



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Vyšetření včel na vybrané onemocnění pomocí PCR

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: **LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA**

Autor: Sabina Gregorová

Vedoucí práce: Ing. Ph.D. Irena Hoštičková

České Budějovice 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „*Vyšetření včel na vybrané onemocnění pomocí PCR*“ jsem vypracoval/a samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich 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 bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 26. 4. 2024

.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala Ing. Ph.D. Ireně Hoštičkové za obětavý a laskavý přístup a odborné vedení mé bakalářské práce. Také bych ráda poděkovala mé rodině za podporu a trpělivost.

Vyšetření včel na vybrané onemocnění pomocí metody PCR

Abstrakt

Nosema ceranae je druh mikrosporidie, která působí negativně nejen na včelu medonosnou (*Apis mellifera*). Nejčastěji je přenášena koprofagií neboli pojidáním výkalů při naplnění výkalových vaků. Je to celosvětově rozšířený patogen, který je považován za jednu z příčin CCD (colony collapse disorder). Méně známá *Crithidia mellificae* patří do třídy Trypanosomatidae působí podobně jako *N. ceranae*. Oba tyto patogeny napadají střeva včel medonosných, nakažené včely slábnou a včelstvo hyne.

Cílem této bakalářské práce bylo praktické vyšetření vybraných vzorků včel ze včelnice Jihočeské univerzity fakulty zemědělské a technologické pomocí metody PCR.

V teoretické části popisují *Nosema ceranae* a *Crithidia mellificae* a jejich vliv na včely medonosné. Dále je zmíněná i cesta přenosu těchto patogenů a také potenciální léčba nakažených včelstev.

V praktické části, kterou jsem vykonávala v laboratoři na katedře rostlinné výroby Fakulty zemědělské a technologické, je detailně popsán postup izolace DNA, PCR a gelová elektroforéza. V této části je také uvedeno vyhodnocení výsledků.

Klíčová slova

Nosema ceranae; *Crithidia mellificae*; *Apis mellifera*; izolace DNA; PCR

PCR testing for selected diseases of bees

Abstrakt

Nosema ceranae is a species of microsporidia that negatively affects *Apis mellifera*. It is most commonly transmitted by coprophagy, or eating faeces when filling faecal sacs. It is a worldwide pathogen that is considered to be one of the causes of CCD (colony collapse disorder). The lesser known *Crithidia mellificae* belongs to the class Trypanosomatidae, which acts similarly like *N. ceranae*. Both of these pathogens target the guts of honey bees. As a result, infected bees weaken and the colony dies.

The aim of this bachelor thesis was the practical examination of selected *Apis mellifera* samples from the beehive of the University of South Bohemia Faculty of Agriculture and Technology using the PCR method.

In the theoretical part I describe *Nosema ceranae* and *Crithidia mellificae* and their effect on honey bees. Furthermore, the route of transmission of these pathogens and the possible treatment of infected honey bee colonies are mentioned.

In the practical part, which I did in the laboratory at the Department of Plant Production of the Faculty of Agriculture and Technology, the procedure of DNA isolation, PCR and gel electrophoresis is described in detail. The evaluation of the results is also presented in this part.

Klíčová slova

Nosema ceranae; *Crithidia mellificae*; *Apis mellifera*; isolation of DNA; PCR

Obsah

1	Úvod	8
2	Literární rešerše	9
2.1	Včela medonosná	9
2.2	Stavba těla včely	9
2.2.1	Hlava.....	9
2.2.2	Hrud'.....	10
2.2.3	Zadeček	10
2.3	Trávicí soustava	10
2.3.1	Přirozená mikroflóra trávicí soustavy.....	11
2.4	Příčiny úbytku včelstev	12
2.4.1	Úbytky včelstev z důvodu nemocí.....	13
2.4.2	Nosema ceranae.....	14
2.4.2.1	Výskyt N. ceranae	14
2.4.2.2	Vliv infekce na včely medonosné.....	15
2.4.2.3	Léčba.....	17
2.4.3	Crithidia mellificae.....	18
2.4.3.1	Výskyt C. mellificae	19
2.4.3.2	Vliv infekce na včely medonosné.....	20
2.4.3.3	Léčba.....	22
3	Cíle práce	23
4	Materiál a metody	24
4.1	Přehled vyšetřovaných vzorků.....	24
4.2	Příprava vzorků.....	24
4.3	Izolace DNA.....	24
4.4	Ověření kvality izolace DNA.....	25
4.5	PCR.....	26
4.6	Gelová elektroforéza	29
4.7	Vizualizace	30
5	Výsledky	31
5.1	Kontrola kvality a koncentrace izolované DNA.....	31
5.2	Výsledky z gelové elektroforézy	32
6	Diskuse	36
7	Závěr	38

8	Seznam literatury	39
9	Seznam tabulek a obrázků.....	48

1 Úvod

Včelařství můžeme zařadit mezi nejstarší obory lidské činnosti. Zájem člověka o včely vzbudily včelí produkty, zejména med a vosk. Později se však ukázalo, že včely mají důležitou roli i při opylování rostlin. Tento proces je nezbytný k jejich reprodukci, které díky opylovací činnosti vytvářejí plody a semena a mnohé z nich jsou základem pro potravinový řetězec. Opylování také přispívá k větší rozmanitosti druhů rostlin, proto mají včely pozitivní vliv na ekonomiku a zemědělství.

Včely se bohužel setkávají s mnoha hrozbami a dochází k jejich celkovému úbytku. Mezi hlavní příčiny patří biotické a abiotické faktory, ale zejména infekce a paraziti. Toto vše má negativní vliv na opylování rostlin a na celkovou ekosystémovou stabilitu.

Tento důležitý hmyz má široké spektrum škůdců, převážně bakterie, viry, houby nebo parazity. *Nosema ceranae* je druh mikrosporidie (parazitická houba) rozšířená po celém světě. Méně známá *Crithidia melliferae* je jednobuněčný parazit schopný infikovat nejen včely. Oba tyto patogeny způsobují onemocnění trávicího traktu. Včely se infikují požitím kontaminované potravy nebo mohou být tyto patogeny zavlečeny do úlu již nakaženými včelami.

V důsledku těchto nemocí včely hynou a včelstvo slábne. K zabránění úbytku včel je nutné provádět pravidelné kontroly včelstev. Podle konkrétní nálezové situace se zvyšuje význam dezinfekce úlů nebo plástů, tedy zničení choroboplodných zárodků.

2 Literární rešerše

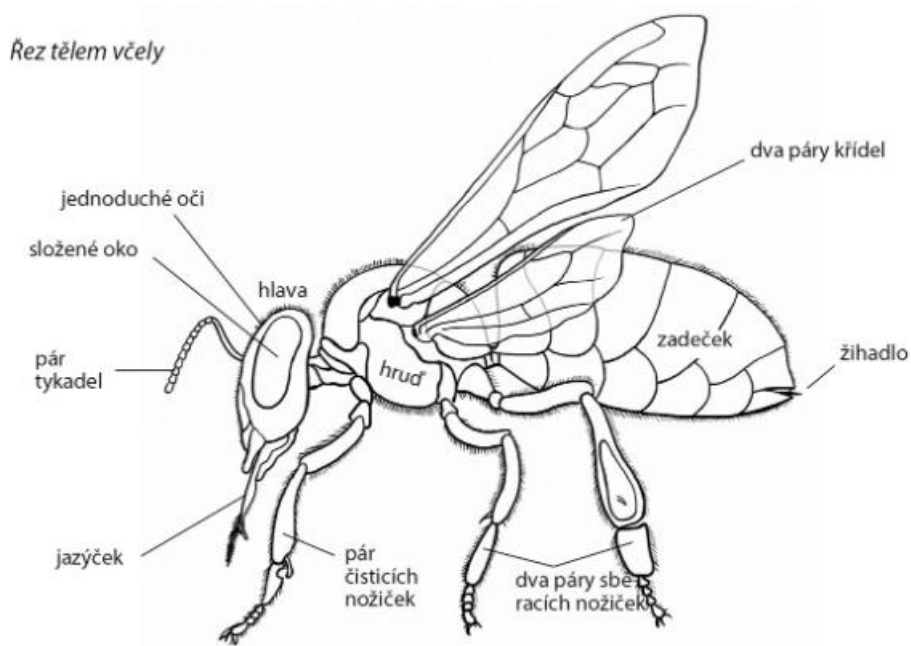
2.1 Včela medonosná

Včela medonosná (*Apis mellifera*) patří do skupiny blanokřídlého hmyzu. Její původ sahá až do Afriky, odkud se rozšířila na Blízký východ a Evropu (Šefčík, 2014).

Nyní se ve střední Evropě vyskytují stovky jiných druhů včel. Medonosné včely jsou společenský hmyz, kteří žijí ve společenství trvale. Ostatní druhy včel jsou nazývány poustevníky a označovány jako divoké včely (Liebig, 1998).

2.2 Stavba těla včely

Včela medonosná patří do skupiny členovců (*Anthropoda*), kteří mají tělo složené z chitinových článků, umožňující pohyb. Tělo se skládá ze 3 částí – hlava, hrud' a zadeček. Původní článkování můžeme nalézt pouze na zadečku, na hlavě není vůbec rozlišitelné. Povrch těla tvoří chitinový krunýř tzv. vnější kostra. Vnitřní kostra je vyvinuta pouze částečně (Veselý a kol., 1985).



Obr. č. 1: Tělo včely (Šefčík, 2014)

2.2.1 Hlava

S hrudí je spojena zúžením, které umožňuje pohyb (Šefčík, 2014).

Hlava je zploštělá ve směru podélné osy těla a její tvar je trojúhelníkový. Temeno (*vertex*) je horní část hlavy, kde jsou uložena tři jednoduchá očka a po bocích dvě oči složené. Složené oči jsou uloženy do tvaru trojúhelníku směřující vrcholem dolů k tenké brázdě, která se rozděluje a končí u kořene tykadel. Tykadla jsou umístěna v jamkách na čele včely. Na nich se nachází mnoho smyslových orgánů jako je čich nebo hmat (Veselý a kol., 1985).

2.2.2 Hrud'

Hrud' je hlavním nosičem pohybových orgánů, tomu nasvědčuje i to, že se hrudní články během vývoje utvořili tak, aby se zajistil efektivní pohyb (Veselý a kol., 1985).

Včela má tři páry nohou sloužící k pohybu, čištění těla nebo ukládání pylu. Nohy jsou stejně jako tělo článkované (Šefčík, 2014). Mezi dráčky na končetinách mají polštářky, umožňující včele lézt i po skle (Hanousek, 1991).

Na bocích těla má dva páry blanitých křídel, které jsou pokryty jemnými chloupky. Křídla obsahují různé velké žilky, podle kterých se zjišťuje tzv. loketní index. Ten může pomoci při určení plemena včely (Šefčík, 2014).

Za letu jsou křídla spojena háčky, které zapadají do žlábků na zadním okraji předního křídla (Veselý a kol., 1985).

2.2.3 Zadeček

V zadečku je uložena většina orgánů – část trávicího ústrojí, medný váček, část cévní a nervové soustavy, vyměšovací a pohlavní ústrojí, vzdušné vaky a vzdušnice, jedový váček a žihadlo. Díky stálému rozšiřování a smršťování zadečku je umožněno i dýchání (Veselý a kol., 1985).

Článkovaný zadeček je rozdělen na dvě části – hřbetní (*tergit*) a břišní (*sternit*). Mezi těmito částmi se nachází svaly, které ovládají rozšiřování a smršťování zadečku (Veselý a kol., 1985).

2.3 Trávicí soustava

Trávicí ústrojí se skládá se z tří částí: přední (*stomodeum*), žaludku (*mesenteron*) a zadní (*proctoreum*) (Veselý a kol., 1985).

Přední část začíná ústy (*os*), které se nachází mezi horním a dolním vnitřním pyskem (*epipharynx* a *hypopharynx*). Dále pokračuje hltanem (*pharynx*) a jícnem (*oesophagus*) (Veselý a kol., 1985). Trubicovitý jícn se na konci rozšiřuje na medný váček, ve kterém enzymatickým štěpením vzniká med (Snodgrass et al., 1984, pp. 90-150).

Česlo (*proventriculus*) zajišťuje průchod potravy z medného váčku do žaludku, střední části trávicí soustavy. To zároveň brání zpětnému posunutí potravy ze žaludku do medného váčku. Všechny tři části trávicího ústrojí jsou k sobě napojeny pomocí chlopní. Napojení žaludku k přední části zajišťuje chlopeň *valvula cardiaca* a k zadní části chlopeň *valvula pylorica* (Veselý a kol., 1985).

Pylorickou chlopní je s žaludkem spojeno tenké střevo, které už je součástí *proctodea*. Funkce tenkého střeva je rozdělení nestrávených zbytků potravy, které se posouvají do konečníku (*rectum*). Konečník, často nazývaný jako výkalový vak, je poslední část trávicího ústrojí (Veselý a kol., 1985). *Rectum* slouží jako rezervoár nestrávených zbytků v zimních měsících, kdy se včela nemůže vyprazdňovat mimo úl. Konečník se tedy může rozšířit a pojmout velké množství výkalů. Vylučování odpadních látek z těla zajišťují Malpighické trubice (Snodgrass et al., 1984, pp. 90-150).

2.3.1 Přirozená mikroflóra trávicí soustavy

Střevní mikroflóra se podílí na růstu a vývoji včel a přispívá ke zdraví hostitele. Její funkce zahrnují trávení potravy, modulaci imunitního systému a obranu proti patogenům. Pokud jsou tyto funkce narušeny, může to mít dopad na schopnosti včel vyrovnat se s enviromentálními stresory, jako jsou paraziti (Jabal-Uriel et al., 2022).

Mikroorganismy jsou všudypřítomné a nevyskytují se jen v trávicím traktu, ale mohou být přítomny například i na povrchu těla nebo v úlu. Nejpočetnější složkou mikroflóry zažívacího traktu jsou bakterie (Gilliam, 1997), z velké části omezené na zadní střevo. Menší počet bakterií se vyskytuje v předžaludku a středním střevě (Reyman, Moran, 2018). U zdravých včel se gramnegativní a grampozitivní bakterie vyskytují ve stejném množství (Gilliam, 1997). Za základní střevní mikrobiom lze považovat bakterie *Snodgrassella alvi* a *Gilliamella apicola*. Druhy *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* jsou všudypřítomné (Raymann, Moran, 2018). Zástupci gramnegativních bakterií jsou rody *Acinetobacter* nebo *Erwinia* (Drobníková, 1983). Z grampozitivních bakterií jsou zastoupeny rody *Bacillus*, *Micrococcus* (Inglis et al. 1993). Mnoho vzácnějších

bakteriálních druhů ve střevech včely medonosné představují oportunní organismy schopné invaze. Zahrnuje to druhy *Enterobacteriaceae*, *Enterobacter*, *Klebsiella* a *Serratia* (Raymann, Moran, 2018).

V trávicím traktu včel se mohou objevit i plísně a kvasinky. Nejčastěji se vyskytující plísně jsou rody *Penicillium* a *Aspergillus*. Z kvasinek jsou to především rody *Candida* nebo *Hansenula* (Gilliam, 1997).

Mnoho z těchto mikroorganismů jsou trvale přítomny u dospělých dělnic, zatímco jejich množství se může u jednotlivých včel lišit. Hluboký vliv na střevní mikroflóru má typ a množství živin (tj. pylu a nektaru), což může mít za následek změnu metabolické aktivity. Střevní mikroflóru mohou ovlivnit také špatné stravovací návyky nebo rozdíly v délce života včel (Kešnerová et al., 2020).

2.4 Příčiny úbytku včelstev

Mnoho včelařů se potýká s úbytky včelstev. Důvodem jsou především nemoci včel, které se rozšířily v důsledku jejich oslabené imunity. Úbytky včel z důvodu nemocí způsobenými různými patogeny není jediné, s čím se včelaři potýkají. Včela však může zemřít i přirozenou smrtí ve stáří nebo z jiných důvodů (Titěra, 2020).

Kolaps včelstva je označován jako CCD – colony collapse disorder. Potencionální příčiny kolapsu včelstva jsou způsobeny parazity a patogeny, zvyšujícím se používáním pesticidů v zemědělství, podvýživou, ale i špatným hospodařením se včelami (Titěra, 2020), avšak podle Cornman et al., 2012 neexistuje žádný přímý důkaz, který by spojoval kolaps včel s potravními zdroji, protože včely ze zhroutených včelstev vykazovaly typickou tělesnou hmotnost, proteinové komplementy i zásoby lipidů. Včely také ovlivňuje globální oteplování. Zvyšující se teplota způsobuje aktivace opylovatelů dříve, než jsou dostupné zdroje potravy v podobě kvetoucích rostlin (Willmer, 2012).

Existuje mnoho mikroorganismů, které negativně ovlivňují včely medonosné, od bakterií po viry, houby, trypanosomy. Je proto důležité dbát zvýšené opatrnosti a v případě sebemenšího náznaku podniknout první kroky k léčbě (Cornman et al., 2012). Ke vzniku nákazy (popř. rozšíření) nestačí pouze nakažení příslušným původcem onemocnění. Musí být splněny určité podmínky, aby se mohl původce nemoci vyvinout a rozmnožit. Uplatňují se různé faktory např. teplota a vlhkost, chov a rozmnožování a mnoho dalších

(Lampeitl, 1996). I přes splnění určitých podmínek, se zdá být pravděpodobné, že patogeny hrají významnou roli v CCD (Cornman et al., 2012).

2.4.1 Úbytky včelstev z důvodu nemoci

Abychom pochopili, co je příčinou úbytku včelstev, je důležité objasnit hlavní škůdce a nemoci s nimi spojené, které ovlivňují zdraví včel. Včely jsou postiženy řadou škůdců a nemocí, včetně roztočů, virů, bakterií, mikrosporidií a plísňových onemocnění. V důsledku zátěže infekčními chorobami a jejich původci mohou včelstva vykazovat výrazné oslabení a dokonce úhyn (Hristov et al., 2021).

Včelu medonosnou napadají roztoči druhů *Varroa destructor*, *Varroa jacobsoni* nebo *Tropilae clareae*. Ektoparazitický roztoč *Varroa destructor* je rozšířený po celém světě a je považován za hlavní hrozbu včelařství (Rosenkranz et al., 2010). V současné době se *V. destructor* vyskytuje po celém světě s výjimkou Austrálie a některých severních území a odlehlých ostrovů (Hristov et al., 2021).

Nejběžnějším a nejnebezpečnějším virem je virus deformovaných křídel (DWV). Tento jednovláknový RNA virus způsobuje vývojové deformace a předčasné stárnutí, což vede k vysokým ztrátám přezimujících včelstev (Ryabov et al., 2014). Dalšími běžnými viry včely medonosné jsou virus pomalé paralýzy včel (SBPV), virus akutní paralýzy včel (ABPV), virus černé královny (BQCV), virus jezera Sinaj (LSV) atd. Jejich rostoucí rozšíření je způsobeno všudypřítomným roztočem *V. destructor*, který slouží jako přenašeč (Mráz et al., 2021).

Poměrně častou bakterií, která napadá včelí plod, je *Paenibacillus larvae*. Je to původce bakteriální nákazy moru včelího plodu (Hrabák, 2014). Spory této bakterie jsou velmi odolné, proto jediným opatřením zůstává spálení infikovaných úlů (Mráz et al., 2021).

Významnými parazity jsou mikrosporidie (parazitické houby) *Nosema apis* a *Nosema ceranae*, které způsobují onemocnění trávicího traktu dospělých včel. Onemocnění nose móza, způsobené těmito mikrosporidii, je v současné době považováno za jednu z hlavních příčin CCD v zimním období (Mráz et al., 2021).

Crithidia mellificae a *Lotmaria passim* jsou nebezpeční parazitictí prvoci z řádu *Trypanosomatida*. Byly považovány za neškodné, nyní se však ukazuje, že mohou být

příčinou ztráty včelstev, zejména při koinfekci *Nosema ceranae*. Trypanosomatidy působí negativně na včelí střevní mikrobiom (Mráz et al., 2021).

2.4.2 *Nosema ceranae*

Nosema ceranae patří do skupiny mikrosporidií. Je to intracelulární parazit a šíří se mezi hostiteli ve formě spor (Fries, 2010). Rod *Nosema* infikuje hmyz, nejen včely medonosné, ale i čmeláky a bource morušové. Parazitují na dospělých včelách a jejich mikrosporidie napadají epitelální buňky středního střeva (Hristov et al., 2021).

2.4.2.1 Výskyt *N. ceranae*

Byla objevena jako přirozená infekce včelstev *Apis mellifera* v roce 2005 ve Španělsku. Do této doby byla popsána jen u včely východní (*Apis carana*) v Číně (Titěra, 2017). Avšak podle Paxton et al. (2007) se *N. ceranae* vyskytovala v Evropě minimálně od roku 1998, a to ve Finsku. Než byla objevena, byla *N. apis* považována za jediný faktor nose mózy pozorovatelný u včel medonosných. V současné době je *N. ceranae* nalézána v Evropě, Severní a Jižní Americe, severní Africe a Austrálii. V západní Evropě a Austrálii došlo k výraznému poklesu *N. apis*, tudíž má *N. ceranae* vyšší virulenci (Ozgor et al., 2015).

Zjistilo se, že klimatické podmínky ovlivňují míru infekce druhů Nosemy. V horkém podnebí Evropy i Severní Ameriky byla pozorována dominantnější míra infekce *N. ceranae*. Předpokládá se, že v mírném podnebí dochází k jejímu častějšímu šíření a zvyšuje se míra infekce s rostoucí teplotou (Ozgor et al., 2015). Proto se infekce *N. ceranae* objevují především v letních měsících (Runckel et al., 2011).

V ČR je stav nose mózy včel monitorován. V roce 2011 bylo vyšetřeno 4010 včelstev z různých částí České republiky od různých chovatelů. Celkový výskyt a prevalence *Nosema* spp. je následující:

Tabulka č. 1: Výskyt nose mózy v ČR v roce 2011 (Kampler et al., 2011)

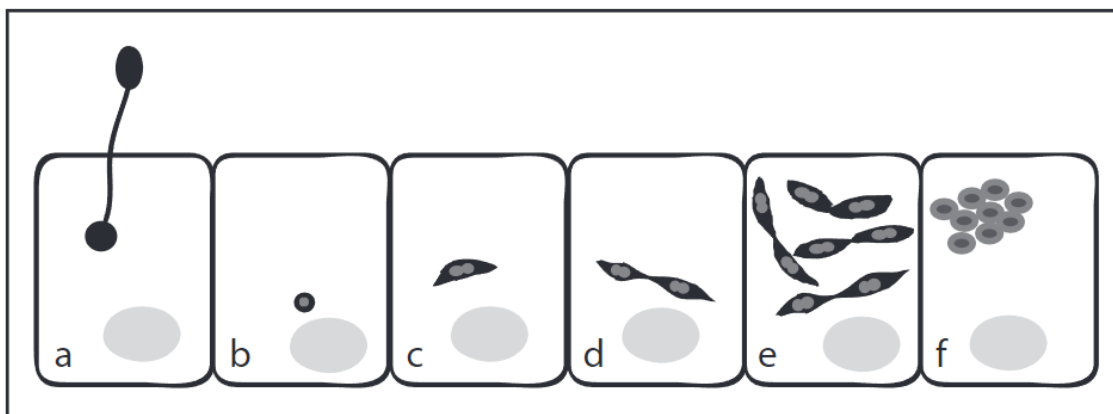
	<i>Nosema</i> spp.	<i>N. apis</i>	<i>N. ceranae</i>	<i>N. apis</i> + <i>N. ceranae</i>
N = 4010	2167	678	1134	356
Prevalence	54,0 %	31,3 %	52,3 %	16,4 %

2.4.2.2 *Vliv infekce na včely medonosné*

Infekce začíná požitím spor s jídlem nebo vodou. Spory do včelstva mohou být zaneseny infikovanými cizími včelami. Infekce se šíří koprofágií neboli požíváním výkalů, které jsou během onemocnění sladké. Další šíření noseμόzy je výměna matky. Ta může být infikovaná a svými výkaly může ohrozit ostatní včely (Titěra, 2017). Po požití se spory začnou vyvíjet v místě primární infekce a namnožení parazitů se mohou rozšířit do různých tkání. Mimo středního střeva může infekce zasahovat do malpighických tubulů, hypofaryngeálních žláz nebo tukových tělísek (Chen, Huang, 2010). Výsledky studie Traver and Fell (2012) uvádí nízké hladiny *N. ceranae* i v břiše, hrudníku, hlavě a vaječnicích. Nízké hladiny ve vaječnicích by mohli ukazovat na vertikální přenos *N. ceranae*. Roberts et al. (2015) se zabývali tím, zda může být *N. ceranae* přenášena i sexuálně. Výsledky ukázali přítomnost spor ve spermatu samců a u královen uměle inseminovaných spermatem samců infikovaných Nosemou. Tato studie poskytuje důkaz, že *N. ceranae* se nemusí šířit pouze koprofágií a ukazuje na další cestu přenosu.

Nejčastějšími příznaky onemocnění noseμόza jsou úplavice, plazení nebo mléčné zbarvení střeva (Chen, Huang, 2010). Při onemocnění byl u některých včel pozorován i zvětšený zadeček. Nakažené včely mají i bělavý zvětšený žaludek, který se trhá. U zdravých včel nacházíme žlutý a pevný žaludek (Titěra, 2017). U nakažených včelstev však nemoc může probíhat i bezpříznakově (Chen, Huang, 2010).

Sporogonie je disporoblastická. Živá zralá spora je ovocylindrická, rovná až mírně zakřivená a měří cca 4,7 x 2,7 μm (Fries et al., 1996). Na povrchu se nachází stěna z exospor, endospor a plazmatické membrány (Cali et al., 2017). Dále obsahují dvojjadernou cytoplazmu a pólové vlákno. Do nového hostitele se spory dostanou s potravou. V žaludku nebo ve střevě se aktivují a dochází k vystřelení dutého vlákna. To propíchně buněčnou stěnu a sporoplazma infikuje hostitelskou buňku. Po pomnožení spor buňka praská a uvolněné spory infikují další buňky v okolí nebo jsou vylučovány s výkaly. Ve stěně spor se nachází chitin, který podporuje odolnost ve vnějším prostředí (Titěra, 2017).



Obr. 2: Intracelulární životní cyklus *N. ceranae*: a) sporoplazma v hostitelské buňce jako kulovité tělíčko; b) vyvine se ve vřetenovitý meront; c) začíná se dělit a vznikne párový meront; d) a e) páry merontů projdou několika koly buněčného dělení; f) oddělí se a vyvinou se v kulaté až oválné sporonty, které jsou kondenzované a vyznačují se zesílenou plazmatickou membránou (Gisder et al., 2011)

V prvních dnech napadení dojde k porušení střevní bariéry včely. Napadené epiteliální buňky střeva ztrácejí plazmu a v žaludku se přestává tvořit tzv. peritrofická membrána (Titěra, 2017), což má za následek vznik dalších infekcí (Naree et al., 2021). *N. ceranae* napadá také epiteliální buňky žaludku. To způsobuje nesprávnou funkci žaludku a poruchu trávení potravy. Je napadena i aktivita genů imunitního systému, konkrétně je snížena tvorba abaecinu a vitellogeninu, což má vliv na dlouhověkost dělnic (Titěra, 2017). Způsobuje také imunitní supresi, která usnadňuje mnohočetné koinfekce u včel medonosných. *N. ceranae* se vyvíjí v přímém kontaktu s cytoplazmou hostitelské buňky, což naznačuje, že parazit může vyžadovat externí dávku energie k reprodukci (Martín-Hernández et al., 2011).

Nosema ceranae, jako intracelulární parazit, způsobuje silný energetický stres, který je pravděpodobně způsoben samotným parazitem, který soutěží o živiny a zdroje energie, jako většina druhů mikrosporidií (Martín-Hernández et al., 2011). Využívá ATP z buněk k vlastní reprodukci (Williams et al., 2014). Infikované včely mají nižší hladiny bílkovin, což má za následek sníženou hypofaryngeální žlázu a také změněné složení mastných kyselin v hemolymfě (Mayack, Naug, 2009). Infekce *N. ceranae* může obsadit velkou část středního střeva a mít vliv na fyziologii a imunitní reakce. Poruchy fyziologie infikovaného střeva mohou ovlivnit složení nestrávených zbytků potravy, které putují do zadního střeva a dále mohou měnit složení mikroflóry v této oblasti (Zhang et al., 2019). Kvůli narušení střevního mikrobiomu dochází k poruše schopnosti trávení a příjmu

potravy (Naree et al., 2021). Odumírající nebo již mrtvé buňky střevní výstelky vyvolávají špatnou absorpci živin ve středním střevě. To nakonec vede k předčasné smrti včel v důsledku hladovění (Martín-Hernández et al., 2011). V zimním období může také nedostatečné trávení přispívat k nadměrnému naplňování výkalových vaků včel, což vyvolá průjem. Nastává domino efekt, kdy infekce postihuje další včely, jenž se snaží uklidit kontaminované hnízdo (Titěra, 2017).

Negativní vliv nose mózy na úrovni včelstva se týká produktivity, dlouhověkosti dospělých včel, odchovu včelího plodu, biochemie včel, sběru pylu a dalších projevů chování včel. *N. ceranae* je spojována s nemocnými včelstvy a uvažuje se o ni jako o potenciální příčině CCD (Hristov, 2021). Nakažená včelstva vykazují snížené počty dělnic, což vede k nízkému výnosu medu. *N. ceranae* totiž může negativně ovlivnit schopnost letu infikovaných včel shánějící med, a proto hodnota nektaru a pylu závisí na stavu včelstva (Botías et al., 2013). Vysoký podíl vajíček nakladených královnou včelstva trpícího nose mózou neprodukuje kukly. Populace včel se tedy začíná snižovat s rozšiřující se infekcí (Martín-Hernández et al., 2007).

N. ceranae je vysoce patogenní pro *Apis mellifera*. Její úmrtnost je vázána na přítomnost autoinfekčních spor, které usnadňují rychlé dělení a invazi trávicí tkáně (Martín-Hernández et al., 2007).

2.4.2.3 Léčba

K boji proti *N. ceranae* včelaři používají antibiotika fumagillin, který narušuje replikaci DNA tohoto parazita (Williams et al., 2008). V současné době není fumagillin v zemích EU registrován. Brání tomu pochybnosti o účinnosti a vedlejších účincích a problém potenciálních reziduí antibiotik (Titěra, 2017).

Michalczyk et al. (2015) zkoumali účinnost tří přípravků na infikovaných včelách. Cílem této studie bylo vyhodnotit účinnost přípravků při kontrole infekcí způsobených *Nosema spp.* Analýzy ukázali, že Nozevit, Api Herb a ApiX snížili počet spor v průměru o 31,15 %. Největší pokles byl zaznamenán u přípravků Nozevit a ApiX. Testovaná ošetření neměla negativní účinky na včelstvo.

Bylo prokázáno, že suplementace proteiny, jako je propolis a pyl, zabraňuje klinickým příznakům infekce. Suplementace pylem zvyšuje transkripci genů souvisejících s expresí

vitellogeninu. Podávání extraktu propolisu snižuje hladiny spor *N. ceranae* u včel (Marín-García et al., 2022).

Klassen et al. (2021) zjišťovali vliv probiotik (eugenol, chitosan, naringenin) a komerčního probiotika Protexin na infekce *N. ceranae*. Ošetření eugenolem v cukrovém sirupu snižovalo počet spor u včel, pravděpodobně proto, že zesílil vnitřní vrstvy střevního traktu, což zvýšilo odolnost vůči střevním patogenům. Léčba Protexinem snížila počty spor a tím i infekci *N. ceranae*. V této studii bylo také zjištěno, že Protexin byl konzistentnější ve schopnosti kontrolovat infekci *N. ceranae* než fumagillin. Léčba naringeninem v cukrovém sirupu podobně snížila počet spor. Snížené množství *N. ceranae* naringeninem by mohlo být způsobeno jeho protilátkovou aktivitou, která zvyšuje množství antioxidantů a snižuje hladiny prozánětlivých cytokinů. Naopak chitosan nebyl spojen s významným snížením počtu spor.

Nechemická ošetření, jako je kyselina mravenčí, přírodní extrakt na bázi extraktu řepy a melasy a fenylsalicylát, neprokázali podle Marín-García et al. (2022) pozitivní vliv na kontrolu *N. ceranae*. Zato léčba kyselinou šťavelovou snížila počet spor v 8denním laboratorním experimentu a prevalence infekce se snížila.

2.4.3 *Crithidia mellificae*

V současnosti uznávání jednobuněční parazité *A. mellifera* představují čtyři skupiny eukaryot: *Amoebozoa*, *Chromalveolata*, *Excavata* a *Opisthokonta* (Schwarz et al., 2015). Třída *Kinetoplastea* (bičivky), která patří do skupiny *Excavata*, zahrnuje čeled' *Trypanosomatidae* sestávající z několik desítek druhů, které zahrnují obligátní parazity, obratlovce a hostitelé rostlin (Dario et al., 2021). *Kinetoplastea* obsahují hmoty kinetoplastové DNA (kDNA) v prodloužených mitochondriích těchto buněk. kDNA poskytuje alternativní zdroj genetického materiálu. Gen cytochromu b kódovaný na kDNA, Cytb, je důležitým lokusem pro rozlišení genotypů v rámci některých druhů. Čeled' *Trypanosomatidae* byly kategorizovány podle šesti hlavních morfotypů na základě bičíkaté fáze vývoje. Nejvýraznější je to patrné u morfotypu promastigota, který byl popsán u několika rodů, ke kterým patří i *Crithidia*. Trypanosomatidy postupně získávají uznání jako dominantní skupina patogenů u evropských včel medonosných a obvykle jsou přiřazovány k jednomu již uznávanému druhu, *Crithidia mellificae* (Schwarz et al., 2015).

2.4.3.1 Výskyt *C. mellifica*

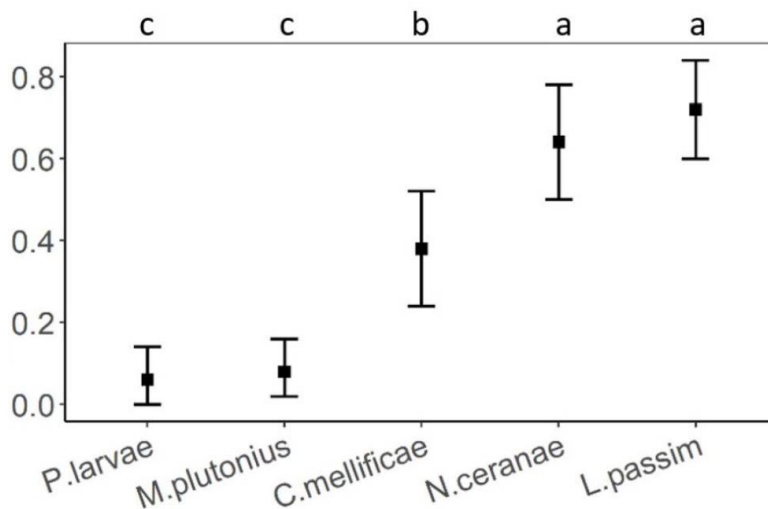
Z trypanosomatid patřících do *Excavata* je známo, že infikují *A. mellifera* již od roku 1912, s ohledem na množství zpráv o jejich běžné a globální distribuci včetně Evropy, Afriky, Jižní Ameriky a Asie (Schwarz et al., 2015). Rod *Crithidia* byl poprvé popsán jako typ infikující komáry *Anopheles maculipennis* s *Crithidia fasciculata*. Kromě komárů byly popsány v různých skupinách hmyzu s celosvětovou distribucí, včetně včel z rodů *Bombus* a *Apis*, štěnic z rodů *Leptopetalops* a *Largus* a pestřenek z rodu *Eristalis*. Druhy *C. mellifica* a *C. bombi* jsou v přírodních podmínkách nejvíce studovanými druhy, protože jsou patogenní pro včely a čmeláky a představují ekonomické ztráty v zemědělství (Dario et al., 2021).

C. mellifica byla poprvé popsána u australských včel v roce 1967. Během 60. a 70. let 20. století byla považována za převládající u *Apis mellifera*. Později se zjistilo, že izolovaná nukleotidová sekvence označená jako *C. mellifica*, patřila ve skutečnosti novému druhu, *Lotmaria passim*, kvůli morfologii jejich buněk, které nelze se 100 % jistotou rozlišit (Stevanovic et al., 2016).

Parazituje převážně na včelách, ale infikování tímto parazitem bylo pozorováno i u jiných bezobratlých hostitelů, jako je *Vaspula squamosa* (vosa), *Osmia cornuta* (sadová včela) nebo *Haematopota griseicoxa* (koňský hmyz) (Dario et al., 2021).

Byla prokázáno, že *C. mellifica* je schopna růst a udržovat se při různých teplotách. Dokáže přežít i při teplotách vyšších než 27 °C. Je tedy termotolerantní vůči vysokým teplotám, což vysvětluje výskyt této trypanosomatidy u různých druhů hostitelů po celém světě (Dario et al., 2021). Sezónní výskyt parazita se zdá být výrazně nižší na jaře ve srovnání s létem a podzimem (Cersini et al., 2015).

V roce 2021 byl publikován článek o screeningu patogenů včely medonosné v ČR a jejich prevalence v různých biotopech. Sledoval se výskyt pěti patogenů v městském biotopu. Nejčastějšími patogeny byly *L. passim* (72 %) a *N. ceranae* (64 %), na třetím místě *C. mellifica* (38 %).



Obr. č. 3: Porovnání podílu výskytu patogenů bez ohledu na stanoviště. Černé tečky představují průměr a chybové úsečky představují 95 % intervaly spolehlivosti. (Mráz et al., 2021)

2.4.3.2 Vliv infekce na včely medonosné

C. mellificae se může vyskytovat ve formě choanomastigotů nebo promastigotů. Promastigoti vykazují protáhlejší tvar buňky ve tvaru slzy s krátkým kaudálním (ocasným) prodloužením. Choanomastigoti jsou charakterističtí hlubokými, úzkými bočními rýhami a bičíkem vloženým do úzké přední kapsy, která sahá přibližně do poloviny délky buňky. Ten se skládá z axonémy s typickou strukturou mikrotubulů a kryptické paraflagelární tyčinky (Schwarz et al., 2015). Bičík je obklopen rezervoárem nebo bičíkovitou kapsou, ve které se vyskytují váčky (Buendía-Abad et al., 2022). Buňka choanomastigotů se pohybuje v průměru 6,62 μm na délku, u promastigotů je průměrná délka 7,44 μm (Schwarz et al., 2015).



Obr. č. 4: Snímky *Crithidia mellificae*. Pohled na typické choanomastigoty s hlubokými, úzkými bočními rýhami a předním bodem vložení bičíku. (Schwarz et al., 2015)

C. mellificae kolonizuje zadní střevo (íleum a konečník). Parazit vykazuje větší tropismus pro íleum, ale může se vyskytovat i v konečníku. Přichycení trypanosomatid k zadnímu střevu včely je zprostředkováno bičíkovou strukturou, která se nazývá flagellopodium. Bičík kontaktuje střevní buňky prostřednictvím struktur podobných hemidesmozomům. Dojde k hlavní přestavbě bičíku v distální oblasti, kde haptomonády vytvářejí připevňovací polštářek, který se spojuje s epiteliálními buňkami prostřednictvím rozsáhlých výdutí na bázi bičíku. Povrch této struktury se zrovná a rozšíří přes hostitelské buňky, čímž se vytvoří bod kontaktu mezi trypanosomatidou a hostitelem. Spojení mezi bičíkovcem a zadním střevem včely mohou být ve vzdálenosti 10-20 nm a mezeru mezi membránami vyplňují zabalená pole elektronových hustých vláken (Buendía-Abad et al., 2022).

Trypanosomatidy se přenášejí cestou kontaminace, predace nebo koprofagie. Předpokládá se, že orální přenos je hlavní cestou infekce *C. mellificae* (Dario et al., 2021).

Výzkumy o patologických účincích *C. mellificae* ve střevech včel medonosných se liší. Gómez-Moracho et al. (2020) zjistili, že v porovnání s *L. passim*, která patří také mezi trypanosomatidy, dosahovala *C. mellificae* vyšší hustoty buněk. Zdá se, že suplementace heminem zvyšuje množení *Crithidie*. V této studii bylo také zjištěno, že *C. mellificae* a *L. passim* zkracují délku života infikovaných včel, což podporuje patogenní vliv těchto trypanosomatid. Podle výzkumu Strobl et al. (2019) nebyl zjištěn žádný významný účinek infekce *C. mellificae* na tělesnou hmotnost hostitele. Data z této studie ukazují významné snížení přežití ve srovnání s kontrolami. Ravoet et al. (2013) ve své studii potvrdil úmrtnost *C. mellificae*. Analýza prokázala velký účinek výskytu v létě na pozdější zimní ztráty, především s koinfekcí *N. ceranae*. Oproti tomu Higes et al. (2016) zjistili, že *C. mellificae* nemá patologický účinek na včely medonosné. V této studii také potvrdili to, že *N. ceranae* způsobuje vyšší mortalitu včelích dělnic bez ohledu na přítomnost *C. mellificae*.

Patogenita *C. mellificae* na střevní mikrobiom není zcela jasná a dostupných informací je velice málo. *C. mellificae* ale parazituje v zadním střevě, kde pokrývá stěny střeva a tvoří koberce, které by mohly ohrozit absorpci metabolitů nebo tento proces blokovat. Alternativně by mohli haptomonádové buňky sekvestrovat molekuly a sloučeniny, buď přímo z lumen nebo ze střevních buněk včely. Oba tyto procesy by mohly generovat

nutriční deficit včely, což by mohlo zvýšit jejich úmrtnost. Přesto budou zapotřebí další studie k objasnění (Buendía-Abad et al., 2022).

Molekulární dopady *C. melliferae* na včely medonosné včetně imunitních reakcí, ať už samotných nebo ve spojení s jinými mikroby, jsou neprozkoumané oblasti důležité pro pochopení dynamiky hostitel-patogen na zdraví včel (Schwarz and Evans, 2013).

2.4.3.3 Léčba

Léčba *C. melliferae* je stále velice málo prozkoumána, podobně jako její vliv na střevní mikrobiom včely medonosné. I přesto existuje pár studií, které se léčbou trapanosomatid zabývají. Podle výzkumu Palmer-Young et al. (2022) by mohli fytochemické bariéry omezit rozmanitost trypanosomatid, které infikují včely medonosné. Flavonoidy jsou jednou třídou antimikrobiálních sloučenin, které jsou všudypřítomné jak v nektaru, tak v pylu. Včely se dále vyznačují sbírkou rostlinných pryskyřic bohatých na sekundární metabolity (propolis), které často obsahují více než 20 % flavonoidů.

Studie Alotaibi et al. (2019) se zabývala účinky propolisu. Propolis je pryskyřičná látka sbíraná včelami, obvykle z pupenů rostlin. Propolis téměř vždy vykazoval aktivitu proti prvokům, zejména z řádu *Kinetoplastida*. Antiprotozoální aktivita byla zajištěna u propolisu z Libye, Nigérie, Kamerunu, Saúdské Arábie a Brazílie. Zatím neexistuje žádný důkaz o tom, že by včely požívali propolis, ale protože k šíření protozoální infekce dochází prostřednictvím výkalů, potažení povrchů v úlu propolisem, by mohlo zabránit přenosu. Zůstává však nezodpovězenou otázkou, jak důležitý je propolis pro včely a jaký je jeho přesný mechanismus při zadržování infekcí v úlu.

3 Cíle práce

Cílem této práce bylo vyšetřit vybraná včelstva chovaná na včelnici Fakulty zemědělské a technologické Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Vyšetření bylo provedeno metodou PCR na vybraná onemocnění způsobené patogeny *Nosema ceranae* a *Crithidia mellificae*. Dalším úkolem bylo zjištěné výsledky porovnat se zimními úhyny těchto včelstev.

4 Materiál a metody

4.1 Přehled vyšetřovaných vzorků

Pro detekci patogenů bylo vyšetřeno 33 vzorků včel medonosných. Z každého včelstva bylo smeteno z rámku cca 50 dělnic, které byly usmrceny uložením do -20°C.

Tabulka č. 2: Seznam vzorků (1)

Číslo vzorku	Datum odebrání
1	14.11.2023
2	14.11.2023
3	14.11.2023
4	14.11.2023
5	14.11.2023
7	14.11.2023
8	14.11.2023
9	14.11.2023
10	14.11.2023
11	14.11.2023
14	14.11.2023
15	14.11.2023
16	14.11.2023
22	14.11.2023
25	14.11.2023
26	21.11.2023
27	21.11.2023
28	21.11.2023
29	21.11.2023

Tabulka č. 3: Seznam vzorků (2)

Číslo vzorku	Datum odebrání
26	14.2.2024
27	14.2.2024
28	14.2.2024
29	14.2.2024
1	16.2.2024
2	16.2.2024
3	16.2.2024
4	16.2.2024
5	16.2.2024
7	16.2.2024
8	16.2.2024
9	16.2.2024
10	16.2.2024
25	16.2.2024

4.2 Příprava vzorků

Zmražené včely byly vyndány z mrazáku a rozdrceny v třecí misce s tloučkem. Následovala izolace DNA pomocí extrakčního pufru CTAB-PVP.

4.3 Izolace DNA

1. Včely byly rozdrceny a bylo přidáno 495 µl CTAB-PVP a 5 µl mercaptoethanolu (na jeden vzorek).
2. Do sterilních, řádně označených, mikrocentrifugačních zkumavek byl přepipetován vzniklý roztok z třecích misek.
3. Zkumavky byly inkubovány 10 minut při 65 °C, během inkubace byly zkumavky lehce promíchány.

4. Po inkubaci proběhla centrifugace 5 minut na maximální rychlost při pokojové teplotě.
5. K vzorkům bylo přidáno 500 μ l chloroformu – IAA a 5 minut byly zkumavky se vzorky protřepávány.
6. Následně proběhla znovu centrifugace 5 minut na maximální rychlost při pokojové teplotě.
7. Po centrifugaci byla přepipetována vodná fáze do nových, označených zkumavek a bylo přidáno 2/3 objemu izopropanolu. Zkumavky byly 2 - 3x lehce promíchány.
8. Zkumavky byly inkubovány na 10 minut v mrazáku (-20 °C).
9. Zkumavky byly centrifugovány 5 minut při 4 °C na maximální rychlost. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant.
10. Bylo přidáno 1 ml ledového 70 % ethanolu a vzorky centrifugovány 5 minut na maximální rychlost při 4 °C. Znovu byl odstraněn supernatant. Suché zkumavky byly usušeny při 37 °C cca 30 minut.
11. K usušeným vzorkům bylo přidáno 100 μ l TE-pufu.
12. Zkumavky s DNA byly uchovány při – 20 °C.

4.4 Ověření kvality izolace DNA

Měření kvality a koncentrace získané DNA bylo provedeno pomocí analyzátoru BioSpec-nano, který funguje na principu spektrofotometrie, a počítačového softwaru.



Obr. č. 5 Analyzátor BioSpec-nano

1. Před měřením byl do analyzátoru pipetován negativní (blank) vzorek na předem označené místo.
2. V počítačovém softwaru byl spuštěn start.
3. Po změření bylo místo, na které bylo pipetováno, automaticky otřeno hadříkem.
4. Po blanku bylo pipetováno 1 μ l izolované DNA na předem označené místo.
5. V počítačovém softwaru byl spuštěn start.
6. Po každém měření bylo označené místo automaticky otíráno hadříkem.
7. Takto byla změřena kvalita u všech vzorků.
8. Výsledné hodnoty byly změřeny a přeneseny do počítače. Soubor byl uložen ve formátu PDF.

4.5 PCR

Reakční směs pro metodu PCR byla namíchána z Master mixu, reverse primeru, forward primeru, PCR H₂O a DNA. Před použitím byly složky reakce uchovány v lednici a namíchány pro každý vzorek následovně:

Tabulka č. 4 Reakční směs pro PCR

Složky PCR	μl
Master mix	5
Forward primer	0,25
Reverse primer	0,25
DNA	1
PCR H ₂ O	3,5

V následujících tabulkách č. 5–8 jsou shrnuty sekvence a délky ampliconů pro jednotlivé primery použité v této práci.

Tabulka č. 5 Sekvence původních primerů pro *N. ceranae* (Mráz et al., 2021)

Typ primeru	Sekvence	Délka ampliconu
Forward	5'-CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTAA-3'	218 bp
Reverse	5'-CCCGGTCATTCTCAAACAAAAAACCG-3'	

Tabulka č. 6 Sekvence původních primerů pro *C. melliferae* (Mráz et al., 2021)

Typ primeru	Sekvence	Délka ampliconu
Forward	5'-AGTTTGAGCTGTTGGATTTGTT-3'	140 bp
Reverse	5'-AACCTATTACAGGCACAGTTGC-3'	

Tabulka č. 7 Sekvence nových primerů pro *N. ceranae* (Naudi et al., 2021)

Typ primeru	Sekvence	Délka ampliconu
Forward	5'-CGTTAAAGTAGATAAGATGTT-3'	143 bp
Reverse (uni)	5'-GACTTAGTAGCCGTCTCTC-3'	

Tabulka č. 8 Sekvence nových primerů pro *C. melliferae* (Stevanovic et al., 2016)

Typ primeru	Sekvence	Délka ampliconu
Forward	5'-AGTtTGAgCtGTtGGaTTTgTt-3'	160 bp
Reverse	5'-AACcTAttACaGGcACaGTTGC-3'	

Po napipetování reakční směsi do PCR stripů byly vzorky vloženy do termocycleru, kde byl použit amplifikační program podle použitých primerů pro *N. ceranae* a *C. mellifica*.

Tabulka č. 9 Amplifikační program pro *N. ceranae* a *C. mellifica* (původní primery):

Krok	Počet cyklů	Teplota	Čas
Počáteční denaturace	1	95 °C	02:00
Denaturace	35	95 °C	00:30
Annealing		55 °C	00:30
Elongace		72 °C	00:59
Finální elongace	1	72 °C	05:00
Ochlazení		4 °C	Bez limitu

Tabulka č. 10 Amplifikační program pro *N. ceranae* *C. mellifica* (nové primery):

Krok	Počet cyklů	Teplota	Čas
Počáteční denaturace	1	94 °C	00:45
Denaturace	35	94 °C	00:45
Annealing		55 °C	00:45
Elongace		72 °C	01:00
Finální elongace	1	72 °C	10:00
Ochlazení		4 °C	Bez limitu



Obr. č. 6 Termocycler

4.6 Gelová elektroforéza

Na zhotovení agarózového gelu bylo použito 115 ml TBE, 1,5 g agarózy a 4 μ l Ethidium bromide.

1. Bylo smícháno 1,5 g agarózy a 115 ml TBE v Erlenmeyerově baňce a následně postupně zahříváno a rozpuštěno v mikrovlnné troubě.
2. Směs byla ochlazena na cca 50 °C pod tekoucí vodou.
3. Bylo přidáno 4 μ l barviva Ethidium bromide a lehce promícháno.
4. Do předem připravené formy s hřebínky na vytvoření jamek byl nalit gel.
5. Za cca 30 minut byly opatrně vyjmuty hřebínky a vanička s gelem byla vložena do elektroforetické vany s TBE pufrem.
6. Do vytvořených jamek bylo pipetováno cca 7 μ l 100bp Ladderu (žebříčku) a za ním směs DNA.
7. Po nanesení všech vzorků byla elektroforetická vana zakryta víkem s přívodními kabely. Elektroforéza byla připojena ke zdroji a bylo nastaveno napětí 90 V na 30 minut.



Obr. č. 7 Elektroforetická vana s agarózovým gelem a napipetovanými vzorky

4.7 Vizualizace

Po skončení elektroforézy proběhla vizualizace gelu za pomoci UV transluminátoru s UV světlem, snímacího kamerového systému a počítačového programu.

5 Výsledky

5.1 Kontrola kvality a koncentrace izolované DNA

Po izolaci DNA byla změřena kvalita a koncentrace nukleových kyselin na analyzátoru BioSpec-nano.

No.	Sample Name	Date Time	Check	Judge	Nucleic Acid Conc(ng/ μ L)	OD260 /280	OD260 /230	OD 260	OD 280	OD 230	OD 320	Pathlength (mm)	Dilution
1	1 14.11.23	24/03/14 13:16:35			312.43	0.81	0.57	7.808	9.296	12.474	1.559	0.209	1.000
2	2 14.11.23	24/03/14 13:20:05			118.47	1.08	0.71	2.468	2.294	3.446	0.098	0.209	1.000
3	3 14.11.23	24/03/14 13:21:00			1122.57	0.75	0.57	29.583	37.010	46.534	7.132	0.209	1.000
4	4 14.11.23	24/03/14 13:21:56			595.04	2.05	1.45	11.677	5.588	7.989	-0.223	0.209	1.000
5	5 14.11.23	24/03/14 13:22:39			968.85	1.88	1.07	19.845	10.799	18.591	0.468	0.209	1.000
6	7 14.11.23	24/03/14 13:23:22			337.27	1.92	1.19	6.389	3.158	5.334	-0.357	0.209	1.000
7	8 14.11.23	24/03/14 13:24:26			560.34	2.05	1.40	10.908	5.163	7.692	-0.298	0.209	1.000
8	9 14.11.23	24/03/14 13:25:36			223.00	2.06	1.56	4.039	1.746	2.443	-0.421	0.209	1.000
9	10 14.11.23	24/03/14 13:26:57			338.75	1.72	0.99	6.719	3.873	6.760	-0.057	0.209	1.000
10	11 14.11.23	24/03/14 13:27:37			443.98	1.37	0.77	9.624	7.239	12.222	0.744	0.209	1.000

Obr. č. 8 Kontrola kvality DNA (vzorky 1-11, 14.11.2023)

No.	Sample Name	Date Time	Check	Judge	Nucleic Acid Conc(ng/ μ L)	OD260 /280	OD260 /230	OD 260	OD 280	OD 230	OD 320	Pathlength (mm)	Dilution
11	14 14.11.23	24/03/14 13:28:15			595.93	1.98	1.31	11.806	5.917	9.012	-0.113	0.209	1.000
12	15 14.11.23	24/03/14 13:28:53			1268.41	0.77	0.60	32.259	39.747	49.180	6.891	0.209	1.000
13	16 14.11.23	24/03/14 13:29:34			399.21	1.03	0.74	9.577	9.322	12.318	1.593	0.209	1.000
14	22 14.11.23	24/03/14 13:30:14			911.81	1.96	1.17	18.419	9.497	15.711	0.183	0.209	1.000
15	25 14.11.23	24/03/14 13:30:53			168.04	2.10	1.62	2.775	1.011	1.486	-0.586	0.209	1.000
16	1b 14.2.24	24/03/14 13:31:43			871.06	0.46	0.43	21.104	41.740	44.418	3.683	0.209	1.000
17	2b 14.2.24	24/03/14 13:32:21			275.54	0.35	0.32	7.146	17.539	18.807	1.635	0.209	1.000
18	3b 14.2.24	24/03/14 13:32:52			1030.61	0.45	0.39	29.699	54.679	61.863	9.087	0.209	1.000
19	4b 14.2.24	24/03/14 13:33:34			227.32	2.02	1.45	4.215	1.923	2.810	-0.331	0.209	1.000
20	26 21.11.23	24/03/14 13:34:11			906.27	0.50	0.47	21.238	39.264	41.760	3.113	0.209	1.000

Obr. č. 9 Kontrola kvality DNA (vzorky 14-25, 14.11.2023; 26–29 v tabulce značeno 1b-4b, 14.2.2024; 26, 21.11.2023)

No.	Sample Name	Date Time	Check	Judge	Nucleic Acid Conc(ng/ μ L)	OD260 /280	OD260 /230	OD 260	OD 280	OD 230	OD 320	Pathlength (mm)	Dilution
21	27 21.11.23	24/03/14 13:34:49			1324.71	0.45	0.41	33.084	64.882	70.693	6.590	0.209	1.000
22	28 21.11.23	24/03/14 13:35:27			503.69	1.04	0.78	11.300	10.887	14.062	1.226	0.209	1.000
23	29 21.11.23	24/03/14 13:36:07			604.56	1.62	1.16	12.793	8.158	11.111	0.702	0.209	1.000

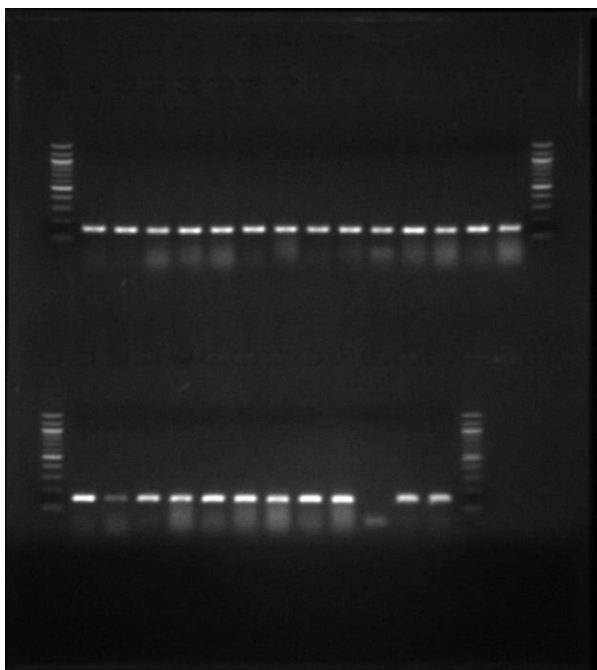
Obr. č. 10 Kontrola kvality DNA (vzorky 27-29, 21.11.2023)

No.	Sample Name	Date Time	Check	Judge	Nucleic Acid Conc(ng/ μ L)	OD260 /280	OD260 /230	OD 260	OD 280	OD 230	OD 320	Pathlength (mm)	Dilution
1	1 16.2.24	24/03/21 13:48:34			319.52	0.92	0.63	9.069	9.654	12.745	2.679	0.209	1.000
2	2 16.2.24	24/03/21 13:49:23			608.99	1.78	1.15	14.947	9.612	13.383	2.767	0.209	1.000
3	3 16.2.24	24/03/21 13:50:12			224.16	0.61	0.48	6.166	9.037	10.934	1.682	0.209	1.000
4	4 16.2.24	24/03/21 13:50:51			314.26	1.04	0.68	8.428	8.172	11.345	2.142	0.209	1.000
5	5 16.2.24	24/03/21 13:51:29			126.35	0.49	0.39	3.375	6.031	7.407	0.848	0.209	1.000
6	7 16.2.24	24/03/21 13:52:10			62.53	1.74	0.80	1.070	0.536	1.380	-0.181	0.209	1.000
7	8 16.2.24	24/03/21 13:52:56			760.76	2.13	1.61	16.535	8.462	10.787	1.320	0.209	1.000
8	9 16.2.24	24/03/21 13:53:33			715.81	1.88	1.18	16.931	10.223	14.757	2.615	0.209	1.000
9	10 16.2.24	24/03/21 13:54:13			34.53	1.09	0.41	0.615	0.558	1.602	-0.076	0.209	1.000
10	25 16.2.24	24/03/21 13:54:52			375.99	2.15	1.66	7.518	3.497	4.528	-0.002	0.209	1.000

Obr. č. 11 Kontrola kvality DNA (vzorky 1-25, 16.2.2024)

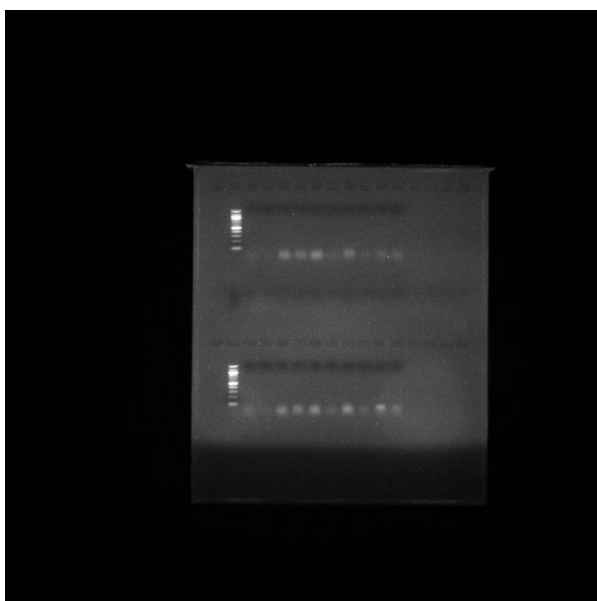
5.2 Výsledky z gelové elektroforézy

Všechny vzorky byly otestovány nejprve s primery pro včelu medonosnou pro kontrolu amplifikovatelnosti vzorků. Ilustrační obr. č. 12 zobrazuje první sadu testovaných 26 vzorků. Většina vzorků byla pozitivní na přítomnost DNA včely medonosné. Světelná výraznost se odvíjí od množství specifické DNA ve vzorku.



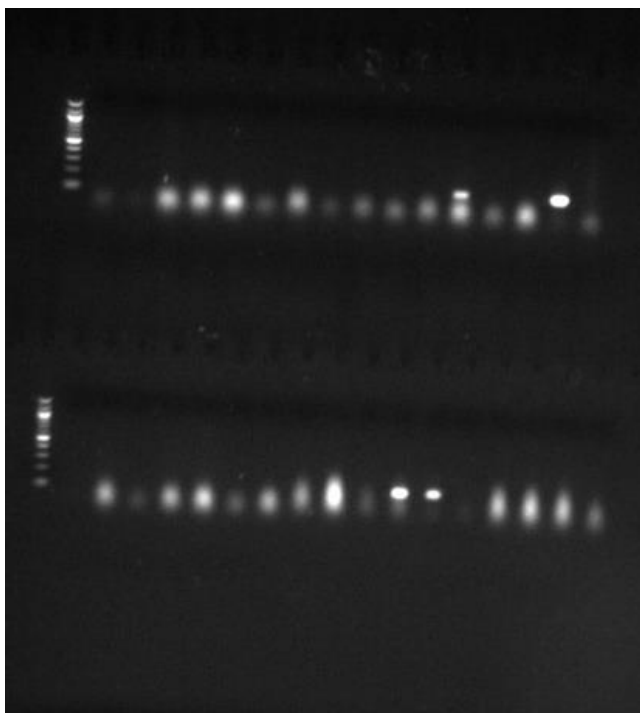
Obr. č. 12 Elektroforetický snímek s primery *Apis mellifera*.

Všechny vzorky byly následně vyšetřovány na přítomnost patogenů *Nosema ceranae* a *Crithidia mellifica*.



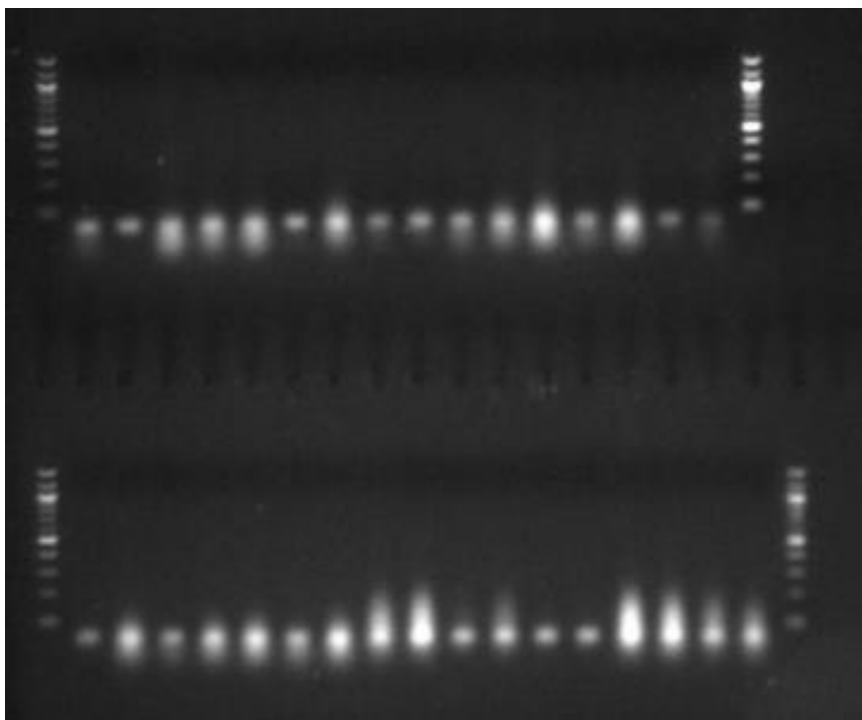
Obr. č. 13 Elektroforetický snímek s původními primery

Na obrázku č. 13 je testováno 10 vzorků s původními primery. V horní části gelu jsou vzorky s původními primery, které měly detekovat *N. ceranae*, v dolní části jsou vzorky s primery, které měly detekovat *C. mellifica*. Vzhledem k tomu, že všechny vzorky měly negativní výsledek (včetně pozitivních kontrol, které nejsou na obrázku), byly objednány nové primery s odlišnou sekvencí.



Obr. č. 14 Elektroforetický snímek s novými primery *Nosema ceranae*

Z 33 vzorků byly na přítomnost mikrosporidie *Nosema ceranae* pozitivní pouze 4, konkrétně vzorky ze včelstev č. 15 (14.11.23), č. 25 (14.11.23), č. 4 (16.2.24) a č. 5 (16.2.24).



Obr. č. 15 Elektroforetický snímek s novými primery *C. mellifica*

Z elektroforetického snímku (obr. č. 14) nebylo možné hodnotit pozitivitu vzorků vyšetřované na *C. mellifica*. Všechny vzorky vyšly opakovaně negativní.

V následující tabulce jsou shrnuty údaje o úhynech včelstev na včelnici FZT JU.

Tabulka č. 11: Zimní úhyn včelstev na včelnici FZT JU

Číslo včelstva	Datum úhynu
1	
2	
3	
4	
5	
7	
8	Březen 2024
9	
10	
11	
14	Březen 2024
15	Březen 2024
16	
22	
25	
26	
27	
28	
29	

6 Diskuse

Cílem této práce bylo vyšetřit vybraná včelstva chovaná na včelnici FZT JU na přítomnost patogenů *Nosema ceranae* a *Crithidia mellificae*. K tomuto účelu byly odebrány vzorky včel v dvou opakováních v průběhu zimního období 2023/2024. Tato sezona byla specifická velmi dlouhým, teplým podzimem, což mohlo určitým způsobem ovlivnit zdravotní stav včelstev.

Nosema ceranae je intracelulární parazit a šíří se mezi hostiteli ve formě spor (Fries, 2010). U včel v posledních letech nahradila původně převládající *Nosema apis* (Mráz et al. 2021). U včel chovaných na FZT JU jsem testovala přítomnost *Nosema ceranae* za použití primerů, které byly použity při screeningu patogenů včely medonosné v ČR v roce 2020 (Mráz et al., 2021). V mých vzorcích se pomocí těchto primerů nepodařilo amplifikovat žádné fragmenty DNA. Pravděpodobnost, že by všechny moje vzorky byly negativní, jsem vyhodnotila jako velmi nízkou, vzhledem k tomu, že autoři uvádějí prevalenci *N. ceranae* ve včelstvech chovaných na území ČR 64 %. DNA z mých vzorků byla extrahována metodou CTAB, tedy stejnou metodou, kterou použili Mráz et al. (2021). Autoři skladovali již vyizolovanou DNA při 4 °C, zatímco mé vzorky s časně izolovanou DNA byly skladovány při -20 °C a poté při 4 °C. Skladovány byly pouze pár týdnů, ale je možné, že vlivem kontaminace, byla urychlena degradace DNA, která je zřejmá díky „šmouze“ v elektroforetickém gelu (obr. č. 13). Provedla jsem ale zkoušku amplifikovatelnosti pomocí primerů pro včelí gen actin, kdy vzorky vyšly pozitivně, čímž byla potvrzena jejich amplifikovatelnost.

V publikaci Mráz et al. (2021) jsou malé odlišnosti v amplifikačním programu. Pro *N. ceranae* byl program nastaven na počáteční denaturaci při 95 °C po dobu 5 minut a finální elongaci při 72 °C po dobu 10 minut. Amplifikační program, který jsem používala byl nastaven na počáteční denaturaci ve stejné teplotě, ale po dobu pouze 2 minut. Finální elongace byla nastavena na 72 °C po dobu 5 minut. Nemyslím si však, že by toto bylo důvodem, proč by pozitivní vzorky vycházely falešně negativní.

Tyto primery pro *N. ceranae* také používali Martín-Hernández et al. (2007) k vyšetření včel. Primery fungovaly a autoři potvrdili přítomnost *N. ceranae* v 53,8 % ze všech zkoumaných vzorků.

I přes opakované testování primerů se mi nepodařilo amplifikovat specifické fragmenty pro *N. ceranae*, proto jsem použila nový pár primerů podle publikace Naudi et al. (2021) Přítomnost *N. ceranae* byla potvrzena u 4 vzorků včel., jak je vidět na obr. č. 14. Jedním z pozitivně testovaných včelstev bylo včelstvo č. 15, které v březnu uhynulo. Tento zimní úhyn mohl být způsoben rozšiřující se *N. ceranae*.

Druhým patogenem, jehož přítomnost ve včelstvech jsem testovala v rámci této práce je *C. melliferae*, která parazituje na dospělých včelách, napadá epiteliální buňky jejich středního střeva (Hristov et al., 2021). Opět jsem použila nejdříve primery, které použili i Mráz et al. (2021). Přítomnost *C. melliferae* nebyla opakovaně prokázána u žádného vzorku. Vzhledem k tomu, že Mráz et al. (2021) popisují ve své práci prevalenci *C. melliferae* u 38 % včelstev chovaných v ČR, byla pravděpodobnost negativity všech vzorků nízká, proto jsem opět opakovala testování všech vzorků s jinými primery.

Stevanovic et al. (2016) použili na diagnostiku trypanosomatid nové primery. Tyto primery byly použity pro můj druhý pokus o vyšetření vzorků na přítomnost patogenu *C. melliferae*. I v tomto případě vyšly všechny testované vzorky negativně. Mnou použitý amplifikační program se lišil pouze v počáteční denaturaci, která probíhala při 95 °C po dobu 2 minut a ve finální elongaci, která se lišila pouze ve zkrácené době tohoto kroku.

Ravoet et al. (2015) použili nově navržené primery pro *C. melliferae* (F – CCCACGGGAATATCCTCAGC; R – GGTAACCCGCGGATGAGT), které byly navrženy v polymorfních oblastech genu pro cytochrom b (Cytb). Vědcům se podařilo identifikovat *C. melliferae* u belgických včel se stejným amplifikačním programem, který jsem použila pro *C. melliferae*.

Jednotlivé amplifikační programy se od sebe tedy natolik neliší, aby to výrazně ovlivnilo výsledek PCR testu. Je tedy pravděpodobné, že včelstva chovaná na FZT JU nejsou tímto patogenem napadena.

7 Závěr

Cílem této práce bylo vyšetřit vybraná včelstva chovaná na včelnici FZT JU na přítomnost patogenů *Nosema ceranae* a *Crithidia mellificae* v průběhu zimního období 2023/2024. Bylo otestováno 33 vzorků včel medonosných na tyto patogeny. Vzorky byly odebrány ve dvou opakováních v listopadu 2023 a v únoru 2024. Byla potvrzena pouze přítomnost *N. ceranae*, a to ve 4 vzorcích, přičemž u jednoho pozitivně testovaného včelstva došlo k úhynu. Přítomnost *C. mellificae* nebyla potvrzena u žádného vzorku.

8 Seznam literatury

- 1) ALOTAIBI, A., EBILOMA, G. U., WILLIAMS, R., ALENEZI, S., DONACHIE, A. M. et al., 2019. European propolis is highly active against trypanosomatids including *Crithidia fasciculata*. *Scientific Reports*. 9 (1), s. 11364. DOI: 10.1038/s41598-019-47840-y. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6684629/>
- 2) BOTÍAS, C., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., BARRIOS, L., MEANA, A., HIGES, M., 2013. *Nosema* spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. *Veterinary Research*. 44 (25) DOI: 10.1186/1297-9716-44-25. ISSN 1297-9716. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-25>
- 3) BUENDÍA-ABAD, M., GARCÍA-PALENCIA, P., MIGUEL DE PABLOS, L., ALUNDA, J. M., OSUNA, A. et al., 2022. First description of *Lotmaria passim* and *Crithidia mellificae* haptomonad stages in the honeybee hindgut. *International Journal for Parasitology*. 52 (1), s. 65-75. DOI: 10.1016/j.ijpara.2021.06.005. ISSN 0020-7519. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751921002587?via%3Dihub>
- 4) CERSINI, A., ANTOGENTTI, V., CONTI, R., VELLETRANI, F., FORMATO, G., 2015. First PCR isolation of *Crithidia mellificae* (Euglenozoa: Trypanosomatidae) in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in Italy. *Fragmenta entomologica*. 47(1), pp. 45–49. DOI: 10.13133/2284-4880/133. ISSN 2284-4880. Dostupné z: https://rosa.uniroma1.it/rosa02/fragmenta_entomologica/article/view/133/124
- 5) CORNMAN R.S., TARPY D.R., CHEN Y, JEFFREYS L, LOPEZ D, PETTIS J.S., et al., 2012. Pathogen Webs in Collapsing Honey Bee Colonies. *Plos One*. 7(8) DOI: 10.1371/journal.pone.0043562. Dostupné z: <https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0043562&type=printable>
- 6) DARIO, M. A., LISBOA, C. V., SILVA, M. V., HERRERA, H. M., ROCHA, F. L. et al., 2021. *Crithidia mellificae* infection in different mammalian species in

- Brazil. Online. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. 15, s. 58-69. DOI: 10.1016/j.ijppaw.2021.04.003. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8085711/>
- 7) DROBNÍKOVÁ V., 1983. Bakterie ve včelařství. *Včelařství*. 9: 202–203
 - 8) FRIES, I., FENG, F., DA SILVA, A., SLEMENDA, S. B., PIENIAZEK, N. J., 1996. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology*. 32 (3), s. 356-365. DOI: 10.1016/S0932-4739(96)80059-9. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0932473996800599>
 - 9) FRIES, I., 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*. 103, S73–S79. DOI: 10.1016/j.jip.2009.06.017. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201109001888>
 - 10) GILLIAM M., 1997. Identification and role of non-pathogenic microflora associated with honey bee. *Fems Microbiology Letters*. 155: 1-10. DOI: 10.1111/J.1574-6968.1997.TB12678.X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12678.x>
 - 11) GISDER, S., MÖCKEL, N., LINDE, A., GENERSCH, E., 2011. A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important honey bee-pathogenic microsporidia. *Environmental mikrobiology*. 13 (2), 404–413. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2010.02346.x. PMID 20880328. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20880328/>
 - 12) GÓMEZ-MORACHO, T., BUENDÍA-ABAD, M., BENITO, M., GARCÍA-PALENCIA, P., BARRIOS, L., BRTOLOMÉ, C., MASIDE, X., MEANA, A., JIMÉNEZ-ANTÓN, M. D., OLÍAS-MOLERO, A. I., ALUNDA, J. M., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., & HIGES, M., 2020. Experimental evidence of harmful effects of *Crithidia mellificae* and *Lotmaria passim* on honey bees. *International Journal for Parasitology*. 50(13), 1117–1124. DOI: 10.1016/j.ijpara.2020.06.009. ISSN 0020-7519. Dostupné z:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751920302368?via%3DiHub>

- 13) HANOUSEK, L., 1991. Začínáme včelařit. 1.st ed. Praha: Brázda. ISBN 80-209-0194-9.
- 14) HIGES, M., RODRIGUEZ GARCÍA, C., GÓMEZ-MORACHO, T., MEANA, A., BARTOLOME, C., MASIDE, X., BARRIOS, L., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., 2016. Short communication: survival of honey bees (*Apis mellifera*) infected with *Crithidia mellificae* (Langridge and McGhee: ATCC® 30254TM) in the presence of *Nosema ceranae*. Spanish Journal Agriculture Research. 14 (3), e05SC02. DOI: 10.5424/sjar/2016143-8722. ISSN2171-9292. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/307555302_Short_communication_Survival_of_honey_bees_Apis_mellifera_infected_with_Crithidia_mellificae_Langridge_and_McGhee_ATCCR_30254_in_the_presence_of_Nosema_ceranae
- 15) HRABÁK, J., 2014. Mor včelího plodu a jeho klinické příznaky. Včelařství. Praha. 67 (9), s. 258-259. ISSN 0042-2924.
- 16) HRISTOV, P. et al., 2021. Honey Bee Colony Losses: Why Are Honey Bees Disappearing?. Sociobiology. 68 (1). DOI: 10.13102/sociobiology.v68il.5851. ISSN 0361-6525. Dostupné z: <https://periodicos.uefs.br/index.php/sociobiology/article/view/5851/4912>
- 17) CHEN, Y. P., HUANG Z. Y., 2010. *Nosema ceranae*, a newly identified pathogen of *Apis mellifera* in the USA and Asia. Apidologie. 41 (3), s. 364-374. DOI: 10.1051/apido/2010021. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1051/apido/2010021#citeas>
- 18) INGLIS GD, SIGLER L, GOETTE MS., 1993. Aerobic microorganisms associated with alfalfa leafcutter bees (*Megachile rotundata*). Microb Ecol. 26(2), 125-143. DOI: 10.1007/BF00177048. PMID: 24190009. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24190009/>
- 19) JABAL-URIEL, C., ALBA, C., HIGES, M. et al., 2022. Effect of *Nosema ceranae* infection and season on the gut bacteriome composition of the European honeybee (*Apis mellifera*). Scientific Reports. 12, 9326. DOI: 10.1038/s41598-022-13337-

4. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-13337-4#citeas>
- 20) KAMLER, F., 2011. Komerční včelaření v České republice. 2., dopl. vyd. Dol: Výzkumný ústav včelařský. ISBN 978-80-87196-06-9
- 21) KEŠNEROVÁ, L., EMERY, O., TROILO, M. et al., 2020. Gut microbiota structure differs between honeybees in winter and summer. ISME Journal. 14, 801–814. DOI: 10.1038/s41396-019-0568-8. ISSN 1751-7370. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/s41396-019-0568-8#citeas>
- 22) KLASSEN S., S., VANBLYDERVEEN, W., ECCLES, L., KELLY, P., G., BORGES, D., GOODWIN, P., H., PETUKHOVA, T., WANG, Q. GZMAN-NOVOA, E., 2021. *Nosema ceranae* Infections in Honey Bees (*Apis mellifera*) Treated with Pre/Probiotics and Impacts on Colonies in the Field. Veterinary Sciences. 8(6), 107. DOI: 10.3390/vetsci8060107. ISSN 2306-7381. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2306-7381/8/6/107>
- 23) LAMPEITL, F., 1996. Chováme včely: úvod do včelaření. [4. rozš. a aktualiz. vyd.]. Ostrava: Blesk. ISBN 80-85606-96-8.
- 24) LIEBIG, G., 1998. Včelaříme jednoduše. 5.th ed. Stuttgart: APRO. ISBN 80-86041-64-6.
- 25) MARÍN-GARCÍA, P.J., PEYRE, Y., AHUIR-BARAJA, A. E., GARIJO, M. M., LLOBAT L., 2022. The Role of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) in Honey Bee Colony Losses and Current Insights on Treatment. Veterinary Sciences. 9(3), 130. DOI: 10.3390/vetsci9030130. ISSN 2306-7381. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2306-7381/9/3/130>
- 26) MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., MEANA, A., PRIETO, L., SALVADOR, A. M., GARRIDO-BAILÓN, E., HIGES, M., 2007. Outcome of Colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. Applied and Environmental Microbiology. 73(20), 6331-6338. DOI: 10.1128/AEM.00270-07. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2075036/>
- 27) MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., BOTÍAS, C., BARRIOS, L., MARTÍNEZ-SALVADOR, A., MEANA, A., MAYACK, Ch., HIGES, M., 2011. Comparison

of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). *Parasitology Research*. 109(3), 605-612. DOI: 10.1007/s00436-011-2292-9. ISSN 0932-0113. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-011-2292-9>

28) MAYACK, C., NAUG, D., 2009. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *Journal Invertebrate Pathology* 100 (3), 185–188. DOI: 10.1016/j.jip.2008.12.001. ISSN 0022-2011. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201108002668>

29) MICHALCZYK, M., SOKÓŁ, R., KOZIATEK, S., 2016. Evaluation of the effectiveness of selected treatments of *Nosema* spp. infection by the hemocytometric method and duplex PCR. Online. *Acta Veterinaria-Beograd*. 66 (1), s. 115-124. DOI: 10.1515/acve-2016-0009. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/298319143_Evaluation_of_the_Effectiveness_of_Selected_Treatments_of_Nosema_Spp_Infection_by_the_Hemocytometric_Method_and_Duplex_Pcr

30) MRÁZ, P., HÝBL, M., KOPECKÝ, M., BOHATÁ, A., HOŠTIČKOVÁ, I., ŠIPOŠ, J., VOČADLOVÁ, K., ČURN, V., 2021. Screening of Honey Bee Pathogens in the Czech Republic and Their Prevalence in Various Habitats. *Insects*. 12(12), 1051. DOI: 10.3390/insects12121051. ISSN 2075-4450. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2075-4450/12/12/1051>

31) NAREE, S., ELLIS, J.D., BENBOW, M.E., SUWANNAPONG, G., 2021. Experimental *Nosema ceranae* infection is associated with microbiome changes in the midguts of four species of *Apis* (honey bees). *Journal of Apicultural Research* 61(3), 435-447. DOI: 10.1080/00218839.2021.1987086. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/355395372_Experimental_Nosema_ceranae_infection_is_associated_with_microbiome_changes_in_the_midguts_of_four_species_of_Apis_honey_bees

32) NAUDI, S., ŠTEISELIS, J., JURISON, M., RAIMETS, R., TUMMELEHT, L., PRAAKLE, K., RAIE, A., KARISE, R., 2021. Variation in the Distribution of *Nosema* Species in Honeybees (*Apis mellifera* Linnaeus) between the Neighboring Countries Estonia and Latvia. *Veterinary Sciences*. 8(4), 58. DOI:

10.3390/vetsci8040058. Dostupné z:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8066546/>

- 33) OZGOR, E., GÜZERIN, E., KESKIN, N., 2015. Determination and comparison of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in terms of geographic and climatic factors 43 (1), 9-15. DOI: 10.15671/HJBC.20154311200. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/279712918_Determination_and_Comparison_of_Nosema_apis_and_Nosema_ceranae_in_Terms_of_Geographic_and_Climatic_Factors
- 34) PALMER-YOUNG, E. C., SCHWARZ, R. S., CHEN, Y., EVANS, J. D., 2022. Punch in the gut: parasite tolerance of phytochemicals reflects host diet. *Environmental Microbiology*. 24 (4), s. 1805-1817. DOI: 10.1111/1462-2920.15981. ISSN 1462-2912. Dostupné z: <https://enviromicro-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/1462-2920.15981>
- 35) PAXTON, R. J., KLEE, J., KORPELA, S., FRIES, I., 2007. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie*. 38(6), 558-565. DOI: 10.1051/apido:2007037. ISSN 0044-8435. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1051/apido:2007037>
- 36) RAVOET, J., MAHARRAMOV, J., MEEUS, I., SMET, L.D., WENSELEERS, T., SMAGGHE, G., GRAAF, D.C. de, 2013. Comprehensive bee pathogen screening in Belgium reveals *Crithidia mellificae* as a new contributory factor to winter mortality. *PLOS ONE*. 8 (8), e72443. DOI: 10.1371/journal.pone.0072443. Dostupné z: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0072443>
- 37) RAVOET, J., SCHWARZ, R. S., DESCAMPS, T., YAÑEZ, O. at al., 2015. Differential diagnosis of the honey bee trypanosomatids *Crithidia mellificae* and *Lotmaria passim*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 130, s. 21-27. DOI: 10.1016/j.jip.2015.06.007 Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201115001214?via%3Dihub>

- 38) RAYMANN, K., MORAN, N., 2018. The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. *Current Opinion in Insect Science*. 26, s. 97-104. DOI: 10.1016/j.cois.2018.02.012. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214574517301761?via%3Dihub>
- 39) ROBERTS, K. E., EVISON, S. E. F., BAER, B., HUGHES, W. O. H., 2015. The cost of promiscuity: sexual transmission of *Nosema* microsporidian parasites in polyandrous honey bees. *Scientific Reports*. 5(1). DOI: 10.1038/srep10982. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4485198/>
- 40) ROSENKRANZ P., AUMEIER P., ZIEGELMANN B., 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of invertebrate pathology*. 103, pp. 96-119. DOI: 10.1016/j.jip.2009.07.016. PMID 19909970. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19909970/>
- 41) RUNCKEL C., FLENNIKEN ML., ENGEL JC, RUBY JG, GANEM D, ANDINO R, et al., 2011. Temporal Analysis of the Honey Bee Microbiome Reveals Four Novel Viruses and Seasonal Prevalence of Known Viruses, *Nosema*, and *Crithidia*. *PLoS ONE* 6(6): e20656. DOI: 10.1371/journal.pone.0020656. Dostupné z: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0020656>
- 42) RYABOV E.V., WOOD G.R., FANNON J.M., MOORE J.D., BULL J.C., et al., 2014. A Virulent Strain of Deformed Wing Virus (DWV) of Honeybees (*Apis mellifera*) Prevails after *Varroa destructor*-Mediated, or In Vitro, Transmission. *PLOS Pathogens*. 10(6). DOI: 10.1371/journal.ppat.1004230. Dostupné z: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1004230>
- 43) SCHWARZ, R. S., EVANS, J. D., 2013. Single and mixed-species trypanosome and microsporidia infections elicit distinct, ephemeral cellular and humoral immune responses in honey bees. *Developmental & Comparative Immunology*. 40 (3), s. 300-310. DOI: 10.1016/j.dci.2013.03.010. Dostupné z:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X13000773?via%3Dihub>

- 44) SCHWARZ, R. S., BUCHAN, G. R., MURPHY, C. A., RAVOET, J., DE GRAAF, D. C., & EVANS, J. D., 2015. Characterization of two species of trypanosomatidae from the honey bee *Apis mellifera*: *Crithidia mellificae* Langridge and McGhee, and *Lotmaria passim* n. gen., n. sp. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62(5), 567–583. DOI: 10.1111/jeu.12209. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jeu.12209>
- 45) SNODGRASS, R.E., 1984. *The anatomy of the honey bee*. Ithaca: Comstock Pub. Associates. Dostupné z: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?>
- 46) STEVANOVIC, J., SCHWARZ, R. S., VEJNOVIČ, B., EVANS, J. D., IRWIN, R. E. et al., 2016. Species-specific diagnostics of *Apis mellifera* trypanosomatids: A nine-year survey (2007–2015) for trypanosomatids and microsporidians in Serbian honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*. 139, s. 6-11. DOI: 10.1016/j.jip.2016.07.001. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201116300775>
- 47) STROBL, V., YANEZ, O., STRAUB, L., ALBRECHT, M., NEUMANN, P., 2019. Trypanosomatid parasites infecting managed honeybees and wild solitary bees. *International Journal for Parasitology*. 49, 605–613. DOI: 10.1016/j.ijpara.2019.03.006. ISSN 020-7519. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751919301353>
- 48) ŠEFČÍK, J., 2014. *Začínáme včelařit*. 1.st ed. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-4857-3.
- 49) TITĚRA, D., 2017. *Včely zdravé a nemocné*. Praha: Brázda. ISBN 978-80-209-0420-1.
- 50) TITĚRA, D., 2020. Co všechno může stát za ztrátami včelstev. *Včelařství*. roč. 73 (155), č. 2, s. 43-45. Dostupné z: https://www.vcelarstvi.cz/dokumenty-cms/web_vcelarstvi_2_2020_blok.pdf.
- 51) TRAVER B. E., FELL, R. D., 2012. Low natural levels of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* queens. *Journal of Invertebrate Pathology*. 110(3), 408-410. DOI:

10.1016/j.jip.2012.04.001. ISSN 0022-2011. Dostupné z:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201112000882?via%3Dihub>

- 52) VESELÝ, V., BACÍLEK, J., DROBNÍKOVÁ, V., HARAGRIM, O., KAMLER, F., KNÍŽEK, F., KODOŇ, S., KRIEG, P., KUBIŠOVÁ, S., PEROUTKA, M., PTÁČEK, V., 1985 Včelařství. 1st ed. Praha 1 Státní zemědělské nakladatelství. ISBN 07-056-85.
- 53) WILLIAMS, B. A., DOLGIKH, V. V., SOKOLOVA, Y. Y., 2014. Microsporidian biochemistry and physiology. *Microsporidia: Pathogens of opportunity*. 9, 245–260. DOI: 10.1002/9781118395264.ch9. Dostupné z: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/9781118395264.ch9?saml_referrer#accessDenialLayout
- 54) WILLIAMS, G. R., SAMPSON, M. A., SHUTLER, D., EL ROGERS, R., 2008. Does fumagillin control the recently detected invasive parasite *Nosema ceranae* in western honey bees (*Apis mellifera*)? *Online Journal of Invertebrate Pathology*. 99 (3), s. 342-344. DOI: 10.1016/j.jip.2008.04.005. ISSN 0022-2011. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201108000980?via%3Dihub>
- 55) WILLMER, P., 2012. Ecology: Pollinator–Plant Synchrony Tested by Climate Change. *Current Biology*. 22(4), 131–132. DOI: 10.1016/j.cub.2012.01.009. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982212000103>
- 56) ZHANG, Y., LU, X., HUANG, S. et al., 2019. *Nosema ceranae* infection enhances *Bifidobacterium* spp. abundances in the honey bee hindgut. *Apidologie*. 50, 353–362. DOI: 10.1007/s13592-019-00644-5. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13592-019-00644-5#citeas>

9 Seznam tabulek a obrázků

Obrázek č. 1 Tělo včely (Šefčík, 2014)

Obrázek č. 2 Intracelulární cyklus *Nosema ceranae* (Gisder et al., 2011)

Obrázek č. 3 Pozorování podílu výskytu patogenů bez ohledu na stanoviště (Mráz et al., 2021)

Obrázek č. 4 Snímky *Crithidia mellificae* (Schwarz et al., 2015)

Obrázek č. 5 Analyzátor BioSpec-nano

Obrázek č. 6 Termocycler

Obrázek č. 7 Elektroforetická vana s agarozovým gelem a napipetovanými vzorky

Obrázek č. 8 Kontrola kvality DNA (vzorky 1-11, 14.11.2023)

Obrázek č. 9 Kontrola kvality DNA (vzorky 14-25, 14.11.2023; 26-29 v tabulce označeno 1b-4b, 14.2.2024; 26, 21.11.2023)

Obrázek č. 10 Kontrola kvality DNA (vzorky 27-29, 21.11.2023)

Obrázek č. 11 Kontrola kvality DNA (vzorky 1-25, 16.2.2024)

Obrázek č. 12 Elektroforetický snímek s primery *Apis mellifera*

Obrázek č. 13 Elektroforetický snímek s původními primery

Obrázek č. 14 Elektroforetický snímek s novými primery *Nosema ceranae*

Obrázek č. 15 Elektroforetický snímek s novými primery *Crithidia mellificae*

Tabulka č. 1 Výskyt nose mózy v ČR v roce 2011 (Kampl et al., 2011)

Tabulka č. 2 Seznam vzorků (1)

Tabulka č. 3 Seznam vzorků (2)

Tabulka č. 4 Reakční směs pro PCR

Tabulka č. 5 Sekvence původních primerů pro *N. ceranae* (Mráz et al., 2021)

Tabulka č. 6 Sekvence původních primerů pro *C. mellifica* (Mráz et al., 2021)

Tabulka č. 7 Sekvence nových primerů pro *N. ceranae* (Naudi et al., 2021)

Tabulka č. 8 Sekvence nových primerů pro *C. mellifica* (Stevanovic et al., 2016)

Tabulka č. 9 Amplifikační program pro *N. ceranae* a *C. mellifica* (původní primery)

Tabulka č. 10 Amplifikační program pro *N. ceranae* a *C. mellifica* (nové primery)