

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH  
BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Agroekologie – Péče o krajinu

Katedra: Katedra speciální produkce rostlinné

Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vliv působení trávicího procesu zavíječe voskového  
(*Galleria mellonella*) na spory původce moru včelího  
plodu (*Paenibacillus larvae*)

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Mgr. Štěpán Ryba, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Autor diplomové práce: Bc. Petr Mráz

České Budějovice, 2017

**ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE**  
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Petr MRÁZ**  
Osobní číslo: **Z15302**  
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**  
Studijní obor: **Agroekologie - Péče o krajinu**  
Název tématu: **Vliv působení trávícího procesu zavíječe voskového (*Galleria mellonella*) na spory původce moru včelího plodu (*Paenibacillus larvae*)**  
Zadávající katedra: **Katedra speciální produkce rostlinné**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Cíl práce: Ověřit změnu klíčivosti spor moru včelího plodu (*Paenibacillus larvae*) po průchodu trávícím traktem Zavíječe voskového (*Galleria mellonella*).

- 1) Úvod - základní informace *Paenibacillus larvae* a *Galleria mellonella*.
- 2) Mor včelího plodu (*Paenibacillus larvae*) - historie, klinické příznaky, šíření, diagnostika a prevence.
- 3) Zavíječ voskový (*Galleria mellonella*) - stručný popis, životní cyklus, fyziologie trávení, tlumení škůdce ve včelařských provozech.
- 4) Experiment:
  - a. Kultivační test - určení přítomnosti životaschopných spor v exkrementech *Galleria mellonella* krmených infikovaným voskem *Paenibacillus larvae*.
  - b. PCR test - detekce přítomnosti DNA *Paenibacillus larvae* v exkrementech *Galleria mellonella* krmených infikovaným voskem.
- 5) Výsledková část - uspořádání výsledků testů do tabulek, fotografie z pitvy trávícího ústrojí *Galleria mellonella*.
- 6) Diskuze - porovnání dosažených výsledků s literárními údaji.
- 7) Závěr - shrnutí výsledků vlastní práce.
- 8) Seznam použité literatury

Rozsah grafických prací: **5-10 stran**  
Rozsah pracovní zprávy: **30 - 50 stran**  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Vendula Salášková, Pavel Hyršl: **Stále stejný zavíječ voskový *Galleria mellonella*? In Zoologické dny České Budějovice 2008. 2008. ISBN 978-80-87189-00-9**  
Marek M.: **Vliv podchlazení a inkubačních medií na proteosyntézu a metabolismus prepup a kukel (*Galleria mellonella* L.)habilitační práce PŘF MU, Brno, 1990**  
Foul brood disease of honey bees: recognition and control Central Science Laboratory National Bee Unit, Department for Environment, Food and Rural Affairs (DEFRA): United Kingdom  
Kodrík D.: **Fyziologie hmyzu, čební texty, Jihočeská univerzita, České Budějovice, 2004**  
Skuhřavý V. a kol.: **Metody chovu hmyzu, Academia, Praha, 1968** Elke Genssch; **American Foulbrood in honeybees and its Causative Agent, Paenibacillus larvae, Journal of Invertebrate Pathology 103 (2010)**

Vedoucí diplomové práce: **RNDr. Mgr. Štěpán Ryba, Ph.D.**  
BCPU

Konzultant diplomové práce: **prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.**  
Katedra speciální produkce rostlinné

Datum zadání diplomové práce: **24. února 2016**

Termín odevzdání diplomové práce: **30. dubna 2017**

L.S.

prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.  
děkan

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.  
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 22. února 2016

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem práci zpracoval samostatně a použil jen uvedených pramenů a literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

České Budějovice, duben 2017

.....

Petr Mráz

## **Poděkování**

Tímto bych chtěl poděkovat RNDr. Mgr. Štěpánu Rybovi, Ph.D., vedoucímu diplomové práce a prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D., konzultantovi diplomové práce za odborné vedení, vstřícný přístup, věcné připomínky a pomoc při zpracování této diplomové práce. Velké poděkování patří také mé rodině a přátelům za duševní podporu a trpělivost.

## Abstrakt

Tato práce se zabývá závažným včelím onemocněním – morem včelího plodu (MVP) a možnostmi kontroly této nemoci a je rozdělena na dvě části, teoretickou a experimentální. Teoretická část je zpracována formou rešerše a obsahuje 2 velké kapitoly. První pojednává o moru včelího plodu a původci onemocnění MVP, bakterii *Paenibacillus larvae*, od její klasifikace, výskytu, patogeneze až po metody tlumení a léčby onemocnění MVP. Druhá část se zabývá zavíječem voskovým (*Galleria mellonella*), převážně vývojovým cyklem, orgánovými soustavami a také proč a jak škodí ve včelařství spolu s metodami prevence a kontroly.

Experimentální část poté kombinuje tato témata ve snaze nalezení vztahu mezi zavíječem voskovým a *P. larvae*, který by mohl pomoci při kontrole MVP. *Paenibacillus larvae* vytváří velmi odolné sedmivrstevné spory, které jsou životaschopné i po mnoha letech a pokud se dostanou do včelí larvy, nejčastěji potravou, rychle vyklíčí do vegetativní formy, usmrtí hostitele a začnou produkovat velké množství nových spor. To je obrovský problém ve včelařství, neboť po vypuknutí onemocnění se v České republice dle zákona 166/1999 Sb., o veterinární péči a o změně souvisejících zákonů (veterinární zákon) musejí včelstva spálit, i se vším spalitelným vybavením, které přišlo s nákazou do styku. Toto je jediné účinné opatření k potlačení MVP a včelařům způsobuje značné škody.

Cílem práce tedy bylo zjistit, zda je zavíječ voskový díky svému dobře přizpůsobenému trávicímu traktu, který dokáže rozložit i velmi stabilní látky, jako je včelí vosk, schopen narušit odolné vrstvy spory *P. larvae*, čímž by mohlo dojít ke změně klíčivosti těchto spor. Výzkum spočíval v naočkování bakterie *P. larvae* na mezistěny, na kterých se poté krmily larvy zavíječe voskového. Některé se pohybovaly volně, jiné byly fixované ve speciálních klíčkách, které zabraňovaly kontaminaci sporami povrchu těla larev. Po několika dnech krmení se larvám vypítvaly trávicí soustavy a následně z nich izolovaly spory toluenovou metodou. Tyto vzorky se naočkovali na MYPGP agar a nechaly 10 dní kultivovat. Nakonec ještě proběhla PCR analýza s následným vyhodnocením elektroforézou. Výsledky kultivačního testu nebyly průkazné z důvodu nízkého množství narostlých spor, ale PCR a elektroforetické vyhodnocení ukázalo, že pravděpodobně nejvíce spor se vyskytovalo na začátku trávicí soustavy housenky zavíječe voskového, méně potom ve střední části a v zadní části dokonce žádné.

**Klíčová slova:** Mor včelího plodu, *Paenibacillus larvae*, Zavíječ voskový (*Galleria mellonella*), kultivace, PCR metoda, elektroforéza

## Abstract

This diploma thesis deals with a serious honey bee (*Apis mellifera*) disease, the American foulbrood (AFB), and with possibilities of its control. The thesis is divided into two parts, the theoretical and the experimental. The theoretical part is written as a research and contains two big chapters. The first one describes American foulbrood disease and its causative agent, bacteria *Paenibacillus larvae*, from its classification, occurrence and pathogenesis to the control methods of AFB disease treating. The second part deals with the wax moth (*Galleria mellonella*), focusing on its development cycle, organ systems and exploring why and how is the wax moth detrimental to the beekeeping. It also contains methods of its control and prevention.

The experimental part then combines above mentioned themes in an effort to find the relationship between the wax moth caterpillars and bacteria *P. larvae* that could possibly help to control the AFB. *P. larvae* create very resistant spores that are viable even after many years and when they get into the bee larvae, mostly via food, they quickly germinate into vegetative forms, kill the host and begin to produce large amounts of new spores. This is a huge problem in beekeeping, especially because the beehives must be burned after the outbreak of the disease even with all the flammable equipment that had come in contact with the infection, according to the Act No 166/1999 Coll. (On veterinary care and amending related laws - Veterinary Act) in the Czech Republic. It is the only effective measure to suppress the AFB but it also causes significant economic losses to beekeepers.

The aim of this work was to determine whether the wax moth can disrupt resistant layers of *P. larvae* spores thanks to its well adapted digestive tract and whether it could change their germination. The research consisted in inoculation of *P. larvae* on a wax partition and the wax moth larvae were then fed on it. Some larvae moved freely, others were fixed in special cages that prevented contamination via larvae's body surface spores. After several days of feeding, larvae's digestive systems were dissected and subsequently the spores were isolated using the toluene method. These samples were then inoculated on MYPGP agar and cultivated for 10 days. Finally, a PCR analysis was carried out with subsequent electrophoretic evaluation. Results of the culture tests were inconclusive due to the low amount of spores grown on the MYPGP agar plate but PCR and electrophoretic evaluations revealed that most spores probably occurred at the beginning of the wax moth caterpillar's digestive system, a little bit less occurred in the middle and the rear part of the digestive system contained even no spores.

**Keywords:** American foulbrood, *Paenibacillus larvae*, wax moth (*Galleria mellonella*), the cultivation method, the PCR method, the electrophoresis

## Obsah

<b>1. ÚVOD A CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>11</b>
<b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED .....</b>	<b>14</b>
2.1 Mor včelího plodu .....	14
2.1.1 Obecná charakteristika včelstva.....	14
2.1.2 Původce moru včelího plodu, historie a klasifikace.....	15
2.1.3 Taxonomické zařazení <i>P. larvae</i> (Sedláček, 2007).....	18
2.1.4 Rozšíření .....	18
2.1.5 Patogeneze.....	18
2.1.6 Metabolity <i>P. larvae</i> .....	20
2.1.7 Virulence <i>P. larvae</i> a odolnost včelstva.....	21
2.1.8 Přenos infekce .....	24
2.1.8.1 Horizontální a vertikální šíření onemocnění .....	25
2.1.9 Klinické příznaky .....	26
2.1.10 Vyšetření na přítomnost <i>P. larvae</i> a postup při pozitivním nálezu.....	26
2.1.10.1 Fyzikální dezinfekce .....	29
2.1.10.2 Chemická dezinfekce .....	29
2.1.10.3 Poskytnutí náhrady za utracená včelstva .....	29
2.1.10.4 Zrušení ohniska MVP a následné zavčelení oblasti.....	29
2.1.11 Extrakce a kultivace spor <i>P. larvae</i> .....	30
2.1.11.1 Extrakce spor <i>P. larvae</i> z včelí měli .....	30
2.1.11.2 Kultivace spor .....	31
2.1.12 Prevence .....	31
2.1.13 Kontrola MVP .....	32
2.1.14 Alternativní metody kontroly MVP .....	34
2.1.14.1 Přirozená odolnost včel.....	35
2.1.14.2 Fágová léčba .....	36
2.1.14.3 Metoda přemetení včelstva na mezistěny .....	36
2.1.14.4 Kontrola včelím jedem.....	38
2.1.15 Dekontaminace úlu.....	38
2.1.16 Nákazová situace v České republice .....	39
2.2 Zavíječ voskový ( <i>Galleria mellonella</i> ) .....	40
2.2.1 Klasifikace.....	40



2.2.2	Charakteristika čeledi.....	41
2.2.3	Výskyt.....	41
2.2.4	Binomie.....	41
2.2.4.1	Vajíčko.....	41
2.2.4.2	Larva.....	42
2.2.4.3	Kukla.....	43
2.2.4.4	Dospělec.....	43
2.2.4.5	Páření.....	44
2.2.4.6	Kladení vajíček.....	44
2.2.5	Orgánové soustavy.....	44
2.2.5.1	Trávicí soustava.....	44
2.2.5.2	Tukové těleso.....	46
2.2.5.3	Trávení vosku.....	46
2.2.5.4	Dýchací soustava.....	47
2.2.5.5	Vylučovací soustava.....	47
2.2.5.6	Cévní soustava.....	47
2.2.5.7	Nervová soustava.....	48
2.2.5.8	Endokrinní soustava.....	48
2.2.5.9	Pohlavní soustava.....	49
2.2.6	Škody způsobené zavíječem voskovým.....	49
2.2.7	Kontrola zavíječe voskového.....	51
2.2.8	Skladování souší a plástů.....	53
2.2.8.1	Technika zamražení voskových plástů.....	53
2.2.8.2	Skladování voskových plástů v klimatizovaných skladech.....	53
2.2.8.3	Skladování voskových plástů v silných včelstvech.....	53
2.2.9	Chov zavíječe voskového.....	54
2.2.10	Potrava.....	54
2.3	PCR metoda.....	55
2.4	Elektroforéza.....	58
<b>3.</b>	<b>MATERIÁL A METODY.....</b>	<b>60</b>
3.1	Chov zavíječe voskového.....	60
3.1.1	Výživa pro zavíječe voskového.....	62
3.1.2	Postup přípravy krmné směsi.....	63

3.1.3	Příprava preparátu housenky zavíječe voskového a mikroskopování..	64
3.1.4	Příprava vzorků a kultivace.....	65
3.1.4.1	Postup přípravy inokula toluenovou metodou.....	67
3.1.5	Izolace DNA <i>P. larvae</i> ze zavíječe voskového .....	69
3.2	PCR metoda.....	70
3.3	Elektroforéza .....	70
<b>4.</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>72</b>
4.1	Výsledky pitvy <i>Galleria mellonella</i> .....	72
4.2	Výsledky kultivace .....	73
4.3	Výsledky PCR a elektroforézy .....	75
<b>5.</b>	<b>DISKUSE.....</b>	<b>76</b>
5.1	Kultivace .....	76
5.2	PCR a elektroforéza.....	77
5.3	Prevence a kontrola moru včelího plodu .....	78
<b>6.</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>82</b>
<b>7.</b>	<b>SEZNAM LITERATURY.....</b>	<b>84</b>

# 1. ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Opylovači, jako je hmyz, ptáci, netopýři a další, jsou velmi důležití pro pohlavní rozmnožování mnoha kulturních plodin i planě rostoucích rostlin. Nejvíce se na opylování podílejí včely, převážně včela medonosná (*Apis mellifera*), která je nejpočetnějším a také nejuniverzálnějším opylovačem, avšak zanedbatelné nejsou ani včely samotářky. Včela je nezbytná i pro život ostatních zvířat v přírodě. Mnoho druhů ptáků se živí semeny, plody, bobulovinami, které se vyvinou, pouze pokud jsou květy opyleny. Včelařství má tedy velmi úzký vztah se životním prostředím, významně přispívá k posílení ekologické stability krajiny. Často také včely bývají jediným způsobem pro zemědělce, jak zajistit dostatečné opylení plodin, jestliže jsou další druhy opylovačů vzácné nebo zcela chybí. Proto patří včely mezi velmi důležitá hospodářská zvířata (Morse a Calderon, 2000).

Avšak navzdory hospodářskému i ekologickému významu včel je včelařství v celé Evropě v úpadku. Včely jsou napadány mnoha patogeny, např. viry, bakteriemi, houbami a parazity, kteří velmi poškozují jejich zdraví a tím se také snižuje úroveň trvale udržitelného zemědělství a množství celkové produkce. Velkým rizikem je i nepřiměřená aplikace chemických látek (pesticidy, desikanty, morforegulátory aj.) do polí, což také významně oslabuje včelstva. Před příchodem parazitického roztoče *Varroa destructor*, byla ekonomicky nejzávažnější onemocnění právě mor včelího plodu (MVP) a hniloba včelího plodu (Genersch, 2010).

Tato práce se zabývá závažným včelím onemocněním – morem včelího plodu a možnostmi kontroly této nemoci a je rozdělena na dvě části, teoretickou a experimentální. Teoretická část je zpracována formou rešerše a obsahuje 2 velké kapitoly. První pojednává o moru včelího plodu a původci onemocnění MVP, bakterii *Paenibacillus larvae*, od její klasifikace, výskytu, patogeneze až po metody tlumení a léčby onemocnění MVP. Druhá část se zabývá zavíječem voskovým (*Galleria mellonella*), převážně vývojovým cyklem, orgánovými soustavami a také proč a jak škodí ve včelařství spolu s metodami prevence a kontroly. Experimentální část poté kombinuje tyto témata ve snaze nalezení vztahu mezi zavíječem voskovým a bakterií *P. larvae*, který by mohl objasnit některé aspekty a pomoci při kontrole MVP.

Mor včelího plodu (anglicky American foulbrood) je závažné bakteriální onemocnění včelího plodu způsobené bakterií *Paenibacillus larvae*. Svůj anglický název nemá proto, že by pocházel z Ameriky, ale proto, že ho poprvé popsal americký vědec White v roce 1906 (Lindström, 2006). Mor včelího plodu není přenosný na člověka (Titěra, 2009), přesto bývá považován za nejnebezpečnější včelí onemocnění, jelikož nezabíjí pouze včelí larvy, ale je velmi nebezpečný pro celé infikované včelstvo a může zlikvidovat i celou včelnici. Jakmile je larva infikována, umírá během 3 až 12 dnů. Dospělé včely se nakazit nemohou, ale slouží jako

přenašeč. MVP se šíří velmi snadno jak mezi úly, tak i mezi lokalitami a jednotlivými státy. Nejčastější příčinou je výměna materiálů, zalétávání včel, nebo prodej oddělků a včelích produktů, které mohou být infikované touto nemocí (Ashiralieva a Genersch, 2006; von der Ohe, 2003; Morrissey a kol., 2015). V koevoluci včel a původce moru včelího plodu se jistě vyvinula přirozená schopnost obrany hostitele proti patogenům, která však může být narušena vlivem člověka. Moderní technologie včelaření již příliš neodráží přirozený život divokých včel.

Podle zákona 166/1999 Sb., o veterinární péči a o změně souvisejících zákonů (veterinární zákon) je mor včelího plodu chorobou v České republice povinnou k ohlášení příslušnému úřadu, jímž je Krajská veterinární správa (KVS), který po prokázání MVP vyhlásí ohnisko nebezpečné nákazy o poloměru 5 km a stanoví mimořádná veterinární opatření (Titěra, 2009). V závislosti na výsledku se poté případně provede likvidace včelstev a spalitelného včelařského vybavení a pomůcek, které s infikovaným včelstvem přišly do styku. Dle současné vyhlášky 299/2003 může být likvidace pouze částečná, pokud počet pozitivních včelstev na stanovišti nepřesahuje 15 % z celkového počtu. V tomto případě se utratí pouze pozitivní včelstva. Pokud je ale na stanovišti více než 15% infikovaných včelstev, dochází k likvidaci kompletní, tedy spálení všech včelstev na stanovišti. V ochranném pásmu je zákaz přemísťování včelstev a je též nařízeno plošné vyšetření měli (Krpec, 2015). Kvůli pálení infikovaných včelstev a kontaminovaného materiálu dochází ke značným ekonomickým ztrátám včelařům po celém světě (Ashiralieva a Genersch, 2006; von der Ohe, 2003; Morrissey a kol., 2015). Vzhledem k identifikaci a izolaci původce moru včelího plodu se tato nemoc stala jednou z nejvíce studovaných včelích nemocí, přesto mnohé aspekty zůstávají i nadále neobjasněné (Ashiralieva a Genersch, 2006).

Zavíječ voskový se může vyskytovat ve včelím úlu nebo na starém díle divokých včel, takže se s bakterií způsobující MVP může snadno setkat. Včelaři je považován za škůdce, protože se jeho larvy živí převážně starším včelím voskem s příměsí včelích „košilek“ a dalších „nečistot“, nebo plásty se zásobami pylu. V přírodě však zastává důležitou funkci, a to biologickou degradaci včelího vosku a navrácení živin zpátky do uzavřeného cyklu. Pokud divoké včely v přírodě uhynou, nebo změní stanoviště, např. za účelem hygienickým (ozdravným) nebo za nedostatku snůšky, což je typické zejména pro včelu východní (*Apis cerana*), zůstane po nich včelí dílo. To je velmi špatně odbouratelné a může být zdrojem různých nemocí. Zavíječ voskový tyto plásty vyhledává a klade na ně vajíčka. Z nich se poté vylihnou larvy, které se ihned začínají krmit voskem. Z tohoto pohledu mají larvy zavíječe voskového i hygienickou funkci v krajině. A zde se také nabízí otázka. Poradí si i s původcem moru včelího plodu, bakterií *P. larvae*, která se běžně vyskytuje ve včelím vosku, primární složce potravy housenky zavíječe voskového?

Cílem práce bylo zjistit, zda je zavíječ voskový díky svému dobře přizpůsobenému trávicímu traktu schopen narušit odolné vrstvy spory *P. larvae*, čímž by mohlo dojít ke změně klíčivosti těchto spor. Výzkum spočíval v naočkování bakterií *P. larvae* na mezistěny, na kterých se poté krmily larvy zavíječe voskového. Některé se pohybovaly volně, jiné byly fixované ve speciálních klíčkách, které zabraňovaly kontaminaci sporami povrchu těla larev. Po několika dnech krmení se larvám vypitvaly trávicí soustavy a následně z nich izolovaly spory toluenovou metodou. Tyto vzorky se naočkovali na MYPGP agar a nechaly 10 dní kultivovat. Nakonec ještě proběhla PCR analýza s následným vyhodnocením elektroforézou.

## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Mor včelího plodu

#### 2.1.1 Obecná charakteristika včelstva

Včely jsou eusociální hmyz, to znamená, že žijí v koloniích s překrývajícími se generacemi a mají rozdělené povinnosti v úlu, většinou podle stáří včely. Některé z těchto povinností mají velký vliv na přenos onemocnění, jako je například MVP. Nejmladší včely po vylíhnutí čistí buňky a poté krmí larvy a matku. Tyto činnosti jsou nejrizikovější ohledně šíření MVP ve včelstvu, protože pokud včela vyčistí buňku po infikované larvě, ulpí na ni velké množství spor a krmením dalších larviček je snadno infikuje. Starší včely stavějí voskové pláсты, ventilací vzduchu udržují vhodnou teplotu v úlu, přenáší a zahušťují medné zásoby, stráží česno a po dvacátém dni života se stávají létavkami a sbírají pyl, nektar, medovici, pryskyřičnaté látky a vodu. Na konci léta, kdy už dochází k nedostatku snůšky, pátrají včely po oslabených včelstvech, které si své zásoby nedokáží ochránit. Oslabené včelstvo může být infikováno MVP, a silné loupící včelstvo si tak spolu s veškerými mednými zásobami odnese i spory původce onemocnění MVP. A právě loupění může být jednou z hlavních cest horizontálního přenosu MVP v přírodních podmínkách (Lindström, 2006).

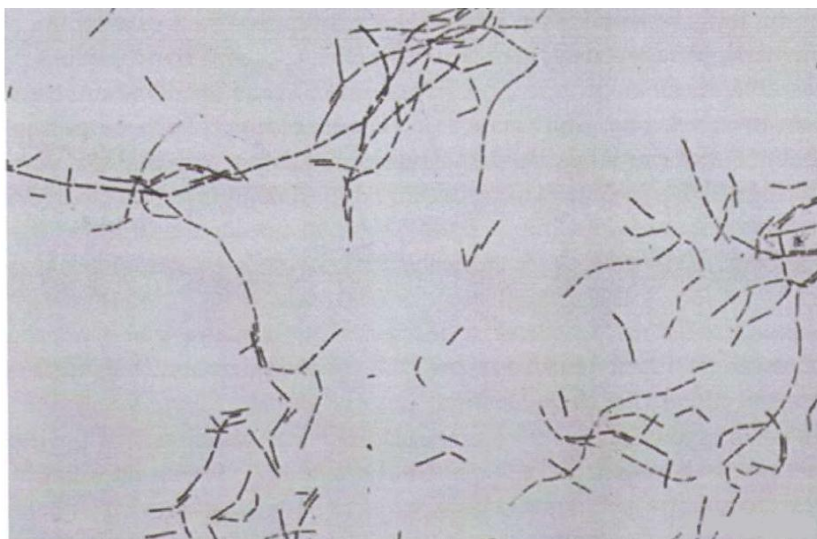
Všechny tyto činnosti vykonávají pouze včely dělnice, které mají na rozdíl od matky nevyvinuté pohlavní ústrojí. Matka je ve včelstvu obvykle jen jedna a její hlavní úloha je kladení vajíček. Páří se pouze jedenkrát za život s několika trubci, aby si vytvořila dostatečné zásoby spermatu na oplodňování vajíček. Pomocí feromonu, tzv. mateří látky, se stará mimo jiné o soudržnost včelstva a inhibuje vývin vaječnicků včel dělnic. Dále jsou v úlu trubci. Žijí pouze v letním období, na podzim jsou vyhnáni z úlu. Trubci mají oplodňovací funkci a spolu s matkou jsou zodpovědní za reprodukci včelstva. Z jiného úhlu pohledu se může včelstvo množit (rozdělit) také rojením. V tomto případě se v úlu vylíhne mladá matka a ta stará odlétne s částí včelstva založit jinou kolonii. To je velmi důležité pro přežití včelstva, pokud dojde např. k různým onemocněním nebo hladověním v případě nedostatku snůšky (Lindström, 2006).

Včelstvo bývá označováno jako superorganismus, protože selektivní tlak je vyvíjen na celou kolonii, nikoliv na jednotlivé včely. Jednotlivé včely dělnice jsou stejně postradatelné jako např. buňky v organismu. Z tohoto pohledu je rojení považováno za jediný způsob rozmnožování. A právě takto musíme nahlížet na včelstvo i při onemocnění MVP. Nelze vybrat jednotlivé včely nebo larvy, které se zdají být zdravé, ale zacházíme s včelstvem jako s jedním celkem. I včelstvo samotné se dokáže přizpůsobit nečekaným okolnostem, např. přerozdělením povinností včel, pokud některá věková kategorie chybí, nebo zvýšením hygienického a čistícího pudu při prvních náznacích onemocnění (Lindström, 2006).

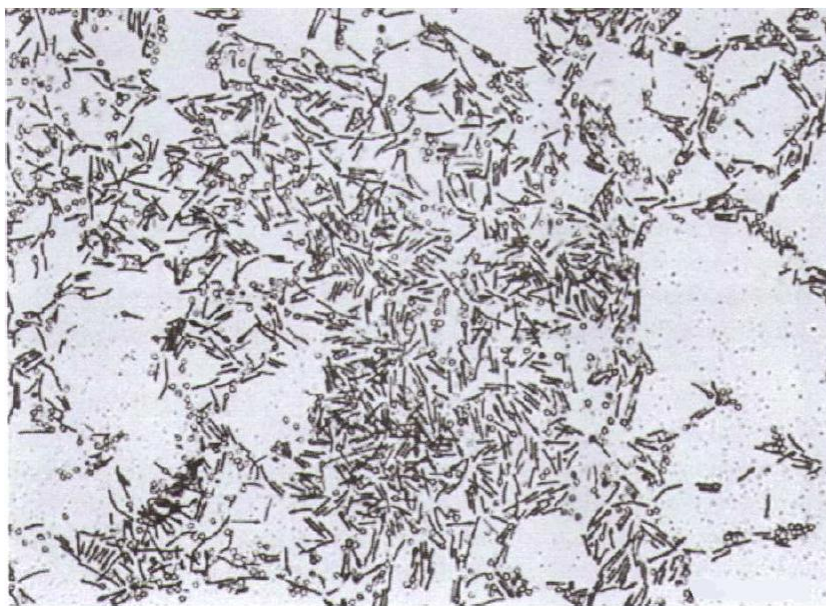
### 2.1.2 Původce moru včelího plodu, historie a klasifikace

Bakterie způsobující mor včelího plodu se nazývá *Paenibacillus larvae* a byla poprvé popsána Whitem (1906). Jedná se o tyčinkovitou gram pozitivní a fakultativně anaerobní bakterii (viz obr. č. 1), dosahující délky 2,5-5  $\mu\text{m}$ . Bakterie za nepříznivých podmínek vytváří spory (viz obr. č. 2) o velikosti 0,6-1,3  $\mu\text{m}$ . Tyto extrémně odolné spory, které mohou na lokalitě přežít i více než 35 let, jsou jedinou infekční formou tohoto organismu, a jak už název onemocnění napovídá, mohou infikovat pouze včelí plod (Hansen a Brødsgaard, 1999; Hitchcock a kol., 1979; Neuendorf a kol., 2004). Spora je vybavena silným mnohvrstevným obalem, který zárodku uvnitř umožňuje přežít sucho i vlhko, zimu i horko, sluneční záření i většinu dezinfekčních prostředků. Ideálním materiálem pro vyčkávání na hostitele je dřevo. Spory bakterie *P. larvae* jsou menší než póry ve dřevě, a proto se v nich snadno ukryjí. Jak dřevo vlhne a opět vysychá, spory se dostávají hlouběji a dochází k jejich dlouholeté konzervaci. Pokud toto dřevo začne trouchnivět, spory se začínají dostávat opět na povrch a mohou přijít do kontaktu se včelami. Tomu pomáhá i přirozená vlastnost včel, okousávat dřevěné části uvnitř úlu. Těmito způsoby se obnovují stará ohniska nákazy, kde se již předpokládalo, že jsou prostá MVP (Titěra, 2009). Larvy jsou nejvíce náchylné v raném stadiu asi 12-36 hodin po vylíhnutí, kdy se mohou infikovat stravou obsahující i malé množství spor *P. larvae* (Genersch a kol., 2005; Bailey, 1981). Titěra (2009) udává množství přibližně 10 spor, které je již schopno nakazit nejmladší larvy. Dospělé včely se nakazit nemohou (Genersch a kol., 2005; Bailey, 1981).

Obr. č. 1 Vegetativní stadia *P. larvae* (Titěra, 2009)



Obr. č. 2 Sporangia a spory *P. larvae* (Titěra, 2009)



Nejstarší zpráva o moru včelího plodu sahá až do období Aristotela kolem roku 384-322 př. n. l. V roce 1769 popsal saský přírodovědec Schirach onemocnění včel, vyznačující se specifickým zápachem a pojmenoval ho American foulbrood (AFB), česky - mor včelího plodu. V roce 1885 byla příčina moru včelího plodu připisována bakterii *Bacillus alvei*, ovšem v roce 1906 vyšlo najevo, že se jedná ve skutečnosti o 2 odlišné bakterie a onemocnění. První choroba známá jako hniloba včelího plodu (EFB – European foulbrood) je mírnější a způsobuje ji bakterie *Melissococcus plutonius* často spolu s *Bacillus alvei*. Druhá choroba, neléčitelná a velmi nebezpečná je mor včelího plodu způsobená bakterií *Paenibacillus larvae* (Ashiralieva a Genersch, 2006; Genersch, 2010; Hansen a Brødsgaard, 1999). V roce 1950 Katznelson identifikoval podobné bakteriální onemocnění včel, které se od moru včelího plodu lišilo tvrdšími pozůstatky po larvách. Původce tohoto onemocnění byla bakterie velmi podobná *Paenibacillus larvae*, ale přes některé rozdíly byla považována za jiný druh, a to *Paenibacillus pulvifaciens*. Tento původce je velmi vzácný. Existují také protichůdné názory o jeho patogenitě, i když byla potvrzena Hitchcockem a kol. (1979). Přesto je *Paenibacillus pulvifaciens* považován za patogen zřídka způsobující viditelné poškození včelích larev (Ashiralieva a Genersch, 2006; Genersch, 2010; Hansen a Brødsgaard, 1999).

S příchodem molekulárně genetických metod se velmi usnadnilo zařazování druhů a díky sekvenaci genomu se našlo minimálně 5 rozdílných fylogenetických linií původce moru včelího plodu podle přítomnosti určitých genů (Ash a kol. 1991). Bakterie *Bacillus larvae* a *Bacillus pulvifaciens* byly natolik odlišné od ostatních, že



vznikl v roce 1993 zcela nový rod *Paenibacillus* a tyto bakterie do něj byly přearány (Ash a kol. 1993).

V roce 1996 byly tyto druhy znova přezkoumány a zejména ve vzorcích DNA byla podobnost opravdu velká a tak byla snaha přeřadit tyto druhy pod jeden společný. Na fenotypové úrovni a v patogenitě se však ukázaly drobné odchylky, a proto systematické zařazení zůstalo ještě stejné (Heyndrickx a kol. 1996). Nakonec v důsledku nejnovějších studií z různých sbírek a kmenů z Německa, Finska a Švédska došlo k taxonomické revizi této skupiny a *P. larvae* a *P. pulvificiens* byly klasifikovány jako jeden druh - *P. larvae*. V několika následných pokusech se však zjistilo, že bývalý druh *P. pulvificiens* má odlišný průběh infekce i jinou inkubační dobu a posléze v tentýž rok byly vytvořeny poddruhy *P. larvae* subs. *larvae* a *P. larvae* subs. *pulvificiens*. (Genersch a kol. 2006; Heyndrickx a kol. 1996; Hansen a Brødsgaard, 1999).

K zatím poslednímu překlasifikování původce moru včelího plodu došlo v roce 2006 zkoumáním genotypů prováděným pomocí ERIC (Enterobacterial repetitive intergenic consensus) primerů v rep-PCR (polymerázová řetězová reakce). Tato reakce byla založená na sekvenci konkrétních 127 dusíkatých bází v genetické informaci, podle které se určují jednotlivé poddruhy. Tentokrát se ustoupilo od používání dvou poddruhů a došlo k sloučení v jednu taxonomickou jednotku *Paenibacillus larvae*. Tato studie ukázala, že každý bývalý poddruh *P. larvae* může mít 2 rozdílné genotypy (viz tab. č. 1), výsledkem jsou tedy 4 celkové genotypy (ERIC I – IV). Experimentální infekce včelích larev *P. larvae* a *P. pulvificiens* ukázaly příznaky onemocnění a následnou smrt larev (viz tab. č. 1). Z toho je patrné, že oba poddruhy jsou patogenní. Z tabulky je také zřejmé, že genotyp ERIC I je méně virulentní (měřitelná schopnost vyvolat onemocnění) než ERIC II- IV (Ashiraliyeva a Genersch, 2006; Genersch, 2010; Morrissey a kol., 2015; Poppinga a Genersch, 2015). Za klasický genotyp způsobující většinu ohnisek po celém světě je považován nepigmentovaný ERIC I. Kmen ERIC II se více vyskytuje v Německu a Rakousku, odkud bylo jasně prokázáno odstraňování příškvarů před zavíčkovaním, což je pro něj typické (Genersch a kol., 2005; Genersch, 2010).

Tab. č. 1 ERIC genotypy *Paenibacillus larvae* (Ashiraliyeva a Genersch, 2006; Genersch, 2010)

<i>Paenibacillus larvae</i>				
Genotyp	ERIC I	ERIC II	ERIC III	ERIC IV
Morfologie kolonií	našedlá	oranžová	oranžová	našedlá
Poddruh	<i>P. l. larvae</i>	<i>P. l. larvae</i>	<i>P. l. pulvificiens</i>	<i>P. l. pulvificiens</i>
Způsobují onemocnění larev	ano	ano	ano	ano
LT <sub>100</sub>	12 d	7 d	7 d	7 d

Morrissey a kol. (2015) však uvádí, že PCR metoda má i své nevýhody, např. není dobře možné porovnávat výsledky mezi laboratořemi kvůli obtížnému opakování a standardizaci a doporučuje používat novou metodu MLST (multilocus sequence typing) pro lepší rozpoznání kmene *P. larvae*. Tato metoda je založená na sekvenování 7 genů, které kódují hlavní metabolické dráhy. Vzhledem k tomu, že tato metoda sekvenuje přímo DNA, mohou být výsledky snadno porovnávány v různých laboratořích, na rozdíl od jiných metod, které určují fenotyp.

### 2.1.3 Taxonomické zařazení *P. larvae* (Sedláček, 2007)

Doména: *Bacteria*

Kmen: *Firmicutes*

Třída: *Bacilli*

Řád: *Bacillales*

Čeleď: *Paenibacillaceae*

Rod: *Paenibacillus*

### 2.1.4 Rozšíření

MVP je rozšířen téměř po celém světě s výjimkou subsaharské Afriky a Indického subkontinentu. V jižní Americe byl poprvé MVP nalezen v roce 1980 v Argentinském medu a v roce 1989 se našlo první ohnisko této nemoci na území Argentiny. V Evropě je MVP postiženo průměrně 3-10% včelstev, v některých oblastech i více. V bývalém Československu byl zaznamenán první výskyt moru včelího plodu v roce 1939 a přítomnost podobného onemocnění způsobeného *P. pulvifaciens* byla zjištěna v roce 1984 (Hansen a Brødsgaard, 1999).

### 2.1.5 Patogeneze

Larvy včely medonosné jsou nejvíce náchylné v raném stadiu asi 12-36 hodin po vylíhnutí, kdy se mohou infikovat stravou obsahující i malé množství spor *P. larvae*. Titěra (2009) udává množství přibližně 10 spor, které jsou již schopny nakazit nejmladší larvy. Po této době získávají včelí larvy stále větší odolnost, jejíž úroveň je dána mimo jiné geneticky a dospělé včely se již nakazit nemohou. Spory však v nich mohou přetrvávat až do konce života a z takovéto včely se stává přenašeč *P. larvae* (Genersch a kol., 2005; Hansen a Brødsgaard, 1999; Poppinga a Genersch, 2015; Bailey, 1981). Uvnitř larvy spory *P. larvae* snadno přejdou přes přední střevo a po 12 hodinách začnou klíčit a přemění se na aktivní vegetativní formu v středním střevu. Vegetativní bakterie osidlují střední střevo a začínají se rychle množit bez toho, aby viditelně poškozovaly tkáň. V této části infekce zřejmě nastává komensalismus a bakterie se živí přijímanou potravou larvy. Obsahují totiž enzymy, které se podílí na metabolismu sacharidů. Tímto způsobem *P. larvae* dokáže využívat některé cukry (glukózu a fruktózu) a podpořit tak svůj růst. Infikované larvě pomáhá peritrofická membrána udržet bakterie ve střevě, nicméně ty se přes ni

nakonec dokáží dostat. Bakterie ovšem vyčkávají, dokud se nenamnoží a zaplní velkou část střeva (Genersch, 2010; Hansen a Brødsgaard, 1999; Morrissey a kol., 2015; Neuendorf a kol., 2004; Poppinga a Genersch, 2015; Yue a kol., 2008). Vzhledem k tomu, že vegetativní forma bakterie je na rozdíl od spory schopna pohybu, mohl by být výrazným faktorem k průniku bakterií do hemolymfy právě jejich pohyb, způsobující mechanické rozrušení tkáně (Salyers a Whitt, 2002). Tento způsob jako samotný se ale zdá jako nepravděpodobný a určitě se bude jednat o souhru několika různých faktorů. Bakterie *P. larvae* se také vyznačují sekrecí vysoce aktivních extracelulárních proteáz (např. enzym chitináza) během růstu a infekce, které pomáhají rozrušit membrány a proniknout do hemolymfy. Tyto proteázy jsou také potřebné pro rozklad zbytků po larvě a přeměnu na polotekutou, nahnědlou a lepidlu podobnou hmotu, která se po uschnutí mění na tzv. příškvár, typický právě pro mor včelího plodu. Vegetativní forma *P. larvae* v rozkládajícím se včelím plodu sporuluje, což umožňuje této bakterii uniknout z uhynulého těla larvy a šířit se dále. To je z hlediska rozmnožování této bakterie velice podstatné, protože vegetativní forma není schopna napadnout další plod ani vyvolat infekci (Genersch, 2010; Hansen a Brødsgaard, 1999; Morrissey a kol., 2015; Neuendorf a kol., 2004; Poppinga a Genersch, 2015; Yue a kol., 2008). S postupující nákazou se rodí méně a méně mladušek a včelstvo slábne, až uhynie. K úhynu včelstva dochází často v zimě, kdy je ve včelstvu minimum plodu nebo žádný (Titěra 2009).

Sporulace nastává tehdy, pokud již rozkládající se larva neobsahuje dostatek živin pro bakterie. Průměrný počet spor v uhynulé larvě je přibližně  $2,5 \times 10^9$ . Spory *P. larvae* mohou přežít v půdě, ve vosku, v dřevě úlu nebo přisušcích po larvách po mnoho let. V pokusech bylo nejvíce zaznamenáno 35 let, ale je velice pravděpodobné, že spory mohou přežít mnohem déle. Jsou také velmi odolné vůči teplotě (viz tab. č. 2), přičemž různé kmeny mohou mít různou odolnost. Z toho důvodu spálení infikovaného úlu často nezničí všechny spory, ale sníží jejich počet na minimum. Toto velmi malé množství spor již není schopné vyvolat onemocnění. Avšak kvůli těmto vlastnostem a obrovskému množství spor je efektivní kontrola moru včelího plodu velmi složitá a problematická (Genersch, 2010; Hansen a Brødsgaard, 1999; Morrissey a kol., 2015; Neuendorf a kol., 2004; Poppinga a Genersch, 2015; Yue a kol., 2008).

Tab. č. 2 Teplota a čas působení nutný k likvidaci spor v různých mediích (Hansen a Brødsgaard, 1999)

<b>Materiál</b>	<b>Fáze bakterie</b>	<b>Teplota (°C)</b>	<b>Čas (min)</b>
Včelí plod	vegetativní	60	15
Voda	spory	100	30
Vosk	spory	121	30
Med	spory	100	160
	spory	110	41
	spory	121	8,6

### 2.1.6 Metabolity *P. larvae*

Během posledních desetiletí přitahoval *P. larvae* velkou pozornost a pomocí sekvenace genomu bylo dosaženo významného pokroku v objasnění jeho biologie a patogeneze, ale mnohé informace o virulenci a patogenitě na molekulární úrovni jsou stále nejasné. Tyto údaje jsou důležité k dalšímu pochopení tohoto patogenu a jsou prvním krokem do molekulární éry MVP (Ashiralieva a kol., 2008; Fünfhaus a kol., 2009; Fünfhaus a Genersch, 2008; Pentikäinen a kol., 2009; Genersch, 2010). Většina bakteriálních patogenů je charakterizována určitou třídou specifických ostrůvků (PAI) v DNA, které nesou jeden nebo více virulentních genů. Tyto ostrůvky v DNA však chybí nepatogenním členům stejného nebo blízkého příbuzného druhu. Charakteristickým prvkem PAI je procentuální zastoupení cytosinu (C) a guaninu (G) lišící se od jádra genomu. Toho se často využívá k identifikaci nového PAI (Schmidt a Hensel, 2004). U *P. larvae* však molekulárně genetické metody dosud neodhalily oblasti, které by se lišily obsahem G + C, což naznačuje, že tento patogen postrádá PAI (Heyndrickx a kol., 1996). Většina patogenů s chybějícím PAI je přizpůsobena pouze na svého hostitele a ztratila schopnost replikovat se mimo něj v přírodním prostředí. Naopak bakterie s PAI jsou velmi flexibilní a mohou žít na různých částech hostitele nebo i mimo něj. Z toho vyplývá, že *P. larvae* je velmi specializovaná bakterie (Schmidt a Hensel, 2004). Za použití komparativní genomiky se zjistila přítomnost velkých genových klastrů kódujících syntézu polyketidů (PKS) a neribozomálních peptidů (NRPS) a dále přítomnost některých genů kódujících toxiny. Zatímco toxiny jsou obvyklé spíše pro patogeny, velké genové klastry nikoliv. PKS/NRPS jsou velké neribozomální enzymy, produkující různorodé peptidy s antimikrobiální, fungicidní a proti parazitní funkcí. PKS a NRPS jsou kódovány ve velkých genových klastrech, jejichž délka je od 5 do více než 25 kb. Syntéza těchto obřích proteinů je velmi náročná z hlediska energie, času, substrátu a proto zisk konečného produktu (antibiotik) musí být podstatný. Tato silná antibiotika jsou zřejmě potřebná proti antagonistickým bakteriím ve střevech včelího plodu. Tvorbu antibiotik dokazují i kultivace pouze čistých kolonií *P. larvae* z rozkládajících se zbytků potravy larev včel (Evans a Armstrong, 2005; Evans a Armstrong, 2006).

Pro *P. larvae* jsou velmi důležité metabolity s antimikrobiální aktivitou, díky kterým dokáží osídlit celé střevo hostitele téměř bez konkurence. Další velmi významnou skupinou metabolitů jsou látky s cytotoxickou aktivitou. Tyto metabolity pomáhají bakteriím prolomit epitelovou bariéru ve střevě a dostat se do celého těla larev včely medonosné (Poppinga a Genersch, 2015).

U zástupců *P. larvae* ERIC II kmene byl nalezen gen kódující tripeptid sevadicin. Tento metabolit je produkován během vegetativního růstu bakterie, ale jelikož vykazuje pouze nižší antimikrobiální aktivitu, lze předpokládat, že se pravděpodobně nechová jako antibiotikum při patogenezi (Garcia-Gonzales a kol., 2014 A). Také byl nalezen shluk genů, zodpovědných za produkci iturinu, což je

lipopeptid vykazující silné antifungicidní účinky. Jejich úloha je pravděpodobně v likvidaci plísní během vegetativního růstu bakterie (Sood a kol., 2014). Jiný NRPS/PKS genový klastr kóduje aparát pro paenilamiciny (PAM). To jsou složité látky peptidové povahy s širokou antimikrobiální a antifungicidní aktivitou (Garcia-Gonzales a kol., 2014 B; Poppinga a Genersch, 2015; Müller a kol., 2014). Další objasněný genový klastr se nachází v obou genotypech *P. larvae* (ERIC I a II). Jedná se o genetický úsek zodpovědný za produkci látky catechol-type siderophore bacillibactin (Dhb). Tato látka se tvoří při nedostatku železa a za těchto podmínek významně pomáhá konkurovat *P. larvae* ostatním bakteriím (Hertlein a kol., 2014; Poppinga a Genersch, 2015). Klíčovou roli během patogeneze má enzym PICBP49, který rozkládá peritrofickou membránu v zažívacím traktu larvy včely medonosné. Pokud je narušen gen, způsobující produkci tohoto enzymu, ztrácí *P. larvae* svou virulenci a nedokáže se přes peritrofickou membránu dostat. Pokud ale tento gen mají, naruší peritrofickou membránu a dostávají se dále k epitelovým buňkám. V této fázi se pak uplatňují toxiny, které narušují přilehlé hostitelské buňky. (Poppinga a Genersch, 2015; Garcia-Gonzalez 2013, 2014 C).

### 2.1.7 Virulence *P. larvae* a odolnost včelstva

Virulence (měřitelná schopnost vyvolat onemocnění) patogenů se hodnotí podle LD50 (dávka látky, která způsobí úhyn 50% testovaných živočichů), LC50 (koncentrace látky, která způsobí úhyn 50% živočichů) a LT50 (časový interval mezi podáním látky a úhynem 50% objektů). Ačkoliv je *P. larvae* schopen zabít všechna včelstva na stanovišti, některé kolonie nejen že dokáží přežít, ale ani se u nich neprojeví viditelné příznaky onemocnění (Hansen a Brødsgaard, 1999). Tyto rozdíly se přisuzovaly různé toleranci včel na toto onemocnění a úrovně hygienického chování. Záleží ale také na virulenci patogenního kmene *P. larvae*. Vysoce virulentní kmeny usmrtily 50% larev s méně než 100 CFU/ml (jednotky tvořící kolonie), zatímco jiné kmeny stejného výsledku dosáhly s 800 CFU/ml (Hoage a Rothenbuhler, 1966). Z tohoto důvodu je těžké předvídat klinické příznaky podle množství spor v infikované kolonii. Další problémy s detekcí *P. larvae* mohou nastat při rychlejším průběhu nemoci, způsobeném zejména genotypem ERIC II, kdy larvy umírají ještě před zavíčováním buňky a včely tyto buňky vyčistí (až 90% odstraněných příškvavů oproti pomalejšímu průběhu ERIC I, kde je to přibližně 60%). Proto čím více larev zemře až po zavíčování, tím více bude klinických příznaků onemocnění v kolonii. Na druhou stranu odstranění příškvavů z buněk před zavíčováním efektivně narušuje produkci spor a šíření onemocnění v úlu, čímž zpomaluje a oddaluje celkový kolaps včelstva (Genersch a kol., 2005; Genersch, 2010). Paradoxně tedy nejvíce virulentní kmeny na úrovni jedince ve skutečnosti mohou být méně virulentní na úrovni včelstva (Lindström, 2006). „Z dlouhodobých sledování včelstev s nepatrným nálezem zárodků moru vyplývá, že včelstva se sama bacilů nezbaví, ale dokud je jich málo, nákaza nepropukne. Je to časovaná bomba, mor čeká na příležitost, kdy včelstvo bude oslabeno“ (Titěra, 2009).

Některé studie uvádějí, že i kolonie bez klinických příznaků mohou přechovávat med kontaminovaný spory *P. larvae*. S tím souvisí i fakt, že neexistuje jednoduchý vztah mezi počtem spor v medu a prvními viditelnými příznaky onemocnění. Počet spor nutných k propuknutí MVP ve včelstvu byl zjišťován krmáním sladkou vodou infikovanou spory *P. larvae*. Hansen a Brødsgaard (1999) zjistili, že množství  $2 \times 10^9$  spor může způsobit klinické příznaky. L'Arrivée (1958) udává počet stejnou metodou  $5 \times 10^8$  a Sturtevant (1932) dokonce  $5 \times 10^7$ . Titěra (2009) ve své práci zmiňuje, že už při množství  $10^3$  se mohou objevit klinické příznaky a při množství  $10^4$  tyto příznaky zpravidla již bývají přítomny (viz tabulka č. 3).

Tab. č. 3 Množství spor schopné vyvolat klinické příznaky onemocnění MVP (Titěra, 2009)

Množství spor	Množství spor	Klinické příznaky
$<10^2$	Žádné, případně méně než sto	nejsou
$10^2$	stovky	nejsou
$10^3$	tisíce	mohou se objevit v budoucnu
$10^4$	desetitisíce	zpravidla bývají
$10^5$	statisíce	zpravidla bývají
$10^6$	milióny	zpravidla bývají

Tyto rozdíly mohou být způsobeny různou odolností a silou jednotlivých včelstev, dále pak podílem dospělých včel k plodu, geografickou polohou, počasím, množstvím a složením pylu a nektaru nebo virulencí kmene *Paenibacillus larvae* (Hansen a Brødsgaard, 1999). Velký význam na celkovém stavu a odolnosti včel má i napadení jinými nemocemi, viry, nebo parazity. Nejvýznamnější je přítomnost roztoče *Varroa destructor* (kleštík včelí), který způsobuje onemocnění varroázu a tím významně oslabuje včelstva. Z tohoto důvodu je vhodné chovat včelstva s vyšší odolností k tomuto roztoči a samozřejmě by měla být správná péče o tyto včelstva a také prevence. K výraznějšímu pokroku tímto směrem by mohl přispět i stát vhodnou podporou (Neuendorf a kol., 2004).

Vypuknutí MVP není závislé jen na počtu spor, ale také na stupni rezistence jednotlivých včelstev. Včelstvo má určitou přirozenou imunitu. To znamená, že pokud je jinak zdravé, menší počet spor *P. larvae* propuknutí nákazy nezpůsobí. S nákazou v okolí přijdou do styku zejména včely „létavky“, které se přímo nestýkají s mladým plodem a bakterie se tak nemohou množit. Pokud se ale bakterie dostanou ve větším počtu do zásob, mohou je kojičky přenést na plod. Pak je důležitá úroveň hygienického chování a čistícího pudu. Pokud je vysoká, včely stíhají odklízet nakažený plod ještě před sporulací a k většímu množení bakterií nedochází. Se snižující se schopností včas odstraňovat infikovaný plod se bakterie více a více

množí, až čistící aktivita včelstva nestačí a nemoc propukne naplno (Titěra, 2009). „Za hygienické chování jsou zodpovědné dva recesivní geny. Jeden na odvíčkování postižených buněk a druhý na odstranění infikovaného plodu. Včely s těmito geny jsou schopny se vypořádat s velkým počtem spor bez klinických příznaků. Frekvence těchto genů je v populaci kolem dvaceti procent, je však možné je podstatně zvýšit selekcí“ (Kovařík, 2016).

Tolerantní včelstva za normálních podmínek zvládají množství i  $2-5 \times 10^5$  spor na gram medu (Hansen a Brødsgaard, 1999; Bailey, 1981). Za dvě nejrizikovější skupiny se považují včely středního věku, které jsou ve styku s plodem, detekují nakažený plod a poté ho likvidují a čistí buňky. Druhou skupinou jsou zimní dlouhověké včely, které mají jen omezenou možnost k proletům a vyprázdnění se (Riessberger-Galle' a kol., 2001). Různé včelí kasty mají také různou odolnost. Tak například larvy budoucí včelí matky jsou nejnáchylnější, protože jsou jen minimálně krmeny pylem. Dělnice jsou na tom již lépe a nejvyšší odolností se vyznačují trubci, kteří jsou krmeni převážně pylem. Pyl totiž představuje základní bílkovinou složku potravy včel a přímo souvisí se záležitostmi kolem imunity. Dále obsahuje některé mikroorganismy, které působí antagonisticky proti bakterii *P. larvae* a jsou schopny inhibovat klíčení spor. Velmi užitečnou inhibiční látkou je také mateří kašička. Další důležitý faktor je rozpoznání a odstranění této patogenní bakterie včelou dříve, než sporuluje (Hansen a Brødsgaard, 1999; Bailey, 1981).

Odolnost včelstva také prokazatelně snižuje stres. Stres se dostaví, když ve včelstvu chybí matka, nebo naopak pokud na včelstvo působí příliš velká koncentrace feromonů z převčeleného stanoviště. Dalším stresovým faktorem je kočování. Včelstva mají více práce s aklimatizací a orientací nebo přicházejí o část včel, které se ztratí. V neposlední řadě ke stresu včel přispívají nečistoty ze životního prostředí a velká chemická zátěž (Titěra, 2009).

Vznik onemocnění je tedy souhrou tří základních faktorů. Schopnost daného kmene *P. larvae* vyvolat onemocnění, stavu a odolnosti včelstva - individuální rezistence larviček vůči infekci, čistící pud včelstva a třetím faktorem je prostředí - dostupnost zdrojů pylové snůšky, infekční tlak (Hrabák, 2014).

Výzkum MVP na Novém Zélandu odhalil tzv. třetinový scénář průběhu moru včelího plodu. „Na jeho počátku výzkumníci infikovali maximálně pět buněk vysokou koncentrací spor. U jedné třetiny z infikovaných včelstev došlo k exponenciálnímu růstu. Patnáctý den po naočkování se počet infikovaných buněk rozšířil na nezvladatelnou mez a včelstvo šlo k zániku. U druhé třetiny včelstev se přechodně zvýšil počet infikovaných buněk o jednotky, po padesáti dnech příznaky vymizely a do čtyř let se nevyskytly. U poslední třetiny příznaky úplně zmizely na tři týdny, poté se ovšem znovu objevily a včelstvo šlo k zániku“. Kvůli poslednímu scénáři není doporučována léčebná metoda přemetení včelstva na mezistěny (Kovařík, 2016).

### 2.1.8 Přenos infekce

Moru včelího plodu si včelař všimne většinou pozdě, když už jsou patrné příznaky. V tu dobu je již MVP značně rozšířen po celém stanovišti. Přírozené šíření *Paenibacillus larvae* je ztíženo především odstraňováním spor z oběhu dospělými včelami a také proto, že nejvíce náchylné jsou pouze mladé larvy. Přesto se MVP šíří velmi snadno především z kontaminovaného medu, pylu, vosku a plástů, včelařského vybavení nebo infikovaného úlu. Z toho vyplývá, že nejlepším rozšiřovatelem infekce je člověk, který vyměňuje (kontaminované) rámkové mezi jednotlivými včelstvy na včelnici nebo obchoduje s oddělky, včelstvy, nebo včelími produkty a tím účinně rozšiřuje onemocnění (Hansen a Brødsgaard, 1999; Ondruš, 2013). Med obsahující spory *P. larvae* lze konzumovat, protože mor včelího plodu není přenosný na člověka, ale je velmi nebezpečný pro včelstvo, pokud bychom ho dávali do úlu pro účel doplnění zásob na zimu (Titěra, 2009). V roce 2010 však Rieg a kol. (2010) zveřejnili svůj článek v časopisu *Emerging Infectious Diseases*, ve kterém informuje o nálezu bakterie *Paenibacillus larvae* v krvi pěti pacientů. Všechny pět pacientů byli uživatelé drog na substituční léčbě metadonem, který byl pravděpodobně infikovaný *P. larvae*. Pacienti vykazovali příznaky infekce krevního řečiště. U 2 pacientů vymizely příznaky samovolně a u 3 došlo k léčbě antibiotiky. Všichni pacienti infekci přiznali. Jedná se o velmi neobvyklou nákazu a pravděpodobně se může vyskytnout pouze u jedinců s oslabenou imunitou nebo jedinců vnímavých. Bakterie rodu *Bacillus* a *Paenibacillus* nejsou pro člověka většinou patogenní. Výjimku tvoří *Bacillus anthracis* a *Bacillus cereus*. Z druhů *Paenibacillus* byly popsány případy infekcí u lidí druhu *Paenibacillus thiaminolyticus*, *Paenibacillus polymyxa* a rovněž mikrob izolovaný ze včel – *Paenibacillus alvei*, který způsobuje především infekci kloubních náhrad (Hrabák, 2012).

Z mezistěn by se nákaza MVP šířit neměla, protože všechny schválené výroby v České republice jsou pod veterinárním dohledem. Velmi častou příčinou náhlého objevení se infekce je použití starých včelařských pomůcek, často z pozůstatosti, které původní majitel odložil stranou např. při likvidaci morového ohniska, a poté se na včelařské vybavení zapomnělo, nebo celý dům koupil jiný majitel i se vším zapomenutým včelařským nářadím ukrytým na půdě. Titěra (2009) varuje také před nebezpečím, které mohou představovat volně žijící včelstva, zpravidla roje, které uletěly některému včelaři. Hornitzky a kol. (1996) však ve svém výzkumu zjistili, že u divokých včel se MVP téměř nevyskytuje. To potvrzuje i Goodwin a kol. (1994) ve své studii, kterou testoval medné zásoby divoce žijících včel. Ze 109 vzorků objevil spory pouze v 7, což představuje minimální infekční tlak v porovnání s chovanými včelstvy. Nákazu mohou také rozšiřovat roztoči a škůdci (Krpec, 2015).

Další způsob přenosu je loupání infikovaných včelích zásob jiným včelstvem. Včely dělnice rozpoznají nakažený plod a tyto buňky vyčistí. Tím se také infikují a přenášejí onemocnění po celém úlu. V nakaženém včelstvu se rodí stále méně mladušek a včelstvo slábne. Na podzim, když je málo zdrojů nektaru, se tato včelstva



stávají snadným cílem pro silnější včelstva, která je vyloupí. Takto se MVP v naší lokálně převčelené krajině snadno šíří dál. Zalétávání a loupění včelstev lze výrazně omezit, např. správnou technikou chovu, ponecháváním dostatku zásob po medobraní, chovem pouze silných včelstev atd. Pro lepší orientaci před úlem je vhodné umístit po bocích keře, stromy nebo nějaké jiné předměty, podle kterých se mohou včely lépe orientovat (Hansen a Brødsgaard, 1999; Ondruš, 2013).

#### 2.1.8.1 Horizontální a vertikální šíření onemocnění

Patogeny, které jsou závislé svou reprodukcí a přežitím na hostiteli musí být schopné přenosu na jiného hostitele během svého života. Během infekce se patogen reprodukuje a tím různou měrou snižuje svému hostiteli fitness. Tato míra je závislá na virulenci patogenu a odolnosti včelstva. V zájmu těchto patogenů proto není vhodné zabít hostitele co nejdříve, ale ve vhodnou dobu, kdy bude mít dobré podmínky pro další rozšíření. Při vertikálním přenosu, tj. přenos patogenů z jedné generace na druhou, bude patogen vyvíjet méně virulentní formy. Tím si zajistí lepší reprodukci hostitelů a své snadnější přežití i šíření. Oproti tomu patogen s horizontálním přenosem (přenos mezi jedinci uvnitř populace) není závislý na reprodukci hostitele a může vytvářet více virulentní formy (Ashiralieva a Genersch, 2006; von der Ohe, 2003; Morrissey a kol., 2015). MVP bylo doposud považováno za vysoce nakažlivé onemocnění, které se šíří pouze horizontálním způsobem. Byly ale také nalezeny kolonie, které i po propuknutí onemocnění zůstávaly silné a nejevily žádné klinické příznaky nemoci, což je typické právě pro vertikální přenos. Nedávné studie ukázaly, že MVP může být šířen jak horizontálně, např. loupěním slabých, infikovaných kolonií, tak i vertikálně a to zejména rojením včelstev. Tyto rozdílné způsoby postupu infekce mohou souviset s různými genotypy *P. larvae* (ERIC I-II). Jedna otázka je ovšem stále nevyřešena. Jedná se opravdu o vertikální přenos, nebo jde o možnou cestu léčení rojením? Roj totiž odlétá z úlu pouze s matkou a dělnicemi, tzn. bez infikovaného plodu. Včely sice přenášejí spory, ale na druhou stranu by měly být schopné se jich zbavit ještě před tím, než vznikne nový plod. Tyto studie prokázaly, že ve včelstev s méně než 20 CFU, u kterých ještě nebyly viditelné příznaky infekce, se množství spor významně snížilo během 2 měsíců po vyrojení a zůstalo téměř nedetekovatelné déle než 13 měsíců. Žádné larvy tedy nebyly infikovány a tudíž ani nevznikly žádné nové spory. To se shoduje s metodou přemetení včelstva na mezistěny, jako alternativní způsob kontroly MVP, kde se využívá umělého rojení. Na druhou stranu u včelstva s přibližně 6000 CFU se sice po vyrojení také snížila zátěž na 5 týdnů, ale po 13 týdnech opět vzrostla a objevily se klinické příznaky a tvorba nových spor. Tudíž umělé i přírodní rojení takového včelstva může být efektivní způsob vertikálního přenosu MVP do neinfikovaných oblastí. Z těchto výzkumů je patrné, že rozdíl mezi vertikálním šířením a léčebnou metodou je v množství spor ve včelstvu (Rauch a kol., 2009; Pernal a kol., 2008; Hansen a Brødsgaard, 1999; Fries a Camazine, 2001; Fries a kol., 2006; Genersch, 2010).

### 2.1.9 Klinické příznaky

„Mor se rozpoznává podle změn oproti normálnímu plodu. Tyto změny označujeme jako klinické příznaky“ (Titěra 2009). Ve včelstvech s klinickými příznaky MVP se vyskytuje mrtvý plod, nejčastěji v již zavíčkované buňce. Napadený včelí plod se rozkládá na hnědou viskózní hmotu, která je snadno rozpoznatelná pomocí tzv. sirkového testu. Tím se snadno odliší od jiné bakteriální choroby, a to hniloby včelího plodu (Hansen a Brødsgaard, 1999; Hrabák, 2014; Bailey, 1981). Titěra (2009) však udává, že „tento příznak v některých fázích moru a u některých druhů bacila moru vůbec nemusí být zřetelný. Proto se na něj v praxi nelze spoléhat“. Tento rozkládající se zbytek zapáchá a během několika měsíců se přeměňuje na příškvár na stěně buňky, který včely odstraňují jen s velkým úsilím. Napadené buňky bývají často propadlé a tmavé. Občas v nich bývá díra po uniklém plynu, který se hromadí pod víčkem. Tento plyn vzniká při množení *P. larvae*, až nakonec tlakem protrhne víčko buňky. Někdy také může dojít k vytlačení tekutiny z rozkládající se larvy na povrch víčka buňky v podobě malých červenohnědých kapek. Dalším typickým příznakem je mezerovitost plodu, protože dospělé včely mají tendenci odstraňovat poškozený plod (Hansen a Brødsgaard, 1999; Hrabák, 2014; Bailey, 1981). Přírozená mezerovitost je kolem pěti procent, tedy asi 20 prázdných buněk na jednom decimetru čtverečním a příčinou této mezerovitosti je převážně odstraňování plodu z genetických příčin, např. když se v buňce vyvíjí místo dělnice diploidní trubec. Dále včely rozpoznají a odstraňují i larvy nemocné. Častou příčinou mezerovitosti plodu, které není nakažlivá, je špatně kladoucí matka. Mezerovitě kladou zejména matky staré (Titěra, 2009).

Klinické příznaky jsou někdy velmi typické, někdy méně. Proto pro diagnózu MVP je nutná nejen prohlídka, ale také laboratorní vyšetření, které se od roku 2005 v České republice provádí nejčastěji ze vzorků měli (Titěra, 2009).

### 2.1.10 Vyšetření na přítomnost *P. larvae* a postup při pozitivním nálezu

Včasná detekce této choroby je velmi důležitá vzhledem k dalším léčebným opatřením a zamezení šíření původce MVP. Způsob vyšetření včelího medu na spory *P. larvae* poprvé popsal Sturtevant (1936). Metoda se skládá z kvalitativní a kvantitativní části a spočívá v odstředění a následném mikroskopickém vyšetření medu. Ovšem oddělit spory od sedimentu může být obtížné a také časově náročné. V České republice se vyšetření na MVP od roku 2005 nejčastěji provádí z odebrané včelí měli mikroskopickým pozorováním, kultivačním testem, nebo PCR metodou. Dále je pak běžné vyšetření včelího vosku, plodových plástů a medu. Méně časté vyšetření se provádí i u mateří kašičky, propolisu, glycidových a pylových zásob, uhynulých včel nebo stěrů z prostředí (Titěra, 2009). Velmi častá metoda je přímá kultivace na agaru s různými přísadami (Hansen a Brødsgaard, 1999). Hornitzky a Karlovsky (1989) vynalezli metodu vyšetření dospělých včel na přítomnost *P. larvae*

za pomoci agaru s ovčí krví. Touto metodu mohou být nalezeny spory *P. larvae* i bez propuknutí klinických příznaků (Hansen a Brødsgaard, 1999).

Podle zákona 166/1999 Sb., o veterinární péči a o změně souvisejících zákonů (dále jen veterinární zákon) je mor včelího plodu chorobou v České republice povinnou k ohlášení příslušnému úřadu, jímž je Krajská veterinární správa (KVS), která provede vyšetření a stanoví mimořádná veterinární opatření (Titěra, 2009). Na Slovensku jsou vyškolení pracovníci, kteří vyšetřují včelstva přímo v terénu (Löffelmann, 2013). V České republice probíhá vyšetření v laboratořích Státní veterinární správy a Výzkumného ústavu včelařského v Dole, který má povolení provádět diagnostické vyšetření včelích chorob i pro účely státního veterinárního dozoru. Existují i terénní diagnostické soupravy pro včelaře, které s poměrně vysokou přesností dokáží detekovat původce MVP nebo i hnilobu včelího plodu během krátké doby přímo v terénu. Pokud poznáme MVP ve včelstvu, nebo na něj máme podezření, je nutné toto zjištění dle veterinárního zákona ohlásit příslušné krajské veterinární správě. Krajská veterinární správa pošle proškoleného odborníka, který provede klinické vyšetření všech včelstev na stanovišti v souladu s § 13 a § 49 odst. 1 písm. c) a d) veterinárního zákona a odebere vzorek pro laboratorní vyšetření (Löffelmann, 2013; Bzdil, 2014; Saksún, 2015). Podezřelý materiál (nejlépe měl) je také možné zaslat do akreditované laboratoře, kde pracovníci laboratoře prohlédnou zaslaný materiál a z vhodných míst odeberou vzorky a připraví mikroskopický preparát. Ten se poté speciálním způsobem obarví, a pokud je napadení bakterií *P. larvae* silné, lze pod mikroskopem rozeznat vegetativní stadia, sporangia i spory této bakterie (viz obr. č. 1 a 2). U nejasných vzorků se dále provádí tzv. kulturační vyšetření, které zahrnuje naočkování na živná media, nejčastěji MYPGP agar. Po několika dnech se za vhodných podmínek objevují kolonie namnožených bakterií, případně kvasinek nebo plísní (Titěra, 2009). Identifikace narostlé kultury je poměrně jednoduchá a velmi důležitá. K identifikaci se používají nejrozličnější metody, jako je morfologická a mikroskopická charakteristika, a v poslední době velmi účinná molekulárně genetická PCR analýza (Hrabák, 2011). Toto laboratorní vyšetření na MVP je povinné také při přemísťování včelstev mimo území obce (Pantůček, 2016).

V závislosti na výsledku se poté v případě pozitivního nálezu provede likvidace včelstev a veškerého spalitelného včelařského vybavení i pomůcek, které s infikovaným včelstvem přišly do styku. Dle současné vyhlášky 299/2003 může být likvidace pouze částečná, pokud počet pozitivních včelstev na stanovišti nepřesahuje 15 % z celkového počtu. V tomto případě se utratí pouze pozitivní včelstva. Stanoviště se dále monitoruje, a pokud by se nákaza opět objevila, přikáže KVS spálit všechna včelstva. Stejně tak pokud je ale na stanovišti více než 15% infikovaných včelstev, dochází k likvidaci kompletní, tedy spálení všech včelstev na stanovišti (Krpec, 2015; Titěra, 2009).

Pouhý nález spor původce moru včelího plodu není důvodem k vyhlášení ohniska nákazy. Pokud se však na stanovišti včelstev objeví klinické příznaky a laboratorní vyšetření prokáže, že jde o mor, vyhlásí Krajská veterinární správa v souladu s veterinárním zákonem ohnisko nebezpečné nákazy o poloměru 5 km a dále KVS stanoví mimořádná veterinární opatření v souladu s § 15 odst. 1 a § 54 odst. 1 písm. a), odst. 2 písm. a) a odst. 3 a § 76 odst. 3 veterinárního zákona. V ochranném pásmu je zákaz přemísťování včelstev a je též nařízeno plošné vyšetření měli (Krpec, 2015; Titěra, 2009). Vzhledem k tomu, „že prohlídka včelstev v ochranných pásmech je ukládána majiteli, který často nemá potřebnou kvalifikaci a navíc není zaručena spolehlivost a objektivita prohlídky včelstev ani odebraných vzorků“, uvažuje se o zařazení prohlídky včelstev mezi odborné veterinární činnosti a zřízení institutu prohlížeatele včelstev (Pantůček, 2016).

Jako ohnisko nákazy se považuje celé stanoviště včelstev s příznaky moru včelího plodu. Tlumení nákazy spočívá v likvidaci včelstev, úlů a veškerého spalitelného vybavení, které přišlo do styku s infikovaným včelstvem a není jej možné nijak dezinfikovat, kromě budov a konstrukcí včelínů a kočovných vozů. Je velmi důležité spálit všechno najednou, aby se MVP nešířil dále. O této činnosti se poté provede úřední zápis, který slouží k případnému vyčíslení náhrady (Titěra, 2009).

Med v plástech se pálí spolu s vybavením. Pokud máme nějaký již vytočený z pozorovací doby, pošle se na laboratorní vyšetření a v případě nálezu spor *P. larvae* může být použit pouze na průmyslové zpracování za kontrolovaných podmínek, např. na výrobu medoviny, do pekáren, kosmetického nebo tabákového průmyslu. Na přepravu tohoto medu musí být vystaveno veterinární osvědčení (Titěra, 2009).

„Před utracením včelstev je nutné nejdříve připravit místo, kde se bude se souhlasem hasičů včelařské vybavení pálit. Večer, po skončení letu včel, se úly důkladně uzavřou a shora do nich nalije asi 1-2 dl benzínu. Benzin se rychle odpaří, omámí a usmrtí včely. Tento postup je rychlejší než zaplynování včelstev oxidem siřičitým ze zapáleného sirného knotu“. Následuje spálení všech spalitelných pomůcek. Nesmíme zapomenout ani na záložní úly, rojáčky, nástavky nebo souše, protože by po nějakém čase mohly způsobit propuknutí MVP. Polystyrenové a plastové vybavení se nesmí volně pálit, ale je potřeba domluvit si spálení ve spalovně. Nespalitelné části, jako jsou třeba konstrukce včelařských staveb a kočovných vozů je třeba velmi důkladně očistit oškrábáním a opálením a následně znovu natřít. Nespalitelné pomůcky a vybavení se dezinfikuje, což je postup, „při kterém se sníží počet životaschopných zárodků nemoci tak, že už nemohou nemoc znovu vyvolat“. Dezinfekce se provádí působením vysoké teploty, tlaku, různých druhů záření a některých chemických látek, které působí silně oxidačně nebo redukčně. Kombinace těchto postupů zvyšuje účinnost (Titěra, 2009).

#### 2.1.10.1 Fyzikální dezinfekce

Ve včelařské praxi se nejvíce používají tlaková zařízení a zdroje účinného záření. Likvidace spor vysokou teplotou je poměrně náročná, protože jsou velmi odolné a vysoké teplotě musí být vystaveny dlouhou dobu. Krátké působení plamene nestačí. Na dřevěné předměty lze využít horký parafín (150°C) po dobu 10 minut, avšak pouze jako preventivní ošetření. Nelze jím nahradit nařízenou likvidaci úlů. Ošetření chladem se nejeví jako neúčinné, protože i opakované namočení do tekutého dusíku mor beze škody přežije (Titěra, 2009).

#### 2.1.10.2 Chemická dezinfekce

Z chemických dezinfekčních látek je nejběžnější louh (hydroxid sodný nebo hydroxid draselný). Využívá se 5% roztok, ale musí být zahřátý minimálně na 80°C, jinak na spory dostatečně neúčinkuje. Dále se využívá přípravků na bázi kyslíku, především jednoatomového. Mezi tyto přípravky patří například Savo, kde je účinnou látkou chlornan draselný, který ve vodě uvolňuje aktivní kyslík. Velmi efektivní je kombinace Sava s louhem v poměru 5% louhu a 0,5% chlornanu sodného. Tato směs likviduje spory i za studena. Pouze na dřevěné předměty neúčinkuje, protože spory se „zavrtávají“ hlouběji do porézního dřeva. Doba působení přípravku musí být minimálně 1 hodina. Mezi další dezinfekční přípravky patří Presept a Dismozon (Titěra, 2009).

#### 2.1.10.3 Poskytnutí náhrady za utracená včelstva

Pokud KVS nařídí likvidaci ohniska, může chovatel v souladu s veterinárním zákonem požádat o poskytnutí náhrady. Náhrada za utracená včelstva se hradí ze státního rozpočtu prostřednictvím Ministerstva zemědělství ČR. Žádost o náhradu se musí podat do 6 týdnů od utracení včelstev (Titěra, 2006).

#### 2.1.10.4 Zrušení ohniska MVP a následné zavčelení oblasti

Zrušení ohniska moru včelího plodu vyhlásí KVS po splnění všech nařízených opatření. Pokud se tato opatření organizačně zvládnou, je možné ohnisko zrušit již po 3 měsících od likvidace nemocných včelstev. KVS zhodnotí nákazovou situaci a v případě příznivých výsledků může povolit zavčelení. Je vhodné do těchto oblastí nejdříve umístit pouze jedno pozorovací včelstvo pro případ, že by byl ještě v okolí vysoký infekční tlak, např. ze zapomenutého včelstva nebo včelstev volně žijících. Pokud toto monitorovací včelstvo onemocní, pak nezbyvá, než zdroje nákazy dále dohledávat a odstraňovat. Pokud bude zdravé, může se přistoupit k zavčelení. Nová včelstva je třeba opatřit z důvěryhodných zdrojů, tzn. od dodavatele s certifikátem o vyšetření měli na mor. Nedoporučuje se umístit nová včelstva na stejné místo, jako byla ta původní, nakažená MVP (Titěra, 2009).

## 2.1.11 Extrakce a kultivace spor *P. larvae*

### 2.1.11.1 Extrakce spor *P. larvae* z včelí měli

Částí laboratorního vyšetření včelí měli na přítomnost bakterie *P. larvae* je extrakce spor ze vzorku. Účelem této operace je převedení spor do menšího množství kapaliny, kterou snáze kultivujeme na agaru. Metod na extrakci spor je několik. Zde jsou popsány postupy některých z nich.

#### Toluenová metoda

Množství 1 g včelí měli se rozpustí spolu s 9 ml toluenu a poté se 1 hodinu nechá protřepávat za pokojové teploty. Následně se kapalná část převede do jiné mikroskopické zkumavky spolu s přídavkem 2 ml destilované vody. Směs se zahřeje na 90°C ve vodní lázni po dobu 5 minut a protřepe. Po zchlazení se 200 µl vodní fáze ze dna mikroskopické zkumavky použije jako inokulum na MYPGP agar a dalších 100 µl pro následný PCR test (Ryba a kol., 2009).

#### Tweenová metoda:

Množství 1 g včelí měli se smíchá s 8,5 ml destilované vody. Do této směsi se ještě přidá 0,5 ml látky tween 80 zahřáté na 70°C. Roztok se protřepe a ponoří do vodní lázně o teplotě 70°C. Následně se tato směs zchladí a 3 ml se převedou do stejného množství destilované vody. Nakonec se směs zahřeje na 90°C po dobu 10 minut a po vychladnutí lze kultivovat, opět v množství max 200 µl do jedné misky s agarem (Bzdil, 2007).

#### Extrakce spor v isopropanolu a etanolu:

Množství 1 g včelí měli se přidá k 9 ml isopropanolu nebo 96% etanolu a nechá promíchávat při pokojové teplotě. Po 1 hodině se odebere množství 100 µl na PCR test (metoda za studena). Zbytek se ještě zahřeje na 70°C po dobu 5 minut a následně promíchá. Po zchlazení se odebere 100 µl vodní fáze ze dna mikroskopické zkumavky pro izolaci DNA (metoda za tepla) pomocí PCR analýzy (Ryba a kol., 2009).

#### Extrakce spor ve vodě:

Množství 1 g včelí měli se smíchá s 5 ml destilované vody a nechá promíchávat při pokojové teplotě. Po 1 hodině se odebere množství 100 µl na PCR test (metoda za studena). Zbytek se ještě zahřeje na 70°C po dobu 5 minut a následně promíchá. Po zchlazení se odebere 100 µl vodní fáze ze dna mikroskopické zkumavky (metoda za tepla) pro izolaci DNA pomocí PCR analýzy (Ryba a kol., 2009).

### 2.1.11.2 Kultivace spor

*P. larvae* se rozmnožuje na umělém mediu jen velmi neochotně. White (1906) ke kultivaci používal agar s bujónem ze včelích larev nebo s přidavkem vaječného žloutku. Příprava však byla náročná a nijak zvlášť účinná a proto se hledaly jiné možnosti. Později se využívaly kvasničné extrakty s přidavkem mrkve, který zvyšoval citlivost kultivačního vyšetření moru včelího plodu. Později se ale ukázalo, že právě mrkvový extrakt je inhibítoem sporulace. V současné době je velmi oblíbené medium MYPGP navržené Dingmanem a Stahlym (1983). Avšak ani na nejlepších umělých mediích nedosahuje *P. larvae* takového růstu, jako v přirozené situaci ve včelí larvě. Postup kultivace je popsán v praktické části v kapitole příprava vzorků a kultivace.

### 2.1.12 Prevence

Nejdůležitějším preventivním opatřením je častá a úplná kontrola celého včelstva, převážně pak plodových plástů. Doporučuje se kontrola každoroční, případně i častější. Další způsoby předcházení vzniku onemocnění MVP je dodržování obecných zásad včelaření, udržovat včelstva v dobré kondici, zbytečně je nestresovat a minimalizovat chemickou zátěž (Titěra, 2009).

Infekční tlak MVP působí na včelstva z okolního prostředí. Proto je velmi důležité udržovat pořádek a čistotu na včelnici nebo ve včelíně. Důležitým předpokladem je odhalení a likvidace případného zdroje nákazy v okolí. Hlavní zásadou prevence je tedy hygiena. Nepotřebné vybavení je ve spojení s touto nemocí lepší likvidovat, potřebné obnovovat. Nejlépe a nejvíce se obnovuje včelí dílo (Titěra, 2009). Není vhodné používat plodové plásty déle než 3 roky. Ve Skandinávii se dokonce nevyužívají déle než 1 rok (Hansen a Brødsgaard, 1999).

Při pozitivních nálezech *P. larvae* ve včelstvech, která nemají klinické příznaky a nejsou tedy úředně ohniskem moru, doporučuje Titěra (2009) vyměnit dílo radikálně, a to tak, že smeteme včely na mezistěny (metoda přemetení včelstva na mezistěny), nejlépe na nové rámky a do nových úlů. Pokud smetené včely necháme v rojáku opatrně vyhladovět, spotřebují i veškeré zásoby z medného váčku. Po usazení je samozřejmě okamžitě přikrmíme. Toto ozdravení se dá kombinovat i s ošetřením proti varroáze, což je velmi účinné, protože ve včelstvu není žádný zavíčkovaný plod. Tato metoda navíc ozdraví včely i od spor nosemy, jejichž hlavní zdroj je také v plástvech.

Pokud chceme odebírat pyl, je důležité provést vyšetření na přítomnost *P. larvae*. Někteří včelaři sbírají od svých včel pyl, např. pylochytem, a poté jím krmí při nedostatku pylu v krajině svá včelstva. Je ovšem známo, že původce MVP je přenosný právě na pylu a jeho krmením se snadno dostává do střev včel. Proto se doporučuje sbírat pyl pouze ze zdravých včelstev. Vhodné je provést toto vyšetření i

u medu, protože v mnoha případech byly spory *P. larvae* detekovány v medu rok před tím, než se ve včelstvu objevily klinické příznaky MVP (Hansen a Brødsgaard, 1999).

Větší množství spor lze různými metodami ve včelstvu odhalit již několik let před propuknutím nemoci. Von der Ohe (2003) doporučuje bakteriologické vyšetření medu. Tato metoda se jeví jako vhodný způsob včasné detekce bakterie *Paenibacillus larvae*, protože přítomnost této bakterie v medu často bývá o 2-3 roky dříve, než se začnou objevovat klinické příznaky MVP. Lindström (2006) zase doporučuje k monitoringu nákazové situace používat místo vzorku medu raději vzorek dospělých včel, protože jsou mnohem citlivější. Tato metoda se zdá nejvhodnější při velkém počtu včelstev nebo včelnic, kde by bylo velmi pracné každé zvlášť kontrolovat a hledat klinické příznaky MVP. Spočívá v tom, že se od každého včelstva na včelnici odebere vzorek alespoň 100 včel, poté se vzorky smíchají a provede se laboratorní vyšetření na přítomnost spor *Paenibacillus larvae*, např. pro každou včelnici. Tento způsob vyšetření nám poměrně přesně určí přítomnost onemocnění ve včelstvech, protože výskyt původce onemocnění na úrovni včelstva je velmi podobný jako na úrovni celé včelnice.

Možné preventivní opatření by mohlo být oddělené obhospodařování včelstev, které zjednodušeně spočívá ve vkládání plástů pouze do stejných úlů. Obnáší to označení veškerých úlů, nástavků a rámků a jejich kontrolování při každém zásahu do včelstva nebo vytáčení medu, což se může zdát jako velmi pracné, ale časem si na to dle autora lze zvyknout. Tato metoda hospodaření může velmi pomoci k omezení přenosu infekce (Hansen a Brødsgaard, 1999).

### 2.1.13 Kontrola MVP

V některých zemích (USA, Kanada) se k potlačení MVP používají některá anitibiotika, nejvíce oxytetracyklin hydrochlorid (OTC) a sulfathiazol. Tyto látky pomáhají zdravým včelstvům eliminovat infekci před tvorbou spor. OTC však zanechává v medu rezidua a dlouhodobou aplikací ve včelstvu vzniká rezistence *P. larvae* na tuto látku, což vede k vývoji nových antibiotik. OTC se používá i k léčbě člověka před bakteriálními chorobami a tak vzniklá rezistence na tuto látku se stává závažným problémem. Z těchto důvodů aplikace OTC do včelstva je zakázána v mnoha státech, např. v České republice nebo celé Evropské unii (Hansen a Brødsgaard, 1999). V roce 2003 bylo v Bulharsku zakázáno používat k léčbě MVP antibiotika a sulfonamidy. V Iránu tento zákaz platí již od roku 1986. V Kanadě se od roku 2000 používá pro kontrolu MVP „caspian solution“. Jedná se o směs pylu, feromonů a dalších přírodních ingrediencí a malého množství antibiotik (Parvanov a kol., 2006).

Nedávno provedený výzkum plasmidu pMA67 izolovaného z OTC rezistentních kmenů *P. larvae* ukázal, že tento plasmid nese geny pro rezistenci na



tetracyklin, konkrétně gen tetL. To by mohlo pomoci vyřešit dlouhotrvající otázku původu rezistence na tetracyklin, což je účinná látka používaná v antibiotikách právě proti *P. larvae* (Evans, 2003). Plasmid pMA67 je první nalezený gen v rodu *Paenibacillus*, způsobující rezistenci na tetracyklin, ačkoliv PCR analýza ukázala, že *Paenibacillus alvei* by také mohl mít podobný plasmid. Předpokládá se, že plasmid pMA67 je mobilní a může být přenášen mezi příbuznými bakteriemi na stejném stanovišti (Murray a kol., 2007; Murray a Aronstein, 2006; Genersch, 2010).

Mor včelího plodu se doposud nedá efektivně léčit. Byly prováděny pokusy o léčbu pomocí antibiotik, ale jejich nasazení jen utlumilo klinické příznaky. Antibiotika totiž nepůsobí na odolné spory, takže pouze potlačí klinické příznaky, zkreslí průběh onemocnění a po jejich odeznění mor propukne znova. Antibiotika mají i další velké nevýhody. Mohou přecházet do včelích produktů a negativně ovlivňovat jejich kvalitu a zdravotní nezávadnost. V neposlední řadě zabíjí užitečnou včelí mikroflóru a snižují životaschopnost včelích larev a dlouhověkost včel. Jediné účinné opatření zabráňující šíření MVP v České republice je pouze zákonem nařízené pálení infikovaných včelstev (Titěra, 2009).

Státní veterinární správa doporučuje všem chovatelům včel dodržovat následující opatření k tlumení a zamezení šíření moru včelího plodu (Státní veterinární správa ČR):

- Zjišťovat příčiny zimních úhynů a slábnutí včelstev, při zvýšených úhynech kontaktovat neprodleně příslušnou Krajskou veterinární správu Státní veterinární správy
- Systémem správné včelařské praxe chovat pouze silná včelstva s vyvinutým čistícím pudem, pravidelně kontrolovat jejich kondici a zdravotní stav
- Utrácet roje neznámého původu a divoce žijící včelstva
- Nepoužívat plásty, med, vosk a pyl z oblastí s neznámou nakažovou situací k chovu a ke krmení včel
- Zamezit přístupu včel do neobsazených úlů, přemísťovaného a skladovaného včelího díla
- Provádět pravidelně desinfekci úlů, souší, včelařských potřeb a pomůcek a veškerého dezinfikovatelného materiálu, který přichází do kontaktu se včelami a včelími produkty
- Používat pouze mezistěny z výroben, které vosk tepelně opracovávají (117°C po dobu 60 minut)
- Nezařazovat včelí dílo, nedezinfikované úly, včelařské potřeby, pomůcky a zařízení do chovu včel v případě neznámé nakažové situace v místě a době jejich původu
- Nově přisunutá včelstva a oddělky umísťovat do nových úlů
- Soustavně monitorovat intenzitu varroázy a v návaznosti na výsledky tuto nákazu účinně tlumit podle aktuální situace v průběhu celého roku

- Při podezření na mor včelího plodu se nepokoušet o léčbu podezřelých včelstev, ale o neprodlené nahlášení podezření příslušné krajské veterinární správě Státní veterinární správy
- Pravidelně sledovat nákazovou situaci v okolí stanoviště (v doletové vzdálenosti včel), např. spolupracovat s ostatními včelaři, kteří mají stanoviště na stejném katastrálním území
- Likvidovat staré nepoužívané úly (prevence usazení rojů)
- Pravidelně každé tři roky obměňovat veškeré včelí dílo, např. každý rok obměnit třetinu
- Pořizovat nová včelstva (oddělky) nebo matky pouze z důvěryhodných zdrojů (pokud možno vyšetřených na mor včelího plodu)
- Podporovat chov včelstev s velmi dobrým čistícím instinktem
- Vyvarovat se zásahů a úkonů, které by mohly vést k loupeživosti mezi včelstvy – pokles zásob pod 10 kg po vytáčení, opožděné zakrmení po posledním vytočení medu, držení slabých včelstev
- Nepřekračovat úživnou kapacitu lokality vysokou koncentrací včelstev na stanovišti a usilovat o rovnoměrné rozmístění stanovišť v krajině, zejména při kočování

#### 2.1.14 Alternativní metody kontroly MVP

Během posledních 10 let je velký zájem o hledání nových alternativních metod pro kontrolu MVP. Vzhledem k tomu, že se jedná o chorobu povinnou k ohlášení, je tato kontrola často regulována právními předpisy, příkazujícími spálení infikovaných včelstev a dřevěného vybavení. V některých zemích jsou povolena antibiotika (USA), ale v Evropské unii nikoliv. Nejčastěji se používá oxytetracyklin (OTC) nebo sulfathiazol. Aplikace antibiotik má ale značné nevýhody (viz výše). Proto je tendence k rozvoji alternativních léčebných strategií, které se zatím ubírají třemi hlavními směry. První cesta je šlechtění k vyšší odolnosti, jak jednotlivých včel, tak i celého včelstva k bakterii *P. larvae*. Další způsob je biologická kontrola za pomoci antagonistických bakterií, které by onemocnění udržovaly pod únosnou mezí. Třetí směr vede k využívání přírodních antimikrobiálních látek, jakými jsou například různé rostlinné silice. Velká pozornost se také věnuje metodě přemetení včelstva na mezistěny, která lze použít, pouze pokud se ještě neprojevují klinické příznaky onemocnění. (Genersch, 2010; Morrissey a kol., 2015; Spivak a Reuter, 2001; Spivak a Reuter, 1998; Miyagi a kol., 2000; Mussen, 2000).

Šlechtěním se již podařilo dosáhnout určitého úspěchu. Hygienický pud včelstva je dán mj. geneticky a zjistilo se, že nejdůležitější mechanismus potlačení MVP je hygienické chování dospělých včel, které by měli včas najít a odstranit napadený plod. Tím se zabrání další produkci spor a celkovému šíření nemoci (Spivak a Reuter, 2001; Spivak a Reuter, 1998; Rauch a kol., 2009). Některé linie čistí napadené buňky a mrtvý plod rychle a úplně, jiné genetické linie čistí pomaleji a zanechávají zbytek příškvary v buňce. To má samozřejmě velký vliv na další šíření

spor. Důležitá je také individuální rezistence larev. Některé jsou odolné již po 36 hodinách života, jiné tuto odolnost získávají až okolo 48 hodin života (Wenedig a kol., 2003).

Další hypotéza je, že za rezistenci včel vůči bakterii *Paenibacillus larvae* může také strava, jak produkovaná „kojičkami“, tak přinesená z venkovního prostředí. Bylo prokázáno, že se složení larvální stravy mění v závislosti na jejím vývoji (Wenedig a kol., 2003). Bíliková a kol. (2001) zjistila, že peptidová část mateří kašičky royalisin inhibuje růst *Paenibacillus larvae*.

Éterické oleje a další přírodní antimikrobiální látky se také zdají být vhodným alternativním řešením, už kvůli tomu, že by se mohly aplikovat kombinovaně na ošetření proti roztoči *V. destructor* a bakterii *P. larvae*. Zbývá tedy zjistit jejich účinnost, popřípadě nežádoucí vedlejší účinky na životaschopnost včel a možné ovlivnění jakosti medu a dalších včelích produktů v praxi (Genersch, 2010; Ebert a kol., 2007; Higes a kol., 1997).

Biologická kontrola přes antagonistické bakterie je lákavá představa a první úspěšné pokusy s kultivovaným kmenem *P. larvae* byly prezentovány Evansem a Armstrongem (2005; 2006). Ovšem z infikovaného včelího plodu jsou izolovány pouze čisté kultury *P. larvae*, což naznačuje že, tento patogen sám zřejmě vytváří silná antibiotika. Účinnost antagonistických bakterií tak stále čeká na své objevení (Fünfhaus a kol., 2009; Genersch, 2010).

#### 2.1.14.1 Přirozená odolnost včel

V roce 2001 proběhla studie vedená Riessberger-Galle' a kol. (2001), ve které se vypreparoval trávicí trakt 4-5 včel, smíchal s destilovanou vodou, homogenizoval a ještě se přidal etanol pro usmrcení vegetativních forem bakterie. Poté se ke každému vzorku přidaly kultivované bakterie *Paenibacillus larvae* v různém množství. Nakonec se tato směs naočkovala na Columbia agar a pozorovalo se klíčení spor po působení inhibičních látek z trávicího traktu včel. Čím více byl homogenizovaný vzorek trávicího traktu včel naředěn vodou, tím menší měl inhibiční účinek. Důležitou roli také hraje množství spor. Menší počet spor dokáže inhibovat nižší koncentrace přirozených inhibičních látek ve včele. Pro inhibici více spor je potřeba vyšší koncentrace inhibičních látek. Jedná se ovšem pouze o potlačení růstu bakterií, nikoliv jejich zničení. Po opětovné kultivaci na Columbia agaru se tyto bakterie opět začaly množit. V této studii bylo také zjištěno, že včelstva s přístupem k přirozené stravě (pylu a nektaru) měla vyšší inhibiční účinek než včelstva, která měla dietu sestavenou z umělých látek. Zajímavé je, že i tyto nesprávně živěné včely inhibovaly bakterie *Paenibacillus larvae*. Z toho je zřejmé, že včely tyto látky nezískávají jen díky stravě, ale musejí si ji i samy vyrábět, například v oblasti zažívacího traktu nebo v některých žlázách.

Inhibiční látky ve včelím zažívacím traktu objevil také Wilson (1971). Jeho výzkum ukázal, že tyto látky jsou velmi stabilní a i po vystavení teplotě 125 °C po dobu 15 minut vykazovaly ještě 60% z jejich původního účinku.

#### 2.1.14.2 Fágová léčba

Nárůst rezistence *P. larvae* vůči antibiotikům vede k hledání jiných metod k potlačení tohoto patogenu. Jednou z možností je fágová léčba pomocí bakteriofágů specializovaných právě na bakterie *P. larvae*. Bakteriofágy jsou viry napadající bakterie. Jejich výzkum a možné uplatnění se prováděl již na přelomu 19. a 20. století, ale kvůli nedostatečným znalostem mikrobiologie, horšímu vybavení a nástupu antibiotik odešel vývoj tímto směrem do ústraní. Pouze v zemích bývalého Sovětského svazu se ještě v 90. letech vyráběla léčiva na bázi bakteriofágů. Narůstající rezistence na antibiotika a nové technologie však opět přivolaly zájem o tyto viry a nyní výzkum bakteriofágů zažívá velký rozmach. Zatím bylo nalezeno asi 9 různých bakteriofágů schopných napadat *P. larvae*. Bakteriofágy jsou v přírodě zcela běžné a díky evolučnímu vývoji je vznik rezistence minimální. Z tohoto důvodů také představují vhodnou náhražku antibiotik. Do včelstva je lze aplikovat např. v cukerném roztoku. Včelám nevadí, protože jsou úzce specializované na bakterie *P. larvae*. Jakmile najdou hostitelské bakterie, rychle se namnoží a tyto bakterie účinně zahubí. Pokud hostitelské bakterie zmizí, bakteriofág mizí také (Petr, 2015).

#### 2.1.14.3 Metoda přemetení včelstva na mezistěny

Tato metoda se používá v raném stadiu nákazy pro vyléčení včelstva od MVP. Přemetení včelstva na mezistěny poprvé navrhnul Schirach v roce 1769 a poté byla několikrát upravována. Spočívá v přemístění infikovaného včelstva do nového, MVP prostého úlu a to buď jednou (jednoduché) anebo dvakrát (dvojitě). Přemístují se pouze dospělé včely, což má napodobit vyrojení včelstva. Rámky a včelí plod se likvidují. Než dospělé včely vystaví nové dílo, spotřebují přenesené zásoby medu a poté se již nepovažují za zdroj infekce. Této fázi se říká hladovění a trvá přibližně 1-2 dny. Všechny včely se během této doby očistí a všechny spory se pak vyskytují jen v trávicím traktu. Poté jsou spory vynášeny ven z úlu vyprazdňujícími se včelami. Touto metodou jsou včelstva oslabena a proto Von der Ohe (2003) navrhuje spojit dohromady 2-3 a vytvořit jedno silné. Velmi důležité je sledovat včelstva v celém okolí a provádět léčebná opatření na všech kontaminovaných lokalitách. Pokud by se tato činnost zanedbávala, je velmi pravděpodobné, že se nákaza bude šířit dále (Hansen a Brødsgaard, 2003; Von der Ohe, 2003).

Další možnost je setřást včely do krabice a na několik dní uložit do chladného sklepa. Mezitím zkonzumují všechny své zásoby a pak se na nových rámcích umístí do neinfikovaného úlu. V některých případech bývají ještě 2 měsíce až 1 rok po tomto léčení přítomny spory *P. larvae*. Nejedná se totiž o úplné vymýcení spor, ale o jejich snížení na minimum a udržení nemoci pod kontrolou. Je však důležité toto

léčebné opatření kombinovat s dalšími preventivními opatřeními, jako je např. pravidelné tavení plástů a výměna díla. Výhoda spočívá v záchraně kolonie a nezanechává žádná rezidua v medu, v porovnání s chemickou ochranou. Nevýhodou je větší pracnost (Hansen a Brødsgaard, 1999).

V Dánsku se na toto téma prováděl výzkum s 15 včelstvy krmenými roztokem obsahující  $1 \times 10^9$  spor *Paenibacillus larvae*. Po 43 dnech se u 12 včelstev ukázaly klinické příznaky MVP a množství spor bylo průměrně  $1,7 \times 10^6$  na gram medu. Poté byla provedena metoda přemetení včelstva na mezistěny. Po 4 dnech tyto včelstva zkonsumovala své zásoby a došlo k dalšímu přemetení do MVP prostých úlů, kde již byla krmena cukerným roztokem. Po tomto léčebném opatření kleslo množství spor *Paenibacillus larvae* o 99,5% a ani po 2 letech se neprojevily klinické příznaky MVP, stejně tak jako u 3 zbývajících včelstev, která léčena nebyla. Zajímavé je, že všech 15 včelstev mělo úzce příbuzné matky a i přes stejnou koncentraci spor *Paenibacillus larvae* se u 3 neprojevily žádné klinické příznaky. Tato metoda se jeví jako vhodná alternativa k potlačení MVP pro linie včel, které mají alespoň minimální odolnost proti sporám *Paenibacillus larvae*. Byly nalezeny i některé linie buckfastské včely, které nemají žádnou odolnost vůči sporám původce MVP a tato metoda na ně nezabírá (Hansen a Brødsgaard, 2003).

V Maďarsku proběhl výzkum, ve kterém se pomocí metody přemetení včelstev na mezistěny snažili vyléčit 3 včelnice o celkovém počtu 119 včelstev. Takto se podařilo vyléčit všech 28 infikovaných včelstev a zachránit celé včelnice (Parvanov a kol., 2006). V Pákistánu zase porovnávali včelstva napadená MVP neléčená s těmi, kde byla provedena metoda přemetení včelstva na mezistěny. Výsledky byly jednoznačné. V přemetěných včelstvech již nebylo možné detekovat spory *Paenibacillus larvae*, zatímco v neléčených včelstvech se jejich počet stále zvyšoval (Munawar a kol., 2010).

Lindström (2006) prováděl studii s 25 pozitivními včelstvy na MVP, z nichž 21 mělo klinické příznaky. Nechal je všechny vyrojit, roje poté odchytil a dopravil mimo dolet mateřského včelstva. Ve všech těchto rojích významně klesl počet spor a žádný z nich nevykazoval klinické příznaky MVP. Ovšem za 1 rok po vyrojení se počet spor opět přiblížil hodnotě jako v původním mateřském včelstvu. Tato skutečnost by se dala odůvodnit tím, že při přirozeném rojení si včely zcela naplní medné vaky potravou a vydrží jim déle, než když při rychlém přemetení na mezistěny mají zásoby potravy pouze minimální. Další možnost je, že spory původce MVP skrytě vyčkávají na vhodné podmínky a pokud nastanou, dojde opět k vypuknutí nákazy.

Lindström (2006) také provedl výzkum s umělým vyrojením celkem 45 včelstev, z toho 29 včelstev bylo přemeteno jednou a 16 včelstev dvakrát. Sledoval stav včelstev po dobu 3 let a na konci experimentu přežilo celkem 19 včelstev a to bez klinických příznaků, z toho 11 přemetěných dvakrát a 8 přemetěných jednou.

Z těchto výsledků vyplývá, že přemetení 2x mělo vyšší účinnost než přemetení jednou.

#### 2.1.14.4 Kontrola včelím jedom

Na svou obranu využívají včely dělnice žihadlový aparát. Ten slouží k dopravě včelího jedu na místo určení. Včelí jed produkují jedové žlázy a skládá se z mnoha biologicky aktivních látek, od aminů až po proteiny. To zahrnuje i peptidy, např. melitin, apamin, adopalín, dále enzymy (fosfolipázy PLA2) a nepeptidové složky. Melitin a PLA2 jsou nejhojnější proteiny v sušině včelího jedu (Perien a kol., 2005). Jedové žlázy jsou považovány za důležitý zdroj antimikrobiálních látek, které jsou schopny inhibovat růst patogenních bakterií (Han a kol., 2013). V laboratorních podmínkách bylo dokázáno, že přimíchání vysušeného včelího jedu do cukerného roztoku mělo výrazné inhibiční účinky proti *P. larvae* a v porovnání s esenciálními oleji nebo výtažky rostlin až 50x vyšší účinnost. Při vysokých dávkách včelího jedu byla zaznamenána mnohem nižší toxicita pro včely, než u některých rostlinných výtažků (Damiani et al. 2014; Fernández a kol., 2014). V této souvislosti by měly být provedeny studie zaměřené na stanovení toxikologického rizika, optimální dávky nebo např. použití jednotlivých peptidů z včelího jedu. Zajímavé by mohlo být zkoumat účinek včelího jedu i na jiné včelí nemoci (Fernández a kol., 2014).

#### 2.1.15 Dekontaminace úlu

Hansen a Brødsgaard (1997) porovnávali následující dekontaminační metody:

1. Sežehnutí hořákem
2. Vydrhnutí horkou mýdlovou vodou
3. Vysokotlaké čištění studenou vodou
4. Léčba 1% roztokem Virkon S
5. Sterilizace párou a ponoření do vroucího roztoku louhu s následným vysokotlakým proplachováním studenou vodou

Žádná z těchto metod neodstraní spory úplně. První 4 metody mají účinnost kolem 80%, poslední metoda 99.9%. Následné pokusy v terénu ukázaly, že včelstva umístěná do dekontaminovaného úlu pomocí první až čtvrté metody nevykazovaly žádné klinické příznaky. Z toho lze doporučit, aby dekontaminační metody měly účinnost nad 80% (Hansen a Brødsgaard, 1999).

Máčení kontaminovaného úlu horkým parafínem (150-160°C) přineslo také dobré výsledky na Novém Zélandu, stejně jako vykuřování etylenoxidem (EtO), který zabije spory a je používán pro sterilizaci včelařského vybavení. Nicméně pára EtO je pro člověka jedovatá a rezidua jsou považována za karcinogenní. V Austrálii se zase osvědčilo sterilizovat úly pomocí gama záření (Hansen a Brødsgaard, 1999). V České republice je vhodné využívat techniky dekontaminace úlu, ale pouze jako

preventivní opatření. V případě, že se již vyskytnou klinické příznaky MVP, postupuje se dle veterinárního zákona a úly se v rámci kontrolních opatření pálí.

### 2.1.16 Nákazová situace v České republice

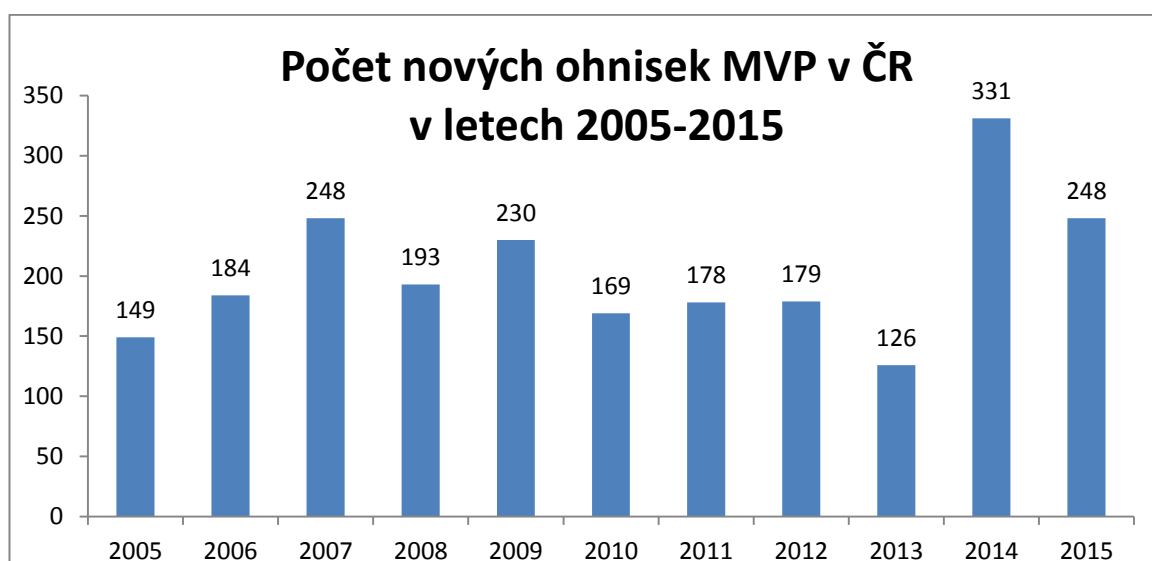
V České republice se MVP vyskytuje nejvíce ve Zlínském kraji, z toho převážně ve Vsetínském okrese. Za poslední 3 roky se počet ohnisek MVP v České republice výrazně rozrostl (viz tab. č. 4, graf č. 1a obr. č. 3), zejména ve Zlínském kraji. Vyšší počet ohnisek byl také zaznamenán v kraji Olomouckém a Moravskoslezském a dále ve Středních a Jižních Čechách. Přesto prevalence není opticky příliš vysoká. V roce 2014 bylo zjištěno 0,6 % nemocných včelstev. I tak jsou ale škody vysoké a likvidace nakažených včelstev velmi nákladná. V roce 2014 se jednalo o zhruba 16 milionů korun (Krpec, 2015).

„Bohužel si ale nemůžeme být zcela jisti, že v krajích, které jsou dnes podle úředních potvrzení bez ohnisek nákazy, MVP skutečně není“. Vyšetření směsných vzorků měli ukázala také ohniska, kde nákaza dosud zjištěna nebyla a někde chybějí statistická data. Za oblasti MVP prosté můžeme považovat jen takové, „kde je pravidelně prováděn monitoring nákazy s negativním výsledkem a současně je zajištěn dozor nad přemísťováním včelstev“ (Pantůček, 2016).

Tab. č. 4 Počty nových ohnisek MVP v České republice (Pantůček, 2016)

Rok	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Počet nových ohnisek MVP v ČR	149	184	248	193	230	169	178	179	126	331	248

Graf č. 1 Počty nových ohnisek MVP v České republice (Pantůček, 2016)



Obr. č. 3 Nově vyhlášená ohniska v roce 2014 (Státní veterinární správa ČR)



Aktuální nálezovou situaci moru včelího plodu i vymezená ochranná pásma lze sledovat také na internetu na mapě (viz obr. č. 3) vytvořené Státní veterinární správou. Tato mapa se aktualizuje každou hodinu a lze ji nalézt na adrese [www.svscr.cz](http://www.svscr.cz). (Duben, 2013)

## 2.2 Zavíječ voskový (*Galleria mellonella*)

Zavíječ voskový je globálně rozšířený škůdce ve včelařství, který způsobuje značné ekonomické ztráty na voskových buňkách i celých plástech. Může poškodit a zničit velké množství zásob medu a hlavně špatně uskladněné souše (Ellis a kol., 2013).

### 2.2.1 Klasifikace

Říše: Živočichové (*Animalia*)

Kmen: Členovci (*Arthropoda*)

Podkmen: Šestinozí (*Hexapoda*)

Třída: Hmyz (*Insekta*)

Řád: Motýli (*Lepidoptera*)

Čeleď: Zavíječovití (*Pyralidae*)

Rod: Zavíječ (*Galleria*)

Druh: Zavíječ voskový (*Galleria mellonella*, *Linnaeus, 1758*)



### 2.2.2 Charakteristika čeledi

Čeď zavíječovití zahrnuje malé až středně velké motýli se štíhlým tělem a rozpětím 10 - 46 mm. Charakteristická jsou pro ně úzká trojúhelníkovitá dozadu složená přední křídla, zadní jsou široce trojúhelníkovitá, v klidu složená pod předními. Tykadla jsou nitkovitá, u samců obrvená, vzácně hřebenitá. Sosák zpravidla vyvinutý, někdy zkrácený, nebo chybí úplně. U některých druhů jsou výrazná pysková a čelistní makadla. Částečně se vyskytuje pohlavní dimorfismus. Housenky jsou jen slabě ochlupené, některé produkují velké množství hedvábí, kterým opřádají živný substrát. Najdeme mezi nimi větší počet škůdců rostlin, uskladněných produktů a potravin. Několik druhů se vyvíjí pod vodou na vodních rostlinách. Čeď je velmi rozmanitá nejen morfologicky, ale výrazně se liší i bionomií jednotlivých druhů. V ČR bylo zjištěno 254 a v SR 278 druhů (Bělín, 2003).

### 2.2.3 Výskyt

Se včelstvy byl zavíječ voskový zavlečen téměř do celého světa. Nejvíce škodí v teplých oblastech, jako jsou subtropy a tropy, méně škodí v chladnějších severních oblastech (Williams, 1997).

### 2.2.4 Binomie

Zavíječ voskový má proměnu dokonalou a jeho vývoj tedy probíhá od vajíčka přes larvu, kuklu až po dospělého jedince (Ellis a kol., 2013).

#### 2.2.4.1 Vajíčko

Vajíčka jsou perleťově bílá až mírně narůžovělá (viz obr. č. 4) s hrubou strukturou na povrchu. Během vývoje se barva mění do žluta. Samička klade vajíčka o průměru 0,3 mm ve shlucích 50-150 kusů. 4 dny před vylíhnutím je larva viditelná jako tmavý kruh uvnitř vajíčka a 12 hodin před líhnutím lze přes chorion vidět plně vyvinutou larvu. Vajíčka se vyvíjí rychle při teplotě 29 °C – 35°C (za optimálních podmínek 7-9 dní) a pomaleji (kolem 30 dní) za nižších teplot pod 18°C. Vajíčka nejsou schopna přežít extrémní teploty pod nulou déle než 4,5 hodiny a více než 46°C po dobu 70 minut (Ellis a kol., 2013).

Obr. č. 4 Vajíčka a larva prvního instaru zavíječe voskového (Ellis a kol., 2013)



#### 2.2.4.2 Larva

Po vylíhnutí je larva (viz obr. č. 4) bělavé barvy a na délku měří 1-3 mm. Housenky mají 3 páry článkovaných hrudních nožek a 5 párů panožek na zadečkových člancích. Ústní ústrojí je kousací. Nově vylíhlé larvy ihned začínají konzumovat potravu a vytvářejí bělavé vlákno. Největšího růstu larvy dosahují v posledních 2 instarech. Vývoj trvá 6-7 týdnů při teplotě 29°C – 32°C a vysoké vlhkosti. Plně vyvinutá larva (viz obr. č 5) je dlouhá asi 20 mm a má šedou barvu. Hlava je malá, mírně špičatá. Larva prochází vývojem se 7 instary. Larvy posledních instarů jsou schopné vrtání do dřeva, nejčastěji do různých částí úlu nebo do rámků. Poté, co larva najde vhodné místo, zakuklí se a začne s předáním hedvábného vlákna, z kterého se později stane kokon. Vnější vrstva kokonu ztvrdne, zatímco vnitřní (kukla) zůstává měkká. Čas potřebný pro tvorbu celého kokonu je různý v závislosti na teplotě a vlhkosti a průměrně činí asi 2,25 dne. Když je kokon dokončen, larva se stává méně aktivní. Larvy zavíječe voskového mají tendenci se shromažďovat při kuklení v úlu na jednom místě (Ellis a kol., 2013; Williams, 1997; Paddock, 1918).

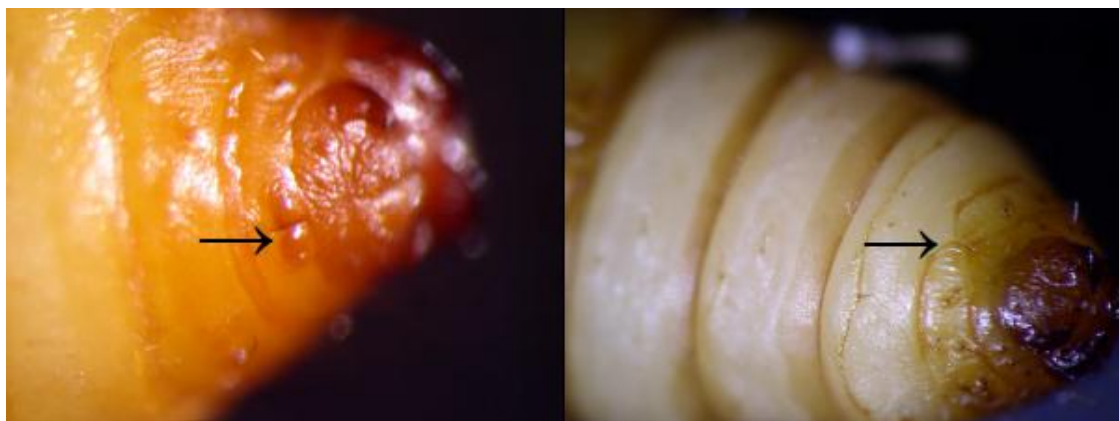
Obr. č. 5 Larvy vyššího instaru



#### 2.2.4.3 Kukla

V kokonu se formuje kukla (viz obr. č. 6 a 7), která je zpočátku bílá a po 24 hodinách žlutne. Po 4 dnech se kukla stane světle hnědou a postupně dále tmavne. Zavíječ voskový tvoří kukly v průměru o velikosti 5 až 7 mm na šířku a 12 až 20 mm na délku. Vývojové stadium kukly trvá podle ročního období a teploty od 6 do 55 dnů (Ellis a kol., 2013; Williams, 1997; Paddock, 1918).

Obr. č. 6 Kukla zavíječe voskového, první šipka ukazuje na typické morfologické znaky samce, druhá totéž u samice (Salášková, 2008)



Obr. č. 7 Zakuklený zavíječ voskový (Ellis a kol., 2013)



#### 2.2.4.4 Dospělec

Dospělý jedinec je přibližně 15 mm dlouhý s rozpětím křídel kolem 31 mm. Křídla jsou hnědá, kromě zadních třetích křídel, jež jsou normálně skrytá, která mají bronzovou barvu. Sameček bývá o něco menší a světlejší barvy než samička a vyznačuje se členitějším okrajem předních křídel. Samičky mají o 10-20% delší tykadla. Dospělci se objevují v podvečer a vyhledávají chráněná místa vhodná

k založení nové kolonie. Dospělý jedinec již nekonzumuje potravu a samičky žijí průměrně 12 a samečci 21 dní (Ellis a kol., 2013).

Obr. č. 8 Dospělý jedinec zavíječe voskového, vlevo samec, vpravo samice (Salášková, 2008)



#### 2.2.4.5 Páření

K páření dochází krátce po vylihnutí dospělce. Sameček vábí samičku pomocí ultrazvukových signálů. Samičky začnou mávat křídly, což způsobuje feromon uvolněný samečkem a vede ke sblížení před pářením (Ellis a kol., 2013; Spangler, 1985, 1987; Jones a kol., 2002).

#### 2.2.4.6 Kladení vajíček

Po páření samička vyhledává štěrby, kam naklade vajíčka. Při tom prodlužuje své tělo, aby kladélkem dosáhla co nejdále do štěrby. V laboratorních podmínkách samičky pokračují v kladení od 3 do 12 dní. Za svůj život může naklást až 2000 vajíček, ale průměrně klade kolem 700 vajíček (Ellis a kol., 2013; Williams, 1997).

### 2.2.5 Orgánové soustavy

#### 2.2.5.1 Trávicí soustava

Trávicí soustava slouží k příjmu, rozmělnění a rozkladu potravy až na nízkomolekulární látky, které je organismus schopen využít a dále předat do cévní soustavy. Nestravitelné zbytky se poté pomocí vylučovací soustavy dostávají do vnějšího prostředí (Kodřík, 2004).

Trávicí soustava se skládá z trávicí trubice rozdělené na 3 části:

1. Stomodeum – přední střevo
2. Mesenteron – střední střevo
3. Proctodeum – zadní střevo

Přední a zadní střevo jsou ektodermálního původu a jsou kryty kutikulou zvanou intima. Střední střevo je původu entodermálního (Kodrík, 2004).

### Stomodeum

Stomodeum slouží k příjmu a přípravě potravy na trávicí proces, převážně k mechanickému zpracování. Skládá se z dutiny ústní, hltanu, jícnu, volete a žvýkacího žaludku. Vole má funkci zásobní. Obsahuje četné záhyby, které se při hromadění potravy narovnávají a vole tak zvyšuje svůj objem. Buňky předního střeva nemají sekreční ani resorpční funkci (Kodrík, 2004).

### Mesenteron

Mesenteron je hlavní část trávicí trubice, ve které dochází k chemickému rozkladu potravy a resorpci živin. Je tvořen mnoha záhyby a slepými výběžky (caeca), které zvyšují resorpční povrch. Buňky mesenteronu se nazývají hlavní buňky a membrána na jejich povrchu je tvořena mikrovilli, které se efektivně podílejí na zvětšení plochy střeva. Na začátku středního střeva je peritrofická membrána, která obaluje zpracovávanou potravu. Tím chrání buňky epitelu jak chemicky před enzymy, tak i mechanicky před jiným poškozením. Tato membrána obsahuje drobné póry, díky kterým se živiny dostávají ven, ale větší molekuly, jako je nestrávená potrava nebo i různé bakterie zůstávají uvnitř a putují střevem dále až do zadního střeva. Ve středním střevě se často nachází mycetomy a fermentační komory, které obsahují symbiotické mikroorganismy podílející se na trávení hůře rozložitelných živin (Kodrík, 2004).

### Proctodeum

Zadní střevo se dělí na ileum, colon a rectum a slouží k resorpci vody a solí. Na konci vyúsťuje v řitní otvor. Jednotlivé části trávicí trubice jsou od sebe odděleny valvami, které zabraňují zpětnému pohybu potravy (Kodrík, 2004).

Svalovina střeva je příčně pruhovaná a může být dvojího typu – externí a interní. Externí svalovina se napojuje na střevo i integument a interní svalovina se pojí pouze se střevem. Externí svalovina se nachází ve stomodeu a proctodeu a má ve střevě dilatační funkci. Interní svalovina zahrnuje kruhové a podélné svaly okolo střeva. Podílí se na drcení potravy a je dobře vyvinuta zejména okolo hltanu. V Zadním střevu se podílí na posouvání nestrávené potravy ke konečníku. Svalovina stomodea a mesenteronu je inervována a činnost střeva řízena stomatogastrickým nervovým systémem. Proctodeum je kontrolováno z terminálního abdominálního ganglia (Kodrík, 2004).

Trávení potravy je zahájeno slinami produkovanými slinnými žlázami na začátku trávicí soustavy. Přijímanou potravu zvlhčují a upravují její pH a celkové podmínky pro správnou funkci enzymů. Velká část trávení se odehrává ve středním střevě, kde epiteliální buňky produkují trávicí enzymy a také absorbují základní živiny (Kodrík, 2004).

#### 2.2.5.2 Tukové těleso

Tukové těleso představuje funkční analog jater a hraje důležitou roli v metabolismu hmyzu. U larev zavíječe voskového je nažloutlé barvy a svou velkou styčnou plochou s hemolymfou naznačuje velkou metabolickou aktivitu a umožňuje i značnou tracheizaci (Kodrík, 2004).

Tukové těleso obsahuje několik typů buněk (Kodrík, 2004):

- Trofocyty (adipocyty) - jsou odpovědné za většinu metabolických procesů, slouží také k ukládání živin. Zvětšují se během postembryonálního vývoje, dochází v nich k akumulaci živin - tuku, bílkovin, glykogenu. Ke konci vývoje jsou to jedny z největších buněk v organismu.
- Mycetocyty - jsou v nich soustředěny intracelulární bakterie a pomáhají trávení některých složitě rozložitelných živin.
- Chromatocyty - ovlivňují zbarvení tukového tělesa, obsahují granule pigmentu.
- Oenocyty – vysoce specializované buňky ektodermálního původu, podílejí se na tvorbě a sekreci lipoproteinových látek pro novou epikutikulu.
- Urátové bunky (urocyty) - shromažďují některé odpadní produkty metabolismu, jako je např. kyselina močová.

Funkce tukového tělesa lze rozdělit do 2 skupin:

1. Syntéza a sekrece - Tukové těleso syntetizuje řadu významných látek, jako jsou např. zásobní proteiny nebo lipoproteiny a lipophoriny.
2. Mobilizace a ukládání rezerv - Tyto rezervy se poté využívají jako prekursory pro metabolismus v jiných tkáních (Kodrík, 2004).

Tukové těleso také významně ovlivňuje metabolismus sacharidů. Hlavním hmyzím cukrem je neredukující disacharid trehalóza a jeho význam spočívá v usnadnění transportu glukózy ze střeva do hemolymfy (Kodrík, 2004).

Hlavním úkolem tukového tělesa larev je syntetizovat a ukládat rezervy pro růst, svlékání a pro období vývoje kukly. Dospělci slouží převážně jako místo syntézy látek nutných pro reprodukci a let (Kodrík, 2004).

#### 2.2.5.3 Trávení vosku

Voskové pláсты včel jsou přirozenou potravou zavíječe voskového. Tyto pláсты obsahují až 60% vosku. Pro vosk je typický jeho velmi obtížný rozklad, protože obsahuje mimo jiné mastné kyseliny a estery s vysokou molekulovou hmotností. Tento proces trávení vosku larvou zavíječe voskového není zcela prozkoumán a předpokládá se, že se na něm podílí bakterie obsažené ve střevě larvy.

Enzym lipáza extrahovaný ze střeva larvy zavíječe voskového se sice účastní metabolismu některých tuků a olejů, ale není aktivní k myricinu, což je ester vyššího alkoholu obsažený ve vosku. Bylo zjištěno, že larvy zavíječe voskového nedokáží trávit všechny složky včelího vosku. Velkou roli v tomto procesu hraje také tvorba fosfolipidů, protože téměř polovina lipidů ve střevě patří právě mezi fosfolipidy (Wigglesworth, 1965).

#### 2.2.5.4 Dýchací soustava

Zavíječ voskový má vzdušnicovou dýchací soustavu, která bezprostředně zásobuje kyslíkem buňky a tkáň. Skládá se ze systému otevřených trubic (trachejí, vzdušnic) postupně se větvících až na velmi malé chodbičky vstupující do tkání. S vnějším prostředím komunikují uzavíratelnými průduchy (stigmaty) (Kodrík, 2004). Nasávání a vypuzování vzduchu se děje střídavým prodlužováním (pasivní vdech) a zkracováním (aktivní výdech) zadečku (Dogel, 1961).

#### 2.2.5.5 Vylučovací soustava

Hlavním vylučovacím orgánem jsou malpighické trubice umístěné mezi střevem a konečníkem (Dogel, 1961). Jedná se o jednoduché trubicovité žlázy bez kutikuly volně se vznášející v hemocélu. Jsou složeny z velkých buněk pokrytých mikrokly a obsahují velké množství mitochondrií, protože jsou metabolicky velmi aktivní (Kodrík, 2004). Na exkreci látek se také podílejí perikardiální buňky (nefrocyty) uložené po stranách srdce (Dogel, 1961).

#### 2.2.5.6 Cévní soustava

Cévní soustava zavíječe voskového je otevřená, tzn., že hemolymfa volně koluje v dutině zvané hemocél a omývá ostatní orgány. Směr a rychlost jejího toku jsou regulovány vnitřními orgány. Největší podíl na tomto pohybu má dorsální céva, někdy nazývána srdce, které funguje jako pumpa a vhání hemolymfu do těla (Kodrík, 2004; Dogel, 1961).

Hemolymfa v těle plní hned několik funkcí. Tou základní je transport a výměna látek mezi buňkami i celými orgány. Dále udržuje tvar těla, má obranou funkci a může sloužit jako zásobárna vody (Kodrík, 2004; Dogel, 1961).

Hemolymfa má nažloutlou barvu, vodnatou konzistenci a obsahuje velké množství solí, aminokyselin i peptidů. Dále se v ní nacházejí steroidní látky, hormony a sacharidy, z nichž nejdůležitější je transportní disacharid trehalóza složený ze dvou molekul glukózy. Většina lipidů je navázána na proteiny a tvoří tak lipoproteidy. PH se pohybuje okolo 6,4-6,8, tedy slabě kyselé (Kodrík, 2004; Dogel, 1961).

### 2.2.5.7 Nervová soustava

Skládá se z nervových buněk (neuronů) a gliových buněk. Pro hmyz je typická gangliová soustava – nervové buňky jsou soustředěny v uzlinách (gangliích) a představují CNS. Výběžky buněk tvoří obvodové nervstvo. V hlavě je hlavní uzlina – mozek a dále se vytvářejí další menší uzliny na břišní straně těla (Kodrík, 2004).

Nervová soustava se dělí na:

1. CNS – mozek
2. Viscerální nervová soustava
3. Periferní nervová soustava

Mozek je největší a nejdůležitější ganglium. Sbíhají se zde informace z ostatních ganglií i smyslových orgánů. Po zpracování informací je z mozku řízena činnost celého těla (Kodrík, 2004).

Viscerální nervová soustava inervuje přední a zadní střevo, endokrinní soustavu, reprodukční orgány a tracheální soustavu (Kodrík, 2004).

Periferní nervová soustava je tvořena velkým množstvím axonů, které jsou nezávislé, nevětví se a ani netvoří synapse. Axony vedoucí informace do ganglia se nazývají senzory (afery) a axony vedoucí informace z ganglia se nazývají motorické (eferentní). Většina nervů obsahuje oba typy axonů (Kodrík, 2004).

Na nervovou soustavu navazuje smyslová soustava, která přijímá podněty z vnějšího okolí a předává je nervové soustavě k vyhodnocení. Skládá se z mnoha receptorů rozmístěných po celém těle, nejvíce v tykadlech. Ke vnímání otřesů, zvuků a vlnění prostředí slouží orgány na principu napnuté struny nebo blány a vyskytují se převážně na končetinách, hrudi a zadečku (Sedlák, 2000). Vizuálním orgánem jsou složené oči, které umožňují obrazové mozaikové vidění (Kodrík, 2004).

### 2.2.5.8 Endokrinní soustava

Tato soustava představuje mezi bezobratlými nejdokonalejší systém a jejím úkolem je hormonální řízení organismu i samotná produkce hormonů. Hormony totiž zasahují do nitrobuněčných dějů, regulují je a tím prakticky ovlivňují všechny pochody v organismu. Zjednodušeně to funguje tak, že hormony aktivují již existující enzym, nebo vyvolají syntézu nových enzymů. Enzymy poté regulují specifické reakce v buňce. „U hmyzu rozlišujeme v zásadě dvě hormonální soustavy (retrocerebrální komplex a prothorakální žlázy), které fungují v těsné závislosti a další 2 – 3 skupiny buněk (tkání) s endokrinní funkcí“. Retrocerebrální komplex zahrnuje neurosekretické buňky mozkových hemisfér. Prothorakální žlázy jsou párové žlázatité orgány velmi nepravidelného tvaru, nacházející se v prvním hrudním článku a v hlavě. Produkují svlékačí steroidní hormony (ekdysteroidy). U dospělců tento orgán chybí, protože jeho existence závisí na přítomnosti juvenilního hormonu, který se u dospělých jedinců taktéž nevyskytuje (Kodrík, 2004).



## 2.2.5.9 Pohlavní soustava

### Samičí pohlavní soustava

„Hlavní funkcí samičích pohlavních orgánů je produkce vajíček včetně tvorby jejich ochranných struktur a skladování samčích spermií do doby, kdy jsou vajíčka připravena k oplodnění“. Transport spermií je umožněn jednak jejich pohybovou aktivitou a jednak napomáhají i svalové kontrakce reprodukčního traktu samice (Kodrík, 2004).

Samotné pohlavní žlázy (vaječníky) jsou párové. U samic se každý vaječník skládá z jistého počtu vaječných trubiček, vybíhající ze stejného vývodu (vejcovodu). „Během růstu se vajíčko posunuje ve vaječné trubičce směrem k vejcovodu a na místě vajíček již hotových se tvoří na slepém konci trubice z nediferencovaných zárodečných buněk jak nová vajíčka, tak i živné buňky. Oba vejcovody splývají v nepárovou pochvu, vyústující na ventrální straně zadečku pod análním otvorem. Do pochvy se otevírá jednak zvláštní váček, schránka chárová, v němž se po oplození uchová sperma, jednak svalnatý kopulační váček, do něhož je zaváděn pářící orgán samce“ (Kodrík, 2004).

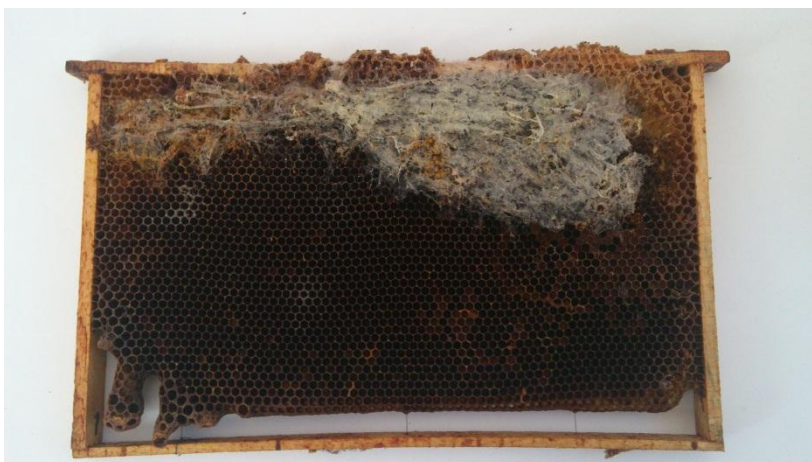
### Samčí pohlavní soustava

„Hlavní funkcí samčí pohlavní soustavy je produkovat a uchovávat spermie a zajistit jejich transport v životaschopném stavu do pohlavních orgánů samice“. Hlavní částí pohlavní soustavy samců jsou párová varlata, která se skládají z testikulárních trubic (folikul). Folikuly produkují samčí pohlavní buňky – spermie. Trubice ústí do dvou chárovodů, které splývají v chámomet, do kterého ústí párové přídatné žlázy. Funkcí těchto žláz je produkce sekretu, který usnadňuje páření. Posledním článkem samčí pohlavní soustavy je kopulační orgán – penis (Kodrík, 2004).

## 2.2.6 Škody způsobené zavíječem voskovým

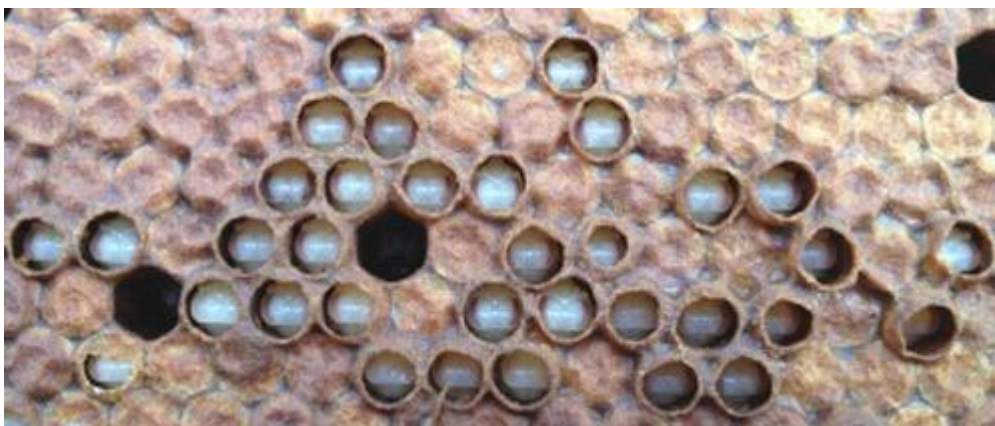
Larvy zavíječe voskového se živí voskovými buňkami, včelími košílkami, zámotky včelích larev, pylem a medem. Preferují tmavé buňky, ve kterých byl vychováván včelí plod a tudíž je zde i více košílek, výkalů a dalších nečistot, které obsahují potřebné dusíkaté látky. Na těchto plástech (viz obr. č. 9) působí největší škody. Tyto stravovací návyky vedou k degradaci plástů na hromady suti s výkaly larev zavíječe voskového a produkovaného vlákna, tzv. hedvábí (Ellis a kol., 2013; Shimanuki a kol., 1992; Droz a Charriere, 2015). Hedvábné vlákno často uvězní včelí plod, který se nemůže dostat z buňky ven (Ellis a kol., 2013).

Obr. č. 9 Starší včelí plást napadený zavíječem voskovým (vlastní foto)



Larvy také mohou tunelovat těsně pod povrchem zavíčkovaných plodových buněk, což mate hygienické chování včel, které rozpoznají nemocný plod a buňky odvíčkují (viz obr. č. 10). Vytvořené se plod je tak odhalen a fekálie larev zavíječe voskového mohou padat přímo na hlavy vyvíjejících se včel, což zvyšuje riziko dalších onemocnění. Tyto odvíčkované buňky s vyvíjícím se plodem se obvykle vyskytují v linii nebo ve shluku, podle směru tunelující larvy zavíječe voskového (Ellis a kol., 2013).

Obr. č. 10 Odvíčkované buňky po napadení tunelujícím zavíječem voskovým (Ellis a kol., 2013)



Larvy zavíječe voskového mohou způsobit značné poškození i samotnému úlu, jako např. provrtávání rámků nebo nástavků (viz obr. č. 11). Některé larvy se prožvýkají skrz dřevěné části úlu pro vytvoření vhodného místa k zakuklení. To může vypadat jako drobná díra, ale i jako velký otvor. Toto poškození je charakteristické pro zavíječe voskového a může snížit pevnost a životnost celého rámků i úlu (Ellis a kol., 2013; Williams, 1997).

Obr. č. 11 Poškození úlu provrtáváním larev zavíječe voskového



### 2.2.7 Kontrola zavíječe voskového

Zavíječ voskový je považován za sekundárního škůdce včely medonosné, a proto v porovnání s jinými přednějšími škůdci (*Varroa destructor*, *Aethina tumida*, *Acarapis woodi*) byl zkoumán z tohoto pohledu jen velmi málo (Ellis a kol., 2013).

Velký význam v kontrole zavíječe voskového hraje prevence (viz tab. č. 5), která spočívá ve vhodném uskladnění plástů a jejich častém kontrolování. Před uskladněním plástů se doporučuje nechat je včelami vyčistit, např. od zbytkového nevytočeného medu. Trávením včelího vosku se larva zavíječe voskového nevyvine zcela úplně. K tomu je zapotřebí dalších živin, které získá z plástového pylu (perga), zámotků včelích larev, „košilek“ a dalších „nečistot“. Mezistěny a plásty, kde nebyl včelí plod, a také plásty bez pylu, zavíječ zpravidla nepoškodí. Proto je vhodné tyto plásty oddělit a skladovat zvlášť, nebo starší plodové plásty zpracovat na vosk (Droz a Charriere, 2015).

V České republice se k likvidaci zavíječe voskového nejčastěji používají sirné knoty, které však nepůsobí na vajíčka. Proto je nutné síření opakovat v rozmezí 2 týdnů, což zvyšuje pravděpodobnost požáru a dochází k většímu úniku SO<sub>2</sub> do okolí. Dále je možné používat kyselinu mravenčí ve formě odparné desky, která se umístí do horního nástavku přikrytého víkem. Ovšem švýcarská studie ukázala, že odpařovaná kyselina mravenčí se ukládá do medu v množství, které pak 2-3x převyšuje normální hodnoty této v medu se přirozeně vyskytující látky. Kyselina mravenčí není nikterak nebezpečná, ale ovlivňuje celkovou chuť medu a tím i snižuje jeho kvalitu. Navíc Codex Alimentarius (mezinárodní dokument vztahující se k bezpečnosti potravin) zakazuje přidávání látek, které by změnily chuťové vlastnosti medu. Podobný účinek na zavíječe voskového má i kyselina octová, ale je pravděpodobné, že riziko kontaminace bude stejné. Alternativním ošetřením pak

mohou být různé přípravky na bázi bakterie *Bacillus thuringiensis* (Droz a Charriere, 2015).

Tab. č. 5 Ochrana při skladování plástů podle Droz a Charriere (2015)

<b>Preventivní opatření</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Oddělit plodové plásty od plástů s medem</li> <li>• Vytavit plásty, které obsahují košilky nebo pyl</li> <li>• Přednostně použít fyzikální techniky (zamrazit, skladovat při nízkých teplotách)</li> <li>• Pravidelně kontrolovat</li> <li>• Zlikvidovat tmavé plásty, nebo je na zimu nechat ve včelstvech (nikde neskladovat)</li> </ul>	Bez použití chemických prostředků
<b>Přímé ošetření</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Použití ošetření jen jako poslední možnost (následně plásty vyvětrat)</li> <li>• Ošetření provádět zřídka a ne bezprostředně před snůškou</li> </ul>	Kyselina mravenčí – riziko reziduí

Účinnost kontrolních opatření určených k eliminaci zavíječe voskového se měří zejména těmito ukazateli:

Mortalita – úmrtnost zavíječe voskového ve všech jeho stadiích.

Spotřeba potravy – množství potravy zkonsumované vyvíjející se larvou. Vhodné zejména pro samostatně umístěné larvy.

Změna ve vývoji – to zahrnuje přibývání na váze (denně, týdně, za instar), změny času ve vývoji, úspěšné dosažení dospělosti.

Neplodnost – denní a celková plodnost zpářených samic.

Paralýza po léčebném opatření – neschopnost larvy vrátit se zpět do původní polohy po 30 minutách ležení na hřbetu (Ellis a kol., 2013).

Pro kontrolu zavíječe voskového se vyvíjí velké množství látek. Tyto vyvíjené látky se většinou musí dopravit do hemolymfy, nejčastěji přímo injekčně (West a Briggs, 1968). Většinou se používá bakteriální toxin, mykotoxin (Vilcinskas a kol., 1997), insekticid, rostlinná silice atd. Tímto způsobem lze také iniciovat imunitní reakci na určitou látku. Při práci je velice důležité udržovat čisté pracoviště i vybavení a pomůcky, kvůli eliminaci kontaminace. Kontaminovaná látka může zkreslit výsledky, nebo je zcela znehodnotit (Ellis a kol., 2013).

Po úspěšném experimentu se testovaná látka začlení do stravy zavíječe voskového a dále se sleduje její účinnost a fyziologické změny ve vývoji zavíječe v různém časovém rozmezí (Ellis a kol., 2013; Burges a Bailey, 1968 A, 1968 B; Eischen a Dietz, 1987).

### 2.2.8 Skladování souší a plástů

Ohledně skladování souší nebo zásobních plástů je zavíječ voskový primární škůdce a může napáchat velké škody. V první řadě je důležitá prevence. Pokud se již tento škůdce do skladu dostane, je zaděláno na problém. Voskové dílo lze skladovat hned několika způsoby, např. zamražením, uskladněním v klimatizovaném skladu nebo i v silných včelstvech (Ellis a kol., 2013).

#### 2.2.8.1 Technika zamražení voskových plástů

Tato metoda spočívá ve sterilizaci voskového díla, nebo i celých medníků mrazem. Charriere a Imdorf (1999) považují za dostatečné  $-15^{\circ}\text{C}$  po dobu 2 hodin,  $-12^{\circ}\text{C}$  po dobu 3 hodin a nebo  $-7^{\circ}\text{C}$  po dobu 4,5 hodin. Také je možné ponechat plásty při teplotě jen mírně pod  $0^{\circ}\text{C}$ , ovšem na dobu minimálně 24 hodin. Po rozmrazení se plásty skladují v pečlivě uzavřených plastových pytlích nebo silných včelstvech bez přítomnosti zavíječe voskového. Při rozmrazování je nutné zamezit přístupu tohoto škůdce k plástům a důležité je také nechat voskové dílo pořádně proschnout, aby nedocházelo k plesnivění (Ellis a kol., 2013).

#### 2.2.8.2 Skladování voskových plástů v klimatizovaných skladech

Tato volba je nejúčinnější, ale také nejdražší a vyplatí se např. na větších včelích farmách. Do klimatizovaného skladu, kde je teplota 0 až  $10^{\circ}\text{C}$ , stálé proudění vzduchu a světlo, se umisťují celé medníky. Včelí plásty musí být zbavené medu a pylu, který by se jinak mohl znehodnotit. Takovýto sklad je vhodný zejména pro panenské dílo, ve kterém ještě nebyl vychováván plod. Včelí plásty lze takto uchovávat v komorách nebo skříních, ve kterých je vhodné ihned po uskladnění použít sirné knoty. Výpary ze sirných knotů účinně zahubí zavíječe, roztoče i plísň v koncentraci  $100\text{g}/\text{m}^3$  během 24 až 36 hodin. Neúčinné jsou pouze na vajíčka, proto se musí aplikace 2x – 3x opakovat po 10 až 14 dnech (Ellis a kol., 2013).

#### 2.2.8.3 Skladování voskových plástů v silných včelstvech

Silná včelstva jsou schopna ubránit svůj úlový prostor i před zavíječem voskovým. Rámky nebo i celý medník bez medu a pylu se vkládá přímo do úlu. Tato metoda je vhodná pro včelaření s nižším počtem včelstev, protože rámky do úlu vkládáme pouze v omezeném množství (Ellis a kol., 2013).

### 2.2.9 Chov zavíječe voskového

Dospělec je v přírodě noční hmyz, který létá v noci a přes den se ukrývá ve stínu. Nejvíce tedy prosperuje ve tmě, teplu a omezené cirkulaci vzduchu bez přítomnosti včel. Ideální teplota je kolem 30 °C a relativní vlhkost 70 % (Ellis a kol., 2013).

Existuje velké množství metod a jejich modifikací pro chov zavíječe voskového, především k účelům jako potrava pro plazy, ptáky a ryby, ale i pro výzkum (Ellis a kol., 2013). Přírodní metoda spočívá v chovu zavíječe voskového ve včelím úlu pouze se staršími rámkami plnými medu a pylu. Do tohoto úlu přesuneme larvy vyšších instarů a zajistíme přístřešek nad úlem. Tma, teplo a nedostatek větrání podpoří kolonizaci rámků. Toto prostředí bez včel by mělo nalákat dospělé jedince zavíječe voskového z okolí (Ellis a kol., 2013).

Všechny laboratorní metody jsou založeny na podobném principu. První krok je umístit vajíčka do kontejneru k potravě, nechat je za příznivých podmínek vylíhnout a krmit se, nejčastěji na uměle připravené stravě, a později, až dosáhnou vyšších instarů nebo se zakuklí, přenést do jiného kontejneru. Tam se zakuklí a vylíhnou dospělci, kteří se nechají spářit a samičky poté nakladou vajíčka, které se opět přesunou k vhodné potravě. Tím se cyklus uzavírá (Ellis a kol., 2013).

Chovné kontejnery se využívají pro fázi vývoje larev z vajíček, další pro vylíhnutí dospělců a jejich páření a nakonec kontejner pro kladení vajíček samičkou. Tyto kontejnery musí být z vhodných materiálů, aby se jimi larvy neprokousaly. Doporučuje se plast, kovy a sklo. Důležitá je také sterilizace kontejneru, která zabrání vzniku a šíření chorob (Ellis a kol., 2013).

Samičky začnou klást vajíčka během několika hodin po páření a to na jakýkoliv povrch. Upřednostňují ale místa vhodná k ochraně vajíček, jako jsou různé průrvy a štěrby (Ellis a kol., 2013; Williams, 1997; Burges a Bailey, 1968).

Do kontejneru k larvám s vyšším instarem se přidává zvlhčený ubrousek nebo papír, ve kterém se larvy kuklí (Ellis a kol., 2013; Eischen a Dietz, 1990). Jsou-li zapotřebí panenské samičky, je nejlepší je oddělit již ve stadiu kukly, protože krátce po vylíhnutí se páří. Při podrobném zkoumání jsou již v této fázi vidět charakteristické rysy pro samce a samice, jako například rozdíly v tykadlech a křídlech (Ellis a kol., 2013; Smith, 1965; Jones a kol., 2002).

### 2.2.10 Potrava

Zavíječ voskový konzumuje potravu pouze v larválním stadiu a to většinou zámotky včelích larev, med, pyl, vosk a nečistoty ve včelím vosku, jakou jsou např. včelí „košilky“. Jedna možnost je tedy obstarat larvám tuto přirozenou stravu, na které se budou dobře vyvíjet. Je to ale poměrně nákladné, hlavně pro chov většího množství. Druhou možností je příprava umělé stravy, která se skládá z medu a

dalších ingrediencí (Ellis a kol., 2013; Bronskill, 1961; Coskun a kol., 2006; Droz a Charriere, 2015).

Jedna z možných krmných směsí pro larvy zavíječe voskového, která se připravuje a používá v entomologickém ústavu v Českých Budějovicích, se skládá z těchto surovin:

Kukuřičný šrot – 660g

Pšeničná mouka – 330g

Pšeničný šrot – 330g

Sušené mléko – 330g

Sušené kvasnice – 165g

Včelí med – 330g

Glycerin – 330g

Včelí vosk – 525g

### 2.3 PCR metoda

PCR (Polymerase chain reaction) je metoda snadného a velmi rychlého (exponenciálního) namnožení libovolného úseku DNA (Mullis, 1990). V současné době jsou známy kompletní nebo téměř kompletní nukleotidové sekvence mnoha genů. A právě k PCR technice je zapotřebí znát pouze tyto nukleotidové sekvence, ohraničující danou zkoumanou oblast (Snustad a kol., 2009). Před objevem PCR se DNA pro naklonování vkládala do bakteriální plasmidu. Tato metoda byla zdoluhavá a náročná, není tedy překvapením, že objev způsobil převrat a díky své spolehlivosti se PCR stala jednou z nejpoužívanějších technik v oboru. PCR je velmi citlivá metoda, teoreticky k dosažení výsledku stačí 1 molekula DNA. Vynalezl ji Kary Mullis v roce 1983, když vyvíjel novou metodu detekce srpkovité anémie. O 10 let později za svůj objev dostal Nobelovu cenu za chemii (Mullis, 1990).

Princip reakce spočívá v opakované denaturaci dvoušrobovice DNA vlivem vysoké teploty na dvě jednotlivá vlákna, která následně slouží jako templát pro syntézu komplementární kopie sestavenou z volných nukleotidů (Innis a kol., 1990; Mullis, 1990; Wolfe, 1993). Templátový řetěz DNA může být syntetizován pouze jedním směrem. Jelikož jsou tyto řetězce umístěny paralelně, probíhá syntéza naproti sobě. Enzym polymeráza „umísťuje“ nukleotidy pouze na konec existujícího řetězce DNA, proto je nutné pro zahájení procesu použít krátký předpřipravený řetězec, tzv. primer, na kterém se zahájí syntéza (Wolfe, 1993). Dříve se používala DNA polymeráza z bakterie *E. coli*, která však byla v každém denaturačním cyklu teplem nenávratně zničena a musela se neustále přidávat. Nyní se používá DNA polymeráza

z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*, tzv. *Taq* polymeráza, která má své optimální podmínky při teplotě kolem 75°C. Při teplotách nad 90°C již není aktivní, ale odolává denaturaci. Díky tomu se mohl celý proces PCR automatizovat a zvýšila se i výtěžnost DNA (Murray a kol., 2002; Snustad a kol., 2009). Množit je možné sekvence DNA od 50-100 bp až do 2,5 kbp (Murray a kol., 2002). Celý proces PCR probíhá v přístroji zvaném termální cykler, který dokáže automaticky rychle zvýšit nebo naopak snížit teplotu a pojme velké množství vzorků, čímž se amplifikace specifických sekvencí DNA stala relativně jednoduchou (Snustad a kol., 2009).

Reakční směs obsahuje:

- Templátovou DNA – DNA izolovaná ze vzorku
- Primery – Specifické a zcela komplementární oligonukleotidy k úseku, na který mají dosedat
- DNA polymerázu – termostabilní enzym zahajující syntézu DNA
- Základní reakční roztok, který obsahuje
  - Nukleotidy
  - Pufry
  - Soli
  - Vodu

Příprava reakce

Pro více vzorků je vhodné připravit si tzv. master mix. Tento master mix obsahuje všechny komponenty reakční směsi, kromě templátové DNA. Po smíchání všech složek ve správném poměru (viz tab. č. 6) se vše důkladně promíchá a poté odpipetuje množství 49 µl do PCR stripu a nakonec přidá 1µl templátové DNA. Je vhodné také připravit pozitivní a negativní kontrolu pro porovnání výsledků. Do negativní kontroly se místo testované DNA přidává voda. Pozitivní kontrola naopak obsahuje takovou DNA, která nám zajistí vznik požadovaného produktu (Ryba a kol., 2009).

Tab. č. 6 Poměr jednotlivých složek pro PCR metodu podle návodu firmy PCR Biosystems (Ryba a kol., 2009)

Složka	Množství
Základní reakční směs	25 µl
Primer 1	2 µl
Primer 2	2 µl
Destilovaná voda	20 µl
Templátová DNA	1 µl



Amplifikace DNA má 3 základní kroky, ke kterým se ještě přidává počáteční denaturace DNA a závěrečná polymerační reakce (Innis a kol., 1990). Tento cyklus se opakuje obvykle 25-35x. Po dvaceti cyklech je stupeň namnožení přibližně  $10^6$  a po třiceti cyklech  $10^9$  (Murray a kol., 2002).

Počáteční denaturace DNA – Dochází k separaci řetězců DNA při teplotě 95°C. Trvá 2-5 minut z důvodu úplného oddělení dlouhého řetězce DNA.

### 1. Denaturace

Probíhá při teplotě kolem 95°C a dochází k uvolnění vodíkových můstků mezi jednotlivými dusíkatými bázemi a tím k rozdělení DNA na 2 vlákna. Tato fáze probíhá jen 30-60 sec., protože ve směsi jsou již i kratší úseky DNA vzniklé z prvního cyklu reakce (Innis a kol., 1990; Snustad a kol., 2009).

### 2. Hybridizace (annealing)

V této fázi na vlákna DNA nasedají primery a nastává příprava k následné syntéze komplementárního řetězce DNA z volných nukleotidů v reakční směsi. Tyto nukleotidy se připojují rychleji než dlouhé jednořetězcové molekuly, ale musí jich být dostatečný počet. Pro připojení primerů je nutné skokově snížit teplotu na 50-60°C. Důležité je nastavit teplotu přesně podle použitého páru primerů. Při příliš nízké teplotě mohou primery nasedat na sekvence komplementární jen z části nebo naopak při vysoké teplotě budou málo hybridizovat a nevytvoří se dostatečné množství kopií (Innis a kol., 1990; Snustad a kol., 2009).

### 3. Elongace

Poslední část probíhá při teplotě 65-75°C. Spárované nukleotidy tvoří primery pro DNA polymerázu, která zahájí syntézu (Innis a kol., 1990). Po prvním cyklu vzniknou z každé molekuly DNA dvě. Každý další cyklus vede opět ke zdvojnásobení počtu molekul DNA (Wolfe, 1993).

Závěrečná polymerační reakce – Dосyntetizování řetězců při teplotě 70°C během 5-10 minut.

Slabou stránkou PRC je, „že se v nízké, ale významné četnosti, zanášejí do amplifikovaných kopií DNA chyby.“ *Taq* polymeráza na rozdíl od většiny ostatních totiž nedisponuje korekční aktivitou a následkem toho produkuje chyby s vyšší četností, než je obvyklé. Amplifikace DNA, kde je požadovaná vysoká přesnost, se provádí s použitím teplotně stabilních polymeráz, které vykazují korekční aktivitu, např. *Pfu* z *Pyrococcus furiosus* nebo *Tli* z *Thermococcus litoralis*. *Taq* polymeráza také není účinná pro amplifikaci delší než několik tisíc nukleotidových párů. Pro tyto delší úseky se používá *Tfl* polymeráza z *Thermus flavus*, která amplifikuje fragmenty až do velikosti 35 kb. Větší úseky nad 35 kb již nelze metodou PCR účinně amplifikovat (Snustad a kol., 2009).

PCR se využívá k diagnóze dědičných onemocnění u lidí, zvláště v případech prenatální diagnostiky, kde je k dispozici pouze limitované množství DNA plodu. Také se hojně využívá při řešení forenzních případů vyžadující identifikaci jedince použitím DNA izolované z velmi malých vzorků tkání (Snustad a kol., 2009).

## 2.4 Elektroforéza

Elektroforéza neboli migrace iontů v elektrickém poli, je hojně využívaná metoda pro analytické dělení biologických látek. Rychlost pohybu iontů je dána jejich odporem a viskozitou roztoku. Odpor zvyšuje velikost, tvar a stupeň solvatace iontu. Rychlost molekul DNA ovlivňuje také konformace DNA. Zde platí, že méně spiralizovaná DNA se pohybuje pomaleji než superspiralizovaná DNA, která je více kompaktní a spory v gelu prochází snadněji. Každý ion se tedy pohybuje charakteristickou konstantní rychlostí (Voeta a Voetová, 1995; Lehninger a kol., 2008). Molekuly DNA přirozeně nesou záporný náboj, jehož hlavním nositelem jsou fosfátové skupiny, a proto se při elektroforéze pohybují směrem ke kladně nabitě elektrodě.

Využití elektroforézy pro dělení proteinů poprvé popsal roku 1937 švédský biochemik Arne Tiselius. „Ve své metodě použil tzv. volnou elektroforézu, při níž umístil roztok proteinů do trubice ve tvaru U a konce převrstvil pufrem. Působením elektrického pole, vytvořeného elektrodami ponořenými na obou stranách do pufru, se molekuly proteinů pohybují k elektrodám s opačnou polaritou.“ Jednotlivé proteiny se na základě odlišného náboje a různého odporu pohybují rozdílnou rychlostí, tím vznikají pohybová rozhraní mezi jednotlivými druhy proteinů. Avšak kvůli konvekčnímu míchání putujících proteinů byla postupně volná elektroforéza nahrazena elektroforézou na nosiči, „při níž se vzorek pohybuje na pevném podkladu, jako je filtrační papír, celulóza nebo gel“ (Voeta a Voetová, 1995).

Dříve se pro identifikaci proteinů elektroforéza používala pouze minimálně, protože často nepříznivě ovlivňovala strukturu a tím i funkci proteinů a také proto, že ostatní metody byly dostupnější. Výhodou elektroforézy je, že proteiny mohou být vizualizovány podle jejich rozdělení. Lze poté snadno a rychle odhadnout počet různých proteinů ve směsi nebo stupeň čistoty jednotlivých proteinů. Elektroforéza umožňuje determinaci rozhodujících vlastností proteinů, jako je izoelektrický bod nebo přibližná molekulární hmotnost (Lehninger a kol., 2008).

„Gelová elektroforéza patří mezi nejpraktičtější a nejvýkonnější metody používané pro dělení makromolekul.“ Nejčastěji se jako gel používá polyakrylamid nebo agarosa, protože lze snadno ovlivnit velikost jejich pórů. „Separace molekul je založena jednak na gelové filtraci, jednak na elektroforetické pohyblivosti dělených látek. Při gelové elektroforéze se velké molekuly oproti malým značně zpožďují, protože obtížněji pronikají gelem. Vyšší koncentrace gelu tedy přispívá k lepší separaci krátkých molekul a naopak nižší koncentrace vede k lepší separaci dlouhých fragmentů. Pro dělení látek s větší molekulovou hmotností, jako jsou např. nukleové

kyseliny, se používá agarosový gel v koncentraci 0,8%. Polyakrylamidový gel se vyznačuje hustší sítí s jemnějšími póry (Voeta a Voetová, 1995; Lehninger a kol., 2008; Yilmaz a kol., 2012).

Proužky jednotlivých látek vzniklé při elektroforetickém dělení se dají zjistit pomocí nejrůznějších technik. Proteiny se obvykle barví ponořením do kyselého roztoku obsahující alkohol a barvivo Coomassie-modř. Také lze pro lepší přesnost proteiny obarvit stříbrem, což je ale poněkud složitější (Voeta a Voetová, 1995; Lehninger a kol., 2008). Nukleové kyseliny se nejčastěji vizualizují látkou ethidiumbromid (EtBr), nebo také GelRed a SYBR Green, které lze aplikovat přímo do gelu. Všechny tyto látky patří mezi mutageny. Obarvené testované vzorky se poté vizualizují pod UV zářením, např. v transiluminátoru (Yilmaz a kol., 2012).

#### Postup při elektroforéze

Agarózový gel se nejčastěji připravuje v koncentraci od 0,5% - 2%. Záleží na požadované struktuře gelu. Agarózový prášek se smísí v požadovaném množství s elektroforetickým pufrům, nejčastěji TAE, a vše se zahřeje v mikrovlnné troubě do rozpuštění. Po vychladnutí se přidá EtBr v množství 0,5  $\mu$ l/ml, promíchá a vše nalije do elektroforetické vany, kde směs po čase ztuhne a vytvoří gel. Nakonec se zajile TAE pufrům (Lee a kol., 2012).

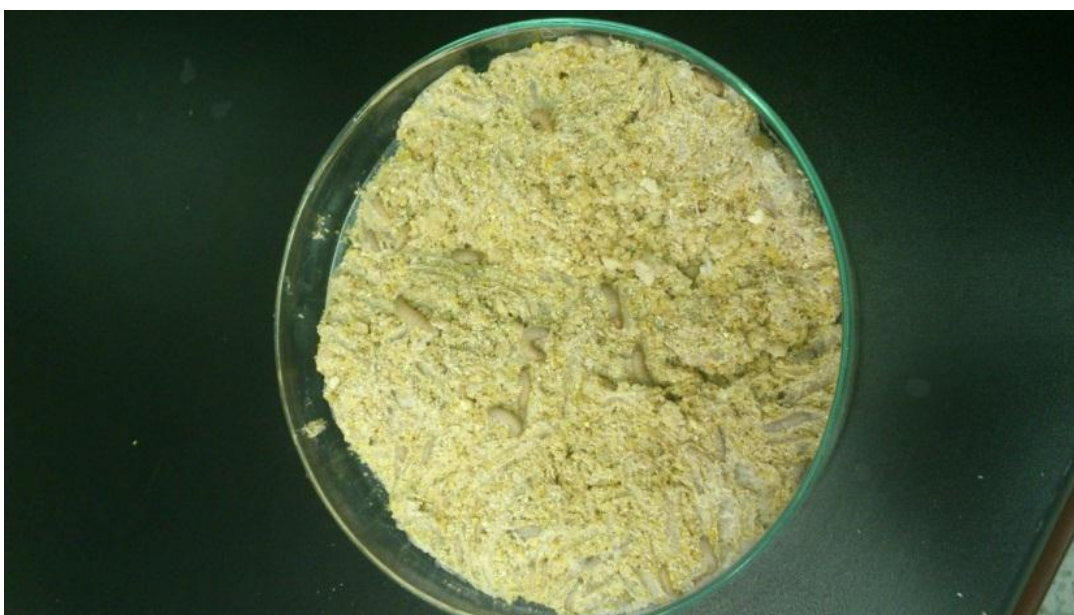
Vzorky DNA se smíchají s nanášecím pufrům, který obsahuje barvivo bromfenolovou modř a glycerol. Obarvený vzorek se snadněji umístí do zářky na elektroforetické vaně a glycerol zajistí klesnutí vzorku skrz TAE pufr až na agarózový gel. Nakonec se připojí zdroj stejnosměrného napětí, nastaví na hodnotu 1-5 V na každý cm mezi elektrodami (nejčastěji 150 V) a spustí. Čím déle proces běží, tím dále molekuly doputují a tím podrobnější bude měřítko. Nesmí však přejít až na konec gelu. Doporučuje se asi 30 minut. Po skončení elektroforézy se odstraní TAE pufr a vyjme gel se vzorky. Po okapání se gel umístí pod UV záření, např. do transiluminátoru pro vyhodnocení a pořízení snímku (Lee a kol., 2012).

### 3. MATERIÁL A METODY

#### 3.1 Chov zavíječe voskového

Larvy zavíječe voskového lze chovat ve větších skleněných Petriho miskách. Do těchto misek se přidá výše uvedená živná směs a larvy zavíječe voskového nižšího instaru (viz obr. č 12). Poté se vloží do boxu, který zaručuje optimální teplotu a pak už se jen kontroluje a přidává potrava.

Obr. č. 12 Chov zavíječe voskového – larvy nižšího instaru s krmnou směsí (vlastní foto)



Larvy vyšších instarů se následně přesouvají do sklenic se zadrátovanou mřížkou ve víčku. Na ni se přiloží hrubší papír, např. filtrační a přelepí lepicí páskou (viz obr. č. 13 a 14). Do sklenice se ještě přidává menší množství krmné směsi pro larvy před zakuklením. Zadrátované víčko je důležité pro následné kladení vajíček již vylíhnutých dospělců zavíječe voskového, kteří kladélkem kladou vajíčka přes mřížku až na filtrační papír (viz obr. č. 15). Důležitá je i velikost oček v mřížce. Příliš malá očka nedovolují prostrčit kladélko a příliš velká se také neosvědčila, protože dospělci začali klást vajíčka po celé sklenici. Další důležitou záležitostí je odstraňování zakuklených jedinců a veškerých nečistot z této mřížky, aby bylo umožněno neustálé kladení vajíček.

Obr. č. 13 a 14 Chov zavíječe voskové – kukly a vajíčka kladoucí dospělci v chovných sklenicích (vlastní foto)



Obr. č. 15 Vajíčka na filtračním papíru (vlastní foto)



Filtrační papír se musí časem měnit za nový z důvodu naplnění vajíčky a vkládá se celý i s vajíčky opět do větší skleněné Petriho misky přikryté víčkem s menším množstvím jemnější potravy (viz obr. č. 16).

Obr. č. 16 Chov zavíječe voskového - vajíčka v Petriho misce s jemnou potravou (vlastní foto)



Malé larvičky ihned po vylíhnutí začínají konzumovat připravenou potravu bohatou na živiny a rychle rostou. Dalším krokem je opět hlídat množství potravy a velikost, nebo instar larvy pro následné vložení do sklenice k zakuklení. Takto se cyklus neustále opakuje a na tomto principu je založen celý chov zavíječe voskového.

### 3.1.1 Výživa pro zavíječe voskového

Jedna z možných krmných směsí pro larvy zavíječe voskového, která se připravuje a používá v entomologickém ústavu v Českých Budějovicích, se skládá z těchto surovin:

Kukuřičný šrot – 660g

Pšeničná mouka – 330g

Pšeničný šrot – 330g

Sušené mléko – 330g

Sušené kvasnice – 165g

Včelí med – 330g

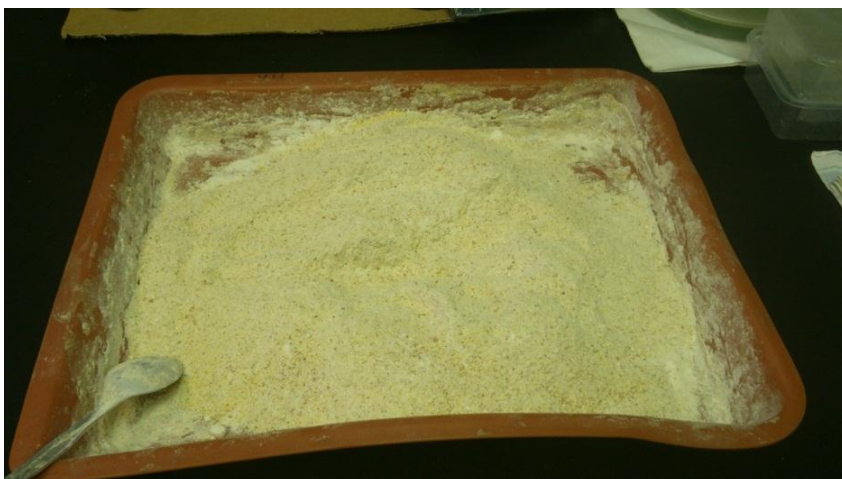
Glycerin – 330g

Včelí vosk – 525g

### 3.1.2 Postup přípravy krmné směsi

Nejdříve je vhodné smíchat včelí med s glycerinem a celé pomalu ohřát. Do druhé nádoby se vloží navážený včelí vosk a také pomalu zahřívá až do úplného roztavení. Mezi tím se naváží sypké směsi podle receptu, tzn. kukuřičný šrot, pšeničnou mouku, pšeničný šrot, sušené mléko (může být tučné i odstředěné), sušené kvasnice a vše se smíchá dohromady (viz obr. č. 17).

Obr. č. 17 Příprava krmné směsi pro zavíječe voskového – smíchané sypké směsi (vlastní foto)



Do této směsi se pomalu přilévá nejprve rozeřtý včelí vosk a okamžitě zpracovává do těsta. Vosk má tendenci rychle tuhnout, např. na stěnách a na dně pracovní misky, proto je velmi důležité jeho pomalé přilévání a rychlé promísení se vznikajícím těstem (viz obr. č. 18).

Obr. č. 18 Pomalé přilévání a okamžité zpracování rozeřtého včelího vosku do vznikajícího těsta (vlastní foto)



Poté se přilévá rozpuštěný med s glycerinem stejným způsobem. Vznikne hrudkovité těsto, které se ručně zpracuje až do homogenní drobné hmoty s minimálním množstvím velkých hrudek (viz obr. č. 19).

Obr. č. 19 Hotové krmné těsto pro zavíječe voskového (vlastní foto)



Tato směs je velmi trvanlivá, za dobrého skladování vydrží až několik měsíců, takže ji lze připravit i do zásoby. Při skladování je důležité zamezit přístupu zavíječe k této potravě a toho se dosáhne nejlépe umístěním do chladicího zařízení, např. lednice.

### 3.1.3 Příprava preparátu housenky zavíječe voskového a mikroskopování

#### Pomůcky:

Skalpel

Pinzeta

Nůžky

Entomologické špendlíky

Petriho miska

Vosková podložka

Kádinka s alkoholem

Mikroskop (binolupa)



## Postup

Nejdříve je vhodné obstarat si dostatečně velké housenky, nejlépe v posledním instaru před zakuklením. Lépe se s nimi pracuje a orgány jsou snadněji rozpoznatelné. Stačí pouze pár jedinců, které se ponechají v Petriho misce.

Housenka se usmrtí v etanolu a položí na voskovou podložku hřbetem dolů. Prvním špendlíkem se přichytí tělo housenky pod hlavou, druhým špendlíkem na opačném konci u zadečku. Dalším krokem je rozstříhnutí nůžkami nebo rozříznutí skalpelem pokožky po celé délce tak, aby se nepoškodily vnitřní orgány. Poté se pinzetou natáhne pokožka do stran a zafixuje entomologickými špendlíky. Pro lepší vizualizace je vhodné celý preparát ponořit do vody, zabrání se tím přílišnému odlesku orgánů. Nyní je preparát hotov a může se přejít k samotnému mikroskopování.

Mikroskopování probíhalo na přístroji Olympus SZX 12 napojeném na kameru Olympus DP 50. Ohledně mikroskopování je nejdůležitější optimalizovat osvětlení, které je zcela zásadní pro pořizování makrofotografií. Tento úkon trvá převážnou část celého fotografování. Kvalitu fotografie zvýší ponoření preparátu do vody, protože tím se zabrání odlišnému lesknutí se jednotlivých orgánů. Poté se už jen zaostřuje a vybírají vhodné části preparátu, které budou fotografovány. Dále je vhodné pořídit snímky zaostřené na jednotlivé orgány skrz celé tělo. Přes speciální programy, např. photoshop lze poté na počítači vytvořit z této série snímků jeden, ve kterém budou zaostřeny všechny orgány (viz obr. č. 25 a 26).

### 3.1.4 Příprava vzorků a kultivace

V prováděném výzkumu byly použity čtyři různé kategorie. Ve třech kategoriích bylo po 9 vzorcích + jako poslední kategorie, byly výkaly zavíječe. Celkem tedy 28 vzorků. První testovaná kategorie vzorků obsahovala larvy zavíječe voskového, které se volně pohybovaly v Petriho misce s mezistěnou kontaminovanou původcem onemocnění MVP, bakterii *Paenibacillus larvae* (označeno zkratkou PR). Ke druhé sadě vzorků bylo zapotřebí udělat speciální klíčky z malého pletiva, které slouží k fixaci zavíječe voskového. Tyto klíčky se zafixovanou larvou zavíječe voskového se poté zapíchly do mezistěny kontaminované bakterií *Paenibacillus larvae* tak, aby housenka měla přístup k vosku, ale jinými částmi těla se ho nedotýkala (označeno zkratkou PK)(viz obr. č. 20). Toto opatření je důležité zejména proto, aby se bakterie nemohly dostat na povrch housenky zavíječe. Musejí tedy projít skrz trávicí soustavu housenky zavíječe voskového spolu s přijímanou potravou (voskem).

Obr. č. 20 Larvy zavíječe voskového fixované v klíčkách z jemného pletiva (vlastní foto)



Dalším typem vzorku byla housenka zavíječe voskového v Petriho misce s mezistěnou bez kontaminace *Paenibacillus larvae*, která sloužila jako negativní kontrola (označeno zkratkou NK). Poslední vzorek představují výkaly housenek, které neměly přístup k výše uvedené bakterii (označeno zkratkou 0). Všechny housenky byly krmeny krmeny 2 dny, aby strava mohla projít celým trávicím traktem.

Následně se vykrmené housenky vypitvaly a zpracovaly do vzorků. Housenky, které se volně pohybovaly v Petriho misce bez kontaminace a housenky, které byly zafixované v klíčkách se rozdělily na třetiny (přední - označeno číslem x - 1, střední - označeno číslem x - 2, a zadní část - označeno číslem x - 3) a umístily do mikrokumavky typu Eppendorf. Po každém rozdělení bylo nutné sterilizovat používané pomůcky nad plamenem ohně z kahanu. Složitější to bylo u housenek, které se volně pohybovaly v petriho misce kontaminované bakterií *Paenibacillus larvae*. Jelikož povrch těla housenek mohl být kontaminovaný, musela se vypitvat celá trávicí soustava, rozdělit opět na třetiny a následně vložit do mikrokumavky typu Eppendorf. Aby se zabránilo kontaminaci bakterií *Paenibacillus larvae* a tím znehodnocení výsledků, po každé operaci se opět sterilizovaly všechny nástroje plamenem ohně z kahanu. Poslední vzorek v mikrokumavce tvořily výkaly housenek.

### 3.1.4.1 Postup přípravy inokula toluenovou metodou

Dalším krokem byla extrakce spor bakterie *Paenibacillus larvae*. Pro tento výzkum byla vybrána klasická toluenová metoda, která využívá k přípravě inokula toluen.

Množství 0,1 g vzorku se rozpustilo v 0,9 ml toluenu a poté nechalo protřepávat po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě v přístroji Biosan Multi Bio RS-24 (viz obr. č. 21). Následně se toluen a v něm vyextrahované spory převedly do jiné mikrozkušavky a přidalo se 0,2 ml destilované vody. Tato směs se vložila na 5 minut do vodní lázně přístroje značky Polyscience o teplotě 90 °C. Tento krok je důležitý pro usmrcení všech nežádoucích bakterií. Přežijí pouze bakterie *P. larvae*, které je velmi odolné. Po vytažení vzorků z vodní lázně se opět promíchaly na homogenizátoru a po vychladnutí, se ze dna mikrozkušavky pipetou odebralo množství 200 µl vodní fáze pro inokulaci na MYPGP agar. MYPGP je živné médium pro kolonie bakterií, které obsahuje koncentrovaný hovězí odvar 3,5 ml, kyselý kaseinový hydrolyzát 6 g, rozpustný škrob 0,5 g, kvasničný autolyzát 15 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3g, Na-pyruvát 1 g, agar 10 g, H<sub>2</sub>O destilovaná 1000 ml a kyselina nalidixová 30 mg/l. (Ryba a kol., 2009).

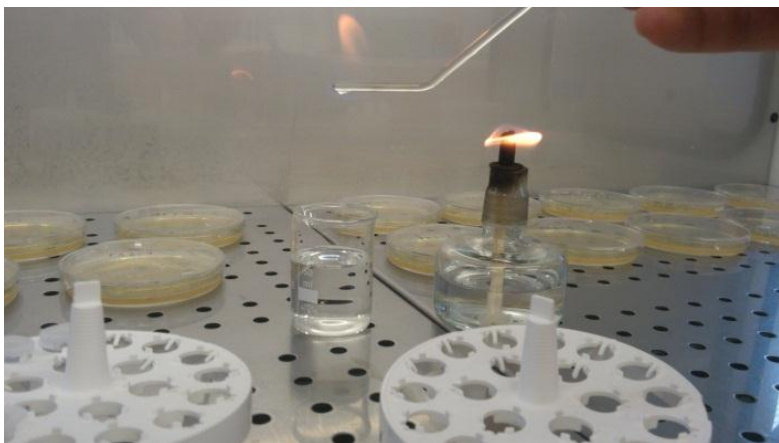
Obr. č. 21 Protřepávání vzorků v přístroji Biosan Multi Bio RS-24 (vlastní foto)



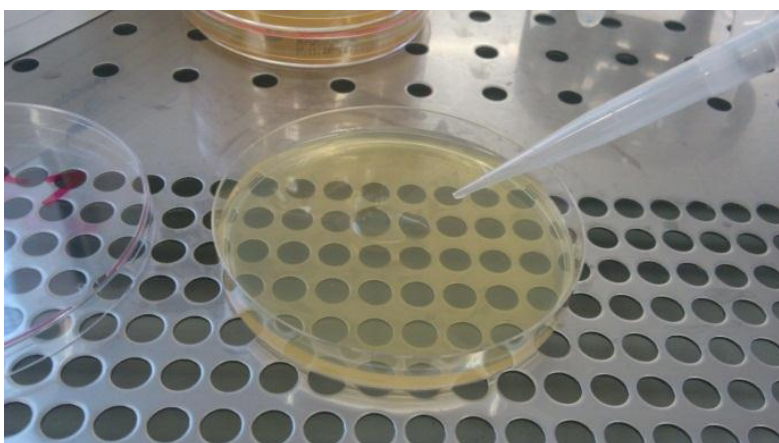
Vlastní inokulace probíhala v laminárním boxu Aura Vertical S. D. 4. Nejdříve bylo nutné připravit si vše potřebné, tzn. Petriho misky s MYPGP agarem, kalibrovanou pipetu na množství 200 µl, stojan se vzorky, kahan, roztírací skleněné tyčinky, nádobku s etanolem a vatu na otírání skleněné tyčinky. Petriho misky s MYPGP agarem bylo třeba ještě pečlivě označit podle vzorků a bylo možné začít. Nejdříve se vysterilizovaly skleněné tyčinky. Je lepší jich mít více, aby se nemuselo čekat, než vychladnou. Sterilizace se prováděla namočením do etanolu s následným projetím nad plamenem kahanu (viz obr. č. 22). Po vyhoření se skleněná tyčinka otřela vatovým ubrouskem a po vychladnutí byla připravena k použití. Ze dna mikrozkušavky se vzorkem se odebralo množství 200 µl vodní fáze a přesunulo na MYPGP agar (viz obr. č. 23) se správným označením. Skleněnou tyčinkou se vzorek důkladně rozetřel po celé ploše (viz obr. č. 24) a Petriho miska s inokulem se

uzavřela a umístila ke kraji laminárního boxu do igelitového uzavíratelného sáčku, kvůli navýšení koncentrace CO<sub>2</sub> pro vhodnější podmínky při růstu *P. larvae*. Takto se postupovalo u každého z celkových 28 vzorků. Připravená inokula se nechala 10 dní kultivovat.

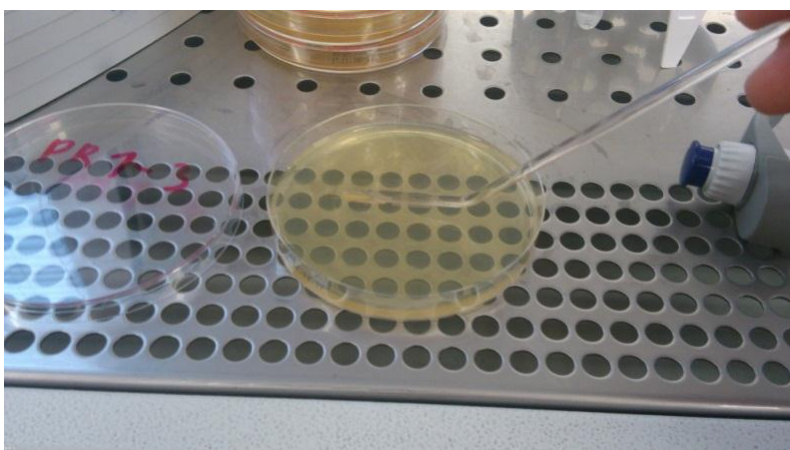
Obr. č. 22 Sterilizace skleněné tyčinky namočené do etanolu nad plamenem (vlastní foto)



Obr. č. 23 Pipetování vzorku na MYPGP agar (vlastní foto)



Obr. č. 24 Roztírání vzorku skleněnou tyčinkou (vlastní foto)



Po 10 dnech kultivace přišlo na řadu vizuální zhodnocení. Kolonie *P. larvae* se posuzují z morfologického hlediska a každá narostlá kolonie představovala přibližně 50 bakterií ve vzorku. Identifikovat kolonie *P. larvae* lze také pomocí peroxidového testu. Ten spočívá ve zjištění přítomnosti nebo nepřítomnosti enzymu peroxidázy v kolonii bakterií. Na testovanou kolonii se kápne 3% roztok peroxidu vodíku a pokud tyto bakterie tvoří enzym peroxidázu, dojde k rozkladu peroxidu na kyslík a vodu. Tato reakce je viditelná jako vznik bublinek. Bakterie *P. larvae* tento enzym nemá, tudíž negativní peroxidový test potvrdí přítomnost této bakterie.

### 3.1.5 Izolace DNA *P. larvae* ze zavíječe voskového

DNA je uschována v buněčném jádře každé buňky. Aby bylo možné se k DNA dostat a pracovat s ní, je nutné nejdříve rozrušit buňku a odstranit nežádoucí látky. Čím více se těchto látek odstraní, tím bude DNA čistější a bude se s ní lépe pracovat. Proto na izolaci DNA existují různé soupravy chemikálií s mnoha druhy pufrů a proteináz, kterými se vzorek několikrát proplachuje. Já jsem použil soupravu od firmy Omega bio-tek, pouze proteináza K byla od firmy Fermentas.

#### Postup izolace

Vzorek zavíječe voskového byl rozdělen na 3 části, přední – ve výzkumu označeno číslem 1, střední – označeno číslem 2 a zadní – označeno číslem 3. První zavíječ se živil na mezistěnách bez kontaminace *P. larvae* – označeno písmenem N, druhý byl umístěn do mezistěn infikovaných touto bakterií – označeno písmenem P. Celý postup izolace DNA je podle návodu E.Z.N.A. Bacterial DNA Kit (2003).

Ke každému z šesti vzorků jsem přidal 1 ml destilované vody a homogenizoval. Do mikrozkušavky typu eppendorf jsem napipetoval 150 µl BTL pufru a 20 µl proteinázy K. Směs jsem následně promíchal pomocí přístroje Vortex – T genie 2. Homogenizovanou směs jsem umístil do vodní lázně o 55°C po dobu 1 hodiny. Po vychladnutí jsem přidal 5 µl RNasy. Tato látka je důležitá kvůli rozložení nepotřebné RNA. Směs jsem opět promíchal a vložil do centrifugy nastavené na 10 000 otáček/min na dobu 2 minuty. Tímto krokem se oddělí sediment a supernatant, který jsem následně přepipetoval do jiné eppendorfky a smíchal s 220 µl BDL pufru. Následovala další vodní lázeň o teplotě 65°C po dobu 10 minut. Po vychladnutí jsem ještě přidal 220 µl 100% etanolu a důkladně promíchal ve Vortexu. Obsah této mikrozkušavky jsem poté přepipetoval do promývací zkumavky s filtrem, přes který po následné centrifugaci proteče veškerá kapalná fáze do 2 ml eppendorfky umístěné pod promývací zkumavku a DNA se zachytí na filtru. Další látkou k promývání je HB pufr v množství 700 µl, který se použije 2x. Opět stačí centrifugace 10 000 otáček/min po dobu 2 minut. Nakonec jsem vzorky DNA spolu s promývací mikrozkušavkou vložil do 1,5 ml eppendorfky a k DNA přidal 70 µl elution pufru. Po 3-5 minutách působení proběhla poslední centrifugace. Celý tento poslední krok jsem ještě jednou zopakoval. Elution pufr způsobil uvolnění DNA

z filtru do eppendorfky a tím celý proces izolace skončil. Dlouhodobé skladování DNA pak probíhá při teplotě -20 °C.

### 3.2 PCR metoda

PCR (polymerase chain reaction) je metoda pro rychlé namnožení požadovaného úseku DNA založená na principu replikace nukleových kyselin. Reakce probíhá v přístroji zvaném termocykler, který dokáže rychle snížit nebo zvýšit teplotu.

#### Postup

Nejdříve jsem si připravil tzv. master mix, do kterého se později přidávají jednotlivé vzorky DNA. Master mix obsahuje základní reakční směs, 2 primery – ohraničují vybraný úsek DNA, destilovanou vodu a templátovou DNA. Základní reakční směs lze pořídit již připravenou. Já jsem použil produkt PCR BIO Ladder I od firmy PCR Biosystems. Obsahuje DNA polymerázu, MgCl<sub>2</sub>, pufr a všechny 4 dusíkaté báze - adenin, thymin, cytosin, guanin (Ryba a kol., 2009).

Ve výzkumu byly použity tyto primery:

F3: TCCTGGCTCAGGACGAAC

B3: ACAGGTTGCCCCGTCTTT

Do 1,5 ml eppendorfky jsem odměřil 200 µl základní reakční směsi, 16 µl od každého primeru, celkem tedy 32 µl a nakonec 160 µl destilované vody. Tento master mix jsem promíchal a poté odpipetoval 8x49 µl do PCR stripu pro 8 vzorků. Jako poslední jsem přidal 6x1 µl vyzolované DNA, 1 µl DNA *P. larvae* pro pozitivní kontrolu a jedna kolonka PCR stripu zůstala bez DNA jako negativní kontrola. Nakonec se PCR strip vložil do termocykleru, vybral vhodný program a zahájila se reakce (Ryba a kol., 2009).

### 3.3 Elektroforéza

Elektroforéza je metoda, při které dochází k dělení látek na základě jejich odlišné pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli. Nejčastěji se používá pro vyhodnocení PCR reakce. Do elektroforetické vany se nalije agarosový gel, ve kterém po zapnutí stejnosměrného proudu putují záporně nabitě částice ke kladně nabitě elektrodě a naopak. Přitom větší molekuly procházejí gelem pomaleji, menší naopak rychleji. V transiluminátoru se poté podle vzoru posoudí, zda vzorek obsahuje zkoumaný úsek DNA.

## Postup

Agarosový gel jsem připravil smícháním 0,5 g agarosy s 50 ml pufru TAE. V mikrovlnné troubě se agarosový prášek rozpustil a vznikla čirá tekutina. Po jejím mírném vychladnutí jsem přidal 5  $\mu$ l ethidium bromidu (EtBr), promíchal a nalil do elektroforetické vany, kde gel postupně chladnutím tuhnul. Nakonec jsem na ztuhlý gel nalil TAE pufr.

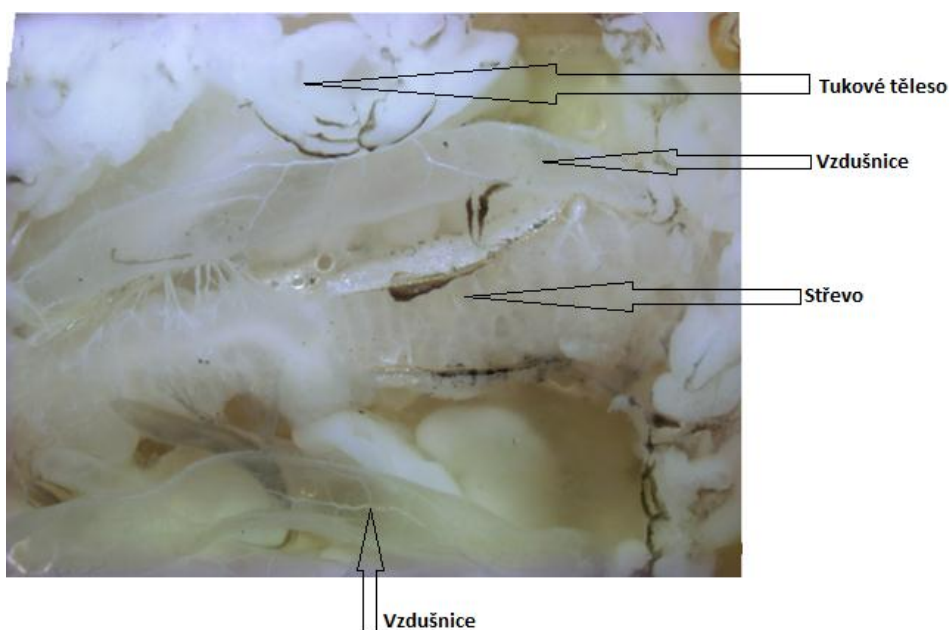
Vzorky s DNA jsem připravil smícháním s nanášecím pufrům a množství 5  $\mu$ l odpipetoval do zarážky v elektroforetické vaně. Takto jsem postupoval u každého z 8 vzorků. Nanášecí pufr obsahuje barvivo bromfenolovou modř pro kontrolu úspěšného vložení vzorků do zarážky na elektroforetické vaně a dále obsahuje glycerol, který pomáhá k poklesu vzorku skrz pufr až ke gelu. Po puštění stejnosměrného 120 V elektrického proudu přešla DNA do agarosového gelu a záporně nabitě molekuly DNA se začaly přemisťovat směrem k anodě a naopak kladně nabitý EtBr směrem ke katodě (při elektrolýze má anoda kladný náboj a katoda záporný). Za 30 minut po ukončení procesu jsem agarosový gel vložil do transiluminátoru pro vyhodnocení. Během elektroforézy se EtBr naváže na molekuly DNA, díky čemuž lze v transiluminátoru pod UV světlem zjistit výsledky elektroforézy.

## 4. VÝSLEDKY

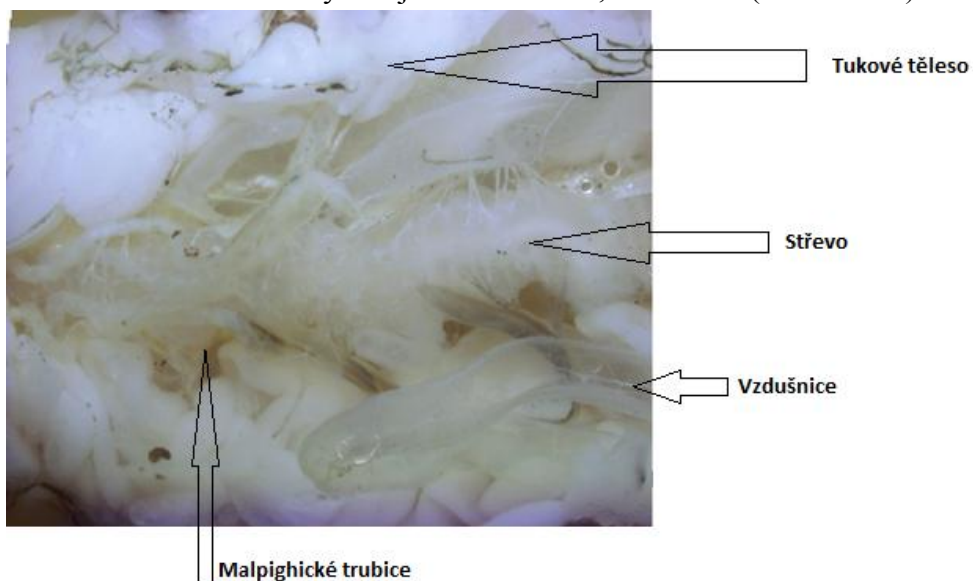
### 4.1 Výsledky pitvy *Galleria mellonella*

Obrázky z pitvy *Galleria mellonella* jsou pořízeny pomocí přístroje Olympus SZX 12 připojeného na kameru Olympus DP 50 a lze na nich vidět tukové těleso, vzdušnice, střevo a malpighické trubice (viz obr. č. 25 a 26). O jejich funkci je psáno výše v kapitole Zavíječ voskový.

Obr. č. 25 Pitva housenky zavíječe voskového, přední část (vlastní foto)



Obr. č. 26 Pitva housenky zavíječe voskového, zadní část (vlastní foto)





## 4.2 Výsledky kultivace

Po 10 dnech kultivace přišlo na řadu vizuální zhodnocení. Kolonie *P. larvae* se posuzují z morfologického hlediska a každá narostlá kolonie představovala přibližně 50 bakterií ve vzorku. Ovšem z důvodu nízkého množství narostlých bakterií nejsou výsledky neprůkazné. U testovaných vzorků negativní kontroly (NK) se na MYPGP agaru neobjevily žádné kolonie *P. larvae*, kromě vzorku NK3-1 (viz tab. č. 7) což je přední část třetího zavíječe. Tento zavíječ neměl mít přístup ke sporám *P. larvae*, takže možné vysvětlení by mohlo být nedostatečná sterilizace pomůcek. Pravděpodobnější možnost je, že těsně před procesem izolací spor přelezl přes kontaminované místo, nebo se začal krmit kontaminovanou mezistěnou anebo přišel do styku s kontaminovaným zavíječem.

Kultivační test vzorků PK bohužel také neodhalil žádné spory *P. larvae*, kromě vzorku PK3-2 (viz tab. č. 7), což je prostřední část třetího zavíječe. Tato skupina zavíječů byla fixována v klíčkách vyrobených z jemného pletiva s předpokládaným přístupem ke sporám. Příčinu absence spor při kultivačním testu přikládám příliš pevnému upevnění larev v klíčkách a tím pádem špatnému, případně žádnému přístupu k potravě, nebo pravděpodobně nižší teplotě a obsahu CO<sub>2</sub> při kultivaci.

Vzorky skupiny PR obsahovaly nejvíce spor, ale ani tato kategorie nevyšla podle očekávání. Jedná se o vzorky z larev, které se volně pohybovaly v kontaminovaném prostředí. Spory se objevily ve vzorcích PR1-1, PR2-2 a PR3-2 (viz tab. č. 7). Důvodem, proč spory na agaru nevyklíčily, může být malé množství přidaných spor na mezistěny, nebo příliš malé vzorky ze zavíječe (pouze 0,1g). Larvy zavíječe se také mohly úmyslně vyhýbat sporám, které byly umístěny spíše ostrůvkovitě, nebo spory špatně ulpívaly na povrchu těla larvy. Výkaly larev neobsahovaly žádné spory *P. larvae*.

Tab. č. 7 Výsledky kultivace spor *P. larvae* ze zavíječe voskového

Vzorek	Část těla	Počet kolonií <i>P. larvae</i>	Přibližný počet spor ve vzorku
NK1	1	0	0
	2	0	0
	3	0	0
NK2	1	0	0
	2	0	0
	3	0	0
NK3	1	2	100
	2	0	0
	3	0	0
PK1	1	0	0
	2	0	0
	3	0	0
PK2	1	0	0
	2	0	0
	3	0	0
PK3	1	0	0
	2	Nespočet	Nespočet
	3	0	0
PR1	1	Nespočet	Nespočet
	2	0	0
	3	0	0
PR2	1	0	0
	2	17	850
	3	0	0
PR3	1	0	0
	2	1	50
	3	0	0
Výkaly	0	0	0

Vysvětlivky k tabulce:

NK= vzorek zavíječe voskového, který se volně pohyboval v prostředí bez kontaminace *P. larvae*

PK= vzorek zavíječe voskového, který byl fixován v kličce a měl přístup k *P. larvae*

PR= vzorek zavíječe voskového, který se volně pohyboval v prostředí kontaminovaném *P. larvae*

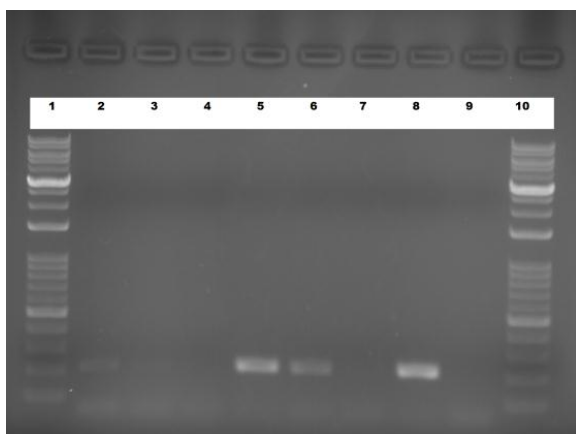
Část těla: 1 = přední část, 2 = střední část, 3 = zadní část

### 4.3 Výsledky PCR a elektroforézy

Po ukončení elektroforézy se agarosový gel vložil do transiluminátoru, který pomocí UV záření zachytil EtBr navázaný na DNA. Poté se již podle stupnice a kontrolních vzorků vyhodnotily výsledky.

Zavíječ voskový umístěn v nekontaminovaném prostředí podle očekávání neobsahoval žádné spory *P. larvae*. U druhého zavíječe, který byl umístěn do kontaminovaného prostředí, se očekával vysoký počet spor ve všech částech. V přední části se opravdu vyskytovalo větší množství spor původce MVP, ve druhé části však bylo těchto spor pravděpodobně méně a ve třetí se dokonce nevyskytovaly žádné (viz obr. č. 27).

Obr. č. 27 Vyhodnocení vzorků v transiluminátoru, výsledný proužek na gelu odpovídá velikostně amplikonu o 211 bp



Vysvětlivky k obrázku: 1 – velikostní marker, nekontaminovaný zavíječ 2 - přední část, 3 - střední část, 4 - zadní část, kontaminovaný zavíječ 5 - přední část, 6 - střední část, 7 - zadní část, 8 - pozitivní kontrola, 9 - negativní kontrola, 10 – velikostní marker

## 5. DISKUSE

### 5.1 Kultivace

Kultivace *P. larvae* je považována za obtížnou, protože tato bakterie neochotně roste na umělých médiích. Nejlépe roste a klíčí v žaludku včelí larvy, umělá kultivace nedosahuje ani zdaleka takových výsledků.

Pro účely tohoto výzkumu byla kultivace prováděna na MYPGP agaru při pokojové teplotě po dobu 10 dní. Výsledky ovšem nebyly průkazné, protože počet narostlých kolonií nedosahoval požadovaného množství a důvodů, proč tomu tak bylo, může být hned několik. Podle některých autorů by měla být kultivace prováděna za vyšší teploty. Katznelson (1950) prováděl kultivaci *P. larvae* při teplotě 33°C, Hrabák (2007) při teplotě 35°C, Nordström a kol. (2002) uvádí teplotu 36°C a Han a kol. (2008) a Ryba a kol. (2009) dokonce 37 °C. Tyto hodnoty jsou podobné teplotě ve včelím úlu, kde přirozeně dochází k růstu a sporulaci *P. larvae*.

Další otázka se týká vhodné atmosféry pro kultivaci. Hrabák (2013) poukazuje na potřebu zvýšit koncentraci CO<sub>2</sub> při kultivaci *P. larvae* a Hornitzky a Nicholls (1993) také uvádějí lepší růst těchto bakterií při vyšší koncentraci CO<sub>2</sub>. Totéž se shoduje s přirozenými podmínkami ve včelím úlu. Nordström a kol. (2002) inkuboval *P. larvae* v 5 % CO<sub>2</sub>. Borracci a kol. (2003) prováděl kultivační testy v atmosféře s hodnotou až 30 % CO<sub>2</sub>. Nordström a Fries (1995) ve svém výzkumu zjistili, že přidavek 5 % CO<sub>2</sub> do inkubační atmosféry výrazně zlepšil růst *P. larvae* na většině testovaných médií. Nejvýraznější posun byl vidět u J-agaru, na kterém bez uměle vytvořené atmosféry nevyrostly žádné bakterie, ale s přidavkem 5 % CO<sub>2</sub> předčil všechny ostatní testovaná kultivační media, včetně MYPGP agaru. MYPGP agar je ale dle jejich výsledků vhodnější pro růst *P. larvae* při inokulaci menšího množství spor a také se zdá být spolehlivější, jelikož poměr pozitivních výsledků byl vyšší (147 pozitivních ze 186 vzorků) než u J-agaru (118 pozitivních ze 195). V poslední době je snaha o co největší citlivost kultivačních metod, tzn., aby při inokulaci nízkého množství spor vyklíčil co největší počet, a proto autoři považují MYPGP agar za nejlepší kultivační medium pro *P. larvae*. Dále ve svém výzkumu zjistili, že pouze 7,6 % inokulovaných spor vyklíčí na MYPGP agaru bez zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub>, což se shoduje s hodnotou 6 %, kterou ve svém výzkumu udávají Dingman a Stahly (1983).

Ve mnou provedeném výzkumu byla pravděpodobně koncentrace CO<sub>2</sub> také vyšší, ale nikterak významně, protože Petriho misky byly zabaleny pouze do neprodyšného igelitu. Další možné důvody nedostatečného klíčení spor mohou být např. kontaminace mezistěn nízkým počtem spor, příliš malé množství vzorku (pouze 0,1g), práce s nedostatečně vychladnutými pomůckami po jejich sterilizaci, u fixovaných jedinců také nemuselo dojít ke styku s kontaminovanou potravou, nebo se jen larvy zavíječe voskového vyhýbaly sporám *P. larvae*. Klíčky bylo nutné

pořádně sevřít, aby fixované larvy nemohly uniknout. Z tohoto důvodu mohly být larvy ve stresu ze stísněných podmínek a stahovaly se hlouběji do klícky.

Podle výsledků je zřejmé, že nejvíce spor obsahovaly larvy volně se pohybující v kontaminovaném prostředí (3 vzorky). V kategorii s fixovanými zavíječi byl 1 kontaminovaný vzorek a v kategorii výkalů žádný.

## 5.2 PCR a elektroforéza

Výsledky izolace spor z larvy zavíječe voskového ponechaném 3 dny v kontaminovaném prostředí, namnožení genetického materiálu PCR metodou a následné vyhodnocení na transiluminátoru vyšlo podle očekávání. Negativní kontrola neobsahovala žádné spory *P. larvae* ani v jedné z 3 částí. U pozitivního vzorku pravděpodobně nejvíce spor obsahovala přední část housenky, tedy okolí hlavy. Méně potom střední část a v zadní části již nebyly spory žádné. Lze to vysvětlit dvojím způsobem. První z nich je, že spory postupně procházely přes trávicí trakt a do poslední části se již nestihly dostat. Je možné, že průchod střevem je pro spory velice pomalý a mohou uvíznout v mnoha záhybech. Druhá možnost je, že některý z metabolitů housenky zavíječe, nebo jejich mix, dokáže narušit odolný obal spory, která pak snadno podlehne nepříznivým podmínkám v žaludku. V každém případě by bylo vhodné provést další výzkumy, nejlépe s větším počtem jedinců.

PCR metoda je velice přesná a je schopná zachytit dokonce i jedinou sporu *P. larvae* mezi dalšími bakteriemi přirozeně se vyskytujícími v zažívacím traktu zavíječe voskového. Morrissey a kol. (2015) však uvádí, že PCR metoda má i své nevýhody, např. není dobře možné porovnávat výsledky mezi laboratořemi kvůli obtížnému opakování a standardizaci a doporučuje používat novou metodu MLST (multilocus sequence typing) pro lepší rozpoznání kmene *P. larvae*. Tato metoda je založená na sekvenování 7 genů, které kódují hlavní metabolické dráhy. Vzhledem k tomu, že tato metoda sekvenuje přímo DNA, mohou být výsledky snadno porovnávány v různých laboratořích, na rozdíl od jiných metod, které určují fenotyp. Heid a kol. (1996) doporučuje používat Real-time PCR pro vyhodnocení vzorků z každého cyklu v reálném čase. Výhodou je poměrně přesné určení počtu sledovaného genetického materiálu, tedy v našem případě počtu spor *P. larvae*. Mello (2001) a Cho a kol. (2006) však poukazují na přetrvávající nedostatky této metody. Zmiňují zejména dlouhou dobu reakce a ne příliš přesnou syntézu materiálu. Jako důvod uvádějí špatný typ vytápění v blocích, který nezaručí homogení teplotu a dále pak metoda vyžaduje velké množství vzorku. Proto byla vynalezena metoda micro real-time PCR vyznačující se lepší tepelnou vodivostí a kratší dobou reakce. Tato metoda je schopná provést 40 cyklů během méně než 20 minut (Cho a kol., 2006), na rozdíl od běžné PCR, kde 35 cyklů trvá asi 85 minut (Ryba a kol., 2009). Han a kol. (2008) porovnával metody real-time PCR a ultra-rapid real-time PCR, které se od sebe liší přístrojem pro průběh PCR, termálním cyklerem. Ve výzkumu byly použity primery 16SNF a 16SNR komplementární k sekvenci genu 16S rRNA *P. larvae*. Ve výsledku autoři vyzdvihnou velkou citlivost obou metod oproti klasické

PCR a dodávají, že ultra-rapid real-time PCR vyšla v testu lépe a dominovala hlavně z časového hlediska, protože reakce proběhla za necelých 8 minut.

### 5.3 Prevence a kontrola moru včelího plodu

Včelí onemocnění a oslabení imunity včelstva jsou nyní v poslední době hojně diskutované záležitosti. A není se čemu divit. „Včely hromadně hynou, trpí parazity a nemocemi a vyžadují stále větší péči, mají-li se vůbec udržet.“ Stupňuje se industrializace chovu včel, který má na mnoha místech charakter průmyslové výroby medu nebo podobu „opylovacího průmyslu“ a jiných plantáží. Zejména v posledních 15 letech dochází k enormnímu úhynu včelstev. Po zimě 2002/2003 zaznamenali němečtí, rakouští a švýcarští včelaři ztráty jedné čtvrtiny, v některých oblastech až tři čtvrtin včelstev. Další velké úhyny včelstev nastaly v zimě 2006/2007 ve Spojených státech, kde v některých regionech došlo ke ztrátám až 80% včelstev. Tento celosvětový problém se týká i ČR. V roce 2012 zde došlo k úhynu asi jedné třetiny včelstev. Přitom normální ztráty, se kterými se každý rok počítá, jsou do 10% (Hradil, 2014).

Dnešní systém klasického konvenčního zemědělství v České republice je založen na pěstování několika málo druhů kulturních plodin, které se neustále točí v jednoduchých osevních postupech, pokud se tedy tyto plodiny nesejí na stejném pozemku každý rok. Pěstované rostliny svým specifickým odběrem živin půdu velmi vyčerpávají, a proto poté musí přijít na řadu intenzivní hnojení průmyslovými minerálními hnojivy. Organická hnojiva, jako je např. chlévský hnůj, nestačí pokrývat spotřebu živin z půdy z důvodu nedostatku chovaných hospodářských zvířat. S tím souvisí snižování mikrobiální aktivity v půdě, zhoršování půdní struktury, vyplavování živin a zrychlená eroze půdy. Všechny tyto problémy způsobují hospodářským plodinám stres, který vede k vyšší náchylnosti k chorobám a škůdcům a snížením výnosů. Abychom tomu předcházeli, používáme preventivně chemické postřiky, tzv. pesticidy, dále pak morforegulátory nebo desikanty. A právě tyto pole plné pesticidů, převážně řepkové, kam včelaři často kočují, způsobují spolu s monodietní podvýživou včelám stres, což vede k jejich oslabení a zvýšení náchylnosti k různým nemocem, jako je např. mor včelího plodu.

V Americe je situace místy ještě horší. Zdejší „farmáři a sadaři jsou existenčně závislí na opylení obrovských monokultur a včelaři se svými úly naježdí tisíce kilometrů ročně, aby jejich včelstva opylovala floridské pomeranče, kalifornské mandloně, pensylvánské jabloně, nebo borůvky v Maine. Celkové vyčerpání včelstev končí ztrátou jejich přirozené imunity a přicházejí nemoci jako CCD (syndrom zhroucení včelstev). Nejmodernější vynález už navrhuje kočování se včelami na korbách nákladňáků jako příliš nákladný. Nejnověji se včelstva nakládají do dřevěných kontejnerů, které se doprostřed sadů shazují z letadel. Tyto včely, které pád přežijí, se rozletí do kraje, opylí, co mohou, a pak pojdou, protože nemají možnost návratu do úlu“ (Kopička, 2014). V Číně mají také problémy s opylováním, ale řeší je zcela odlišným způsobem. Nasazují vyškolené zemědělské pracovníky,

kteří ručně opylují ovocné sady. Také je snaha o vytvoření robotické včely v různých institucích po celém světě, např. na Harvardské univerzitě (Walsh, 2013). Všechny tyto události poukazují na důležitost opylovačů v zemědělství i v celé krajině. A právě včele medonosné se přisuzuje v tomto směru největší podíl.

Včely se vyznačují také jako bioindikátory krajiny. Jsou citlivé na kvalitu ovzduší, vody a dokonce i půdy. Kontaminovaná půda „produkuje“ kontaminované rostliny, ze kterých včely sbírají kontaminovaný pyl. Hromadné úhyny včelstev nám dávají znamení, že se s krajinou něco děje, že se jako lidé nechováme k životnímu prostředí dobře a rozumně a tím ohrožujeme nejen včely, ale i všechny živočichy, rostliny a dokonce i sebe.

Na druhé straně však stojí i jinak smýšlející lidé rozvíjející alternativní a přirozené včelaření, u nichž včelstvo přestává být výrobním prostředkem, ale stává se partnerem. Tito lidé respektují celistvost včelstva a jeho přirozené schopnosti a potřeby, jako je zimování na medu, chov na přirozeném díle bez mezistěn nebo alternativní možnosti chovu i léčby. S tímto přístupem souvisí také náležitá péče o krajinu a snaha o zvýšení její pestrosti a rozšíření potravní nabídky pro včely a další hmyz (Hradil, 2014). Tento způsob chovu se řídí podle požadavků včel, nikoliv podle požadavků člověka a vede k posílení a využívání přirozené obranyschopnosti včelstva. Celková imunita včelstva je v dnešní době mnohdy velmi oslabena a je zapotřebí velkých vstupů, převážně v podobě léčiv, což představuje další ekonomické náklady. Alternativní a přirozené včelaření dbá na odolnost včelstva a snaží se zachovat co největší hygienické chování včel, které je velmi důležité pro potlačení některých chorob, zvláště moru včelího plodu. Nižší medné výnosy pak kompenzuje nízkými náklady za vstupy a celkově nižšími úhyny včelstev. Kovařík (2016) uvádí, že hygienické chování podporují převážně 2 geny. První je zodpovědný za odvíčkování postižených buněk a druhý za odstranění infikovaného plodu. Včely s těmito geny jsou schopny se vypořádat s velkým počtem spor bez klinických příznaků MVP. Průměrná frekvence těchto genů v populaci je kolem dvaceti procent, ale šlechtěním lze podstatně zvýšit. V minulých letech byl trend šlechtění včel na brzký jarní rozvoj pro maximální využití první snůšky a velké medné výnosy. Nyní se ale ukazuje, že šlechtění včel na vysokou úroveň hygienického chování a různé tolerance je velmi důležité, mnohdy ještě důležitější. Neuendorf a kol. (2004) v tomto smyslu doporučuje chovat včelstva také s vyšší odolností i k roztoči *Varroa destructor*, který dělá mnoha včelařům největší starosti, jelikož významně oslabuje včelstva, která jsou poté náchylnější k různým nemocem. K výraznějšímu pokroku tímto směrem by mohl přispět i stát vhodnou podporou.

Von der Ohe (2003) navrhuje využívat včelstva, která zdárně přečkala infekční tlak moru včelího plodu ze stanoviště bez klinických příznaků a dále s nimi pracovat, protože je pravděpodobné, že mají větší odolnost proti původci moru včelího plodu, bakterii *P. larvae*. Dále doporučuje při nízké kontaminaci včelstva provést některé léčebné opatření, např. přemetení včelstva na mezistěny, a po vymizení klinických příznaků tyto odolná včelstva dále rozmnožovat a využívat

jejich genetického potenciálu. K tomuto kroku by však v České republice byla nutná změna v legislativě. Nyní to funguje tak, že se při pozitivním nálezu u více než 15 % včelstev na stanovišti pálí všechna, tedy i zdravá včelstva. Ohledně české legislativy spojené s včelařstvím proběhl v nedávné době návrh o změnu zákona č. 166/1999 Sb., O veterinární péči a o změně souvisejících zákonů, jehož zastáncem byl také Klíma (2016). Změna zákona by ukládala povinnost provést metodu přemetení včelstva na mezistěny u všech včelstev na stanovišti bez klinických příznaků MVP, pokud by se zde vyskytl pozitivní nález u méně než 15% včelstev a k tomu provést základní desinfekci vybavení plamenem, případně horkým parafinem. Tento návrh ovšem nebyl přijat.

Kovařík (2016) však před tímto postupem varuje a poukazuje na výzkum na Novém Zélandu, ve kterém se u jedné třetiny včelstev po přemetení nejdříve počet spor snížil na minimum, ale po několika týdnech došlo k prudkému nárůstu spor a včelstva spěla k zániku. Právě kvůli tomuto scénáři nedoporučuje léčebnou metodu přemetení včelstva na mezistěny. S tímto výrokem však nesouhlasí Klíma (2016) a komentuje to tím, že dle jeho vlastních zkušeností je metoda přemetení včelstva na mezistěny velmi účinná, tedy alespoň na území České republiky. K tomu dodává, že toto léčebné opatření je nutné kombinovat s vyhledáním a následnou likvidací všech zdrojových včelstev v okolí pro snížení infekčního tlaku a zamezení možnosti loupění infikovaných včelstev. Právě loupění slabých infikovaných včelstev je podle Ondruše (2013) a Hansen a Brødsgaard (1999) nejčastější příčina šíření MVP a jako preventivní opatření navrhuje ponechávání dostateku zásob po medobraní, chov pouze silných včelstev a pro lepší orientaci včel před úlem doporučují umístit po stranách úlu keře, stromy nebo nějaké jiné předměty, podle kterých se mohou včely lépe orientovat.

Autoři zabývající se problematikou MVP poukazují na nedávné studie, podle kterých je velmi podstatný počet spor ve včelstvu před metodou přemetení. Při slabém napadení včelstva s méně než 20 CFU (jednotky tvořící kolonie) bez klinických příznaků se po přemetení včelstva množství spor významně snížilo na téměř nedetekovatelnou úroveň. Při počtu 6000 CFU ve včelstvu se po přemetení také snížil počet bakterií *P. larvae*, ale po několika týdnech se opět objevily klinické příznaky a tvorba nových spor. Tudíž umělé i přírodní rojení takového včelstva může být efektivní způsob vertikálního přenosu MVP do neinfikovaných oblastí. Z těchto výzkumů je patrné, že rozdíl mezi vertikálním šířením a léčebnou metodou je v množství spor ve včelstvu (Rauch a kol., 2009; Pernal a kol., 2008; Hansen a Brødsgaard, 1999; Fries a Camazine, 2001; Fries a kol., 2006; Genersch, 2010).

Zastáncem metody přemetení včelstva na mezistěny je i Munawar a kol. (2010), jež prováděl výzkum s 24 včelstvy, které vykazovaly klinické příznaky MVP. Všechna včelstva přemetl na mezistěny a 2 dny nechal opatrně vyhladovět, aby se zbavily veškerých zásob medu a vyprázdnily se. Poté je přesunul do nového úlu a zjistil, že se množství *P. larvae* snížilo, jelikož u žádného včelstva se nevyskytovaly klinické příznaky MVP. Proto autoři považují tuto metodu za velmi



efektivní možnost kontroly MVP. Taktéž Hansen a Brødsgaard (1999) hodnotí toto léčebné opatření kladně. Mezi velké výhody řadí záchranu včelstva a také to, že metoda nezanechává žádná rezidua v medu ani vosku, na rozdíl od antibiotik. Za nevýhodu uvádí pouze větší pracnost.

Kladné výsledky jsou hlášeny z různých částí světa. Po zavedení této metody se snížil výskyt MVP v mnoha státech, např. ve Švédsku (Munawar a kol., 2010), Dánsku (Hansen, 1992) nebo na Novém Zélandu (Goodwin a van Eaton, 1999).

Ohledně dalších preventivních metod by mohlo být vhodné oddělené obhospodařování včelstev doporučované autory Hansen a Brødsgaard (1999), které zjednodušeně spočívá ve vkládání rámků a nástavků pouze do stejného úlu. Obnáší to označení veškerých úlů, nástavků a rámků a jejich kontrolování při každém zásahu do včelstva nebo vytáčení medu, což se může zdát jako velmi pracné, ale dle autorů si na to lze časem zvyknout. Tato metoda hospodaření může velmi pomoci k omezení přenosu infekce.

V rámci přímých metod k potlačení choroby by se v budoucnu mohl uplatnit přípravek na potlačení enzymu PICBP49 produkovaného bakterií *P. larvae*, nebo porušení genu zodpovědného za jeho produkci. Tento enzym rozkládá peritrofickou membránu v zažívacím traktu larvy včely medonosné a bakterie se poté snadno dostávají k epitelovým buňkám, kde se dále uplatňují toxiny narušující přilehlé hostitelské buňky. Pokud je však narušen gen způsobující produkci tohoto enzymu, ztrácí *P. larvae* svou virulenci, protože se nedokáže dostat přes peritrofickou membránu (Poppinga a Genersch, 2015; Garcia-Gonzalez 2013, 2014 C). Jsou však zapotřebí ještě mnohé další výzkumy, jak ohledně této genetické metody, tak ohledně celé problematiky moru včelího plodu pro pochopení různých souvislostí v patogenitě *P. larvae* a navržení funkčních preventivních i přímých metod ochrany včelstev.

## 6. ZÁVĚR

Práce v rešeršní části shrnuje současné poznatky o moru včelího plodu, od historie této včelí nemoci a problémech s klasifikací původce onemocnění, přes patogenezi, virulenci, možnosti šíření a škody způsobené touto bakterií až po preventivní opatření, různé formy kontroly a legislativní záležitosti v České republice spojené s MVP. Druhá část rešerše pojednává o zavíječi voskovém, převážně o jeho vývojovém cyklu, orgánových soustavách a možnostech chovu. Nechybí ale ani kapitoly škody ve včelařství způsobené larvami tohoto motýla nebo možnosti prevence a kontroly. Obě tyto části poté spojuje praktická část práce.

Cílem experimentální části bylo zjistit, zda je zavíječ voskový díky svému dobře uzpůsobenému trávicímu traktu, který dokáže rozložit i velmi stabilní látky, jako je včelí vosk, schopen narušit odolné vrstvy spory *P. larvae*, čímž by mohlo dojít ke změně klíčivosti těchto spor. Výzkum spočíval v naočkování bakterie *P. larvae* na mezistěny, na kterých se poté krmily larvy zavíječe voskového. Některé se pohybovaly volně, jiné byly fixované ve speciálních klíčkách, které zabraňovaly kontaminaci sporami povrchu těla larev. Po několika dnech krmení se larvám vypitvaly trávicí soustavy a následně z nich izolovaly spory toluenovou metodou. Tyto vzorky se naočkovaly na MYPGP agar a nechaly 10 dní kultivovat. Nakonec ještě proběhla PCR analýza s následným vyhodnocením elektroforézou.

Výsledky kultivačních testů bohužel nevyšly v souladu s očekáváním, jelikož nebyly průkazné z důvodu nízkého počtu narostlých kolonií *P. larvae*. O možných příčinách, proč tomu tak bylo, se pojednává v kapitole diskuse. Ovšem z výsledků PCR testu s elektroforetickým vyhodnocením je patrné, že nejvíce spor *P. larvae* se pravděpodobně vyskytovalo v přední části housenky, méně potom ve střední části a v poslední třetině dokonce nebyly detekovány žádné spory. Jedno z možných vysvětlení je pomalý průchod spor zažívacím traktem housenky zavíječe. Další vysvětlení by mohlo být narušení nebo rozklad spor ve střevech zavíječe. Proti moru včelího plodu stále neexistuje žádný lék a patří mezi nejnebezpečnější včelí onemocnění, které včelařům způsobuje velké ekonomické škody. Proto na základě PCR výsledků doporučuji provést další výzkumy, nejlépe s větším počtem vzorků, ve snaze pochopit funkci enzymů v trávicím traktu zavíječe.

Příroda má všechny své složky v rovnováze, ale člověk tuto rovnováhu narušuje ve snaze maximalizovat veškeré výnosy a zvýšit svůj prospěch. Jedním z příkladů může být i v České republice povinná léčba včelstev ne příliš šetrnými přípravky, které spolu s přemírou aplikace pesticidů na pole, ještě k tomu mnohdy v nevhodný čas, způsobují oslabení imunity včelstva, které je pak náchylnější na infekční tlak z okolí a hyne. Další věc je cílená likvidace zavíječe voskového. Silné včelstvo si svůj úlový prostor dobře uhlídá, pouze slabá a nemocná včelstva s tím mají problém a jsou odsouzena k zániku. Poté přichází na řadu právě housenky zavíječe voskového, které se postarají o recyklaci živin z voskového díla a jejich návrat do přírodního koloběhu. Tím plní také dezinfekční a ozdravnou funkci v krajině. A zde

se nabízí otázka. Poradí si i s původcem moru včelího plodu, bakterií *P. larvae*, která se běžně vyskytuje ve včelím vosku, primární složce potravy housenky zavíječe voskového? Příroda bývá v mnoha případech krásně jednoduchá. Často máme řešení přímo před nosem, ale pro jeho jednoduchost ho ani nevidíme. Je možné, že by to tak mohlo být i v tomto případě?

Bylo by dobré mít možnost přímo zasáhnout a vyléčit včelstvo od MVP. Bohužel takový lék zatím neexistuje, a proto se musíme více soustředit na prevenci. Je to nejlepší způsob kontroly každé nemoci, obzvlášť nemoci neléčitelné. Důležité proto je, aby včelaři chovali svá včelstva silná a zdravá, nezvyšovali stresovou zátěž, udržovali hygienu na vysoké úrovni a řídili se obecnými zásadami včelaření. Tímto způsobem včelaření nejenže snížíme riziko onemocnění včelstev, ale zvýší se také odolnost včelstev proti stresu, jejich síla a schopnost lépe zvládat nepříznivé podmínky. Na oplátku dostaneme odměnu v podobě pohledu na silná, zdravá a prosperující včelstva s dobrým medným výnosem a radosti z dobře vykonané práce.

## 7. SEZNAM LITERATURY

Ash, C., Proest, F. G., Collins, M. D. (1993) Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test, *Antonie van Leeuwenhoek*. 64, 253– 260.

Ash, C., Farrow, J. A. E., Wallbanks, S., Collins, M. D. (1991) Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small subunit-ribosomal RNA sequences, *Lett. Appl. Microbiol.* 13, 202–206.

Ashiralieva, A., Fünfhaus, A., Borriss, R., Genersch, E. (2008) Identification of entomocidal toxins in *Paenibacillus* larvae. *Apidologie*. 39, 599.

Ashiralieva, A., Genersch, E. (2006) Reclassification, genotypes and virulence of *Paenibacillus* larvae, the etiological agent of American foulbrood in honeybees - a review. *Apidologie*. 37 (4), 411-420.

Bailey, L. (1981) *Honey Bee pathology*. New York: Academic Press.

Bělín, V. (2003) *Noční motýli České a Slovenské republiky*. Kabourek. Zlín.

Borracci, S. E., Chacana, P. A., Palacio, A., Terzolo, H. R. (2003) In Vitro Generation of *paenibacillus larvae* Spores. XXXVIIIth Apimondia International Apicultural Congress - Book of Abstracts, Ljubljana.

Bronskill, J. F. (1961) A cage to simplify the rearing of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (*Pyrallidae*). *Journal of the Lepidopterists' Society*. 15 (2), 102-104.

Burges, H., Bailey, L. (1968 A) Persistence of *Bacillus thuringiensis* in foundation beeswax and beecomb in beehives for the control of *Galleria mellonella*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 28 (2), 217- 222.

Burges, H., Bailey, L. (1968 B) Control of the greater and lesser wax moths (*Galleria mellonella* and *Achroia grisella*) with *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 11 (2), 184-195.

Bzdil, J. (2007) Detection of *Paenibacillus larvae* spores in the debris and wax of honey bee by the Tween 80 method. *Acta Vet. Brno*. 76, 643–648.

Bzdil, J. (2014) Co dělat při podezření na mor. *Včelařství*. 9/2014, 260-261.

Coskun, M., Kayis, T., Sulanc, M., Ozalp, P. (2006) Effects of different honeycomb and sucrose levels on the development of greater wax moth *Galleria mellonella* larvae. *International Journal of Agriculture and Biology*. 8 (6), 855-858.

Damiani, N., Fernández, N., Porrini, M., Gende, L., Álvarez, E. (2014) Laurel leaf extracts for honeybee pest and disease management: antimicrobial, microsporidicidal, and acaricidal activity. *Parasitol. Res.* 113, 701–709.

- Dingman, D. W., Stahly, D. P. (1983) Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components. *Applied and Environmental Microbiology*. 46 (4), 860-869.
- Droz, B., Charriete, J. D. (2015) Nach Wachsmottenbehandlung Ameisensäurerückstände im Honig. *Agroscope, Zentrum für Bienenforschung, Schweizerische Bienen-Zeitung*, 8/2015, 14-16.
- Duben, J. (2013) Prevence nákaz včel. *Včelařství*. 4/2013, 114-115.
- Ebert, T. A., Kevan, P. G., Bishop, B. L., Kevan, S. D., Downer, R. A. (2007) Oral toxicity of essential oils and organic acids fed to honey bees (*Apis mellifera*). *J. Apic. Res.* 46, 220–224.
- Eischen, F., Dietz, A. (1990) Improved culture techniques for mass rearing *Galleria mellonella* (*Lepidoptera: Pyralidae*). *Entomological News*. 101, 123-128.
- Ellis, J. D., Graham, J. R., Mortensen, A. (2013) Standard methods for wax moth research. *Journal of Apicultural Research*. 52 (1), 1-17.
- Evans, J. D. (2003) Diverse origins of tetracycline resistance in the honey bee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* 83, 46–50.
- Evans, J. D., Armstrong, T. N. (2005) Inhibition of the American foulbrood bacterium, *Paenibacillus larvae larvae*, by bacteria isolated from honey bees. *J. Apic. Res.* 44, 168–171.
- Evans, J. D., Armstrong, T. N. (2006) Antagonistic interactions between honey bee bacterial symbionts and implications for disease. *BMC Ecol.* 6 (4).
- Fernández, J., Porrini, M., Podaza, E., Damiani, N., Gende, L., Eguaras, M. (2014) A scientific note on the first report of honeybee venom inhibiting *Paenibacillus larvae* growth. *Apidologie*. 45, 719-721
- Fries, I., Camazine, S. (2001) Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honeybee epidemiology. *Apidologie*. 32, 199–214.
- Fries, I., Lindström, A., Korpela, S. (2006) Vertical transmission of American foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in honey bees (*Apis mellifera*). *Vet. Microbiol.* 114, 269–274.
- Fünfhaus, A., Ashiralieva, A., Borriss, R., Genersch, E. (2009) Use of suppression subtractive hybridization to identify genetic differences between differentially virulent genotypes of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American foulbrood of honeybees. *Environ. Microbiol. Rep.* 1, 240–250.
- Fünfhaus, A., Genersch, E. (2008) Molecular analysis and comparison of different genotypes of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood of honeybees. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 121, 400.

Garcia-Gonzalez, E., Genersch, E. (2013) Honey bee larval peritrophic matrix degradation during infection with *Paenibacillus larvae*, the aetiological agent of American foulbrood of honey bees, is a key step in pathogenesis. *Environ Microbiol.* 15, 2894-2901.

Garcia-Gonzalez, E., Müller, S., Ensle, P., Süßmuth, R. D., Genersch, E. (2014 A) Elucidation of sevadicin, a novel nonribosomal peptide secondary metabolite produced by the honey bee pathogenic bacterium *Paenibacillus larvae*. *Environ Microbiol.* 16, 1297-1309.

Garcia-Gonzalez, E., Müller, S., Hertlein, G., Heid, N. C., Süßmuth, R. D., Genersch, E. (2014 B) Biological effects of paenilamicin, a secondary metabolite antibiotic produced by the honey bee pathogenic bacterium *Paenibacillus larvae*. *MicrobiologyOpen.* 3, 642-656.

Garcia-Gonzalez, E., Poppinga, L., Fünfhaus, A., Hertlein, G., Hedtke, K., Jakubowska, A., Genersch, E. (2014 C) *Paenibacillus larvae* chitin-degrading protein PICBP49 is a key virulence factor in American Foulbrood of honey bees. *PLoS Path.* 10 (7), e1004284.

Genersch, E. (2010) American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. Institute for Bee Research, Friedrich-Engels-Str. 32. 103, 10-19.

Genersch, E., Ashiralieva, A., Fries, I. (2005) Strain- and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae* subsp. *Larvae*, the causative agent of American foulbrood disease in honey bees. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7551–7555.

Genersch, E., Forsgren, E., Pentikäinen, J., Ashiralieva, A., Rauch, S., Kilwinski, J., Fries, I. (2006) Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies classification, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 501–511.

Goodwin, R. M., Van Eaton, C. (1999) Elimination of American Foulbrood Without the Use of Drugs. A Practical Manual for Beekeepers. National Beekeepers Association of New Zealand, Napier, New Zealand.

Goodwin, R. M., Perry, J. H., Houten, A. T. (1994). The effect of drifting honey bees on the spread of American foulbrood infections. *Journal of Apicultural Research.* 33, 209–212.

Han, S., Lee, K., Park, K., Pak, S. (2013) Antimicrobial activity of honey bee venom against select infectious fish pathogens. *N. Am. J. Aquacult.* 75, 445–448.

Hansen, H. (1992). Forekomst af ondartet bipest og bipest-bakterien I Danmark. *Tidsskrift for Biavl.* 126, 125-128.

Hansen, H., Brødsgaard, C. J. (1999) American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control, *Bee World.* 80, 5–23.

- Hansen, H., Brødsgaard, C. J. (1997) Cleaning of beehives contaminated with spores of the foulbrood bacterium *Paenibacillus larvae larvae*. Proceedings of the XXXV International Apicultural Congress of Apimondia, Antwerp. Apimondia Publishing House; Bucharest, Romania.
- Hansen, H., Brødsgaard, C. J. (2003) Control of American foulbrood by the shaking method. *Apiacta* 38, 140-145.
- Heid, C. A., Stevens, J., Kivak, K. J., Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6, 986–994.
- Hertlein, G., Müller, S., Garcia-Gonzalez, E., Poppinga, L., Süßmuth, R., Genersch, E. (2014) Production of the catechol type siderophore bacillibactin by the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*. *PLoS ONE*, 9, e108272.
- Heyndrickx, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Janssen, P., Kersters, K., De Vos, P., Logan, N., Ali, N., Berkeley, R. (1996) Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash et al. 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *Pulvifaciens*, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 270–279.
- Higes, M., Suarez, M., Llorente, J. (1997) Comparative field trials of *varroa* mite control with different components of essential oils (thymol, menthol, and camphor). *Res. Rev. Parasitol.* 57, 21–24.
- Hitchcock, J. D., Stoner, A., Wilson, W. T., Menapace, D. M. (1979) Pathogenicity of *Bacillus pulvifaciens* to honeybee larvae of various ages (*Hymenoptera: Apidae*). *J. Kansas Entomol. Soc.* 52, 238–246.
- Hoage, T. R., Rothenbuhler, W. C. (1966) Larval honeybee response to various doses of *Bacillus larvae* spores, *J. Econ. Entomol.* 59, 42–45.
- Hornitzky, M. A. Z., Karlovski, S. (1989) A culture technique for the detection of *Bacillus larvae* in honey bees. *Journal of Apicultural Research.* 28, 118–120.
- Hornitzky, M. A. Z., Nicholls, P. J. (1993) J medium is superior to sheep blood agar and brain heart infusion agar for the isolation of *Bacillus larvae* from honey samples. *Journal of Apicultural Research.* 32 (1), 51-52.
- Hornitzky, M. A. Z., Oldroyd, B. P., Sommerville, D. (1996) *Bacillus larvae* carrier status of swarms and feral colonies of honeybees (*Apis mellifera*) in Australia. *Australian Veterinary Journal.* 73, 116–117.
- Hrabák, J. (2007) Proteolytické enzymy vegetativních forem a spor bakterie *Paenibacillus larvae*. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Plzni, Ústav mikrobiologie. Plzeň.
- Hrabák, J. (2011) Mor včelího plodu. *Včelařství.* 11/2011, 367-368.

- Hrabák, J. (2012) *Paenibacillus larvae* poprvé zachycen u lidí. Včelařství. 11/2012, 369.
- Hrabák, J. (2013) Zamyšlení nad cenou jednoho mikrobiologického vyšetření. Včelařství. 02/2013, 47.
- Hrabák, J. (2014) Mor včelího plodu a jeho klinické příznaky. Včelařství. 9/2014, 258-259.
- Hradil, R. (2014) Včely jinak, alternativy v chovu včel a přístup k nim. Hranice: Fabula.
- Cho, Y. K., Kim, J. T., Lee, Y. S., Kim, Y. A. (2006) Clinical evaluation of micro-scale chip-based PCR system for rapid detection of hepatitis B virus. Biosens. Bioelectron. 21, 2161–2169.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. (1990) PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc.
- Jones, G., Barabas, A., Elliott, W., Parsons, S. (2002) Female greater wax moths reduce sexual display behaviour in relation to the potential risk of predation by echolocating bats. Behavioural Ecology. 13 (3), 375-380.
- Katznelson, H. (1950) *Bacillus pulvifaciens* (N. SP.), an organism associated with powdery scale of honeybee larvae, Journal of Bacteriology. (59), 153-155.
- Klíma, Z. (2016) Ještě k novozélandským zákrokům proti moru včelího plodu. Moderní včelař. 6/2016, 19.
- Kodřík, D. (2004) Fyziologie hmyzu, učební texty. Jihočeská univerzita, České Budějovice.
- Kopička, O. (2014) Co by včely chtěly. Včely jinak, alternativy v chovu včel a přístupu k nim. Hranice: Fabula. 15-21.
- Kovařík, I. (2016) Management moru včelího plodu na Novém Zélandu. Moderní včelař. 5/2016, 13-16.
- Krpec, M. (2015) Mor včelího plodu v okrese Vsetín. Včelařství. 10/2015, 340-341.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., Kim, Y. H. (2012) Agarose gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. J. Vis. Exp. (62), e3923.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M. (2008) Lehninger principles of biochemistry. 5th ed. New York: W. H. Freeman.
- Löffelmann, J. (2013) Snadná detekce moru a hniloby včelího plodu. Včelařství. 4/2013, 116-117.
- Mello, A. J. D. (2001) DNA amplification: does small really mean efficient? Lab Chip. 1, 24–29.



- Miyagi, T., Peng, C. Y. S., Chuang, R. Y., Mussen, E. C., Spivak, M. S., Doi, R. H. (2000) Verification of oxytetracycline-resistant American foulbrood pathogen *Paenibacillus larvae* in the United States. *J. Invertebr. Pathol.* 75, 95–96.
- Morrissey, B., Helgason, T., Poppinga, L., funfhaus, A., Genersch, E., Budge, G. (2015) Biogeography of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood, using a new multilocus sequence typing scheme. *Environmental Microbiology.* 17, 1414-1424.
- Morse, R. A., Calderon, N. W. (2000) The value of honey bee pollination in the United States. *Bee Cult.* 128, 1–15.
- Müller, S., Garcia-Gonzalez, E., Mainz, A., Hertlein, G., Heid, N. C., Mösker, E., van den Elst, H., Overkleeft, H. S., Genersch, E., Süssmuth, R. D. (2014) Paenilamicin — structure and biosynthesis of a hybrid non-ribosomal peptide/polyketide antibiotic from the bee pathogen *Paenibacillus larvae*. *Angew Chem Int Ed Engl.* 53, 10547-10828.
- Mullis, K. B. (1990) The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American.* 262 (4), 56-61.
- Munawar, M. S., Raja, S., Waghchoure, E. S., Barkat, M. (2010) Controlling American Foulbrood in honeybees by shook swarm method. *Pakistan J. Agric. Res.* 23 (1-2), 53-58.
- Murray, K. D., Aronstein, K. A. (2006) Oxytetracycline-resistance in the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae* is encoded on novel plasmid pMA67. *J. Apicult. Res.* 45, 207–214.
- Murray, K. D., Aronstein, K. A., de Leon, J. H. (2007) Analysis of pMA67, a predicted rolling-circle replicating, mobilizable, tetracycline-resistance plasmid from the honey bee pathogen, *Paenibacillus larvae*. *Plasmid.* 58 (2), 89–100.
- Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W. (2002) Harperova biochemie. 23. vyd., (4. české vyd.), v H & H 3. Jinočany: H & H. Lange medical book.
- Mussen, E. C. (2000) Antibiotic-resistant American foulbrood, *Am. Bee J.* 140, 300–301.
- Neuendorf, S., Hedtke, K., Tangen, G., Genersch, E. (2004) Biochemical characterization of different genotypes of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a honey bee bacterial pathogen. *Microbiology.* 150, 2381–2390.
- Nordström, S., Fries, I. (1995) A comparison of media and cultural conditions for identification of *Bacillus larvae* in honey. *Journal of Apicultural Research.* 34 (2), 97-103.
- Ondruš, P. (2013) Včelaříme v kontaktu s morem včelího plodu. *Včelařství.* 9/2013, 299-300.

- Paddock, F. B. (1918) The beemoth or waxworm. Texas Agricultural Experiment Station. USA.
- Pantůček, B. (2016) Zkušenosti s tlumením moru včelího plodu v České republice a v Jihomoravském kraji. Včelařství. 7/2016, 230-231.
- Parvanov, P., Russenova, K., Dimov, D. (2006) Control of american foulbrood disease without antibiotic use. Uludag Bee Journal. 97-103.
- Peiren, N., Vanrobaeys, F., de Graaf, D., Devreese, B., Van Beeumen, J., Jacobs, F. (2005) The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach. Biochim. Biophys. Acta. 1752 (1), 1–5.
- Pentikäinen, J., Kalliainen, E., Pelkonen, S. (2009) Molecular epidemiology of *Paenibacillus larvae* infection in Finland. Apidologie. 40, 73–81.
- Pernal, S. F., Albright, R. L., Melathopoulos, A. P. (2008) Evaluation of the shaking technique for the economic management of American foulbrood disease of honey bees (*Hymenoptera: Apidae*). J. Econ. Entomol. 101, 1095–1104.
- Petr, J. (2015) Fágová léčba moru včelího plodu. Včelařství. 1/2015, 32.
- Poppinga, L., Genersch, E. (2015) Molecular pathogenesis of American Foulbrood: how *Paenibacillus larvae* kills honey bee larvae. Current Opinion in Insect Science. 10, 29-36.
- Rauch, S., Ashiralieva, A., Hedtke, K., Genersch, E. (2009) Negative correlation between individual insect-level virulence and colony-level virulence of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American foulbrood of honeybees. Appl. Environ. Microbiol. 75, 3344–3347.
- Rieg, S., Bauer, T. M., Peyerl-Hoffmann, G., Held, J., Ritter, W., Wagner, D., Kern, W. V., Serr, A. (2010) *Paenibacillus larvae* Bacteremia in Injection Drug Users. Emerging Infectious Diseases. 16 (3), 487-489.
- Riessberger-Galle, U., Von der Ohe, W., Crailsheim, K. (2001) Adult Honeybee's Resistance against *Paenibacillus larvae larvae*, the Causative Agent of the American Foulbrood. Journal of Invertebrate Pathology. 77, 231-236.
- Ryba, S., Titěra, D., Haklová, M., Stopka, P. (2009) A PCR method of detecting American Foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in winter beehive wax debris. Veterinary Microbiology. 139, 193-196.
- Saksún, J. (2015) Mor včelího plodu. Včelařství. 5/2015, 152-153.
- Salášková, V. (2008) Fyziologie zavíječe voskového *Galleria mellonella*. Diplomová práce. Masarykova univerzita. Brno.

- Salyers, A. A., Whitt, D. D. (2002) *Bacterial Pathogenesis – A Molecular Approach*. American Society for Microbiology Press. Washington.
- Sedláček, I. (2007) *Taxonomie prokaryot*. Masarykova univerzita. Brno.
- Shimanuki, H., Knox, D., Furgala, B., Caron, D., Williams, J. (1992) Diseases and pests of honey bees. *Beekeeping in the United States. Agriculture handbook 335*, U. S. Department of Agriculture. 118-128.
- Schmidt, H., Hensel, M. (2004) Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 14–56.
- Smith, T. L. (1965) External morphology of the larvae, pupa and adult of the wax moth *Galleria mellonella* L. *Journal of the Kansas Entomological Society.* 38 (3), 287-310.
- Snustad, D., Simmons, D. P., Relichová, J. (2009) *Genetika*. Masarykova univerzita. Brno.
- Sood, S., Steinmetz, H., Beims, B., Mohr, K. I., Stadler, M., Djukic, M., von der Ohe, W., Steinert, M., Daniel, R., Müller, R. (2014) Paenilarvins: Iturin family lipopeptides from the honey bee pathogen *Paenibacillus* larvae. *ChemBioChem.* 15, 1947-1955.
- Spangler, H. G. (1985) Sound production and communication by the greater wax moth (*Lepidoptera: Pyralidae*). *Annals of the Entomological Society of America.* 78, 54-61.
- Spangler, H. G. (1987) Acoustically mediated pheromone release in *Galleria mellonella* (*Lepidoptera: Pyralidae*). *Journal of Insect Physiology.* 33, 465-468.
- Spivak, M. S., Reuter, G. S. (1998) Performance of hygienic honey bee colonies in a commercial apiary. *Apidologie.* 29, 291–302.
- Spivak, M. S., Reuter, G. S. (2001) Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie.* 32, 555–565.
- Státní veterinární správa. Mor včelího plodu. [online]. [cit. 2016-18-11]. Dostupné z: <https://www.svs-cr.cz>
- Sturtevant, A. P. (1936) Quantitative demonstration of the presence of spores of *Bacillus larvae* in honey contaminated by contact with American foulbrood. *Journal of Agricultural Research.* 52, 697–704.
- Titěra, D. (2009) *Mor včelího plodu*. VÚVč Dol.
- Vilcinskas, A., Matha, V., Götz, P. (1997) Effects of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its secondary metabolites on morphology and cytoskeleton of plasmatocytes isolated from the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Journal of Insect Physiology.* 43, 1149-1159.

- Voet, D., Voet, J. G. (1995) Biochemie. Victoria Publishing. Praha.
- von der Ohe, W. (2003) Control of American Foulbrood by using alternatively eradication method and artificial swarms. *Apiacta*. 38, 137-139.
- Walsh, B. (2013) A World without bees. *Time*. 19, 26-31.
- Wedenig, M., Riessberger-Gallé, U., Crailsheim, K. (2003) A substance in honey bee larvae inhibits the growth of *Paenibacillus larvae larvae*. *Apidologie*. 34 (1), 43-51.
- West, E. J., Briggs, J., D. (1968) In vitro toxin production by the fungus *Beauveria bassiana* and bioassay in greater wax moth larvae. *Journal of Economic Entomology*. 61, 684-687.
- White, G. F. (1906) The bacteria of the apiary with special reference to bee disease. Bureau of Entomology, Technical Series. 14, 1-50.
- Wigglesworth, V. B. (1965) The principles of Insect Physiology. Methuen & CO. LTD. London.
- Williams, J. L. (1997) Insects: *Lepidoptera* (moths). Honey bee pests, predators, and diseases. The AI Root Company. Ohio, USA. 121-141.
- Wilson, T. W. (1971) Resistance to American foulbrood in honey bees. XI. Fate of *Bacillus larvae* spores ingested by adults. *J. Invertebr. Pathol.* 17, 247-255.
- Wolfe, S. L. (1993) Molecular and cellular biology. Belmont: Wadsworth.
- Yilmaz, M., Ozic, C., Gok, I. (2012) Principles of Nucleic Acid Separation by Agarose Gel Electrophoresis. Gel Electrophoresis - Principles and Basics. InTech.
- Yue, D., Nordhoff, M., Wieler, L. H., Genersch, E. (2008) Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol.* 10, 1612-1620.