

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Ústav pro životní prostředí
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

Študijný program: Ekologie a ochrana prostředí

Študijný obor: Ochrana životního prostředí



Bc. Martina Bičianová

VÝSKYT PARAZITICKÝCH MIKROORGANIZMŮ U OSLABENÝCH A ZDRAVÝCH
POPULÁCIÍ VČELY MEDONOSNEJ (*APIS MELLIFERA*)

THE PARASITIC MICROORGANISMS IN IMMUNODEFICIENT AND HEALTHY POPULATION
OF HONEY BEES (*APIS MELLIFERA*)

Diplomová práce

Vedúci záverečnej práce:

Mgr. Jan Hubert, PhD.

Praha, August 2015

Prehlasujem, že som túto diplomovú prácu vypracovala samostatne s využitím uvedenej literatúry a informácii, na ktoré odkazujem. Povoľujem jej zapožičanie s tým, že všetky (aj prebraté) informácie budú riadne citované.

V Prahe, 14.8.2015

Bc. Martina Bičianová

Pod'akovanie

Týmto by som chcela poďakovať vedúcemu mojej diplomovej práce Mgr. Janovi Hubertovi PhD., za cenné rady, ochotu, odbornú pomoc, obetovaný čas a trpezlivosť. Moje poďakovanie takisto patrí aj Ing. Marte Nesvornej za odbornú pomoc v laboratóriu. Ďalej ďakujem VÚVč Dol, MVDr. Martinovi Kamlerovi a včelárom za poskytnuté vzorky a informácie, ktoré boli kľúčové k vyhotoveniu tejto diplomovej práce. Takisto moja vďaka patrí aj rodine a kamarátom za podporu a ochotu si prácu prečítať a pripomienkovať.

OBSAH

1	ÚVOD	7
1.1	Význam včiel.....	7
1.2	Vymieranie včiel.....	9
1.3	Zhoršujúci sa stav životného prostredia a vymieranie včiel.....	10
2	CIEĽ PRÁCE	13
3	LITERÁRNY PREHĽAD	14
3.1	Syndróm kolapsu včelstiev (CCD).....	14
3.2	Parazity a imunitný systém včiel.....	18
3.3	Eukaryotické parazity včiel.....	21
3.4	Nosemóza.....	23
3.4.1	<i>Nosema ceranae</i>	27
3.4.2	<i>Nosema apis</i>	29
3.5	<i>Crithidia mellificae</i>	32
3.6	<i>Lotmaria passim</i>	36
3.7	<i>Apicystis bombi</i>	38
3.8	Možnosti detekcie eukaryotických parazitov.....	41
4	MATERIÁL A METODIKA	44
4.1	Prehľad lokalít.....	44
4.2	Odber vzoriek.....	47
4.3	Príprava vzoriek.....	48
4.3	Izolácia dna.....	49
4.4	Molekulárna identifikácia eukaryotických parazitov vo vzorkách.....	51
4.5	Vizualizácia PCR produktu pomocou gélu.....	54
4.6	Overenie selektivity detekčných primerov pomocou klonovania PCR produktu.....	56
4.7	Štatistická analýza dát.....	59
5	VÝSLEDKY	61
5.1	PCR Detekcia parazitov.....	61
5.2	Korelačná a faktorová analýza výsledkov.....	67
6	DISKUSIA	71
7	ZÁVER	75
8	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	76
9	PRÍLOHY	85

ABSTRAKT

Oslabené včelstvá sú náchylné na napadnutie parazitmi. Aj napriek tomu v súčasnej dobe chýbajú údaje o výskyte parazitických prvokov vo včelstvách v ČR. Cieľom diplomovej práce bola detekcia eukaryotických parazitov (*Nosema ceranae*, *Nosema apis*, *Crithidia mellificae* a *Apicystis bombi*) vo vybraných českých včelstvách. Detekcia bola vykonaná v 9 lokalitách s rôznym počtom včelstiev a celkovo bolo študovaných 53 včelstiev v roku 2014 a 2015. Z každého včelstva boli odobrané vzorky dospelých včiel z krajného rámu plodového hniezda a vytvorené 3 vzorky po 10 jedincoch včely. V roku 2014 bol zistený liečebný spád roztoča *Varroa destructor*. Zo vzoriek včiel bola izolovaná DNA. Prítomnosť parazitov bola overená pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) so špecifickými primermi. V prípade *Crithidia mellificae* bolo použitých 5 druhov detekčných primerov (SEF, SER; SSU, SSU rRNA, Cyt b, Tryp cyt b) a získané amplikóny boli klonované a sekvenované. Porovnaním sekvencií v GenBanku pri zhode 98-100% sekvenčnej identity bolo zistené, že sa jedná o druh *Lotmaria passim*, druh *Crithidia mellificae* zistený nebol. Druh *Lotmaria passim* bol prvýkrát preukázaný v Českej republike, s prevalenciou 79,2%. Pre detekciu *Lotmaria passim* vo včelách možno doporučiť primer Tryp cytb. Parazit *Nosema ceranae* bol detekovaný v 47 včelstvách, s celkovou prevalenciou 86,8%. Príbuzný druh *Nosema apis*, ktorý bol pôvodne známy ako dominantnejší než predchádzajúci druh, bol zistený iba v 4 vzorkách, s prevalenciou 5,7%, čo potvrdzuje trend celosvetového ústupu. Výskyt *Apicystis bombi* pomocou detekčných primerov v sledovaných vzorkách potvrdený nebol. Testovaná bola súvislosť medzi napadnutím *Nosema ceranae*, *Nosema apis*, *Crithidia mellificae*, *Lotmaria passim* medzi sebou a neprezimovaním včelstva, infestácia *Varroa destructor* a neprezimovaním včelstva a prítomnosť parazitov s ko-infekciou *V. destructor* pomocou korelácie. Medzi jednotlivými druhmi parazitických prvokov korelácia preukázaná nebola. Napadnutie včiel klieštikom *Varroa destructor*, charakterizované, ako liečebný spád, korelovalo s kolapsom kolónií včelstiev v zime 2014/2015, a takisto korelovalo s výskytom *Nosema ceranae*. Výsledky sú diskutované v súvislosti s možným vplyvom daných parazitov na úbytok včiel.

Kľúčové slová: včela medonosná, *Apis mellifera*, *Nosema ceranae*, *Nosema apis*, *Crithidia mellificae*, *Apicystis bombi*, *Lotmaria passim*, *Varroa destructor*, PCR, mikrosporídiá, prevalencia, kolaps, ko-infekcia

ABSTRACT

Immunodeficient honey bee (*Apis mellifera*) colonies suffer from broad range of parasites including eukaryotic protozoa. Despite this fact, the eukaryotic parasites are still poorly documented in the Czech Republic. The presence of eukaryotic parasites (*Nosema ceranae*, *Nosema apis*, *Crithidia mellificae* and *Apicystis bombi*) was observed in different apiaries in the Czech Republic. The samples were taken in 9 apiaries in 53 beehives during the 2014/2015 season. From each beehive, 10 adult of honey bees were taken from the peripheral comb in triplicate. DNA was isolated from every sample of honey bees. The parasites were detected by polymerase chain reaction (PCR) with specific primers. The treatment fall of parasitic mite *Varroa destructor* was obtained from beekeepers for season of 2014. *Crithidia mellificae* was detected by 5 types of specific primers (SEF, SER; SSU, SSU rRNA, Cyt b, Tryp cyt b) and positive amplicons were cloned and sequenced. The obtained sequences were compared with GeneBank and showed similarity from 98-100% to sequences of *Lotmaria passim* (Trypanosomatid). *Crithidia mellificae* was not detected. *L. passim* had prevalence of 79,2% and is reported in the Czech Republic for the first time. Primer Tryp-cyt b is recommended for the routine detection of *L. passim*. *Nosema ceranae* was detected in 47 apiaries with the total prevalence of 86,8%, while *Nosema apis* was detected in 4 samples with prevalence of 5,7% only. It correspond the global replacement of *N. apis* by *N. ceranae*. Presence of *Apicystis bombi* was not confirmed using specific primers in PCR. The interaction among the parasites, parasitic infection and colony collapse and presence of parasites with co-infection of mite *V. destructor* were analyzed by correlation tests. The correlations among the occurrence of observed eukaryotic parasites were not found. The treatment fall of *V. destructor* was correlated with colony losses in winter 2014/2015 and with the presence of *Nosema ceranae*. Results are discussed with possible impact of eukaryotic parasites on honey bee colony losses in immunodeficient honey bees.

Keywords: honey bee, *Apis mellifera*, *Nosema ceranae*, *Nosema apis*, *Crithidia mellificae*, *Apicystis bombi*, *Lotmaria passim*, *Varroa destructor*, PCR, Microsporidia, prevalence, collapse, co-infection

ÚVOD

1.1 VÝZNAM VČIEL

Včela medonosná (*Apis mellifera*) je neodmysliteľnou súčasťou našej prírody. Vytvára početné spoločenstvá fungujúce ako superorganizmus, podieľajúc sa na tvorbe rozmanitých rastlinných spoločenstiev sveta (Bradbear, 2009). Najvýznamnejšou funkciou včely je opelenie, ale takisto výrazne ovplyvňuje ekologické vzťahy v ekosystéme, jeho stabilitu, genetickú variabilitu rastlín, diverzitu kvetov, špecializáciu a evolúciu (Potts et al., 2010). Včely hrajú dôležitú, častokrát málo uznávanú úlohu vo väčšine terestrických ekosystémov s prítomnosťou zelenej vegetácie v temperátnom pásme po dobu 3-4 mesiacov každý rok, kde vznik semien, plodov a bobúľ je vysoko závislý na opelení včelou medonosnou (Benjamin a McCallum, 2009).

Opelenie patrí ku kľúčovým ekosystémovým službám, ktoré včely a ďalšie opelovače poskytujú (Tirado et al., 2013). Rastliny využívajú včelu ako 3. sexuálneho partnera a celkovo približne 1/3 ľudskej obživy priamo, alebo nepriamo súvisí s opelením včely (Genersch, 2010). Podľa údajov Devillersa a Pham-Delegua (2002) opelujú 16% kultúrnych rastlín sveta a zároveň je včela považovaná za najviac ekonomicky hodnotného opelovača na svete. Najviac závislými plodinami sú mandle a iné orechy, zelenina a ovocie (Genersch, 2010). Len v Európe viac ako 4000 druhov zeleniny závisí na opelení (Tirado et al., 2013). Z poľnohospodárskych plodín je podľa Johnsona (2010) až 80% závislých práve od včely medonosnej a nemenší význam má opelenie divoko rastúcich druhov. Biotické opelenie zvyšuje kvalitu plodov, semien a takisto kvantitu asi 70% z 1330 tropických plodín a 85% z 264 plodín pestovaných v Európe (Goulson et al., 2015). Bez včiel by až 75% človekom využívaných plodín trpelo nejakou formou zníženia produktivity a takisto by bola negatívne ovplyvnená aj produkcia mlieka, nakoľko mnoho plodín opelovaných včelou je využívaných do kŕmnych zmesí hospodárskych zvierat. Podľa viacerých zdrojov včely prispievajú až k 22 miliónom eur ročne do európskeho poľnohospodárstva (Tirado et al., 2013). Všeobecne je ale ťažké odhadnúť celkovú hodnotu včelieho opelenia v rastlinnej výrobe, ale vedci sa zhodujú, že príspevok včiel je nesmierny.

Vzhľadom k celosvetovému hospodárskemu významu, správania sociálnej kolónie a semi-domestikácie, je včela medonosná takisto modelový organizmus aplikovaného výskumu (Schwarz et al., 2015^b). Služi napr. ako významný indikátor znečistenia životného

prostredia., kedy sa ako detektor chová 2 spôsobmi, a to cez vysokú úmrtnosť, alebo prítomnosťou toxických molekúl a reziduí v produktoch (Celli a Maccagnani, 2003). V ekotoxikológii sa používa, ako ľahko dostupná a celosvetovo rozšírená vzorka pre detekciu organických a anorganických látok v prostredí (Veselý et al., 2003). Včely je možné využiť napr. na určenie miest s vysokým obsahom kovov (Pb, Mn, Zn, Cu), nakoľko sa práve tieto prvky ukladajú vo včelích produktoch v danej oblasti (Přidal, 2005). Stále viac sa používa pri monitoringu rádionuklidov a takisto pesticídov (Celli a Maccagnani, 2003). Všeobecne sú znečisťujúce látky v organizme včely akumulované prostredníctvom viacerých ciest, a to najmä počas zberu peľu, nektáru, živice, medovice a cez prijímanú vodu (Veselý et al. 2003).

Okrem ekonomickej úlohy včela človeku poskytuje produkty, konkrétne med, propolis, materskú kašičku a vosk (Genersch, 2010). Práve tieto produkty sú najvýznamnejším výstupom včelárstva, ktoré je ako také jedným z najstarších oborov ľudskej činnosti. Hlavným hospodárskym významom tohto odvetvia, ktoré je záľubou a zároveň profesionálnym odborom realizovaným na včelích farmách, je takisto opelenie rastlín (Prokeš, 2008). V dôsledku industriálnej a ekologickej záťaže, takisto zavlečených parazitov je často včelárstvo jediným nástrojom, ako chrániť udržanie včely v prírode. Chov včely medonosnej má okrem spomínaných benefitov aj kultúrny význam. Včelárstvo sa stalo pre mnoho ľudí príťažlivým a venujú mu svoj čas. Starajú sa o celkové zdravie včiel, aby sa ich chov rozvíjal a zároveň bol významným pomocníkom poľnohospodárskej výroby (Williams et al., 1991).

Zhrňujúc včela medonosná ovplyvňuje omnoho viac, ako len prostredie využívané pre svoj život. Opelenie je nevyhnutné pre reprodukciu väčšiny druhov kvitnúcich rastlín, vrátane poľnohospodárskych plodín. Takisto zvyšuje biodiverzitu divoko rastúcich rastlín, umožňuje osvetliť situáciu rizík pre životné prostredie, ktoré by inak ostali skryté a poskytuje nám produkty. Nemenej významné je aj prepojenie s ďalšími druhmi živočíchov v ekosystéme. Výskum včiel objasňuje faktory ovplyvňujúce výkon kolónie a podporuje správny včelársky manažment. Vzhľadom na veľkosť organizmu včely medonosnej je to obrovský impakt na prírodu a samotný život človeka a preto je jej ochrana a zachovanie v prírode nevyhnutné.

1.2 VYMIERANIE VČIEL

Ako hlavné faktory ústupu včiel sa podľa štúdií a článkov považuje ničenie a fragmentácia biotopov, sucho, znečistenie vzduchu, chemizácia poľnohospodárstva, pestovanie monokultúr a používanie chemikálií (insekticídy, fungicídy, herbicídy), ktoré zabíjajú škodcov, ale aj užitočný hmyz (Bradbear, 2009). Expozícia niektorým fungicídum môže navyše rapídne zvýšiť toxicitu insekticídov a následná expozícia insekticídum redukuje odolnosť voči chorobám (Goulson et al., 2015). Choroby sú ďalšou významnou kategóriou spôsobujúcou pokles populácie a v súčasnosti veľmi diskutovanou a zároveň málo preskúmanou kategóriou sú parazity (Bradbear, 2009).

Je faktom, že včely postupne strácajú potravinové zdroje. Následný nutričný stres redukuje schopnosť vyrovnávať sa s toxínmi a patogénmi (Goulson et al., 2015). Lesné a rurálne pôdy sú čoraz viac premieňané na zastavanú plochu, čo spôsobuje znižovanie kvetinových zdrojov a pre včely je omnoho náročnejšie dostať sa k nektáru a peľu (Benjamin a McCallum, 2009). Stresory navyše nepôsobia v izolácií a práve kvôli tomu, je extrémne ťažké predpovedať ich účinky a interakcie (Potts et al., 2010).

Problémom je aj nedostatočné poznanie alebo ignorancia k požiadavkam na opelenie mnohých druhov plodín. V Európe z 250 druhov pestovaných plodín, je 150 považovaných za opelované hmyzom, avšak pre väčšinu z nich nie je jasné, ktorý druh je preferenčný, a či je ich výnos ovplyvnený nedostatočným opelením. Spoliehať sa len na 1 druh opelovača – *A. mellifera* je riskantná stratégia, čo je viditeľné napr. pri epidémii roztoča *Varroa destructor* (Goulson, 2003).

V posledných rokoch sa zdravotnému stavu včiel a poznaniu patogénov venuje zvýšená pozornosť aj v oblasti médií, hlavne po identifikácii fenoménu úbytku včiel ako Colony Collapse Disorder v rokoch 2006/2007 (VanEngelsdorp et al., 2009). Česká republika patrí k najviac zavčeleným zemiám, kde na km² pripadá asi 6,7 včelstva, pričom priemer EÚ činí 3,1, preto by sa rozhodne nemala zanedbávať prevencia a riešenie už pozorovaného úbytku tohto významného opelovača (Rychlík, 2015).

1.3 ZHORŠUJÚCI SA STAV ŽIVOTNÉHO PROSTREDIA A VYMIERANIE VČIEL

Súčasná situácia včiel vo svete začína byť kritická. Postupne sa dostávame do opeľovacej krízy, nakoľko strata habitatov spôsobila menšiu dostupnosť rastlinných zdrojov a takisto aj ich diverzitu.

Populácia včiel čelí mnohým chorobám a početnosť voľne žijúcich opeľovačov sa znižuje vo väčšine regiónov sveta. Diverzita divokých včiel sa výrazne znížila aj v Európe, hlavne kvôli strate habitatov (Aizen et al., 2009). Ďalšími dôležitými spúšťačmi sú zmeny využívania pôdy a jej fragmentácia, znečistenie, šírenie nepôvodných druhov a degradácia zdrojov biodiverzity (Potts et al., 2010). Úbytku sú vystavené jak manažované, tak voľne žijúce kolónie, ktoré čelia sukcesii parazitov a patogénov, ktoré sa náhodne rozšírili po celom svete, hlavne pričinením človeka. Intenzifikácia poľnohospodárstva a zvýšené používanie pesticídov spôsobuje, že opeľovači sú takisto chronicky vystavení kokteilu agrochemikálií (Goulson et al., 2015). Aj limitovaná priama redukcia poľnohospodárskej produkcie pri nedostatku opeľovačov môže spôsobiť neprimeraný dopyt po poľnohospodárskej pôde s cieľom uspokojiť rastúcu globálnu spotrebu, čo urýchli ničenie prírodných lokalít a môže spôsobiť ďalšiu stratu opeľovačov (Potts et al., 2010). Globálne zmeny klímy predpovede do budúcnosti takisto nezlepšujú (Goulson et al., 2015). Z väčšej časti sú dôsledky straty včiel negatívne, pretože hmyz je nevyhnutný na opeľovanie potravinárskych plodín a včely v súčasnosti vypĺňajú veľkú časť tejto úlohy (Schmidt a Buchmann, 1992). Produkčný deficit, ktorý by sa vyskytol v prípade neexistencie opeľovačov by predstavoval 3,5 – 8% v rozvinutom svete a závislosť na opeľovačoch od roku 1980 vzrástla až o 50-62% (Aizen et al., 2009).

Potenciálne ekologické dopady úbytku včiel sú menšie v porovnaní s hlavnými globálnymi zmenami, ako je napr. odlesňovanie, ale môžu byť nesmierne dôležité, nakoľko sú včely kozmopolitným druhom a dokážu prebrať úlohu aj ostatných opeľovačov (hmyz, vtáky, possum medosavý) a považujú sa za kľúčové druhy ekosystému (Matheson et al., 1996). Nutričný prínos opeľovačov pokiaľ ide o vitamíny, proteíny a minerálne látky môže byť oveľa dôležitejší, ako celková masa vyprodukovaných plodín (Aizen et al., 2009).

Napríklad v USA je divoká populácia včely medonosnej takmer nulová. Farmári, ktorí sa predtým spoliehali na opeľovanie pomocou týchto včiel, sú nútení k prenájmu komerčných kolónií od včelárov. Takisto včely sa stali viac-menej závislými na včelárovi,

ktorý v prípade objavenia nových hrozieb je schopný vykonať potrebné kroky. Problémom však je, že často včelár dané opatrenia nepodnikne, prípadne danú právomoc nemá (Schmidt a Buchmann, 1992). Z tohto dôvodu sa budú parazity aj naďalej rozširovať, čomu prispievajú komerčné spôsoby prepravy včiel, migračné aktivity včelárov, roje schopné lietať na veľké vzdialenosti, takisto lodná a lietadlová doprava (Shimanuki, 1992). Avšak hlavným problémom včelárstva je, ak sú ceny medu vysoké, včelári sa sústreďujú hlavne na produkt a nie na opelenie a naopak pri nízkych cenách medu, počet včelárov klesá a tým takisto aj počet ľahko dostupných včiel (Schmidt a Buchmann, 1992).

Ďalším negatívnym efektom na populáciu včiel je šírenie afrikanizovaných včiel, ktoré vinou človeka unikli z Južnej Ameriky počas chybného vypustenia v priebehu vedeckého experimentu. Tento druh je schopný vyplniť miesto európskych včiel a ohroziť schopnosť riadenia kolónií. Africké včely vyhľadávajú kolóniu európskych včiel, zabijú kráľovnú a nahradia ju vlastnou, čím sa mení genetika celého úľa (Watanabe, 1994).

Človek samozrejme nie je jediný tvor, ktorého sa úbytok včiel dotýka. Napríklad odhady North Carolina State University popisujú, že 15-20% potravy medveďa čierneho pochádza z medu a včelami opelovaného ovocia, orechov a bobúľ. Približne 20%-ný pokles v preferovaných zdrojoch potravy by donútilo zmeniť zloženie potravy medveďa (Nickens, 1996).

Nedostatok včiel má impakt aj na druhy rastlín, ktoré vyžadujú určitý počet úspešných návštev od včiel, aby bolo zabezpečené oplodnenie všetkých vajíčok. Ak je oplodnenie nedostatočné z dôvodu nedostatku včiel, nie všetky semená sa budú vyvíjať a plod bude tvarovo aj veľkostne ochudobnený (Bradbear, 2009). Je faktom, že rôzne druhy opelovačov preferujú rôzne druhy kvetov. V Colorade bol uskutočnený výskum, kde bol z lúky odstránený najpočetnejší druh opelovača – včela. Vo výsledku sa zostávajúce čmeliaky stali menej „vernými“ preferovanému druhu kvetov, ako tomu bolo predtým v prítomnosti včely (kvôli vzájomnému súladu medzi druhmi). Odstránenie včely malo následok na konkrétny druh rastliny (larkspur), ktorá vyžaduje reprodukciu svojho vlastného peľu t.z. „verného“ včelieho partnera. Pri jeho neexistencii nastal výrazný úbytok druhu, čo znamená už spomínaný efekt straty biodiverzity. Takisto pestované rastliny pri podobnom experimente poskytovali až o 30% menej osiva, nakoľko bol narušený symbiotický vzťah medzi rastlinou a včelou (Benjamin a McCallum, 2009).

Aj napriek tomu, že základné potraviny (pšenica, kukurica, ryža, zemiaky) sú samoopelovači, alebo sa rozmnožujú vegetatívne, na základe spomínaných interakcií medzi včelou medonosnou, prostredím a človekom, by výrazné vymiznutie tohto organizmu mohlo

mat' za následok zníženú schopnosť rozmnožovania rastlín a tým ohrozenie všetkých uvedených funkcií (Goulson et al., 2012). Pre vyváženú ľudskú výživu, takisto výživu zvierat je opelenie ovocia, zeleniny a stimulačných plodín esenciálne.

Opelenie hmyzu je vitálne dôležité pre terestrické ekosystémy a produkciu plodín. Opelovacia kríza v posledných dekádach vyvolala debaty a výskum, avšak z mnohých oblastí je stále nedostatok dát. Ak sú k dispozícii, tak z manažovaných kolónií, o divokých včelách toho vieme veľmi málo (Goulson et al., 2015).

Rapídny pokles populácie včely medonosnej by pravdepodobne viedol k vyšším cenám jedla a jeho dostupnosti a takisto vyšším nákladom pre chovateľov včiel. Pochopenie biologického pozadia strát kolónií včiel nám umožní zlepšiť manažment kolónie, a takisto celkový zdravotný stav včiel. Najvýznamnejšou škodou je však zníženie zdravia prostredia, nakoľko sú včely považované za významný bioindikátor a ich stav priamo reflektuje zdravie celého prostredia. Straty vo včelstvách môžu odrážať doposiaľ skrytý, oveľa závažnejší environmentálny problém. Zaťaženie parazitmi sa často chápe ako reakcia na znečistené životné prostredie. S úbytkom včiel úzko súvisí prítomnosť a dopad parazitov na včelstvá, a daná problematika je predmetom riešenia tejto diplomovej práce.

2 CIEĽ PRÁCE

Súčasný zdravotný stav včiel je ovplyvnený hlavne parazitmi tj. roztočmi, parazitickými prvokmi, hubami, baktériami a vírusmi. Hlavným cieľom práce je porovnanie napadnutia včiel eukaryotickými parazitmi *Nosema sp.*, *Crithidia mellificae* a *Apicystis bombi* na rôznych stanovištiach a v rôznych včelstvách a ich súvis s napadnutím roztoča *Varroa destructor*. V priebehu výskumu bolo pri detekcii *C. mellificae* zistené, že sa jedná o iný druh trypanozómy *Lotmaria passim*, čo vytvorilo ďalší cieľ overenia prítomnosti tohto parazita a jeho zaradenie do porovnania napadnutia včiel.

3 LITERÁRNY PREHĽAD

3.1 SYNDRÓM KOLAPSU VČELSTIEV (CCD)

V súčasnosti je zaznamenávaný výrazný úbytok včiel v celosvetovom meradle. Straty vo včelstvách boli prítomné aj v minulosti, existuje však viac rozdielov oproti priebehu v predchádzajúcich dekádach. Symptómy CCD (Colony Collapse Disorder = syndróm kolapsu včelstiev) sú špecifické v tom, že kolónie včiel sa často javia zdravé dokonca týždne pred kolapsom (Johnson, 2010). V USA bol prvýkrát reportovaný v roku 2006 a tento masívny úbytok včiel bol nazvaný CCD. Na úrovni apikultúry sa jedná o straty hlásené včelármi vo výške 50-90% kolónií, často iba v priebehu niekoľkých týždňov (Ellis, 2013). Ďalším znakom CCD je najvyššia prevalencia po zime, kedy práve kolónie s CCD indikujú výrazne zníženú imunitnú odpoveď (Cornman et al., 2012).

Kolabujúce kolónie podľa Ellisa (2013) obsahujú nedostatok včiel na zachovanie potomstva, robotnice sú všetky mladých vekových kategórií, kráľovná je síce prítomná, ale včely postupne odmietajú konzumovať potravu poskytnutú včelárom. Kolónie po kolapse sa vyznačujú absenciou dospelých jedincov, maximálne je prítomná malá skupina. V úli sa nachádzajú nevyužité zásoby potravy, ktoré dlhšiu dobu nie sú využívané ani inými organizmami s rovnakou nutričnou preferenciou (Cornman et al., 2012). Včely po opustení úľa nie sú schopné návratu (veľmi necharakteristické správanie pre sociálny hmyz), straty sú masívnych rozmerov a dôvod stále nie je úplne objasnený (Johnson, 2010). Omeškaná je inak bežná invázia roztočov, molí a kleptoparazitov z okolitých včelích kolónií. Včelári uvádzajú, že kolónie takisto neobsahujú žiadne (prípadne minimum) mŕtvych včiel (VanEngelsdorp et al., 2009).

Aj napriek viacerým výskumom nie je stále možné určiť priamu príčinu, či jeden najzávažnejší faktor spôsobujúci výrazný úhyn včiel. Doposiaľ ani jeden patogén nebol nájdený s dostatočnou frekvenciou, aby bolo možné povedať, že je príčinou CCD. Najpravdepodobnejším scenárom sa zdá byť synergické pôsobenie viacerých faktorov, ktorými sú: parazity, patogény a vírusové ochorenia, nesprávny manažment včiel, genetický zdroj kráľovnej, chemikálie používané v kolónií, chemické toxíny v prostredí (hlavne pesticídy), geneticky modifikované plodiny, výživa, zatiaľ neobjavené patogény,

fragmentácia habitatov, poľnohospodárske praktiky, geneticky modifikovaný peľ a problémy v termoregulácii kolónie (Anonym 3, 2012; Ellis, 2013).

Veľmi kontroverznou a debatovanou príčinou sú pesticídy (Celli a Maccagnani, 2003). Popri poskytovanom ekonomickom benefite limitujú rast kvetov popri poľnohospodárskych plodinách a podporujú vznik monokultúr. Najviac pozornosti je venovanej hlavne priamemu toxickému účinku na včely. V kolónii *Apis mellifera* bolo detekovaných 161 rôznych pesticídov, 3 neonicotinoidy (najnovšie a najsilnejšie neurotoxíny postihujúce nervový systém) a 2 organofosfáty (Goulson et al., 2012). Problémom takisto je, že kolónie sú väčšinou vystavené kokteilu rôznych agrochemikálií (Potts et al., 2003).

Celkový pokles je nepochybne výsledkom násobenia faktorov známych aj neznámych, konajúcich jednotlivo, alebo v kombinácii. Za najvýznamnejšie faktory ovplyvňujúce zdravie opeľovačov sa považujú choroby, parazity, poľnohospodárske postupy a klíma (Tirado et al., 2013). Výskumy ukázali, že oslabené kolónie majú oveľa vyššiu úroveň zamorenia patogénmi a pesticídovými reziduami. Nezávislé štúdie potvrdzujú častú prítomnosť pesticídov, či už na priamu kontrolu patogénov, alebo pôvodom z poľnohospodárstva. Vysoké dávky pesticídov môžu následne interagovať s ďalšími polutantami, parazitmi a patogénmi spôsobom, ktorý rapídne zvyšuje mortalitu. Jedným z možných spôsobov ako včely reagujú na patogény, je podľa VanEngelsdorpa et al. (2009) emigrácia z úľa, a práve toto správanie vysvetľuje rýchlu stratu dospeljej populácie, pričom infikovaní jedinci umierajú ďaleko od úľa. Vyvinuli si týmto spôsobom odpoveď na hrozbu vo forme samovražedného odstránenia patogénu. Včely vďaka tomuto mechanizmu umierajú príliš rýchlo na to, aby bola kolónia schopná ich nahradiť, a to spôsobí následné zlyhanie populácie (VanEngelsdorp et al. 2009).

Intenzívne poľnohospodárske oblasti produkujú menej divoko rastúcich kvetov, ktoré sú často plošne izolované vo formácii masovo pestovaných plodín. Farmárska pôda spôsobuje viac monotónnu stravu, ako v evolučnej minulosti, čo môže mať významný vplyv na fitness včely. Pre optimálny rast a vývin je pre organizmus včely potrebná variácia rôznych peľov (Goulson et al., 2015).

Zmena klímy v posledných dekádach (úbytok ľadu, rozširovanie púští, extrémne výkyvy počasia) ma významný vplyv na včely na rôznych úrovniach. Jedná sa priamo o správanie a fyziológiu, zmenu kvality rastlinného životného prostredia, zníženie kapacity na rozvoj kolónie, vznik nových vzťahov medzi patogénmi, potreba zmeny včelárskych metód, pričom sa hlavný impakt sa považuje zmena rozloženia druhov kvitnúcich rastlín, na ktorých sú včely závislé. Pravdepodobným následkom bude migrácia včiel, import kráľovien

iných haplotypov, vznik nových invázných druhov, zvýšenie distribučného rozsahu patogénov a celková zmena rovnováhy medzi včelou, životným prostredím rastlín a chorobami (Le Conte a Navajas, 2008).

Straty včiel vo svete

V USA predstavuje strata v komerčných kolóniách od roku 2006 zhruba 30-40%. V Severnej Amerike od roku 2004 pozorovali menej včiel ako kedykoľvek za posledných 50 rokov. Takisto Čína, ktorá má cez 6 miliónov včelstiev, z čoho asi 200-tisíc predstavujú druhy *Apis mellifera* a *Apis cerana*, hlási nevysvetliteľné straty v posledných rokoch. Príznaky CCD boli reportované aj z Egypta z oblasti pozdĺž Nílu. V strednej Európe sa straty vo včelstvách zvýšili od roku 1985 až o 25%. Od roku 1998 je hlásená zvýšená úmrtnosť a oslabenie kolónií z Francúzska, Belgicka, Švajčiarska, Nemecka, Holandska, Talianska, Španielska a Veľkej Británie, kde úmrtnosť včiel dosahuje dokonca až 54% populácie (Tirado et al., 2013). Úmrtnosť v Európe dosahuje v priemere 20% (Laurent et al., 2015). Výsledky celosvetovej analýzy mortality po zime 2014/2015, ktorej sa zúčastnilo 31 zemí, zahŕňajúc 469 249 kolónií hodnotia priemernú stratu včelstiev na 17,4% s vysokou variabilitou medzi krajinami a takisto aj regiónmi v rámci krajín. Najväčšie straty boli zaznamenané v Belgicku, až 36,5% a napr. v susednom Rakúsku to bolo celkovo 24,7% (Anonym 2, 2015)

Straty včiel v Českej republike

V Českej republike sa v posledných rokoch takisto zaznamenáva významný pokles vo včelstvách, avšak nenazýva sa fenoménom CCD, pri ktorom príčiny nie sú jasné, pretože hlavným dôvodom úbytku včiel v ČR je varroóza spôsobená klieštikom *Varroa destructor* (Kamler et al., 2014). Za najkritickejšie sa považujú sezóny 2001/2002, 2007/2008, 2011/2012 a v minulej sezóne 2013/2014 zaznamenali straty 6,6%. V súčasnej sezóne 2014/2015 podľa výskumu COLOSS počas zimy v ČR uhynulo 19,4% včiel. Miera úhynu je porovnateľná z Nemeckom, Poľskom a Estónskom. V susednom Slovensku úmrtnosť dosiahla nižšie hodnoty okolo 8% (Van der Zee, 2014; Anonym 2, 2015).

Včely prirodzene trpia širokou škálou parazitov a patogénov, zahŕňajúc prvoky, huby, baktérie a vírusy. Prirodzené patogény hrajú nepochybne významnú, ale málo preskúmanú úlohu v ovplyvňovaní populačnej dynamiky včelích hostiteľov. Pozornosť je však sústredená na neprirodzené parazity a patogény (Goulson et al., 2015). V temperátnom klimatickom pásme je považovaný za hlavný dôvod strát včelstiev roztoč *Varroa destructor* (Cornman et al., 2010). V tejto práci sa zameriavam na ďalší faktor, ktorý môže straty včelstiev spôsobovať, t.j. eukaryotické parazity včiel. Zdravie včiel takisto odzrkadluje environmentálnu kvalitu daného prostredia. Všeobecne platí čím je včelstvo slabšie, tým je parazitárne zaťaženie roztočmi, eukaryotickými parazitmi, baktériami a vírusmi väčšie.

3.2 PARAZITY A IMUNITNÝ SYSTÉM VČIEL

Včely trpia v dôsledku svojich vlastných chorôb a parazitov. Parazity často bývajú invazívne druhy, ktoré sa prebojovali cez prirodzené prispôsobenie včiel. Choré včely sú následne náchylnejšie na všetky ostatné negatívne vplyvy (Tirado et al., 2013). Medzi najvýznamnejšie choroby včiel patrí mor včelieho plodu, nose móza a varroóza (Rychlík, 2015).

Parazity sú univerzálnou hrozbou organizmov a takisto sa predpokladá, že parazitárne zaťaženie sa zvyšuje s vekom hostiteľa, buď v dôsledku nahromadenia parazitov v čase, alebo znížením imunokompetencie vekom hostiteľa (Roberts a Hughes, 2014). Prítomnosť parazitov ovplyvňuje mnoho faktorov, ako včelárske praktiky, hostiteľská genetická variabilita, alebo klíma (Muñoz et al., 2014). K pochopeniu dynamiky medzi parazitom a hostiteľom, je potrebné poznať schopnosť hostiteľa odolávať infekcii.

Schopnosť včiel odolávať chorobám a parazitom je ovplyvnená viacerými faktormi. Medzi najdôležitejšie patria nutričný stav včely, vystavenie toxickým chemikáliám, diverzita prostredia a klíma (Tirado et al., 2013).

Včely sú proti parazitárnej infekcii chránené pomocou imunitného systému. Všeobecnú imunitu včely zabezpečuje hlavne imunitný enzým hmyzu fenoloxidáza (Roberts a Hughes, 2014). Takisto sa predpokladá aj určitý súvis s vertikálne prenášanými mikrobiálnymi symbiontami, ktoré pravdepodobne hrajú úlohu v obrane hmyzu proti infekcii vírusmi, baktériami a parazitmi. U včiel sa prekvapivo ukázalo, že majú druhovo pomerne chudobné spoločenstvo baktérií mikrobiálnej flóry v čreve, pričom sa práve jej úloha považuje za významnú pri interakcii s patogénmi (Koch a Schmid-Hempel, 2011). Zdravie včiel je nutné posudzovať podľa širšieho systému, ktorý zahŕňa včelí genóm, ale takisto aj genóm ich benefičných mikrobiálnych symbiontov. Genóm hostiteľa a mikroflóry sa prispôsobuje a vyvíja ako 1 jednotka, a v závislosti na reakciu na patogény a iné environmentálne faktory určujúce fenotyp a kondíciu organizmu (Schwarz et al., 2015^b).

Parazity sú schopné meniť metabolizmus uhlíka a dusíka, a takisto kľúčové biologické funkcie hostiteľa. Narušujú imunitnú obranu čрева a uprednostňujú výrobu metabolitov, ktoré si vyžadujú pre svoj vlastný vývoj (Muñoz et al., 2014). Včely sú špecifickým objektom štúdia vzájomných účinkov na imunokompetenciu, pretože ich imunitný systém sa líši v závislosti na veku, sociálnom kontexte a úlohe v kolónii. Všeobecne oslabujú zdravie spoločenstva a vytvárajú priestor pre sekundárne infekcie. Nakazené včely následne

podstupujú oxidatívny stres, nakoľko prítomnosť parazita v čreve zvyšuje hojnosť antioxidantných proteínov (Vidau et al., 2014). V súčasnosti je veľmi často diskutovaný parazit *Nosema sp.* Mikrosporidióza spôsobená týmto druhom je jedným z hlavných faktorov súvisiacich so stratami včelstiev (Muñoz et al., 2014).

K rozšíreniu väčšiny parazitov včiel došlo dôsledkom ich prepravy na veľké vzdialenosti. Hlavný prenos prebehol viac-menej v histórii, ale tento trend stále pokračuje, aj napriek zlepšenému procesu karantény pri prevoze. Navyše preprava na veľké vzdialenosti spôsobuje stres, zvýšený prísun CO₂, vibrácie, zvýšenú teplotu a tým vyššiu náchylnosť na choroby. K rozšíreniu došlo takisto prostredníctvom komerčného obchodu s čmeliakmi, ktoré sa používajú hlavne na opelenie skleníkových plodín, ako sú napr. rajčiny (Goulson et al., 2015).

Je zrejmé, že sociálne prostredie včiel a čmeliakov uľahčuje prenos baktérií z jedného jedinca na druhého. Jedná sa najmä o vertikálny prenos a následnú koevolúciu špeciálnych črevných baktérií vo včelách. Kým vertikálny prenos sa ukázal ako zvyšujúci úmrtnosť, horizontálny spôsobuje zníženú hostiteľskú plodnosť (Koch a Schmid-Hempel, 2011). Veľká populačná hustota včiel vytvára ideálne podmienky pre rapidnú multiplikáciu a následný prenos do divokých populácií. Predpoveď indikuje, že vlny infekcie sa šíria rýchlosťou 2km za týždeň, pri tomto zábere sa infikuje 100% včiel (Goulson et al., 2015). Štúdia Graystocka et al. (2015) poskytuje nový náhľad na disperziu parazitov. Výsledky ukazujú, že rastliny sa môžu správať ako disperzné platformy pre variáciu parazitov opelovačov, kedy po kontaminácii infekciou prispievajú k rozširovaniu parazitov pomocou včiel, ktoré slúžia ako vektory. Dokázaný bol dokonca prenos parazitov medzi včelami a čmeliakmi, kedy parazity schopné infikovať iba 1 druh boli tým druhým iba prenášané. Včela teda dokáže hrať aj úlohu rezervoárového hostiteľa. Mnoho parazitov je vďaka tomu schopných benefitovať zo zdieľaných potravných zdrojov (Graystock et al., 2015). Celkovo je však známych málo informácií o rozpätí hostiteľov, geografickom rozpätí, prevalencii a virulencii väčšiny patogénov včiel.

Žiadny zo stresorov nepôsobí v izolácii, napr. niektoré pesticídy majú významný synergický či aditívny účinok k výskytu parazitárnej infekcie. Expozícia pesticídom a nutričný stres zhoršujú imunitnú odpoveď a včely sa tak stávajú ľahšie dosiahnuteľnými pre parazity (Le Conte a Navajas, 2008). Takisto ko-infekcia viacerými druhmi parazitov môže vyústiť vo facilitáciu, alebo kompetíciu, čo dokáže výrazne zmeniť priebeh a povahu infekcie, ako zvýšená virulencia a náchylnosť k infekcii ďalšími druhmi (Schwarz et al., 2015^b). Chronická expozícia viacerých interagujúcich stresorov spôsobuje straty včelích

kolónií a úbytok divokých opel'ovačov. Určitá kombinácia stresorov sa však miesto od miesta líši (Goulson et al., 2015).

3.3 EUKARYOTICKÉ PARAZITY VČIEL

V mojej práci sa sústreďujem na prítomnosť eukaryotických parazitov v organizme včiel, ktoré ako ukazujú viaceré štúdie, patria medzi najvýznamnejších pôvodcov kolapsu kolónii. Konkrétne sa zameriavam na detekciu parazitov *Nosema apis* a *Nosema ceranae* v českých včelách, ktoré sú v súčasnosti podľa množstva odbornej literatúry považované za vysoko súvisiace s kolapsom kolónii, pričom sa vyskytujú viacmenej po celom svete a potvrdený je ich výskyt vo väčšine európskych krajín, vrátane Českej republiky (Veselý et al., 2003; Kamler et al., 2011).

Najväčší počet zistených parazitov sociálneho hmyzu bol doposiaľ zistený u včely medonosnej, s viac ako 70-timi druhmi v databáze. Európska včela medonosná je komerčne chovaným druhom takmer všade na svete, vďaka vzájomnej výmene dochádza k rozšíreniu chorôb a prenosu parazitov. Vo väčšine prípadov parazity do tela včely vnikajú cez stenu čreva, pretože ostatné časti alimentárneho traktu sú pôvodne ektodermálne a poskytujú efektívnu bariéru proti infekciám. Dôležitú úlohu hrá takisto pH intestinálneho traktu, pri nepriaznivých hodnotách sú virióny degradované (Schmid-Hempel, 1998).

Medzi najvýznamnejšie parazity včiel patrí klieštik *Varroa destructor*, spôsobujúci tzv. varroózu, rozmnožujúci sa v kuklách včiel, pričom im saje hemolymfu, čím potláča proteínový metabolizmus a takisto prenáša radu ďalších viróz, ako napr. vírus deformovaných krídel (Kamler et al., 2014). Tento škodca ničí včelstvá po celom svete a takisto je aktívnym vektorom v prenose vírusov a baktérií, navyše sa stáva rezistentným voči akaricídum používaných včelármi (Le Conte a Navajas, 2008). Ďalšou parazitárnou chorobou je meňavkovitá nákaza včiel spôsobená prvokom *Malpighamoeba mellificae*, ktorá sa vyskytuje vo vegetatívnej forme a parazituje vo výstelkových bunkách Malpighiho žliaz a vo forme cýst, ktoré žijú mimo organizmu včiel. Nákazu možno pozorovať na základe pomaly lezúcich včiel, ktoré sú neschopné letu, s trasúcimi sa krídelkami s plochou zadnou časťou tela (Schmid-Hempel, 1998).

Akariáza je choroba včiel spôsobená parazitárnym roztočom *Acarapis woodi*. Roztočičky odoberajú včele veľa hemolymfy, pri postupnom preplňovaní vzdušnic roztočičkami, vajíčkami a larvami dochádza v dôsledku nedostatočného zásobovania kyslíkom k odumretiu hrudných svalov. Parazitárnou chorobou plodu a včiel vyvolanú roztočom *Tropilaelaps clareae* je ďalším ohrozujúcim faktorom včely medonosnej. Kládne vajíčka do buniek včelieho plodového plástu tesne pred zaviečkováním plodu, vajíčka ukladá často

priamo na telo larvy a rozmnožuje sa veľmi rýchlo. Takisto saje hemolymfu a na vyliahnutých včelách sú viditeľné morfológické zmeny napr. deformované krídla a takéto včely sú z úľov vynášané (Anonym 1, 2013)

Hlavné kúmané patogény rodu *Nosema sp.* zaraďujeme medzi mikrosporidiálne parazity, ktoré patria k najmenším eukaryotom. Sú obligátne intracelulárne a spôsobujú poškodenie ekonomicky dôležitého hmyzu (Szumowski a Troemel, 2015). Nájdené boli takmer u všetkých rodov bezstavovcov. Vyznačujú sa senzitivitou voči teplote, pričom tento aspekt naberá vyšší význam pre sociálne včely, ktoré sú schopné udržiavať vysokú teplotu tela pomocou svojich lietacích svalov (Schmid-Hempel, 1998).

Nosema apis bola v minulosti často prítomná vo väčšine včelstiev, avšak svetový trend v súčasnosti popisuje jej ústup a je postupne nahradzovaná príbuzným inváznym druhom *Nosema ceranae* (Huang et al., 2014; Yang et al., 2013). Potvrdenie tejto skutočnosti v rámci lokalít v Českej republike bude taktiež predmetom diplomovej práce.

Zvýšená pozornosť sa podľa posledných štúdií takisto prikladá parazitom *Apicystis bombi* a *Crithidia mellificae*, ktorých prítomnosť vo včelách a účinky stále nie sú úplne objasnené. Prítomnosť oboch parazitov je bežný u viacerých druhov čmeliakov *Bombus sp.* (Morimoto et al., 2013; Meeus et al., 2010; Plischuk et al., 2011) a z dôvodu ich blízkej príbuznosti a možnosti prenosu zaraďujem do mojej práce aj detekciu týchto druhov.

Očakávam, že v skúmaných vzorkách potvrdím vo viacerých prípadoch prítomnosť eukaryotov druhov *Nosema ceranae* a *Nosema apis*. Ak sa zvolenými metódami podarí detekovať aj ďalšie parazity rodov *Crithidia* a *Apicistys* poukázalo by to na dôležitosť venovania pozornosti aj novým druhom parazitov.

3.4 NOSEMÓZA

Nákaza včiel zvaná nose móza, spôsobená parazitmi rodu *Nosema*, je po varroóze druhým najviac rozšíreným zdravotným problémom včely medonosnej. Patogénnymi pre včely sú dva druhy, a to *Nosema apis* a *Nosema ceranae*.

Taxonomické zaradenie *Nosema sp.*:

Ríša: *Eukaryota*

Kmeň: *Fungi*

Trieda: *Microsporidia*

Podtrieda: *Nosematidae*

Rod: *Nosema*

Zdroj: Cornman et al. (2009)

Až na základe štúdie DNA je od roku 2006 trieda *Microsporidia* ktorá obsahuje viac ako 160 rodov a takmer 1300 druhov, radený medzi vysoko špecializované huby (Schwarz et al., 2015^a). Charakteristicky sú to obligátne intracelulárne hubové parazity, ktoré mimo hostiteľskej bunky existujú iba ako metabolicky inaktívne výtrusy. Často sa vyznačujú rezistenciou k imunitnej odpovedi svojich hostiteľov (Genersch, 2010). Infekcia *Nosema sp.* podľa Chena et al. (2009) spôsobuje úplavicu včiel, skrátenie dĺžky života, potrebu výmeny infikovanej kráľovnej a pokles veľkosti kolónie. Štúdia Mussena (2011) spomína taktiež, že robotnice nakazené spórami nedokážu správne tráviť potravu a takisto nie sú schopné v dôsledku poškodenia žliaz a narušenia premeny bielkovín produkovať potravové sekrety potrebné pre vývoj potomstva. Ďalej uvádza, že dĺžka života môže byť skrátená až o 78%.

V minulosti prevládal viac parazit *Nosema apis*, avšak v poslednej dekáde sa prikladá vyšší význam *N. ceranae*, parazitovi, ktorý bol pôvodne považovaný za schopného infikovať iba ázijský druh včiel *Apis cerana* (Genersch, 2010).

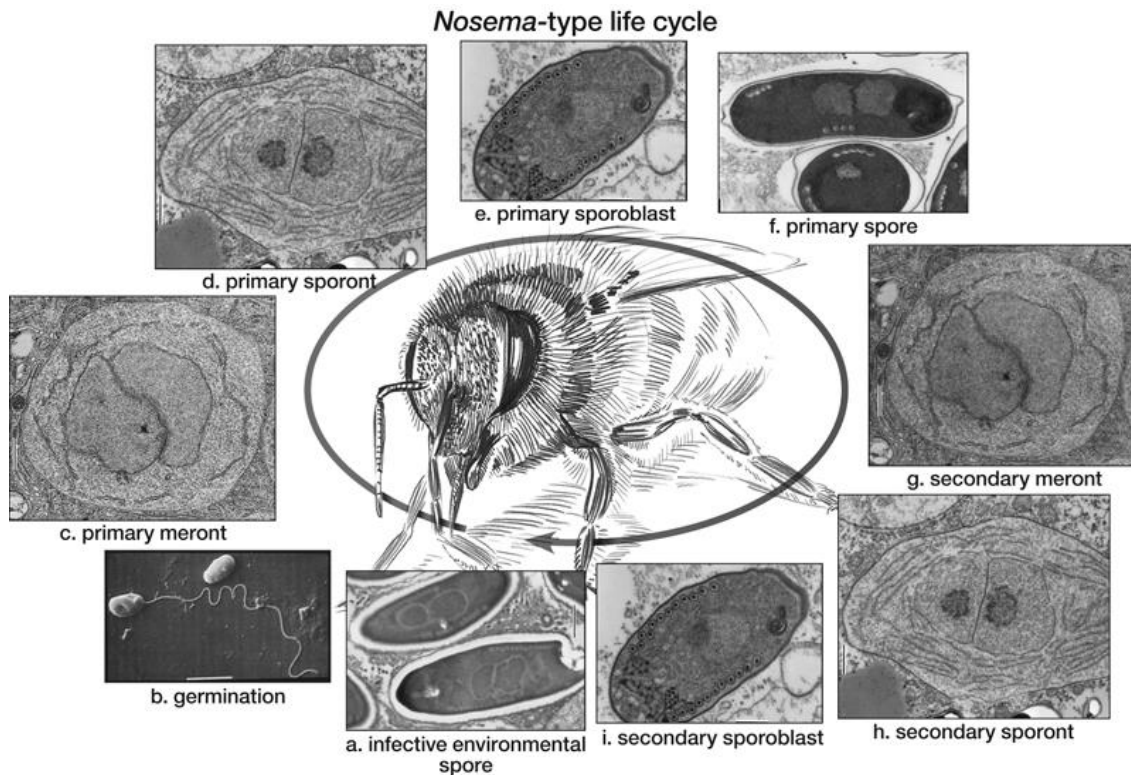
Rozdiel medzi druhmi *apis* a *ceranae* bol zistený na základe 16S malej podjednotky rRNA génovej sekvencie a ultraštruktúrálnej rysov, veľkosti spór a takisto v symptómoch ochorenia (Klee et al., 2007). Oba druhy sú schopné reprodukcie iba v epitelárnych bunkách čreva, avšak ich výtrusy boli podľa najnovšieho výskumu detekované aj v iných orgánoch, a to: včelie ováriá, sliny, mandibulárne a hypofaryngiálne žľazy, med, peľ, vosk a včelársky materiál. Ako najpravdepodobnejšou cestou prenosu výtrusov aj do ťažko dostupných tkanív sa zdá byť hemolymfa, v ktorej boli nájdené stopy patogénu (Glavinić, 2014).

Vývojový cyklus

Mechanismus mikrosporidiálnych parazitov (rovnaký pre obidva druhy) začína požitím spór včelou, ktoré sú prítomné v potrave, vzduchu, vode a peľi (Genersch, 2010). Vo vnútri spóry *Nosema sp.* sa nachádza dvojjadrový sporont. Tesne pod stenou spóry je uložené v dvoch vrstvách závitú pólové vlákno, ktoré je duté a dlhé až 400 μ m (Rejnič et al., 1987). Infekcia hostiteľskej bunky zahŕňa klíčenie spór a následnej mechanickej injekcii extrudovanej trubice polárneho vyčnievajúceho zo spór. Fyzickou silou vlákno preniká cez membránu hostiteľskej bunky a cez neho je potom vnášaný infekčný sporoplazmus priamo do cytoplazmy bunky, alebo aspoň do blízkosti jej stien (Roberts a Hughes, 2014). V epitelárnej bunke žalúdka sa parazit následne replikuje a približne po 3 až 4 dňoch od infekcie sa vo veľkom množstve začínajú vyvíjať nové výtrusy, ktoré potom odchádzajú s výkalmi z tela von (Anonym 1, 2013).

Nosematická infekcia sa vyskytuje samostatne, teda buď *N. apis*, alebo *N. ceranae*, ale aj ako zmiešaná infekcia obidvoma druhmi.

Obrázok č.1: Schéma životného cyklu *Nosema sp.*



Zdroj: Internet (1)

Vznik a priebeh infekcie

Nákaza *Nosema sp.* narastá v obdobiach útlmu včiel, a to najmä v skorú jar, jeseň a v zime, prípadne po dlhotrvajúcom nepriaznivom počasí, nevhodnom umiestnení úľa, alebo skorom a príliš veľkom rozšírení úľa včelárom (Botías et al., 2013). *N. apis* má viac sezónny charakter, s typickým vrcholom výskytu aj dopadu na včelstvá v zimnom období, nakoľko ťažko znáša vysoké teploty a infekcia behom leta je výrazne obmedzená. Naopak *N. ceranae* zaznamenáva vyšší výskyt v letných mesiacoch (Gómez-Moracho et al., 2015). Vysoká virulencia bola zistená najmä v Španielsku, práve v dôsledku teplej klímy (Higes et al., 2006).

Nákaza včely najčastejšie nastáva prostredníctvom potravy obsahujúcej výtrusy. Do včelstva môžu byť však spóry prinášané aj nakazenými zalietavajúcimi, či lúpežnými včelami. Príčinou môže byť aj samotný včelár pri výmene matky za nakazenú, alebo pri spájaní či doplňovaní úľov (Rejnič et al., 1987). Zrejme najvýznamnejší spôsob prenosu nákazy medzi včelami je koprofágia, t.j. požieraním výkalov (Kamler et al., 2011). Dôvodom je prirodzený inštinkt čistoty včiel a zároveň pri nose móze je chuť výkalov výrazne sladšia (Fries et al., 2012). Počas prvých 5 dní od invázie dochádza v dôsledku porušenia črevnej bariéry k prestupu saprofytických baktérií z tráviacich ústrojov do hemolymfy včiel a ich hynutie na septikémiu. Napadnuté bunky črevného epitelu strácajú plazmu a v neskoršom období sa prestáva tvoriť peritrofická membrána a teda dochádza k porušeniu činnosti žalúdka a k nedokonalému tráveniu a trofalaxii (Veselý et al., 2003). Včely následne vo vnútornom prostredí kontaminujú zdroje potravy, teda vodu aj peľ a tým sa infekcia šíri ďalej (Kamler et al., 2011). Infikované včely konzumujú väčšie množstvo cukru a majú vyššie energetické nároky a stres (Huang et al., 2014). Podľa výskumu Vidaua et al. (2014) je parazit schopný meniť metabolizmus uhlíka a dusíka a tým má schopnosť meniť kľúčové biologické funkcie hostiteľa. Vyvoláva uvoľnenie reaktívneho kyslíka a dusíka, čo sú základné zložky imunitnej odpovede hmyzu (Vidau et al., 2014). Svojou prítomnosťou narušuje imunitnú obranu čreva, pretože včela uprednostňuje výrobu hostiteľských metabolitov požadovaných pre vývoj samotného parazita (Fries et al., 2012).

U napadnutej včely má na intenzitu množenia *Nosema sp.* vplyv rada činiteľov. Najvýznamnejšími sú teplota a prítomnosť bielkovín v potrave. Optimálnou teplotou pre parazita je 30-35°C, čo je bežná teplota vo vnútri úľa (Veselý et al., 2003). Vo včelách chovaných pri teplote 30°C dochádza k formovaniu nových spór do 5 dní od začiatku infekcie. Dozreté spóry opúšťajú telo s výkalmi, ako voľné spóry, alebo stále napojené na

tukovú bunku tela hostiteľa. Infikovaná včela pritom môže obsahovať 30-50 mil spór (Schmid-Hempel, 1998).

Experimentálne vyšetovanie nosematickej infekcie na fitness hostiteľskej kolónie podľa Tripodi et al. (2014) prinieslo protichodné závery. Nakazené kráľovné vytvárajú menšie kolónie a produkujú menej reprodukčného materiálu, čo následne vedie k poklesu populácie. Samci z infikovaných kolónií produkujú málo životaschopné spermie a takisto vykazujú nafúknuté bruchá, nechcú sa páriť a tým účinne znižujú zdravie a rast kolónie. Naopak v štúdií na Novom Zélande boli kolónie aj napriek nose móže rovnako produktívne, ako nose manegatívne (Tripodi et al., 2014).

Nosema apis vs. *Nosema ceranae*

Parazity *Nosema sp.* sú stále do značnej miery záhadné, popísané príznaky sa líšia medzi jednotlivými parazitmi rovnako, ako ich sezónny výskyt. Výsledky ukazujú, že hlavný spôsob prenosu medzi včelami sa medzi druhmi *N. apis* a *N. ceranae* môže líšiť (Milbrath et al., 2014). U druhu *N. ceranae* je potrebné lepšie objasniť celú epidemiológiu, doplniť nedostatok údajov o rozdielnej citlivosti oboch parazitov medzi rôznymi včelími kmeňmi. Rozdielna citlivosť sa prejavuje takisto aj v hostiteľovi a izoláty parazita sa pravdepodobne líšia v infekčnosti aj vo virulencii (Fries et al., 2012).

Dôležitým výstupom je, že väčšina súčasných údajov o *Nosema sp.* Bolo získaných z experimentov s *Nosema apis*, preto je výskum na rovnakej úrovni potrebný aj pre *N. ceranae* za účelom posúdenia podobnosti a rozdielov medzi oboma druhmi, nakoľko celá infekcia má už preukázané odlišnosti.

3.4.1 NOSEMA CERANAE

Nosema ceranae bola prvýkrát popísaná vo včele medonosnej v roku 2006, kedy sa výskyt parazita zhodoval s masívnymi stratami včelstiev v Európe a Severnej Amerike (Vidau et al., 2014). Vyznačuje sa spórovým dimorfizmom, pričom tenkostenné spóry vyklíčia v hostiteľovi a hrubostenné sú uvoľňované do prostredia. Spóry majú cylindrický tvar s priemernou veľkosťou 4,6 x 2,5 µm (Williams et al., 2014).

Patogenita

V prípade *Nosema ceranae* včelstvá zo začiatku nevykazujú žiadne známky nákazy, okrem zvýšenej mortality počas zimy. V štúdiu Nosemosis (Anonym 1, 2013) uvádzajú, že pri prepuknutí infekcie črevo včiel nabere z pôvodnej hnedej, bielej farby a stáva sa veľmi krehkým. Pri akútnom priebehu takisto môžeme zaznamenať výkaly na plástoch, úľoch, silný spád uhynutých včiel a rapídne slabnutie včelstva.

Medzi hlavné poruchy popísané v infikovaných včelách patrí aktívny stres, behaviorálna horúčka, hormonálne poruchy, imunitné vyčerpanie a následné zníženie životnosti (Vidau et al., 2014). *Nosema* v tukových bunkách včiel spôsobuje expresiu génov v metabolických a nutričných dráhach, čo pravdepodobne vedie k transkripčným a fyziologickým zmenám asociovaným práve so zmenou správania, zníženou imunitnou odpoveďou a skrátenou dĺžkou života (Grozinger a Robinson, 2015). Kolónie s chronickým priebehom noseμόzy sú slabé a včiel postupne ubúda, slabo lietajú a majú skrátený život (Botías et al., 2013). Prítomnosť parazita takisto zvyšuje citlivosť k chemickým stresorom a môže znižovať účinnosť liečby akaricídmi proti *Varroa destructor* (Vidau et al., 2014). Postupná depopulácia a vyššia jesenná a zimná úmrtnosť spôsobuje vznik modelu kolónie, kde ostáva kráľovná obklopená mladými včelami (Fries et al., 2012).

Prevalencia

Problematickým sa pri tomto druhu stáva najmä nedostatok symptómov, kedy sú mŕtve včely videné iba zriedkavo, aj to vďaka synergii s chorobami a pesticídmi (Anonym 1, 2013). Závažné symptómy boli popísané hlavne na juhu, zriedkavo v miernom podnebí. Je však možné, že priebeh infekcie sa líši aj rôznymi poddruhmi včiel, potravnou ponukou,

poľnohospodárskymi postupmi v danej lokalite, v manažmente úľa, či v dôsledku iných abiotických a biotických faktorov (Fries et al., 2012).

V prípade *N.ceranae* existuje málo dlhodobých štúdií založených na časovej dynamike infekcie včelstiev. Ukazuje sa jasný sezónny vplyv na rozšírenie choroby, vyššia prevalencia sa vyskytuje v ranom období. Problémom aj naďalej ostáva značná variabilita v produktivite a správaní medzi kolóniami (Milbrath et al., 2014).

Celosvetovo sa obrovský výskyt *Nosema ceranae* zaznamenal najmä v USA a Španielsku (Ravoet et al., 2014). Dôvod prečo sa práve v USA stala dominantným parazitom aj naďalej ostáva kontroverzný. V Českej republike bolo podľa štúdie Kamlera et al. (2011) vyšetrených 4010 včelstiev zo všetkých krajov od 113 chovateľov včiel. Parazit *Nosema ceranae* bol prítomný v 1134 včelstvách, teda s prevalenciou 52,3%. U 8 chovateľov bola dokonca zistená nákaza vo všetkých včelstvách. Prevalencia *Nosema apis* bola nižšia, celkovo 31,3% s prítomnosťou v 678 včelstvách. Celkovo bola nákaza *Nosema sp.* zaznamenaná v 54% všetkých vyšetovaných vzorkách.

V súčasnosti sa navyše začína prejavovať synergický efekt medzi nákazou a používanými poľnohospodárskymi pesticídmi, nakoľko parazit zvyšuje citlivosť k chemickým stresorom. Takisto preukázateľne znižuje účinnosť liečby akaricídmi proti patogénu *Varroa destructor* (Vidau et al. 2014). Výsledky zjavne ukazujú, že aj v podmienkach Českej republiky sa postupne *Nosema ceranae* dostáva do role dominantného parazita a je potrebné jeho postup monitorovať.

3.4.2 NOSEMA APIS

Mikrosporidiálny parazit včely medonosnej *Nosema apis* bol prvýkrát spomenutý v roku 1909, kedy Zander referoval o prvokovi vyvolávajúcom úplavicu včiel.

N. apis sa zdá byť neschopná infikovať larvy a juvenilné jedince (Schmid-Hempel, 1998). Spóry druhu majú oválny tvar a väčšiu veľkosť, ako u *N. ceranae*, a to: 5,8 x 3,3 µm. V tele hostiteľa sa usadzujú v tukových bunkách a hypofaryngiálnych žľazách. V iných orgánoch zatiaľ výskyt potvrdený nebol (Kamler et al., 2011).

Teplota a podmienky hostiteľa výrazne ovplyvňujú cyklus *N. apis*. Sporonty produkované v lete sú rozdielne, ako tie ktoré vznikajú v zimnom období. Takisto podľa Weisera (1961) diapauza hostiteľského hmyzu urýchľuje rozvoj mikrosporidií, čo môžeme považovať za relevantné pri včele, ako sociálnom hmyze so sezónnymi cyklami.

Patogenita

Včely infikované druhom *N. apis* nevykazujú najprv žiadne známky nákazy, ale ich dĺžka života sa nápadne skracuje a majú nedokonale vyvinuté vakuolovité hypofaryngiálne žľazy (Schmid-Hempel, 1998). Infekcia môže nadobudnúť až rozmery pandémie a spôsobiť značné oslabenie celého včelstva. Znížená je aj aktivita zbierania peľu (Klee et al., 2007).

Kráľovné infikované druhom *apis* často prerušujú kladenie vajíčok, hlavne v jarnom období a zároveň hynú po pár týždňoch od začiatku nákazy, väčšinou mimo priestoru úľa. Parazit sa k nim najčastejšie dostáva počas kŕmenia nakazenými robotnicami (Schmid-Hempel, 1998).

Ďalším zisteným efektom je neschopnosť včely v prítomnosti parazita naplno využiť bielkoviny z potravy a ich nedostatok spôsobuje atrofiu hltanových žliaz a u robotníc nastáva neschopnosť kŕmenia plodu, matky a predčasné starnutie populácie (Veselý et al., 2003).

Akútna nákaza ďalej spôsobuje chvenie tiel robotníc a rozšírenú oblasť brucha (Fries et al., 2012). Nakazené včely postihuje dyzentéria, čo enormne podporuje rozšírenie nákazy po celej kolónii (pri štandardných podmienkach včely defekujú počas letu mimo úľa) a spoznať ju možno podľa uhynutých včiel a fekálnych značiek okolo úľa (Schmid-Hempel, 1998). Príčinou je v dôsledku prítomnosti parazita nedokonalé vstrebávanie glycidov, ktoré predovšetkým v zimnom období zaťažujú výkalový vak a tým spôsobujú úplavicu. Silne nosematické včelstvo pravdepodobne uhynie ešte v zime (Veselý et al., 2003).

Pri štandardnom priebehu infekcie sa kolónie dokážu zotaviť, pokiaľ sú infikované začiatkom roka, naopak infikované na jeseň hynú počas obdobia hibernácie (Schmid-Hempel, 1998). Faktom je, že strácajú veľkú časť populácie a jedným z dôvodov je aj malá zásoba medu vytváraná počas prítomnosti parazita, pričom sa odhaduje zníženie o 20-30% (Fries et al., 1984).

Taktiež je pravdepodobné, že niektoré pozorované príznaky sú výsledkom vírusov, ktoré sa často objavujú spolu s parazitmi a ich účinky sa navzájom synergizujú (Schmid-Hempel, 1998). Infekcia *N. apis* je často spojená s 3 nesúvisiacimi vírusovými infekciami a to: vírus sčernania matečníkov (BQCV), včelí vírus Y (YV) a vlákňitý vírus (FV). Hlavné kombinácie infekcie s parazitom s BQCV je výrazne škodlivejšia, ako samostatné jednotlivé infekcie. Vírus je schopný pridať poddruhu *apis* virulenciu (Fries et al., 2012). Zistený bol aj častý výskyt v spoločnosti prvoka *Malpighamoeba mellificae*, ktorý môže byť pôvodcom práve spomínanej úplavice (Schmid-Hempel, 1998).

Prevalencia

Výskyt *N. apis* koreluje s pozorovanou zimnou úmrtnosťou, ale hlavným problémom je, že choroba sa často objavuje aj bez toho, aby došlo k stratám v infikovaných kolóniách (Fries et al., 2012).

V miernom podnebí vykazuje nákaza *N. apis* nižšiu prevalenciu v lete, malý vrchol na jeseň a pomalý vzostup infekcie počas zimy. Na jar kedy začína chov plodu sa infekcia zvyšuje rýchlo aj v dôsledku toho, že možnosti lietania sú v tomto období značne obmedzené (Fries et al., 2012). Ďalšia štúdia naopak ukazuje absenciu teplotného gradientu, kedy sa prevalencia v chladnejšej klíme nejavila nižšia, dosahovala veľmi podobné hodnoty (Schmid-Hempel, 1998). Možno usúdiť, že prevalencia parazita je variabilná v rôznych podmienkach a kolóniách. Napr. Varis et al. (1992) vykonal screening vzoriek včely medonosnej vo Veľkej Británii a vo Fínsku, kde zistil infekciu *Nosema apis* vo viac ako v 1/3 včelstiev, ktoré vykazovali prítomnosť spór.

Možnosti liečby a prevencie Nosemózy

Infekcia *Nosema sp.* je závislá na teplote. Práve teplota v úli je potenciálne významný faktor ovplyvňujúci rezistenciu hostiteľa voči parazitom. Prítomnosť noseemózy je všeobecne nižšia počas leta, vysoké teploty v úli dokážu inhibovať multiplikáciu *Nosema*

sp. (Holt et al., 2013). Avšak zistilo sa, že teplota by mala dosiahnuť aspoň 35°C, čo je hodnota zriedkavo dosiahnutá aj priamo v centre úľa. V prípade, že bolo počasie chladnejšie a včely boli nútené zdržovať sa dlhšiu dobu vnútri úľa, bude nákaza pravdepodobne významnejšia. Epidémia je podporovaná takisto preplnenosťou úľa. Infekcia je schopná dokonca sama vymiznúť na začiatku sezóny, kedy sú včely uvoľnené z prezimovania a môžu defekovať mimo priestoru úľa (Schmid-Hempel, 1998).

Pred cca 20 rokmi sa nose móza liečila pomocou antibiotík (fumagilin), avšak dnes je táto metóda zakázaná kvôli možnému prieniku antibiotík do medu (Huang et al., 2013). Pri prepuknutí choroby je nutné likvidovať spóry na plástoch a stenách úlu dezinfekciou pomocou tepla. Ďalšou možnosťou je voľne dostupný prostriedok použiteľný k tlmeniu nose mózy, a to odparné dosky s kyselinou mravčou (formidol), primárne určené k liečbe varroózy. Pary tejto kyseliny vyvolávajú devitalizáciu spór (Navrátil et al., 2012). Uhynuté včely je potrebné spáliť a ich zásoby vytočiť, zriediť s vodou a 15 min prevariť (Rejnič et al., 1987).

Ako prevenciu je dôležité vykonávať doplňovanie zimných zásob, hygienické kŕmenie a napájanie, pravidelnú dezinfekciu úľov, liečbu, spálenie uhynutých jedincov, asanáciu a celkovú správnu starostlivosť počas celého roka (Navrátil et al., 2012).

3.5 CRITHIDIA MELLIFICA

Crithidia mellifica, prvýkrát popísaná v roku 1967 (Landridge a McGhee) v austrálskych včelách patrí medzi jednobunkové parazity včely medonosnej, presnejšie radená do rodiny *Trypanosomatidae* (Runckell et al., 2011). Trypanozómy sú primitívne eukaryoty s neobvyklou mitochondriálnou štruktúrou zvanou kinetoplast (Boulanger et al., 2001). Táto štruktúra obsahuje unikátne množstvo kinetoplastovej DNA v rámci elongovaných mitochondrií buniek a predstavuje alternatívny zdroj genetického materiálu (Schwarz et al., 2015^a). Trypanozómy sa vyznačujú ľahkým prenosom, nízkou hosťateľskou špecifitou a nie príliš závažnými účinkami na hosťateľa (Schmid-Hempel, 1998).

Taxonomické zaradenie:

Ríša: *Eukaryota*

Skupina: *Excavata*

Kmeň: *Euglenozoa*

Trieda: *Kinetoplastea*

Podtrieda: *Metakinoplastina*

Rad: *Trypanosomatida*

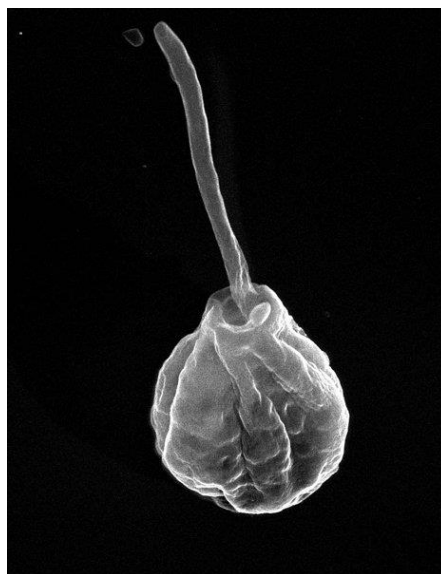
Čeľaď: *Trypanosomatidae*

Podčeľaď: *Leishmaniinae*

Rod: *Crithidia*

Zdroj: Schwarz et al. (2015^a)

Obrázok č.2: Spóra *Crithidia mellifica*



Zdroj: Internet (2)

Vývojový cyklus

Trypanozómy sú obligátne parazity, ktoré väčšinou na dokončenie svojho cyklu potrebujú stavove aj bezstavovce. Napriek tomu, mnoho bezstavovcov je parazitovaných monoxénnymi druhmi, ktoré vyžadujú iba jedného hostiteľa (Schwarz et al., 2015^a).

Vo svojom živote *Crithidie* prechádzajú viacerými cyklami, pričom vystriedajú aspoň 2 rôzne formy výskytu (Boulanger et al., 2001). *C. mellificae* sa najčastejšie vyskytuje v morfologickej forme mierne pretiahnutých choanomastigota so skráteným bičíkom (Schwarz et al., 2015^a).

Vznik a priebeh infekcie

Crithidia mellificae môže byť prenášaná potravou včiel, avšak jej úspešné prezimovanie požaduje interné prostredie tela včely (Tripodi et al., 2014). K novej infekcii dochádza prenosom pri kontakte s okolitými včelami, materiálom z úľa, alebo cez kvety navštívené infikovanými včelami. Typicky infikuje mladé kráľovné, vytvorené na konci koloniálneho cyklu a dosahuje ďalšie generácie hostiteľov (Schmid-Hempel a Tognazzo, 2010). Parazit infikuje včelu na špecifickom mieste – črevo, Malpighiho žľazy, alebo peritrofická membrána, pričom sa infekcia neobjavuje vo včelách mladších, ako 6 dní (Schmid-Hempel, 1998). Podľa najnovších zistení primárne kolonizuje črevo a to vo forme vyšších počtov sféroïdov, ktoré vytvárajú súvislú vrstvu (Schwarz et al., 2015^a).

Patogenita

Za normálnych podmienok infekcia *C. mellificae* nebýva fatálna, ale nakazenie kráľovnej môže mať výrazný impakt na vznik novej kolónie (Morimoto et al., 2013). V dôsledku prítomnosti *Crithidie* dochádza k strate fitnes v porovnaní so zdravými jedincami (Koch et al., 2011). Infekcia znižuje celkovú telesnú hmotnosť prezimovanej kráľovnej a tým znižuje jej schopnosť zakladania kolónie (Tripodi et al., 2014). Kolónie úspešne založené takouto kráľovnou boli preukázateľne o 40% menej fit, menej početné s výraznou redukciou samcov, ktorí sú schopný reprodukcie (Schmid-Hempel, 1998). Virulencia parazita môže byť rôzna v dôsledku odlišných podmienok životného prostredia. Za podmienok hladovania utrpeli jedince infikované parazitom až 50% úmrtnosť, v porovnaní s 0% pri žiadnom strese z prostredia (Tripodi et al., 2014).

Infikované kolónie takisto obsahujú menší podiel robotníc, ktoré vykazujú vyšší manipulačný čas potrebný na zaobstaranie potravy a menej navštevujú kvety (Tripodi et al., 2014). Zaznamenaná bola nižšia produkcia potomkov v porovnaní so zdravými jedincami (Morimoto et al., 2013). Ďalšia štúdia Boulangera et al. (2001) popisuje stratu schopnosti včiel rozlišovať medzi kvetmi, ktoré obsahujú a neobsahujú nektár. Následne navštevujú kvety, ktoré ich nie sú schopné nasýtiť a pomaly sa vyhladujú na smrť. *C. mellificae* bola takisto použitá v kontrolovaných štúdiách, kde bola zistená stimulácia komplexnej imunitnej odpovede hostiteľa, takže je možné predpokladať vplyv na celkové zdravie včely medonosnej (Schwarz a Evans, 2013).

Príbuzný parazit *Crithidia bombi* sa považuje za dôležitého, globálne rozšíreného parazita čmeliakov, pričom sa predpokladá časom prenos aj na zatiaľ nepostihnuté populácie iných druhov vplyvom koevolúcie (Schmid-Hempel, 1998). Fylogenetická analýza jasne oddeľuje *Crithidia mellificae* od komplexu *Crithidia bombi*, čo súhlasí s experimentálnymi výsledkami, ktoré ukazujú, že *Apis mellifera* nie je náchylná na *C. bombi*. (Schmid-Hempel a Tognazzo, 2010). Avšak blízko príbuzný parazit podľa Schmid-Hempel (1998) vážne škodí čmeliakom, spôsobuje redukcii veľkosti vaječníc, pomalší rast kolónii na začiatku sezóny, zníženú kondíciu a výrazne znižuje prežitie kolónie a aj preto je dôležité dôsledne objasniť impakt *C. mellificae* na včelu medonosnú.

Okrem spomínaných negatívnych efektov bola zistená významná negatívna synergia medzi pôsobením *C. mellificae* a *Nosema ceranae* na zimnú úmrtnosť včiel. Kombinácia obidvoch patogénov má síce nižší celkový účinok, ako ich súčet jednotlivo, stále však možno pozorovať jasný zvyšujúci sa účinok (Ravoet et al., 2014). Kolónie napadnuté parazitom sú náchylnejšie k rôznorodému súboru ďalších parazitov, ktoré môžu toto oslabenie využiť.

Prevalencia

Tento bežný bičíkovec sa nachádza takmer na celom svete a je prenášaný priamo, bez akéhokoľvek vektora. Mimo tela hostiteľa dokáže prežiť len krátku dobu (Schmid-Hempel a Tognazzo, 2010). Analýza ukázala veľký vplyv výskytu *C. mellificae* v lete, na neskoršie zimné straty včiel. Kolónie napadnuté infekciou sú následne náchylnejšie k rôznorodému súboru parazitov, ktoré môžu využiť toto oslabenie (Ravoet et al., 2014).

C. mellificae bol dlhšiu dobu ignorovaný parazit, ale aktuálne údaje ukazujú, že by teoreticky mohol byť aj jedným z kľúčových hráčov syndrómu kolapsu včiel (Ravoet et al., 2014). Kombinácia poľných pozorovaní a modelovania napovedá, že infekcia *Crithidia*

bombi sa presunula zo skleníkov do komerčných kolónií (Goulson et al., 2015). Podľa rôznych štúdií má kozmopolitné rozšírenie, bola reportovaná z Austrálie, Číny, Japonska, Belgicka, Francúzska, Španielska a USA (Ravoet et al., 2014). V Európe a Severnej Amerike je potvrdený výskyt 2 rodových línií (Schmid-Hempel a Tognazzo, 2010). V Českej republike zatiaľ podľa dostupných informácií tento parazit detekovaný nebol.

Prevenia

Analýza črevnej mikroflóry čmeliakov ukazuje, že by mohla pôsobiť ako ochrana proti trypanozóme *Crithidia bombi*. Normálna mikroflóra ochraňuje čmeliaky proti rozmanitej a intenzívnej infekcii, a to prenos parazita do matiek a zníženie fitness (Goulson et al., 2015). Na základe výskumu Koch a Schmid-Hempel (2011), ktorí experimentálne pridávali črevnú mikroflóru do tiel čmeliakov a zaznamenali zníženie zaťaženia parazitom, možno predpokladať rovnaký scenár aj pri poddruhu *Crithidia mellificae*. Avšak mechanizmus, ktorým mikroflóra dokáže zmierniť parazitárne zaťaženie zatiaľ nie je známy. Zaujímavou informáciou podľa štúdie Koch et al. (2012) je zvýšenie rozmanitosti mikroflóry u jedincov prirodzene infikovaných parazitom *Crithidia mellificae* (takisto *Nosema bombi*). Ekologické faktory, ktoré majú vplyv na kvalitu a kvantitu mikroflóry sú nutričný stav hostiteľa a aktivácia imunitného systému pri parazitárnych infekciách. Podľa výskumu bolo v črevách hostiteľov napadnutých *Crithidia sp.* zistených viac taxónov baktérií (Koch et al., 2012).

Niektoré pozorovania naznačujú priamu interakciu medzi baktériami mikroflóry a parazitmi *Crithidia* v čreve, čo sa zdá byť pravdepodobnejšie, ako len všeobecný účinok na fitness (Koch et al., 2012). Aj napriek tomu, že oslabenie črevnej mikroflóry priamo nesúviselo so zvýšenou úmrtnosťou, bola dokázaná stimulácia imunitného systému včiel pozitívnymi baktériami mikroflóry. Možným mechanizmom tohto efektu je produkcia antimikrobiálnych látok, či zvýšené súperenie o zdroje v čreve (Koch a Schmid-Hempel, 2011). K pochopeniu úlohy mikroflóry a ďalších možností prevencie pred parazitom je potrebný ďalší výskum.

3.6 LOTMARIA PASSIM

Trypanozómy infikujúce včelu medonosnú boli do súčasnosti veľmi málo skúmané pomocou molekulárnych metód. Väčšina objavov trypanozómy v čreve *Apis mellifera* bolo automaticky považovaných za druh *Crithidia mellificae*, až nedávny výskum Schwarz (2015) dokázal identifikovať a popísať nového parazita z radu *Trypanosomatidae* – *Lotmaria passim* (Ravoet et al., 2015). Druhy sú si značne geneticky podobné, rozdiel predstavuje len niekoľko nukleotidov, a preto je na ich rozlíšenie nevyhnutná metagenomická sekvenácia (Schwarz et al., 2015^b). Konkrétne cytochrómový gén b kódovaný kDNA je dôležitý lokus pre rozlíšenie genotypov v rámci trypanozóm (Schwarz et al., 2015^a).

Taxonomické zaradenie:

Ríša: *Eukaryota*

Skupina: *Excavata*

Kmeň: *Euglenozoa*

Trieda: *Kinetoplastea*

Podtrieda: *Metakinoplastina*

Rad: *Trypanosomatida*

Čeľaď: *Trypanosomatidae*

Podčeľaď: *Leishmaniinae*

Rod: *Lotmaria*

Obrázok č. 3: Spóra *Lotmaria passim*



Zdroj: Internet (3)

Popis a patogenita

Dostupné informácie z dôvodu nedávneho objavu sú značne obmedzené. Promastigoty parazita majú kopijovitý, až slzovitý tvar s jedným voľným bičíkom, ktorý postráda membránu. Dĺžka spóry je 7,44 μm (4.66-11.40 μm), šírka 3,15 μm (1,50-4,65 μm). *Lotmaria passim* takisto ako *C. mellificae* napáda črevo hostiteľa a okolité rektálne papily. Sféroidy často pokrývajú črevnú stenu hostiteľa v hustej vrstve (Schwarz et al., 2015^a). Dopady trypanozóm na populáciu *Apis mellifera* sú do značnej miery neobjasnené, avšak dávajú sa do súvislosti s kolapsom kolónií. Predpokladaným impaktom na včelí organizmus je hlavne metabolické a behaviorálne poškodenie (Schwarz et al., 2015^b).

Prevalencia

Mnoho identifikovaných objavov trypanozóm bolo reklasifikovaných ako *L. passim* a vďaka tomu sa neočakávane stala predominantným parazitom včely medonosnej v celosvetovom meradle, v kontraste ku skutočnej, taxonomicky platnej identifikovanej *C. mellificae*. Takisto bola v prípade belgických včiel objavená aj spoločná koinfekcia obidvoch parazitov (Ravoet et al., 2015). V štúdiách je označovaná, ako vysoko prevalentná vo včelích populáciách, a to nielen *Apis mellifera*, ale aj samotárskych včiel ako *Osmia bicornis* (Groezinger a Robinson, 2015). Výskyt bol doteraz potvrdený v amerických včelách, v Európe v Belgicku (Schwarz et al., 2015) a takisto na Novom Zélande (Tipa, 2015).

V ČR zatiaľ výskyt potvrdený nebol, až vo výskume tejto diplomovej práce sa podarilo reklasifikovať pôvodný objav považovaný za *C. mellificae* pomocou sekvenovania DNA na parazita *Lotmaria passim*.

3.7 APICYSTIS BOMBI

Apicystis bombi je parazitický prvok skupiny *Apicomplexa*, ktorý je všeobecne taxonomicky málo objasnený. Aj z toho dôvodu bol tento parazit v minulosti chybne považovaný druh *Mattesia bombi*. Až nedávny fylogenetický výskum odhalil, že sa vyskytuje vo forme oocysty so 4 sporozoitmi a na základe toho bol správne zaradený do rodu *Apicystis* (Lipa, Triggiani, 1996). Konkrétne patrí do radu *Neogregarinorida*, ktoré sú charakteristické hostiteľskou špecifitou a schopnosťou spôsobiť závažnú infekciu (Schmid-Hempel, 1998). Pôvodne bol prvok identifikovaný, ako typický parazit čmeliakov (detekovaný v najmenej 10. druhoch), avšak jeho virulencia bola potvrdená aj u včely medonosnej (Morimoto et al. 2013).

Taxonomické zaradenie:

Ríša: *Eukaryota*

Kmeň: *Alveolata*

Skupina: *Apicomplexa*

Trieda: *Conoidasida*

Podtrieda: *Gregarinasina*

Rad: *Neogregarinorida*

Čeľaď: *Ophryocystidae*;

Rod: *Apicystis*

Zdroj: Meeus et al. (2010)

Obrázok č. 4 : Spóra *Apicystis bombi*



Zdroj: Internet (4)

Vývojový cyklus a priebeh infekcie

Životný cyklus neogregarín je značne komplexný. Rod *Apicystis* je charakteristický rozmnožovaním cez cykly mikro a makronukleárnej merogónie a gametogónie s výslednou formáciou dvoch spór (Schmid-Hempel, 1998).

Do včely sa podobne, ako predošlé parazity dostáva cez tráviaci trakt z potravy, vody a prostredia (Marrahamov et al., 2013). Infekcia začína požitím dospelých oocýst, ktoré sa usadia v črevnom epiteli, penetrujú cez črevnú stenu a postupne infikujú bunky tela (Schmid-Hempel, 1998). Multiplikácia nastáva produkciou sporozoitov oocystami. Zistená prítomnosť oocýst však naznačuje aj možnosť autoinfekcie. Oocysty sú navikulárneho tvaru v rozmere 21,6 x 5,4µm, často majú na sebe čiapočky a spôsobujú sfarbenie infikovaných tukových buniek do biela (Marrahamov et al., 2013).

Patogenita

Apicystis bombi infikuje dospelé jedince včiel a prítomnosť parazita je možné detekovať na základe prítomnosti spór vo výkaloch. Efekt na hostiteľa-včelu je možné nazvať serióznym. Pozorovaná bola dezintegrácia tukových buniek v telách nakazených robotníc a znížená schopnosť reprodukcie kolónií (Schmid-Hempel, 1998).

U čmeliakov spôsobuje vážne fyzické a behaviorálne zmeny, takisto problémy v komunikácii medzi kráľovnou a robotnicami (Plischuk et al., 2009). Jeho prítomnosť koreluje s vysokou úmrtnosťou jarných kráľovien, čo zabraňuje zakladaniu nových kolónií (Marrahamov et al., 2013). Krátko po objavení parazita nastala masívna strata druhu *Bombus dahlbonii*, čo sa spája práve s príchodom tohto exotického parazita (Goulson et al., 2012). Zatiaľ nebolo vykonaných mnoho štúdií *A. bombi*, ale uskutočnené analýzy ukazujú, že parazit je schopný dokončiť svoj životný cyklus aj vo včele, nakoľko bola zaznamenaná emergencia zrelej sporozoitov z oocýst (Plischuk et al., 2011). Predpokladaným účinkom na *Apis mellifera* sú zmeny v správaní, zvýšená mortalita robotníc a spomalené zakladanie nových kolónií (Goulson et al., 2012).

Prevalencia

Všeobecne sa predpokladá, že má *Apicystis bombi* kozmopolitné rozšírenie u čmeliakov a u včiel je potvrdený výskyt viacmenej sporadický (King, 2012). Hlásené nálezy

pochádzajú z Kanady, Francúzska, Švajčiarska a Talianska v prezimovaných kráľovných a samcoch rôznych druhov *Bombus*. V roku 1990 bol prvok prvýkrát objavený vo včele medonosnej vo Fínsku a neskôr aj v Taliansku (Plischuk et al., 2011). V roku 2012 bol takisto potvrdený jeho výskyt z Patagónie v druhoch *Apis mellifera* a *Bombus terrestris* (Goulson et al., 2012).

Podľa štúdie Marrahamova et al. (2013) bol pri screeningu vybraných úľov v Európe zistený až 40,8% pozitívny nález *Apicystis bombi*, čo len zdôrazňuje potrebu monitoringu tohto málo preskúmaného parazita.

Nakoľko sú čmeliaky aj včely infikované rovnakým haplotypom *A. bombi* a účinky na čmeliaky sú preukázateľne negatívne, je potrebné objasniť, aké dôsledky má na kolónie včiel a v akej miere prispieva ku kolapsu včelstiev.

3.8 MOŽNOSTI DETEKČIE PARAZITOV

Na identifikáciu parazitických druhov eukaryotických organizmov vo včelách boli vyvinuté 2 hlavné metódy detekcie, a to mikroskopické a molekulárne. Mikroskopické zahŕňajú transmisnú elektrónovú mikroskopiu (TEM), histologické metódy a priamu detekciu pomocou vitálnych preparátov. Všobecne sa považujú za viac pracné, časovo náročné a nie celkom spoľahlivé z hľadiska druhovej diferenciácie napr medzi druhmi *Nosema apis* a *Nosema ceranae* (Erler et al., 2012). Molekulárne nástroje sú založené na polymerázovej reťazovej reakcii (PCR) (Traver a Fell, 2012). PCR amplifikácia na báze DNA je často používanou metódou na detekciu eukaryotických parazitov (Meeus et al. 2010). Hlavné 2 využívané typy sú konvenčná PCR a real-time quantitative PCR (qPCR), pričom obidve metódy využívajú tepelné cyklovanie, ale odlišujú sa v spôsobe amplifikácie DNA produktov, kedy je pri konvenčnej metóde nutné post-spracovanie, štandardne gélovou elektroforézou (Traver a Fell, 2012). qPCR naopak umožňuje hodnotenie DNA produktov priamo po každom cykle amplifikácie a je považovaná za jednu z najsenzitívnejších génových analýz (Internet, 5). Výhodou oproti mikroskopickým metódam je vyššia špecifita a senzitivita. Nevýhodou je potreba špeciálnych zariadení a nízka účinnosť, ktorá môže byť spôsobená nízkou primerovou špecifitou, a takisto výskyt falošných pozitívnych a negatívnych výsledkov (Erler et al., 2012).

Tabuľka č.1: Detekčné primery pre jednotlivé parazity

Parazit	Lokus	Názov	Sekvencia primeru (5'-3')	Teplota (°C)	Veľkosť produktu (bp)	Referencia
<i>Nosema ceranae</i>	16S rRNA	218 MITOC	CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTTAA CCC GGTCATTCTCAAACAAAAAACCG	61,8	218-219	Martín-Hernández et al. (2007)
<i>Nosema apis</i>	16S rRNA	321 APIS	GGGGGCATGTCTTTGACGTA CTATGTA GGGGGGCGTTTTAAATGTGAAACA ACTATG	58	321	Martín-Hernández et al. (2007)
<i>Crithidia mellificae</i> *	18S rDNA	SEF SER	CTTTTGGTCGGTGGAGTGAT GGACGTAATCGGCACAGTTT	61	417	Meeus et al.(2010)
<i>Crithidia mellificae</i> *	18S rRNA	SSU	GGCGTCTTTTGACGAACAAC TACGTTCTCCCCGA ACTAC	60	763-775	Yang et al. (2013)
<i>Crithidia mellificae</i> *	18S rRNA	SSU rRNA	TGCCATGGCGTTGACGGGAG CCAACAAAAGCCGAAACGGTAGCCT	60	544	Yang et al. (2013)
<i>Crithidia mellificae</i> *	18S kDNA	Cyt b	GTWTRTTTTTTRTGRGATTTT CATAAACGYTCACAATAAAAATGC	50	413	Schwarz et al. (2015 ^a)
<i>Crithidia mellificae</i> *	18S kDNA	Tryp-cytb	TGTGGWGTGTGTTTAGC CRTCWGA ACTCATAAAAATAATG	50	490	Schwarz et al. (2015 ^a)
<i>Apicystis bombi</i>	18S rDNA	ApUF1 ApUR1	TCAATTGGAGGGCAAGTCTG CACGCAAAGTCCCTCTAAGAA	55	850	Meeus et al. (2010)

*primery v tejto práci vybrané pre *C.mellificae*, avšak detekovali *Lotmariu passim*

Spóry *Nosema ceranae* sú mierne ohnuté narozdiel od *N. apis* a takisto majú menej jednotný tvar a veľkosť. Avšak aj napriek rozdielom je ťažké určiť rozdiel pri diagnostike svetelnou mikroskopiou a to aj hlavne kvôli častému výskytu zmiešanej infekcie obidvoch druhov (Fries et al., 2012). Za najspoľahlivejšiu metódu je považovaná molekulárna detekcia, vďaka ktorej je možné spóry *Nosema* detekovať aj pri minimálnej prítomnosti parazita, ktorý môže mať zanedbateľný, až žiadny vplyv na hostiteľa. Vyznačuje sa extrémnou citlivosťou a je schopná detekovať aj vegetatívne formy *Nosema*, nakoľko patria medzi organizmy na báze DNA a práve extrakcia genomickej DNA je prekursorom na uskutočnenie PCR (Traver a Fell, 2012). Z toho dôvodu sa používajú techniky prevažne na báze PCR (Uniplex, Multiplex, qPCR), pričom existuje celý rad špecifických primerov pre

Nosema sp.(Fries et al., 2012). Detekcia *N. ceranae* a *N. apis* bola zvolená samostatne s využitím uniplex PCR, pomocou detekčných primerov uvedených v Tabuľke č.1.

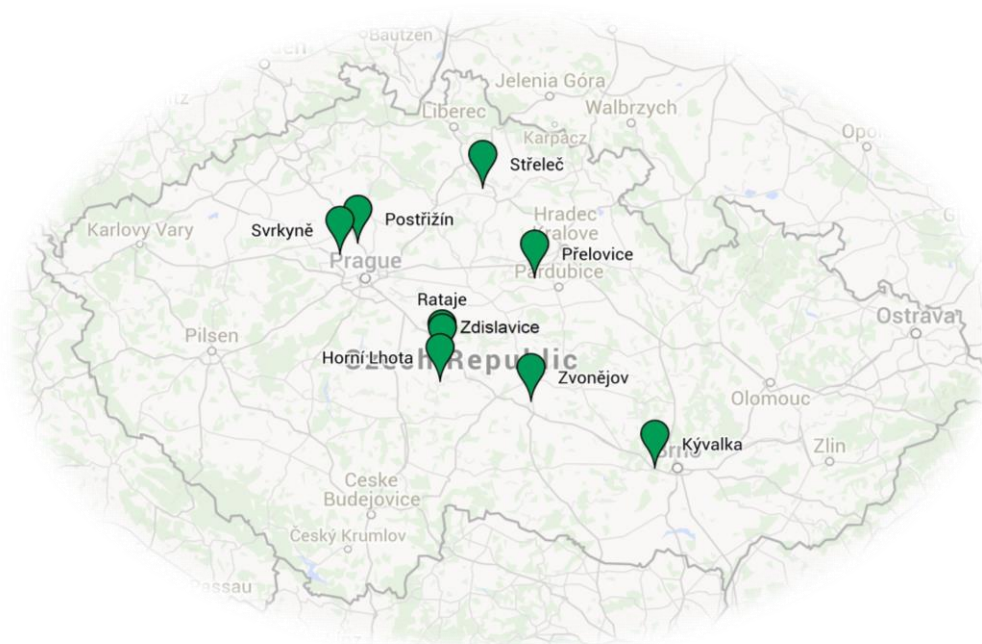
Pre parazity *Crithidia mellificae* a *Apicystis bombi* bola takisto zvolená metóda uniplex PCR, s využitím detekčných primerov zobrazených v Tabuľke č.1.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 PREHĽAD LOKALÍT

K odberu vzoriek včely medonosnej (*Apis mellifera carnica*) a následnému využitiu detekčných metód boli vybrané nasledovné lokality (9) zobrazené v Tabuľke č.2. V rámci každej lokality bol k dispozícii rozdielny počet včelstiev a z každého včelstva vytvorené 3 vzorky počas sezóny 2014/2015. Vybrané včelstvá boli skúmané v rámci riešenia výskumného projektu KUS QJ1310085 riešeným VÚRV, v.v.i (Výzkumný ústav rostlinné výroby) a VúVČ Dol (Výzkumný ústav včelařský v Dole, www.beedol.cz).

Obrázok č.5: Mapa lokalít



Tabuľka č.2: Sledované lokality

Lokalita	GPS súradnice		Dátum odberu	Počet včelstiev	Neprezi-mované včelstvá	AFB *	Varroa destructor					Liečba
							Stupne napadnutia					
							0	1	2	3	4	
Horní Lhota	49°35'43"	14°57'25"	26.9.2014	2	0	1			2			Gabon PA92
Kývalka	49°11'24"	16°26'57"	14.9.2014	1	0	0					1	Formidol 40mL
Postřižín	50°13'59"	14°23'12"	29.10.2014	5	2	0		1	2	2		Formidol 40mL
			11.5.2015	2	0	0	2					Formidol 40mL
Přelovice	50°04'22"	15°36'53"	14.9.2014	6	1	0		3	2	1		Formidol 40mL Gabon PA92
			Rataje	49°42'15"	14°58'14"	10.2.2014	2	0	1	2		
Svrkyně	50°10'53"	14°15'49"	29.10.2014	3	1	0		1			2	Formidol 40mL
				3.6.2014	2	1	0		2			Formidol 40mL
				4.2.2015	3	0	0	3				Formidol 40mL
			11.5.2015	2	0	0	2				Formidol 40mL	
Střeleč	50°29'03"	15°15'14"	10.2.2014	5	0	1	1	4				Formidol 40mL
Zvonějov	49°30'09"	15°35'19"	7.8.2014	18	5	0			5	9	4	Gabon PA92
Zdislavice	49°41'12"	14°58'28"	10.2.2014	2	0	1		2				Gabon PA92

*Lokality Horní Lhota, Rataje a Zdislavice boli napadnuté morom včelieho plodu (*Paenibacillus larvae*). Nakazené včelstvá boli spálené, preto označujeme neprezimovanie ako 0. (Odber a transport vzoriek včiel prebiehal s vedomím a súhlasom Státní veterinární správy ČR za dodržania bezpečnostných podmienok proti nožnej kontaminácii prostredia).

O včelstvách boli sledované a poskytnuté údaje VÚVč Dol o prítomnosti roztoča *Varroa destructor*, charakterizované podľa liečebného spádu v podletí roku 2014. Kategórie napadnutia roztočom *V. destructor* zobrazuje Tabuľka č.3. Spádová podložka bola umiestnená na dno úľa a prítomnosť roztočov bola zhodnotená po 7 dňoch od akaricídneho liečenia. Použité prípravky pre jednotlivé včelstvá sú zobrazené v Tabuľke č.2. V roku 2015 bolo takisto zistené, či dané včelstvo prežilo, alebo neprežilo do leta. Nakoľko bol odber zabezpečený včelármi, okrem prezimovania včelstva neboli poskytnuté, prípadne nie sú známe údaje o veku matky.

Tabuľka č.3: Kategorizácia napadnutia *Varroa destructor* z liečebného spádu

Kategória	Počet v ks
0	0
1	1-50
2	51-100
3	101-1000
4	1001 a viac

4.2 ODBER MATERIÁLU

Odber vzoriek bol vykonaný v spolupráci s VúVČ Dol počas sezóny 2014/2015. Dospelé robotnice boli odoberané z úľa z okraja plodiska pomocou zmetáčika. V prípade zimných odberov boli včely odobrané z okraja zimného chumáča. Zmetených bolo cca 50-100 jedincov včely medonosnej. &následne boli umiestnené do igelitu a vzorky transportované na ľade do laboratória. Včely boli premiestnené do hlbokomraziacej mrazničky (Thermo, USA) o teplote -40°C , kde boli uskladnené až do analýzy DNA.

4.3.PRÍPRAVA VZORIEK

Z každej odobranej vzorky včiel bolo vybraných 10 jedincov včely medonosnej z príslušného včelstva, t.j. z každej vzorky boli vytvorené a analyzované 3 paralelné vzorky. Celkovo bolo vytvorených 159 vzoriek z 9 lokalít. Tie následne prešli povrchovou sterilizáciou za účelom odstránenia povrchovej mikroflóry s využitím 96% etanolu (absolútny ethanol a dd H₂O). Vzorky boli čistené 2x, a následne pomocou fosfátového pufru PBST (3.2 mM Na₂HPO₄, 0.5 mM KH₂PO₄, 1.3 mM KCl, 135 mM NaCl s 0.05% w/w detergent Tween® 20) (všetky Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) takisto 2x . Včely boli po sterilizácii premiestnené do sterilného skleneného homogenizátoru (Potter-Elvehjem homogenizer, Kavalier, Sázava, ČR), kde bolo pridaných 6ml sterilného PBST. Mechanická homogenizácia pomocou sklenenej drtičky (Radnoti tissue grinder, cat No. 440613, Monrovia, CA, USA) prebiehala cca 2 minúty pre každú vzorku a homogenát (cca 6ml) bol premiestnený do 25ml plastových (PP) skúmaviek (Cat No. D1003; KRD, Praha, ČR). Homogenát bol následne stočený pomocou centrifúgy (Thermo Scientific Multispeed Centrifuge CL31R, Thermo Fisher Scientific Inc.) 5min/3000rpm a vzniknutý supernatant bol prepipetovaný do sterilných PP skúmaviek.

4.3 IZOLÁCIA DNA

Na izoláciu DNA bola využitá Fenol-Chloroformová extrakcia podľa protokolu Hubert et al. (2015) , ktorý bol modifikovaný podľa nasledovného postupu:

1. Zo stočeného homogenátu, využijeme supernatant o objeme 6ml a zmiešame s 6ml fenolového činidla fenol/chloroform/izopropanol (Roti-Phenol®, Cat No: A156.2, Carl Roth, Karlsruhe, Nemecko)
2. Zmes premiešame otočením skúmavky a umiestnime do centrifúgy na 5min/6000rpm
3. Supernatant prepipetujeme do novej skúmavky a znova pridáme 6 ml fenolového činidla a zmes centrifugujeme po dobu 5min/6000rpm
4. Pripravíme zmes chloroformu a propanolu v pomere 24:1
5. Supernatant prepipetujeme do nových skúmaviek a pridáme zmes chloroform-propanol o objeme 6ml
6. Centrifugujeme opäť po dobu 5min/6000rpm a krok 5. a 6. znovu zopakujeme
7. Supernatant prepipetujeme do sterilných eppendorfiiek (Sterile Microcentrifuge Tube 1.5 ml, Eppendorf® Safe-Lock™) o objeme vzorky 700μl
8. Do každej vzorky pridáme pomocou pipety 70μl octanu sodného (Sodium acetate trihydrate, Cat. No. 6131-90-4, Sigma-Aldrich)
9. Zmes premiešame a pridáme 500μl propanolu a skúmavky uložíme na 20min do mrazničky (-40°C)
10. Vzorky centrifugujeme po dobu 15min/12 000rpm
11. Zo vzniknutého produktu odpipetujeme celú kvapalnú fázu, pričom nám musí ostať tuhá fáza na dne eppendorfky, s ktorou je ďalej pracované
12. Tuhú fázu rozpustíme pridaním 500μl 70% etanolu (absolútny ethanol a ddH₂O)
13. Vzorky z rovnakého včelstva pomocou pipety zlúčime do jednej eppendorfky a centrifugujeme po dobu 15min/12 000rpm
14. Odlejeme etanol a do vzoriek pridáme 1000μl 70% etanolu a zopakujeme centrifugáciu pri rovnakých podmienkach
15. Po opätovnom odliatí etanolu eppendorfky umiestnime do evaporizátora (Speed Vac, Thermo Scientific), až kým sa lieh neodparí a ostane nám suchá tuhá fáza
16. Rozpúšťanie vzorky prebieha pomocou napipetovania destilovanej (dd) H₂O o teplote 60°C a objeme 100μl

K ďalšiemu kroku čistenia DNA bol zvolený GeneClean® Turbo kit (Cat No. 1102-600, MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA), použitý presne podľa protokolu. Po prečistení kitom boli vzorky centrifugované po dobu 5min/12000rpm. Do kolónky do stredu membrány bola napipetovaná dd H₂O (60°C) v objeme 100µl. Vzorky sa nechali odstáť 5min a naposledy boli centrifugované 5min/12000rpm.

Po získaní DNA sa jej prítomnosť vo vzorkách overovala pomocou nanodropu (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific.). Po otestovaní boli vzorky skladované v hlbokomraziacej mrazničke (-40°C) až do ich ďalšieho spracovania.

4.4 MOLEKULÁRNA IDENTIFIKÁCIA EUKARYOTICKÝCH PARAZITOV VO VZORKÁCH

Na detekciu eukaryotických parazitov bola zvolená metóda uniplex PCR a každý z parazitov bol detekovaný jednotlivo. Reakčná zmes (pre všetky skúmané parazity) pre 1 vzorku s objemom 25 μ l obsahovala 18,875 μ l H₂O, 2,5 μ l pufru, 0,5 μ l dNTPs, 1 μ l Forward primeru, 1 μ l Reverse primeru, 0,125 μ l polymerázy Taq a 1 μ l DNA (všetky Promega, Madison, WI, USA).

Amplifikačné podmienky PCR reakcie sú uvedené pre každého parazita zvlášť.

Každá vzorka bola analyzovaná 1x v sete s pozitívnou a negatívnou kontrolou. Pozitívna kontrola bola získaná z extraktov DNA poskytnutých VÚVč Dol. Negatívna kontrola bola vytvorená z reakčnej zmesi PCR bez DNA.

Z každého včelstva boli analyzované 3 nezávislé vzorky (celkovo 159), preto bol pre prítomnosť parazita pre každé včelstvo získaný nasledujúci výsledok: 0 – nevyskytuje sa, 1 – vyskytuje sa v jednej vzorke, 2 – vyskytuje sa v dvoch vzorkách, 3 – vyskytuje sa vo všetkých vzorkách včelstva.

Nosema ceranae

K detekcii *Nosema ceranae* pomocou metódy PCR bol použitý protokol pre amplifikáciu časti génu kódujúceho 16S rRNA podľa Muñoz et al. (2014). Detekčné primery a amplifikačné podmienky boli zvolené podľa Martin-Hernández et al. (2007). Použité boli detekčné primery 218 MITOC, pri veľkosti produktu 218-219bp. PCR reakcia v thermocyclery (C1000 Touch™ Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, Inc.) prebiehala v 35 cykloch pri amplifikačných podmienkach zobrazených v Tabuľke č.4.

Tabuľka č.4: Amplifikačné podmienky PCR pre *Nosema ceranae*

<i>Krok</i>	<i>Teplota</i>	<i>Čas</i>
<i>1.</i>	<i>94°C</i>	<i>10min</i>
<i>2.</i>	<i>94°C</i>	<i>30s</i>
<i>3.</i>	<i>61,8°C</i>	<i>30s (35x)</i>
<i>4.</i>	<i>72°C</i>	<i>45s</i>
<i>5.</i>	<i>72°C</i>	<i>7min</i>

Nosema apis

K detekcii *Nosema apis* bol použitý protokol pre amplifikáciu časti génu kódujúceho 16S r RNA (Muñoz et al., 2014). Detekčné primery boli zvolené podľa Martin-Hernandéz et al. (2007) 321 APIS, pri veľkosti produktu 321bp. Amplifikačné podmienky zobrazuje Tabuľka č.5.

Tabuľka č.5: Amplifikačné podmienky PCR pre *Nosema apis*

<i>Krok</i>	<i>Teplota</i>	<i>Čas</i>
1.	94°C	10min
2.	94°C	30s
3.	58°C	30s (35x)
4.	72°C	45s
5.	72°C	7min

Crithidia mellificae/ Lotmaria passim

K detekcii *Crithidia mellificae* bol použitý protokol pre amplifikáciu časti génu kódujúceho 18S rDNA (Morimoto et al., 2013) . Detekčné primery boli zvolené podľa Meeus et al.(2010) - SEF/SER, pri veľkosti produktu 417bp. Vzhľadom k prvému nálezu patogénu v ČR a všeobecnej nejasnosti taxonómie trypanozóm a nedávnomu objavu príbuzného druhu *Lotmaria passim* vo svete boli použité ďalšie 4 druhy primerov podľa literatúry pri rozdielnych amplifikačných podmienkach: SSU, SSU-rRNA (Yang et al.,2013), Cyt b a Tryp-cytb (Schwarz et al.,2015^b) vid' Tabuľka č.1. Amplifikačné podmienky pre všetky druhy primerov sú zobrazené v Tabuľke č.6.

Tabuľka č.6: Amplifikačné podmienky PCR pre *Crithidia mellificae/ Lotmaria passim*

Názov primeru					
Teplota a čas	SEF,SER	SSU	SSU r-RNA	Cytb	Tryp – cytb
1.	94°C - 3min	94°C 3min	94°C - 3min	94°C - 3min	94°C - 3min
2.	94°C – 45s	94°C – 45s	94°C – 45s	94°C – 45s	94°C – 45s
3.	61°C – 45s (35x)	60°C – 45s (35x)	60°C – 45s (35x)	50°C – 45s (30x)	50°C – 45s (30x)
4.	72°C – 45s	72°C – 45s	72°C – 45s	72°C – 45s	72°C – 45s
5.	72°C – 5min	72°C – 5min	72°C – 5min	72°C – 5min	72°C – 5min

Apicystis bombi

K detekcii *Apicystis bombi* bol použitý protokol pre amplifikáciu 18S rDNA podľa Meeus et al. (2010) a zvolené detekčné primery ApUF1/ApUR1, pri veľkosti produktu 850 bp. Amplifikačné podmienky podľa Morimoto et al. (2013) sú zobrazené v Tabuľke č.7.

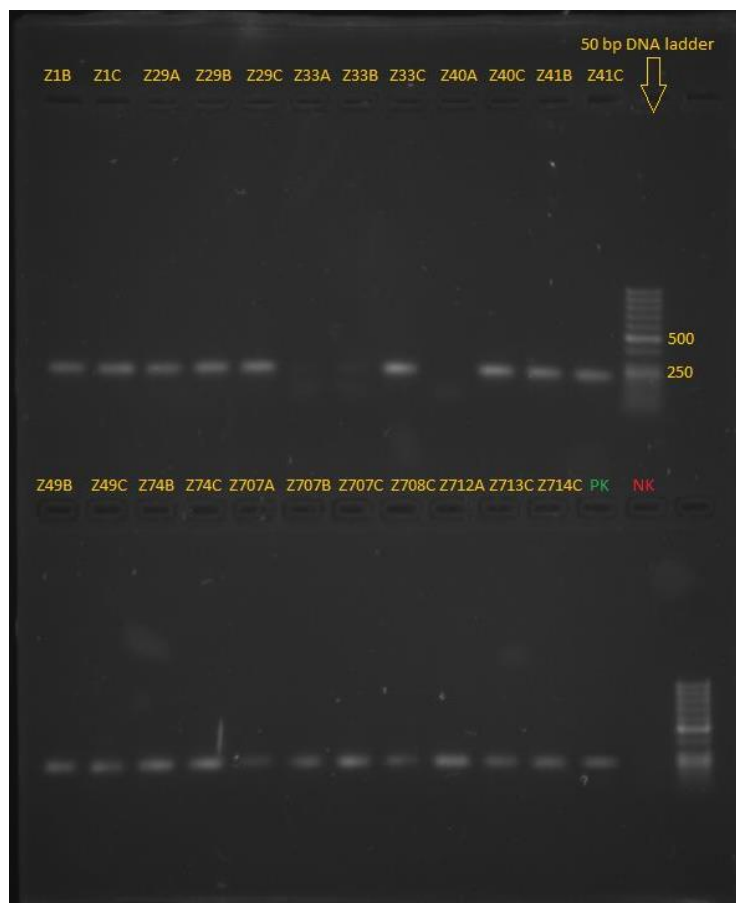
Tabuľka č.7: Amplifikačné podmienky PCR pre *Apicystis bombi*

<i>Krok</i>	<i>Teplota</i>	<i>Čas</i>
1.	94°C	10min
2.	94°C	30s
3.	58°C	30s (35x)
4.	72°C	45s
5.	72°C	7min

4.5 VIZUALIZÁCIA PCR PRODUKTU POMOCOU GÉLU

Prítomnosť aplikónu z PCR reakcie bola overovaná pomocou gélu. Gél bol pripravený z agarózy (SeaKem® LE Agarose, Lonza, Rockland, ME, USA) 1% v pufri (Tris Acetate-EDTA buffer, T9650, SIGMA). Vizualizácia prebehla pomocou farbiva Sybr (SYBR® Safe DNA Gel Stain, Cat No. S33102, Invitrogen, Oregon, USA). Po stuhnutí gélu boli do jamiek vytvorených hrebienkom napipetovaná príslušná DNA, zmiešaná s vkladacím farebným pufrom Zipruler (DNA Loading Dye, ZipRuler™ Express DNA Ladder Set, Cat No. SM1373, Thermo Fisher Scientific) v objeme 4µl. Do poslednej jamky gélu bol nanesený veľkostný marker (50µl ZipRuler™ Express DNA Ladder 1, SM1373, Thermo Fisher Scientific) v objeme takisto 4µl. Gél bol presunutý do elektroforetickej vane (ENDURO™ 300V Power Supply, E0303, Labnet International) a elektroforéza spustená pri konštantnom napätí 100V po dobu cca 30min. Odčítanie výsledkov z gélu prebehlo pomocou UV-transluminátora (SYNGENE, USA) a počítačového programu GeneSnap (GeneSnap from SynGene 7.12.1, Syngene).

Obrázok č.6: Detekcia *Nosema ceranae* z gélu



Pri vyhodnocovaní gélu boli za pozitívne vzorky považované amplikóny príslušnej veľkosti v PCR reakciách, ak bol prítomný amplikón v pozitívnej kontrole. Za negatívne vzorky boli považované vzorky bez amplikónu, v reakcii kde bol prítomný amplikón v pozitívnej kontrole. Vo všetkých prípadoch bola negatívna kontrola bez amplikónu, čo indikuje, že PCR nebola kontaminovaná. V prípade parazita *Lotmaria passim* bola pozitívna kontrola vytvorená z pozitívneho amplikónu overeného sekvenáciou.

4.6 OVERENIE SELEKTIVITY DETEKČNÝCH PRIMEROV POMOCOU KLONOVANIA PCR PRODUKTU

Pre *Nosema sp.* bola selektivita overená už pred začatím výskumu tejto diplomovej práce. V prípade *Lotmaria passim* bolo potrebné overiť selektivitu nasledovným postupom.

Purifikácia DNA

K purifikácii pozitívnych vzoriek z PCR bol použitý MinElute PCR Purification Kit (Cat No. 28004, QIAGEN) presne podľa protokolu.

Ligácia DNA

Purifikované vzorky boli následne zaligované pomocou pGEM – T Vector System I (a,b) (Cat No. A3600, Promega Corporation, Madison, WI, USA)

Klonovanie DNA

Klonovanie DNA pozitívnych zaligovaných vzoriek prebehlo podľa protokolu PCR Cloning Handbook (QIAGEN, 04/2001) modifikovaného podľa nasledovného postupu:

1. Pripravíme si vodný kúpeľ v termostatickej vodnej vani (Waterbath, Memmert) na teplotu 42°C
2. SOC médium (Krypton 20g, yeastextrakt 5,5g, NaCl 10ml, KCl 2,5ml na 1l dd H₂O) uložíme do trepačky (Shaking Incubator NB-205, N-BIOTEK Co., Ltd) pri teplote 37°C a 230rpm na cca 30min
3. Necháme rozpustiť bunky (JM 109 Competent Cells)
4. 25µl buniek pridáme do ligačnej zmesi, premiešame pipetou a celý objem premiestnime do 15ml sterilných plastových skúmaviek (PP)
5. Zmes necháme 30min inkubovať na ľade
6. Skúmavky na 1min ponoríme do vodného kúpeľa (42°C)
7. 2 min opäť inkubujeme na ľade
8. Pridáme 950µl SOC média izbovej teploty do každej skúmavky
9. 2 hod trepeme v trepačke pri podmienkach 37°C/230rpm

Príprava agarových misiek

Príprava bola zvolená podľa PCR Cloning Handbook protokolu (QIAGEN, 2001) modifikovaného podľa nasledovného postupu:

Zmes na výrobu misiek pripravíme z 20g LB agaru (Luria Bertani Agar, Miller, M1151, HIMEDIA) na 0,5l dd H₂O. Rozpúšťame v sterilnej sklenenej fľaši pomocou miešadla (MSH-300, Magnetic Stirrer with hot plate, Biosan). Po rozpustení umiestnime do autoklávy (PS 20A, CHIRANA) (30min, 120°C). Po sklávovaní ponoríme do vodného kúpeľa a schladíme na 55°C. Opäť premiešame na miešadle a pridáme 1ml Ampicilínu, 2ml X-Galu a 0,5ml IPTG (všetky QIAGEN). Premiešame a obsah rozlejeme do sterilných sklenených misiek a necháme 2-3 hodiny stuhnúť.

11. Na pripravené misky napipetujeme 100µl zmesi s DNA
12. Pomocou zahnutej sterilnej sklenenej tyčinky rozprestrieme zmes po celej ploche misky
13. Misky necháme po dobu 15-18hod v inkubátore pri teplote 37°C

Amplifikácia DNA klonov pomocou PCR

Pripravíme mastermix (viď kapitola 4.4.) pomocou primerov pUCM 13F, pUCM 13R (F 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3' , R 5'-CACAGGAAACAGCTATGAC-3') a do každej mikroskúmavky vložíme pomocou sterilného špáratka 1 biely klon z príslušnej misky. PCR prebieha pri nasledovných amplifikačných podmienkach zobrazených v Tabuľke č.8:

Tabuľka č.8: Amplifikačné podmienky PCR klonov

<i>Krok</i>	<i>Teplota</i>	<i>Čas</i>
1.	94°C	5min
2.	94°C	1min
3.	54°C	50s (35x)
4.	72°C	1min 30s
5.	72°C	5min

K vizualizácii výsledkov bola použitá gélová elektroforéza za rovnakých podmienok ako pri PCR. Výsledky boli odčítané v programe GeneSnap a k zobrazenej veľkosti fragmentu v bp bolo potrebné pripočítať veľkosť vektoru (+240bp). Amplikóny zodpovedajúce veľkosti bp použitého detekčného primeru sme považovali za pozitívne. Klony, ktoré boli identifikované ako pozitívne boli napipetované do sterilnej PCR doštičky (96 Well PCR Plate, Cat No. 4zi-0750,4titude, Wotton, UK). Vybraných bolo 2x96 klonov

z rôznych lokalít (v 1. prípade z 24 včelstiev, v 2. prípade zo 16) vzniknutých s použitím 5 rôznych detekčných primerov (viď Tabuľka č.2). Následne boli odoslané do laboratória Macro genu (Macro gen Korea, Seoul, Rep.of Korea) na analýzu.

Sekvencie z fylogenetick ej analýzy boli vyhodnotené pomocou CodonCode (CodonCode Aligner, version 1.5.2). Získané sekvencie boli jednostranné vzhľadom k veľkosti produktu. Sekvencie boli následne porovnávané s GenBank pomocou programu BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Výsledky porovnania sú zobrazené v Tabuľke č.9. Vybrané boli sekvencie, ktoré demonštrujú detekciu prvou sadou (SEF,SER) a ďalšími sadami zvolených primerov pri rozdielnom výsledku podľa databázy.

4.7 ŠTATISTICKÁ ANALÝZA DÁT

Korelačná analýza

Dáta obsahovali nezávislé premenné údaje o včelstvách, t.j. lokalita, dátum odberu, prezimovanie včelstva, stupeň varroózy a prítomnosť včelieho moru. Závislé premenné boli semikvantitatívne dáta popisujúce prítomnosť jednotlivých eukaryotických parazitov vo včelstve (0-3). Z celkového počtu 53 včelstiev splňovalo kritéria tejto analýzy 48 včelstiev. Vzorky zo 7 včelstiev boli odobrané až v roku 2015, a teda nie je k dispozícii údaj o prezimovaní/neprezimovaní včelstva. Tieto vzorky však boli použité pri hodnotení PCR detekcie. Vzťah medzi nezávislými a závislými premennými bol na základe nespojitosti dát vyhodnotený pomocou Spearmanovho korelačného koeficientu.

Faktorová analýza

Na ďalšie spracovanie dát bola zvolená faktorová analýza, ktorá umožňuje analýzu väčšieho množstva merateľných premenných a na základe toho určiť skupiny premenných, ktoré štatisticky spolu súvisia (Škaloudová, 2012). Jedným zo základných cieľov faktorovej analýzy je posúdiť štruktúru vzťahov sledovaných premenných a zistiť tak, či dovoľuje ich rozdelenie do skupín, v ktorých by študované premenné z rovnakých skupín spolu nekorelovali, než premenné z rôznych skupín. Tieto skupiny sa nazývajú faktory, ktoré by mali umožniť lepšie pochopenie vstupných premenných (Hebák, 2005).

Ako premenné boli použité: neprezimovanie včelstva, mor včelieho plodu, napadnutie *Varroa destructor* (char. liečebným spádom), prítomnosť *Nosema ceranae*, *Nosema apis* a *Lotmaria passim*.

Najprv bola vytvorená matica korelácií pomocou Spearmanovho korelačného koeficientu medzi všetkými premennými v sade a identifikácia nekorelovaných premenných. Na posúdenie vhodnosti faktorovej analýzy bola použitá Kaiser-Meyer-Olkinova miera (KMO). Ďalším krokom bola extrakcia faktorov pomocou metódy hlavných komponentov, pri ktorej sa sformovalo toľko faktorov, koľko existuje premenných a určil sa počet faktorov, pre ďalšiu prácu, na základe hodnoty vlastného čísla (Eigenvalue) a sutinového grafu (Scree plot). Následne bola použitá ortogonálna rotácia pomocou metódy Varimax, kedy sa pre každý faktor minimalizoval počet premenných s vysokými záťažami. Účelom rotácie bolo

získať navzájom nekorelované faktory a umožniť čo najlepšiu interpretáciu (Hebák,2005; Škaloudová, 2012). Po rotácii, boli faktory interpretované Analýzy boli vykonané v programe XLSTAT (Addinsoft, NY, USA).

5 VÝSLEDKY

5.1 PCR DETEKČIA PARAZITOV

Za pozitívnu detekciu *N. ceranae* boli považované PCR amplikóny o veľkosti 218-219bp získané z reakcie so špecifickými detekčnými primermi (218 MITOC). Za pozitívnu detekciu *N.apis* boli považované PCR amplikóny o veľkosti 321bp získané z reakcie so špecifickými detekčnými primermi (321 APIS). Prvé použité primery (SEF, SER) ukazovali v klonovaných sekvenciách podobnosť s parazitom *Crithidia mellificae*. Aby bolo možné potvrdiť, ktorý druh trypanozómy bol skutočne detekovaný boli použité ďalšie primery podľa najnovšej literatúry. Pri následných 4 setoch detekčných primerov (SSU, SSU r RNA, Cytb, Tryp-cytb) použitých na tie isté vzorky, boli pozitívne v celkovom počte 192 klonov, odoslaných na analýzu. Získané sekvencie pri porovnaní so sekvenciami z GeneBanku ukázali 98-100% sekvenčnej identity s parazitom *Lotmaria passim*. Porovnanie vybraných sekvencií zobrazuje Tabuľka č.9. Použitými detekčnými primerami (ApUF1, ApUR1), pomocou zvolenej metódy PCR nebol nájdený v žiadnej z testovaných vzoriek amplikón parazita *Apicystis bombi*.

Tabuľka č.9: Porovnanie získaných sekvencií so sekvenciami z GeneBank

Lokalita	Včelstvo	Primer	Dĺžka sekvencie	Taxón	Acces No.	Similarity	Query cover
Zvonějov	Z1	SEF,SER	414	<i>Crithidia mellifica</i>	KF607064.1	100%	99%
Zvonějov	Z1	SSU	794	<i>Lotmaria passim</i>	KM980188.1	100%	98%
Zvonějov	Z708	SSU	791	<i>Lotmaria passim</i>	KJ713371.1	99%	98%
Zvonějov	Z1	SSU rRNA	569	<i>Lotmaria passim</i>	KM980188.1	100%	99%
Zvonějov	Z708	SSU rRNA	572	<i>Lotmaria passim</i>	KM980188.1	100%	99%
Zvonějov	Z708	Tryp cytb	453	<i>Lotmaria passim</i>	KM980188.1	100%	99%
Svrkyně	SVR7	SEF,SER	414	<i>Crithidia mellifica</i>	KF607064.1	100%	99%
Svrkyně	SVR8	SEF,SER	415	<i>Crithidia mellifica</i>	KF607064.1	100%	98%
Svrkyně	SVR8	SSU	792	<i>Lotmaria passim</i>	KM980188.1	99%	98%
Svrkyně	SVR7	SSU rRNA	568	<i>Lotmaria passim</i>	KM980188.1	100%	100%
Svrkyně	SVR8	SSU rRNA	560	<i>Lotmaria passim</i>	KM980188.1	100%	99%
Svrkyně	SVR7	Cyt b	402	<i>Lotmaria passim</i>	KM980181.1	99%	100%
Svrkyně	SVR7	Tryp cytb	452	<i>Lotmaria passim</i>	KM980188.1	100%	99%
Postřižín	P2	SEF,SER	415	<i>Crithidia mellifica</i>	KF607064.1	99%	98%
Postřižín	P201	SEF,SER	415	<i>Crithidia mellifica</i>	KF607064.1	100%	98%
Postřižín	P2	SSU	794	<i>Lotmaria passim</i>	KM980188.1	100%	98%
Postřižín	P201	SSU	794	<i>Lotmaria passim</i>	KM980188.1	99%	98%
Postřižín	P2	SSU rRNA	570	<i>Lotmaria passim</i>	KM980188.1	100%	99%
Postřižín	P201	SSU rRNA	572	<i>Lotmaria passim</i>	KM980188.1	99%	99%
Postřižín	P201	Cyt b	402	<i>Lotmaria passim</i>	KM980188.1	99%	98%
Postřižín	P2	Tryp cytb	452	<i>Lotmaria passim</i>	KM980188.1	98%	99%
Střeleč	S17	SEF,SER	414	<i>Crithidia mellifica</i>	KF607064.1	100%	99%
Střeleč	S19	SSU	798	<i>Lotmaria passim</i>	KJ713376.1	98%	99%
Střeleč	S17	SSU rRNA	572	<i>Lotmaria passim</i>	KM980188.1	100%	99%
Střeleč	S19	SSU rRNA	572	<i>Lotmaria passim</i>	KM980188.1	100%	99%
Zdislavice	ZD45	SSU	791	<i>Lotmaria passim</i>	KM980188.1	100%	99%
Zdislavice	ZD45	SSU rRNA	571	<i>Lotmaria passim</i>	KM980188.1	99%	100%
Zdislavice	ZD45	Tryp cytb	452	<i>Lotmaria passim</i>	KM980188.1	100%	99%

Nosema ceranae bola prítomná vo všetkých skúmaných lokalitách (9) a 46 včelstvách s najvyššou prevalenciou v lokalite Zvonějov, kde bola prítomná vo všetkých (18) včelstvách. Celkovo bola detekovaná v 95 vzorkách (zo 153) s celkovou prevalenciou 86,8%.

Nosema apis bola nájdená iba v 4 testovaných včelstvách. Dve pozitívne vzorky pochádzali z lokality Zvonějov, po jednej z lokality Rataje a Zdislavice. V každom z týchto prípadov bola detekovaná iba v 1 z 3 vzoriek daného včelstva s nízkou prevalenciou iba 5,7%. V porovnaní 2 druhov rodu *Nosema* je *N. ceranae* v skúmaných lokalitách výrazne dominantnejšia.

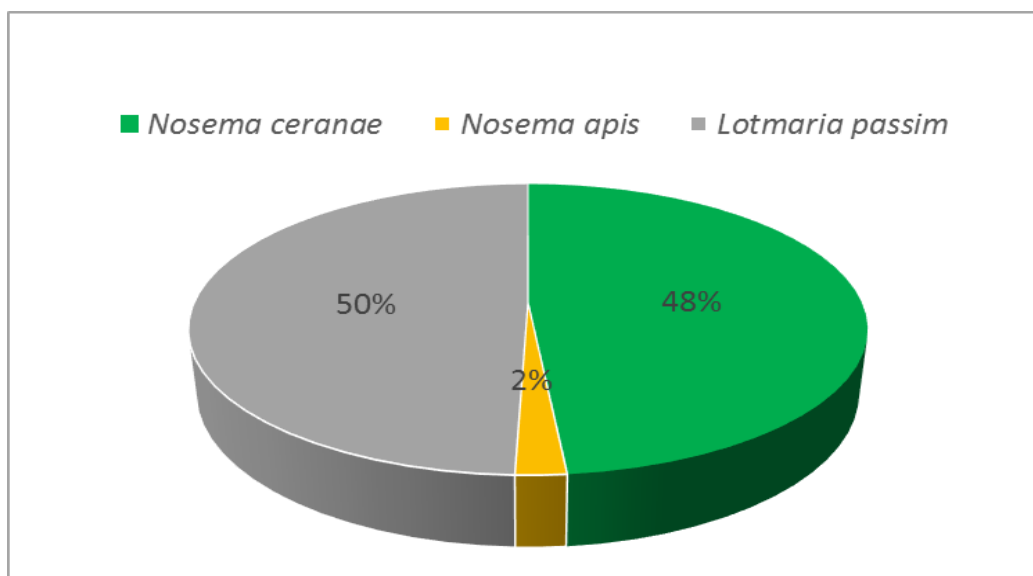
Parazit *Lotmaria passim* bol prítomný prekvapujúco vo všetkých skúmaných lokalitách, 42 včelstvách a celkovo v 97 vzorkách s prevalenciou 79,2%. Vo všetkých včelstvách bol detekovaný v lokalitách Střeleč, Postřižín, Kývalka a Rataje. Výskyt jednotlivých parazitov v skúmaných včelstvách, spolu s údajmi o prítomnosti roztoča *Varroa destructor* a prezimovaní včelstva zobrazuje Tabuľka č.10.

Tabuľka č.10: Napadnuté včelstvá jednotlivými parazitmi

Včelstvo	Lokalita	Neprezimované včelstvo	<i>Varroa destructor</i>	<i>Nosema ceranae</i>	<i>Nosema apis</i>	<i>Lotmaria passim</i>
Z1	Zvonějov	0	3	3	0	3
Z29	Zvonějov	0	3	3	0	2
Z33	Zvonějov	0	2	1	0	0
Z40	Zvonějov	0	3	3	0	3
Z41	Zvonějov	0	3	3	0	3
Z49	Zvonějov	0	3	2	0	0
Z704	Zvonějov	0	3	2	0	0
Z705	Zvonějov	0	4	2	0	0
Z706	Zvonějov	1	4	1	0	3
Z707	Zvonějov	0	3	2	1	2
Z708	Zvonějov	1	4	3	0	3
Z709	Zvonějov	1	4	2	0	0
Z712	Zvonějov	0	2	1	0	0
Z713	Zvonějov	1	3	3	0	1
Z714	Zvonějov	1	3	3	1	2
Z715	Zvonějov	0	3	2	0	3
Z717	Zvonějov	0	2	2	0	2
Z74	Zvonějov	0	2	3	0	3
SVR5	Svrkyně	1	4	3	0	0
SVR6	Svrkyně	0	1	0	0	0
SVR7	Svrkyně	0	1	0	0	3
SVR8	Svrkyně	1	4	2	0	3
SVR9	Svrkyně	0	1	1	0	3
SVR5'	Svrkyně	0	0	3	0	1
SVR6'	Svrkyně	0	0	3	0	1
SVR5F	Svrkyně	0	0	1	0	1
SVR6F	Svrkyně	0	0	0	0	1
SVR7F	Svrkyně	0	0	0	0	1
S16	Střeleč	0	1	3	0	3
S17	Střeleč	0	1	0	0	3
S18	Střeleč	0	0	3	0	2
S19	Střeleč	0	1	1	0	3
S20	Střeleč	0	1	2	0	3
P1	Postřižín	0	2	1	0	3

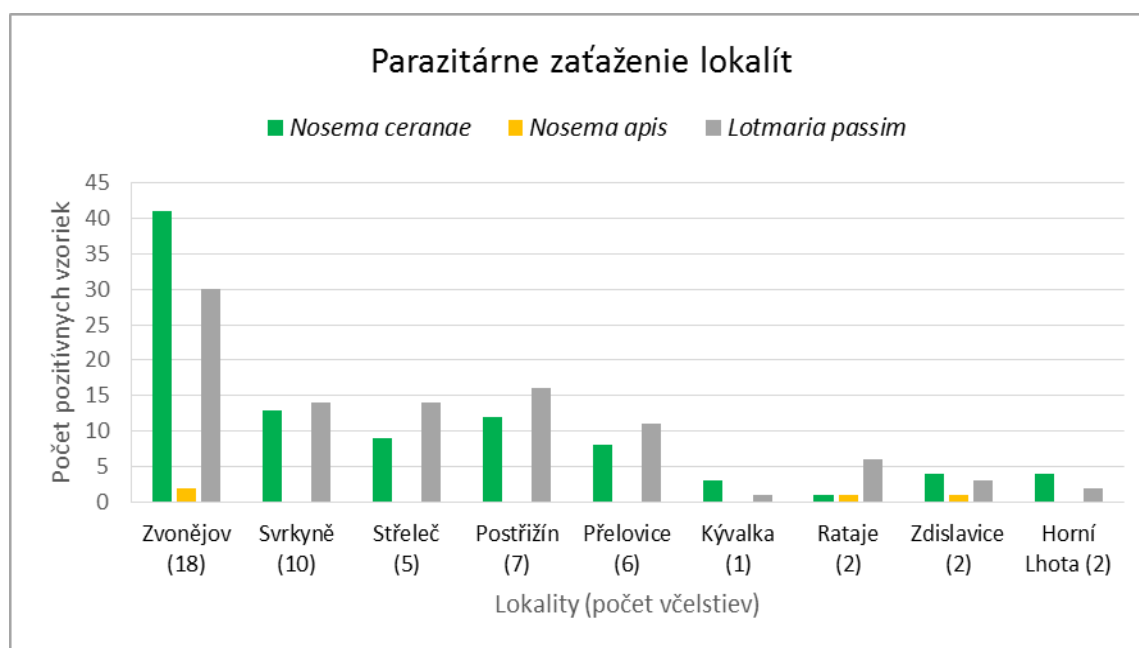
P1'	Postřizín	0	0	3	0	1
P11	Postřizín	0	3	3	0	3
P4	Postřizín	0	0	1	0	1
P2	Postřizín	1	2	0	0	3
P201	Postřizín	0	1	3	0	3
P3	Postřizín	1	3	1	0	2
PR1	Přelovice	0	2	1	0	0
PR11	Přelovice	1	1	1	0	3
PR18	Přelovice	1	1	1	0	0
PR2	Přelovice	1	2	1	0	3
PR20	Přelovice	1	1	1	0	2
PR4	Přelovice	1	3	3	0	3
K59	Kývalka	0	4	3	0	1
R10	Rataje	1	0	0	0	3
R14	Rataje	0	0	1	1	3
ZD45	Zdislavice	0	0	3	0	3
ZD51	Zdislavice	0	0	1	1	0
HLK	Horní Lhota	0	0	2	0	1
HLM	Horní Lhota	0	0	2	0	1

Graf č.1: Štruktúra pozitívnych vzoriek



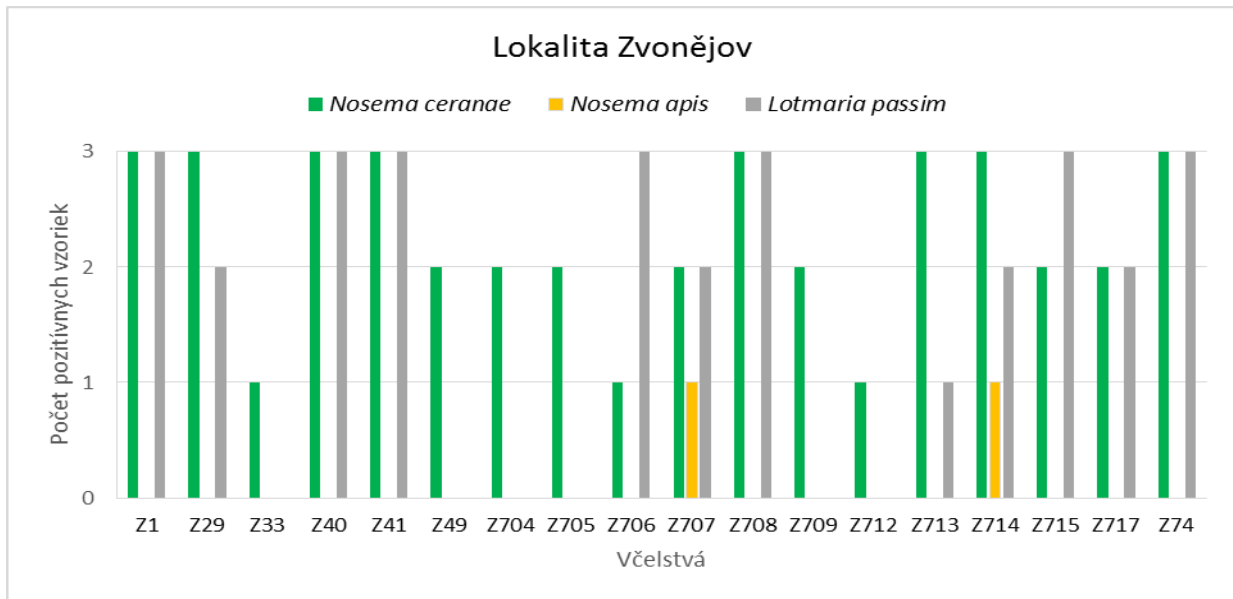
Prekvapujúco najvyššiu početnosť vo vzorkách dosiahol novoobjavený parazit *Lotmaria passim*. Štruktúru pozitívnych vzoriek zo všetkých lokalít zobrazuje Graf č. 1.

Graf č.2: Porovnanie parazitárneho zaťaženia jednotlivých lokalít



Pri porovnaní parazitárneho zaťaženia jednotlivých lokalít sa ukazuje, že žiadne zo včelstiev nebolo bez prítomnosti parazita (viď Graf č. 2). *Nosema ceranae* a *Lotmaria passim* sa vyskytovali vo všetkých lokalitách, možno ich teda označiť za vysoko prevalentné. Výsledky takisto naznačujú vysokú schopnosť prenosu parazitov medzi jednotlivými včelstvami, pri tak početnom výskyte. Vo všetkých lokalitách možno pozorovať spoluvýskyt *N. ceranae* a *L. passim*, čo naznačuje, že tieto druhy si vzájomne nekonkurujú, avšak výsledný účinok ich ko-infekcie nie je jasný. V prípade *Nosema apis* sa potvrdzuje svetový trend ústupu tohto druhu a výrazná dominancia druhu *N. ceranae*. Takisto možno usudzovať nízku schopnosť prenosu medzi jednotlivými lokalitami a včelstvami, pri prítomnosti v 2 včelstvách Zvonějov a po 1 včelstve v Ratajoch a Zdislaviciach (viď Graf č.2).

Graf č.3: Porovnanie parazitárneho zat'azenia lokality Zvonějov.



Lokalita Zvonějov obsahovala najvyšší počet sledovaných včelstiev (18), pričom ani jedno nebolo bez zisteného parazita (vid' Graf č.3). Detekované boli všetky 3 druhy parazitov, s najvýznamnejším výskytom *Nosema ceranae* – vo všetkých včelstvách. *Nosema apis* bola detekovaná v 2 včelstvách, ktoré však nie sú susedné, čo naznačuje nízku schopnosť prenosu, avšak výsledok mohol byť ovplyvnený výraznou sezónnou dynamikou parazita.

5.2 KORELAČNÁ A FAKTOROVÁ ANALÝZA VÝSLEDKOV

Do analýzy bolo zaradených 48 včelstiev z celkového počtu 53 včelstiev s počtom 144 vzoriek. Vzorky zo 7 včelstiev boli odobrané až v roku 2015, a teda nie je k dispozícii údaj o prezimovaní/neprezimovaní včelstva. Tieto vzorky však boli použité pri hodnotení PCR detekcie.

Na vyhodnotenie vzťahu výskytu eukaryotických parazitov s vyhynutím včelstiev a parazitov so stavom varroózy a výskytom moru včelieho plodu bola zvolená korelácia pomocou Spearmanovho korelačného koeficientu. Výsledky sú zobrazené v Tabuľke č.11.

Použité premenné: neprezimovanie včelstva = N, mor včelieho plodu = AFB, napadnutie *Varroa destructor* (char. liečebným spádom)= VD, prítomnosť *Nosema ceranae* = NC, *Nosema apis* = NA a *Lotmaria passim* = LP

Tabuľka č.11: Spearmanove korelačné koeficienty pre jednotlivé ukazovatele

Premenné	N	AFB	VD	NC	NA	LP
N		-0,243	0,349	-0,061	-0,028	0,029
AFB	-0,243		-0,263	-0,141	0,342	-0,012
VD	0,349	-0,263		0,305	-0,034	-0,111
NC	-0,061	-0,141	0,305		-0,048	0,035
NA	-0,028	0,342	-0,034	-0,048		-0,079
LP	0,029	-0,012	-0,111	0,035	-0,079	

Výsledok korelácie medzi jednotlivými parazitmi a neprezimovaním kolónii nebol signifikantný, nepodarilo sa preukázať súvislosť. Korelácia sa podarila preukázať medzi prežitím včiel a stupňom napadnutia roztočom *Varroa destructor*, preto bolo pre nasledujúce hodnotenie zvolený stav napadnutia *V. destructor*, kde sa podarilo preukázať koreláciu medzi výskytom parazita *Nosema ceranae* a reportovaným výskytom varroózy. To znamená, že tento roztoč značne oslabuje kolónie, ich náchylnosť na napadnutie ďalšími parazitmi a ovplyvňuje ich prezimovanie. *Nosema apis* a *Lotmaria passim* s prítomnosťou roztoča *V. destructor* korelované neboli. Takisto možno z tabuľky vyčítať súvislosť medzi morom včelieho plodu a *N. apis*, avšak tento parazit bol prítomný len v 4 vzorkách analýzy, preto tento výsledok nemožno považovať za signifikantný.

Faktorová analýza

Faktorová analýza bola zvolená za účelom analýzy skrytých vzťahov medzi premennými. Vytvorená bola na základe rovnakých dát, ktoré boli použité na vytvorenie Spearmanovej korelačnej tabuľky (N= neprezimovanie, AFB= mor včelieho plodu, VD= napadnutie *V. destructor*, NC= prítomnosť *N. ceranae*, NA= prítomnosť *N. apis*, LP= prítomnosť *L. passim*), z ktorej sme zistili, ako medzi sebou jednotlivé premenné korelujú. *V. destructor* koreloval s neprezimovaním včelstva a takisto aj s *N. ceranae*. *N. ceranae* však s neprezimovaním nesúvisela, takisto bola zobrazená korelácia medzi *N. apis* a morom včelieho plodu, čo naznačuje prítomnosť 3 faktorov v pozadí.

Ďalej bol vykonaný KMO test (Kaiserova - Meyerova – Olkinova štatistika) vhodnosti faktorovej analýzy, kde vyšla hodnota 0,498, ktorá je blízka hraničnej doporučenej hodnote $x < 0,5$ takže je potrebné výsledky interpretovať opatrne.

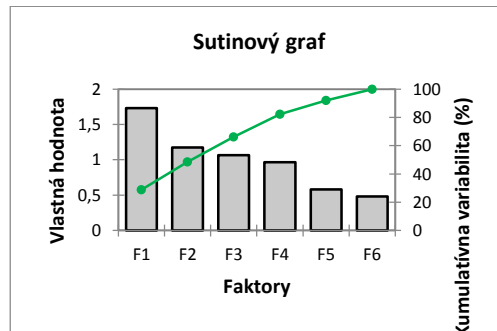
Extrakcia faktorov bola vykonaná pomocou analýzy variácie hlavných komponentov. Tabuľka č.12 zobrazuje mieru vysvetlenej variability. Prvé 3 faktory F1, F2, F3 popisujú viac ako 66% celkovej variability pôvodných premenných. Prvý komponent vysvetľuje 29 % , druhý 19% a tretí 17% variability. Počet faktorov stojacich v pozadí je vybraný podľa hodnoty vlastného čísla (Eigenvalue) daných komponentov ($x > 1$).

Tabuľka č.12: Analýza variácie hlavných komponentov

	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Vlastné číslo	1,733	1,174	1,065	0,965	0,582	0,482
Variabilita (%)	28,875	19,571	17,748	16,075	9,702	8,028
Kumulatívna variabilita (%)	28,875	48,446	66,195	82,270	91,972	100,000

Na objektivizáciu voľby počtu faktorov bol ešte použitý Sutinový graf (Obrázok č.8) ktorý demonštruje použitie prvých 2 faktorov F1,F2 do ďalšej analýzy.

Graf č.4: Sutinový graf faktorov (Scree plot)



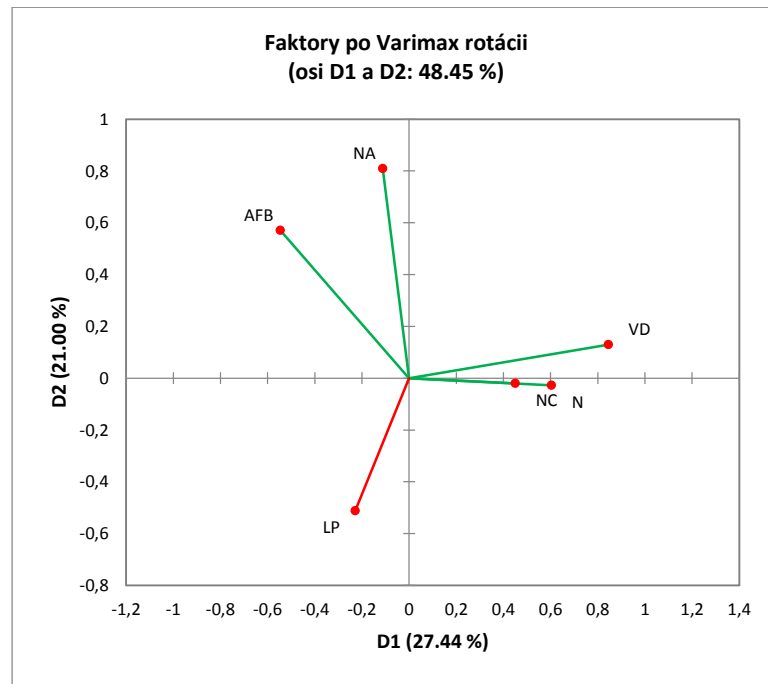
Po rotácii metódou Varimax vznikli navzájom nekorelované faktory. Za významnú faktorovú váhu sa považuje $x > 0,3$. Zistené bolo, že Faktor 1 je najviac sýtený prítomnosťou roztoča *V. destructor*, neprezimovaním včelstva a prezenciou *N. ceranae*. Faktor 2 je najviac sýtený prítomnosťou *N. apis* a morom včelieho plodu. (D1= Faktor1, D2=Faktor 2 po Varimax rotácii) vid' Tabuľka č.13.

Tabuľka č.13: Komponenty po Varimax rotácii

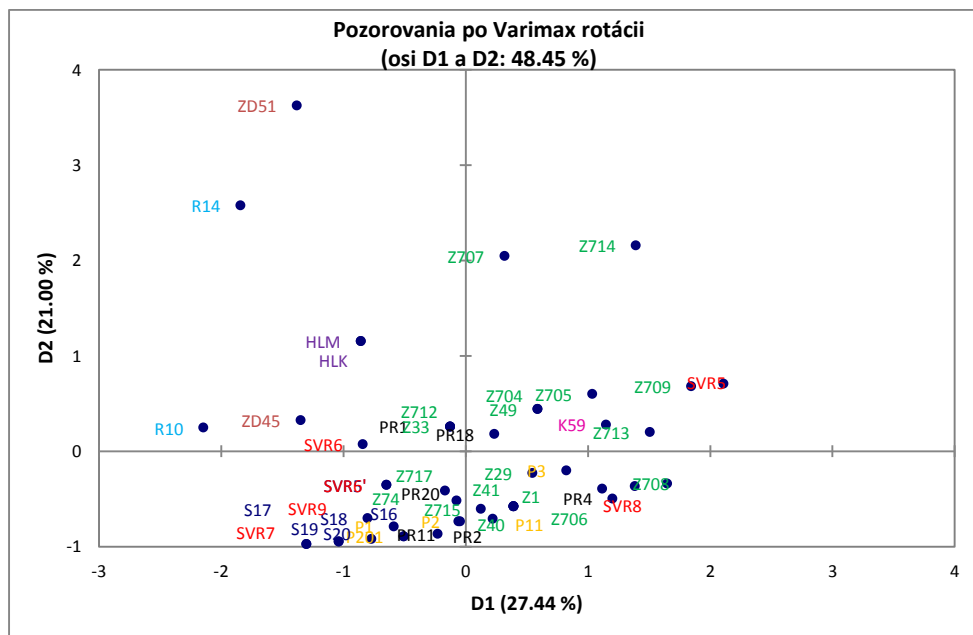
	D1	D2
N	0,604	-0,028
AFB	-0,546	0,571
VD	0,846	0,130
NC	0,451	-0,021
NA	-0,112	0,809
LP	-0,229	-0,512

Pomocou metódy hlavných komponentov sa podarilo nájsť 2 v pozadí stojace spoločné faktory vysvetľujúce 5 premenných. Celkovo sa pomocou modelu podarilo vysvetliť 48% variability. Výsledok preukazuje súvislosť medzi prítomnosťou *V. destructor*, neprezimovaním kolónie a *N. ceranae*. Faktor 2 zobrazuje súvis prítomnosti včelieho moru a *Nosema apis*, avšak parazit *N. apis* sa vyskytoval iba v 4 vzorkách súboru, takže nemožno pokladať tento výsledok za signifikantný (vid' Graf č. 5). Súvislosť medzi jednotlivými parazitmi medzi sebou, a neprezimovaním preukázaná nebola.

Graf č.5: Zobrazenie faktorov po Varimax rotácii



Graf č.6: Rozmiestnenie pozorovaní po Varimax rotácii



V Grafě č. 6 sú zobrazené jednotlivé lokality odobraných vzoriek (každá lokalita inou farbou). Z obrázka možno usudzovať, že distribúcia jednotlivých lokalít je variabilná, viditeľný rozdiel medzi nimi nie je pozorovateľný, a teda na mieste distribúcie a prítomnosťou parazitov nezáleží.

6 DISKUSIA

Úlohou tejto diplomovej práce bola detekcia eukaryotických parazitov *Nosema ceranae*, *Nosema apis*, *Crithidia mellificae* a *Apicystis bombi* vo vybraných českých včelstvách. Detekcia bola vykonaná na 9 lokalitách s rôznym počtom včelstiev a celkovo bolo skúmaných 159 vzoriek. O parazitovi *Apicystis bombi* nie je známe, či sa na území ČR nachádza a táto práca takisto jeho výskyt nepotvrdila. Ďalším cieľom bolo overiť súvis medzi napadnutím jednotlivých parazitov medzi sebou, parazitárnym zaťažením a kolapsom včelstva a prítomnosťou parazitov s ko-infekciou roztoča *Varroa destructor*. Predpokladom bola detekcia *N. ceranae* a *N. apis* na základe už reportovaného výskytu v ČR, čo sa vo výsledkoch aj potvrdilo.

Na základe viacerých vedeckých článkov sa predpokladal súvis parazita *Nosema ceranae* so stratami v kolóniách (Cepero et al., 2014). V štúdií Higes et al. (2008) dokázali, že prirodzená infekcia *N. ceranae* môže spôsobiť kolaps kolónií na základe priamej korelácie medzi parazitárnym zaťažením a kolapsom včelstva v prirodzených podmienkach. Metagenomický výskum *Apis mellifera* v USA (Cox-Foster et al., 2007) takisto predkladá *N. ceranae* ako dominantného parazita spôsobujúceho kolaps kolónií. Štúdiá zo Španielska (Martín-Hernández et al., 2007) dokonca tvrdí, že *N. ceranae* do 18 mesiacov od počiatku infekcie spôsobuje kolaps, avšak parazit je z Európy reportovaný už od roku 2005 s vysokou prevalenciou, preto by v prípade tejto hypotézy bolo skolabovaných kolónií pravdepodobne omnoho viac (Higes et al., 2006). Novšie štúdie sa viac prikláňajú k názoru, že parazit nie je príčinou kolapsu kolónií v Európe (Dainat et al., 2012). V štúdií tejto diplomovej práce sa podarilo detekovať *Nosema ceranae* takmer vo všetkých včelstvách bez ohľadu na prezimovanie či neprezimovanie, nebola prítomná iba v 7 z 53 rôznych včelstiev (95 vzoriek), s celkovou prevalenciou 86,8%. K dominancii parazita sa prikláňa aj predošlý výskum v ČR (4010 včelstiev), podľa ktorého sa *N. ceranae* vyskytovala s prevalenciou 52,3% (Kamler et al., 2011). Možno teda predpokladať významný výskyt v Českej republike, ktorá však nie je priamym pôvodcom strát včelstiev, ale iba prispievateľom. Metagenomická analýza (Huang et al., 2014) takisto podporuje tieto zistenia, kde preukázali vysokú prevalenciu *N. ceranae* vo včelích úľoch, ktoré vykazujú straty. Avšak pri porovnaní zdravých a skolabovaných včelstiev nebola zistená žiadna korelácia, pretože parazit bol prítomný vo všetkých včelstvách. Takisto možno predpokladať, že *N. ceranae* bola prítomná vo včelstvách už pred objavením fenoménu CCD (Higes et al., 2006).

V práci sa nepodarilo sa preukázať predpokladanú súvislosť medzi napadnutím parazitov a neprezimovaním včelstva, avšak bol potvrdený súvis prítomnosti roztoča *Varroa destructor* s kolapsom včelstva, a takisto nájdená korelácia medzi jeho prítomnosťou a výskytom nosemózy. Znamená to, ak by varroóza nebola nijakým spôsobom liečená, včely by vymierali omnoho výraznejším spôsobom. Na základe tohto faktu bolo použité napadnutie *V. destructor* v korelácii s ostatnými skúmanými parazitmi, kedy sa podarilo preukázať koreláciu výskytu *Nosema ceranae* s výskytom varroózy v daných včelstvách. Možno teda usudzovať, že s pribúdajúcim zisteným liečebným spádom *V. destructor* pribúda takisto parazitárne zaťaženie *N. ceranae*.

Existuje mnoho štúdií zaoberajúcich sa spojením medzi parazitizmom *V. destructor* a rozvojom nosemózy. Viacero z nich napovedá, že nedávne straty kolónii pozorované v USA a Európe môžu byť spôsobené synergickým efektom medzi týmito 2 parazitmi (Anderson a East, 2008; Cox-Foster et al., 2007; Higes et al., 2008; Ribiére et al., 2008). Pravdepodobnou príčinou výraznej synergie v napadnutom včelstve je efekt *V. destructor*, ktorý pri saní hemolymfy včely spôsobuje deštrukciu hemocytov, proteínov a lipidov, ktorá poháňa reprodukciu mikrosporidiálnych parazitov (Mariani et al., 2012). Takisto celkové oslabenie spôsobené prítomnosťou roztočov zvyšuje náchylnosť k napadnutiu ďalšími parazitmi (Le Conte et al., 2010).

Naopak pôvodne dominantnejší parazit *Nosema apis* bol detekovaný iba v 4 vzorkách z lokalít Rataje, Zdislavice a Zvonějov. Zodpovedá to všeobecnému trendu ústupu tohto parazita vo viacerých krajinách (Yang et al., 2014; VanEngelsdorp et al., 2009; Dainat et al., 2012). Zistená prevalencia predstavovala iba 5,7%. V sezóne 2008/2009 bola v ČR zistená v 91,3% skúmaných včelstvách, avšak v nasledujúcej sezóne klesla hodnota na 28,4% (Kamler et al., 2011) a tento trend má podľa zistených údajov pokračujúcu tendenciu.

Nosemóza *N. apis* bola považovaná za príčinu signifikantných strát včelstiev v manažovaných kolóniách v minulosti. Po objavení *N. ceranae* bola však v dominancii nahradená, pričom pravdepodobným dôvodom výhody v kompetenčnej dynamike obsadzovania rovnakej niky je vyššia produkcia spór a limitácia infekcie ďalším parazitom (Huang et al., 2014). Často bola vo výskume detekovaná práve *Nosema ceranae* vo všetkých včelstvách a *Nosema apis* nebola prítomná vôbec (Yang et al., 2014). Príčinou môže byť nižšia preferencia teploty, čím by mohol byť výskyt presunutý do krajín s chladnejšími klimatickými podmienkami a zároveň reakcia na otepľovanie klímy (Dainat et al., 2012).

Ďalším cieľom práce bola detekcia parazita *Crithidia mellifcae*, pomocou vybraných detekčných primerov, podľa vedeckej literatúry. *C. mellifcae* do súčasnosti v ČR nebola

detekovaný. Vo výskume tejto práce boli nájdené pozitívne amplikóny, avšak analýza ďalších detekčných primerov dokázala, že sa jedná o príbuzného parazita *Lotmaria passim*, pričom sa jedná o jeho prvý nález v ČR.

Trypanozómy boli dlhšie ignorované pri výskume včiel molekulárnymi metódami a väčšina z nich bola detekovaná pred dekadami, podľa neaktualizovanej morfológie a hostiteľsky špecifických kritérii (Ravoet et al., 2015), čím sa vysvetľuje vysoká špecifická podobnosť s *Crithidia mellificae* prvou sadou použitých primerov, na základe nesprávne zadaných sekvencií v GeneBanku pre dané primery. Novo rozpoznávaný taxón *Lotmaria passim* (Schwarz, 2015^a) bol v minulosti z týchto dôvodov často chybne považovaný za *C. mellificae* a podľa najnovších odhadov sa javí, ako predominantný parazit, hlavne v kontraste k taxonomicky platne detekovanej *C. mellificae* (Ravoet et al., 2015). Táto práca tiež podporuje túto skutočnosť, nakoľko bola *L. passim* detekovaná v 42 z 53 skúmaných včelstiev s celkovou prevalenciou 79,2% čo naznačuje významný výskyt parazita na danom území a prekvapujúco sa radí k dominantným parazitom, čo len zdôrazňuje potrebu ďalšieho výskumu.

Apicystis bombi je pôvodným parazitom čmeliakov rodu *Bombus*, ale s vysokou pravdepodobnosťou je schopný dokončiť životný cyklus aj v *Apis mellifera* (Morimoto et al., 2013). Výskyt *A. bombi* vo včele bol zatiaľ potvrdený v Argentíne, Japonsku a v jednej vzorke vo Fínsku (Plischuk et al., 2011). Naopak ani v rozsiahlych výskumoch v USA parazit identifikovaný nebol (Ravoet et al., 2014). V tejto štúdií nebol nájdený žiadny amplikón, čo môže znamenať, že zvolená metóda parazita nedetekuje, aj napriek tomu, že bola použitá podľa štúdií, ktoré parazita detekovali. Ďalšou možnosťou je, že sa v Českej republike nenachádza, alebo je jeho prevalencia nízka, či agregovaná. Na základe získaných poznatkov nie je možné rozhodnúť jednoznačný záver.

Parazitárne zaťaženie v rovnakých včelstvách poukazuje na vysokú prevalenciu *N. ceranae* a *C. mellificae*, ktoré sa vyskytovali vo všetkých lokalitách a takmer všetkých včelstvách, čo naznačuje ich vysokú schopnosť prenosu medzi včelstvami.

Najnovšie výskumy popisujú, že aj rastlinné druhy podporujú disperziu parazitov. Ak sú prvýkrát kontaminované, môžu sa stať disperznými platformami na šírenie infekcie, pričom včela zastáva úlohu vektorujúceho organizmu (Graystock et al., 2015). táto skutočnosť by mohla vysvetľovať vysokú prítomnosť parazitov takmer vo všetkých včelstvách.

Takisto bola častá ko-infekcia obidvoch parazitov (*N. ceranae*, *L. passim*) v rovnakých včelstvách, na základe čoho možno predpokladať, že si výrazne nekonkurujú. Povaha ich

vzájomného účinku, zatiaľ nie je známa. V prípade *N. apis* bola jej prítomnosť vzácna, detekovaná bola v 2 rôznych lokalitách v 1 vzorke, v lokalite Zvonějov v 2 včelstvách, ktoré však nie sú susedné, z čoho možno usúdiť, že jej schopnosť prenosu je nízka. Súvis uvedených parazitov s neprezimovaním včelstva sa pomocou korelácie nepodarilo preukázať, nakoľko ich výskyt bol takmer vo všetkých včelstvách. Neznamená to však, že nie sú prispievateľom k stratám vo včelstvách, pretože pomocou faktorovej analýzy sa podarilo zistiť súvis medzi infestáciou roztoča *V. destructor*, neprezimovaním včelstva a *N. ceranae*, takže tento parazit môže byť prispievateľom k úhynu včelstiev v zimnom období.

Významný pokles opel'ovačov z posledných dekád a zároveň paralelný pokles rastlín na nich závislých, spôsobuje významné ekologické a hospodárske dôsledky, ktoré ovplyvňujú diverzitu divoko ratúcich aj kultúrnych druhov, stabilitu ekosystémov, rastlinnú výrobu a bezpečnosť potravín. Opel'ovanie je závislé na domestikovaných aj voľne žijúcich druhoch, pričom oba sú ovplyvnené radom environmentálnych zmien (Potts et al., 2010). Za najdôležitejšie sa považujú zmeny využívania pôdy, fragmentácia biotopov, aplikácia pesticídov a znečistenie životného prostredia a šírenie nepôvodných druhov (Celli a Maccagnani, 2003). V globálnom meradle sú populácie *Apis mellifera* najviac nakazené roztočom *Varroa destructor*, ďalšími patogénmi s takmer rovnakou prevalenciou, hlavne *Nosema sp.* a niekoľko vírusov (Potts et al., 2010), čo sa ukázalo v tejto práci aj v podmienkach ČR. Pozornosť je potrebné venovať aj novým parazitom, čo len podporuje objav *Lotmarie passim* na území ČR, a to s významnou prevalenciou. Viacnásobné infekcie a interakcie medzi patogénmi s prídavkom environmentálnych stresorov sú najväčšími prispievateľmi úbytku včely medonosnej a preto je potrebné ich ďalej skúmať a monitorovať.

7 ZÁVER

- V rámci všetkých skúmaných včelstiev sa podarilo detekovať parazity *Nosema ceranae*, *Nosema apis* a *Lotmaria passim*
- Z celkového počtu 53 testovaných včelstiev z 9 rôznych lokalít bolo 46 napadnutých parazitom *Nosema ceranae* (95 vzoriek zo 159), s prevalenciou 86,8%
- Z celkového počtu vzoriek boli iba 4 napadnuté parazitom *Nosema apis*, pričom jej celková prevalencia predstavovala 5,7%
- Trypanozóma *Crithidia mellificae* vo vybraných vzorkách detekovaná nebola. Zvolenými detekčnými primerami pre *C. mellificae* bol detekovaný príbuzný parazit *Lotmaria passim* objavený v Českej republike prvýkrát vo výskume tejto diplomovej práce. *Lotmaria passim* bola prítomná v 42 včelstvách (97 vzoriek zo 159), s prevalenciou 79,2%. Doporučené detekčné primery pre detekciu *L. passim* sú Tryp-cytb (viď Tabuľka č.1), na základe vysokej úspešnosti PCR detekcie vo vzorkách a 100% sekvenčnej identity s parazitom v GeneBanku
- Výskyt *Apicystis bombi* nebol v sledovaných včelstvách preukázaný
- Pomocou korelácie bol preukázaný vzťah medzi napadnutím včelstva roztočom *Varroa destructor* a mikrosporídiom *Nosema ceranae*. Včelstvá s vyššou infestáciou *V. destructor*, sú viac parazitované aj *N. ceranae*
- Vzťah medzi neprezimovaním včelstva a prítomnosťou parazitov *Nosema ceranae*, *Nosema apis* a *Lotmaria passim* sa pomocou korelácie nepodarilo preukázať
- Metódou faktorovej analýzy bola zistená súvislosť medzi infestáciou *V. destructor*, neprezimovaním včelstva a *N. ceranae*. Súvis medzi ďalšími parazitmi, neprezimovaním a *V. destructor* zistený nebol. Analýza takisto preukázala, že na mieste distribúcie parazitov v jednotlivých lokalitách nezáleží.

8 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

1. **Aizen, M. A., Garibaldi, L. A., Cunningham, S. A., Klein, A. M. (2009)** How much does agriculture depend on pollinators? Lessons from long-term trends in crop production. *Annals of Botany* 103 (9):1579-1588
2. **Anderson, D., East, I.J. (2008)** The latest buzz about colony collapse disorder. *Science* 319 (5864): 724-725
3. **Anonym 1 (2013)** Nosemosis of Honey Bees. OIE Terrestrial Manual. Chapter 2.2.4
4. **Anonym 2 (2015)**: Losses of honey bee colonies over the 2014/15 winter. Preliminary results from an international study. Press Release from COLOSS
5. **Anonym 3 (2012)** Colony Collapse Disorder 2012 Annual Progress Report. United States Department of Agriculture. 7str.
6. **Benjamin, E., McCallum, B. (2009)** A World Without Bees. Guardian Books. 304str.
7. **Botías, C., Martín-Hernández, R., Barrios, L., Meana, A., Higes, M. (2013)** *Nosema spp.* infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. *Veterinary Research* 10 (44):25
8. **Boulanger, N., Ehret-Sabatier, L., Brun, R., Zachary, D., Bulet, P., Imler, J.L. (2001)** Immune response of *Drosophila melanogaster* to infection with the flagellate parasite *Crithidia spp.* *Insect Biochem Mol Biol* 31(2):129-37
9. **Bradbear, N. (2009)** Bees and their role in forest livelihoods. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 204 str.
10. **Celli, G., Maccagnani, B. (2003)** Honey bees as bioindicators of environmental pollution. *Bulletin of Insectology* 56 (1): 137-139
11. **Cepero, A., Ravoet, J., Gómez-Moracho, T., Bernal, J.L., Del Nozal, M.J., Bartolomé, C., Maside, X., Meana, A., González-Porto, A.V., de Graaf, D.C., Martín-Hernández, R., Higes, M. (2014)** Holistic screening of collapsing honey bee colonies in Spain: a case study. *BMC Res Notes*. 7:649
12. **Cornman, R.S., Chen, Y.P., Schatz, M.C., Street, C., Zhao, Y. (2009)** Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees. *PLoS Pathog* 5: e1000466.
13. **Cornman, S.R., Schatz, M.C., Johnston, S.J., Chen, Y.P., Pettis, J., Hunt, G., Bourgeois, L., Elsik, C., Anderson, D., Grozinger, C. M., Evans, J.D. (2010)** Genomic survey of the ectoparasitic mite *Varroa destructor*, a major pest of the honey bee *Apis mellifera*. *BMC Genomics* 11:602

14. **Cornman, R. S., Tarpy, D. R., Chen, Y., Jeffreys, L., Lopez, D., Pettis, J. S., VanEngelsdorp, D., Evans J. D. (2012)** Pathogen Webs in Collapsing Honey Bee Colonies. *PLoS ONE* 7(8): e43562
15. **Cox-Foster, D. L., Conlan, S., Holmes, E., Palacios, G., Evans, J. D., Moran, N. A., Quan, P. L., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D. M., Martinson, V., VanEngelsdorp, D., Kalkseit, A. L., Drysdale, A., Hui, J., Zhai, J., Cui, L., Hutchinson, S. K., Simons, J. F., Egholm, M., Pettis, J. S., Lipkin, W. I. (2007)** A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*. 318:283-287
16. **Dainat, B., Evans, J.D., Chen, Y.P., Gauthier, L., Neumann, P. (2012)** Predictive Markers of Honey Bee Colony Collapse. *PLoS ONE* 7(2): e32151
17. **Devillers, J., Pham-Delegue, M. H. (2002)** Honey Bees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals. 332 str.
18. **Ellis, J. (2013)** Colony Collapse Disorder (CCD) in Honey Bees. Entomology and Nematology Department. 150str.
19. **Erler, S., Lommatzsch, S., Lattorff, H. M. (2012)** Comparative analysis of detection limits and specificity of molecular diagnostic markers for three pathogens (*Microsporidia*, *Nosema spp.*) in the key pollinators *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Parasitology Research*. 110(4):1403-1410
20. **Fries, I.; Ekbohm, G.; Villumstad, E. (1984)** *Nosema apis*, sampling techniques and honey yield. *Journal of Apicultural Research* 23(2): 102-105.
21. **Fries, I., Chauzat, M.P., Chen, Y.P., Doublet, V., Genersch E., Gisder S., Higes M., McMahon D. P., Martín-Hernández R., Natsopoulou M., Paxton R. J., Tanner G., Webster T.C., Williams G.R. (2012)** Standard methods for *Nosema* research. *Journal of Apicultural Research* 52 (1)
22. **Genersch E. (2010)** Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87 (1):87-97
23. **Glavinić U., Stevanović J., Gajić B., Simeunović P., Đurić S., Vejnović B., Stanimirović Z. (2014)** *Nosema ceranae* DNA in Honey Bee Haemolymph and Honey Bee Mite *Varroa Destructor*/DNA *Nosema ceranae* U Hemolimfi Pčela I Pčelinjem Krpelju *Varroa Destructor*. *Acta Veterinaria*. Volume 64 (3):349-357
24. **Gómez-Moracho T., Bartolomé C., Bello X., Martín-Hernández R., Higes M., Maside X. (2015)** Recent worldwide expansion of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in *Apis mellifera* populations inferred from multilocus patterns of genetic variation. *Infect Genet Evol.* 31:87

25. **Goulson, D. (2003)** Conserving wild bees for crop pollination. *International Journal Of Food, Agriculture And Environment* 1:142-144
26. **Goulson, D., Whitehorn, P., Fowley, M. (2012)** Influence of urbanisation on the prevalence of protozoan parasites of bumblebees. *Ecological Entomology*. Volume 37, Issue 1:83-89
27. **Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., Rotheray, E. L. (2015)** Bee Declines Driven by Combined Stress from Parasites, Pesticides and Lack of Flowers. *Science* 347(6229): 1255-1257
28. **Graystock, P., Goulson, D., Hughes, W. (2015)** Parasites in bloom: flowers aid dispersal and transmission of pollinator parasites within and between bee species. *Proc. R. Soc.* 282: 20151371
29. **Grozinger, Ch., Robinson, G. E. (2015)** The power and promise of applying genomics to honey bee health. *Current Opinion in Insect Science* 10:124-132
30. **Hebák, P.(2005)** *Vícerozměrné statistické metody* 3. Praha: Informatorium. 239 str.
31. **Higes, M., Matin, R., Meana, A. (2006)** *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honey bees in Europe. *J. Invert. Pathol.* 92:93-95
32. **Higes, M., Martin-Hernandez, R., Botías, C., Garrido-Bailon, E., Gonzalez-Porto, A. V., Barrios, L., del Nozal, M., Bernal, J. L., Jiménez, J. J., Palencia, G. P., Meana, A. (2008)** How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ. Microbiol.* 10:2659-2669
33. **Holt, H.L., Aronstein, K.A., Grozinger, C.M. (2013)** Chronic parasitization by *Nosema* microsporidia causes global expression changes in core nutritional, metabolic and behavioral pathways in honey bee workers (*Apis mellifera*). *BMC Genomics* 14:799
34. **Huang, W. F., Leellen, P., Solter, L., Yau, M., Imai, B. S. (2013)** *Nosema ceranae* Escapes Fumagillin Control in Honey Bees. *PLoS Pathog* 9(3): e1003185
35. **Huang, W. F., Solter, L., Aronstein, K., Huang, Z. (2014)** Infectivity and virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in commercially available North American honey bees. *J Invertebr Pathol.*124:107-113
36. **Hubert, J., Erban, T., Kamler, M., Kopecky, J., Nesvorna, M., Hejdankova, S., Zurek, L. (2015)** Comparison of microbiomes in *Varroa destructor* from natural mite drop and hive honeybees of different apiaries. *Environmental Microbiology Report* (in m.s.)
37. **Chen, Y. P., Evans, J. D., Murphy, C., Gutell, R., Zuker, M., Gundensen-Rindal, D., Pettis, J. S. (2009)** Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of *Nosema*

- ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the European honey bee, *Apis mellifera*. J. Eukaryot. Microbiol. 56:142-147
38. **Johnson, R. (2010)** Honey Bee Colony Collapse Disorder. Congressional Research Service. DIANE Publishing. 17str.
 39. **Kamler, F., Titěra, D., Kamler, M. (2011)** Rozšíření, patogenéze a návrh opatření v chovech včel ohrožených mikrosporidií *Nosema ceranae*. Závěrečná zpráva za rok 2011. 20str.
 40. **Kamler, F., Veselý, V., Titěra, D. (2014)** Celý rok proti varroáze. 6. přepracované vydání. Dol : Výzkumný ústav včelařský. 36str.
 41. **King, A. (2012)** Plight of the bumblebee. New Scientist 215(2877):42-45
 42. **Klee, J., Besana, A., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Tam, D., Chinh, T., Puerta, F., Ruz, J., Kryger, P., Message, D., Hatjina, F., Korpela, S., Fries, I., Paxton, R. (2007)** Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. Journal of Invertebrate Pathology 96(1):1-10.
 43. **Koch, H., Schmid-Hempel, P. (2011)** Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. Proceedings of National Academic Science USA. 108(48):19288-19292
 44. **Koch H., Cisarovsky, G., Schmid-Hempel, P. (2012)** Ecological effects on gut bacterial communities in wild bumblebee colonies. Journal of Animal Ecology 81(6):1202-1210
 45. **Langridge, D.F., McGhee, R. B. (1967)** *Crithidia mellificae* n. sp. an acidophilic trypanosomatid of the honey bee *Apis mellifera*. J Protozool. 14(3):485-7
 46. **Laurent, M., Hendrik, P., Ribiere-Chabert, M., Chauzat, M. (2015)** A pan-European epidemiological study on honeybee colony losses 2012-2014. EPILOBEE. 40str.
 47. **Le Conte, Y., Navajas, M. (2008)** Climate change: impact on honey bee populations and diseases. Revue Scientifique et Technique 27(2):485-97
 48. **Le Conte, Y., Ellis, M., Ritter, W. (2010)** Varroa mites and honey bee health: Can Varroa explain part of the colony losses?*. Apidologie, Springer Verlag (Germany), 2010, 41 (3).
 49. **Lipa, J. J., Triggiani, O. (1996)** *Apicystis* gen nov and *Apicystis bombi* (Liu, Macfarlane & Pengelly) comb nov (*Protozoa: Neogregarinida*), a cosmopolitan parasite of *Bombus* and *Apis* (*Hymenoptera: Apidae*). Apidologie 27: 29-34
 50. **Maharramov, J., Meeus, I., Maebe1, K., Arbetman, M., Morales, C., Graystock, P., Hughes, W. O. H., Plischuk, S., Lange, C. E., De Graaf, D. C., Zapata, N., De la Rosa, J. J. P., Murray, T. E., Brown., Smagghe, G. (2013)** Genetic Variability of the

Neogregarine *Apicystis bombi*, an Etiological Agent of an Emergent Bumblebee Disease. PLoS ONE 8(12): e81475

51. **Mariani, F. Maggi, M., Porrini, M., Fuselli, S., Caraballo, G., Brasesco, C., Barrios, C., Principal, J., Martin, E.**(2012) Parasitic interactions between *Nosema spp.* and *Varroa destructor* in *Apis mellifera* colonies. *Zootecnia Trop.* 30(1): 81-90
52. **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
53. **Meeus, I., De Graaf, D. C., Jans, K., Smagghe, G.** (2010) Multiplex PCR detection of slowly-evolving trypanosomatids and neogregarines in bumblebees using broad-range primers. *Journal of Applied Microbiology* 109(1):107-115
54. **Milbrath, M. O., van Tran, T., Huang, W., Solter, L. F., Tarpy, D. R., Lawrence, F., Huang, Z.Y.** (2014) Comparative virulence and competition between *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* 125: 9-15
55. **Matheson, A., Buchmann, S. L., O'Toole, C., Westrich, P., Williams, I. H.** (1996) The Conservation of Bees. Linnean Society Symposium Series No. 18, Academic Press, Harcourt Brace & Company, Publishers, New York. 254str.
56. **Morimoto, R., Kojima, Y., Yoshiyama, M., Kimura, K., Yang, B., Peng, G., Kadowaki, T.** (2013) Molecular detection of protozoan parasites infecting *Apis mellifera* colonies in Japan. *Environmental Microbiology Reports* 5(1): 74-77
57. **Muñoz, I., Cepero, A., Pinto, M. A., Martín-Hernández, R., Higes, M., De la Rúa, P.** (2014) Presence of *Nosema ceranae* associated with honeybee queen introductions. *Infection, Genetics and Evolution* 23: 161–168
58. **Mussen, E. C.** (2011) Diagnosing and Treating *Nosema* Disease <http://entomology.ucdavis.edu/files/147621.pdf>
59. **Navrátil, S., Klíma, Z., Palíková, M.** (2012) Choroby včel – multimediální pomůcka <http://soubory.vfu.cz/fvhe/choroby-vcel/index.html> □
60. **Nickens, E.** (1996) Beyond the birds and the bees (mites destroying American honey bee populations and upsetting the food web). *Audubon*, 98 (5): 22-4.
61. **Plischuk, S., Martín-Hernández, R., Prieto L., Lucía, M., Botías, C., Meana, A., Abrahamovich, A. H., Lange, C., Higes, M.** (2009) South American native bumblebees (Hymenoptera: Apidae) infected by *Nosema ceranae* (Microsporidia), an emerging

- pathogen of honeybees (*Apis mellifera*). Environmental Microbiology Reports 1(2): 131–135
62. **Plischuk, S., Meeus, I., Smagghe, G., Lange, C. E. (2011)** *Apicystis bombi* (Apicomplexa: Neogregarinorida) parasitizing *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) in Argentina. Environmental Microbiology Reports 3(5): 565-568
 63. **Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W.E. (2010)** Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. Trends Ecol Evol. 25(6):345-53
 64. **Potts, S.G., Vulliamy, B., Dafni, A., Ne'eman, G., O'Toole, C., Roberts, S. & Willmer, P.G. (2003)** Response of plant-pollinator communities following fire: changes in diversity, abundance and reward structure. Oikos 101: 103-112
 65. **Prokeš, P. (2008):** Úl Optimal, Včelařství 61(7):182
 66. **Přidal, A., Čermák, K. (2005):** Včelařství. Brno, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. 95str.
 67. **Ravoet, J., De Smet, L., Meeus, I., Smagghe, G., Wenseleers, T., De Graaf, D. C. (2014)** Widespread occurrence of honey bee pathogens in solitary bees. Journal of Invertebrate Pathology 122: 55-58
 68. **Ravoet, J., Schwarz, R.S., Descamps, T., Yaez, O., Tozkard, C. O., Martin-Hernandez, R., Bartolomé, C., De Smet, L., Higes, M., Wenseleers, T., Schmid-Hempel, R., Neumann, P., Kadowaki, T., Evans, J. D., De Graaf, D. C. (2015)** Differential diagnosis of the honey bee trypanosomatids *Crithidia mellificae* and *Lotmaria passim*. Journal of Invertebrate Pathology 130: 21-27
 69. **Rejnič, J., Haragsim, O., Rekoš, J. (1987)** Včelařství. Institut výchovy a vzdělání MZVŽ ČSR – Praha. 143str.
 70. **Ribiére, M., Ball, B.V., Aubert, M. (2008)** Natural history and geographical distribution of honey bee viruses. Virology and the honey bee. Luxembourg: European Commission. 15-84
 71. **Roberts, E. K., Hughes, O. H. W. (2014)** Immunosenescence and resistance to parasite infection in the honey bee, *Apis mellifera*. Journal of Invertebrate Pathology 121: 1-6
 72. **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(6): e20656
 73. **Runckel, C., DeRisi, J., Flenniken, M. L. (2014)** A Draft Genome of the Honey Bee Trypanosomatid Parasite *Crithidia mellificae*. Plos One 9(4): e95057

74. **Rychlík, M. (2015)** Roztoč kleštěk včelí decimuje včelstva. Chovatele čeká šok nad prázdnými úly a zákazníky dražší med. Lidové noviny. 5.ledna 2015: 4
75. **Shimanuki, H. (ed.) (1992)** Diseases and Pests of Honey Bees. The Hive and the honey bee. 1083-1151
76. **Schmid-Hempel, P. (1998)** Parasites in social insects, Princeton University Press, Princeton N.J. 119-123
77. **Schmid-Hempel, R., Tognazzo, M. (2010)** Molecular divergence defines two distinct lineages of *Crithidia bombi* (*Trypanosomatidae*), parasites of bumblebees. J Eukaryot Microbiol. 57(4):337-345
78. **Schmidt, J., Buchmann, S. (1992)** Other Products of the Hive. The Hive and the honey bee. IL: Dadant. 927-988
79. **Schwarz, R.S., Bauchan, G.R., Murphy, C.A., Ravoet, J, de Graaf, D.C., Evans, J.D. (2015^a)**: Characterization of Two Species of Trypanosomatidae from the Honey Bee *Apis mellifera*: *Crithidia mellificae* Langridge and McGhee, and *Lotmaria passim* n. gen., n. sp. Journal of Eukaryotic Microbiology 10: 10-17
80. **Schwarz, R. S., Huang, Q., Evans, J. E. (2015^b)** Hologenome theory and the honey bee pathosphere. Current Opinion in Insect Science 10: 1-7
81. **Schwarz, R. S., Evans, J. D. (2013)** Single and mixed-species trypanosome and microsporidia infections elicit distinct, ephemeral cellular and humoral immune responses in honey bees. Dev Comp Immunology 40(3-4): 300-310
82. **Szumowski, S. C., Troemel, E. R. (2015)** Microsporidia-host interactions. Current Opinion in Microbiology 26:10-16
83. **Škaloudová, A. (2012)** Faktorová analýza. Web CUNI. <http://userweb.pedf.cuni.cz/kpsp/skalouda/fa/>
84. **Tipa, R. (2015)**: Bee colonies wiped out as new parasite spreads through New Zealand. <http://www.stuff.co.nz/business/farming/agribusiness/69531572/Bee-colonies-wiped-out-as-new-parasite-spreads-through-New-Zealand>
85. **Tirado, R., Simon, G., Johnston, P. (2013)** Bees in Decline A review of factors that put pollinators and agriculture in Europe at risk. Greenpeace Research Laboratories Technical Report (Review) 01/2013. 46str.
86. **Traver, E., Fell, B. E. (2012)** PCR for the Analysis of *Nosema* in Honey Bees. Honey Bee Colony Health. Challenges and Sustainable Solutions Pages 103-114
87. **Tripodi, A. D., Cibils-Stewart, X., McCornack, B. P., Szalanski, A.(2014)** *Nosema bombi* (*Microsporidia: Nosematidae*) and Trypanosomatid Prevalence in Spring Bumble

- Bee Queens (*Hymenoptera: Apidae: Bombus*) in Kansas. Journal Of The Kansas Entomological Society 87(2): 225-233
88. **VanEngelsdorp, D., Meixner, M. D. (2009)** A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. Journal of Invertebrate Pathology 103: 95
 89. **Van der Zee, R.(ed.) (2014)** Results of international standardised beekeeper surveys of colony losses for winter 2012-2013: analysis of winter loss rates and mixed effects modelling of risk factors for winter loss. Journal of Apicultural Research 53(1):19-34
 90. **Varis, A.L., Ball, B.V, Allen, M (1992)** The incidence of pathogens in honey bee (*Apis mellifera L*) colonies in Finland and Great Britain. Apidologie 23: 133-137
 91. **Veselý, V., Kubišová, S., Haragsim, O., Kamler, K., Krieg, P., Škrobal, D., Ptáček, V., Titěra, D., Peroutková, M., Drobníková, V., Bacílek, J., Kamler, F. (2003)** Včelařství. Brázda, Praha. 272 str.
 92. **Vidau, C., Panek, J., Texier, C., Biron, D.G., Belzunces, L.P., Le Gall, M., Broussard, C., Delbac, F., El Alaoui, H. (2014)** Differential proteomic analysis of midguts from *Nosema ceranae*-infected honeybees reveals manipulation of key host functions. Journal of Invertebrate Pathology 121:89-96
 93. **Watanabe, M. (1994)** Pollination worries rise as honey bees decline. Science 265(5176): 1170
 94. **Weiser, J. (1961)** Die Mikrosporidien als Parasiten der Insekten. Monogr. Angew Entomol. 17:1-149
 95. **Williams, I. H., Corbet, S. A., Osborne, J. L. (1991)** Beekeeping, Wild Bees and Pollination in the European Community. Bee World Volume 72(4):170-180
 96. **Williams, G. R., Shutler, D., Burgher-MacLellan, K. L., Rogers, R. E. (2014)** Infra-Population and Community Dynamics of the Parasites *Nosema apis* and *Nosema ceranae*, and Consequences for Honey Bee (*Apis mellifera*) Hosts. Plos One 9(7): e99465
 97. **Yang, B., Peng, G., Li, T., Kadowaki, T. (2013)** Molecular and phylogenetic characterization of honey bee viruses, *Nosema* microsporidia, protozoan parasites, and parasitic mites in China. Ecology and Evolution Volume 3(2): 298-311
 98. **Zander E. 1909.** Tierische parasiten als krankheitserreger bei der biene. Münchener Bienenzeitung 31:196-204

Internetové zdroje

1. **Internet(1)** <http://www.extension.org/pages/31234/nosema-microsporidia:-friend-foe-and-intriguing-creatures#.VbUkB7Ptmko>
2. **Internet(2)** <http://archiv.ethlife.ethz.ch/articles/sciencelife/Verteidigungskosten.html>
3. **Internet(3)** <http://spos.info/novi-parazit-lotmaria-passim-zbrisao-pcelinje-zajednice-na-novom-zelandu/>
4. **Internet(4)** <http://scialert.net/fulltext/?doi=pjbs.2006.1282.1286&org=11>
5. **Internet(5)** <https://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/qpcr-vs-digital-pcr-vs-traditional-pcr.html>

9 PRÍLOHY

Príloha č.1: Fotodokumentácia lokality Postřižín

Obrázok č.I: Včelstvá lokality Postřižín



Obrázok č. II: Plásty včelstva P1



Obrázok č. III: Odber vzoriek z plodového plástu



Obrázok č. IV: Plást so včelami



Obrázok č. V: Kontrola spádovej podložky roztoča *Varroa destructor*

