Zdravotně sociální fakulta
Faculty of Health and Social Sciences
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
University of South Bohemia in České Budějovice

Sezónní dynamika vybraných patogenů včel

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA

Autor: Denisa Káchová, DiS.

Vedoucí práce: Ing. Irena Hoštičková, Ph.D.

České Budějovice 2026

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem ***Sezónní dynamika vybraných patogenů včel*** jsem vypracovala 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 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 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 30. 04. 2026 ……..

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své vedoucí práce Ing. Ireně Hoštičkové, PhD. za vedení mé práce a její vstřícný přístup. Zároveň bych chtěla poděkovat svému manželovi, který mi byl velkou oporou, hlavně při čtení mé práce a pravopisné kontrole textu.

Sezónní dynamika vybraných patogenů včel

Abstrakt

Včela medonosná (*Apis mellifera*) v současné době čelí mnoha environmentálním hrozbám a infekčním onemocněním. Mezi ně patří často podceňovaný patogen mikrosporidie rodu *Nosema ceranae*, která způsobuje infekci trávicího ústrojí (nosematózu). Nákaza narušuje vstřebávání živin, oslabuje imunitní systém a zkracuje délku života včel. Vývoj onemocnění souvisí s celkovou kondicí včelstva a mírou vnějšího stresu.

Tato bakalářská práce se zaměřuje na monitoring sezónní dynamiky a relativní úrovně napadení *Nosema ceranae* u vybraných včelstev umístěných na školním včelíně Fakulty zemědělské a technologické Jihočeské univerzity. Analýza probíhala v hlavním období včelařské sezóny (červen, srpen, říjen). Pro stanovení zátěže patogenem byly v daných měsících odebrány vzorky z 8 včelstev, následně proběhla izolace DNA a k získání relativní úrovně napadení byla použita molekulární metoda kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase (RT-PCR). Získaná data byla vyhodnocena grafickým a statistickým způsobem v programu MS Excel.

Výsledky prokázaly absolutní absenci jednotného plošného sezónního trendu a odhalily velkou variabilitu ve zdravotním stavu jednotlivých včelstev. Statistické vyhodnocení potvrdilo, že letní míra nákazy nepředurčuje podzimní stav včelstva a vývoj nákazy byl vysoce individuální. Toto dokazuje, že dynamika nákazy není primárně řízena biologií parazita, ale aktuální obranyschopností včelstva a jeho schopností čelit chronickému stresu. Efektivní ochrana včelstva musí spočívat nejen v zoohygieně, ale také v hledání kompromisu mezi lidskou potřebou výzkumu a respektováním biologických limitů kolonie.

Klíčová slova

Včela medonosná; *Nosema ceranae*; nosematóza; sezónní dynamika; PCR; stres; imunita včel

Seasonal Dynamics of Selected Honey Bee Pathogens

Abstract

The Honey Bee (*Apis mellifera*) currently faces many environmental threats and infectious diseases. Among these is the often-underestimated pathogen *Nosema ceranae*, a microsporidium that causes an infection of the digestive tract (nosematosis). The infection disrupts nutrient absorption, weakens the immune system, and shortens the lifespan of bees. The progression of the disease is related to the overall condition of the colony and the level of external stress.

This bachelor's thesis focuses on monitoring the seasonal dynamics and relative levels of *Nosema ceranae* infestation in selected colonies located at the school apiary of the Faculty of Agriculture and Technology at the University of South Bohemia. The analysis was conducted during the main periods of the beekeeping season (June, August, October). To determine the pathogen load, samples were collected from 8 colonies during the specified months; DNA was subsequently isolated, and the molecular method of real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to determine the relative level of infestation. The obtained data were evaluated graphically and statistically using MS Excel.

The results demonstrated the complete absence of a uniform, widespread seasonal trend and revealed significant variability in the health status of individual colonies. Statistical analysis confirmed that the summer infection rate does not predict the autumn condition of the colony, and the progression of the infection was highly individual. This demonstrates that the dynamics of the infection are not primarily governed by the biology of the parasite, but by the colony's current immune status and its ability to cope with chronic stress. Effective protection of the colony must rely not only on beehive hygiene, but also on finding a balance between the human need for research and respect for the colony's biological limits.

Key words

Apis mellifera; *Nosema ceranae*; nosematosis; seasonal dynamics; PCR; stress; honeybee immunity

Obsah

1 Úvod **8**

2 Literární rešerše **9**

2.1 Včela medonosná 9

2.2 Biologie včely medonosné 10

2.2.1 Stavba těla 10

2.2.2 Soustavy a ústrojí 11

2.2.3 Vývojová stádia 13

2.2.4 Včelstvo 14

2.3 Význam včely medonosné 15

2.4 Hlavní ohrožení zdraví včel 15

2.5 Přehled patogenů včel 16

2.5.1 Parazit Varroa destructor 16

2.5.2 Viry včel 17

2.5.3 Bakteriální onemocnění plodu 19

2.5.4 Onemocnění způsobená houbami 20

2.6 Sezónní dynamika patogenů a jejich vzájemná interakce 21

2.7 Metody detekce patogenů 22

2.7.1 Izolace DNA metodou CTAB 22

2.7.2 Polymerázová řetězová reakce 23

3 Cíle práce **24**

4 Materiál a metodika **25**

4.1 Sběr a homogenizace vzorků 25

4.2 Izolace DNA 26

4.3 RT-PCR detekce 27

5 Výsledky **29**

5.1 Sezónní dynamika relativní úrovně napadení Nosema ceranae u jednotlivých včelstev 29

5.2 Statistické vyhodnocení dat 33

6 Diskuse **35**

7 Závěr **38**

Seznam použitých zdrojů **40**

Seznam obrázků **44**

Seznam tabulek **45**

Seznam zkratek **46**

1 Úvod

Včela medonosná (*Apis mellifera*) představuje jeden z nejdůležitějších pilířů globálního ekosystému i moderního zemědělství. Hospodářsky nejvýznamnější opylovač se používá k zajištění biodiverzity volně rostoucích rostlin, ale i ke stabilitě produkce důležitých zemědělských plodin. V posledních letech včelaři čelí rostoucím problémům spojovaným oslabováním a hromadným úhynem včelstev. Tyto ztráty jsou nejčastěji spojované s působením mnoha negativních faktorů najednou, ke kterým patří ztráta přirozených biotopů, nadužívání agrochemikálií, klimatické změny, a hlavně šíření infekčních onemocnění a parazitů.

Mezi podceňované patogeny patří mikrosporidie rodu *Nosema ceranae*, která je původcem infekčního onemocnění trávicího ústrojí včel zvané jako nosematózy. Na rozdíl od onemocnění plodu či varroázy, které mají často jasně viditelný klinický obraz, probíhá nosematóza většinou skrytě. Patogen přímo napadá trávicí trakt, zhoršuje vstřebávání živin a nenápadně zkracuje jejich život. Bez molekulární diagnostiky může tato nákaza vést k náhlému kolapsu celého včelstva.

Stále více výzkumů ukazuje, že samotná přítomnost patogenu v úlu automaticky neznamená úhyn. Důležitou roli hraje celková obranyschopnost včelstva a míra vnějších faktorů, kterému jsou vystavena. Obzvlášť specifickým prostředím jsou výzkumné a školní včelíny, kde jsou včelstva vystavena velkému provoznímu stresu spojovaným s výukou a výzkumnou činností. Tento faktor může měnit přirozenou dynamiku chorob a reakci včelstva na ně.

Cílem této práce je zhodnotit sezónní dynamiku vybraných patogenů včel. Původním záměrem bylo zahrnout více patogenů, ale laboratorní analýza se cíleně zaměřila na kvantifikace mikrosporidie *Nosema ceranae* na školním včelíně Fakulty zemědělské a technologické Jihočeské univerzity (FZT JU). Pomocí metody kvantitativní polymerázové řetězové reakce (RT-PCR) byl vývoj nákazy monitorován v průběhu tří hlavních období včelařské sezóny (červen, srpen, říjen). Práce si klade za cíl kvantifikovat zátěž patogenu na sledovaném stanovišti, ale především analyzovat, jestli úroveň nákazy podléhá jednotnému sezónnímu trendu a jestli existuje nějaký společný vzorec výskytu vybraného patogenu.

2 Literární rešerše

2.1 Včela medonosná

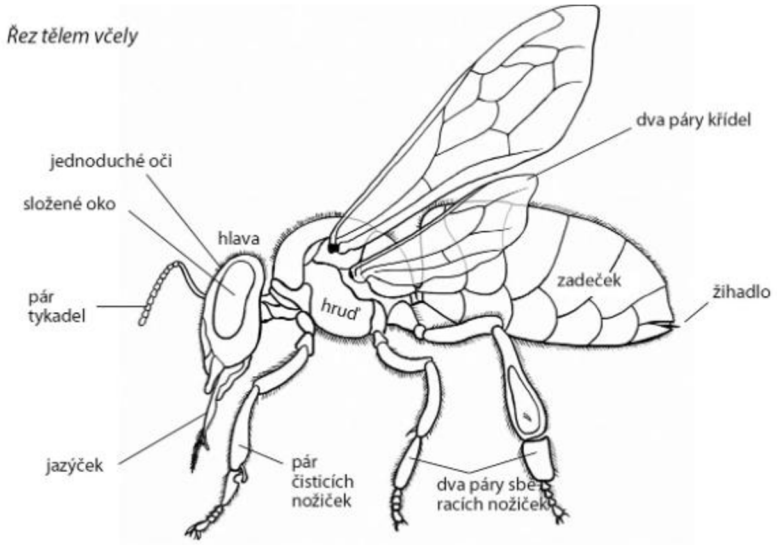
Z hlediska systematiky (viz Obrázek 1) se včela řadí do kmene členovců (*Arthropoda*), pro které je typická vnitřní chytinová kostra a článkované tělo. Dále spadá do třídy hmyzu (*Insecta*), která se vyznačuje rozdělením těla na hlavu, hruď a zadeček, třemi páry končetin a u většiny zástupců schopností letu. Následně patří do řádu blanokřídlých (*Hymenoptera*), pro které je charakteristický evoluční vztah ke krytosemenným rostlinám. Z tohoto řádu je pro nás pak důležitý nadčeleď včely (*Apoidea*). Její zástupci během evoluce plně přešli z masité výživy na potravu rostlinnou, tvořenou nektarem a pylem. K tomuto způsobu života plně přizpůsobili svou anatomii těla, která se vyznačuje pylovým košíčkem na třetím páru nohou (Danihlík a spol., 2017).

Obrázek 1: Taxonomie (Danihlík a spol., 2017)

Včela medonosná, latinským názvem *Apis mellifera*, byla pojmenována v roce 1758 Carlem Linné v jeho 10. publikaci *Systema naturae* (Danihlík a spol., 2017). Je typickým představitelem eusociálního hmyzu, kdy jednotlivci sami nejsou schopni dlouhodobého života a jsou zcela závislí na vysoce organizovaném společenství (včelstvu). Charakteristickým rysem je jejich vysoká organizovanost a dělba práce (Tautz, 2016). Díky jedinečné schopnosti přečkat zimní období v semknutém zimním chomáči, jsou schopny hned od začátku jara plnit svou opylovací funkci. Z ekologického hlediska jsou pro svou schopnost opylovat považovány za pomyslného třetího partnera při rozmnožování mnoha druhů rostlin (Šefčík, 2014).

2.2 Biologie včely medonosné

Biologie je nedílnou součástí každého organismu a abychom mohli pochopit například vliv nemocí nebo patogenů, je potřeba se tomu trochu věnovat. Dalším souvisejícím faktorem je samotný vývoj od vajíčka po dospělce a jejich zastoupení ve včelstvu. Celková stavba těla včely medonosné, které se budeme věnovat v následující kapitole, je znázorněná na Obrázku 2.



Obrázek 2: Anatomie včely (Šefčík, 2014)

2.2.1 Stavba těla

Vnější kostra je tvořena pokožkou (*integumentum*), která chrání vnitřní orgány, zajišťuje tvar těla a je první bariérou proti patogenům. Možným vstupem patogenu mohou být ztenčené mezičlánkové membrány. Samotný integument se skládá ze tří částí: vnitřní bazální membrány, jednovrstevné epidermis a vnější kutikuly. Epidermis obsahuje stavební látku chitin, který dodává krunýři potřebnou pevnost a pružnost. Zbarvení těla je pak dáno obsahem pigmentu melaninu (Veselý, 2013).

Vnější kostra (endoskelet) v hlavě tvoří pevnou výstuž (*tentorium*), které chrání mozek i žlázy a slouží k upevnění svalů kusadel a hltanu. V hrudi zpevňuje spojení článků a poskytuje plochu pro upevnění svalů, které pomáhají s pohybem křídel a nohou. V zadečku naopak pevnou kostru nenajdeme. Svaly jsou upevněny přímo na vnitřní stěnu hřbetní a břišní části, a tím umožňují roztažitelnost a pohyblivost zadečku (Veselý, 2013).

Hlava (*caput*) vznikla srůstem šesti částí do pevné schránky, která nese smyslové orgány a ústní ústrojí. Přední část tvoří čelní štítek, na který se napojuje horní pysk chránící kusadla. Ty nalezneme po stranách čelního štítku. Horní část tvoří čelo s tykadly, temeno a vzadu týl, kde je spojena spojkou s hrudí. Boky hlavy zabírají velké složené oči, mezi nimi jsou tři jednoduchá očka. V prohlubni na spodní části hlavy je v klidovém stavu složen sosák (Danihlík a spol., 2017).

Hruď (*thorax*) představuje pohyblivé centrum včely nesoucí páry nohou a křídel. Rozděleno do tři částí: předohruď, středohruď, zadohruď. Specifickým znakem blanokřídlých je pevné připojení prvního článku zadečku (beder) přímo k hrudi. Nejvýznamnější částí je středohruď s hřbetním štítem a štítkem, pod kterými jsou uložené svaly křídel (Veselý, 2013).

Křídla jsou blanitá, vyrůstají z hrudi vychlípením pokožky zpevněnou žilnatinou (vzdrušnicemi). Ke středohrudí a zadohrudí jsou připojeny složitým kloubním systémem. Pohyb křídel zajišťují hrudní svaly. Nepřímé se neupínají ke křídlům, ale pomáhají ve vzletu, zatímco přímé upevněné jsou a pomáhají s natáčením a řízením letu (Veselý, 2013).

Včela má tři páry nohou, které pomáhají v pohybu a specializovaným činnostem. Noha se skládá z kyčle, příkyčlí, stehna, holeně a pětičlenného chodidla zakončeném drápky a přilnavým polštářkem. Přední pár slouží k čištění tykadel, střední pár je opatřen trnem pro vypichování květového pylu a zadní pár slouží ke sběru pylu (Veselý, 2013).

Zadeček je tvořen pohyblivě spojenými články bez vnitřní kostry. Každý článek se skládá s hřbetní (tergit) a břišní (sternit) části, které jsou spojeny pružnými membránami. Toto uspořádání umožňuje zvětšovat objem zadečku. Uvnitř jsou uloženy životně důležité orgánové soustavy jako trávicí, vylučovací a pohlavní včetně žihadlového aparátu (Veselý, 2013).

2.2.2 Soustavy a ústrojí

Trávicí ústrojí se skládá z trávicí trubice, kterou dělíme do tří částí: přední *stomodeum*, navazuje *mezenteron* (střední část střeva) a zadní *proctodeum*. Přední část je tvořena hltanem a ústí do medného váčku, který slouží jako rezervoár sladiny. Zde neprobíhá trávení, ale dochází k předávání potravy mezi včelami, což je častá cesta přenosu patogenů. *Mezenteron* je od medného váčku oddělen česlem, které funguje jako filtr

pevných částic. V žaludku probíhá trávení a vstřebávání živin. Jeho epitel je zároveň primární bariérou, kterou se snaží prolomit infekce. Posledním úsekem je *proctodeum*, které je tvořeno střevem a výkalovým váčkem, kde končí nestrávené zbytky a dokáže zadržet výkaly i během zimování (Danihlík a spol., 2017).

Žlázová soustava zajišťuje komunikaci, výživu plodu i zpracování potravy. V hlavě se nachází hltanové žlázy, které slouží k tvorbě mateří kašičky u dělnic a kusadlové žlázy, které u matek slouží k produkci feromonu, u dělnic naopak zpracovávají vosk a propolis. Funkci slinných žláz plní pyskové žlázy a slouží ke zvlhčení potravy. Na hřbetní straně se nachází vonná žláza, která produkuje feromony a slouží k orientaci a značení zdrojů. V zadečku jsou uloženy voskové žlázy, které jsou potřeba ke stavbě pláství. Obrannou funkcí plní jedové žlázy s žihadlem (Veselý, 2013).

Dýchací ústrojí je tvořeno sítí vzdušnic (tracheoly), které se větví do mikroskopických tracheol a převádějí kyslík přímo k tkáním. Tento proces je nezávislý na oběhu hemolymfy. Vzdušnice ústí na povrch těla párovými průduchy a ty jsou opatřeny uzávěrem, který reguluje výměnu plynů a zároveň brání před vniku nečistot a patogenů (např. roztoči). Součástí ústrojí jsou objemné vzdušnicové vaky, které slouží k ukládání vzduchu a nadlehčování těla při letu. Aktivní ventilaci pak zajišťují rytmické stahy zadečku v závislosti na fyzické zátěži (Veselý, 2013).

Včela má otevřenou cévní soustavu, ve které koluje hemolymfa volně kolem orgánů. Samotná hemolymfa nepřenáší kyslík, ale slouží k přenosu živin, hormonů a odpadních látek. Může také fungovat jako transportní médium pro viry a jiné patogeny. Buněčnou složku tvoří hemocyty, které jsou důležité pro imunitní obranu. Pohyb hemolymfy zajišťuje pětikomorové srdce uložené pod hřbetní stranou zadečku. To pumpuje tekutiny aortou směrem do hlavy, odkud se volně vrací zpět. Cirkulaci v tělní dutině usměrňuje hřbetní a břišní přepážka (Veselý, 2013).

Nervová soustava je gangliového typu a dělí se na centrální a periferní část. Centrální je tvořena mozkem, podjícnovou uzlinou a břišní nervovou páskou. Mozek (nadjícnová uzlina) představuje hlavní řídící centrum, které se anatomicky člení na tři oddíly. Přední částí obsahuje houbovitá tělíska, která jsou centrem paměti, učení a instinktivního chování. Střední část zpracovává podměty z tykadel, zatímco zadní část propojuje mozek s podjícnovou uzlinou. Ta ovládá ústní ústrojí, především kusadla a sosák. Na hlavové centrum navazuje břišní nervová páska složená ze dvou hrudních ganglií, která jsou

důležitá pro pohyb křídel a nohou. Dále pět zadečkových ganglií řídících činnost vnitřních orgánů. Z těchto center vychází periferní nervy, které přenášejí vzruchy ze smyslových orgánů a motorické pokyny do svalů (Veselý, 2013).

Smyslové orgány přijímají podněty z vnějšího i vnitřního prostředí a jejich předání nervové soustavě. Na povrchu kutikuly se nachází sensila a jejich funkci rozlišujeme na mechanoreceptory (dotyk, proudění vzruchu) a chordotonární orgány (vibrace). Chemické podněty jako čich a chuť zpracovávají chemoreceptory a mezi ně můžeme zařadit destičkovitá ústrojí a Leydigovy kužele zastoupené na tykadlech, sosáku a chodidlech (Veselý, 2013).

Pohlavní ústrojí je plně vyvinuto u reprodukčních jedinců. U matky vyplňují většinu zadečku párové vaječníky (ovaria) složené z vaječných rourek, ve kterých dozrávají vajíčka. Ta sestupují vejcovody do pochvy, která ústí do pářicí schránky. Důležitý je semenný váček, který slouží jako rezervoár spermií získaných při páření. Oplození vajíček je aktivně řízeno svalovou pumpičkou. Oplozená vajíčka jsou diploidní, zatímco vajíčka neoplozená kladená trubci jsou haploidní. Dělnice mají vaječníky zakrnělá, ale pokud je dlouhodobá absence matky, mohou se funkčně aktivovat a tím vzniknou tribčice kladoucí jen neoplozená vajíčka. Samčí pohlavní ústrojí tvoří varlata produkující spermie, které se shromažďují v semenných váčcích. Ty společně s hlenovými žlázami ústí do vystřikovacího kanálku (chámovodu), jímž je sperma při páření vpraveno do matky (Veselý, 2013).

2.2.3 Vývojová stádia

Vývoj včely zahrnuje stádia vajíčka, larvy, předkukly a kukly. Vajíčko má tyčinkovitý tvar, mírně prohnuté a na svém ztluštělém pólu je opatřeno malým otvorem (mikropyle), kterým proniká spermie při kladení. Za normálních podmínek klade vajíčka matka do dělničních buněk, větších dělničních buněk nebo do mateřích misek. Vajíčko na začátku stojí kolmo na dně buňky, vlivem vývoje embrya se postupně naklání a třetí den leží zcela na dně. Tímto končí embryonální vývoj a líhne se larva (Danihlík a spol., 2017).

Beznohá larva leží stočená do tvaru písmene C hřbetní stranou natočena ven na dně buňky a téměř ponořena v mateří kašičce. Během růstu se čtyřikrát svléká a jednotlivá stádia mezi jednotlivými svlékáními se nazývají instary. Jejich vývoj závisí na původu vajíčka a následné výživě, přičemž z neoplozených vajíček se líhnou trubci a z oplozených matky

a dělnice. Potrava hraje velkou roli při vývoji samiček, kdy larva budoucí matky dostává velmi výživnou mateří kašičku, zatímco larvy dělnic od třetího dne dostávají méně vydatnou směs kašičky, medu a pylu. Samotné larvální stádium u matky trvá pět dní, u dělnic šest dní a u trubce sedm dní (Danihlík a spol., 2017).

Na konci larválního vývoje, před pátým instarem, dospělé dělnice zavíčkují plodovou buňku prodyšným voskovým víčkem, kde se larva napřímí, spřede kolem sebe kokon (zámotek) a přejde do klidového stádia předkukly. Následně se přemění v kuklu, která nese vnitřní anatomické rysy dospělé včely a jakmile je vývoj kompletní, dospělý jedince prokouše víčko svými kusadly a opustí buňku. Celková doba vývoje vajíčka až po vylíhnutí je dána druhově. Matka se vyvíjí 16 dní, dělnice 21 dní a trubec 24 dní (Danihlík a spol., 2017).

2.2.4 Včelstvo

Včelstvo je tvořeno jednou matkou, mnohou dělnic a v letním období několika trubci. Jejich celková populace kolísá v závislosti na ročním období. Celé společenství funguje jako vysoce organizovaný superorganismus (Šefčík, 2014).

Matka je nepostradatelnou součástí, zajišťuje reprodukční osu včelstva, jelikož její celá anatomie je plně přizpůsobena jedinému celoživotnímu úkolu, kladení vajíček a zajištění plynulé obnově populace. Na rozdíl od dělnic nemají pylové košíčky a voskotvorné žlázy. Své žihadlo používá k obraně před úlu před konkurenčními matkami. Pohlavně dozrává přibližně do týdne od vylíhnutí. Samotné rozmnožování probíhá při tzv. snubním letu, kde se páří na trubčím shromáždění s vícero trubci (přibližně s deseti až dvaceti). Poté se vrací do úlu, kde o ní neustále pečují dělnice. Matka se může dožít až pěti let, ale k její obměně dochází buď rojením, což slouží ke shromáždění celého včelstva nebo tzv. tiché výměně, kdy je nová matka vychována bez rozdělení včelstva (Šefčík, 2014).

Veškeré ostatní činnosti potřebné k chodu úlu mají na starosti dělnice (samičky s potlačeným pohlavním vývojem). Jejich role se mění v závislosti na fyziologickém stáří. První tři týdny života působí jako tzv. mladušky, které čistí buňky, krmí plod a matku, staví voskové dílo, zpracovávají donesený nektar a střeží vstup do úlu. Poté se z nich stávají létavky, které v okolí vyhledávají a přinášejí do úlu pyl, nektar, propolis a vodu. V letních měsících se dělnice kvůli vysoké fyzické zátěži dožívají pouze 30 až 40 dnů,

zatímco v zimních měsících musí zajistit přežití včelstva a dožívají se několika měsíců (Šefčík, 2014).

Specifickou roli mají trubci (včelí samci), kdy jejich hlavním úkolem je oplození mladých matek při snubním letu a poté se podílejí na udržení tepla plodu. V úlu je jejich přítomnost tolerována jen v reprodukčním období, následně jsou vyhnáni z úlu, kde v důsledku hladu a chladu hynou. (Šefčík, 2014).

2.3 Význam včely medonosné

Včela medonosná je hlavním prvkem pro udržení biodiverzity díky její nezastupitelné roli opylovače. Podílí se na opylování obrovského množství plání rostoucích rostlin a zjišťuje stabilitu celých ekosystémů. Další důležitou rolí je produkce medu a dalších včelích produktů (Tautz, 2016).

V hospodářství je potřebná pro potravinovou bezpečnost. Zemědělská produkce několika druhů ovoce, zeleniny, luštěnin nebo olejnin je závislá na hmyzím opylování, které může zvyšovat kvantitu, ale i celkovou kvalitu úrody (Hung et al., 2018). Následná produkce medu, vosku, propolisu nebo mateří kašičky má značný význam v potravinářství, kosmetice a farmacii, ale jedná se pouze o pouhý zlomek celkové jejich hodnoty. Včely slouží jako významný bioindikátor kvality životního prostředí, jelikož velmi citlivě reagují na přítomnost cizorodých látek v krajině (Veselý, 2013).

2.4 Hlavní ohrožení zdraví včel

Zdravotní stav včelstev je neustále ovlivňován skupinou fyzikálních, chemických a biotických faktorů. K nim se přidávají i vlivy samotných chovatelských postupů, zvolených metod diagnostiky a prevence. Mezi klíčové fyzikálně-chemické vlivy patří klimatické změny (výkyvy průměrných teplot, srážek a vzdušné vlhkosti), zde velkou roli hraje samotné stanoviště včelstev a konstrukce úlu (ochrana před silným větrem, umístění v dostatečné vzdálenosti od průmyslových zón, dosah bohaté včelí pastvy). Další skupinou tvoří biotické faktory, kam patří rezervoáry a přenašeči chorob, jako jsou různí paraziti a škůdci (např. roztoči, mravenci), ale i rostliny produkující toxický pyl. Ohrožení může pocházet i z vnitřního prostředí samotného včelstva, kde hraje roli stáří populace nebo patogeny, které přímo narušují vývoj plodu (např. mor včelího plodu) (Čermák a spol., 2016).

Jeden z nejznámějších vnějších faktorů v zemědělské krajině představuje intenzivní chemizace prostředí. Aplikace agrochemikálií (např. insekticidy, fungicidy, herbicidy) mají na včelstvo závažné nežádoucí účinky a mohou vést k narušení nervové soustavy včel nebo zhoršení jejich prostorové orientace (Goulson et al., 2015). S moderním zemědělstvím přichází pěstování jedno druhových rostlin, které poskytují velké množství nektaru, ale z dlouhodobého hlediska vedou k jednostranné výživě a pylové chudobě. Nedostatek druhově pestré stravy vede ke zhoršování imunitní odpovědi, detoxikaci organismu nebo úspěšnému přezimovaní celého včelstva (Veselý, 2013).

Nejčastěji se nejedná jen o jeden faktor působení, ale o jejich kombinaci, tzv. synergickém efektu. Včela, která je vystavena špatné výživě a vysokým dávkám pesticidů, snadno podléhá virovým nebo bakteriálním infekcím přenášenými parazity. Významnou roli může hrát i samotný chovatel a jím používaná technika chovu (Čermák a spol., 2016). Může se jednat například o nedostatečnou obměnu voskového dála, šířené patogenů přes infikované pomůcky nebo nevhodně zvolená metoda tlumení chorob (nadužívání syntetických léčiv, které vedou k rezistenci) (Titěra, 2017).

2.5 Přehled patogenů včel

Na zdraví včel neustále působí široké spektrum faktorů, ale jejich největším ohrožením je působení samotných patogenních organismů, mezi něž se řadí viry, bakterie, houby, mikrosporidie a parazitičtí roztoči (Titěra, 2017). Ve studiích a článcích se prokazuje, že k fatálním kolapsům včelstev dochází nejčastěji působením vzájemné interakce mezi patogeny a jejich synergickým efektem. Zásadní roli hraje zejména roztoč *Varroa destructor*, který primárně narušuje imunitu včel a zároveň funguje jako efektivní přenašeč virových infekcí (Johnson, 2023).

2.5.1 Parazit Varroa destructor

Původcem onemocnění zvaného varoáza je kleštík včelí (*Varroa destructor*), ektoparazitický roztoč, který původně parazitoval na včele východní (A*pis cerana*). Během 20. století přeskočil na včelu medonosnou, pro kterou představuje největší zdravotní hrozbu (Rosenkranz et al., 2010). Novým zjištěním je, že roztoč se neživí primárně hemolymfou, ale cíleně konzumuje tukové tělísko, které je důležité pro správné fungování imunitního systému, detoxikaci a přezimování včely (Ramsey et al. 2019).

Životní cyklus kleštíka se dělí na dvě fáze. První je foretická neboli disperzní fáze, kde se oplozené vajíčko nachází přímo na těle dospělé včely, nejčastěji na mladuškách, protože tyto včely mohou přenést roztoče přímo k otevřenému plodu (Ramsey et al. 2019). Těsně před zavíčkováním buňky samička sleze z včely na dno buňky a začíná druhá fáze zvaná reprodukční. Roztoči preferují trubčí plod, jelikož jejich doba vývoje zvyšuje úspěšnost jejich namnožení. Zhruba 60 hodin po zavíčkování buňky začne samička klást první vajíčko, ze kterého se líhne sameček a následně v dalším 30hodinovém intervalu klade další vajíčka, ze kterých se líhnou samičky. Ještě uvnitř zavíčkované buňky samečci oplodní samičky a spolu s líhnoucí se dospělou včelou buňku opouštějí pouze oplozené samičky a stará matka, která přechází na další mlaďušku, čímž se celý cyklus opakuje (Johnson, 2023).

Klinické příznaky napadení kleštíkem lze pozorovat na úrovni jednotlivce, ale i na úrovni celého včelstva. Parazitované včely se líhnou s výrazně nižší hmotností, mají omezené množství živin v organismu a mohou mít zkrácenou délku života. Závažným následkem je potlačení imunitního systému, včela je pak náchylnější k dalším infekcím, kdy kleštík funguje jako přenašeč pro různé virové patogeny jako například virus deformujících křídel (Noël et al., 2020). Na úrovni včelstva se populace roztočů během sezóny rapidně zvyšuje a zhruba jednou za měsíc se jejich počet zdvojnásobí. I když včelstvo dokáže tolerovat určité množství parazitů, v kombinaci s dalšími virovými nákazami a stresory dochází při velkém přemnožení kleštíka k syndromu zhroucení a rychlému odumření celé včelí populace (Johnson, 2023).

2.5.2 Viry včel

Virové nákazy včel mají často skrytý charakter, což znamená, že nákaza probíhá bez viditelných klinických příznaků a je pro pozorovatele ze začátku obtížně detekovatelná. Některé viry však patologicky mění fyziologii a chování infikovaných dělnic s fatálními důsledky pro celé včelstvo. Nakažení jedinci mohou vykazovat poruchy prostorové orientace, díky které nenacházejí cestu zpět do domovského úlu. Dále může docházet k narušení přirozených instinktů při péči o plod, k celkovému zkrácení dlouhověkosti včel a k nebezpečnému snížení až úplné ztrátě schopnosti adaptace na nízké teploty, což může kriticky ohrozit úspěšné přezimování (Titěra, 2017). Z epidemiologického hlediska šíření virových patogenů probíhá dvěma mechanismy. Prvním vertikálním přenosem, který zajišťuje průnik viru přímo z infikované matky na její potomstvo, zatímco druhým

horizontálním přenosem dochází k přenosu mezi dospělými jedinci navzájem (např. sdílení potravy, kontaktem nebo prostřednictvím výkalů). Dominantnost přenosu vždy záleží na vlastnostech konkrétního viru a na přítomnosti či nepřítomnosti biologického vektoru (Johnson, 2023).

Virus chronické paralýzy včel (CPV) je neklasifikovaný bipartitní RNA virus (Budge et al., 2020) z čeledi *Cripaviridae*. Klinicky se tato nákaza projevuje ve dvou odlišných formách. První je charakteristická paralýza, při které včely ztrácejí schopnost létat, trpí třesem těla, mohou mít nápadně vyvrácená křídla a zmateně lezou před česlem úlu. Druhá se projevuje tzv. syndromem černání včel, kdy infikované dělnice ztrácejí ochlupení a získávají tmavý vzhled, ale též po několika dnech dojde rozvinutí třesu, přestanou létat a hynou. Samotný rozvoj nákazy může souviset se sekundárními bakteriálními infekcemi, zatímco spojitost s parazitujícím kleštíkem se spíše projevuje u celkově oslabených včelstev (Čermák a spol., 2016).

Virus akutní paralýzy včel (APV) je celosvětově rozšířený RNA virus z čeledi *Dicistroviridae* a je úzce spojován s náhlým úhynem celých včelstev (Titěra, 2017). Samotná infekce probíhá asymptomaticky, ale zásadní hrozbou se stává až po spojením s roztočem kleštíka, který slouží jako přenašeč, obchází přirozenou imunitu včely a zvyšuje virulenci (Chen et al. 2023). Akutní forma onemocnění postihuje dospělé včely, které hynou velmi rychle v rámci dní. K následnému velkému úhynu až kolapsu včel dochází na konci zimy a na začátku jara (Čermák a spol., 2016).

Kašmírský včelí virus je *aparavirus* patřící do čeledi *Dicistroviridae* a je příbuzný viru akutní paralýzy včel (APV) a viru izraelské akutní paralýzy (IAPV). Infekce ve včelstvu probíhá většinou skrytě a bez viditelných klinických příznaků jako u příbuzných virů. Ke smrtícímu propuknutí nákazy dochází u oslabeného včelstva, kdy největším rizikem je napadení kleštíkem (Mukhamedova et al., 2021). Celkově zkracuje život včel a doposud není zcela objasněné jeho ovlivňování průběhu varroózy včel (Čermák a spol., 2016).

Virus černání matečníků (BQCV), patřící do čeledi *Dicistroviridae*, představuje specifické virové onemocnění, které postihuje především larvy a kukly matky (Titěra, 2017). Samotné onemocnění je charakteristické rychlým odumřením plodu v konečné fázi vývoje a následně doprovázeno typickým tmavnutím až černáním stěn matečníkových misek. Z epidemiologického hlediska je jeho úzká propojenost

s mikrosporidií *Nosema apis*, kdy spory nozémy narušují epiteliální buňky žaludku a tím vytvářejí vstupní bránu pro virové částice BQCV a usnadňují systémovou infekci (Johnson, 2023).

Virus deformovaných křídel (DWV), patřící do čeledi *Iflaviridae* (Titěra, 2017), je považován za nejdestruktivnější virové onemocnění včely medonosné. Postihuje všechny vývojová stádia, ale fatální následky jsou nejvíce patrné u čerstvě vylíhnutých dospělců. Typickým příznakem nákazy jsou zakrnělá, scvrklá křídla a nápadný zkrácený zadeček. Tyto včely jsou neschopné letu a brzy po vylíhnutí hynou. Zásadním faktorem je vzájemná symbióza viru s roztočem kleštíkem včelím, kde se virus přímo replikuje (Martin & Brettell, 2019). Než došlo k této vzájemné spolupráci, virus se primárně šířil v trávicím traktu, což včelám poskytovalo možnost účinné imunitní obrany, ale přenos prostřednictvím parazita tyto slizniční bariéry obchází. Tento mechanismus zvyšuje virulenci samotného patogenu. Míra klinického poškození je tak přímo úměrná virové dávce a souvisí se stupněm napadení včelstva roztočem (Johnson, 2023).

2.5.3 Bakteriální onemocnění plodu

Bakteriální infekce představují specifickou kategorii chorob, které nenapadají dospělé včely, ale zaměřují se na vývojová stádia plodu. Původci těchto onemocnění narušují trávicí trakt larev, což vede k postupnému odumírání a při neléčení až k celkovému kolapsu včelstva (Fünfhaus et al., 2018). Dospělé dělnice jsou sice určitým způsobem imunní vůči bakteriální infekci, ale jsou nevědomky přenašeči, kteří nákazu šíří při krmení plodu, ošetřování buněk či při zalétáváním a loupežením mezi úly (Johnson, 2023). V české republice je mor včelího plodu a hniloba včelího plodu klasifikována jako jedna z nejnebezpečnějších nákaz, jejichž výskyt spadá pod striktní zákonná opatření a povinná hlášení nákazy. Jedním z důvodů je vytváření odolných klidových stadií zvanými spory (Titěra, 2017).

Mor včelího plodu je nejzávažnějším bakteriálním onemocněním včel, způsobené sporotvornou bakterií *Paenibacillus larvae* (Genersch, 2010). Před celosvětovým rozšířením kleštíka představovala tato infekce největší plošnou hrozbu pro chov včel. K nákaze dochází alimentární cestou u larev mladších tří dnů, zatímco starší jsou vůči nákaze imunní. Po průniku do trávicího traktu spory vyklíčí, bakterie larvu konzumuje zevnitř a tím vznikne hnědá hlenovitá hmota. V této fázi lze nákazu přímo diagnostikovat pomocí zkoušky tažnosti (Johnson, 2023). Pokud včely hmotu sami neodstraní, vyschne

na dně buňky v tmavý příškvar, který obsahuje velké množství téměř nezničitelných spor (Fünfhaus et al, 2018). Přístup k léčbě se ve světě liší. V USA se k bakteriální léčbě používají antibiotika, u kterých se projevují známky rezistence, zatímco u nás jsou zakázaná. Léčba v ČR zahrnuje asanaci, což znamená spálení napadeného včelstva včetně úlu a případná další sterilizace vybavení pomocí ionizujícího ozařování (Titěra, 2017).

Další významné bakteriální onemocnění je hniloba včelího plodu, kterou způsobuje bakterie *Melissococcus plutonius*. Silná včelstva dokážou infekci zvládnout sama, ale nemoc samotná způsobuje zpomalení růstu populace, které vede ke snížení produkce medu a poklesu úspěšného přezimování. Bakterie se přenáší přes včely kojičky, poté se množí v trávicím traktu larev mladších dvou dnů, kde s nimi soupeří o živiny a larva umírá na podvýživu ještě před zavíčkováním (Forsgren, 2010). Larvy ztrácejí svojí fyziologickou barvu, kroutí se na dně buňky a po vyschnutí tvoří volně ležící gumové příškvary (Johnson, 2023). Stejně jako u moru se k léčbě ve světě používají antibiotika, kde dlouhodobé podávání oxytetracyklinu vede ke vzniku rezistence (Mosca et al., 2024). V ČR se proto postupuje stejně a při potvrzení nákazy nařizuje Státní veterinární správa likvidaci napadených včelstev spálením a vyhlášení ochranného pásma (Titěra, 2017).

2.5.4 Onemocnění způsobená houbami

Houbová onemocnění a infekce způsobené mikrosporidiemi patří do specifické skupiny včelích patogenů. Z biologického hlediska mají schopnost tvořit vysoce odolné spory, které dokážou v prostředí úlu přežít po dlouhou dobu a poté slouží jako zdroj nákazy (Titěra, 2017). Zatímco někteří zástupci primárně napadají trávicí trakt dospělých dělnic a tím oslabují celý organismus, jiní se specializují přímo na plodiště, kde infikují přímo larvy. Ale jejich společným rysem je jejich úzká vazba na vnější stresové faktory a celkovou kondici včelstva (Johnson, 2023).

Mikrosporidie jsou vysoce specializovaní vnitrobuněční paraziti, kteří jsou na základě taxonomie řazené do říše hub. Způsobují onemocnění trávicího ústrojí jako nosematóza (Mráz et al., 2021). Samotná infekce se přenáší pozřením odolných spor, které následně klíčí a napadají trávicí trakt dospělých včel. Do nedávna byla hlavním původcem nákazy *Nosema apis*, která způsobila akutní trávicí potíže projevující se jako úplavici (průjmové výkaly), v poslední době však západní včelu medonosnou zasáhl nový druh, *Nosema ceranae*. Tento parazit vyvolává chronické onemocnění bez viditelných průjmových příznaků (Johnson, 2023). Infikované včely trpí narušeným vstřebáváním živin,

zkrácenou délkou života a oslabením imunitního systému, což vede k nenápadnému slábnutí včelstva (Mráz et al., 2021). Běžně také dochází ke koinfekcím s virovými patogeny, a to průběh onemocnění dále zhoršuje (D'Alvise et al., 2019). Léčba nákazy se v ČR řeší pomocí prevence, kdy k hlavním zootechnickým opatřením patří obměna voskového díla, dostatečný přísun kvalitní pylové potravy a minimalizace stresu (Titěra, 2017).

Zvápenatění je nejčastějším houbovým onemocněním včelího plodu, kde původcem je vřeckovýtrusá houba *Ascosphaera apis*. Infekce se šíří pomocí mikroskopických spor, které jsou spolu s potravou dávány larvám (obvykle ve věku tří až čtyř dnů). V trávicím traktu spory vyklíčí, vytvoří mycelium, které následně proroste celým tělem hostitele a larvu zcela zkonzumuje, tím vzniká tvrdá houbovitá struktura připomínající kousek křídy nazývána vápenná mumie. Onemocnění se obvykle projevuje jako chronická nákaza a její intenzita stoupá s celkovým oslabením včelstva. Nejčastějším spouštěčem jsou náhlé výkyvy teplot, které vedou k prochladnutí plodu, protože včely nedokážou v okrajových částech plodiště udržet dostatečnou termoregulaci (Johnson, 2023). Silné a zdravé včelstvo dokáže díky hygienickému chování infikované larvy rozpoznat a odstranit. Účinnou prevencí je proto dostatečné zateplení úlového prostoru, chov silných včelstev a případná výměna matky za účelem posílení genetické odolnosti (Titěra, 2017)

2.6 Sezónní dynamika patogenů a jejich vzájemná interakce

V současné apidologii je zhoršování zdraví včel vnímáno jako komplexní, multifaktoriální problém. Na ztrátách kolonií se nepodílí pouze patogeny samostatně, ale jejich společné působení s dalšími stresory, mezi které patří přítomnost pesticidů a nedostatečná výživa způsobená úbytkem vhodné včelí pastvy (Goulson et al., 2015). Účinky těchto faktorů jsou ovlivňovány abiotickými vlivy, jako jsou změny klimatu nebo nevhodné postupy včelařského hospodářství, a biotickými faktory, ke kterým patří genetika včel nebo chování matky (Cilia et al., 2022).

Šíření virových infekcí probíhá několika cestami. K běžným patří horizontální přenos (např. orálně-fekální cestou nebo infikovanou mateří kašičkou) a vertikální přenos z matky nebo trubce na potomstvo. Zásadním zlomem přenosu infekcí přinesla globalizace a celosvětové rozšíření ektoparazita *Varroa destructor*. Ten funguje jako invazivní vektor, který prokazatelně zvyšuje virovou zátěž viru deformovaných

křídel (DWV), ale i další patogenů (např. BQCV, CPV), kdy dochází k obcházení slizniční bariéry přímou inokulací do hemolymfy (Doublet et al., 2024).

Výskyt a šíření patogenů ve včelstvu není během roku konstantní, protože samotná virová zátěž a dynamika společenství souvisí s hustotou včelí populace a s populační křivkou parazitů. Dlouhodobá monitorování včelstev nasvědčuje tomu, že hlavní včelí viry vykazují jasně opakovatelné sezonní trendy, které mohou být ovlivněné dynamickými změnami ve společenství a klimatickými podmínkami (Molinatto et al., 2025). Příkladem může být infekce způsobené mikrosporidií *Nosema ceranae* a sním spojený virus černání matečníku (BQCV), který dosahuje nejvyšších hodnot obvykle v jarních měsících. Naopak virus deformovaných křídel (DWV) nebo virus akutní paralýzy (APV) přenášený roztočem mají nejčastěji vrchol na konci léta a během podzimu, což souvisí se stupněm zamoření včelstva roztočem *Varroa destructor* (Cilia et al., 2022).

V reálném prostředí úlu patogeny nepůsobí samostatně, ale vytvářejí složité sítě vzájemných interakcí, kde koinfekce jsou spíše pravidlem než výjimkou. Přítomnost jednoho onemocnění často usnadňuje vstup dalšímu (např. nozéma destrukcí buněk střevního epitelu otevírá vstup virovým částicím) (D'Alvise et al., 2019). Matematické a populační modely poukazují na kritický bod zlomu pro přežití včelstva v podzimních měsících. Zatímco odchov plodu a početnost dělnic postupně klesá, množství parazitů a virů naopak stoupá (Chen et al., 2023). Líhnoucí se generace dlouhověkých zimních včel je pak vystavena velkému tlaku koinfekcí, které vede k jejich oslabení, a to vede k náhlým podzimním a zimním kolapsům jinak silných včelstev (D'Alvise et al., 2019).

2.7 Metody detekce patogenů

2.7.1 Izolace DNA metodou CTAB

Extrakce nukleových kyselin pomocí kationtového tenzidu CTAB (cetyltrimethylamoniumbromid) se používá pro jeho schopnost efektivně lyzovat buněčné membrány a tvořit nerozpustné komplexy s polysacharidy nebo polyfenoly. Ty by v navazujících analýzách mohly působit jako inhibitory PCR. Dalším krokem po narušení buněk je přidání chloroformu, který po centrifugaci vede k fázové separaci. Denaturovaný proteiny, lipidy a vysrážené inhibiční látky zůstávají ve spodní organické fázi, zatímco nukleové kyseliny přecházejí do svrchní vodné části. V závěrečné fázi je DNA z vodní fáze vysrážena ledovým izopropanolem nebo ethanolem, promyta

a následně resuspendovaná ve stabilizačním pufru. Výsledkem je čistá, koncentrovaná DNA připravená k další analýze (Aboul-Maaty & Oraby, 2019).

2.7.2 Polymerázová řetězová reakce

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase představuje moderní metodu, která se liší od klasické PCR metody tím, že umožňuje kontinuální sledování přibývajícího množství namnoženého produktu přímo během reakce. Samotný proces je založen na optické detekci fluorescenčního signálu, kdy se využívají speciální barviva, které se vmezeří do nově syntetizovaného vlákna DNA. S rostoucím počtem kopií pak roste i intenzita fluorescence (Kralik & Ricchi, 2017). Abychom si byli jistí, že na konci reakce fluorescenční signál pochází z požadovaného genu, a ne například z tvorby dimerů z primerů, dělá se tzv. analýza křivky tání. Metoda má vysokou citlivost, minimalizuje riziko kontaminace a umožňuje přesnou kvantifikaci úrovně nákazy (Taylor et al., 2019).

3 Cíle práce

Hlavním cílem této bakalářské práce je na vzorku včelstev chovaných na stanovišti Fakulty zemědělské a technologické Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích sledovat sezónní dynamiku vybraných patogenů včel v rámci jedné včelařské sezóny.

V teoretické části práce je cílem shrnout nejvýznamnější patogeny včel a jejich vzájemné interakce. Cílem praktické části je zajistit odběr materiálu ve třech kritických fázích včelařské sezóny (červen, srpen, říjen), provést následnou purifikaci DNA a stanovit hladinu mikrosporidie *Nosema ceranae* pomocí RT-PCR. Závěrečným cílem je statistické a grafické vyhodnocení naměřených hodnot a porovnat šíření mezi jednotlivými měsíci.

4 Materiál a metodika

4.1 Sběr a homogenizace vzorků

Odběr biologického materiálu byl proveden ve třech časových horizontech pokrývajících včelařskou sezónu (červen, srpen, říjen) z osmi včelstev chovaných na včelnici FZT JU (viz tabulka 1, 2, 3). Pro maximální zamezení znehodnocení nukleových kyselin byly včely po odběru usmrceny a zamrazeny přímo na místě kapalným dusíkem. Následně byl materiál transportován do laboratoře a uchováván v mrazáku při teplotě -80°C.

Před izolací DNA ze vzorku byla provedena homogenizace. Jednotlivé včely byly důkladně rozetřeny v předem vysterilizovaných (autoklávovaných) třecích miskách. Během celého procesu byl materiál chlazen kapalným dusíkem, aby tkáň zůstala neustále ve zmrazeném stavu. Část takto získaného homogenátu byla alikvotována do mikrocentrifugačních zkumavek typu Eppendorf pro izolaci DNA a zbylý materiál byl uchován ve zmrazeném stavu pro případné budoucí analýzy.

Tabulka 1: Odběr 1 – Červen (zdroj: vlastní zpracování)

Číslo včelstva	**Relativní úroveň napadení Nosemou**	**Datum odběru**
V1	1,000000	10.6.2025
V2	0,010310	10.6.2025
V3	0,000930	10.6.2025
V4	0,297608	10.6.2025
V5	0,000699	10.6.2025
V6	17,531914	10.6.2025
V26	13,930868	10.6.2025
V30	6,514829	10.6.2025

Tabulka 2: Odběr 2 – Srpen (zdroj: vlastní zpracování)

Číslo včelstva	Relativní úroveň napadení Nosemou	Datum odběru
V1	1,213587	26.8.2025
V2	0,008194	26.8.2025
V3	0,000400	26.8.2025
V4	0,262434	26.8.2025
V5	0,000964	26.8.2025
V6	20,783587	26.8.2025
V26	11,733075	26.8.2025
V30	5,235318	26.8.2025

Tabulka 3: Odběr 3 – Říjen (zdroj: vlastní zpracování)

Číslo včelstva	Relativní úroveň napadení Nosemou	Datum odběru
V1	1,352920	20.10.2025
V2	11,461527	20.10.2025
V3	3,148957	20.10.2025
V4	0,061363	20.10.2025
V5	10,718863	20.10.2025
V6	úhyn	20.10.2025
V26	1,936620	20.10.2025
V30	0,000042	20.10.2025

4.2 Izolace DNA

Pro extrakci DNA z včelí tkáně byla využita modifikovaná CTAB metoda. K připravovanému homogenizovanému biologickému materiálu o hmotnosti přibližně 20-200 mg byl přidán extrakční CTAB-PVP pufr (složení: 2% CTAB-PVP, 100 nM Tris o pH 8, 50 nM ECTA, 1,4 M NaCl) obohacený o β-merkaptoethanol. Tento roztok byl předem vytemperovaný na 65 °C. Vzorky byly inkubovány po dobu 10 minut při teplotě 65 °C za občasného lehkého promíchávání. Po uplynutí inkubační doby proběhla centrifugace při maximální rychlosti a pokojové teplotě 5 minut. Poté byla oddělená vodní fáze opatrně přepipetována do čistých zkumavek typu Eppendorf. Následně byl

přidán roztok chloroform-isoamylalkoholu v objemu 500 µl a směs byla 5 minut protřepávána a opět centrifugována za stejných podmínek.

Vodná fáze byla přenesena do nových zkumavek a smíchána s isopropanolem v množství odpovídajícího 2/3 objemu vodné fáze pro precipitaci nukleových kyselin. Po lehkém promíchání byly vzorky inkubovány 10 minut při teplotě -20 °C a centrifugovány při teplotě 4 °C a při maximální rychlosti 5 minut. Supernatant byl odstraněn a získaný pelet byl promyt 1 ml ledového 70% ethanolu. Po závěrečné centrifugaci a odstranění zbytků ethanolu byl pelet DNA vysušen při teplotě 37 °C a resuspendován ve 20-200 µl TE pufru. Čistá izolovaná DNA byla až do dalšího použití skladována při teplotě -20 °C.

4.3 RT-PCR detekce

Detekce mikrosporidií *Nosema ceranae* byla provedena pomocí metody polymerázové řetězové reakce v reálném čase na přístroji QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System s využitím fluorescenční barvičky Power SYBR® Green PCR Master Mix.

Specifické oligonukleotidové primery využité pro amplifikaci cílových sekvencí byly převzaty z publikované literatury a jejich přesné znění je uvedeno v Tabulce 4 (Ryba et al., 2012).

Tabulka 4: Sekvence primeru Nosema ceranae (Ryba et al., 2012)

Název	**Typ primeru**	**Sekvence (5' k 3')**	**Délka fragmentu (bp)**	**T^{a} (°C)**
Nosema ceranae	Forward	CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTAA	321	62
	Reverse	CCCGGTCATTCTCAAACAAAAAACCG		

Reakce probíhala ve standardních 96jamkových PCR destičkách. Celkový reakční objem činil 10 µl a jeho složení shrnuje Tabulka 5. Pro vyloučení falešně pozitivních výsledků v důsledků případně kontaminace byly do každého běhu zařazeny negativní kontroly bez přidání templátové DNA.

Tabulka 5: Složení reakční směsi pro jeden vzorek (zdroj: vlastní zpracování)

Složka	**Objem (µl)**
Power SYBR® Green PCR Master Mix	5,00
Forward primer	0,25
Reverse primer	0,25
Extrahovaná DNA	1,00
PCR H_2O (Top-Bio, s.r.o., ČR)	3,50
Celkový objem	10,00

Před přípravou samotné reakční směsi a pipetováním do 96jamkových destiček bylo nezbytné vzorky izolovaní DNA správně připravit. Zmrazené vzorky byly nejprve rozmrazovány při pokojové teplotě a po rozpuštění byl každý vzorek zhomogenizován pomocí vortexu a následně krátce stočen, aby bylo zajištěno rovnoměrné rozložení nukleových kyselin v celém objemu vzorku. Teprve po této přípravě bylo zahájeno pipetování DNA a ostatních reagencií do reakční destičky.

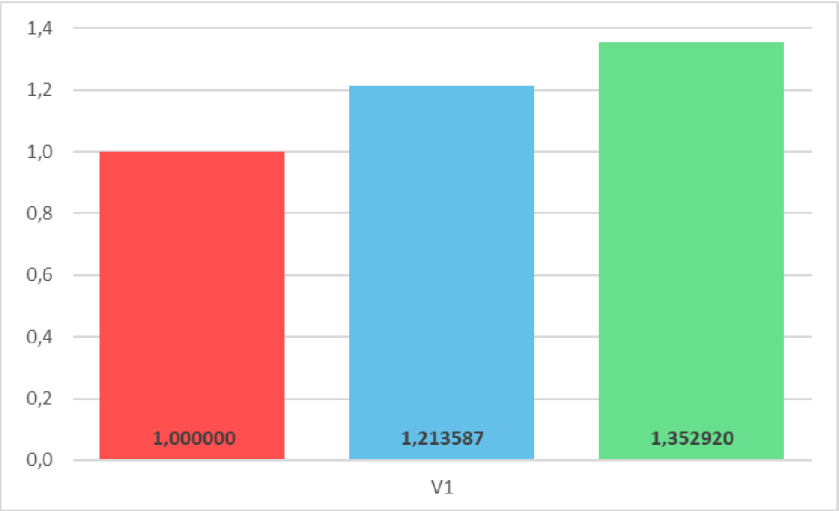
Teplotní profil amplifikace byl nastaven v souladu s doporučením výrobce pro použitý Master Mix a skládal se z následujících fází: počáteční aktivace (2 minuty při 50 °C) a úvodní denaturace (10 minut při 95 °C). Poté následovalo 40 amplifikačních cyklů skládajících se z fáze denaturace (15 sekund při 95 °C) a nasedání primerů s elongací (1 minuta při 60 °C). Následně pro kontrolu namnožených produktů byla provedena závěrečná denaturace (15 s při 95 °C), zchlazení (1 minuta při 60 °C) a opětovné zahřátí (15 sekund při 95 °C).

5 Výsledky

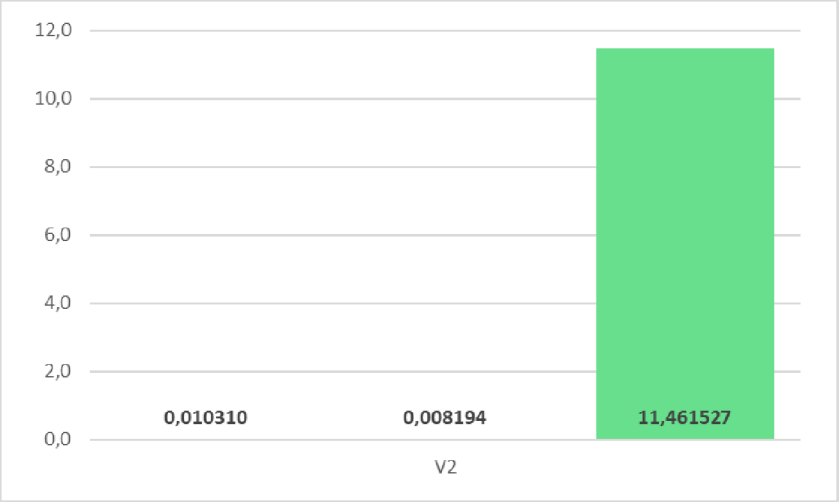
5.1 Sezónní dynamika relativní úrovně napadení Nosema ceranae u jednotlivých včelstev

Z důvodu velké variability naměřených hodnot jsou jednotlivá včelstva zaznamenaná v samostatných obrazcích na základě časové osy odběru. Hodnoty se pohybují od téměř nulových hodnot až po masivní nákazy přesahující úroveň 20. Způsob vyhodnocení byl zvolen kvůli přehlednosti a lepšímu vyhodnocení.

Jednotlivé měsíce jsou označené specifickou barvou sloupce v obrázku. Červen je vyobrazený barvou červenou, srpen modrou a říjen zelenou.

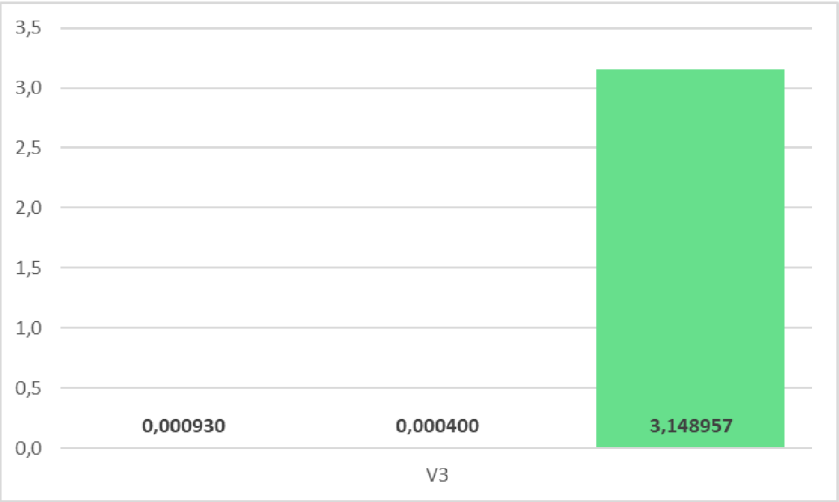


Obrázek 3: Sezónní dynamika úrovně napadení u včelstev V1 (zdroj: vlastní zpracování)

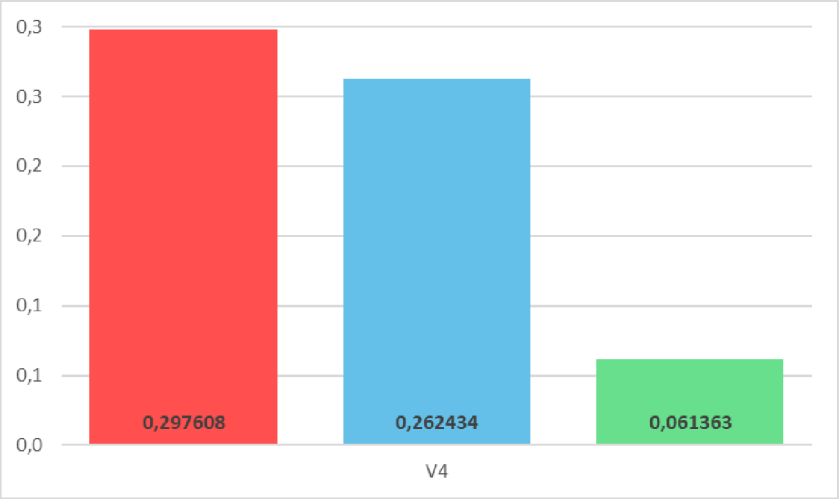


Obrázek 4: Sezónní dynamika úrovně napadení u včelstev V2 (zdroj: vlastní zpracování)

Včelstvo s označením V1 (viz Obrázek 3) v této práci sloužilo jako referenční vzorek. Jeho hodnota byla vypočtena na 1,00 a ostatní vzorky relativního napadení byla porovnávána právě s tímto vzorkem. Během sezóny vykazovalo velmi stabilní a jen mírně rostoucí trend nákazy, která na podzim dosáhla hodnoty 1,35. Naopak u včelstva s označením V2 (viz Obrázek 4) byla hladina nákazy patogenu zanedbatelná, ale s nástupem podzimu a líhnutím zimní generace včel došlo k exponenciálnímu nárůstu a masivní expozici nákazy, kde se hodnota vyšplhala na 11,46.



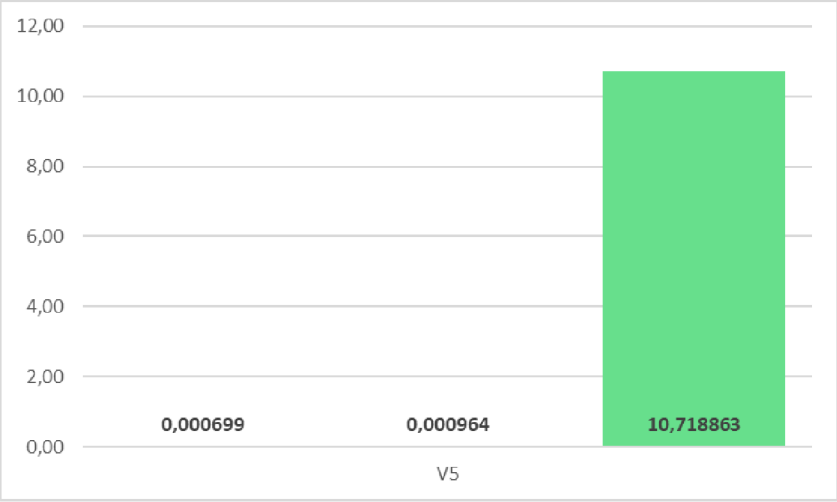
Obrázek 5: Sezónní dynamika úrovně napadení u včelstev V3 (zdroj: vlastní zpracování)



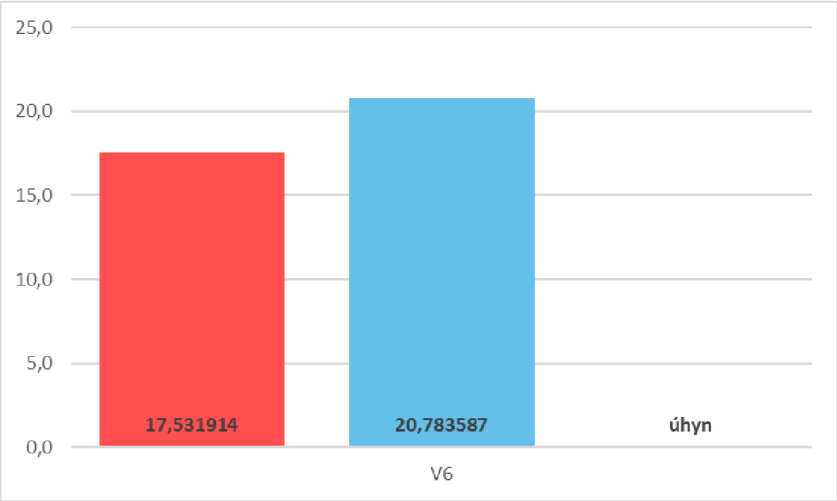
Obrázek 6: Sezónní dynamika úrovně napadení u včelstev V4 (zdroj: vlastní zpracování)

U včelstva s označením V3 (viz Obrázek 5) zaznamenáváme podobný trend jako u V2, ale zde můžeme vidět mírnější průběh. Letní hodnoty, které byly sotva detekovatelné, se v říjnu vyšplhaly na 3,14, což je oproti V2 skoro čtyřnásobně menší. Jiný vývoj jsme

mohli vidět u včelstva označené V4 (viz Obrázek 6), kde se hladina nákazy dlouhodobě držela v nízkých hodnotách pod 0,30 a do podzimu se snížilo k hodnotě 0,06.

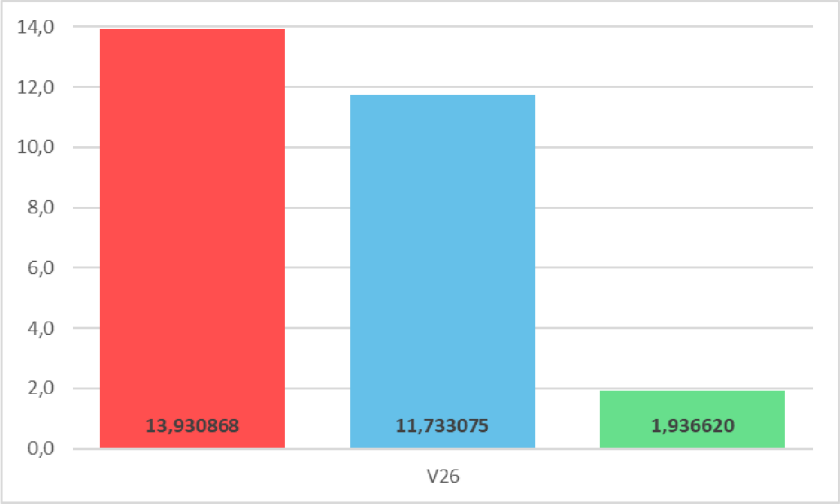


Obrázek 7: Sezónní dynamika úrovně napadení u včelstev V5 (zdroj: vlastní zpracování)

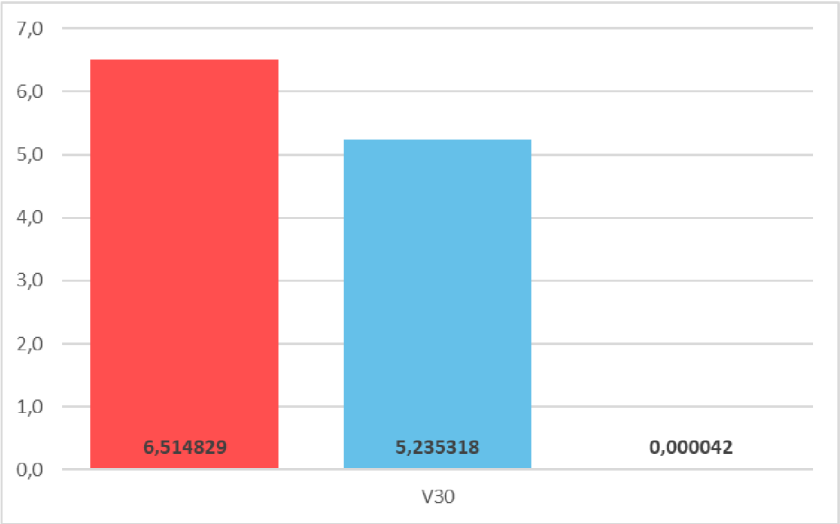


Obrázek 8: Sezónní dynamika úrovně napadení u včelstev V6 (zdroj: vlastní zpracování)

Tyto dva obrázky ukazují dva extrémy sledovaného souboru. Včelstvo s označením V5 (viz Obrázek 7) zrcadlí trend náhlého podzimního selhání stejně jako u V2 a V3. Po ukázkových letních měsících se hladina parazita *Nosema ceranae* v říjnu vyšplhala až na hodnotu 10,71. Naopak u včelstva s označením V6 (viz Obrázek 8) došlo k zásadním až fatálním hodnotám. Tato kolonie vykazovala masivní nákazu už v červnu (17,53), které v srpnu stále stoupalo (20,78).

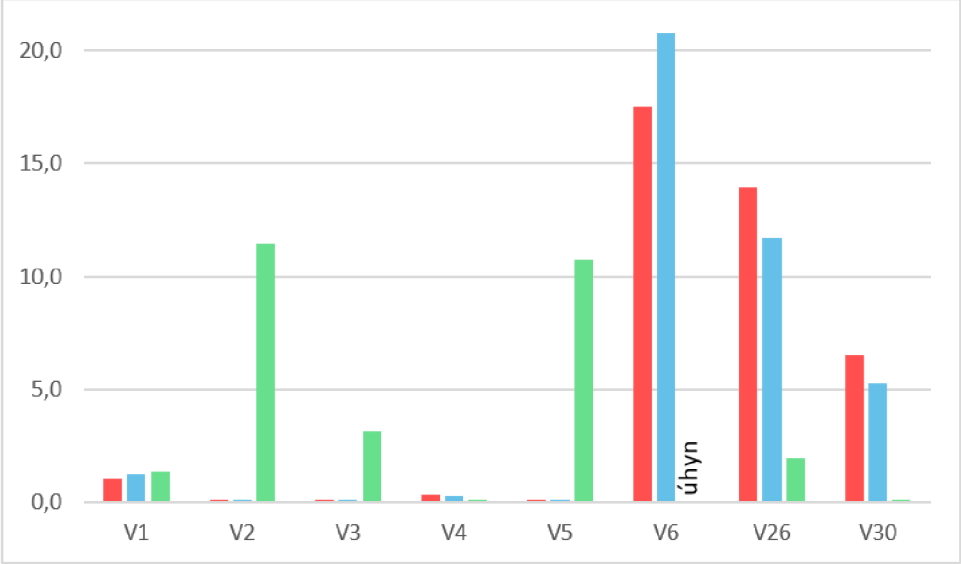


Obrázek 9: Sezónní dynamika úrovně napadení u včelstev V26 (zdroj: vlastní zpracování)



Obrázek 10: Sezónní dynamika úrovně napadení u včelstev V30 (zdroj: vlastní zpracování)

Poslední dvě včelstva s označením V26 (viz Obrázek 9) a V30 (viz Obrázek 10) ukazují úspěšné zvládnutí nákazy jako bylo například u V4. Obě kolonie vstoupily do léta s velmi vysokou nákazou parazita *Nosema ceranae* (13,93 u V26 a 6,51 u V30). I přes toto velké letní zamoření dokázala obě včelstva přežít až do podzimních měsíců a potlačit infekci. U V26 byl pokles nákazy menší (1,93), ale zase z větších hodnot, než u V30 ($4{,}20.10^{-5}$), kde start byl s nižšími hodnotami.



Obrázek 11: Sezónní dynamika úrovně napadení u všech včelstev (zdroj: vlastní zpracování)

Z tohoto souhrnného Obrázku 11 lze vidět viditelnou variabilitu a nepravidelnost vývoje nákazy. Hodnoty se pohybují ve velkém rozpětí, od téměř nulových hodnot až po velmi vysokou zátěž, která přesahuje hodnotu 20. Křivky včelstev nezaujímají jeden sezonní trend, ale můžeme zde vidět jakousi opakovatelnost. Můžeme vidět tři včelstva (V2, V3, V5), kterým se na začátku léta dařilo, ale na podzim podlehly nákaze. Další včelstva (V4, V26, V30) naopak po letní nákaze dokázala na podzim infekci snížit. Naopak tu máme jedno včelstvo (V6), které nákazu nepřežilo a jedno (V1), které mělo pozvolné zvyšování nákazy parazitem.

5.2 Statistické vyhodnocení dat

Statistické vyhodnocení naměřených hodnot (viz Tabulka 6) ukazuje vysokou variabilitu ve zdravotním stavu jednotlivých včelstev. Mezi jednotlivými měsíci můžeme vidět rozdíl v hodnotách mediánu a aritmetického průměru. V červnu byla hodnota mediánu 0,65, zatímco průměr dosahoval 4,91. Tento nepoměr je způsobený přítomností extrémních hodnot nakažení (například u V6 s maximem 17,53), které celkový průměr posouvají směrem nahoru. Velkou různorodost můžeme vidět také u hodnot směrodatné odchylky, kdy se v létě pohybovaly hodnoty u 7,00, ale na podzim spadla na 4,90.

Tabulka 6: Základní statistické zhodnocení relativní úrovně napadení (zdroj: vlastní zpracování)

	Červen	**Srpen**	**Říjen**
Minimum	0,000699	0,000400	0,000042
Maximum	17,531914	20,783587	11,461527
Median	0,648804	0,738010	1,936620
Průměr	4,910895	4,904695	4,097184
Směrodatná odchylka	7,091581	7,616941	4,903277

Pro otestování celkové dynamiky a predikčních faktorů nákazy mezi začátkem a koncem sledovaného období, byl proveden dvouvýběrový párový t-test a vypočítán korelační koeficient (viz Tabulka 7). Ze statistického vyhodnocení bylo v této fázi vyřazeno včelstvo V6 kvůli podzimnímu úhynu, aby bylo možné porovnat pouze kompletní párová data přeživších kolonií. Výsledek t-testu ($p = 0,77$) neprokázal statisticky významný rozdíl mezi červnovým a říjnovým odběrem. Včelstvo nekopírovalo jednotnou křivku nákazy, ale individuální nárůsty nákazy byly matematicky vyrušeny uzdravením jiných.

Korelační koeficient ($r = -0,39$) poté ukazuje, zda letní úroveň nákazy dokáže předpovídat podzimní stav včelstva. Výsledná hodnota prokazuje nepřítomnost přímé lineární závislosti.

Tabulka 7: Výsledky statistického vývoje nákazy, V6 vyřazeno (zdroj: vlastní zpracování)

T.Test	0,769070
Korelační koeficient	-0,387352

6 Diskuse

Mikrosporidie *Nosema ceranae*, původce nosematózy, představuje pro současné včelařství jednu z nejzákeřnějších hrozeb, jelikož od běžných onemocnění (varroáza nebo mor včelího plodu) se liší tím, že prochází trávicím traktem. Průběh nákazy bývá často skrytý a bez viditelných klinických příznaků. Parazit postupně poškozuje buňky zevnitř, čímž narušuje vstřebávání živin, zkracuje délku života a oslabuje celkovou imunitu organismu. V souvislosti s dnešním úbytkem biodiverzity, změnou klimatu a vlivu agrochemikálií se stávají k tomuto tichému nepříteli náchylnější.

Získaná data o sezónní dynamice mikrosporidie *Nosema ceranae* přinášejí jiný pohled do problematiky, než se na první pohled zdálo. Přinášejí hodnotný pohled do zdravotního stavu včelstev a otevírají možnou budoucí diskusi o vlivu specifického zacházení se včelstvy. Popisná i testovací statistika ukázala velkou různorodost napříč sledovaným souborem dat. Naměřené hodnoty nepodléhají jednotnému trendu, kdy t-test neprokázal statisticky významnost změn ($p = 0,77$). Jenomže velký rozdíl mezi hodnotami mediánu a aritmetického průměru spolu s extrémně vysokou směrodatnou odchylkou (nad hodnotu 7,00) prokazuje vysokou dynamiku patogenu u každého včelstva a jeho vysokou individuální zátěž u každého úlu. Zcela klíčový je poté negativní korelační koeficient ($r = -0,39$) mezi letní a zimní nákazou, který nám dokazuje, že původní míra zamoření nepředpovídá podzimní stav včelstva. Silně zasažená včelstva se mohou do podzimu vyčistit (V30), zatímco u původně zdravých včelstev může nákaza fatálně narůstat (V2, V5).

Variabilita výsledků nelze přisuzovat pouze biologickým vlastnostem patogenu, ale v souhrnu je třeba vyzdvihnout, že odlišný průběh infekce u jednotlivých včelstev poukazuje na rozdílnou míru obranyschopnosti. Silnější včelstvo V3 nepodlehlo nákaze tak jednoduše jako sousední V2, zatímco V4 vykazovalo stabilnější nízké hodnoty svědčící o dobré imunitní zdatnosti. Naopak fatální průběh mělo včelstvo V6, kde letní zátěž nákazy vedla k úhynu ještě před říjnovým odběrem. Tento fakt potvrzuje, že chronicky vysoká nákaza bez dostatečné imunitní rezervy končí kolapsem celého včelstva. V26 a V30 pak představují příklad efektivní imunitní odezvy, jelikož i přes masivní letní nákazu dokázala včelstva nákazu do podzimu potlačit.

Tento nepředvídatelný vývoj nákazy se dá vysvětlit specifickými podmínkami lokality. Všechna sledovaná včelstva jsou součástí školního včelína na Fakultě zemědělské

a technologické Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, kde nemají takový klid jako v běžném včelařském provozu a jsou vystavena vnějším stresovým faktorům. Je s nimi častěji manipulováno a neustále se jim narušuje úlové mikroklima. Tento neustálý provozní stres je pro včely velkou zátěží, který narušuje jejich přirozenou imunitu. Z tohoto důvodu včelstva nemusí na nákazu reagovat tak dobře, jak by odpovídal běžný sezonní cyklus patogenu. Každá kolonie bojuje s nákazou podle svých vlastních zbývajících sil, kde se silnější včelstva na podzim vyčistí od patogenu, zatímco imunita těch slabších se pod vlivem stresu a nákazy zhroutí. Výsledky statistické analýzy tento závěr potvrzují. Počáteční míra nákazy patogenu *Nosema ceranae* v létě nepředpovídá stav včelstva na podzim. Samotný vývoj není řízen biologií samotného patogenu, ale aktuální obranyschopností konkrétního včelstva a jejich schopností odolávat vnějším stresovým faktorům.

Tato naprostá všudypřítomnost a lokálně vysoká zátěž patogenem *Nosema ceranae.* souhlasí s rozsáhlým screeningem patogenů včely medonosné v ČR, který publikoval Mráz et al. (2021). Autoři v této studii analyzovali prevalenci patogenů v závislosti na typu prostředí. Prokázali, že výskyt onemocnění je silně vázán na charakter prostředí, kde největší zamoření bylo detekováno zejména v městských a zemědělských ekosystémech, kam můžeme zařadit i stanoviště FZT JU. Zatímco práce Mráze et al. (2021) nabízí pohled na prevalenci z pohledu makroprostředí, tato práce danou problematiku rozšiřuje o důkladný pohled na mikroprostředí. Výsledky jasně dokazují, že v rámci jednoho konkrétního prostředí mohou být rozdíly mezi sousedními včelnicemi natolik odlišné (od hodnot $4{,}00.10^{-5}$ až po 20,78), že zcela odstraňují obecně uznávané populační průměry.

Tuto lokální a vnitrodruhovou variabilitu potvrzuje nejnovější globální screeningová studie a metaanalýza, kterou provedli Barrientos-Espinoza et al. (2026). Studie se zabývá vyhodnocením prevalence nákazy parazitem *Nosema ceranae* napříč různými kontinenty. Zjistili, že evropské včelnice jsou jedny s nejvyšší mírou nákazy a závěrem metaanalýzy je nerovnoměrný výskyt *Nosema ceranae* na včelařské úrovni. Vývoj nákazy nezávisí na samotném patogenu, ale spíše na kombinaci lokálních stresorů a používané včelařské praxi.

Právě zmíněný faktor ve studii Barrientos-Espinoza et al. (2026) nabízí nejlogičtější vysvětlení pro statisticky podloženou variabilitu a nejasnost výsledků této práce. Včelstva

chovaná na školním včelíně FZT JU jsou permanentně vystavena intenzivnímu vlivu člověka, kdy jsou úly poměrně často otevírány nebo odebírány pro další experimenty a demonstrace, což vede k chronickému narušování úlového mikroklimatu. Tento neustálý stres může způsobovat silnou imunosupresi a vést k vyčerpání klíčových obraných proteinů především vitellogeninu. Na ten naráží poměrně nová studie Leipart et al. (2021), kdy vitellogenin není jen zásobní látkou, ale představuje komplexní protein s mnoha doménami hlavně potřebnými ve včelí imunitě. Jeho úbytek v důsledku neustálého vyrušování vede k narušení obranyschopnosti.

Následkem tohoto deficitu ztrácejí včelstva schopnost reagovat na nákazu jednotně. Jak ukazuje hodnota korelace v této práci, každá kolonie bojuje s nákazou výhradně na základě vlastních zbývajících individuálních sil. Imunita slabších jedinců se pod neustálým tlakem stresu a patogenu zhroutí (viz fatální kolaps kolonie V6), zatímco silnější včelstva si dokážou udržet dostatečnou hladinu imunitních proteinů a nákazu utlumit nebo snížit bez ohledu na to, jak silně byla zasažena v létě.

Výsledek této práce má praktický přesah do budoucího nakládání se včelstvy. Ukazuje, že boj s patogenem nelze zredukovat jen na hledání účinných léčiv, zvlášť když je farmakologická terapie v Evropě legislativně zakázána, ale je potřeba se soustředit i na samotnou biodiverzitu okolo včelína. Je potřeba hledat rovnováhu mezi potřebou zkoumat možné preventivní opatření proti nákazám s fyziologickými limity včelstva. Minimalizovat zbytečné zásahy, zajistit kvalitní pylové pastvy a respektovat klid samotného včelstva.

7 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo zhodnotit sezónní dynamiku vybraných patogenů včel, kdy hlavní důraz byl kladen na mikrosporidii *Nosema ceranae* u vybraných včelstev na školním včelíně Fakulty zemědělské a technologické Jihočeské univerzity. Za pomoci molekulární metody RT-PCR byla analyzována data ze tří důležitých období roku (červen, srpen, říjen), abychom mohli lépe porozumět vývoji a šíření tohoto zákeřného, často skrytě probíhajícího onemocnění. Ačkoliv jedna z výzkumných otázek směřovala k hledání společného výskytu více patogenů (koinfekcí), samotná laboratorní analýza se nakonec cíleně zaměřila výhradně na kvantifikaci nosematózy. Tímto bylo možné co nejpřesněji popsat její specifickou dynamiku v podmínkách školního včelína.

V této práci byla zjištěna absolutní absence plošného sezónního trendu. Naměřená data s jejich grafickým a statistickým vyhodnocení odhalily vysokou variabilitu ve zdravotním stavu jednotlivých včelstev. Výpočet párového t-testu a korelačního koeficientu potvrdil, že dynamika patogenu nepodléhá jednotné křivce a letní hodnota nákazy nepředpovídá podzimní stav kolonie. Zaznamenali jsme tři jasné trendy, kdy prvním byl smrtelný letní kolaps silně infikovaného včelstva (V6), druhým byl prudký podzimní nárůst nákazy u původně zdravých včelstev (V2, V5) a třetím posledním ukázkový případ silné imunitní odezvy (V30), kdy se včelstvo dokázalo z masivní letní nákazy do podzimu od patogenu téměř vyčistit.

Na základě těchto výsledků a velkých rozdílů bylo závěrem, že vývoj na sledovaném stanovišti není primárně řízen biologií samotného patogenu, ale aktuální obranyschopností konkrétního včelstva a její schopnosti čelit vnějším stresorům. Klíčovou roli zde hraje specifické zacházení se školním včelínem. Časté otevírání úlů vede k chronickému narušování úlového mikroklimatu a tento neustálý tlak vyčerpává imunitní rezervy včelstev, což otevírá cestu k nekontrolovatelnému množení patogenu u fyziologicky slabších včelstev.

Tato práce ukazuje, že nejefektivnější boj s nosematózou a dalšími patogeny nespočívá pouze v hledání léčby nebo prevence, ale také v zajištění správné biodiverzity v okolí včelína (bohatá pylová pastva) a v minimalizaci stresových faktorů. I v prostředí výzkumných nebo školních včelínů je pro udržení zdravých a silných včelstev nezbytné hledat kompromis mezi lidskou potřebou výzkumů a respektováním biologických limitů

a klidu samotného včelstva. Výsledky mohou být využity při nastavení harmonogramu manipulace se včelstvy na školních a výzkumných včelínech.

Seznam použitých zdrojů

1. Aboul-Maaty, N. A. -F., & Oraby, H. A. -S. (2019). Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. *Bulletin of the National Research Centre*, *43*(1), 25. https://doi.org/10.1186/s42269-019-0066-1

2. Barrientos-Espinoza, K. G., Monti, G., Carrillo, R., & Basoalto, E. (2026). Global and regional prevalence of Nosema ceranae infections in colonies and apiaries of European honeybee Apis mellifera: a systematic review and meta-analysis. *Apidologie*, *57*(2), 13. https://doi.org/10.1007/s13592-026-01255-7

3. Budge, G. E., Simcock, N. K., Holder, P. J., Shirley, M. D. F., Brown, M. A., Van Weymers, P. S. M., Evans, D. J., & Rushton, S. P. (2020). Chronic bee paralysis as a serious emerging threat to honey bees. *Nature Communications*, *11*(1), 2164. https://doi.org/10.1038/s41467-020-15919-0

4. Cilia, G., Tafi, E., Zavatta, L., Caringi, V., & Nanetti, A. (2022). The Epidemiological Situation of the Managed Honey Bee (Apis mellifera) Colonies in the Italian Region Emilia-Romagna. *Veterinary Sciences*, *9*(8), 437. https://doi.org/10.3390/vetsci9080437

5. Čermák, K., Gruna, B., Hajdušková, J., Holub, P., Klíma, Z., Kovařík, I., Navrátil, S., Rytina, L., Texl, P., Texl, F., & Tůma, Z. (2016). *Včelařství* (Sv. I.). PSNV.

6. Danihlík, J., Dostálková, S., Hroncová, Z., & Petřivalský, M. (2017). *Včelařství* (Sv. II.). PSNV.

7. D'Alvise, P., Seeburger, V., Gihring, K., Kieboom, M., & Hasselmann, M. (2019). Seasonal dynamics and co-occurrence patterns of honey bee pathogens revealed by high-throughput RT-qPCR analysis. *Ecology and Evolution*, *9*(18), 10241-10252. https://doi.org/10.1002/ece3.5544

8. Doublet, V., Oddie, M. A. Y., Mondet, F., Forsgren, E., Dahle, B., Furuseth-Hansen, E., Williams, G. R., De Smet, L., Natsopoulou, M. E., Murray, T. E., Semberg, E., Yañez, O., de Graaf, D. C., Conte, Y. L., Neumann, P., Rimstad, E., Paxton, R. J., & de Miranda, J. R. (2024). Shift in virus composition in honeybees (Apis mellifera) following worldwide invasion by the parasitic mite and virus

vector Varroa destructor. *R Soc Open Sci.*, *11*(1), 251529. https://doi.org/10.1098/rsos.231529

9. Forsgren, E. (2010). European foulbrood in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, *103*(Suppl.), S5-S9. https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.016

10. Fünfhaus, A., Ebeling, J., & Genersch, E. (2018). Bacterial pathogens of bees. *Current Opinion in Insect Science*, *26*, 89-96. https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.008

11. Genersch, E. (2010). American Foulbrood in honeybees and its causative agent, Paenibacillus larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, *103*(Suppl.), S10-S19. https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.015

12. Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., & Rotheray, E. L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, *347*(6229), 15. https://doi.org/10.1126/science.1255957

13. Hung, K. -L. J., Kingston, J. M., Albrecht, M., Holway, D. A., & Kohn, J. R. (2018). The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *285*(1870), 20172140. https://doi.org/10.1098/rspb.2017.2140

14. Chen, J., Rincon, J. O. R., DeGrandi-Hoffman, G., Fewell, J., Harrison, J., & Kang, Y. (2023). Impacts of seasonality and parasitism on honey bee population dynamics. *Journal of Mathematical Biology*, *87*(1), 19. https://doi.org/10.1007/s00285-023-01952-2

15. Johnson, B. R. (2023). *Honey bee biology*. Princeton University Press.

16. Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 108. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108

17. Leipart, V., Montserrat-Canals, M., Cunha, E. S., Luecke, H., Herrero-Galán, E., Halskau, Ø., & Amdam, G. V. (2021). Structure prediction of honey bee vitellogenin: a multi-domain protein important for insect immunity. *FEBS Open Bio*, *12*(1), 51-70. https://doi.org/10.1002/2211-5463.13316

18. Martin, S. J., & Brettell, L. E. (2019). Deformed Wing Virus in Honeybees and Other Insects. *Annual Review of Virology*, *6*(1), 49-69. https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015700

19. Molinatto, G., Mondet, F., Marzachi, C., Alaux, C., Bassi, E., Dievart, V., Gotti, M., Guido,, G., Jourdan, P., Kairo, G., Maisonnasse, A., Michel, L., Peruzzi, M., Porporato, M., Tagliabue, M., Kretzschmar, A., Bosco, D., & Manino, A. (2025). Seasonal variations of the five main honey bee viruses in a three-year longitudinal survey. *Apidologie*, *2025*(56), 23. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s13592-025-01147-2

20. Mosca, M., Gyorffy, A., Pietropaoli, M., Giannetti, L., Cersini, A., Fortugno, L., & Formato, G. (2024). IPM Strategy to Control EFB in Apis mellifera: Oxytetracycline Treatment Combined with Partial Shook Swarm and Queen Caging. *Veterinary Sciences*, *11*(1), 28. https://doi.org/10.3390/vetsci11010028

21. 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. https://doi.org/10.3390/insects12121051

22. Mukhamedova, L., Füzik, T., Nováček, J., Hrebík, D., Přídal, A., Marti, G. A., Guérin, D. M. A., & Plevka, P. (2021). Virion Structure and In Vitro Genome Release Mechanism of Dicistrovirus Kashmir Bee Virus. *Journal of Virology*, *96*(11), 1-11. https://doi.org/10.1128/jvi.01950-20

23. Noël, A., Le Conte, Y., & Mondet, F. (2020). Varroa destructor: how does it harm Apis mellifera honey bees and what can be done about it? *Emerging Topics in Life Sciences*, *4*(1), 45-57. https://doi.org/10.1042/etls20190125

24. Ramsey, S. D., Ochoa, R., Bauchan, G., Guldbronson, C., Mowery, J. D., Cohen, A., Lim, D., Joklik, J., Cicero, J. M., Ellis, J. D., Hawthorne, D., & vanEngelsdorp, D. (2019). Varroa destructor feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *116*(5), 1792-1801. https://doi.org/10.1073/pnas.1818371116

25. Rosenkranz, P., Aumeier, P., & Ziegelmann, B. (2010). Biology and control of Varroa destructor. *Journal of Invertebrate Pathology*, *103*(Suppl.), S96-S119. https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.016

26. Ryba, S., Titera, D., Schodelbauerova-Traxmandlova, I., & Kindlmann, P. (2012). Prevalence of honeybee viruses in the Czech Republic and coinfections with other honeybee disease. *Biologia*, *67*(3), 590-595. https://doi.org/10.2478/s11756-012-0038-5

27. Šefčík, J. (2014). *Začínáme včelařit*. Grada.

28. Tautz, J. (2016). *Fenomenální včely: biologie včelstva jako superorganizmu* (Vydání v češtině třetí). Brázda.

29. Taylor, S. C., Nadeau, K., Abbasi, M., Lachance, C., Nguyen, M., & Fenrich, J. (2019). The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time. *Trends in Biotechnology*, *37*(7), 761-774. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.002

30. Titěra, D. (2017). *Včely zdravé a nemocné*. Brázda.

31. Veselý, V. (2013). *Včelařství* (Vyd. 3., V Nakl. Brázda 2). Brázda.

Seznam obrázků

Obrázek 1: Taxonomie (Danihlík a spol., 2017) 9
Obrázek 2: Anatomie včely (Šefčík, 2014) 10
Obrázek 3: Sezónní dynamika úrovně napadení u včelstev V1 (zdroj: vlastní zpracování) 29
Obrázek 4: Sezónní dynamika úrovně napadení u včelstev V2 (zdroj: vlastní zpracování) 29
Obrázek 5: Sezónní dynamika úrovně napadení u včelstev V3 (zdroj: vlastní zpracování) 30
Obrázek 6: Sezónní dynamika úrovně napadení u včelstev V4 (zdroj: vlastní zpracování) 30
Obrázek 7: Sezónní dynamika úrovně napadení u včelstev V5 (zdroj: vlastní zpracování) 31
Obrázek 8: Sezónní dynamika úrovně napadení u včelstev V6 (zdroj: vlastní zpracování) 31
Obrázek 9: Sezónní dynamika úrovně napadení u včelstev V26 (zdroj: vlastní zpracování) 32
Obrázek 10: Sezónní dynamika úrovně napadení u včelstev V30 (zdroj: vlastní zpracování) ... 32
Obrázek 11: Sezónní dynamika úrovně napadení u všech včelstev (zdroj: vlastní zpracování). 33

Seznam tabulek

Tabulka 1: Odběr 1 – Červen (zdroj: vlastní zpracování)..... 25
Tabulka 2: Odběr 2 – Srpen (zdroj: vlastní zpracování)..... 26
Tabulka 3: Odběr 3 – Říjen (zdroj: vlastní zpracování) 26
Tabulka 4: Sekvence primeru Nosema ceranae (Ryba et al., 2012) 27
Tabulka 5: Složení reakční směsi pro jeden vzorek (zdroj: vlastní zpracování) 28
Tabulka 6: Základní statistické zhodnocení relativní úrovně napadení (zdroj: vlastní zpracování)..... 34
Tabulka 7: Výsledky statistického vývoje nákazy, V6 vyřazeno (zdroj: vlastní zpracování)..... 34

Seznam zkratek

APV	Virus akutní paralýzy včel (*Acute Bee Paralysis Virus*)
BQCV	Virus černání matečníku (*Black Queen Cell Virus*)
CPV	Virus chronické paralýzy včel (*Chronic Bee Paralysis Virus*)
CTAB	Cetyltrimethylamoniumbromid
ČR	Česká republika
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DWV	Virus deformovaných křídel (*Deformed Wing Virus*)
FZT JU	Fakulta zemědělská a technologická Jihočeské univerzity
IAPV	Virus izraelské akutní paralýzy (*Israeli Acute Paralysis Virus*)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (*Polymerase Chain Reaction*)
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleová kyselina
RT-PCR	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (*Real-Time PCR*)
TE	Tris-EDTA pufr