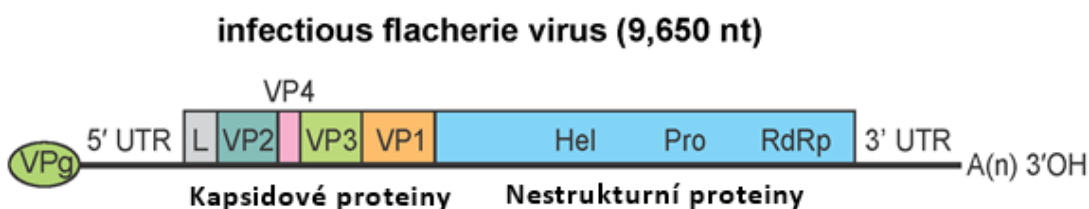
Řád Picornavirales je obsáhlý a zahrnuje šest čeledí. Viry včel se v tomto řádu nachází hlavně v čeledích *Iflaviridae* a *Dicistroviridae*. Obě čeledi obsahující hlavně viry členovců. Zatímco *Iflaviridae* má pouze jeden rod Iflavirus, čeleď *Dicistroviridae* má rody tři: Aparavirus, Cripavirus, a Triatovirus (Valles *et al.*, 2017a; Valles *et al.*, 2017b).

Kromě níže zmiňovaných, dobře známých a patogenních virů, je známa řada dalších. Například již dlouho známý člen rodu Iflavirus, Slow bee paralysis virus (Bailey & Woods, 1974), nebo nověji popsány Moku virus (Mordecai *et al.*, 2016b). U *Dicistroviridae* je to např. *Aphid lethal paralysis virus* (ALPV), který byl původně nalezen v mšicích (Runckel *et al.*, 2011). Recentně bylo také v Austrálii u včel popsáno několik nových virů patřící do řádu *Picornavirales* (např. Victoria bee virus, Renmark bee virus, Darwin bee virus a řada jejich variant) (Roberts *et al.*, 2018).

#### 1.2.3.1. *Iflaviridae*

Viry z čeledi *Iflaviridae* jsou malé neobalené viry s kapsidou ikosahedrální symetrie. Jejich genom (obrázek 2) se skládá z jednořetězcové RNA pozitivní polarity o velikosti 9-11 kb. Tyto viry mají jeden ORF (z ang. Open Reading Frame), který je přeložen do polyproteinu a ten je poté štěpený za vzniku strukturálních a nestrukturních proteinů. Na 5' konci genomu je připojen VPg protein důležitý pro replikaci a 3' konec je polyadenylován (Valles *et al.*, 2017a).

Translace začíná u řady těchto virů z IRES (z ang. Internal Ribosomal Entry Site) lokalizovaného v 5' UTR (z ang. Untranslated Region). Před kapsidovými proteiny je často kódován krátký L protein neznámé funkce, který je odstraněn od kapsidových proteinů před formováním virionu. Genom kóduje tři nestrukturní proteiny: RNA helikázu, 3C-like cysteinovou proteázu a RdRp (z ang. RNA- dependent RNA-polymerase) (Valles *et al.*, 2017a).



Obrázek 2- Struktura genomu modelového viru čeledi *Iflaviridae*  
UTR – Nepřekládaná oblast, L – Leader protein, VP – Kapsidové proteiny, Hel – Helikáza, Pro – Proteáza, RdRp – RNA dependentní RNA polymeráza. Převzato z (Valles *et al.*, 2017a).



### *DWV (Deformed wing virus) komplex*

Deformed wing virus (DWV) komplex je celosvětově rozšířený, často se vyskytující virus. Významná je jeho vazba na parazita včel *Varroa* (Chen *et al.*, 2005; Wilfert *et al.*, 2016), s nímž má téměř symbiotický vztah (Di Prisco *et al.*, 2016). Tento virus se vyskytuje v řadě přechodných variant, které momentálně dělíme na tři genotypy, DWV-A (původně popsán DWV), DWV-B (*Varroa destructor virus-1*) a naposledy popsán DWV-C (Mordecai *et al.*, 2016c). I když je DWV komplex považován za hrozbu zdraví opylovačům, tento virus sám o sobě je málo patogenní a často vyvolává skrytou nebo inaparentní infekci (Chen *et al.*, 2005). V laboratorních podmínkách, bez jiné významné parazitace, je u infikovaných včel pozorována hlavně zkrácená doba života nebo se včely vyvíjí s deformovanými křídly (Dubois *et al.*, 2020). I když je tento specifický znak infekce DWV (obrázek 3) dlouho známý, patogenezé viru je dosud neobjasněna. Předpokládá se, že viditelný projev infekce závisí na dostatečném titru viru v organismu včel (Brettell *et al.*, 2017).



Obrázek 3- Vlevo zdravá včela parazitovaná *Varroa* a vpravo včela s deformovanými křídly. Převzato z (Martin & Brettell, 2019).

Vztah genotypů DWV a typu a rozsahu ztrát včelstev není objasněný a výsledky studií jsou i do jisté míry protichůdné. Mordecai a kol. navrhli, že DWV-B by mohl mít ochranný efekt, a to zabráněním superinfekce (z ang. Superinfection exclusion). To by znamenalo, že infekce DWV-B zabraňuje replikaci více virulentních forem viru (Mordecai *et al.*, 2016a). McMahon však ukázal, že DWV-B forma by mohla v dospělých včelách naopak být více virulentní než DWV-A (McMahon *et al.*, 2016). Výsledky dalších studií ukazují, že u vyvíjejících se včel jsou oba genotypy, DWV-B a DWV-A, stejně virulentní, což by mohlo souviset s faktem, že smrt včely v buňce je pro replikaci viru slepou uličkou (Teheh *et al.*, 2019; Dubois *et al.*, 2020).

Také je možné že různé genotypy, nezávisle na stupni virulence pro jednotlivce, ovlivní zdraví kolonie v jiné míře, DWV-A by mohla vést k větším škodám na úrovni kolonie ve srovnání s DWV-B (Kevill *et al.*, 2019). Ale i varianty viru jednotlivých genotypů by mohli mít odlišnou virulenci, což by mohlo vysvětlit rozporuplné výsledky zmiňovaných studií (Posada-Florez *et al.*, 2019).

Vztah mezi genotypy je ještě složitější, protože v rámci komplexu DWV existuje řada rekombinant i mezi variantami jednotlivých genotypů, jejichž virulence není dobře prozkoumaná. Jakou roli hrají jednotlivé geny a mutace v nich, není známo. Je možné, že některé rekombinantní formy by mohly mít nižší virulenci, než jejich 'mateřské' varianty. To by mohlo vést k jejich častějšímu zastoupení v populaci, neboť infikovaný jedinec by přežíval déle a virus by se mohl jednoduše více pomnožit, ale i rozšířit (Dalmon *et al.*, 2017). Přenos viru pomocí parazita *Varroa* by do jisté míry eliminoval výhodu rekombinant s nižší virulencí a mohl by naopak vést k selekci virulentního typu, který dále po infekci hostitele diverzifikuje, aby unikl imunitním mechanismům, např. RNA interferenci. Schopnost semi-stabilní koexistence těchto diverzních variant byla prokázána (Ryabov *et al.*, 2019). I přesto, že se v některých testech se DWV-B ukazuje jako více virulentní, vysoké titry rekombinant DWV-A a DWV-B byly prokázány jako marker lepšího přežití kolonie (Barroso-Arévalo *et al.*, 2019). Tedy vliv jednotlivých genotypů DWV, variant genotypu, a jejich rekombinant je složitý a není dosud zcela objasněný.

### *SBV (Sacbrood virus)*

Dodnes bylo identifikováno přes 50 variant SBV, celosvětově rozšířeného viru, řada z nich v *A. cerana*, která je k této virové infekci citlivější než *A. mellifera* (Li *et al.*, 2019). I když je možný přenos viru mezi druhy *Apis*, varianta viru z *A. cerana* (AcSBV) má v *A. mellifera* nižší prevalenci a virulenci, a nejspíše potřebuje vyšší dávku viru pro infekci (Jin *et al.*, 2020). Míra virulence variant z *A. mellifera* (AmSBV) u *A. cerana* zatím nebyla studována. I přes nízkou prevalenci AcSBV mezi *A. mellifera* by tento druh mohl sloužit jako rezervoár viru a v budoucnu bychom mohli upravit chov těchto druhů tak, abychom zabránili devastujícímu efektu tohoto viru na populace *A. cerana* (Gong *et al.*, 2016).

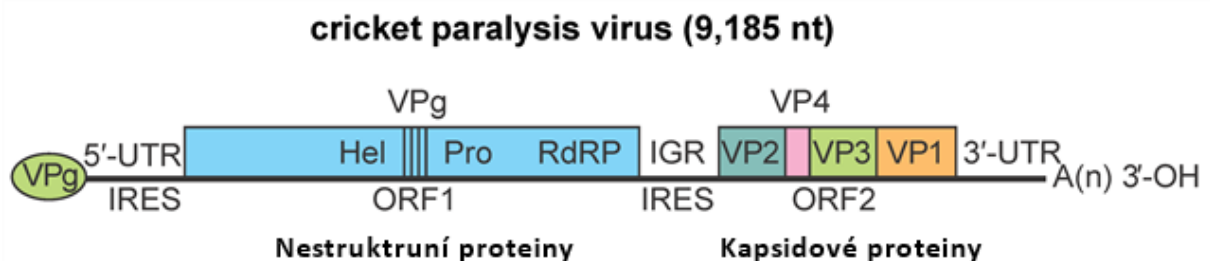
Klinický projev infekce tímto virem je viditelný u larev. Při svém vývoji se nesvléknou a ekdysoidální tekutina s milióny virových částic se hromadí mezi umírajícím jedincem a jeho pokožkou (Bailey *et al.*, 1964). Zpočátku larva změní barvu z perleťově bílé na bledě žlutou a po smrti larva uschne a zhnědne. Tento virus využívá pro přenos, kromě jiných mechanismů, aspekt chování koloniálních včel, kdy dospělí jedinci mrtvé larvy z úlu odstraňují. K viru jsou

nejcitlivější nejmladší jedinci, kteří se právě o larvy starají (Bailey, 1969) Dospělí jedinci jsou k viru poměrně rezistentní. Virus u nich můžeme najít hlavně ve žlázách, které jsou důležité pro zpracování potravy, což umožňuje nakažení larev při krmení (Bailey, 1969).

### 1.2.3.2. *Dicistroviridae*

Čeleď *Dicistroviridae* obsahuje tři rody, Aparavirus, Cripavirus, a Triatovirus, přičemž včelí viry se vyskytují ve všech třech rodech. Zatímco Black queen cell virus (BQCV) patří do rodu Triatovirus, jiné jako AKI komplex (ABPV-KBV-IAPV; ABPV- Acute bee paralysis virus, KBV-Kashmir bee virus, IAPV- Israeli acute bee paralysis virus) patří do rodu Aparavirus, do rodu Cripavirus je zařazen Aphid lethal paralysis virus (Valles *et al.*, 2017b).

Dicistroviridae jsou viry s malou kapsidou ikosahedrální symetrie (BQCV na obrázku 6). Jsou neobalené a jejich genom tvoří jednořetězcová RNA pozitivní polarity dlouhá 8-10 kb (obrázek 4). Na 5' konci genomu mají připojený VPg a 3' konec polyadenylovaný. Samotný genom není segmentovaný, ale obsahuje dva ORF (z ang. Open reading frame) oddělené krátkou mezigenovou oblastí. Translace jednotlivých ORF probíhá pomocí IRES lokalizované v 5' UTR a v mezigenové oblasti. Delší ORF kóduje nestrukturní proteiny: RNA helikázu, cysteinovou proteázu, RdRp a dle viru jednu nebo několik kopií VPg. Zatímco ORF blíže 3' konci kóduje kapsidové proteiny (Valles *et al.*, 2017b).



Obrázek 4- Struktura genomu modelového viru čeledi *Dicistroviridae*

UTR – Nepřekládaná oblast, VP – Kapsidové proteiny, Hel – Helikáza, Pro – Proteáza, RdRp – RNA dependentní RNA polymeráza, IGR – Mezigenová oblast. Převzato z (Valles *et al.*, 2017b).

#### *BQCV (Black queen cell virus)*

Tento celosvětově rozšířený a velmi často se vyskytující virus (Tentcheva *et al.*, 2004; Ellis & Munn, 2005) způsobuje u dospělých jedinců asymptomatickou infekci. V larvách a kuklách vyvolává skrytou infekci (Leat *et al.*, 2000; Benjeddou *et al.*, 2002). Při koinfekci s parazitem *N. apis* dochází ke zvýšené mortalitě včel (Bailey *et al.*, 1983). Jako otevřená infekce se tento virus projevuje u vývojových stádiích královen. U infikovaných jedinců nejprve dochází ke změně textury pokožky a její barvy na bledě žlutou. Kukla poté zhnědne nebo zčerná, stejně jako stěny komůrky (Bailey & Woods, 1977).

### *ABPV-KBV-IAPV neboli AKI komplex*

Acute bee paralysis virus (ABPV), Kashmir bee virus (KBV) a Israeli acute bee paralysis virus (IAPV) jsou příbuzné viry čeledi *Dicistroviridae*, rodu *Apavirus*, se složitým fylogenetickým vztahem (de Miranda *et al.*, 2010). Kromě jejich genetické příbuznosti sdílí i řadu jiných charakteristik. Vyskytují se celosvětově, ale prevalence jednotlivých virů patřících do tohoto komplexu je v různých geografických oblastech rozdílná (Ellis & Munn, 2005; de Miranda *et al.*, 2010). Při orálním přenosu u zdravých včel často vyvolávají skrytou infekci, ale po vstupu viru do hemolymfy včel mohou být velmi virulentní (Bailey *et al.*, 1963; Shen *et al.*, 2005). Z tohoto důvodu přenos může pomoci *Varroa*, kdy dochází k injekci viru do hemolymfy, vyústit v otevřenou infekci (Ball & Allen, 1988; Chen *et al.*, 2004; Di Prisco *et al.*, 2011). Zatímco ABPV a IAPV se projeví progresivní paralýzou spolu s tmavnutím a ztrátou ochlupení u dospělých jedinců a mortalitou u mladších vývojových stadií (L. Bailey, 1991; Maori *et al.*, 2007), otevřená infekce KBV nevyvolává specifické příznaky, ale je vysoce letální (Bailey *et al.*, 1979).

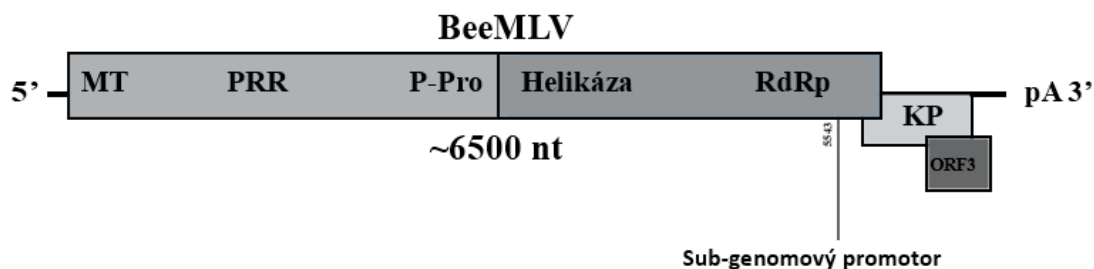
#### **1.2.4. Tymovirales**

Řád *Tymovirales* obsahuje pět čeledí: *Alpha-*, *Beta-*, *Delta-*, *Gamma-flexiviridae* a *Tymoviridae*. Tyto viry obvykle infikují rostliny, ale byly nalezeny i hmyzí viry jako BeeMLV (Bee Macula-like virus) infikující včely a *Bombyx mori* Macula-like virus infikující bource morušového (King *et al.*, 2012). Momentálně je BeeMLV řazen do čeledi *Tymoviridae*, ale dále je nezařazen, i přestože sdílí řadu charakteristik s viry rodu *Maculavirus* (de Miranda *et al.*, 2015).

##### **1.2.4.1. Tymoviridae**

###### *BeeMLV (Bee Macula-like virus)*

Bee Macula-like virus (BeeMLV; také *Varroa destructor* Macula-like virus VdMLV), virus bez zatím známé patologie, má jednořetězcový RNA genom pozitivní polarity s polyA koncem o velikosti 6500 nt. Obsahuje tři překrývající se ORF, první z nich kóduje nestrukturní proteiny: methyl-transferázu, endo-peptidázu, helikázu a RdRp, druhý ORF kóduje kapsidový protein. Z ORF umístěných na 3' konci genomu jsou proteiny překládány pomocí sub-geonomového promotoru umístěného před kapsidovým proteinem. ORF3 kóduje protein zatím neznámé funkce, ale homologní s proteiny nacházejícími se u jiných virů hmyzu čeledi *Tymoviridae* (de Miranda *et al.*, 2015).



Obrázek 5- Organizace genomu *Bee Macula-like viru*

MT – Methyl- transferáza, PRR – oblast bohatá na prolin, P-pro – Endo- peptidáza, RdRp – RNA dependentní RNA polymeráza, KP – Kapsidový protein. Upraveno podle (de Miranda et al., 2015).

### 1.2.5. Nezařazené

#### *Apis Mellifera filamentous virus (AmFV)*

Dlouho známý *Apis mellifera* filamentous virus (AmFV) je velký DNA virus. Jeho kapsida (3150 × 40 nm) je složena do tvaru připomínajícího několik osmiček a obalený virion (450 × 170 nm) má tvar krátké tyčinky (Sitaropoulou *et al.*, 1989) (obrázek 6). Cirkulární dvouřetězcový genom délky přibližně 498,5 kb má nepřekrývající se ORF rovnoměrně rozprostřené na obou vláknech, a předpokládané kódující sekvence zabírají ~65 % genomu. U těchto virů jsou přítomné orthology se zástupci čeledi *Baculoviridae*, lze u nich identifikovat sekvence podobné jiným velkým DNA virům, jako jsou *Poxviridae* nebo *Herpesviridae*, ale není možné je zařadit do žádné známé skupiny virů. Byly u nich nalezeny i geny homologní k proteinům hostitele, což naznačuje dlouhodobou koexistenci těchto virů se svým hostitelem a horizontální genový přenos (Gauthier *et al.*, 2015).

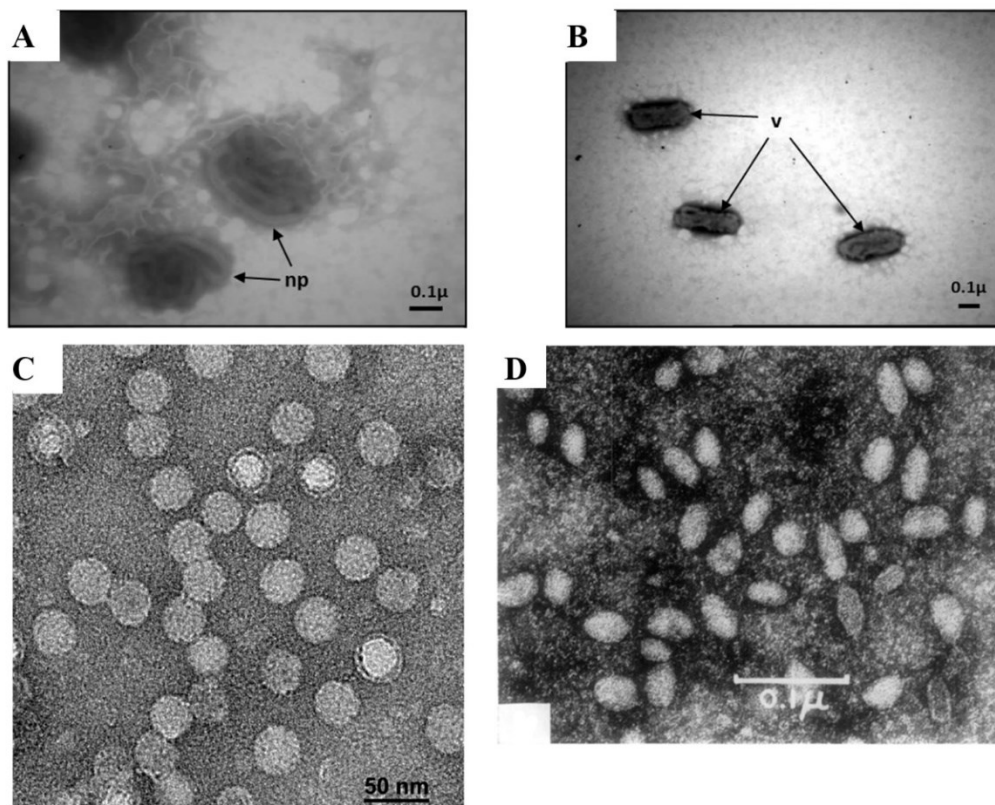
Tento virus je celosvětově rozšířený a má vysokou prevalenci (Ellis & Munn, 2005), ale není spojen s vážnou patologií u svého hostitele. Specifickým příznakem vzácné otevřené infekce je zakalená a do bíla zbarvená hemolymfa dospělců, která je způsobena přítomností velkého množství virionů a lyzí buněk. Občas je možné pozorovat oslabené včely lezoucí okolo úlu (Clark, 1978). Včely nejspíše projdou krátkodobou akutní infekcí, ale poté se produkce virionů ustálí, infekce přejde do chronicity, která nemá pro hostitele žádný viditelný dopad (Hartmann *et al.*, 2015).

#### *Chronic bee paralysis virus (CBPV)*

Chronic bee paralysis virus je celosvětově rozšířený (Ellis & Munn, 2005) neobalený RNA virus s genomem pozitivní polarit, ale oproti jiným RNA virům včel má segmentovaný genom. Kapsida je asymetrická a oválná (obrázek 6), často jsou jednotlivé viriony odlišné velikosti (Bailey *et al.*, 1968). Genom se skládá z RNA1 (~3,67 kb) a RNA2 (~2,31 kb), oba segmenty

nesou 5' čepičku, 3' konec není polyadenylován, ale předpokládá se, že je chráněn vlásenkou (Olivier *et al.*, 2008). Z předpokládaných sedmi čtecích rámců byla nalezena homologie s geny RdRp, methyltransferázy-guanyltransferázy, a dvou strukturálních proteinů (Olivier *et al.*, 2008; Kuchibhatla *et al.*, 2014; Chevin *et al.*, 2015). Tento virus je stále nezařazený, sdílí však řadu charakteristik s čeledí *Nodaviridae* a *Tombusviridae* (Olivier *et al.*, 2008), jistou příbuznost vykazují i s jinými nezařazenými viry (Lake Sinai viry a Anopheline-associated C virus).

Infekce tímto virem se u dospělých jedinců projevuje jako paralýza, kdy křídla včel a i celé včely samotné vykazují neobvyklý třes. Tito jedinci nejsou schopni letu a často je možné je nalézt ve velkém množství lezoucích okolo úlu. Tito jedinci umírají několik dní po prvním projevu příznaků. Druhý syndrom se nejdříve projevuje ztrátou ochlupení a tmavnutím. I když jsou tyto lesklí jedinci zpočátku schopni letu, jsou často napadáni ostatními členy kolonie. Během několika dní dojde i u nich k rozvoji třesu, ztrácejí schopnost letu a řádově během dní umírají. Oba syndromy se obvykle nevyskytují u včel ve stejném úlu. (L. Bailey, 1991).



Obrázek 6- Zobrazení jednotlivých virů v elektronovém mikroskopu. A a B zobrazují *Apis mellifera filamentous virus*. Obrázek A ukazuje stočení jeho nukleokapsidy uvnitř virionů B (Gauthier *et al.*, 2015). Obrázek C obsahuje kapsidu *Black queen cell viru* (Spurny *et al.*, 2017), s níž sdílí podobnost kapsidy včelích virů řádu *Picornavirales*. *Virion Chronic bee paralysis viru* je zobrazen na D (Bailey *et al.*, 1963).

### *Lake Sinai virus (LSV)*

Po objevení Lake Sinai viru-1 a 2 (Runckel *et al.*, 2011) byla nalezena řada dalších variant tohoto neobaleného RNA viru s pozitivní polaritou a ukazuje se, že i on má vysokou prevalenci a celosvětový výskyt (Daughenbaugh *et al.*, 2015; Roberts *et al.*, 2017). Zatím s ním nebyla spojena patologie u včel.

Nesegmentovaný genom kóduje tři proteiny; Orf1, protein který obsahuje doménu methyltransferázy-guanyltransferázy, RdRp a kapsidový protein (Runckel *et al.*, 2011; Ravoet *et al.*, 2015b). I když je tento virus stále taxonomicky nezařazený, vykazuje homologii s RNA1 CBPV a tyto dva viry by spolu s Anopheline-associated C virem mohly tvořit novou rodinu blízkou čeledím *Nodaviridae* a *Tombusviridae*. Avšak kapsidový protein LSV je nejbližší několika virům z čeledi *Alphatetraviridae* a mosinoviru (MoNV). I když je mosinovirus řazen do čeledi *Nodaviridae*, má unikátní kapsidový protein stejně jako LSV (Runckel *et al.*, 2011; Schuster *et al.*, 2014).

Vysoká heterogenita LSV virů je problematická a nejspíše je možné je rozdělit do 4 fylogenetických linií. Můžeme nalézt i zástupce různých linií v jednom jedinci. Fylogenetické vztahy LSV nekorespondují s geografíí hostitelů, v jednotlivých větvích fylogenetického stromu se nacházejí i izoláty z různých kontinentů (Ravoet *et al.*, 2015b; Bigot *et al.*, 2017). Tyto viry mají, ve srovnání s jinými viry včel, ve svém genomu neobvyklé složení a preferenci kodonů, což naznačuje, že jejich genom byl v blízké minulosti ovlivňován jiným hostitelem (Cornman, 2019).

## 1.3. Interakce

### 1.3.1. Virus-virus

Díky vysoké prevalenci řady včelích virů a možnosti jejich výskytu formou skryté infekce není překvapivé, že je včela často infikována více druhy virů (D'Alvise *et al.*, 2019). I když není koinfekce několika virů vzácná, o jejich interakcích a důsledcích těchto interakcí víme jen velmi málo, a to částečně i z důvodu nedostupnosti kultur včelích buněk pro *in vitro* experimenty (Guo *et al.*, 2020).

Díky vysoké příbuznosti RNA virů je pravděpodobné, že mezi nimi bude probíhat kompetice. Ta byla ukázána na jediné studii interakce virů ve včelí buněčné linii AmE- 711. Bylo možné pozorovat kompetici mezi IAPV a SBV; i když původní inokulum použité pro infekci buněčné linie obsahovalo více SBV, IAPV dosáhl při kultivaci vyšší koncentrace. Podobný efekt měl i KBV, v jehož přítomnosti v kultuře nedošlo ke zvýšení hladiny ani SBV, ani IAPV (Carrillo-Tripp *et al.*, 2016). V průběhu studie se ukázalo, že použitá buněčná linie je perzistentně infikována DWV-A, který byl schopen replikace do vysokých titrů pouze v negativních kontrolách, tedy v nepřítomnosti jiných virů. Jestli tato perzistentní infekce ovlivnila výše uvedené výsledky, není zřejmé, v přírodě je však vysoká prevalence virů DWV komplexu a jejich perzistentní infekce by neměla být vzácným jevem i mimo *in vitro* systém (Wilfert *et al.*, 2016).

V reálném světě mohou mít výše uvedené interakce virů rozdílný efekt v závislosti na vývojovém stadiu hostitele. Zatímco mezi některými viry nebyla kompetice v larvách pozorována (BQCV a SBV; CBPV a BQCV), při ustálené chronické infekci BQCV nebo SBV, nebylo možné larvu nakazit dalším virem (ABPV) (Bailey *et al.*, 1981). Naopak je možné, že by některé viry mohly mít pozitivní efekt na infekci jiným virem. Takové náznaky přinesly studie Bailey a Hartmana, které ukazují na pozitivní korelaci mezi výskytem AmFV a řadou RNA virů. Poprvé byla pozorována pozitivní korelace s BQCV (Bailey *et al.*, 1983) a později i s SBV a DWV-A (Hartmann *et al.*, 2015). Tato pozorování mohou však být vysvětlena i změnami ve výskytu studovaných virů v závislosti na období, nebo i zatím neznámými faktory.

Chronic bee paralysis satelitní virus (CBPSV) byl první popsáný satelitní virus hmyzu. Jeho genom se skládá ze tří RNA molekul stejné délky (~1100 nt). Kromě přítomnosti RNA molekul v jejich ikosahedrál ní kapsidě je možné je nalézt i v kapsidách CBPV a vykazují jistou homologii s RNA2 CBPV. V některých případech mohou být dokonce dominantní složkou CBPV virionu (Overton *et al.*, 1982).



I když je *Varroa* schopen přenosu virů a je spojen s otevřenou infekcí u řady virů, zdá se, že hraje důležitou roli hlavně pro viry DWV komplexu. Navzdory vysoké prevalenci DWV komplexu v koloniích a oblastech infikovaných *Varroa* (Mondet *et al.*, 2014) se ukazuje, že řada virů inhibuje jeho replikaci, např. BQCV a SBV (Carrillo-Tripp *et al.*, 2016; Remnant *et al.*, 2019). Výhoda DWV by mohla být způsobena zvýšenou virulencí jiných virů při přenosu vektorem. Zatímco BQCV a SBV způsobí smrt larvy v komůrce a tvoří tak slepou uličku pro parazita i virus, méně patogenní virus, který nezpůsobí smrt larvy, by mohl být selektován tímto přenosem. Tato selekce by vysvětlovala DWV predominanci v přítomnosti *Varroa*, a to i přes jejich poměrně nízkou úspěšnost při kompetici s ostatními viry (Remnant *et al.*, 2019). Pro tuto selekci méně patogenního viru svědčí i fakt, že v oblastech bez *Varroa* se DWV nevyskytuje vůbec, nebo s velmi malou četností, např. v Austrálii nebyly viry DWV komplexu ve včelách dosud nalezeny (Roberts *et al.*, 2017).

### 1.3.2. *Varroa*-virus

*Varroa* je vektor pro řadu virů, ale jestli dochází k replikaci těchto virů v roztoči, je stále diskutované téma. Vztah mezi viry DWV komplexu a *Varroa* jsou nejvíce prozkoumané díky jejich blízkému vztahu, ale předpokládá se, že alespoň některé nalezené aspekty jejich interakcí budou podobné i pro další viry.

Některé výsledky ukazují, že dochází k replikaci DWV díky nalezení jejich replikačních intermediátů ve *Varroa*, ty ale ty mohou pocházet ze včel, na kterých se *Varroa* krmí (Ongus *et al.*, 2004; Gisder *et al.*, 2009). To je podporováno faktem, že můžeme ve *Varroa* nalézt jak, viry, které se replikují jen na včelích buňkách, tak včelí DNA (Posada-Florez *et al.*, 2019). Spíše pro absenci replikace virů v buňkách *Varroa* svědčí výsledky proteomické analýzy roztoče (Erban *et al.*, 2015). Negativní vlákna (replikační intermediáty) DWV-B (ale ne DWV-A, i když byl ve *Varroa* detekován), však byla nalezena v syngangliu *Varroa*. Nedá se tedy vyloučit, že odlišné varianty DWV budou mít odlišný vztah k vektoru (Campbell *et al.*, 2016). Zároveň by replikace DWV v nervovém systému vektoru mohla vést ke změně jeho chování. Takovýto efekt byl pozorován u jiných hmyzích vektorů, ale jasně prokázán pro *Varroa* dosud není (Giuffre *et al.*, 2019).

Kromě toho, že tento roztoč přenáší řadu virů, je důležitý jeho vliv na průběh infekce. Ko-infekce *Varroa* a virů DWV komplexu často vede k přechodu ze skryté do otevřené infekce (viz přehledová tabulka 1). Jakým mechanismem dochází k tomuto přechodu, je stále nejasné, ale existuje několik teorií, které se vzájemně nevylučují.

Podstatou jedné teorie je hypotéza, že samotný přenos pomocí *Varroa* zvyšuje virulenci viru. Někteří autoři pozorovali, že parazit má vliv na samotnou diverzitu virů DWV komplexu, diverzita je zachována ve *Varroa*, ale po přenosu do hemolymfy jistá varianta získá výhodu a převládne oproti ostatním variantám. Stejnou dynamiku bylo možné pozorovat, i pokud byl virus vstříknut do hemolymfy injekcí, místo *Varroa*, a opět svědčí proti replikaci viru ve *Varroa* (Moore *et al.*, 2011; Ryabov *et al.*, 2014). Jiní autoři však poukazují na možnost, že díky testování v určitém čase byla pozorována krátkodobá expanze jedné varianty, díky její výhodě vůči RNA interferenci a varianty DWV virů se poté opět diverzifikovaly (Ryabov *et al.*, 2019). Tedy nezávisle na přesné dynamice jednotlivých variant v čase, dojde při přenosu pomocí *Varroa* k efektu hrdla lahve DWV populace a selekci určitých variant, ať už závislé na mechanickém přenosu, replikaci nebo pouze stabilitě viru ve vektoru. Právě adaptace na přenos *Varroa* by mohla být provázena zvýšenou virulencí a/nebo změnou tropismu virů (Gisder *et al.*, 2018; Ryabov *et al.*, 2019).

Imunitní systém je důležitým faktorem ovlivňujícím vývoj virové infekce, ale informace o změnách a reakcích imunitního systému na virové infekce jsou mezi různými studii rozporuplné, nejspíše díky tomu, že se liší vývojová stadia včel studovaná v jednotlivých pracích. (Yang & Cox-Foster, 2005; Kuster *et al.*, 2014). Z dosud publikovaných dat se zdá, že efekt viru a *Varroa* na imunitní systém je do jisté míry protichůdný. Jeden z hlavních aktérů imunitního systému u včel je transkripční faktor NF- $\kappa$ B. Nazzi a kol navrhovali, že při koinfekci *Varroa* spolu s DWV dojde k supresi NF- $\kappa$ B v buňkách včely (Nazzi *et al.*, 2012). Jiní autoři naopak ukázali, že *Varroa* způsobí aktivaci NF- $\kappa$ B, která převládne i v přítomnosti DWV-A, který má opačný efekt na NF- $\kappa$ B (Erban *et al.*, 2019). I když existují studie, které podporují model imunosuprese skrze snížení exprese NF- $\kappa$ B, jsou založeny hlavně na analýzách transkriptomu a nezkoumaly vliv např. na úrovni proteomu (Zhao *et al.*, 2019). Je však možné, že jak někteří autoři navrhují, že k supresi imunitního systému dojde při překročení určité prahové hodnoty virové nálože (Di Prisco *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2017).

Přizpůsobení *Varroa* svému původnímu hostiteli *A. cerana* by mohl být další důvod pro rozsáhlou replikaci viru při parazitaci *A. mellifera*. V koloniích *A. cerana* toxický protein slin *Varroa* způsobí smrt larev dělnic a smrt *Varroa* s nimi. Tato strategie vzájemného sebezničení vyústí v preferenční parazitaci trubců a nevede tak k vážným poškozením kolonií *A. cerana*. Tento protein u *A. mellifera* larvy nezabíjí, ale dojde k rozsáhlé replikaci DWV-A, která není způsobena pouze injekcí viru poraněním (Zhang & Han, 2018).

Existuje tedy více teorií, často i díky protichůdným výsledkům, jak *Varroa* spolu s DWV způsobují vysoké u škody včel. Byla vytvořena i teorie na základě ekologického modelu, kdy, pokud jsou kořist (virus) a predátor (složky imunitního systému včely) neustále odebírány ze systému tak kořist prosperuje. Při parazitaci *Varroa* dojde krmením k odběru jak samotného viru, tak imunitních složek, což destabilizuje rovnováhu mezi nimi. Je tedy možné, že přechod do otevřené infekce a replikace viru do vysokých titrů nemusí záviset na specifických vlastnostech účastníků, ale pouze na chování jednotlivých složek systému v podmínkách, které virus-parazit vytvoří (Annoscia *et al.*, 2019).

### 1.3.3. Ostatní patogeny– virus

Díky úzkému vztahu mezi řadou virů a parazitací *Varroa* není překvapivé, že snaha porozumět této interakci je prioritou. Na ztrátách včel se ale podílí celá řada patogenů a komplexní sítě mezi nimi jsou dosud málo prozkoumané. Další ze zkoumaných interakcí jsou vztahy některých virů a patogeny *N. apis* a *ceranae*. Kromě vztahů virů s *Nosema spp* a *Varroa* byl pozorován i negativní vztah AmFV s *C. melliferae* a *L. passim*. V jejich přítomnosti byly zaznamenány nižší titry těchto virů u včel (Hartmann *et al.*, 2015).

Přítomnost *N. ceranae* má vliv na průběh infekce CBPV a zvyšuje mortalitu včel, ale míra této interakce je zřejmě závislá i na způsobu přenosu CBPV (Toplak *et al.*, 2013). Kromě CBPV bylo ukázáno, že přítomnost *N. apis*, spolu s BQCV, způsobuje zvýšenou mortalitu včel díky replikaci viru do vysokých titrů při koinfekci (Bailey *et al.*, 1983). Stejný efekt byl pozorován při koinfekci s *N. ceranae* (Doublet *et al.*, 2015a). Koinfekce DWV-A spolu s *N. ceranae* nemá synergetický efekt na mortalitu včel a nejspíše mezi nimi existuje negativní interakce. Po ustálení infekce *N. ceranae* nedosahoval DWV-A tak vysokých titrů jako bez koinfekce, ale naopak virus *N. ceranae* neovlivnil (Doublet *et al.*, 2015b). Další z možných interakcí je vztah *Nosema* a AmFV. I když bylo pozorováno, že infekce *N. apis* zvyšovala infektivitu viru pro jedince (Bailey *et al.*, 1983), později nebyl pozorován žádný vztah mezi AmFV a *N. spp* (Hartmann *et al.*, 2015).

### 1.3.4. Viry parazitů

Další důležitou složkou této sítě interakcí budou pravděpodobně i viry parazitů. V posledních několika letech byly provedeny studie, které cílily na objevení virů, jež se nacházely pouze ve *Varroa*. Řada takto objevených virů byla později nalezena i v neparazitovaných včelách a jejich hostitele tedy nebylo možné jednoznačně určit.

Existuje řada virů, o kterých se předpokládá, že *Varroa* je jejich hostitel. VDV-2 (z ang. *Varroa destructor virus-2*) z rodu Iflavirus a VDV-3, nejvíce podobný zatím nezařazeným virům jako *Ixodes scapularis* associated virus 1,2 a některým virům *Drosophila* (Levin *et al.*, 2016). Velkou příbuznost s VDV-3 má VDV-5, recentně objevený také výhradně ve *Varroa* (Herrero *et al.*, 2019).

Další z možných virů *Varroa* je *Varroa* Thymo-like virus patřící do *Tymoviridae* a příbuzný BeeMLV (de Miranda *et al.*, 2015). Nedávno objevený Rhabdovirus BRV-1 (Bee Rhabdovirus 1, také *Apis* Rhabdovirus 1) se nachází jak ve *Varroa*, tak ve včelách (Remnant *et al.*, 2017). Stejně tak nový virus *Varroa* Orthomyxovirus-1, nejvíce homologní s Orthomyxoviry Thogoto a Dhori, je možné najít jak ve *Varroa*, tak ve včelách (Levin *et al.*, 2019).

Oproti *Varroa*, nebyly viry ostatních parazitů dodnes prozkoumány. Jeden z kandidátních virů je *Apis mellifera* bunyavirus 1, který by mohl infikovat kinetoplastida, které infikují *Apis mellifera*. Remnant a kol. tak usuzují na základě jeho podobnosti s virem infikujícím kinetoplastida, která také parazitují v hmyzím hostiteli (Remnant *et al.*, 2017). Přehled těchto virů je uvedený v tabulce 2.

Tabulka 2- Přehled známých a možných virů parazitů *A. mellifera*. Taxonomie uvádí řád a čeleď, v případě nezařazení jsou označeny ?.

Virus	Zkratka	Genom	Taxonomie	Hostitel
<i>Varroa destructor virus-2</i>	VDV-2	+ssRNA	<i>Picornaviridae</i> ; Iflavirus	<i>Varroa</i>
<i>Varroa destructor virus-3</i>	VDV-3	+ssRNA	?	<i>Varroa</i>
<i>Varroa destructor virus-5</i>	VDV-5	+ssRNA	<i>Picornaviridae</i> ; Iflavirus	<i>Varroa</i>
<i>Varroa</i> Thymo-like virus	VTVL	+ssRNA	<i>Tymoviridae</i> ; ?	<i>Varroa</i>
Bee ( <i>Apis</i> ) Rhabdovirus-1	BRV-1	-ssRNA	<i>Rhabdoviridae</i> ; ?	<i>Varroa</i> ?; <b><i>A. mellifera</i></b>
<i>Varroa</i> Orthomyxovirus-1	VOV-1	-ssRNA	<i>Orthomyxoviridae</i> ; ?	<i>Varroa</i> ?; <i>A. mellifera</i> ?
<i>Apis mellifera</i> bunyavirus 1	ABV-1	-ssRNA	<i>Bunyaviridae</i> ; ?	<i>C. mellifica</i> ?; <i>L. passim</i> ?

## 2. Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo ověřit robustnost použité metodiky pro charakterizaci viromu. Následně charakterizovat virom, s důrazem na viry infikující *Apis mellifera*, pocházející z různých druhů včelstev získaných v České republice. Určit případné změny ve viromu v závislosti na přítomnosti dalších patogenů.

Dílčí cíle práce jsou následující:

1. Získat co nejvíce diverzní a obsáhlé virové sekvence z různých populací *A. mellifera*.
2. Otestovat přítomnost nevirových patogenů, a určit tedy stupeň parazitace ve sledovaných populacích.
3. Porovnat stálost a homogenitu viromu v jednotlivých biologických triplikátech.
4. Prozkoumat závislosti viromu u *A. mellifera* na různých faktorech (např. lokalita a léčba proti *Varroa*).
5. Charakterizovat přítomné viry infikující včely.
6. Identifikovat možné vztahy mezi viry infikujícími včelu a jejich závislost na parazitaci.

### 3. Materiál a metody

#### 3.1. Původ vzorků

Včely byly získány oklepem z plodového plástu do plastového pytle, který byl umístěn do polyesterové krabice se suchým ledem. Vzorky byly poté uchovávány v -80 °C. Včely, které byly poskytnuty do studie, nevykazovaly příznaky žádného známého onemocnění, a to ani virového, ani nevirového původu, a byly tedy považovány za zdravé. Spolu se vzorky včel nám byly poskytnuty informace o datu a lokalitě sběru, poddruhu včel (v některých případech určeny nejenom k poddruhu ale až k chovné linii) a léčbě proti *Varroa*, které jsou shrnuty v tabulce 3.

Tabulka 3- Stručné informace o původu vzorků. U místa odběru a léčby jsou v závorce uvedeny kategorie na které byly rozděleny při zpracování (viz. 4.3.2.), stejně tak jaké poddruhy včel byly považovány za hybridy.

Včelstvo	Datum	Místo odběru	Poddruh včel	Léčba proti <i>Varroa</i> 2019/2018
1	08.08.2018	Ústí nad Labem Brná (S)	F1 Buckfast	Varidol (Varidol)
2	20.08.2018	Prášíly na Šumavě (JZ)	Hybrid <i>A. m. mellifera</i> x <i>A. m. carnica</i> (hybrid)	Kyselina šťavelová/ Kyselina mravenčí (OK)
3	20.08.2018	Prášíly na Šumavě (JZ)	<i>A. m. carnica</i>	Kyselina šťavelová/ Kyselina mravenčí (OA)
4	20.08.2018	Prášíly na Šumavě (JZ)	F1 Buckfast	Kyselina šťavelová/ Kyselina mravenčí (OK)
5	20.08.2018	Strakonice (JZ)	F2 Buckfast	Varidol (Varidol)
6	26.08.2018	Petrušov u Moravské Třebové, úl 625 (SV)	<i>A. m. carnica</i> ; Karpatský ekotyp – Vigor	Kyselina šťavelová (OK)
7	26.08.2018	Petrušov u Moravské Třebové, úl 656 (SV)	<i>A. m. carnica</i> ; Karpatský ekotyp – Vigor	Kyselina šťavelová (OK)
8	27.08.2018	Slezsko (SV)	Hybrid <i>A. m. mellifera</i> (hybrid)	Kyselina šťavelová (OK)
9	28.09.2018	Brumov-Bylnice (JV)	<i>A. m. carnica</i> ; Karpatský ekotyp – Vigor	Bez léčení/ Bez léčení (NL)
10	29.09.2018	Poysdorf, úl 117 (JV)	<i>A. m. carnica</i> ; Alpský ekotyp – Sklenár	Sublimace/ Izolátor+ sublimace kyselinou mravenčí (OK)
11	29.09.2018	Poysdorf, úl 108 (JV)	<i>A. m. carnica</i> ; Alpský ekotyp – Sklenár	Sublimace/ Izolátor+ sublimace kyselinou mravenčí (OK)
12	29.09.2018	Ivančice (JV)	<i>A. m. carnica</i> ; Alpský ekotyp – Singr	Kyselina šťavelová (OK)
13	29.09.2018	Lhotka u Telče (JV)	<i>A. m. carnica</i> ; Alpský ekotyp – Havlín	Kyselina šťavelová/ Kyselina mravenčí (OK)

## 3.2. Studium viromu

Vzorky pro virom byly připravovány podle NetoVIR protokolu (Novel enrichment technique of VIRomes) (Conceição-Neto *et al.*, 2015). Veškerá práce byla prováděna v místnostech oddělených pro práci s pre-PCR materiálem a post PCR. Reakce byly připraveny v UV boxech a pro pipetování byly používány špičky s filtry pro zabránění kontaminace. Pro ředění a míchání roztoků byla používána voda bez nukleáz (HyClone™), která je dále označována pouze jako voda.

Před přípravou knihoven byly včely spočítány na suchém ledu, byli odstraněni jedinci, kteří byli extrémně morfologicky odlišní od zbytku populace, a bylo určeno množství odpadlých *Varroa*. Z každého včelstva byly připraveny tři knihovny, a tedy i izolace DNA a RNA (označovány jako série A-C).

### 3.2.1. Příprava vzorků pro NGS

#### 3.2.1.1. Homogenizace

Včely jsem vyjmula z mrazáku a uchovávala po celou dobu na ledu, abych zabránila rozmrznutí. Devět celých včel jsem sterilní pinzetou vložila po třech do 2ml zkumavek (Bertin Technologies) s 2,8mm keramickým kuličkami (oxid zirkoničitý). Do každé zkumavky jsem přidala 1 ml 1× PBS a vzorky jsem homogenizovala v MINILYS homogenizátoru (Bertin Technologies) po dobu 5 minut při rychlosti 3 000rpm (rychlost 1).

Zhomogenizované vzorky jsem centrifugovala po dobu 3 minut při 17 000xg, ze vzorku jsem odebrala 400 µl supernatantu pro filtraci. Na 0,8 PES (Sartorius Vivaclear Mini) filtry jsem přidala 400 µl supernatantu a zkumavky poté centrifugovala 3 minuty při 17 000xg. Přefiltrovaný supernatant ze tří zkumavek jsem spojila do jedné zkumavky a použila pro přípravu knihovny. Jeden vzorek pro přípravu knihovny tedy pochází z 9 včel.

K peletu/včelám po homogenizaci jsem přidala 0,6 ml TRIzol (poměr 1:1) a vzorek byl znovu homogenizován po dobu 4 minut při rychlosti 5 000rpm (rychlost 3), aby došlo ke kompletní homogenizaci včel. Z takto připraveného vzorku jsem izolovala RNA a DNA viz kapitola 3.3.1.

#### 3.2.1.2. Ošetření nukleázami

Přefiltrovaný supernatant z včel jsem promíchala a 260 µl jsem použila pro ošetření nukleázami. V tomto kroku byly odstraněny neviróvé NK, zatímco viróvé NK byly stále chráněny v kapsidě. Reakce se skládala z 14 µl 20× pufru (1M Tris, 100mM CaCl<sub>2</sub> a 30mM MgCl<sub>2</sub>,

pH=8), 116 U benzonázy (BioLabs), 400 U mikrokokální nukleázy (BioLabs) a 260 µl vzorku. Reakci jsem dvě hodiny inkubovala ve vyhřívacím bloku při 37 °C.

### **3.2.1.3. Extrakce NK**

Virové NK byly izolovány pomocí QIAamp® Viral RNA Mini kitu (Qiagen). Celý objem předchozí reakce (280 µl) jsem smíchala s 1 120 µl AVL pufru, směs jsem promíchala a inkubovala při pokojové teplotě 10 minut. Po krátkém stočení na centrifuze jsem přidala 1 120 µl etanolu a vzorek znovu promíchala. Tento roztok jsem poté přenesla na kolonku po 630 µl a centrifugovala 1 minutu při 6 000xg. Ze sběrné zkumavky jsem odstranila tekutinu. Na kolonku jsem přidala dalších 630 µl vzorku a kolonku centrifugovala. Tento krok jsem opakovala do zpracování celého objemu vzorku.

Na kolonku se zachycenými NK jsem poté přidala 500 µl AW1 pufru a kolonku centrifugovala po dobu 1 minuty při 6 000xg. Po výměně sběrné zkumavky jsem přidala 500 µl AW2 pufru. Nejdříve jsem kolonku centrifugovala 3 minuty při 20 000xg, po výměně zkumavky jsem kolonku opět centrifugovala 1 minutu při 20 000xg pro úplné odstranění AW2 pufru. Kolonku jsem poté umístila do 1,5ml zkumavky a přímo na membránu přidala 60 µl AVE pufru. Inkubace 1 minutu umožnila uvolnění NK zachycených na membráně a kolonku jsem centrifugovala 1 minutu při 6 000xg.

### **3.2.1.4. Amplifikace**

Amplifikace NK byla provedena pomocí upraveného protokolu WTA2 kitu (Complete Whole Transcriptome Amplification kit od Sigma Aldrich). Smíchala jsem 2,82 µl vzorku z předchozího kroku a 0,5 µl roztoku Library Synthesis Solution a inkubovala po dobu 2 minut při 95 °C a poté ochladila na 18 °C. Ke směsi jsem přidala 0,78 µl vody, 0,5µl Library Synthesis Solution a 0,4 µl Library Synthesis Enzyme. Reakce probíhala v přístroji GeneAmp® PCR system 9700 (Thermo Fisher Scientific) za těchto podmínek: 10 minut 18 °C, 10 minut 25 °C, 30 minut 37 °C, 10 minut 42 °C, 20 minut 70 °C, 4 °C do dalšího kroku. Po stočení jsem přidala 7,5 µl Amplification mix, 60,2 µl vody, 1,5 µl WTA dNTP mixu a 0,75 µl Amplification Enzyme. Reakci jsem opět opatrně promíchala a pokračovala v GeneAmp® PCR system 9700 za těchto podmínek: 2 minuty 94 °C, 30 sekund 94 °C, 5 minut 70 °C, krok 2. a 3. byl opakován 17×.

Amplifikované produkty jsem přečistila pomocí MSB® SPIN PCRPACE (Stratec) podle doporučení výrobce a jejich koncentraci zjistila pomocí Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher) na přístroji Qubit Fluorometer 2.0 s nastavením dsDNA High Sensitivity podle firmního protokolu.



### 3.2.1.5. Příprava amplikonů pro sekvenaci

Vzorky po WTA2 amplifikaci jsem naředila vodou na koncentraci 1,2 ng/μl. Z takto standardizovaných vzorků DNA byly připraveny sekvenační knihovny pomocí Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina). Jako negativní kontrola byla použita voda, která prošla WTA2 amplifikací a byla 'naředěna' vodou, která byla používána pro ředění ostatních vzorků.

Do 0,2ml zkumavky jsem smíchala 5 μl Tagment Buffer, 2,5 μl Amplicon tagment mix a 2,5 μl DNA. Směs jsem krátce stočila v mikrocentrifuze a inkubovala v termocykleru GenePro™ (Bioer Co.) po dobu 4 minut při 55 °C. Fragmentovaný vzorek jsem ochladila na 10 °C a okamžitě přidala 2,5 μl Neutralize Tagment Bufferu pro zastavení tagmentace. Vzorek jsem řádně promíchala, stočila mikrocentrifugou a inkubovala 5 minut při pokojové teplotě.

Ke každému vzorku jsem přidala různou sadu indexů, která ho odlišovala od ostatních (viz tabulka 4).

Tabulka 4- Seznam použitých indexů

Série	Indexy		Série	Indexy		Série	Indexy		Negat. kontrola	Indexy	
A	N7xx	S5xx	B	N7xx	S5xx	C	N7xx	S5xx		N7xx	S5xx
1	N701	S504	1	N719	S517	1	N706	S504	NK	N705	S516
2	N705	S502	2	N720	S518	2	N704	S517			
3	N706	S502	3	N703	S502	3	N505	S517			
4	N723	S522	4	N721	S520	4	N722	S521			
5	N716	S515	5	N702	S517	5	N706	S513			
6	N718	S516	6	N706	S503	6	N724	S502			
7	N702	S504	7	N704	S502	7	N726	S503			
8	N703	S504	8	N703	S517	8	N724	S513			
9	N701	S502	9	N701	S503	9	N728	S515			
10	N705	S503	10	N702	S503	10	N729	S516			
11	N704	S504	11	N703	S503	11	N701	S513			
12	N702	S502	12	N704	S503	12	N706	S157			
13	N701	S517	13	N705	S504	13	N702	S515			

Reakce se tedy skládala z 12,5 μl předchozí směsi s tagmentovanou DNA, 2,5 μl Primeru 1 (i7, N7xx), 2,5 μl Primeru 2 (i5, S5xx) a 7,5 μl Nextera PCR master mix. Po stočení v mikrocentrifuze reakce probíhala v GenePro™ termocykleru za podmínek: 3 minuty při 72 °C, 30 sekund při 95 °C, 10 sekund při 95 °C, 30 sekund při 55 °C, 45 sekund při 72 °C, krok 3-5 byl opakován 15×, po ukončení amplifikace byla reakce ochlazena na 4 °C.

### 3.2.1.6. Purifikace

K 25 μl PCR produktu po přípravě knihovny jsem přidala 15 μl AMPure XP magnetických kuliček (Beckman Coulter) a směs promíchala pipetováním. Inkubace po dobu 5 minut při

pokožové teplotě umožnila vazbu DNA na kuličky a vzorek jsem poté umístila do magnetického stojánu (NGS MagSlide™ Mini), kde se kuličky s navázanou DNA přesunuly na stěnu zkumavky nejbližší k magnetům. Čirý supernatant jsem poté opatrně odebrala a do zkumavky jsem přidala 200  $\mu$ l čerstvě namíchaného 80% etanolu. Po krátké inkubaci, se zkumavkou stále v magnetickém stojánu, jsem supernatant odstranila a postup promytí etanolem opakovala. Po druhém promytí etanolem jsem opatrně odstranila všechny zbytky etanolu a inkubovala vzorek při pokojové teplotě pro odstranění zbytkového etanolu.

Po dostatečném vysušení jsem přidala 26,25  $\mu$ l 10mM Tris-HCl (pH=8) a po odstranění zkumavky z magnetického stojánu jsem kuličky resuspendovala pipetou. Inkubovala jsem vzorek při pokojové teplotě 2 minuty pro uvolnění DNA z kuliček. Po této inkubaci jsem zkumavku opět vložila do magnetického stojánu a inkubovala 2 minuty. Opatrně jsem odebrala 25  $\mu$ l supernatantu bez příměsí kuliček do nové zkumavky.

#### **3.2.1.7. Kvantifikace a kontrola kvality knihovny**

Pro každý vzorek jsem stanovila koncentraci pomocí Qubit™ dsDNA HS Assay Kit. Samotná kvalita jednotlivých knihoven byla zobrazena pomocí High Sensitivity DNA Assay v 2100 Bioanalyzeru podle firemního protokolu v Laboratoři sekvenace DNA na PřF UK (BI-OCEV, Průmyslová 595, Vestec). Ve stejné laboratoři byly vzorky kvantifikovány pomocí qPCR. V případě nedostatečné kvality knihovny jsem postup po WTA2 amplifikaci zopakovala.

#### **3.2.1.8. Sekvence nové generace**

Vzhledem k tomu, že ne všechny vzorky dosahovaly koncentrace alespoň 4nM, byly oproti původnímu protokolu naředěny na 2nM. Podle firemního protokolu je možné použít poloviční koncentraci bez ovlivnění kvality výsledků. Vzorky byly poté spojeny a sekvenace byla provedena na přístroji HiSeq2000 (Illumina) v KU Leuven Genomics Core, Belgie.

### **3.2.2. Bioinformatické zpracování**

Kvalita dat před a po ořezu sekvencí (z angl. trimming) byla zkontrolována pomocí FastQC (Babraham bioinformatics, v0.11.9), který informuje o kvalitě samotných dat. Pro odstranění adaptérů po amplifikaci pomocí kitu Nextera a WTA2, byl použit program Trimmomatic v0.39 (Bolger *et al.*, 2014), kromě adaptérů byly odstraněny další sekvence a báze (slidingwindow: 4, 20; leading: 19; trailing: 15; minlen: 50). Jednotlivé sekvence byly poté složeny pomocí SPAdes v3.14.1 s metagenomickým nastavením a použitím několika délek k-merů: 21, 33, 55 a 77 (Bankevich *et al.*, 2012; Nurk *et al.*, 2017). DIAMOND v2.0.1 byl použit pro zarovnání (z angl.

alignment) složených sekvencí proti non-redundantní proteinové databázi (NCBI) (Buchfink *et al.*, 2015), které byly poté anotovány pomocí Kronatools v2.0 (Ondov *et al.*, 2011).

Pomocí ClusterGenomes v3 (<https://bitbucket.org/MAVERICLab/docker-clustergenomes/src/master/>) byly sloučeny sekvence větší než 500pb s identitou minimálně 95 % a pokrytím 80 %. Tyto sekvence byly namapované zpět na virové sekvence pomocí BWA-MEM (Li, 2013) a využity pro BamM v3.0 (<https://github.com/Ecogenomics/BamM>), kde byly zarovnané sekvence filtrovány (95 % identity přes 90 % délky) a z nich bylo poté určeno pokrytí spolu s tpmean, což je korekce na extrémně nízké a vysoké pokrytí oblastí daného segmentu sekvenčními čteními (z angl. read). Z non-redundantních sekvencí byla také vytvořena virová klasifikace.

NGS data byla paralelně analyzována metodou cílenou na známé viry *A. mellifera*. Sekvence reprezentativních zástupců všech doposud popsaných skupin včelích virů (leden 2020) byly staženy z databáze Genbank a spojeny do jedné směsné referenční sekvence. Na tuto referenční sekvenci byly mapovány sekvenční čtení (mapovací software Geneious, max. sekvenční divergence 20 %). U virů s kompletním pokrytím byly extrahovány sloučené sekvence (jedna/druh viru) a na ty znovu mapovány sekvenční čtení stejným způsobem. Takto získané sekvence jsem porovnávala pomocí blastn proti nukleotidové databázi (NCBI).

Pokud bylo možné z jednotlivých vzorků získat kompletní virové sekvence a jejich množství přes celou sadu dat přesahovalo 10 unikátních sekvencí viru, získala jsem pro tyto viry sady reprezentativních sekvencí z databáze Genbank, zahrnující jak nejbližší příbuzné, tak vzdálenější homologní sekvence. V BioEdit jsem vytvořila alignment pomocí ClustalW. Samotný fylogenetický strom jsem vytvořila v MrBayes v3.2.7 (Ronquist *et al.*, 2012) (GTR+I+ $\Gamma$ , nst 6, generace  $10^6$ ), FigTree v1.4.4 (<https://github.com/rambaut/figtree/releases/tag/v1.4.4>) a MEGA-X metodou maximální pravděpodobnosti (bootstrap 1 000) (Kumar *et al.*, 2018).

Statistické testování korelace viromu s metadaty jsem zpracovala v R (R v4.0.2) pomocí adonis testu (permutace 10 000) implementovaného ve vegan balíčku (Oksanen *et al.*, 2019) a shlukování podle PCoA (Bray-Curtis) v ape balíčku (Paradis & Schliep, 2019). Teplotní mapy (z angl. heatmap) jsem vytvořila v R pomocí Heatmaply (Galili *et al.*, 2018), grafy v R, a výstup množství poměrného množství čtení u čeledí byl vytvořen v programovém prostředí Python.

### 3.3. Přítomnost patogenů a charakterizace poddruhu včel

#### 3.3.1. Izolace totální DNA/ RNA

Vzorek homogenizovaných včel TRIzolom (viz kapitola 3.3.1.1) jsem centrifugovala 5 minut při 12 000xg pro odstranění zbytku kompletně nezhomogenizované tkáně, supernatant jsem přenesla do nové zkumavky a inkubovala při pokojové teplotě 5 minut pro rozrušení nukleo-proteinových komplexů. K roztoku jsem přidala 120  $\mu$ l chloroformu a směs jsem řádně promíchala a po 3minutové inkubaci centrifugovala 15 minut při 12 000xg. Výsledný vzorek měl řádně oddělené fáze

##### *Izolace RNA*

Vodnou fázi s RNA jsem pipetou odebrala a k ní přidala 500  $\mu$ l isopropanolu. Roztok jsem promíchala, inkubovala 10 minut při pokojové teplotě a centrifugovala 10 minut při 12 000xg. Po odstranění supernatantu jsem k peletu přidala 600  $\mu$ l 75 % etanolu, vzorek promíchala a centrifugovala 5 minut při 7 500xg. Supernatant jsem odstranila a pelet nechala schnout v otevřené zkumavce do odpaření zbytků etanolu. Pelet jsem poté resuspendovala v 50  $\mu$ l vody a inkubovala 10 minut při 55 °C pro úplné rozpuštění RNA. Kvalitu a koncentraci izolované RNA jsem určila podle absorbance při 260 nm, a poměrů absorbancí v různých vlnových délkách (260/280, 260/230) změřených přístrojem Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) dle návodu výrobce.

##### *Izolace DNA*

Po odebrání posledních zbytků vodné fáze jsem pro zabránění kontaminace RNA přidala ke zbývajícím fázím 180  $\mu$ l 100 % etanolu. Roztok jsem jemně promíchala a po krátké inkubaci (2-3 minuty) centrifugovala 5 minut při 2 000xg. Supernatant jsem odstranila.

K peletu DNA jsem přidala 600  $\mu$ l 0,1M citrátu sodného v 10 % etanolu a inkubovala 30 minut při pokojové teplotě. Po centrifugaci 5 minut při 2 000xg jsem supernatant odstranila a krok propláchnutí peletu roztokem citrátu sodného opakovala. Následně jsem k peletu přidala 1000  $\mu$ l 75 % etanolu a inkubovala 15 minut při pokojové teplotě, občasně jemně promíchala. Vzorek jsem centrifugovala 5 minut při 2 000xg a supernatant jsem odstranila, a pelet nechala vysušit v otevřené zkumavce. Pelet jsem resuspendovala v 300  $\mu$ l 8mM NaOH pomocí pipety a centrifugovala 10 minut při 12 000xg pro odstranění nerozpustného materiálu. Supernatant jsem poté přenesla do nové zkumavky. Koncentraci a kvalitu DNA jsem určila pomocí přístroje Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) podle návodu výrobce.

### 3.3.2. Detekce nevirových patogenů pomocí PCR

Přítomnost patogenů jsem testovala pomocí PCR se specifickými primery. Pro kontrolu izolace byl použit  $\beta$  aktin *Apis mellifera*. Sledovala jsem přítomnost bakterií *Melissococcus plutonius* a *Paenibacillus larvae*; hub *Nosema ceranae* a *apis*; Kinetoplastid *Crithidia mellificae* a *Lotmaria passim*; a roztoče *Varroa destructor*. Seznam používaných primerů spolu s jejich cílovými geny viz. tabulka 5.

Tabulka 5- Přehled primerů použitých pro detekci nevirových patogenů a taxonomii. (COI-II – Cytochrom oxidáza podjednotka I a II, COX- Cyklooxygenáza, SL- spliced-leader, rRNA- ribozomální RNA; \* velikost variabilní)

Organismus	Cílený gen	Sekvence 5' -> 3'	Velikost [pb]	Citace
<i>Apis mellifera</i>	$\beta$ aktin	CCT GGA ATC GCA GAT AGA ATG C AAG AAT TGA CCC ACC AAT CCA TAC	120	(Highfield <i>et al.</i> , 2009)
Taxonomie <i>A. mellifera</i>	COI-COII	GGC AGA ATA AGT GCA TTG CAA TAT CAT TGA TGA CC	*	(Garnery <i>et al.</i> , 1992; Garnery <i>et al.</i> , 1993)
<i>Varroa destructor</i>	COX1	GGR GGW GAY CCW ATT YTW TAT CAA C CCT GTW AWA ATA GCA AAT AC	458	(Anderson & Fuchs, 1998)
Kinetoplastida	SL	GGG AAG CTT CTG TAC TWT ATT GGT A GGG AAT TCA ATA WAG TAC AGA AAC TG	*	(Westenberger <i>et al.</i> , 2004)
<i>Melissococcus plutonius</i>	16S rRNA	GAA GAG GAG TTA AAA GGC GC TTA TCT CTA AGG CGT TCA AAG G	831	(Govan <i>et al.</i> , 1998)
<i>Paenibacillus larvae</i>	16S RNA	CTT GTG TTT CTT TCG GGA GAC GCC A TCT TAG AGT GCC CAC CTC TGC G	1106	(Dobbelaere <i>et al.</i> , 2001)
<i>Nosema ceranae</i>	16S RNA	CGG CGA CGA TGT GAT ATG AAA ATA TTA A CCC GGT CAT TCT CAA ACA AAA AAC CG	218-219	(Martín-Hernández <i>et al.</i> , 2007)
<i>Nosema apis</i>	16S RNA	GGG GGC ATG TCT TTG ACG TAC TAT GTA GGG GGG CGT TTA AAA TGT GAA ACA ACT ATG	321	

Reakce obsahovala 1 U Taq DNA polymerazy (BioLabs), 1 $\times$  Taq pufr (BioLabs), 200 $\mu$ M dNTPS (BioLabs) a 0,5 $\mu$ M primerů (kromě PCR pro *Varroa*, kde je používána koncentrace 0,85 $\mu$ M). K reakci jsem přidala 1  $\mu$ l izolované DNA (~65 ng). Reakce jsem připravovala v objemu 25  $\mu$ l (kromě PCR pro taxonomii, kterou jsem připravovala v objemu 50  $\mu$ l) a probíhaly za podmínek uvedených v tabulce 6. Samotná amplifikace probíhala v přístroji PTC-200 Thermal Cycler (MJ Research).

Tabulka 6- Podmínky PCR reakcí (čas u kroku 7 není uveden a znamená do ukončení programu)

	Aktin [°C/t]	COI-II [°C/t]	Kinetoplastida [°C/t]	<i>Varroa</i> [°C/t]	<i>M. plutonius</i> / <i>P. larvae</i> [°C/t]	<i>N. ceranae</i> / <i>N. apis</i> [°C/t]
1.	95/5m	94/2m	95/30s	95/30s	95/30s	95/30s
2.	95/30s	94/2m	95/30s	95/30s	95/30s	95/30s
3.	55/30s	48/45s	50/1m	52/30s	55/1m	61.8/30s
4.	72/1m	68/2m	68/30s	68/1m	68/30s	68/1m
5.	->2./39×	->2./30×	->2./30×	->2./30×	->2./30×	->2./35×
6.	72/4m	68/5m	68/5m	68/5m	68/5m	68/7m
7.	10/-	10/-	10/-	10/-	10/-	10/-

Pozitivní kontrolu pro *Varroa* jsem získala izolací tří celých roztočů ze vzorků včel pomocí TRIzolu (viz. výše). DNA *Melissococcus plutonius* a *Paenibacillus larvae* nám byly poskytnuty RNDr. Tomášem Erbanem, Ph.D. Jako pozitivní kontrolu *N. ceranae* jsem používala vzorek včel pozitivní po analýze NGS při testu metody přípravy knihoven v naší laboratoři které byly připravené v rámci spolupráce s KU Leuven (CELSA grant), ale nejsou zahrnuty v mé diplomové práci. Vzhledem k nízké prevalenci *N. apis* nebylo možné získat pozitivní kontrolu. Nicméně používané primery byly původně navrženy pro PCR detekci obou druhů *Nosema* se stejnými podmínkami reakce, a proto předpokládáme jejich funkčnost pro detekci obou druhů. Primery používané pro kinetoplastida jsou schopné amplifikovat i jiné druhy kinetoplastid, proto byly jako pozitivní kontroly použity dva blízké druhy *Crithidia fasciculata*, *Leptomonas pyrrocoris* které nám poskytl doc. RNDr. Jan Votýpka, Ph.D., a jejichž DNA jsem izolovala pomocí TRIzolu (viz. výše). U veškerých PCR byly používány negativní kontroly pro kontrolu kontaminace a falešné positivity.

### 3.3.3. Taxonomie přítomných poddruhů *A. mellifera*

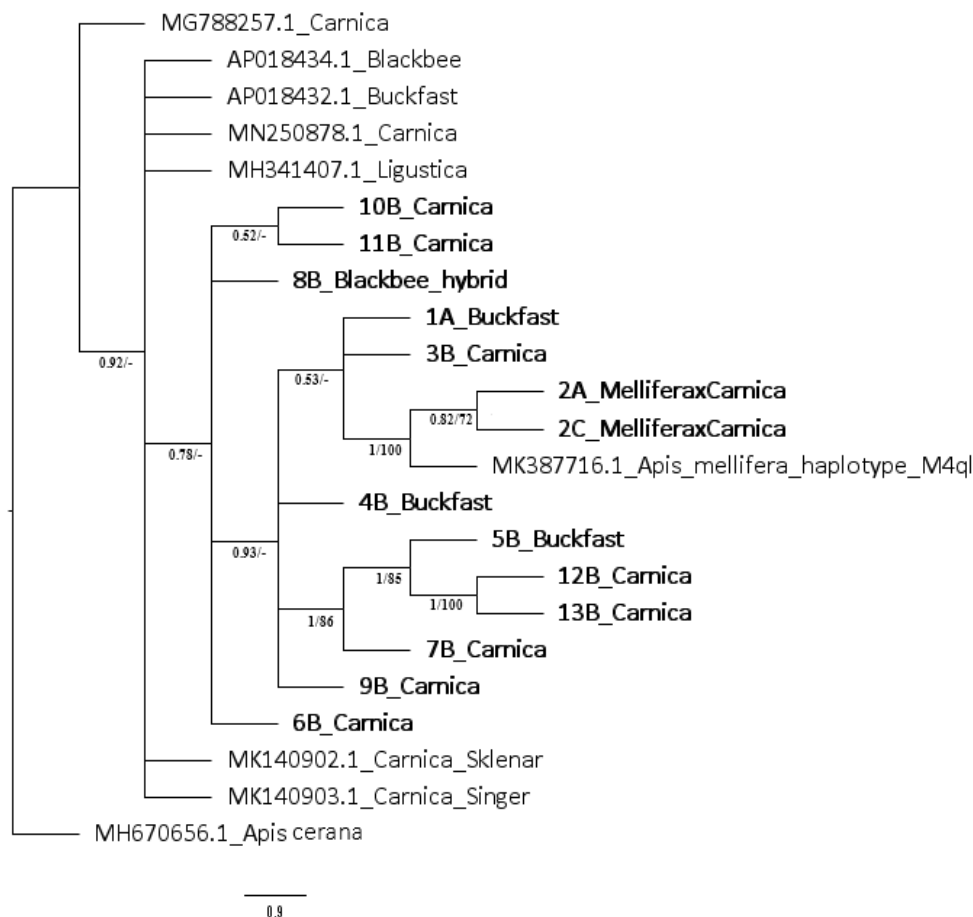
Ze vzorků jsem amplifikovala mezigenovou oblast COI-COII pomocí PCR (viz. výše). PCR produkt jsem přečistila pomocí MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) podle firemního protokolu. Sekvenační reakce byla připravena podle pravidel a doporučení v Laboratoři sekvenace DNA na PřF UK (BIOCEV, Průmyslová 595, Vestec), kde bylo provedeno Sangerovo sekvenování. Množství DNA použité pro sekvenaci bylo určeno podle velikosti fragmentu na elektroforéze (~500-800 pb). Pro každý vzorek byla provedena sekvenace z obou stran amplifikovaného produktu a sekvence jsem poté složila pomocí programu CAP3 (Huang & Madan, 1999). Získané sekvence byly proti sobě zarovnány a byl vytvořen fylogenetický strom (viz. 3.2.2).

## 4. Výsledky

### 4.1. Poddruhy *Apis mellifera*

Nejdříve jsem testovala, jak blízké jsou sekvence mezigenové oblasti COI-COII získané z jednoho včelstva v replikátních vzorcích (vzorové dvojice 2A a 2C). Vzhledem k identitě sekvencí v replikátních vzorkách (95-96%) bylo pokračováno v sekvenaci pouze jednoho vzorku v sérii ze včelstva.

Získané sekvence vytvořily fylogenetické klastry v souladu s informacemi o jejich poddruhu (obrázek 7). Toto rozložení by mohlo být dáno historickým křížením mezi poddruhy, kterému se nedá plně zabránit. Vzhledem k neprůkazné genotypizaci jsem pro analýzu využila informace o poddruhu nám poskytnuté včelařem při odběru vzorků (tabulka 3).



Obrázek 7- Fylogenetický strom poddruhů *Apis mellifera* nacházející se v daných vzorcích (dvě sekvence z včelstva 2 byly ponechány pro potvrzení blízké příbuznosti v replikátních vzorcích). Jednotlivé uzly mají zobrazenou hodnotu podpory získané z bayesovskou metodou a bootstrap hodnoty získané metodou maximální věrohodnosti. Jako vnější sekvence (outgroup) byla použita sekvence *Apis cerana*.

## 4.2. Úroveň parazitace

Vzorky včel, které jsme analyzovaly, byly minimálně parazitované. Celkově bylo v celém souboru vzorků možné detekovat pouze dva patogeny. Odpadlí roztoči *Varroa* byli nalezeni u 4 včelstev, ale pouze v malém množství (0,006 roztočů na včelu). PCR detekce *Varroa* byla pozitivní pro 6 z 39 vzorků (38 %), a 5 ze 13 včelstev (39 %) mělo alespoň jeden vzorek v triplicátu pozitivní. S výjimkou vzorků z včelstva 9, pozitivní byly vzorky z včelstva, kde jsem identifikovala odpadlé jedince. Ve vzorku 9A z včelstva 9, kde nebyl *Varroa* nalezený makroskopicky, byla PCR detekce pozitivní. Včely tedy nebyly masivně parazitovány a proto usuzuji, že by *Varroa* neměl mít výrazný vliv na složení viromu v naší studii. Kromě *Varroa* bylo možné nalézt *N. ceranae*. Celkem 18 % (7/39) vzorků bylo pozitivních a v 39 % (5/13) včelstev.

Tabulka 7 - PCR pozitivita daných vzorků na neviróvé patogeny (PCR pro aktin funguje jako kontrola pro úspěšnou izolaci DNA). Sloupec označen kinetoplastida zahrnuje *Crithidia mellifica* a *Lotmaria passim*.

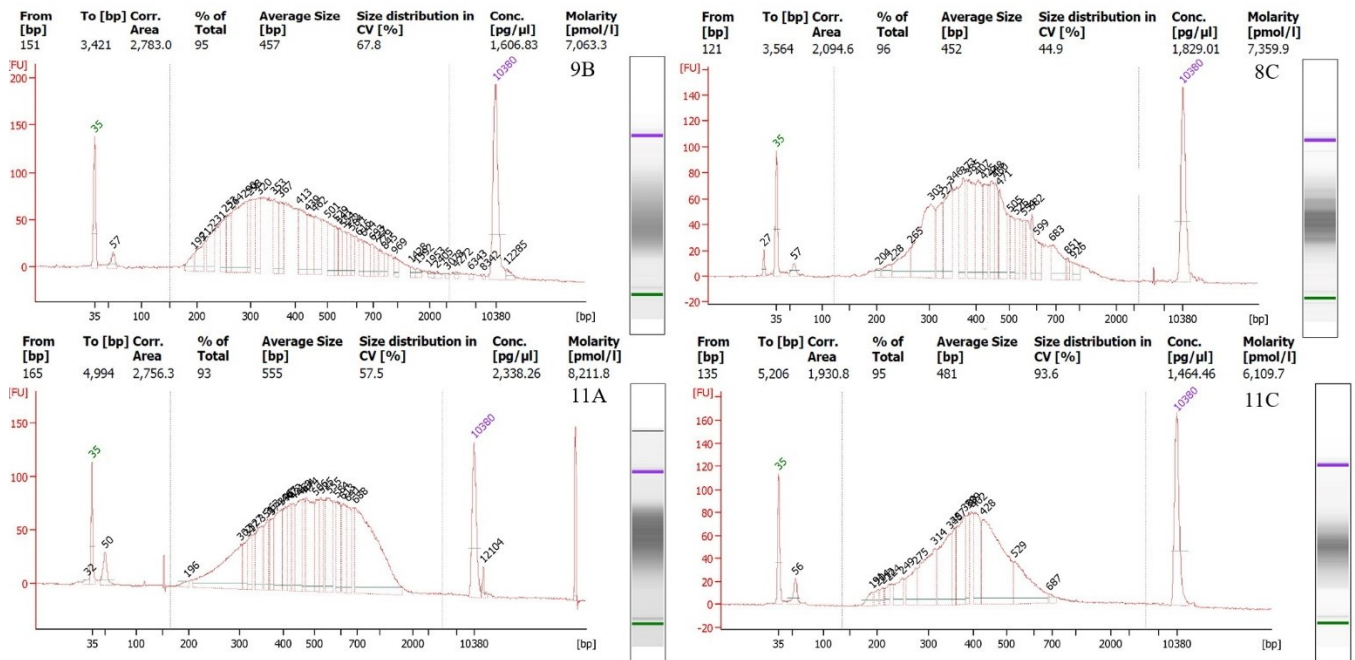
Včelstvo	Série	A. mellifera Aktin	Varroa	Melissococcus plutonius	Paenibacillus larvae	Nosema ceranae	Nosema apis	Kinetoplastida	Včelstvo	Série	A. mellifera Aktin	Varroa	Melissococcus plutonius	Paenibacillus larvae	Nosema ceranae	Nosema apis	Kinetoplastida
1	A	+	-	-	-	-	-	-	8	A	+	-	-	-	+	-	-
	B	+	-	-	-	-	-	-		B	+	-	-	-	-	-	-
	C	+	-	-	-	-	-	-		C	+	-	-	-	-	-	-
2	A	+	-	-	-	+	-	-	9	A	+	+	-	-	-	-	-
	B	+	-	-	-	+	-	-		B	+	-	-	-	-	+	-
	C	+	-	-	-	-	-	-		C	+	-	-	-	-	+	-
3	A	+	-	-	-	-	-	-	10	A	+	-	-	-	-	-	-
	B	+	+	-	-	-	-	-		B	+	+	-	-	-	-	-
	C	+	-	-	-	-	-	-		C	+	-	-	-	-	-	-
4	A	+	-	-	-	-	-	-	11	A	+	-	-	-	-	-	-
	B	+	-	-	-	-	-	-		B	+	-	-	-	-	-	-
	C	+	-	-	-	-	-	-		C	+	-	-	-	-	-	-
5	A	+	-	-	-	-	-	-	12	A	+	+	-	-	-	-	-
	B	+	-	-	-	-	-	-		B	+	-	-	-	-	-	-
	C	+	-	-	-	-	-	-		C	+	-	-	-	-	-	-
6	A	+	-	-	-	-	-	-	13	A	+	+	-	-	+	-	-
	B	+	-	-	-	-	-	-		B	+	-	-	-	-	-	-
	C	+	-	-	-	-	-	-		C	+	+	-	-	-	-	-
7	A	+	-	-	-	+	-	-									
	B	+	-	-	-	-	-	-									
	C	+	-	-	-	-	-	-									



## 4.3. Virom

### 4.3.1. Globální parametry sekvenačních knihoven a dat

Veškeré knihovny, které byly osekvenovány, měly optimální velikostní rozložení ve výsledku z High Sensitivity DNA Assay (obrázek 8). Jednotlivé velikosti fragmentů začínaly okolo 100<sup>+</sup> pb a největší množství fragmentů mělo velikost okolo 300- 500 pb.



Obrázek 8- Vybrané velikostní rozložení knihoven (9B, 8C, 11A, 11C) se souhrnem informací o parametrech (nejmenší a největší velikost fragmentů, průměrná velikost fragmentů, koncentrace a molalita, rozložení velikostí, plocha pod vrcholem a procento pokrytí mezi markery).

Koncentrace knihoven se lišila mezi všemi použitými metodami pro kvantifikaci knihoven: qPCR, Qubit a Agilent (High Sensitivity DNA Assay). Nejnižší získaná hodnota byla 2,9nM a nevyšší 23,3nM. Průměrná koncentrace knihoven byla 8,7nM. I když vždy alespoň 1 ze 3 metod určila koncentraci knihovny nad 4nM, byly pro sekvenaci veškerých knihoven použity koncentrace 2nM. Pro ředění a spojení knihoven pro sekvenaci byl použit údaj získaný měřením na Qubitu.

Tabulka 8- Koncentrace jednotlivých knihoven podle metody měření. Zvýrazněné jsou nízké koncentrace pod 4nM. NK – negativní kontrola

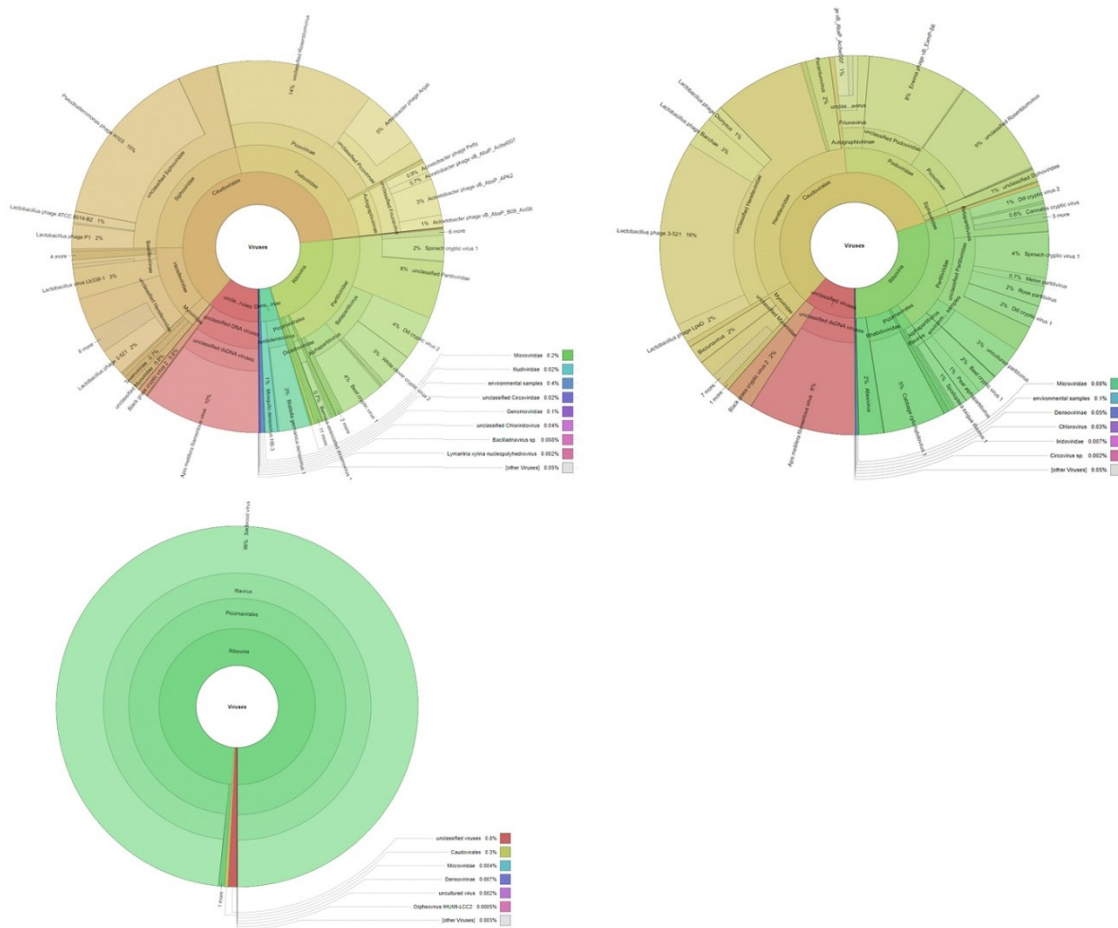
Série/ Včelstvo	A			B			C		
[nM]	qPCR	Agilent	Qubit	qPCR	Agilent	Qubit	qPCR	Agilent	Qubit
1	7.9	8.2	10.6	8.5	10.6	9.2	6.0	5.3	6.1
2	8.0	8.1	9.2	2.9	7.4	3.9	10.0	16.2	12.7
3	6.8	10.0	8.9	6.6	5.3	5.6	20.9	15.7	11.7
4	8.0	11.1	8.6	3.2	5.3	4.7	7.1	8.1	9.8
5	3.5	4.5	5.1	6.6	8.8	9.1	4.1	3.8	5.1
6	9.4	8.0	7.5	7.7	11.0	8.4	4.9	4.8	8.0
7	8.1	12.0	9.0	11.8	11.6	10.0	19.2	17.8	23.3
8	13.8	11.3	13.5	7.8	9.5	8.0	4.9	7.4	7.0
9	6.2	5.1	8.1	4.6	7.1	5.5	6.3	6.8	10.8
10	9.9	11.2	11.7	6.0	8.1	6.3	4.6	4.3	7.9
11	6.4	8.2	7.6	13.8	15.6	17.8	5.0	6.1	7.6
12	5.0	5.3	8.2	14.6	10.9	14.7	7.7	10.5	13.3
13	7.4	11.6	10.0	7.1	8.8	6.8	7.3	6.1	8.2
NK	1.1	0.3	1.1						

Procentuální zastoupení virových sekvencí v jednotlivých vzorcích je zobrazeno v tabulce 9. Už v tomto hrubém parametru je patrná značná variabilita replikátních vzorků, viz dále. Po zpracování bylo celkem získáno 47 999 non-redundantních sekvencí větších než 500 pb, 3925 z nich bylo virových, tedy 8,2 %. Nebylo možné identifikovat žádné sekvence v negativní kontrole.

Tabulka 9- Procentuální zastoupení virových sekvencí v knihovnách (určeny z Krona výstupů).

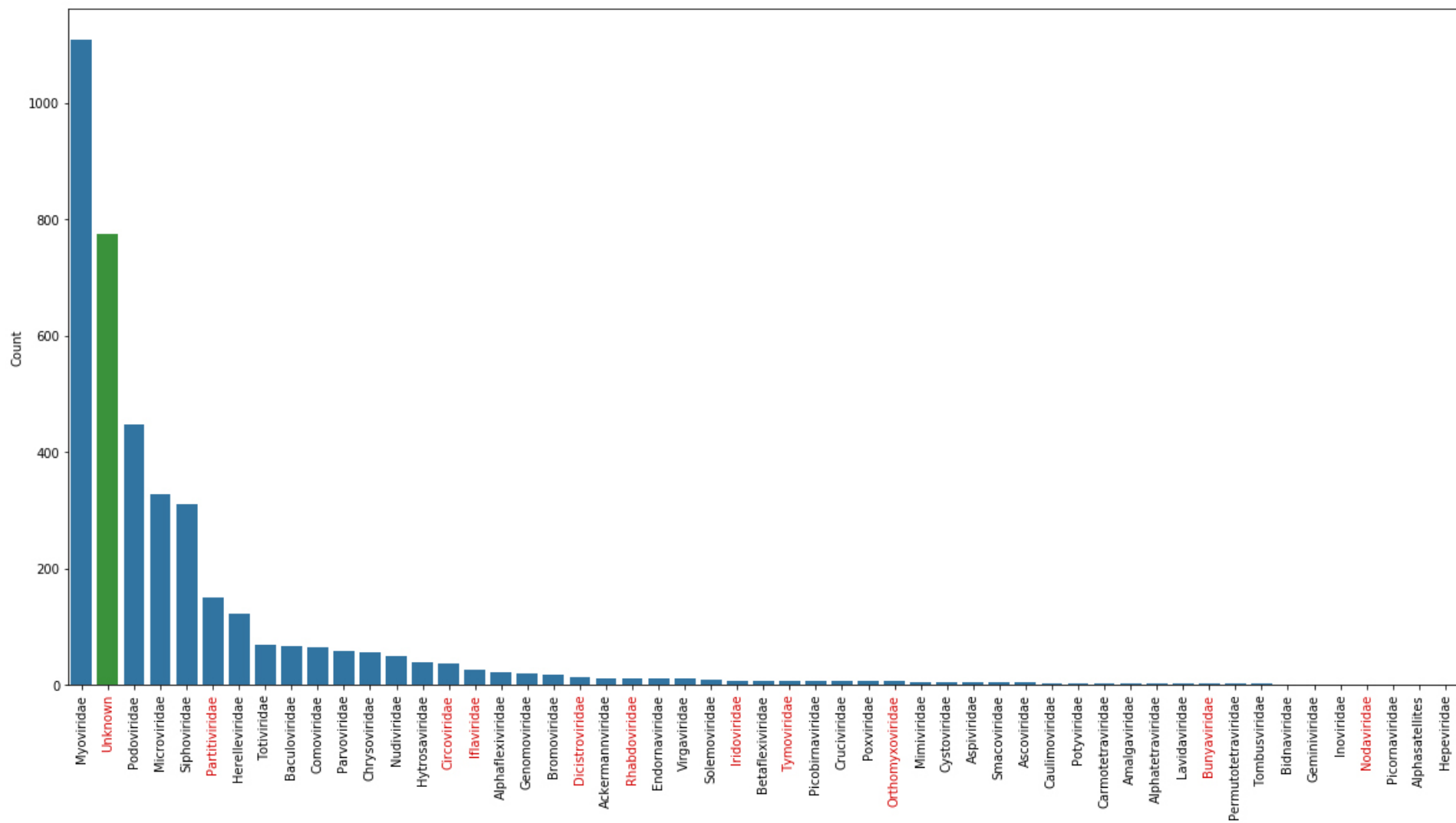
Série/ včelstvo	A	B	C
1	4.0	27.0	3.0
2	4.0	1.0	12.0
3	2.0	8.0	61.0
4	3.0	24.0	0.6
5	16.0	3.0	15.0
6	12.0	0.2	0.2
7	68.0	67.0	0.8
8	57.0	4.0	2.0
9	97.0	96.0	99.0
10	5.0	8.0	23.0
11	59.0	40.0	57.0
12	6.0	92.0	99.0
13	88.0	4.0	9.0

Jeden vzorek se skládal z devíti jedinců, ale ze stejného včelstva byly připraveny vždy 3 izolace (3x9 jedinců, biologické replikáty). Větší množství jedinců mělo teoreticky zabránit jedinci s vysokou/abnormální virovou náloží ovlivnit výstupní data. Přesto se však vyskytly případy, kde jeden konkrétní včelí virus zabíral velkou část veškerých virových čtení (extrémní případ obrázek 9). Jeden virus zaobíral alespoň 80,0 % veškerých virových čtení u 30,8 % (12/39) vzorků.



Obrázek 9- Poměrné zastoupení různých virových sekvencí u vzorku 2-A (vlevo nahoře), 2-B (vpravo nahoře) a 2-C (vlevo dole). V případě 2-C byl nejzastoupenější virus SBV, který tvořil 98 % získaných virových sekvencí, oproti tomu 2A a 2B obsahovaly 0,002 a 0,1 % SBV sekvencí. Krona výstupy v plné velikosti jako přílohy (kapitola 8).

V sekvenačních datech bylo možno identifikovat řadu různých čeledí (obrázek 10). Nejvíce zastoupené byly čeledi bakteriofágové, *Myoviridae* a *Podoviridae*, spolu s rostlinnými viry, *Bromoviridae* a *Comoviridae*, a s neklasifikovanými viry, kam spadají i některé viry infikující včely. Kromě očekávaných („tradičních“) čeledí včelích virů (*Flaviviridae*, *Dicistroviridae* a *Tymoviridae*) pocházely sekvence i z řady dalších čeledí, v nichž byly také recentně identifikovány 'včelí' viry, jako *Partiviridae*, *Orthomyxoviridae* a *Rhabdoviridae*.



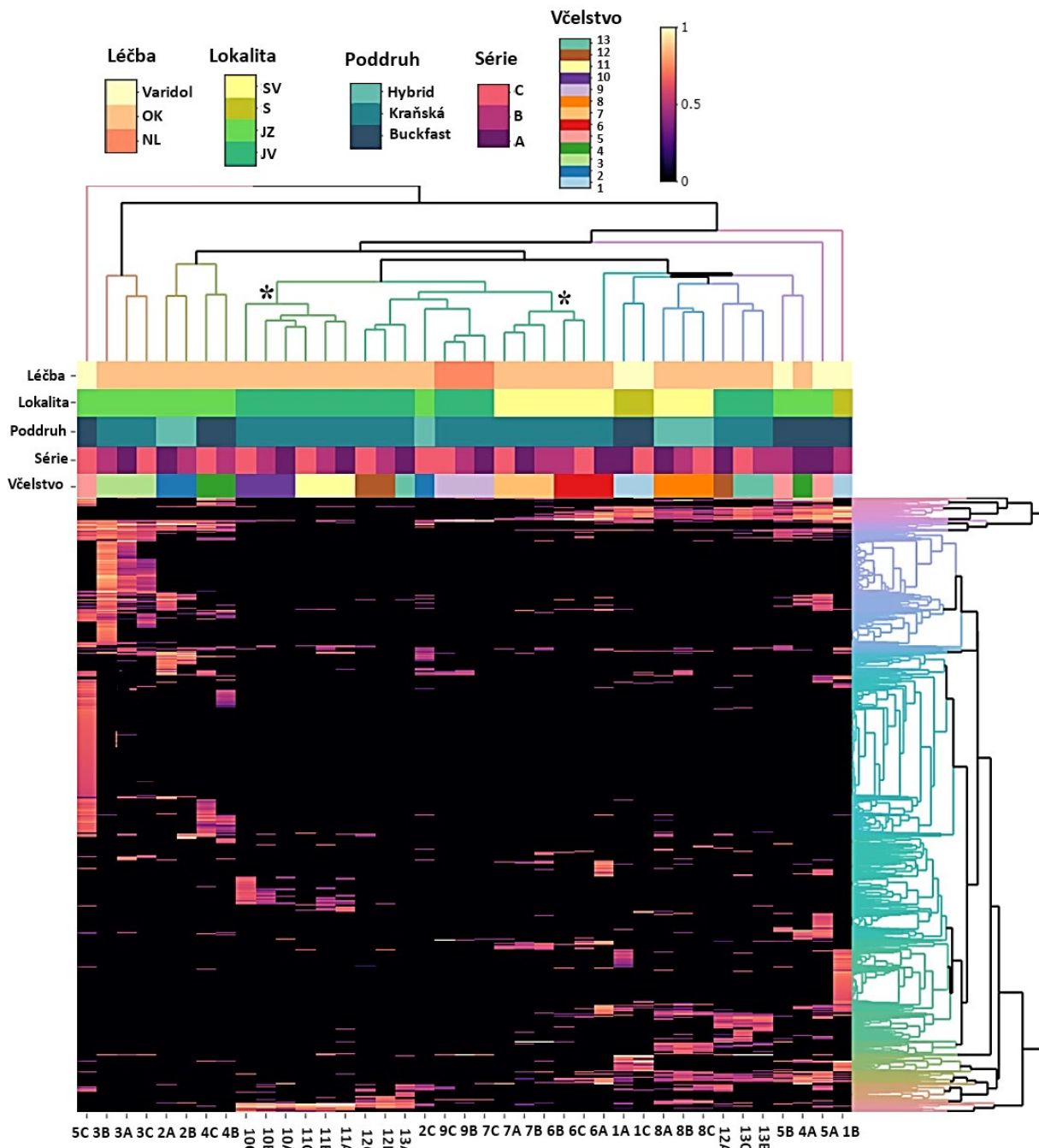
Obrázek 10- Poměrné množství čtení jednotlivých čeledí v získaných datech. Čeledi, kde byly dosud nalezeny viry prokazatelně infikující včelu jsou označeny červeně.

### 4.3.2. Shlukování dat

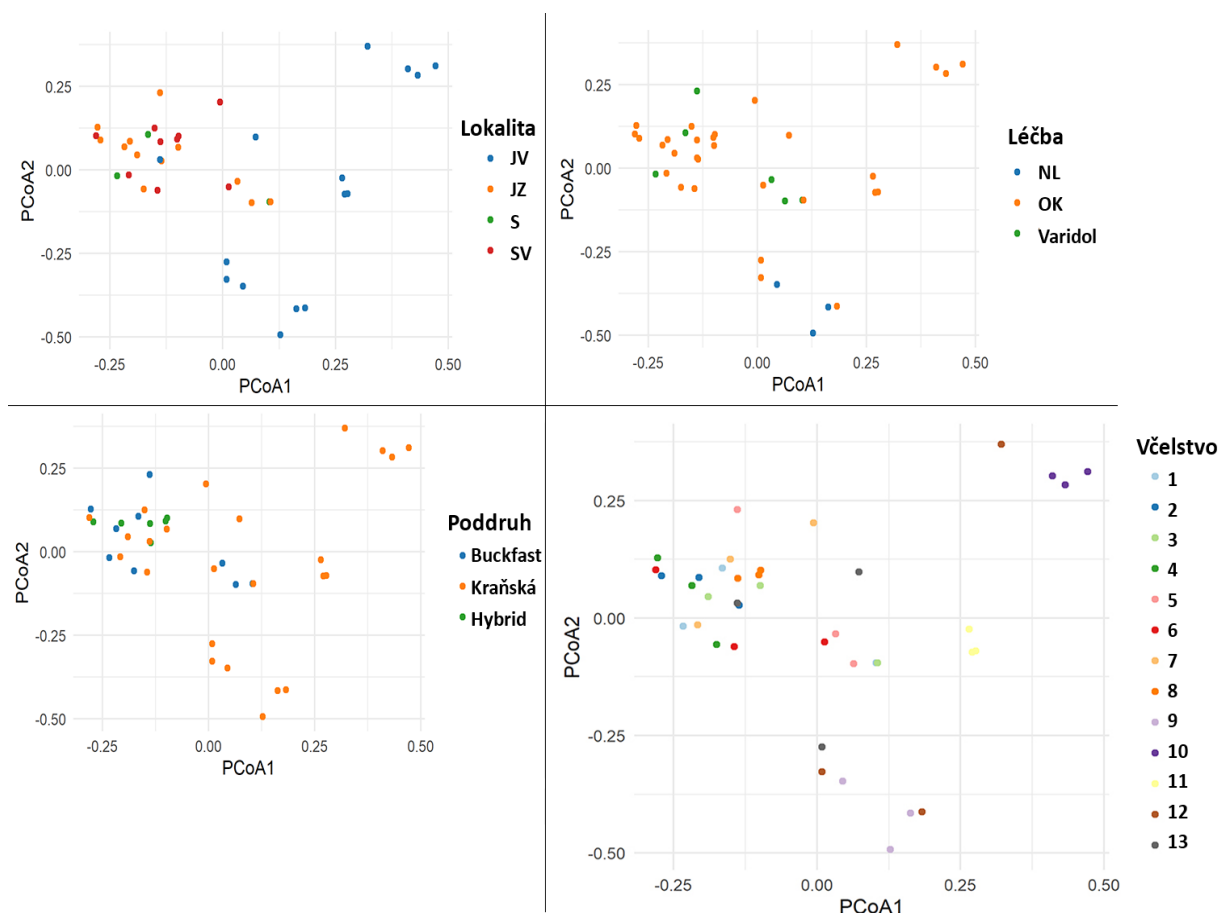
Vzhledem k práci v triplikátech jsou jednotlivé série zpracování označovány A, B a C, a jednotlivá včelstva jsou označovány 1-13. Dvojice včelstev 6/7 a 10/11 pocházejí z jedné kolonie, pouze se liší úl, ze kterého byly včelstva odebrány. Jednotlivá metadata (tabulka 3) byla rozdělena do podskupin: místo odběru, plemeno včel a léčba. Léčba proti *Varroa* byla rozdělena do kategorií: organické kyseliny OK (kyselina šťavelová, kyselina mravenčí), Varidol a neléčeny (NL). Plemena včel byla zredukována na tři hlavní poddruhy Kraňská, Buckfast a hybrid. Lokality původu jednotlivých vzorků byly rozdělené na čtyři oblasti: sever S, severovýchod SV, jihozápad JZ a jihovýchod JV.

Ze zastoupení (abundance) veškerých detekovaných virových sekvencí byla vytvořena tepelná mapa (obrázek 11). Shlukování dat odpovídalo zvolenému metodologickému přístupu. Nebyla patrná závislost na sérii zpracování (A/B/C). Naopak docházelo ke shlukování triplikátních vzorků ze stejného včelstva (7/13) a u ostatních včelstev (5/6) se shlukovaly alespoň dvojice opakovaných vzorků, což může být způsobeno nestandardním zastoupením virových sekvencí u některých vzorků (viz. výše). Vzorky ze dvojic včelstev 6/7 a 10/11 se podle očekávání shlukovaly spolu.

Pro ověření závislosti viromu na jednotlivých kategoriích metadat byl proveden adonis test. Zatímco nebylo možné pozorovat signifikantní závislost na léčbě ( $p=0,11425$ ), byla nalezena závislost na včelstvu ( $p=0,00009999$ ), a lokalitě ( $p=0,00009999$ ). Slabší závislost byla i na poddruhu včel ( $p=0,0002$ ). Shlukování vzorků ve vztahu k lokalitě, léčbě, poddruhu a včelstvu jsou zobrazeny na obrázku 12.



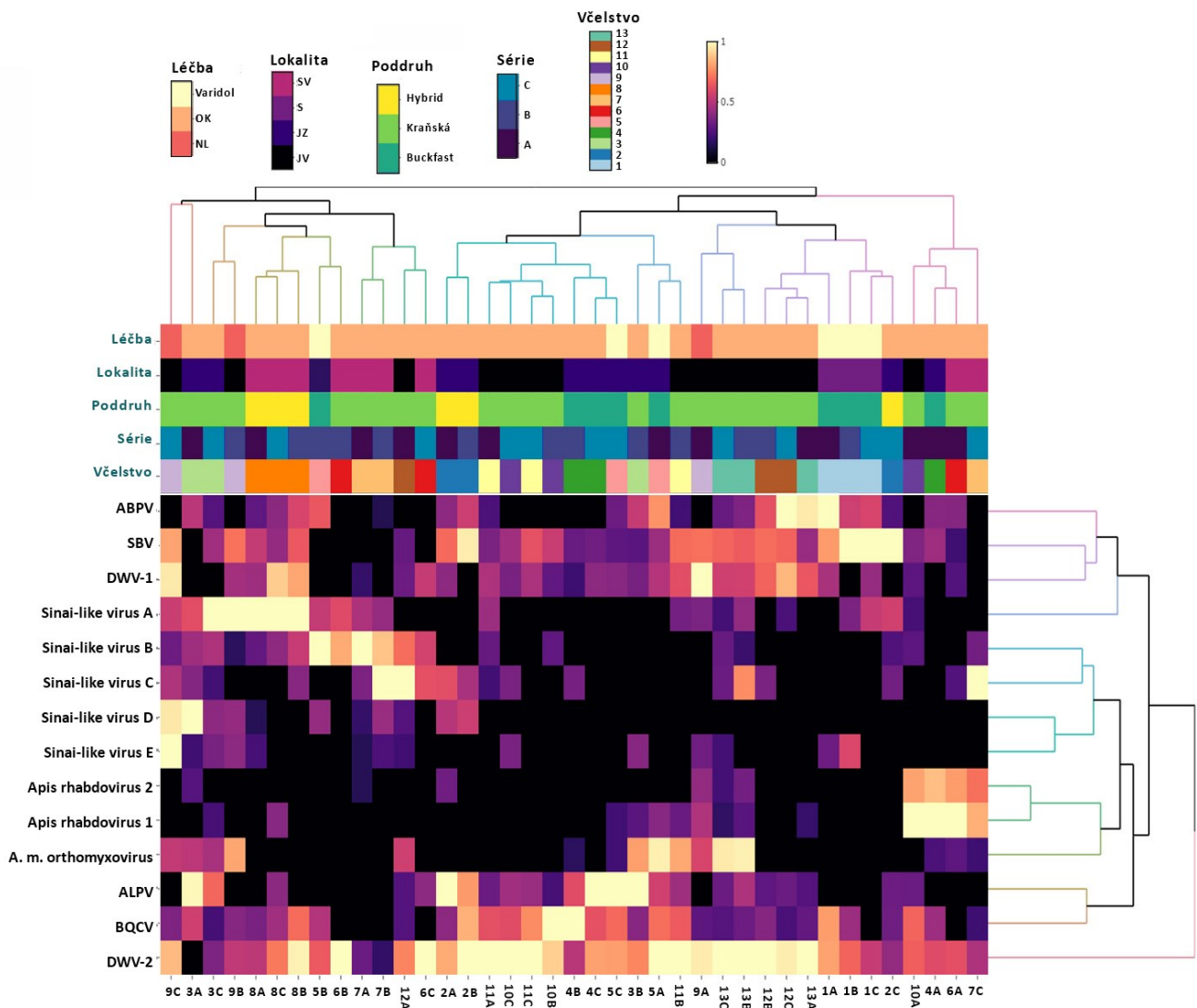
Obrázek 11- Teplotní mapa vzorků, konstruovaná na podkladě veškerých získaných virových sekvencí. Je patrné různě silné shlukování na základě většiny kategorií metadat a absence shlukování podle série zpracování vzorků. Hodnoty relativních zastoupení jednotlivých virů byly zlogaritmovány a normalizovány, aby spadaly do škály 0-1 od nejnižších hodnot po nejvyšší hodnoty zastoupení viru. Hvězdičkou jsou označeny shluky, které tvořily včelstva získané ze stejné kolonie.



Obrázek 12- Shlukování jednotlivých vzorků podle PCoA (Bray-Curtis), barevně označeno podle metadat – lokalita, léčba, poddruh a včelstvo.

#### 4.4. Viry *Apis mellifera*

Nejvíce zastoupené včelí viry a jejich poměrné zastoupení jsou zobrazeny na teplotní mapě, obrázek 13. Oproti teplotní mapě veškerých virových sekvencí vzorky netvořily shluky na základě původu/včelstvu. Vzhledem k tomu, že vzorky sestávaly vždy z 9 jedinců, můžeme z tohoto pozorování vyvodit, že přítomnost a zastoupení jednotlivých včelích virů jsou mezi jedinci výrazně odlišné. Například viry *Apis* rhabdovirus 1 a 2 se nacházejí v pěti včelstvech, ale vždy pouze v jednom vzorku ze tří. V datech nalezené varianty DWV viru jsou označovány jako DWV-1 a 2, Lake Sinai viry (LSV) jako Sinai-like virus A-E.



Obrázek 13- Teplotní mapa zkonstruovaná na podkladě nejvíce zastoupených včelích virů. Hodnoty relativních zastoupení jednotlivých včelích virů byly zlogaritmovány a normalizovány, aby spadaly do škály 0-1 od nejnižších hodnot po nejvyšší hodnoty zastoupení viru.

Zatímco některé viry byly sekvenčně nejpodobnější izolátům z evropských zemí (ABPV, ALPV, BQCV, DWV a Sinai-like virus A), u ostatních podobný trend nebyl pozorován. DWV viry a Sinai-like viry byly podrobněji analyzovány dále (kapitola 4.4.1). Tento fakt může být způsoben nerovnoměrným zastoupením sekvencí v databázi virů z různých oblastí, a to hlavně u nověji objevených virů. Kromě sekvencí pocházejících z *A. mellifera* bylo možné najít podobnost izolátům z jiných hostitelů, jako ze sršně *Vespa velutina* (ABPV). V případě ALPV pocházely homologní sekvence z několika hostitelů, mšice, ale i rostliny kladivníku (lat. *Cestrum*). Nejblíže nalezené sekvence v databázi jsou spolu se základními informacemi uvedené v tabulce 10 a 11. Vzhledem k nízké shodě segmentovaného *Apis mellifera* orthomyxoviru, byl jeho genom porovnán proti proteinové databázi (tabulka 11).



Tabulka 10- Nejblíží sekvence nalezené v databázi pro sloučené sekvence nejvíce zastoupených včelích virů.

Sloučené sekvence viru	Pokrytí [%]	Identita [%]	Identifikace v databázi	Název	Rok	Země	Hostitel
ABPV	99.0	97.9	<a href="#">MN565031.1</a>	Acute bee paralysis virus isolate ABPV/144I, complete genome	2014	Francie	<i>Vespa velutina</i>
	99.0	96.3	<a href="#">AF486072.2</a>	Acute bee paralysis virus isolate Hungary 1, complete genome	1996-2000	Maďarsko	<i>Apis mellifera</i>
	99.0	95.3	<a href="#">AF486073.2</a>	Acute bee paralysis virus isolate Poland 1, complete genome	1996-2000	Polsko	<i>Apis mellifera</i>
ALPV	98.0	83.9	<a href="#">MK704471.1</a>	Aphid lethal paralysis virus isolate ALPV-CE, complete genome	2016	Turecko	<i>Cestrum elegans</i>
	98.0	83.8	<a href="#">JX480861.1</a>	Aphid lethal paralysis virus isolate ALPV-An, complete genome	2011	Izrael	<i>Aphis nerii</i>
	98.0	83.7	<a href="#">LN907588.1</a>	Aphid lethal paralysis virus, isolate KE-P7	2014	Keňa	<i>Aphis fabae</i>
<i>Apis</i> rhabdovirus-1	100.0	99.4	<a href="#">MF114350.1</a>	<i>Apis</i> rhabdovirus 1 strain Bombus/USA/A, complete genome	2013	USA	<i>Bombus impatiens</i>
	100.0	99.4	<a href="#">MH267692.1</a>	<i>Apis</i> rhabdovirus 1 isolate ARV-1 MS, complete genome	2009	Švédsko	<i>Apis mellifera</i>
	100.0	99.3	<a href="#">MH267691.1</a>	<i>Apis</i> rhabdovirus 1 isolate ARV-1 MR, complete genome	2010	Švédsko	<i>Apis mellifera</i>
<i>Apis</i> rhabdovirus-2	99.0	98.8	<a href="#">KY354234.1</a>	<i>Apis</i> rhabdovirus 2 isolate T-12 N protein, complete cds	2015	Tonga	<i>Apis mellifera</i>
	99.0	98.7	<a href="#">KY354233.1</a>	<i>Apis</i> rhabdovirus 2 isolate RI-49, complete cds	2013	Jihoafrická republika	<i>Apis mellifera</i>
BQCV	99.0	96.6	<a href="#">MN565034.1</a>	Black queen cell virus isolate BQCV/144I, complete genome	2014	Francie	<i>Vespa velutina</i>
	99.0	95.8	<a href="#">MT416539.1</a>	Black queen cell virus isolate BQCV-IT1, complete genome	2018	Italy	<i>Apis mellifera</i>
	98.0	93.6	<a href="#">EF517515.1</a>	Black queen cell virus strain HUNGARY-10, complete cds	2007	Maďarsko	<i>Apis mellifera</i>
DWV-1	100.0	98.4	<a href="#">KU847397.1</a>	Deformed wing virus isolate Austria 1414, complete genome	2014	Rakousko	<i>Apis mellifera</i>
	99.0	98.3	<a href="#">MH267695.1</a>	Deformed wing virus isolate DWV MR, complete genome	2009	Švédsko	<i>Apis mellifera</i>
	99.0	98.1	<a href="#">MH267696.1</a>	Deformed wing virus isolate DWV MS, complete genome	2009	Švédsko	<i>Apis mellifera</i>
DWV-2	99.0	99.3	<a href="#">MN565037.1</a>	Deformed wing virus isolate DWV/144I, complete genome	2014	Francie	<i>Vespa velutina</i>
	99.0	99.2	<a href="#">AY251269.2</a>	<i>Varroa destructor</i> virus 1, complete genome	2001	Nizozemsko	<i>Varroa roztoč</i>
	99.0	99.1	<a href="#">MN538209.1</a>	Deformed wing virus isolate DWV B , complete genome	2014	Nizozemsko	<i>Apis mellifera</i>
SBV	100.0	97.1	<a href="#">MH267698.1</a>	Sacbrood virus isolate SBV MS, complete genome	2009	Švédsko	<i>Apis mellifera</i>
	100.0	96.9	<a href="#">MH267697.1</a>	Sacbrood virus isolate SBV MR, complete genome	2010	Švédsko	<i>Apis mellifera</i>
	100.0	96.6	<a href="#">MG545287.1</a>	Sacbrood virus isolate MD2, complete genome	2017	USA	<i>Apis mellifera</i>
Sinai-like virus A	98.0	95.5	<a href="#">MG918125.1</a>	Lake Sinai virus strain M92/2010, complete genome	2010	Slovinsko	<i>Apis mellifera</i>
	100.0	90.7	<a href="#">MH267700.1</a>	Lake Sinai virus 3 isolate LSV-3 MS, complete genome	2009	Švédsko	<i>Apis mellifera</i>
	99.0	85.9	<a href="#">MT482469.1</a>	Lake Sinai virus isolate LSV1/PNG, complete genome	2014	Papua Nová Guinea	<i>Apis mellifera</i>
Sinai-like virus B	100.0	94.5	<a href="#">KY465710.1</a>	Lake Sinai virus 2 strain VN3 ORF1, complete cds	2014	Austrálie	<i>Apis mellifera</i>
	100.0	94.4	<a href="#">KY465711.1</a>	Lake Sinai virus 2 strain QLD, complete cds	2014	Austrálie	<i>Apis mellifera</i>
	100.0	94.3	<a href="#">KY465709.1</a>	Lake Sinai virus 2 strain VN2, complete cds	2015	Austrálie	<i>Apis mellifera</i>
Sinai-like virus C	100.0	93.7	<a href="#">KY354243.1</a>	Lake Sinai Virus SA1, complete cds	2013	Jihoafrická republika	<i>Apis mellifera</i>
	88.0	93.2	<a href="#">KM886904.1</a>	Lake Sinai virus strain VBP256, complete cds	2012	Belgie	<i>Apis mellifera</i>
Sinai-like virus D	100.0	92.9	<a href="#">KY354242.1</a>	Lake Sinai Virus NE, complete cds	2014	Nizozemsko	<i>Apis mellifera</i>
Sinai-like virus E	99.0	91.0	<a href="#">KX883223.1</a>	Lake Sinai virus strain WHCC111282, complete cds	2013	Čína	Hmyz
	86.0	89.8	<a href="#">KM886903.1</a>	Lake Sinai virus strain VBP166, complete cds	2012	Belgie	<i>Apis mellifera</i>

Tabulka 11- Nejblíže shody proteinů pro sloučené sekvence *Apis mellifera* orthomyxoviru a *Apis rhabdoviru- 2*. U *Apis mellifera* orthomyxoviru jsou uvedené segmenty kódující daný protein. Shody pro glykoproteiny těchto virů jsou označeny červeně.

	Pokrytí [%]	Identita [%]	Identifikace v databázi	Název	Rok	Země	Hostitel
<i>Apis mellifera</i> orthomyxovirus							
(seg. 3)	17.0	92.2	<a href="#">QGA69819.1</a>	polymerase subunit PA [ <i>Varroa</i> orthomyxovirus-1]	2016	Izrael	<i>Apis mellifera</i>
(seg. 5)	13.0	93.5	<a href="#">QGA69821.1</a>	nucleoprotein [ <i>Varroa</i> orthomyxovirus-1]	2016	Izrael	<i>Apis mellifera</i>
(seg. 4)	13.0	35.6	<a href="#">AMN92169.1</a>	envelope glycoprotein [Bourbon virus]	2014	USA	<i>Homo sapiens</i>
	13.0	36.9	<a href="#">QFR36191.1</a>	glycoprotein [Thailand tick thogotovirus]	2012	Thajsko	<i>Boophilus sp.</i>
(seg. 1)	18.0	92.2	<a href="#">QGA69817.1</a>	polymerase subunit PB2 [ <i>Varroa</i> orthomyxovirus-1]	2016	Izrael	<i>Apis mellifera</i>
(seg. 6)	8.0	93.4	<a href="#">QGA69822.1</a>	M protein [ <i>Varroa</i> orthomyxovirus-1]	2016	Izrael	<i>Apis mellifera</i>
(seg. 2)	14.0	94.2	<a href="#">QGA69818.1</a>	PB1 polymerase [ <i>Varroa</i> orthomyxovirus-1]	2016	Izrael	<i>Apis mellifera</i>
<i>Apis rhabdovirus-2</i>							
	46.0	94.6	<a href="#">ARO50039.1</a>	L protein [ <i>Apis</i> rhabdovirus 2]	2013	Jihoafrická republika	<i>Apis mellifera</i>
	11.0	95.8	<a href="#">QGA69820.1</a>	glycoprotein [ <i>Varroa</i> orthomyxovirus-1]	2016	Izrael	<i>Apis mellifera</i>
	11.0	95.6	<a href="#">ARO50043.1</a>	G protein [ <i>Apis</i> rhabdovirus 2]	2015	Tonga	<i>Apis mellifera</i>
	9.0	95.9	<a href="#">ARO50040.1</a>	N protein [ <i>Apis</i> rhabdovirus 2]	2015	Tonga	<i>Apis mellifera</i>
	5.0	92.6	<a href="#">ARO50042.1</a>	M protein [ <i>Apis</i> rhabdovirus 2]	2015	Tonga	<i>Apis mellifera</i>
	7.0	93.5	<a href="#">ARO50036.1</a>	P protein [ <i>Apis</i> rhabdovirus 2]	2013	Jihoafrická republika	<i>Apis mellifera</i>

U *Apis mellifera* orthomyxoviru nebylo možné nalézt blízkou shodu v databázi pro glykoprotein (tabulka 11), i nejbližší sekvence měly pouze nízkou podobnost. V dané studii a publikované sekvenci byl nejspíše zaměněn 4 segment orthomyxoviru za glykoprotein *Apis* rhabdoviru 2. Z tohoto důvodu byla brána jako referenční sekvence zatím nepublikovaného *Apis mellifera* orthomyxoviru získaného od Warda Deboutte (KU Leuven Genomics Core, Belgie).

Vzhledem k metodickému přístupu spojování 9 jedinců a práce v triplikátech je posouzení skutečné prevalence obtížné. Tabulka 12 zobrazuje relativní pozitivitu velmi zastoupených virů mezi vzorky (čtení daného viru zabíraly alespoň 2 promile celkových čtení pro pozitivitu). Zároveň část „vzorky“ porovnává pozitivitu mezi jednotlivými vzorky, část „včelstvo“ porovnává pozitivitu pro virus mezi jednotlivými včelstvy, kdy i pokud byl jeden vzorek ze tří pozitivní, je to považováno za pozitivitu pro celé včelstvo. Mezi nejvíce vyskytující se viry patřil DWV, BQCV a SBV.

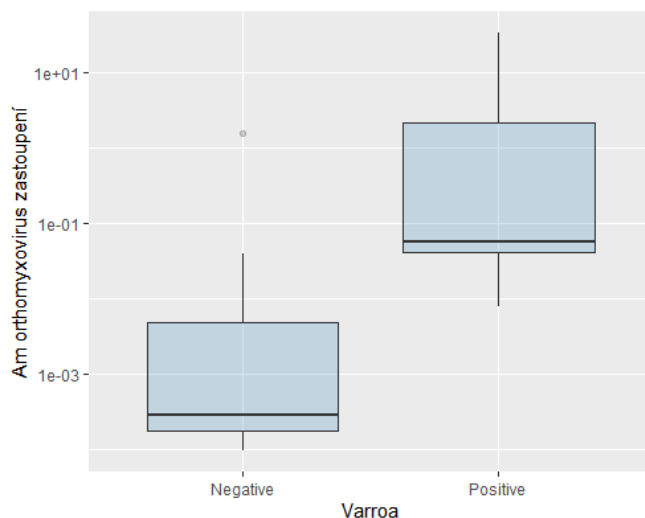
Tabulka 12- Počet vzorků/včelstev, kdy byl identifikován daný virus

Virus	Vzorky		Včelstvo	
	x/39	[%]	x/13	[%]
<i>A. m.</i> orthomyxovirus	11	28.2	6	46.2
ABPV	12	30.8	8	61.5
ALPV	11	28.2	7	53.8
<i>Apis</i> rhabdovirus-1	5	12.8	5	38.5
<i>Apis</i> rhabdovirus-2	5	12.8	5	38.5
BQCV	22	56.4	11	84.6
DWV-1	15	35.9	5	38.5
DWV-2	38	94.9	13	100.0
SBV	23	59.0	8	61.5
Sinai-like virus A	14	35.9	7	53.8
Sinai-like virus B	8	20.5	5	38.5
Sinai-like virus C	10	25.6	6	46.2
Sinai-like virus D	5	12.8	3	23.1
Sinai-like virus E	3	7.7	2	15.4

Překvapivě bylo možné nalézt absolutní korelaci ve výskytu dvou včelích rhabdovirů. I když je bylo možné nalézt pouze pospolu (A4, A6, A10, C7), zastoupení *Apis* rhabdoviru 1 byla vždy násobně vyšší než *Apis* rhabdoviru 2. Silná pozitivita byla vždy omezena pouze na jeden vzorek z triplikátu, což implikuje, že prevalence mezi včelami ve včelstvu je velmi nerovnoměrná.

Zastoupení virů, které s jistotou náleží pouze hostiteli *Varroa* (*Varroa destructor* virus -2,3), byly nízké oproti virům, které by mohly patřit jak *Varroa*, tak včele (*Apis mellifera* orthomyxovirus a *Apis* rhabdovirus- 1,2). Viz kapitola 1.3.4. Tím není vyloučeno, že by tyto viry mohly

mít jako hostitele jak včely, tak *Varroa*, ale je pravděpodobné, že *A. mellifera* je jejich hostitelem nezávisle na jejich vztahu k *Varroa*. Pro průkaz vztahu mezi *Varroa* a *Apis mellifera* orthomyxovirus, svědčí vyšší zastoupení viru ve včelstvu, pokud v něm bylo možné identifikovat *Varroa* jakoukoliv metodou (obrázek 14). Ale vzhledem k charakteru NGS dat je nutné vztahy ověřit plně kvantitativní metodou.



Obrázek 14- Zastoupení *Apis mellifera* orthomyxoviru v přítomnosti a absenci *Varroa* ve včelstvu. Zastoupení je zobrazené na logaritmické škále.

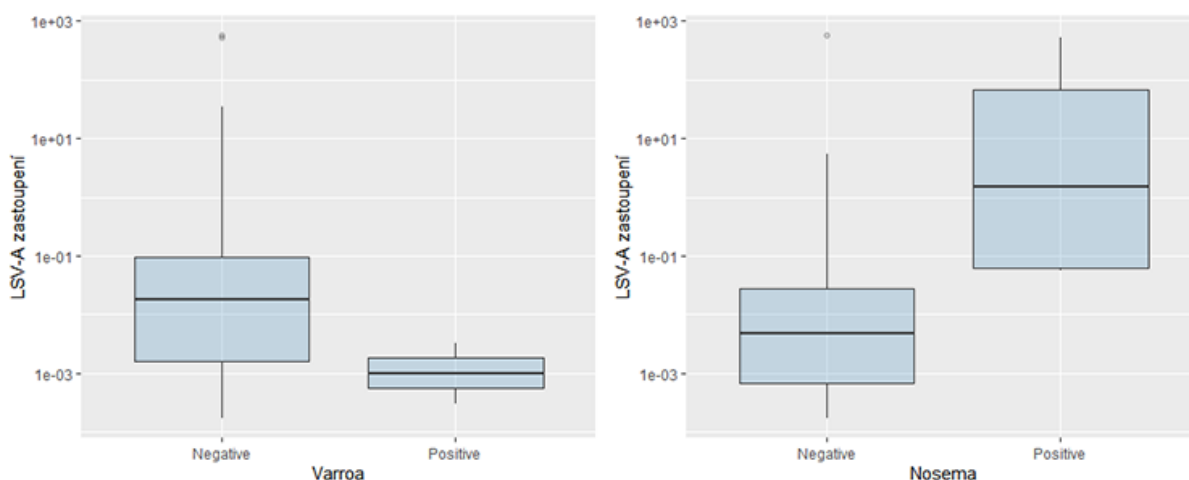
#### 4.4.1. LSV

Ve vzorcích bylo možné nalézt 5 různých sekvenčních klastrů virů patřících mezi LSV (označeny Sinai-like virus A-E) a jejich detekce je zobrazena v tabulce 13. Bylo možné získat 16 různých unikátních sekvencí s kompletním pokrytím (obrázek 16). I v jednom vzorku bylo možné nalézt několik variant, např. včelstvo 7 v sérii B, z něž bylo možné sestavit kompletní sekvenci Sinai-like viru B i C a zároveň obsahoval detekovatelné množství Sinai-like virů A a D. Tato variabilita byla ještě vyšší v rámci jednoho včelstva. Situace je tedy komplexní z důvodů velmi pravděpodobné přítomnosti několika typů Sinai-like virů v jednom jedinci a/nebo variabilitě v přítomnosti jednotlivých typů Sinai-like virů u jedinců ze stejného včelstva.

Tabulka 13- Přítomnost Sinai-like virů v pozitivních vzorcích (červeně označeny pozitivní, definované jako vzorky, u nichž čtení daného viru zabíralo minimálně 2 promile celkových čtení). Vzorky negativní pro všechny Sinai-like viry nejsou zobrazeny.

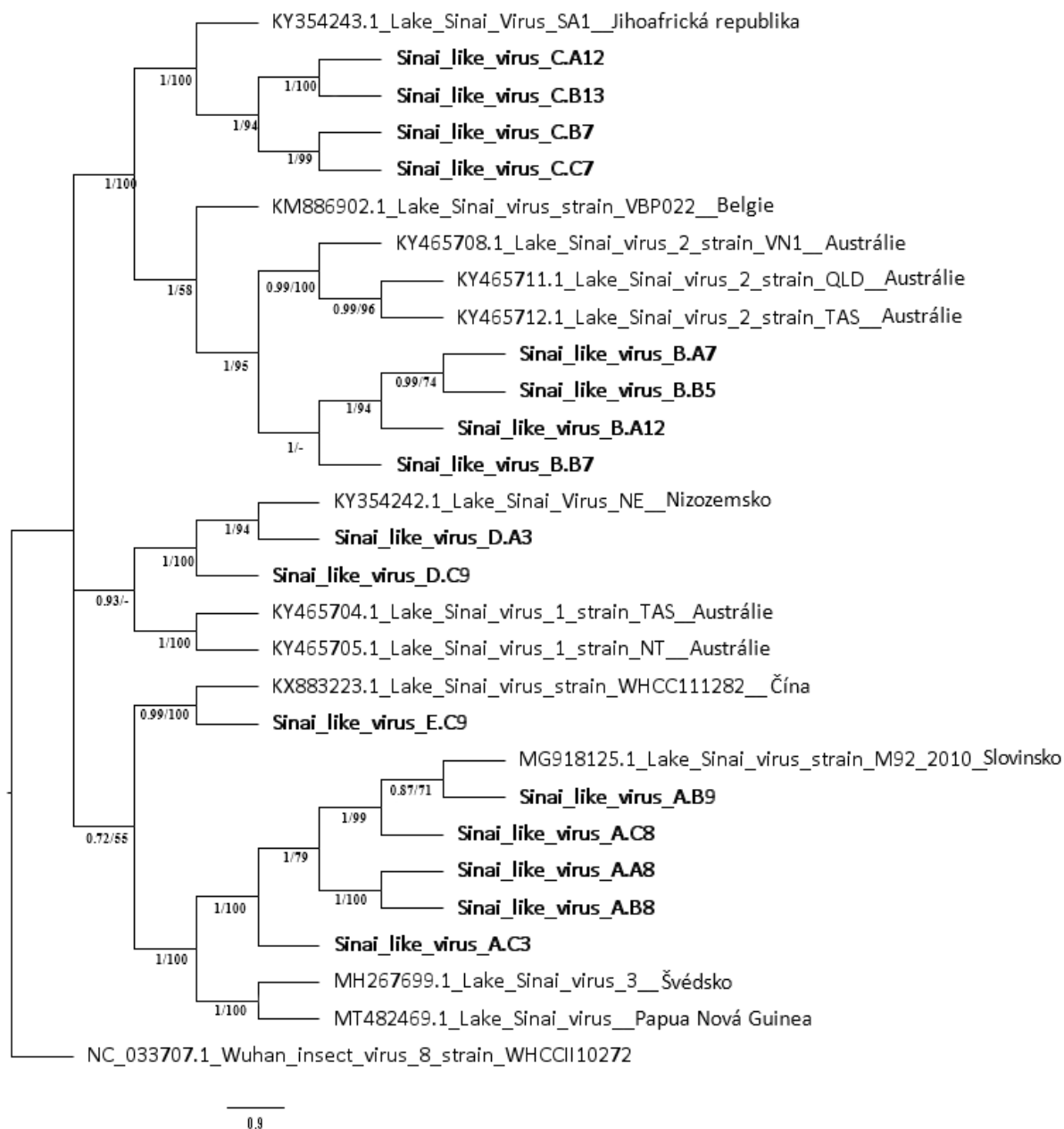
Včelstvo	1C	2A	2C	3A	3C	4B	5B	7A	7B	7C
Sinai-like virus A	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-
Sinai-like virus B	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-
Sinai-like virus C	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+
Sinai-like virus D	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Sinai-like virus E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Včelstvo	8A	8B	8C	9A	9B	9C	11A	12A	12B	13B
Sinai-like virus A	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Sinai-like virus B	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
Sinai-like virus C	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
Sinai-like virus D	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Sinai-like virus E	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

Bylo možné pozorovat větší zastoupení virových sekvencí při koinfekci Sinai-like viru A a *N. ceranae* a nižší při koinfekci s *Varroa* (obrázek 15).



Obrázek 15- Zastoupení viru Sinai-like viru A (LSV-A) v přítomnosti a absenci parazita *Nosema ceranae*. Zastoupení zobrazené na logaritmické škále.

Jednotlivé identifikované varianty podskupiny Sinai-like virů B byly nejbližší několika izolátům pocházejícím z Austrálie, Sinai-like viru D izolátu z Nizozemska, Sinai-like viru C izolátu z Jihoafrické republiky a Sinai-like viru E byl nejbližší izolátu z Číny. Sekvence Sinai-like viru A byly nejbližší izolátu ze Slovinska. Ale sekvence v databázi zatím pocházejí pouze z několika studií, a tedy i pouze z několika zemí (obrázek 16).

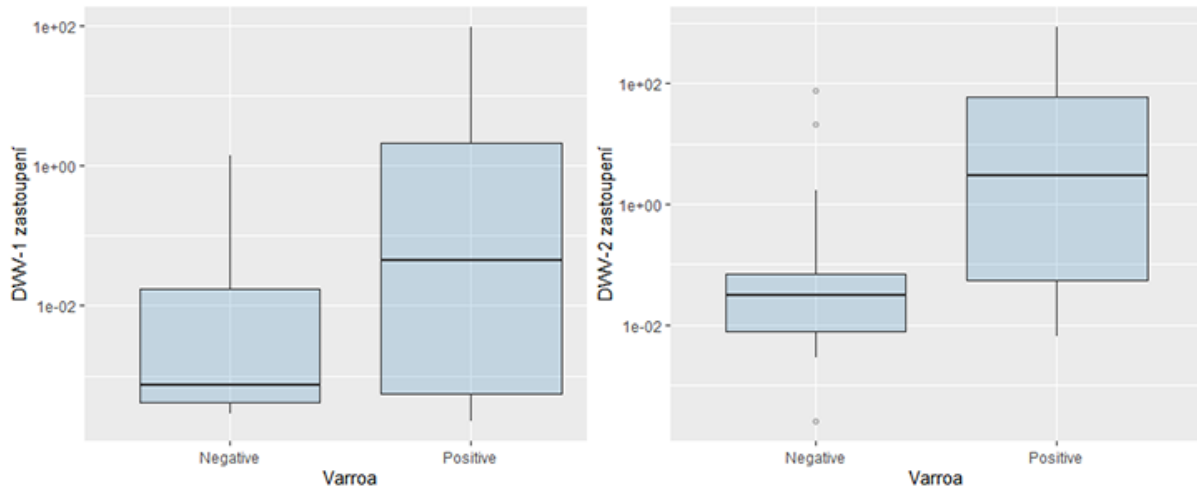


Obrázek 16- Fylogenetický strom LSV-like sekvencí spolu s reprezentativními sekvencemi z Genbank. Tučně vyznačené mnou získané sekvence. Jednotlivé uzly mají zobrazenou hodnotu podpory získané bayesovskou metodou a bootstrap hodnoty (získané metodou maximální věrohodnosti).

#### 4.4.2. DWV

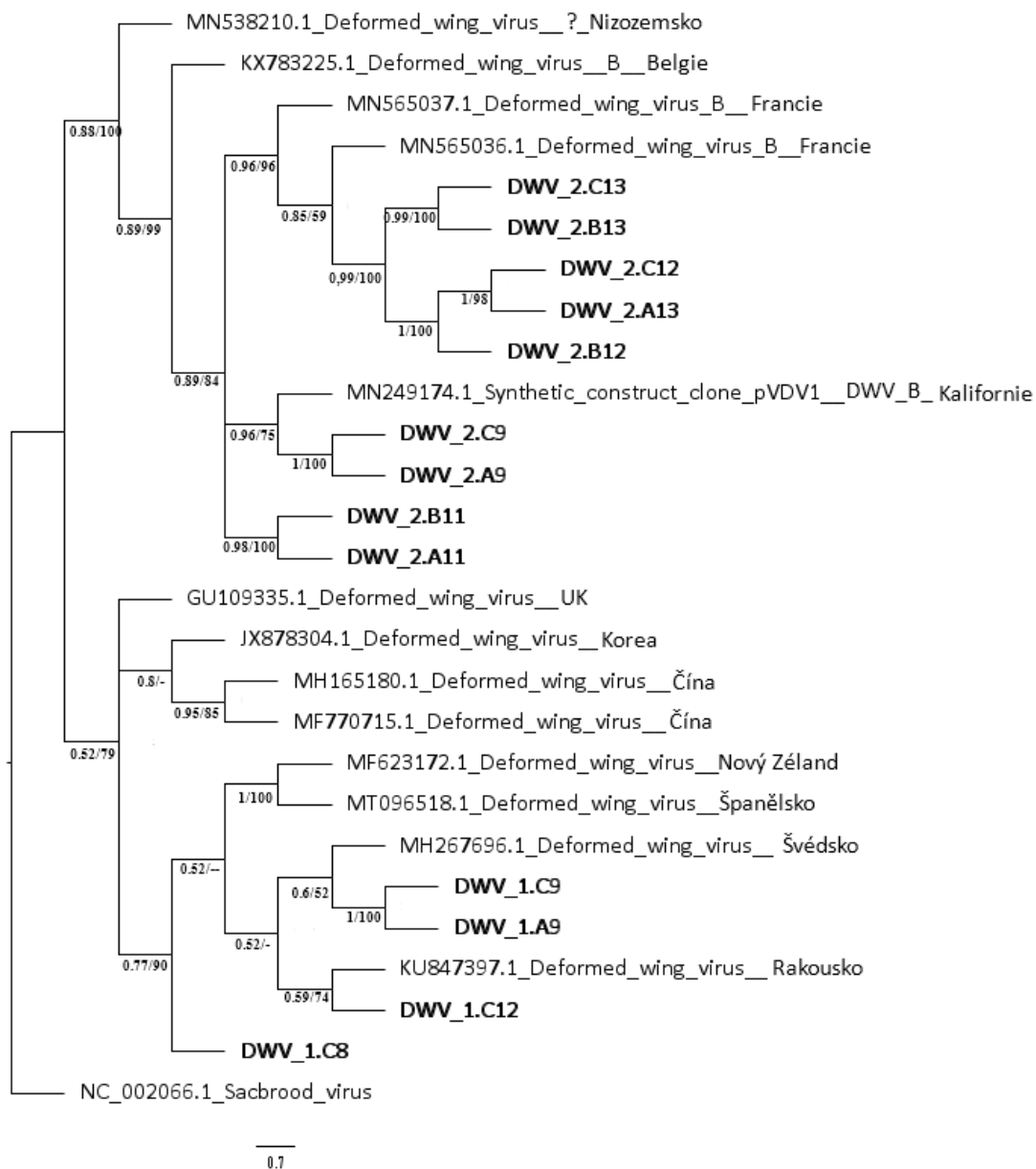
Z dat bylo možné kromě jiných získat 13 unikátních sekvencí DWV virů s kompletním pokrytím, 4 DWV-1 (DWV-A) a 9 DWV-2 (DWV-B) (obrázek 18). Právě DWV-2 patřil v našich datech mezi nejčastěji přítomné viry (obrázek 13). Ve většině případů byly jak u DWV- 1, tak DWV-2 pozitivní všechny vzorky z triplikátu, nebo naopak žádný. I když v datech převažoval DWV-2, bylo možné oba viry nalézt pohromadě (15 vzorků); při současném výskytu bylo možné pozorovat oba viry buď s podobným zastoupením, nebo bylo zastoupení DWV-2

několikrát větší. Zároveň bylo zastoupení obou DWV virů průměrně vyšší, pokud byl detekován *Varroa* ve včelstvu jak pomocí PCR nebo makroskopicky (obrázek 17).



Obrázek 10- Ukazuje zastoupení DWV-1 a DWV-2 v přítomnosti a absenci roztoče *Varroa* ve včelstvu. Zastoupení jsou zobrazené na logaritmické škále.

Sekvence virů DWV izolované ze stejného včelstva byly velmi blízké, např. 9A a 9C jak pro DWV-1, tak DWV-2. Sekvence DWV-1 a DWV-2 tvořily skupiny vždy s DWV-A (označován jako pouze Deformed wing virus) a DWV-B (označovány jako Deformed wing virus B). Ve většině případů pocházely nejbližší izoláty s nejpodobnějšími sekvencemi z evropských zemí (obrázek 17).



Obrázek 11- Fylogenetický strom sekvencí DWV virů spolu s reprezentativními sekvencemi z Genbank. Tučně vyznačené mnou získané sekvence. Jednotlivé uzly mají zobrazenou hodnotu podpory získané bayesovskou metodou a bootstrap hodnoty (získané metodou maximální věrohodnosti).



## 5. Diskuze

I když nejsou zimní ztráty včel nebo zhroucení kolonií novým fenoménem, v posledních letech jsou ztráty včelstev větší, zejména lokálně zvýšený úhyn včelstev. Se zvýšenou potřebou opylovačů pro zemědělství je jejich dopad o to závažnější. Výzkum se tedy zaměřuje na identifikaci faktorů, které by za ztráty mohly být zodpovědné.

Jedním z mnoha faktorů jsou právě virové infekce, řada z nichž má u včel dlouhou historii, především ty skupiny, které vyvolávají pouhým okem nápadné projevy. Právě v posledních letech, hlavně díky sekvenování nové generace, se podařilo objevit velké množství nových virů infikující včelu. Řada infekcí těmito novými viry probíhá bezpříznakově, nebo přesněji nebyly zatím spojeny s žádnou patologií. Je tedy pravděpodobné, že ve většině případů probíhají infekce těmito viry pouze mírně nebo bezpříznakově.

Kromě virů samotných je možné u včel často pozorovat koinfekce řady virů, ale i koinfekce virů s jinými patogeny jako je *Varroa* nebo *Nosema spp.*, které často zhoršují průběh virové infekce, nebo v případě *Varroa* slouží jako vektor pro virus. Oproti silnému vztahu s neviróvými patogeny, o interakcích mezi jednotlivými viry není mnoho známo. Zatím byly objeveny některé vztahy jako kompetice s jiným virem nebo závislost na jiném viru, a patrně budou objeveny další formy vzájemných interakcí. Jejich studium by výrazně posunula vpřed existence vhodných buněčných kultur pro studium těchto virů.

Studium virů u včel je tedy zaměřováno hlavně na objev nových virů, které mohou mít zatím neznámý efekt na včelstva, vztahy mezi viry a patogeny ve zdravých a kolabujících včelstvech, interakci mezi viry, a také na dynamiku a faktory virulence u známých virů.

Tato studie byla zaměřená na zdravá včelstva a složení jejich viromu, ověření použité metodického přístupu pro analýzu viromu a její robustnosti, závislosti složení viromu na různých faktorech (lokalita, léčba proti *Varroa*, poddruh včel). Virom byl prozkoumán pomocí sekvenování nové generace. Pro izolaci NK byl použit protokol, který umožňuje zachytit celé spektrum virů lišících se v mnoha parametrech (velikost, obal, genom). Vzorky pocházely ze 13 včelstev a byly zpracovávány v biologických triplikátech. Každý replikát pocházel z 9 jedinců. Byla zjištěna příbuznost včelstev na základě jejich COI-COII sekvence. Pomocí PCR byla zjištěna přítomnost neviróvých patogenů, hlavně přítomnost *Varroa* a *Nosema spp.*, které mají silné vztahy s některými viry.

Je obtížné určit přesný důvod pro odlišné výsledky provedené taxonomie poddruhů včel, a informací které nám byly poskytnuty od včelařů. Jedním z těchto důvodů může být nespolehlivost COI-COII jako markeru. Může například docházet k mutacím v místě nasedání primerů a dojít k preferenční amplifikaci sekvence která není nejvíce zastoupená (Deagle *et al.*, 2014). Což by v případě naší analýzy, kdy vzorek pocházel z několika jedinců mohlo být problematické. I když je tento variabilní segment spolehlivý pro zařazení do vyšších taxonomických skupin (Kono & Kohn, 2015), pro podrobnější zařazení by byla vhodná rozsáhlá databáze všech včelích poddruhů, která zatím neexistuje. Další důvod může být vysoká úroveň hybridizace včelstev. Hlavně díky jejich dlouhé historii v určitých územích mohlo dojít ke křížení mezi poddruhy, a dnes se sekvenčně liší od své původní linie (Jensen *et al.*, 2005). Nejspíše jsou tedy včelstva do jisté míry hybridizována a/nebo metodika není plně spolehlivá. Moje výsledky ukazují na potřebu kvalitní a spolehlivé metodiky, která by byla schopna přesně určit jejich příbuznost. Pro další analýzu byly tedy použity informace o poddruhu získané od včelařů.

Protokol, podle kterého byly knihovny připravovány, byl upraven téměř v každém kroku (včetně firemních protokolů u kitů) a optimalizován pro zachycení co nejvyšší virové diverzity (Conceição-Neto *et al.*, 2015). Protokol byl úspěšně použit na řadu organismů od bezobratlých po vlky (Conceição-Neto *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2019; Deboutte *et al.*, 2020). Při jeho optimalizaci byly sledovány viry co největší diverzity v uměle vytvořeném vzorku, který obsahoval řadu virů; ssDNA (*Circoviridae*, *Parvoviridae*) dsDNA (*Polyomaviridae*, *Herpesvirus*, *Myoviridae*, *Mimiviridae*), ssRNA (*Alphaflexiviridae*, *Coronaviridae*) dsRNA (*Reoviridae*), s genomy o velikosti genomu 1,8- 1 181 kb a virionu 17 až ~500-700 nm, obalené i neobalené. V jednotlivých krocích byl sledován titr těchto virů pomocí qPCR, jednotlivé kroky byly upravovány, aby byla daným postupem vnesena co nejmenší chyba, zachována diversita virů a odstraněno co nejvíce sekvencí nevirového charakteru. Tímto protokolem by tedy měly být identifikovatelné odlišné viry nezávisle na jejich vlastnostech, jako jsou velikost genomu, přítomnost obalu či druh genomu (Conceição-Neto *et al.*, 2015). I v námi získaných datech bylo možné nalézt řadu různých typů virů. Největším problémem při použití metody NGS je detekce velkých DNA virů. V našich materiálech jsem ale velké DNA viry detekovala, včetně virů patřící do čeledi *Mimiviridae* a jediného včelího velkého DNA viru AmFV. Potvrdila jsme tedy, že tento protokol i v naší laboratoři poskytuje možnost identifikace velmi rozdílných virů u včel.

Většina virů objevených u *Apis mellifera* jsou RNA viry, přesněji +ssRNA. I když byla objevena řada další jako *Rhabdoviridae* nebo *Partitiviridae* (Remnant *et al.*, 2017; Roberts *et al.*,

2018; Galbraith *et al.*, 2018), +ssRNA viry jsou stále nejvíce zastoupenou skupinou virů u tohoto hostitele. Z části by to mohlo být dáno metodikou, neboť řada publikovaných studií se zaměřovala pouze na RNA viry. Nicméně i studie, které byly cílené na objevení nových virů odlišného charakteru sice nové viry identifikovaly, ale převážně opět náležely mezi ssRNA viry (Galbraith *et al.*, 2018). Také naše data potvrzují možnost identifikace odlišných virů. I když se tedy zdá složení viromu včel téměř výhradně ze ssRNA virů neobvyklé, je možné, že složení viromu mezi různými druhy bezobratlých bude odlišné. Byly například pozorovány rozdíly ve složení viromu u dvou bezobratlých, kdy vzorky *Aedes aegypti* obsahovaly více eukaryotických virů oproti *Culex quinquefasciatus* který měl bohatší a více diverzní populace bakteriofágů (Shi *et al.*, 2019). Je tedy možné že virom *A. mellifera* se bude skládat z velmi diverzních populací eukaryotických RNA virů a stejně tak diverzních populací bakteriofágů (Bonilla-Rosso *et al.*, 2020; Deboutte *et al.*, 2020), a nemusí to být mezi bezobratlými ojedinělý případ.

V našich vzorcích jsme našli i řadu virů infikující rostliny. I když se obecně předpokládá, že tyto sekvence jsou kontaminace z potravy včel, není možné vyloučit, že by mezi nimi mohl být virus včelí, ne rostlinný. Existují studie, které zkoumaly hostitelské vztahy včelích a rostlinných virů v rostlině a včele. Studie provedená Li a kol. našla replikaci viru rostlin ve včele, ale byla později kritizována (Li *et al.*, 2014; Miller *et al.*, 2014; Cornman, 2017). Pozorování replikace včelího viru v rostlině pochází ze staršího článku, který je nedostupný v archivech (Cole & Morris, 1979 citováno podle Lommel *et al.*, 1985). Ale široké hostitelské spektrum některých virů nemusí být vzácný nebo unikátní jev (Jiwaji *et al.*, 2019). I když jsou ve většině případů rostlinné viry považovány za kontaminaci díky pylu, nelze vyloučit, že by tyto viry mohly mít hostitelský vztah se včelou. Pravděpodobněji ale existují viry, o nichž se pouze předpokládá, že infikují rostliny na základě jejich sekvenční podobnosti s viry v čeledích, o kterých je známo, že infikují pouze rostliny. Ale jejich podobnost nemusí jistě znamenat, že mají stejného hostitele. Například sekvence BeeMLV byly zpočátku pokládány za rostlinný virus díky jejich podobnosti s rostlinnými viry řádu *Tymovirales*, a to až do popsání dalšího viru bezobratlých v tomto řádu (de Miranda *et al.*, 2015).

V naší studii je velmi důležitým výstupem statisticky signifikantní závislost složení viromu na včelstvu, ze kterého pocházely. V případě analýzy veškerých virových sekvencí bylo možné pozorovat shlukování vzorků podle včelstva. Toto shlukování se z velké části rozpadlo v případě, kdy byly do analýzy zařazené pouze včelí virové sekvence.

To by mohlo být dáno několika faktory. Prvním a velmi důležitým je přítomnost řady bakteriofágů, skupiny virů, která zatím nebyla u včel příliš studována. Ukazuje se, že diverzita

bakteriofágů je obrovská, má rychlou dynamiku a její složení nejspíše bude reagovat na řadu faktorů. Dosud byl tento vztah popsán pro lokaci a rok sběru (Deboutte *et al.*, 2020). Zatím nebylo možné nalézt bakteriofágy ubikviterně přítomné a nalezené sekvence bakteriofágů se pouze zřídka opakují mezi různými vzorky plošného sběru (Bonilla-Rosso *et al.*, 2020; Deboutte *et al.*, 2020). Právě v našich výsledcích bylo možné nalézt velké množství bakteriofágů, jejichž přítomnost mohla významně ovlivnit podobnost vzorků. S bakteriofágy souvisí i složení bakteriálního mikrobiomu. Díky jeho specializovanému charakteru je možné nalézt nějaké druhy téměř vždy (Zheng *et al.*, 2019), ale ukazuje se, že jejich kmeny budou diverzní, a na této úrovni do jisté míry specifické pro jednotlivce ve včelstvu (Ellegaard & Engel, 2019). V případě takto vysoké diverzity v jedincích budou společné rysy bakteriální komunity a jejich bakteriofágů významnější, ve srovnání s podobností nalezených sekvencí mezi jedinci. A budou tedy zvyšovat výši nalezené podobnosti mezi vzorky pocházející ze stejného včelstva, a tedy i prostředí.

Nejpodobnější byl virom u včelstev, které pocházely ze stejné kolonie, lišil se pouze úl, ze kterého byly odebrány. Jejich podobnost lze vysvětlit díky velmi podobným environmentálním faktorům a jejich odlišnost bude dána hlavně minoritními rozdíly v podmínkách kterým byly včelstva vystavena, např. zavlečením viru z potravy. Kromě závislosti složení viromu na včelstvu byla pozorována závislost na lokalitě a slabá závislost na poddruhu včel. Tyto údaje vysvětlily pouze malé procento variability mezi vzorky. Navíc byl z hlediska lokality a poddruhu náš soubor vzorků značně nevyrovnaný, např. z nejvíce zastoupené oblasti jsem měla vzorky jen z jednoho poddruhu (JV/Kraňská, tabulka 3).

V případě pouze virů infikující *A. mellifera* nebylo možné pozorovat stejné závislosti jako v případě všech virových sekvencí (viz výše). Předpokládáme, že příčinou je rozptýl pozitivit/četnosti pro daný virus mezi jednotlivými triplikáty (kromě DWV), a tudíž i rozdíly mezi jedinci pocházejícími ze stejného včelstva. I spojování 9 včel, v některých případech, nezabránilo tomu, aby zastoupení jednoho viru v knihovně bylo majoritní. Zdá se tedy, že virová nálož a diverzita virů, jsou velmi odlišné u jedinců v jednom včelstvu. Toto je zásadní pozorování pro další studie, kdy bude nutné sledovat viry u izolovaných jedinců nebo spojit pro analýzu viromu NK z velkého množství jedinců. V každém případě bude pro přiblížení skutečného stavu virocenózy ve včelstvu nutné studovat soubor vyšších desítek jedinců. Momentálně se používají analýzy pocházející z několika stupňů slučování jedinců: pár jedinců (2) nebo individuálně, ~10 včel a nebo velké množství (25+), např. (Roberts *et al.*, 2018; Galbraith *et al.*, 2018; Deboutte *et al.*, 2020). Zároveň se také ukazuje, že sloučení středního množství jedinců nemusí mít vliv

na počet sekvencí získaných pomocí NGS, např. v práci Shi et al. Autoři nepozorovali změnu v počtu čtení získaných z jednoho jedince nebo sloučením pěti jedinců (Shi *et al.*, 2019). Vzhledem k tomu, že zatím nebyly nalezeny vždy přítomné viry, alespoň co se týče včelích eukaryotických virů, tak sekvenace pocházející z minimálního množství včel by mohla být výhodnější pro tyto studie, ale jedná se o finančně velmi náročné řešení.

Oproti ostatním včelím virům se v naší studii DWV nacházel, ve většině případů, ve všech třech, nebo alespoň ve dvou replikátech z jednoho včelstva (80 % DWV-A, 85 % DWV-B; pro dva ze tří 20 % DWV-A a 15% DWV-B) V případě DWV-B předpokládáme, že konzistentní nález mezi triplikáty je dán jeho vysokou prevalencí v rámci České republiky. Výskyt obou typů u všech jedinců, kde DWV byl identifikovaný je možné přičíst vysoké míře promoření jedinců v populaci včelstva. Vysoká prevalence DWV-B, oproti DWV-A je, v souladu se světovým trendem (Norton *et al.*, 2020). Také bylo nalezeno vyšší zastoupení DWV virů, více pro DWV-B, pokud byl ve vzorcích/úlu simultánně detekován i roztoč *Varroa*. To odpovídá již diskutovanému vztahu těchto dvou patogenů (1.3.2). Ale metoda NGS neudává kvantitu virů, a proto bude nutné jakékoliv vztahy nalezené mezi viry a patogeny ověřit qPCR, ideálně na velkém množství jedinců z jednotlivých včelstev.

Překvapivě, *Apis* rhabdovirus- 1 a 2 (BRV- 1,2) bylo možné najít ve vzorcích výlučně společně (100 %), přičemž BRV- 1 byl vždy čteněji zastoupený. Podobný trend byl pozorován i v dřívější studii Remnant a spol., kde bylo možné v sekvenačních datech detekovat oba rhabdoviry. Nacházely se společně u 67 % lokalit a zastoupení sekvencí pro BRV-1 byl vždy vyšší oproti BRV-2, který bylo také možné nalézt pouze spolu s BRV-1 (Remnant *et al.*, 2017). Tyto koinfekce by mohly být dány např. společným mechanismem přenosu nebo sezonním výskytem, ale vzhledem k závislosti BRV-2 na BRV-1, by mohla existovat interakce mezi těmito viry. Zatímco detekované zastoupení BRV-1 není BRV-2 ovlivněno (Remnant *et al.*, 2017), množství detekovaných sekvencí BRV-2 je závislé na výskytu BRV-1. Tato závislost by mohla být způsobena řadou mechanismů, jedním z nich by mohla být nepřímá interakce (např. ovlivnění genové exprese/imunitního systému), při níž by infekce BRV-1 predisponovala jedince k infekci BRV-2. Další možnost je „defekt“ v nějakém produktu viru BRV-2, který tak není schopen reprodukce, a chybějící funkce je nahrazena produktem z BRV-1. Tento hypotetický protein by mohl být zodpovědný za jakoukoliv část virového cyklu od replikace po přenos mezi jedinci, a opět z jakéhokoliv důvodu být neschopný naplnit jeho funkci v hostiteli. Opět by bylo vhodné provést komplexní kvantitativní analýzu v jedincích, a případně další analýzu např. jejich genomů a genových produktů za účelem odhalení důvodu této závislosti.

I když není neobvyklé nalézt řadu různých variant LSV virů v jednom jedinci (Ravoet *et al.*, 2015b), byla jejich diverzita v našich vzorcích překvapivě vysoká. Bylo možné nalézt i 4 různé varianty v jednom vzorku. To ovšem může být i způsobeno spojováním materiálu pro analýzu viromu z několika jedinců. I když bylo dodnes nalezeno velké množství variant LSV (Ravoet *et al.*, 2015b; Daughenbaugh *et al.*, 2015; Roberts *et al.*, 2017), některé ze Sinai-like virů nalezených v našich vzorcích měly pouze málo velmi blízkých sekvencí v databázi (viz tabulka 10 a fylogram 16). Diverzita LSV virů je tedy obrovská a je pravděpodobné, že budou popsány další varianty, a pravděpodobně tedy půjde o celosvětově rozšířený a prevalentní virus s vysokou mírou diverzifikace (Daughenbaugh *et al.*, 2015; Roberts *et al.*, 2017). Ve vzorcích bylo nalezeno 5 různých hlavních sekvenčních typů LSV, které byly nejpodobnější sekvencím z několika kontinentů, a jedná se o první kompletní genomy LSV virů pocházející z České republiky. Stejně tak byly získány první sekvence *Apis* rhabdoviru 1 a 2, a *Apis mellifera* orthomyxoviru v České republice.

Bylo také možné nalézt vyšší zastoupení LSV viru (Sinai-like virus A, nejpodobnější LSV-3) v přítomnosti *N. ceranae* a nižší při koinfekci s *Varroa*. Pozitivní vztah mezi LSV-2 a *Nosema* byl pozorován již dříve spolu s negativním vztahem s *Varroa* (Traynor *et al.*, 2016). Negativní vztah s *Varroa* by mohl být způsoben i kompeticí LSV viru s virem, který je asociován s *Varroa*. Asociace LSV s *N. ceranae* by mohla souviset s možností, že LSV viry byly popsány již dříve jako Bee virus Y a Bee virus X (de Miranda *et al.*, 2013). Infekce oběma těmito viry probíhají jako bezpříznaková infekce, ale u Bee viru Y byl pozorován větší dopad na zdraví včel při koinfekci s *N. apis*, zatímco Bee virus X byl asociován s parazitickou amébou včel *Malpighamoeba mellificae* (Bailey & Woods, 1974; Bailey *et al.*, 1983). Informace o těchto virech jsou historické a v základních rysech neúplné, nicméně víme, že tyto RNA viry vyvolávají bezpříznakovou infekci, a také mají s LSV viry podobnou morfologii a sezonní výskyt. Vzhledem k prevalenci a rozšíření LSV virů je nepravděpodobné, že by tyto viry nebyly identifikovány již dříve, potenciálně jako Bee virus X/Y.

V našich vzorcích bylo možné nalézt BRV-1 a 2, spolu s *Apis mellifera* orthomyxovirus. Tyto viry byly dříve identifikovány ve *Varroa* (Levin *et al.*, 2017; Levin *et al.*, 2019) a předpokládá se, že mezi nimi existuje vztah, buď hostitelský, nebo *Varroa* slouží pro tyto viry jako vektor. Tyto viry byly nalezené ve větších množstvích než viry, u kterých se předpokládá, že je *Varroa* hostitel (viz kap.1.3.4), a pravděpodobně je tedy jejich hostitelem spíše *A. mellifera*.

I když bylo navrženo, že *Varroa* by mohl fungovat jako vektor pro BRV (Remnant *et al.*, 2017), virus bylo v mých vzorcích možné pozorovat s vysokou četností i v nepřítomnosti

roztoče. Potvrzení existence vztahu BRV a *Varroa* není z našich dat možné, jednak díky nízkému výskytu tohoto viru mezi v našich materiálech a z důvodu limitace NGS metody, která poskytuje jen semikvantitativní odhad zastoupení virů. Limitovanou závislost na *Varroa* podporuje i nález tohoto viru ve čmelácích (*Bombus impatiens*), kteří nejsou parazitováni *Varroa* (Levin *et al.*, 2017). *Apis mellifera* orthomyxovirus byl, oproti BRV, pozorován častěji a s větší četností v přítomnosti *Varroa*, což může naznačovat, že tento virus může mít vztah s tímto parazitem. Ve studii Levina byl také pozorován vztah s *Apis mellifera* orthomyxoviru s *Varroa*, ale jednalo o častější výskyt viru u roztoče než u včel (Levin *et al.*, 2019). Opět je nutné zmínit, že pozorované vztahy je nutné potvrdit metodou umožňující kvantifikaci patogenů.

Sekvenční data budou vloženy do SRA (NCBI), a získané kompletní sekvence jednotlivých virů do Genbank (NCBI).

## 6. Souhrn

Ve studii jsem použila citlivou metagenomickou metodu, která umožňuje záchyt širokého spektra virů rozdílných charakteristik. Analýza viromu byla provedena na skupinách zdravých včel, u nichž bylo dále provedeno taxonomické zařazení a ověřena míra parazitace dalšími významnými patogeny. Bylo zjištěno že virom, v němž jsou nejčteněji zastoupené bakteriofágy, je do jisté míry specifický pro včelstvo. Zastoupení eukaryotických virů infikující přímo včelu má ale velmi odlišné zastoupení a nálož mezi jedinci ve včelstvu. Hlavně odlišné složení včelích virů u jednotlivců je důležité pro další studie, protože často používaná metodika slučování ~10 jedinců pro jeden vzorek nemusí odhalit všechny možné vlastnosti virů a případné interakce s jinými viry nebo neviróvými patogeny. Ve studii samotné byla objevena velká diverzita některých skupin virů a byly identifikovány viry, které zatím v České republice nebyly objeveny. Výsledky naznačily, že mohou mezi viry a patogeny existovat vztahy, které dosud nebyly pozorovány. Pro další ověření a upřesnění pozorovaného výskytu včelích virů a vztahů výskytu těchto virů k lokalitě, k jiným virům a patogenům je třeba použít kvantitativní metody, cílené na jednotlivé patogeny. Výrazným posunem v poznání by byla i možnost *in vitro* pokusů na buňkách kulturách.



## 7. Seznam použité literatury

- Alger, S.A., Burnham, P.A., Boncristiani, H.F., Brody, A.K., 2019a. RNA virus spillover from managed honeybees (*Apis mellifera*) to wild bumblebees (*Bombus spp.*). *PLoS One* 14.
- Alger, S.A., Burnham, P.A., & Brody, A.K. (2019b) Flowers as viral hot spots: Honey bees (*Apis mellifera*) unevenly deposit viruses across plant species. *PLoS One* 14
- Anderson, D.L., & Fuchs, S. (1998) Two genetically distinct populations of *Varroa jacobsoni* with contrasting reproductive abilities on *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research* 37: 69–78.
- Annoscia, D., Brown, S.P., Di Prisco, G., De Paoli, E., Del Fabbro, S., Frizzera, D., *et al.* (2019) Haemolymph removal by *Varroa* mite destabilizes the dynamical interaction between immune effectors and virus in bees, as predicted by Volterra's model. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 286: 20190331.
- Aurori, A.C., Bobiş, O., Dezmirean, D.S., Mărghițaș, L.A., & Erler, S. (2016) Bay laurel (*Laurus nobilis*) as potential antiviral treatment in naturally BQCV infected honeybees. *Virus Res* 222: 29–33.
- Bailey, L. (1969) The multiplication and spread of Sacbrood virus of bees. *Ann Applied Biology* 63: 483–491.
- Bailey, L., Ball, B.V., & Perry, J.N. (1981) The prevalence of viruses of honey bees in Britain. *Annals of Applied Biology* 97: 109–118.
- Bailey, L., Ball, B.V., & Perry, J.N. (1983) Association of viruses with two protozoal pathogens of the honey bee. *Annals of Applied Biology* 103: 13–20.
- Bailey, L., Carpenter, J.M., & Woods, R.D. (1979) Egypt Bee Virus and Australian Isolates of Kashmir Bee Virus. *Journal of General Virology*, 43: 641–647.
- 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. *Journal of General Virology* 2: 251–260.
- 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. *Journal of General Virology*, 37: 175–182.
- Ball, B.V., & Allen, M.F. (1988) The prevalence of pathogens in honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Ann Applied Biology* 113: 237–244.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., *et al.* (2012) SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J Comput Biol* 19: 455–477.
- Barroso-Arévalo, S., Vicente-Rubiano, M., Molero, F., Puerta, F., & Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2019) Nucleotide sequence variations may be associated with virulence of deformed wing virus. *Apidologie* 50: 482–496.
- Benaets, K., Van Geystelen, A., Cardoen, D., De Smet, L., Graaf, D.C. de, Schoofs, L., *et al.* (2017) Covert deformed wing virus infections have long-term deleterious effects on honeybee foraging and survival. *Proc Biol Sci* 284
- Benjeddou, M., Leat, N., & Davison, S. (2002) Black queen-cell virus RNA is infectious in honey bee pupae. *Journal of Invertebrate Pathology* 81: 205–206.
- Bigot, D., Dalmon, A., Roy, B., Hou, C., Germain, M., Romary, M., *et al.* (2017) The discovery of Halictivirus resolves the Sinaivirus phylogeny. *Journal of General Virology*, 98: 2864–2875.
- Bolger, A.M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30: 2114–2120.
- Bonilla-Rosso, G., Steiner, T., Wichmann, F., Bexkens, E., & Engel, P. (2020) Honey bees harbour a diverse gut virome engaging in nested strain-level interactions with the microbiota. *PNAS* 117: 7355–7362.
- Brettell, L.E., Mordecai, G.J., Schroeder, D.C., Jones, I.M., Silva, J.R. da, Vicente-Rubiano, M., & Martin, S.J. (2017) A Comparison of Deformed Wing Virus in Deformed and Asymptomatic Honey Bees. *Insects* 8
- Buchfink, B., Xie, C., & Huson, D.H. (2015) Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat Methods* 12: 59–60.
- Campbell, E.M., Budge, G.E., Watkins, M., & Bowman, A.S. (2016) Transcriptome analysis of the synganglion from the honey bee mite, *Varroa destructor* and RNAi knockdown of neural peptide targets. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 70: 116–126.

- 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**
- Clark, T.B. (1978) A filamentous virus of the honey bee. *Journal of Invertebrate Pathology* **32**: 332–340.
- Cole, A., & Morris, T.J. (1979) Evidence for the replication of an invertebrate virus in plants. *Phytopathology* **69**:914.
- Conceição-Neto, N., Mesquita, J.R., Zeller, M., Yinda, C.K., Álvares, F., Roque, S., *et al.* (2016) Reassortment among picobirnaviruses found in wolves. *Arch Virol* **161**: 2859–2862.
- Conceição-Neto, N., Zeller, M., Lefrère, H., De Bruyn, P., Beller, L., Deboutte, W., *et al.* (2015) Modular approach to customise sample preparation procedures for viral metagenomics: a reproducible protocol for virome analysis. *Scientific Reports* **5**: 16532.
- Cornman, R.S. (2017) Available Genetic Data Do Not Support Adaptation of Tobacco Ringspot Virus to an Arthropod Host. *mBio* **8**
- Cornman, R.S. (2019) Relative abundance and molecular evolution of Lake Sinai Virus (Sinaivirus) clades. *PeerJ* **7**
- Coulon, M., Schurr, F., Martel, A.-C., Cougoule, N., Bégaud, A., Mangoni, P., *et al.* (2018) Metabolisation of thiamethoxam (a neonicotinoid pesticide) and interaction with the Chronic bee paralysis virus in honeybees. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **144**: 10–18.
- Dalmon, A., Desbiez, C., Coulon, M., Thomasson, M., Le Conte, Y., Alaux, C., *et al.* (2017) Evidence for positive selection and recombination hotspots in Deformed wing virus (DWV). *Sci Rep* **7**
- D’Alvise, P., Seeburger, V., Gihring, K., Kieboom, M., & Hasselmann, M. (2019) Seasonal dynamics and co-occurrence patterns of honey bee pathogens revealed by high-throughput RT-qPCR analysis. *Ecol Evol* **9**: 10241–10252.
- 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.
- Deagle, B.E., Jarman, S.N., Coissac, E., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2014) DNA metabarcoding and the cytochrome c oxidase subunit I marker: not a perfect match. *Biology Letters* **10**: 20140562.
- Deboutte, W., Beller, L., Yinda, C.K., Maes, P., Graaf, D.C. de, & Matthijssens, J. (2020) Honey-bee-associated prokaryotic viral communities reveal wide viral diversity and a profound metabolic coding potential. *Proc Natl Acad Sci USA* **117**: 10511–10519.
- DeGrandi-Hoffman, G., Chen, Y., & Simonds, R. (2013) The Effects of Pesticides on Queen Rearing and Virus Titers in Honey Bees (*Apis mellifera* L.). *Insects* **4**: 71–89.
- Di Prisco, G., Annoscia, D., Margiotta, M., Ferrara, R., Varricchio, P., Zanni, V., *et al.* (2016) A mutualistic symbiosis between a parasitic mite and a pathogenic virus undermines honey bee immunity and health. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**: 3203–3208.
- Di Prisco, G., Pennacchio, F., Caprio, E., Boncristiani, H.F., Evans, J.D., & Chen, Y. (2011) *Varroa destructor* is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of General Virology*, **92**: 151–155.
- Dobbelaere, W., Graaf, D.C. de, & Peeters, J.E. (2001) Development of a fast and reliable diagnostic method for American foulbrood disease (*Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*) using a 16S rRNA gene based PCR. *Apidologie* **32**: 363–370.
- Dolezal, A.G., Carrillo-Tripp, J., Judd, T.M., Allen Miller, W., Bonning, B.C., & Toth, A.L. (2019) Interacting stressors matter: diet quality and virus infection in honeybee health. *Royal Society Open Science* **6**: 181803.
- Doublet, V., Labarussias, M., 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.
- Dubois, E., Dardouri, M., Schurr, F., Cougoule, N., Sircoulomb, F., & Thiéry, R. (2020) Outcomes of honeybee pupae inoculated with deformed wing virus genotypes A and B. *Apidologie* **51**: 18–34.
- Ellegaard, K.M., & Engel, P. (2019) Genomic diversity landscape of the honey bee gut microbiota. *Nature Communications* **10**: 446.
- Ellis, J.D., & Munn, P.A. (2005) The worldwide health status of honey bees. *Bee World* **86**: 88–101.
- Erban, T., Harant, K., Hubalek, M., Vitamvas, P., Kamler, M., Poltronieri, P., *et al.* (2015) In-depth proteomic analysis of *Varroa destructor*: Detection of DWV-complex, ABPV, VdMLV and honeybee proteins in the mite. *Scientific Reports* **5**: 13907.

- Erban, T., Sopko, B., Kadlikova, K., Talacko, P., & Harant, K. (2019) *Varroa destructor* parasitism has a greater effect on proteome changes than the deformed wing virus and activates TGF- $\beta$  signaling pathways. *Sci Rep* **9**: 1–19.
- Forsgren, E., Locke, B., Sircoulomb, F., & Schäfer, M.O. (2018) Bacterial Diseases in Honeybees. *Curr Clin Micro Rpt* **5**: 18–25.
- Galbraith, D.A., Fuller, Z.L., Ray, A.M., Brockmann, A., Frazier, M., Gikungu, M.W., *et al.* (2018) Investigating the viral ecology of global bee communities with high-throughput metagenomics. *Sci Rep* **8**: 1–11.
- Galili, T., O’Callaghan, A., Sidi, J., & Sievert, C. (2018) heatmaply: an R package for creating interactive cluster heatmaps for online publishing. *Bioinformatics* **34**: 1600–1602.
- Garnery, L., Cornuet, J.-M., & Solignac, M. (1992) Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Molecular Ecology* **1**: 145–154.
- Garnery, L., Solignac, M., Celebrano, G., & Cornuet, J.-M. (1993) A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. *Experientia* **49**: 1016–1021.
- Gauthier, L., Cornman, S., Hartmann, U., Cousserans, F., Evans, J.D., Miranda, J.R. de, & Neumann, P. (2015) The *Apis mellifera* Filamentous Virus Genome. *Viruses* **7**: 3798–3815.
- Gisder, S., Aumeier, P., & Genersch, E. (2009) Deformed wing virus: replication and viral load in mites (*Varroa destructor*). *J Gen Virol* **90**: 463–467.
- Gisder, S., Möckel, N., Eisenhardt, D., & Genersch, E. (2018) In vivo evolution of viral virulence: switching of deformed wing virus between hosts results in virulence changes and sequence shifts. *Environmental Microbiology* **20**: 4612–4628.
- Giuffrè, C., Lubkin, S.R., & Tarpy, D.R. (2019) Does viral load alter behaviour of the bee parasite *Varroa destructor*? *PLoS One* **14**
- Gong, H.-R., Chen, X.-X., Chen, Y.P., Hu, F.-L., Zhang, J.-L., Lin, Z.-G., *et al.* (2016) Evidence of *Apis cerana* Sacbrood virus Infection in *Apis mellifera*. *Appl Environ Microbiol* **82**: 2256–2262.
- Govan, V.A., Brözel, V., Allsopp, M.H., & Davison, S. (1998) A PCR detection method for rapid identification of *Melissococcus pluton* in honeybee larvae. *Appl Environ Microbiol* **64**: 1983–1985.
- Gray, A., Brodschneider, R., Adjlane, N., Ballis, A., Brusbardis, V., Charrière, J.-D., *et al.* (2019) Loss rates of honey bee colonies during winter 2017/18 in 36 countries participating in the COLOSS survey, including effects of forage sources. *Journal of Apicultural Research* **58**: 479–485.
- Guo, Y., Goodman, C.L., Stanley, D.W., & Bonning, B.C. (2020) Cell Lines for Honey Bee Virus Research. *Viruses* **12**
- Hails, R.S., Ball, B.V., & Genersch, E. (2008) Infection strategies of insect viruses. In *Virology and the honey bee*. Aubert, M., Ball, B., Fries, I., Moritz, R., Milani, N., & Bernardinelli, I. (eds). Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg. pp. 255–276
- 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.
- Highfield, A.C., El Nagar, A., Mackinder, L.C.M., Noël, L.M.-L.J., Hall, M.J., Martin, S.J., & Schroeder, D.C. (2009) Deformed wing virus implicated in overwintering honeybee colony losses. *Appl Environ Microbiol* **75**: 7212–7220.
- Huang, X., & Madan, A. (1999) CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. *Genome Res* **9**: 868–877.
- Chen, Y., Evans, J., & Feldlaufer, M. (2006) Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology* **92**: 152–159.
- Chen, Y., 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.
- 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.
- 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.
- Iqbal, J., & Mueller, U. (2007) Virus infection causes specific learning deficits in honeybee foragers. *Proc Biol Sci* **274**: 1517–1521.
- Jensen, A.B., Palmer, K.A., Boomsma, J.J., & Pedersen, B.V. (2005) Varying degrees of *Apis mellifera ligustica* introgression in protected populations of the black honeybee, *Apis mellifera mellifera*, in northwest Europe. *Mol Ecol* **14**: 93–106.

- Jin, L., Mehmood, S., Zhang, G., Song, Y., Su, S., Huang, S., *et al.* (2020) Visualizing Sacbrood Virus of Honey Bees via Transformation and Coupling with Enhanced Green Fluorescent Protein. *Viruses* **12**
- Jiwaji, M., Matcher, G.F., Bruyn, M.-M. de, Awando, J.A., Moodley, H., Waterworth, D., *et al.* (2019) Providence virus: An animal virus that replicates in plants or a plant virus that infects and replicates in animal cells? *PLoS One* **14**
- Kadlečková, D. (2018) Virom včely medonosné (*Apis mellifera*).
- Kevill, J.L., Souza, F.S. de, Sharples, C., Oliver, R., Schroeder, D.C., & Martin, S.J. (2019) DWV-A Lethal to Honey Bees (*Apis mellifera*): A Colony Level Survey of DWV Variants (A, B, and C) in England, Wales, and 32 States across the US. *Viruses* **11**.
- King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., & Lefkowitz, E.J. (eds) (2012) Order - Tymovirales. In *Virus Taxonomy*. Elsevier, San Diego. pp. 901–903
- Kono, Y., & Kohn, J.R. (2015) Range and Frequency of Africanized Honey Bees in California (USA). *PLoS One* **10**
- 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.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Nkya, C., & Tamura, K. (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* **35**: 1547–1549.
- 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. *Journal of Experimental Biology* **217**: 1710–1718.
- L. Bailey, B.V.B. (1991) *Honey Bee Pathology*. Elsevier.
- 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. *Journal of General Virology*, **81**: 2111–2119.
- Levin, S., Galbraith, D., Sela, N., Erez, T., Grozinger, C.M., & Chejanovsky, N. (2017) Presence of *Apis* Rhabdovirus-1 in Populations of Pollinators and Their Parasites from Two Continents. *Front Microbiol* **8**
- Levin, S., Sela, N., & Chejanovsky, N. (2016) Two novel viruses associated with the *Apis mellifera* pathogenic mite *Varroa destructor*. *Sci Rep* **6**
- Levin, S., Sela, N., Erez, T., Nestel, D., Pettis, J., Neumann, P., & Chejanovsky, N. (2019) New Viruses from the Ectoparasite Mite *Varroa destructor* Infesting *Apis mellifera* and *Apis cerana*. *Viruses* **11**
- Levitt, A.L., Singh, R., Cox-Foster, D.L., Rajotte, E., Hoover, K., Ostiguy, N., & Holmes, E.C. (2013) Cross-species transmission of honey bee viruses in associated arthropods. *Virus Research* **176**: 232–240.
- Li, H. (2013) Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. *arXiv:13033997 [q-bio]*
- Li, J., Wang, T., Evans, J.D., Rose, R., Zhao, Y., Li, Z., *et al.* (2019) The Phylogeny and Pathogenesis of Sacbrood Virus (SBV) Infection in European Honey Bees, *Apis mellifera*. *Viruses* **11**
- Li, J.L., Cornman, R.S., Evans, J.D., Pettis, J.S., Zhao, Y., Murphy, C., *et al.* (2014) Systemic spread and propagation of a plant-pathogenic virus in European honeybees, *Apis mellifera*. *mBio* **5**: e00898-00813.
- Li, Z., Chen, Y., Zhang, S., Chen, S., Li, W., Yan, L., *et al.* (2013) Viral Infection Affects Sucrose Responsiveness and Homing Ability of Forager Honey Bees, *Apis mellifera* L. *PLoS One* **8**
- Lin, Z., Qin, Y., Page, P., Wang, S., Li, L., Wen, Z., *et al.* (2018) Reproduction of parasitic mites *Varroa destructor* in original and new honeybee hosts. *Ecol Evol* **8**: 2135–2145.
- Liu, Q., Lei, J., Darby, A.C., & Kadowaki, T. (2020) Trypanosomatid parasite dynamically changes the transcriptome during infection and modifies honey bee physiology. *Communications Biology* **3**: 1–8.
- Lommel, S.A., Morris, T.J., & Pinnock, D.E. (1985) Characterization of Nucleic Acids Associated with Arkansas Bee Virus. *INT* **23**: 199–207.
- Loope, K.J., Baty, J.W., Lester, P.J., & Wilson Rankin, E.E. (2019) Pathogen shifts in a honeybee predator following the arrival of the *Varroa* mite. *Proc Biol Sci* **286**
- Maori, E., Lavi, S., Mozes-Koch, R., Gantman, Y., Peretz, Y., Edelbaum, O., *et al.* (2007) Isolation and characterization of Israeli acute paralysis virus, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel: evidence for diversity due to intra- and inter-species recombination. *Journal of General Virology*, **88**: 3428–3438.
- Martin, S.J., & Brettell, L.E. (2019) Deformed Wing Virus in Honeybees and Other Insects. *Annual Review of Virology* **6**: 49–69.
- Martín-Hernández, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A.M., Garrido-Bailón, E., & Higes, M. (2007) Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl Environ Microbiol* **73**: 6331–6338.

- McMahon, D.P., Natsopoulou, M.E., Doublet, V., Fürst, M., Weging, S., Brown, M.J.F., *et al.* (2016) Elevated virulence of an emerging viral genotype as a driver of honeybee loss. *Proc Biol Sci* **283**
- Miller, W.A., Carrillo-Tripp, J., Bonning, B.C., Dolezal, A.G., & Toth, A.L. (2014) Conclusive Evidence of Replication of a Plant Virus in Honeybees Is Lacking. *mBio* **5**
- Miranda, J.R. de, Bailey, L., Ball, B.V., Blanchard, P., Budge, G.E., Chejanovsky, N., *et al.* (2013) Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research* **52**: 1–56.
- Miranda, J.R. de, Cordonni, G., & Budge, G. (2010) The Acute bee paralysis virus–Kashmir bee virus–Israeli acute paralysis virus complex. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**: S30–S47.
- Miranda, J.R. de, 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.
- Miranda, J.R. de, & Genersch, E. (2010) Deformed wing virus. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**: S48–S61.
- Mondet, F., Miranda, J.R. de, 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., Brettell, L.E., Martin, S.J., Dixon, D., Jones, I.M., & Schroeder, D.C. (2016a) 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. (2016b) Moku virus; a new Iflavirus found in wasps, honey bees and *Varroa*. *Sci Rep* **6**
- Mordecai, G.J., Wilfert, L., Martin, S.J., Jones, I.M., & Schroeder, D.C. (2016c) Diversity in a honey bee pathogen: first report of a third master variant of the Deformed Wing Virus quasispecies. *The ISME Journal* **10**: 1264–1273.
- Natsopoulou, M.E., McMahon, D.P., & Paxton, R.J. (2016) Parasites modulate within-colony activity and accelerate the temporal polyethism schedule of a social insect, the honey bee. *Behav Ecol Sociobiol* **70**: 1019–1031.
- Nazzi, F., Brown, S.P., Annoscia, D., Del Piccolo, F., Di Prisco, G., Varricchio, P., *et al.* (2012) Synergistic Parasite-Pathogen Interactions Mediated by Host Immunity Can Drive the Collapse of Honeybee Colonies. *PLoS Pathog* **8**
- Nazzi, F., & Le Conte, Y. (2016) Ecology of *Varroa destructor*, the Major Ectoparasite of the Western Honey Bee, *Apis mellifera*. *Annu Rev Entomol* **61**: 417–432.
- Norton, A.M., Remnant, E.J., Buchmann, G., & Beekman, M. (2020) Accumulation and Competition Amongst Deformed Wing Virus Genotypes in Naïve Australian Honeybees Provides Insight Into the Increasing Global Prevalence of Genotype B. *Front Microbiol* **11**
- Nurk, S., Meleshko, D., Korobeynikov, A., & Pevzner, P.A. (2017) metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome Res* **27**: 824–834.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., *et al.* (2019) *vegan: Community Ecology Package*. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Okuyama, H., Hill, J., Martin, S.J., & Takahashi, J. (2018) The complete mitochondrial genome of a Buckfast bee, *Apis mellifera* (Insecta: Hymenoptera: Apidae) in Northern Ireland. *Mitochondrial DNA Part B* **3**: 338–339.
- Olivier, V., Blanchard, P., Chaouch, S., Lallemand, P., Schurr, F., Celle, O., *et al.* (2008) Molecular characterisation and phylogenetic analysis of Chronic bee paralysis virus, a honey bee virus. *Virus Research* **132**: 59–68.
- Ondov, B.D., Bergman, N.H., & Phillippy, A.M. (2011) Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics* **12**: 385.
- Ongus, J.R., Peters, D., Bonmatin, J.-M., Bengsch, E., Vlak, J.M., & Oers, M.M. van (2004) Complete sequence of a picorna-like virus of the genus Iflavirus replicating in the mite *Varroa destructor*. *Journal of General Virology*, **85**: 3747–3755.
- Overton, H.A., Buck, K.W., Bailey, L., & Ball, B.V. (1982) Relationships between the RNA Components of Chronic Bee-Paralysis Virus and those of Chronic Bee-Paralysis Virus Associate. *Journal of General Virology*, **63**: 171–179.
- Paradis, E., & Schliep, K. (2019) ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics* **35**: 526–528.
- Pasca, C., Mărghitaș, L., Sonea, C., Bobis, O., Matei, I., & Dezmirean, D. (2019) A Review of *Nosema ceranae* and *Nosema apis*: Characterization and Impact for Beekeeping. 1843–536.

- Posada-Florez, F., Childers, A.K., Heerman, M.C., Egekwu, N.I., Cook, S.C., Chen, Y., *et al.* (2019) Deformed wing virus type A, a major honey bee pathogen, is vectored by the mite *Varroa destructor* in a non-propagative manner. *Sci Rep* **9**
- Ravoet, J., De Smet, L., Wenseleers, T., & Graaf, D.C. de (2015a) Vertical transmission of honey bee viruses in a Belgian queen breeding program. *BMC Vet Res* **11**
- Ravoet, J., De Smet, L., Wenseleers, T., & Graaf, D.C. de (2015b) Genome sequence heterogeneity of Lake Sinai Virus found in honey bees and Orf1/RdRP-based polymorphisms in a single host. *Virus Research* **201**: 67–72.
- Remnant, E.J., Mather, N., Gillard, T.L., Yagound, B., & Beekman, M. (2019) Direct transmission by injection affects competition among RNA viruses in honeybees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **286**: 20182452.
- 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**
- Requier, F., Garnery, L., Kohl, P.L., Njovu, H.K., Pirk, C.W.W., Crewe, R.M., & Steffan-Dewenter, I. (2019) The Conservation of Native Honey Bees Is Crucial. *Trends in Ecology & Evolution* **34**: 789–798.
- 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**: 1–11.
- Roberts, J.M.K., Anderson, D.L., & Durr, P.A. (2018) Metagenomic analysis of *Varroa*-free Australian honey bees (*Apis mellifera*) shows a diverse Picornavirales virome. *Journal of General Virology*, **99**: 818–826.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Mark, P. van der, Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., *et al.* (2012) MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Syst Biol* **61**: 539–542.
- 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**
- Ruttner, F. (1988) *Biogeography and Taxonomy of Honeybees*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Ryabov, E.V., Childers, A.K., Lopez, D., Grubbs, K., Posada-Florez, F., Weaver, D., *et al.* (2019) Dynamic evolution in the key honey bee pathogen deformed wing virus: Novel insights into virulence and competition using reverse genetics. *PLoS Biol* **17**
- Ryabov, E.V., Wood, G.R., Fannon, J.M., Moore, J.D., Bull, J.C., Chandler, D., *et al.* (2014) A Virulent Strain of Deformed Wing Virus (DWV) of Honeybees (*Apis mellifera*) Prevails after *Varroa destructor*-Mediated, or In Vitro, Transmission. *PLoS Pathogens* **10**: e1004230.
- Schuster, S., Zirkel, F., Kurth, A., Cleef, K.W.R. van, Drosten, C., Rij, R.P. van, & Junglen, S. (2014) A Unique Nodavirus with Novel Features: Mosinovirus Expresses Two Subgenomic RNAs, a Capsid Gene of Unknown Origin, and a Suppressor of the Antiviral RNA Interference Pathway. *J Virol* **88**: 13447–13459.
- Schwarz, R.S., Bauchan, G.R., Murphy, C.A., Ravoet, J., Graaf, D.C. de, & 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.
- Shen, M., Cui, L., Ostiguy, N., & Cox-Foster, D. (2005) Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (Kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic *Varroa* mite. *Journal of General Virology*, **86**: 2281–2289.
- Shi, C., Beller, L., Deboutte, W., Yinda, K.C., Delang, L., Vega-Rúa, A., *et al.* (2019) Stable distinct core eukaryotic viromes in different mosquito species from Guadeloupe, using single mosquito viral metagenomics. *Microbiome* **7**: 121.
- Sitaropoulou, N., Neophytou, E.P., & Thomopoulos, G.N. (1989) Structure of the nucleocapsid of a filamentous virus of the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* **53**: 354–357.
- Spurny, R., Přidal, A., Pálková, L., Kiem, H.K.T., Miranda, J.R. de, & Plevka, P. (2017) Virion Structure of Black Queen Cell Virus, a Common Honeybee Pathogen. *Journal of Virology* **91**
- Tapia-González, J.M., Morfin, N., Macías-Macías, J.O., De la Mora, A., Tapia-Rivera, J.C., Ayala, R., *et al.* (2019) Evidence of presence and replication of honey bee viruses among wild bee pollinators in subtropical environments. *Journal of Invertebrate Pathology* **168**: 107256.
- Tehel, A., Vu, Q., Bigot, D., Gogol-Döring, A., Koch, P., Jenkins, C., *et al.* (2019) The Two Prevalent Genotypes of an Emerging Infectious Disease, Deformed Wing Virus, Cause Equally Low Pupal Mortality and Equally High Wing Deformities in Host Honey Bees. *Viruses* **11**
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 7185.
- Toplak, I., Jamnikar Ciglenc̃ki, 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.

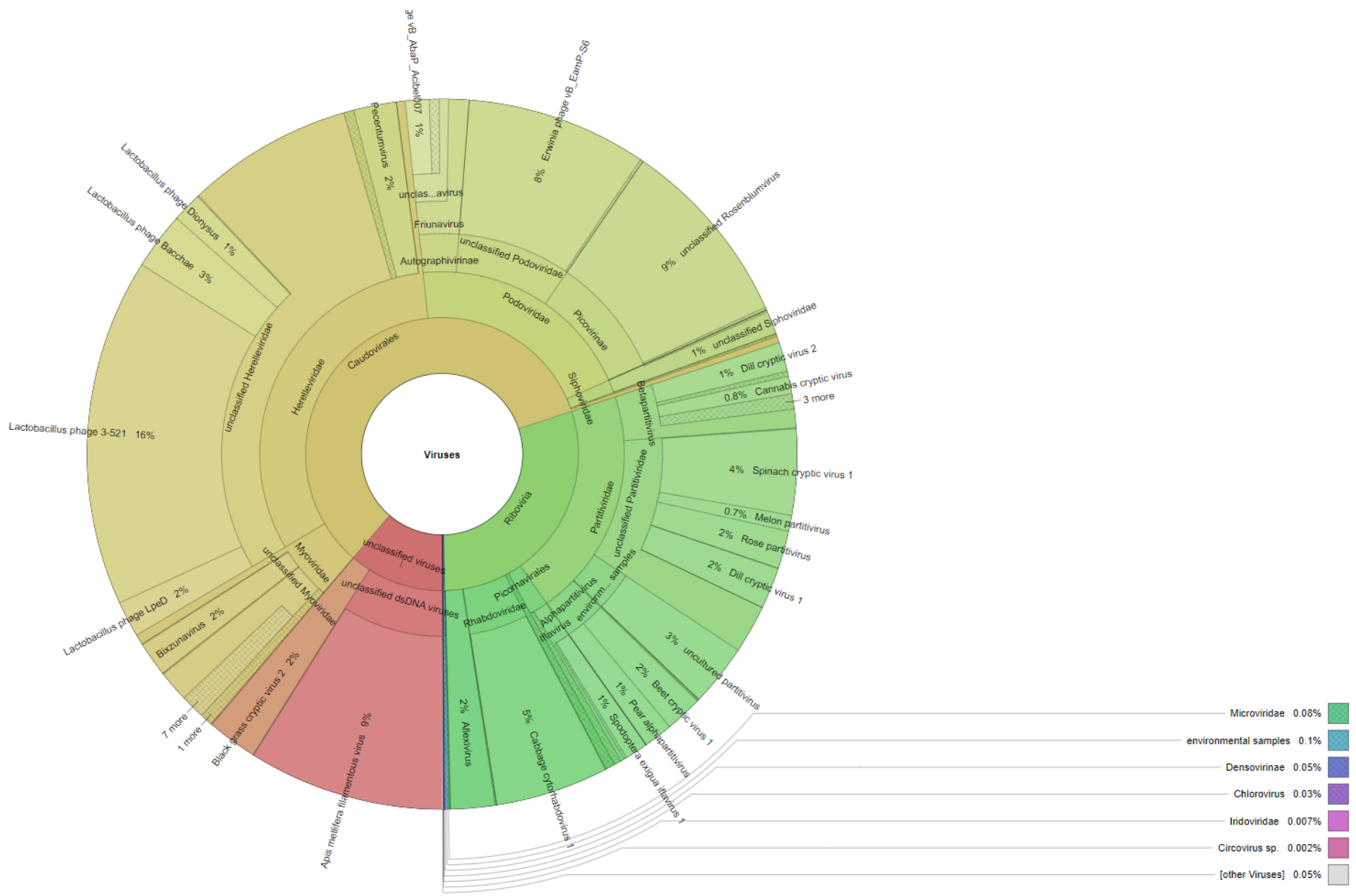
- Traynor, K.S., Mondet, F., Miranda, J.R. de, Techer, M., Kowallik, V., Oddie, M.A.Y., *et al.* (2020) *Varroa destructor*: A Complex Parasite, Crippling Honey Bees Worldwide. *Trends in Parasitology* **36**: 592–606.
- Traynor, K.S., Rennich, K., Forsgren, E., Rose, R., Pettis, J., Kunkel, G., *et al.* (2016) Multiyear survey targeting disease incidence in US honey bees. *Apidologie* **47**: 325–347.
- Valles, S.M., Chen, Y., Firth, A.E., Guérin, D.M.A., Hashimoto, Y., Herrero, S., *et al.* (2017a) ICTV Virus Taxonomy Profile: *Iflaviridae*. *Journal of General Virology*, **98**: 527–528.
- Valles, S.M., Chen, Y., Firth, A.E., Guérin, D.M.A., Hashimoto, Y., Herrero, S., *et al.* (2017b) ICTV Virus Taxonomy Profile: *Dicistroviridae*. *Journal of General Virology*, **98**: 355–356.
- vanEngelsdorp, D., Evans, J.D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B.K., *et al.* (2009) Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. *PLOS ONE* **4**: e6481.
- Wang, S., Chen, G., Lin, Z., Wu, Y., Hu, F., & Zheng, H. (2019) Occurrence of multiple honeybee viruses in the ectoparasitic mites *Varroa* spp. in *Apis cerana* colonies. *J Invertebr Pathol* **166**: 107225.
- Westenberger, S.J., Sturm, N.R., Yanega, D., Podlipaev, S.A., Zeledón, R., Campbell, D.A., & Maslov, D.A. (2004) Trypanosomatid biodiversity in Costa Rica: genotyping of parasites from Heteroptera using the spliced leader RNA gene. *Parasitology* **129**: 537–547.
- 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.
- Wu, Y., Dong, X., & Kadowaki, T. (2017) Characterization of the Copy Number and Variants of Deformed Wing Virus (DWV) in the Pairs of Honey Bee Pupa and Infesting *Varroa destructor* or *Tropilaelaps mercedesae*. *Front Microbiol* **8**
- 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.
- Yue, C., & Genersch, E. (2005) RT-PCR analysis of Deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *Journal of General Virology*, **86**: 3419–3424.
- 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**: 3387.
- Zhao, Y., Heerman, M., Peng, W., Evans, J.D., Rose, R., DeGrandi-Hoffman, G., *et al.* (2019) The Dynamics of Deformed Wing Virus Concentration and Host Defensive Gene Expression after *Varroa* Mite Parasitism in Honey Bees, *Apis mellifera*. *Insects* **10**
- Zheng, H., Perreau, J., Powell, J.E., Han, B., Zhang, Z., Kwong, W.K., *et al.* (2019) Division of labour in honey bee gut microbiota for plant polysaccharide digestion. *PNAS* **116**: 25909–25916.

## 8. Přílohy

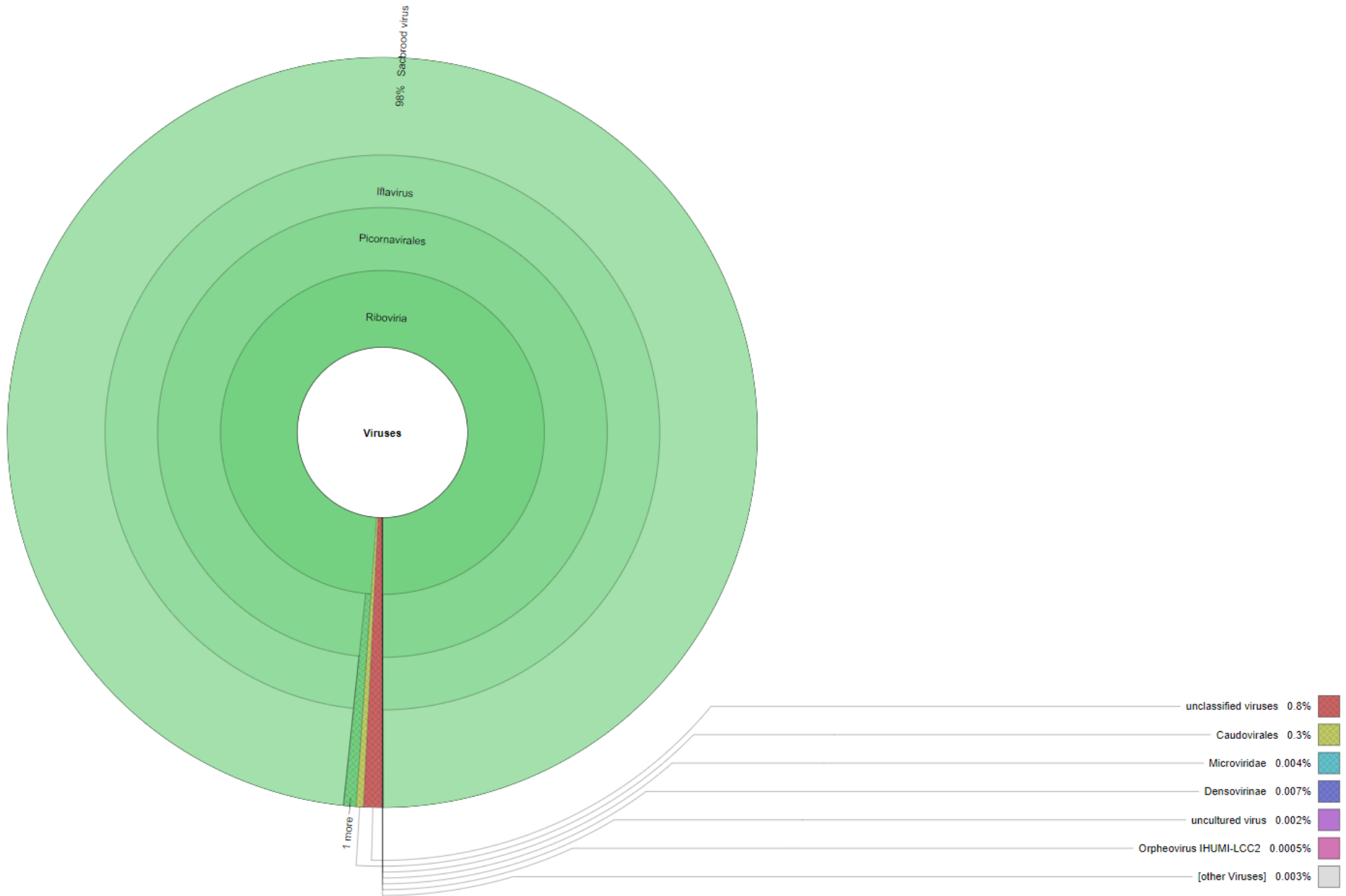




B



C



D

Virus (zkratka)	Taxonomie	Genom	Přenos				Interakce			Infekce			Mimo <i>A. mellifera</i>
			Orální	Kontakt	<i>Varroa</i>	Vertikální	<i>Varroa</i>	<i>Nosema</i>	Jiné	Larva	Kukla	Dospěl.	
Deformed wing virus (DWFV) komplex	Picornavirales <i>Iflaviridae</i>	+ssRNA	+ <sup>1</sup>	-	+ <sup>1</sup>	+ <sup>2</sup>	P/O <sup>1</sup>	N <sup>3</sup>	?	+/- <sup>4</sup>	+/ <sup>1</sup>	+/ <sup>5</sup>	++ <sup>6,7</sup>
Sacbrood virus (SBV)	Picornavirales <i>Iflaviridae</i>	+ssRNA	+ <sup>8</sup>	-	~ <sup>9</sup>	+ <sup>10</sup>	~ <sup>11</sup> /-	-	?	+/ <sup>8</sup>	+/- <sup>8</sup>	+/- <sup>8</sup>	+ <sup>12</sup>
Black queen cell virus (BQCV)	Picornavirales <i>Dicistroviridae</i>	+ssRNA	+ <sup>2</sup>	-	-	+ <sup>10</sup>	-	p <sup>13</sup>	?	+/- <sup>14</sup>	+/ <sup>15</sup>	+/- <sup>14</sup>	++ <sup>7,12</sup>
Acute bee paralysis virus (ABPV)	Picornavirales <i>Dicistroviridae</i>	+ssRNA	+ <sup>16</sup>	-	+ <sup>17</sup>	+ <sup>10</sup>	P/O <sup>18</sup>	?	?	+/~ <sup>18</sup>	+/ <sup>17</sup>	+/ <sup>19</sup>	++ <sup>7,20</sup>
Israeli acute bee paralysis virus (IAPV)	Picornavirales <i>Dicistroviridae</i>	+ssRNA	+ <sup>21</sup>	-	+ <sup>22</sup>	+ <sup>21</sup>	P/O <sup>22</sup>	?	?	+/~ <sup>23</sup>	+/ <sup>23</sup>	+/ <sup>23</sup>	++ <sup>7,20</sup>
Kashmir bee virus (KBV)	Picornavirales <i>Dicistroviridae</i>	+ssRNA	+ <sup>9</sup>	-	+ <sup>24</sup>	+ <sup>2</sup>	P/O <sup>24</sup>	?	?	+/~ <sup>9</sup>	+/ <sup>25</sup>	+/ <sup>25</sup>	++ <sup>7,20</sup>
Chronic bee paralysis virus (CBPV)	Nezařazené	+ssRNA segment.	+ <sup>26</sup>	+ <sup>26</sup>	~ <sup>27</sup>	+ <sup>10</sup>	-	p <sup>26</sup>	?	+/~ <sup>28</sup>	+/~ <sup>28</sup>	+/ <sup>29</sup>	+ <sup>20</sup>
Lake Sinai virus (LSV) komplex	Nezařazené	+ssRNA	+ <sup>30</sup>	?	~ <sup>30</sup>	+ <sup>10</sup>	-	?	?	?	?	+ <sup>31</sup> /?	+ <sup>32</sup>
<i>Apis mellifera</i> filamentous virus (AmFV)	Nezařazené	dsDNA	+ <sup>33</sup>	-	-	+ <sup>33</sup>	-	-	Kinetoplastida N <sup>34</sup>	+/- <sup>33</sup>	+/- <sup>33</sup>	+/ <sup>33</sup>	+ <sup>35</sup>
Bee Macula-like virus (BeeMLV)	Tymovirales Nezařazené	+ssRNA	?	?	+ <sup>36</sup>	+ <sup>10</sup>	?	?	?	?	?	+ <sup>36</sup> /?	+ <sup>37</sup>
			?- neznámé ~-neprůkazné				Interakce/Otevřená infekce P-pozitivní N-negativní			Přítomnost/projev			

### ***Přehled literatury vztahující se k tabulce:***

1. Möckel, N., Gisder, S. & Genersch, E. Horizontal transmission of deformed wing virus: pathological consequences in adult bees (*Apis mellifera*) depend on the transmission route. *Journal of General Virology*, **92**, 370–377 (2011).
2. Chen, Y. P., Pettis, J. S., Collins, A. & Feldlaufer, M. F. Prevalence and Transmission of Honeybee Viruses. *Appl Environ Microbiol* **72**, 606–611 (2006).
3. Doublet, V., Natsopoulou, M. E., Zschiesche, L. & Paxton, R. J. 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 (2015).
4. Chen, Y. P., Higgins, J. A. & Feldlaufer, M. F. Quantitative Real-Time Reverse Transcription-PCR Analysis of Deformed Wing Virus Infection in the Honeybee (*Apis mellifera* L.). *Appl Environ Microbiol* **71**, 436–441 (2005).
5. Yue, C. & Genersch, E. RT-PCR analysis of Deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *Journal of General Virology*, **86**, 3419–3424 (2005).
6. Loope, K. J., Baty, J. W., Lester, P. J. & Wilson Rankin, E. E. Pathogen shifts in a honeybee predator following the arrival of the *Varroa* mite. *Proc Biol Sci* **286**, (2019).
7. Gisder, S. & Genersch, E. Viruses of commercialized insect pollinators. *Journal of Invertebrate Pathology* **147**, 51–59 (2017).
8. Bailey, L. The multiplication and spread of Sacbrood virus of bees. *Ann Applied Biology* **63**, 483–491 (1969).
9. Shen, M., Cui, L., Ostiguy, N. & Cox-Foster, D. Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (Kashmir bee virus and Sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic *Varroa* mite. *Journal of General Virology*, **86**, 2281–2289 (2005).
10. Ravoet, J., De Smet, L., Wenseleers, T. & de Graaf, D. C. Vertical transmission of honey bee viruses in a Belgian queen breeding program. *BMC Vet Res* **11**, (2015).
11. Shen, M., Yang, X., Cox-Foster, D. & Cui, L. The role of *Varroa* mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWV) in honey bees. *Virology* **342**, 141–149 (2005).
12. Murray, E. A. *et al.* Viral transmission in honey bees and native bees, supported by a global black queen cell virus phylogeny. *Environmental Microbiology* **21**, 972–983 (2019).
13. Doublet, V., Labarussias, M., de Miranda, J. R., Moritz, R. F. A. & Paxton, R. J. 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 (2015).
14. Leat, N., Ball, B., Govan, V. & Davison, S. Analysis of the complete genome sequence of black queen-cell virus, a picorna-like virus of honey bees. *Journal of General Virology*, **81**, 2111–2119 (2000).
15. Bailey, L. & Woods, R. D. Two More Small RNA Viruses from Honey Bees and Further Observations on Sacbrood and Acute Bee-Paralysis Viruses. *Journal of General Virology*, **37**, 175–182 (1977).
16. L. Bailey, B. V. B. *Honey Bee Pathology*. (Elsevier, 1991). doi:10.1016/C2009-0-02695-6 (1991).
17. Wieggers, F. P. (Wageningen A. U. Transmission of honeybee viruses by *Varroa jacobsoni* Oud. (1988).
18. Ball, B. V. & Allen, M. F. The prevalence of pathogens in honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Ann Applied Biology* **113**, 237–244 (1988).
19. Bailey, L., Gibbs, A. J. & Woods, R. D. Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology* **21**, 390–395 (1963).
20. Sachman-Ruiz, B., Narváez-Padilla, V. & Reynaud, E. Commercial *Bombus impatiens* as reservoirs of emerging infectious diseases in central México. *Biol Invasions* **17**, 2043–2053 (2015).
21. Chen, Y. P. *et al.* Israeli Acute Paralysis Virus: Epidemiology, Pathogenesis and Implications for Honey Bee Health. *PLoS Pathog* **10**, (2014).
22. Di Prisco, G. *et al.* *Varroa destructor* is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of General Virology*, **92**, 151–155 (2011).
23. Maori, E. *et al.* Isolation and characterization of Israeli acute paralysis virus, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel: evidence for diversity due to intra- and inter-species recombination. *Journal of General Virology*, **88**, 3428–3438 (2007).
24. Chen, Y., Pettis, J. S., Evans, J. D., Kramer, M. & Feldlaufer, M. F. Transmission of Kashmir bee virus by the ectoparasitic mite *Varroa destructor*. *Apidologie* **35**, 441–448 (2004).

25. Bailey, L., Carpenter, J. M. & Woods, R. D. Egypt Bee Virus and Australian Isolates of Kashmir Bee Virus. *Journal of General Virology*, **43**, 641–647 (1979).
26. Toplak, I., Jamnikar Ciglenc̃eki, U., Aronstein, K. & Gregorc, A. Chronic Bee Paralysis Virus and *Nosema ceranae* Experimental Co-Infection of Winter Honey Bee Workers (*Apis mellifera* L.). *Viruses* **5**, 2282–2297 (2013).
27. Celle, O. *et al.* Detection of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome and its replicative RNA form in various hosts and possible ways of spread. *Virus Research* **133**, 280–284 (2008).
28. Seitz, K. *et al.* A molecular clone of Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV) causes mortality in honey bee pupae (*Apis mellifera*). *Scientific Reports* **9**, 1–11 (2019).
29. Blanchard, P. *et al.* 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. *Journal of Virological Methods* **141**, 7–13 (2007).
30. Daughenbaugh, K. F. *et al.* Honey Bee Infecting Lake Sinai Viruses. *Viruses* **7**, 3285–3309 (2015).
31. Runckel, C. *et al.* Temporal Analysis of the Honey Bee Microbiome Reveals Four Novel Viruses and Seasonal Prevalence of Known Viruses, *Nosema*, and *Crithidia*. *PLoS One* **6**, (2011).
32. Parmentier, L., Smagghe, G., de Graaf, D. C. & Meeus, I. *Varroa destructor* Macula-like virus, Lake Sinai virus and other new RNA viruses in wild bumblebee hosts (*Bombus pascuorum*, *Bombus lapidarius* and *Bombus pratorum*). *Journal of Invertebrate Pathology* **134**, 6–11 (2016).
33. Gauthier, L. *et al.* The *Apis mellifera* Filamentous Virus Genome. *Viruses* **7**, 3798–3815 (2015).
34. Hartmann, U., Forsgren, E., Charrière, J.-D., Neumann, P. & Gauthier, L. Dynamics of *Apis mellifera* Filamentous Virus (AmFV) Infections in Honey Bees and Relationships with Other Parasites. *Viruses* **7**, 2654–2667 (2015).
35. Hou, C., Li, B., Luo, Y., Deng, S. & Diao, Q. First detection of *Apis mellifera* filamentous virus in *Apis cerana cerana* in China. *Journal of Invertebrate Pathology* **138**, 112–115 (2016).
36. de Miranda, J. R. *et al.* Genome Characterization, Prevalence and Distribution of a Macula-Like Virus from *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. *Viruses* **7**, 3586–3602 (2015).
37. Schoonvaere, K., Smagghe, G., Francis, F. & de Graaf, D. C. Study of the Metatranscriptome of Eight Social and Solitary Wild Bee Species Reveals Novel Viruses and Bee Parasites. *Front Microbiol* **9**, (2018).