

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra zoologie a rybářství



**Přítomnost vybraných virů ve spermatu
trubců včely medonosné**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Barbora Vodáková

Vedoucí práce: Ing. Dalibor Titěra, CSc.

© 2017 ČZU v Praze

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma Přítomnost vybraných virů ve spermatu trubců včely medonosné vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v přiložené bibliografii.

V Praze dne:

Poděkování

Ráda bych poděkovala Ing. Dalibroovi Titěrovi, CSc. za odborné vedení a pomoc při celém procesu psaní a tvorby diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala RNDr. Janě Prodělalové, Ph.D. za rozbor vzorků a důležité informace týkající se metodiky. Také děkuji své rodině a přátelům, bez kterých by nebyla realizace této práce možná.

Přítomnost vybraných virů ve spermatu trubců včely medonosné

Souhrn

U včely medonosné *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) je známo několik virových patogenů, kterým se věnuje velký počet studií. U některých virů již byla potvrzena možnost vertikálního přenosu. Pro šíření takovýchto virů je velmi výhodný polyandrický způsob rozmnožování včel. V první části této práce jsem shrnula dostupné poznatky o virech, které se u tohoto druhu vyskytují, včetně možností jejich diagnostiky a poznatky o reprodukci včely medonosné.

V druhé části jsme provedli rozbor spermatu včely medonosné kraňské *Apis mellifera carnica* (Pollmann, 1879) na výskyt několika druhů virů. K diagnostice jsme použili PCR. Následně jsme statisticky porovnali výsledky jednotlivých stanovišť. Dále jsme se zaměřili na hodnocení použité metodiky. V některých vzorcích byl prokázán výskyt DWV, ABPV, BQCV a AmFV. Ani v jednom ze zkoumaných vzorků nebyl nalezen KBV, SBV, VdMLV, LSV a BSRV. Mezi stanovišti byly nalezeny statistické rozdíly, avšak vzhledem k malému rozsahu naměřených hodnot jsou zjištěné rozdíly na hranici statistické průkaznosti. Metodika se ukázala jako vhodná pro tuto diagnostiku a bylo nalezeno i několik možností pro její budoucí optimalizaci.

Klíčová slova: včela medonosná, virus, trubec, spermie, vertikální přenos

Presence of viruses in honeybee drone semen

Summary

There are several known viral pathogens of honeybee *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) that are subjects of many studies. The possibility of vertical transmission has been already confirmed for several such viruses. Polyandrous mating of honeybees favors the spreading of such viruses. In the first part of this thesis, I summed up available findings about viruses occurring in the honeybees including different methods of viral diagnostic, and about reproduction of honeybees.

In the second part, we analyzed semen of Carniolan honeybee *Apis mellifera carnica* (Pollmann, 1879) for the presence of several viruses. We used PCR for diagnosing and we compared the results from various sampling stations using statistical method. Moreover, we focused on evaluating of the used methodology. The presence of DWV, ABPV, BQCV and AmFV was demonstrated in some of the samples. KBV, SB, VdMLV, LSV and BSRV were not present in any of the samples. Statistical differences were found among the sampling stations, however, the differences are at the limit of the statistical resolution due to the small number of measured values. The methodology was proved to be suitable for such a diagnostic; furthermore, we have found a number of options for its future optimization.

Keywords: honeybee, virus, drone, sperm, vertical transmission

Obsah

1	Úvod	7
2	Cíl práce a vědecká hypotéza	8
3	Přehled literatury	9
3.1	Reprodukce včely medonosné	9
3.1.1	Biologie páření	9
3.1.2	Reprodukční soustava matky	12
3.1.3	Samčí reprodukční soustava	13
3.1.3.1	Složení trubčího ejakulátu	14
3.1.3.2	Faktory ovlivňující kvalitu trubců a jejich spermatu	16
3.2	Parazitózy ovlivňující přenos a působení virů ve včelstvu	17
3.2.1	<i>Varroa destructor</i>	18
3.2.2	<i>Nosema apis</i> , <i>Nosema ceranae</i>	18
3.3	Virová onemocnění včelstev	20
3.3.1	ABPV a CBPV	20
3.3.2	KBV	23
3.3.3	IAPV	24
3.3.4	BQCV	24
3.3.5	DWV	25
3.3.6	SBV	27
3.3.7	AmFV	28
3.3.8	Diagnostika	29
3.3.8.1	Odběr a uchovávání vzorků	29
3.3.8.2	Rozbor vzorků	30
3.4	Vertikálně přenosné choroby jiných bezobratlých	33
3.5	Přirozená obrana před patogeny	35
3.5.1	Imunita	35
3.5.2	Hygiena hnízda	37
3.6	Souhrn literární části	38
4	Materiál a metody	39
4.1	Odběr a původ vzorků	39
4.2	Rozbor vzorků	40
4.3	Analýza dat	41
5	Výsledky	44
5.1	Statistické zhodnocení	47
5.1.1	Závěr statistického hodnocení	49
6	Diskuze	50

7 Závěr	53
8 Seznam literatury.....	54
9 Zdroje obrázků.....	63

1 Úvod

Význam virových onemocnění včel je v posledních letech velmi intenzivně zkoumán, protože virové infekce jsou dávány do souvislosti se slábnutím a úhyny včelstev. Obecně je nutné této problematice věnovat pozornost, jelikož včely medonosné jako opylovači zajišťují značnou část světové produkce ovoce, zeleniny a jiných plodin. Významné jsou i včelí produkty jako je med, mateří kašička, vosk či propolis.

Pro pochopení mechanismů šíření a působení nálezů je nutné mít informace o souvisejících faktorech. Proto se literární řešerše nezabývá pouze popisem virů, na které jsme se zaměřili během výzkumné části, avšak i celkovým pozadím problematiky.

Pro mnohé viry slouží jako vektor i parazité, u včel zejména roztoč kleštík zhoubný *Varroa destructor* (Anderson et Trueman, 2000). Jeho životnímu cyklu a spolupůsobení s některými viry, jsem se v této práci taktéž zabývala. V podkapitole věnované samotným nejvíce rozšířeným virům, jsou informace o jejich působení a o jejich diagnostice. Dále jsem se věnovala i vertikálně přenosným virům u jiných skupin bezobratlých.

V experimentální části jsme zkoumali pomocí PCR výskyt virů v odebraných vzorcích spermatu. Byla zkoumána účinnost použité metodiky a možnosti přenosu virů spermatem. V diskuzi jsou mimo jiné rozebrány možnosti zlepšení užití metodiky. Dále byla provedena statistická analýza rozdílů ve výskytu virů na různých stanovištích. V diskuzi je též předloženo několik možných vysvětlení rozdílů ve výskytu virů na různých stanovištích a možných vysvětlení kompletně negativních výsledků pro některé patogeny.

2 Cíl práce a vědecká hypotéza

Cílem práce bylo přispět k poznání mechanismů šíření virů mezi včelstvy včely medonosné kraňské. Tato práce je zaměřena na šíření virů pohlavními cestami, tzv. vertikálním přenosem mezi generacemi, resp. z trubců na matky, se kterými se spáříli.

Experimenty byly zaměřeny na techniku odběru trubčího spermatu do vzorkovnic vhodných k uchování a přepravě vzorků spermatu do diagnostické laboratoře k následným PCR analýzám. Analýzou matrice pak byly zjišťovány přítomné vybrané virové patogeny ve spermatu trubců. Následně byly porovnány výsledky z různých stanovišť odběru.

Zkoumána tedy byla hypotéza, že infekce trubců v různých chovatelských lokalitách v Evropě se významně liší.

3 Přehled literatury

3.1 Reprodukce včely medonosné

Pohlavními jedinci ve včelstvech jsou matka a trubci. Matka je vždy jen jedna a počet trubců nepřesahuje deset procent populace úlu (Czekonska et al., 2015). U včely je tzv. polyandrie, tedy páření samice s několika samci.

Pohlavní dospělosti dosahují trubci devátý až dvanáctý den po vylíhnutí. K páření dochází mezi patnáctým a dvacátým třetím dnem po vylíhnutí trubce, většinou jednadvacátý. Trubci, kteří se nespářili, umírají kolem třicátého dne staří (Czekonska et Chuda-Mckiewicz, 2015). Většina trubců se ovšem nedožije ani čtrnáctého dne, nejstarší nalezení trubci byli staří čtyřicet pět až padesát dní (Drašar et al., 1978). Obecně jsou věk dosažení pohlavní dospělosti a kvalita spermatu velmi variabilní v závislosti na chovných podmínkách (Czekonska et Chuda-Mickiewicz, 2015).

3.1.1 Biologie páření

K páření dochází na trubčím shromaždišti. K matce jsou trubci lákáni mateří látkou, kterou matka vylučuje mandibulární žlázou. Trubci taktéž feromonálně lákají matku na trubčí shromaždiště (Drašar et al., 1978). Trubčí shromaždiště jsou stálá přesně daná místa v přírodě (Veselý et al., 2003). Vždy se jedná o plochu s průměrem mezi třiceti a dvě stě metry čtverečními. Kromě feromonálního vlivu matky trubci pravděpodobně vyhledávají shromaždiště za pomoci opticky nápadných znaků (Tautz, 2010). Nejsou žádná specifická geografická pravidla či opakující se znaky, podle kterých bychom mohli předem určit trubčí shromaždiště (Connor, 2008).

Trubci mohou létat na shromaždiště až čtyři kilometry daleko, ojediněle i dále (Veselý et al., 2003). Byly prokázány případy, kdy trubec doletěl na shromaždiště vzdálené i jedenáct kilometrů (Drašar et al., 1978). Matčin dolet je maximálně dva kilometry (Veselý et al., 2003). Vzdálenost mezi úlem a navštíveným shromaždištěm je u trubců ovlivněna i věkem trubce. Starší trubci tráví hledáním shromaždiště více času než mladší. Přičemž v okolí půl kilometru kolem úlu je většina trubců starých pouze osm až deset dnů (Connor, 2008). Vyskytují se i regiony bez trubčích shromaždišť. Na takovýchto místech je uplatněna agregační tendence trubců a ti vytvářejí ve vzduchu nestálé velké skupiny pohybující se po krajině (Tautz, 2010).

Mladé neoplozené matky několikrát z domovského úlu vylétají a to na krátké několika minutové lety, výjimečně na hodinový. Po oplození se vrací zpět. K snubním letům dochází v rozmezí pozdního dopoledne a poloviny odpoledne, kdy trubci vylétají z úlu (Tautz, 2010). Neoplozené matky vylétávají pouze za příznivého počasí, tzn. při teplotách nad dvacet stupňů celsia a při mírném větru či bezvětří (Connor, 2008).

Za normálních okolností se s matkou páří více než jeden samec, zpravidla minimálně šest až deset. Některé matky se dokonce páří ve dvou i třech snubních letech (Drašar et al., 1978) v závislosti na naplnění matčiných semenných váčků (Tautz, 2010). V extrémních případech se matka může spářit až s pětáctyřiceti samci (Connor, 2008). Polyandrie je u včel velmi významná a počet samců, se kterými se matka spáří, má vliv na produkci celé kolonie. Ukázalo se, že pokud je matka inseminována spermatem pouze jednoho trubce, její včelstvo následně produkuje méně matečnicků, má nižší produkci trubčího plodu, pylu a skladuje méně medu (Fuchs et Schade, 1994).

Vlastní kopulace probíhá za letu deset až třicet metrů nad zemí. Přibližující se samec směřuje k matce zespodu zezadu. Avšak během koitu je trubec nad matkou a objímá jí nohama zadeček (Veselý et al., 2003). Nejprve je trubec k matce lákán feromony, když se spolu vyskytnou na jednom shromaždišti, začne se trubec orientovat opticky. Sleduje cokoli, co se objeví na shromaždišti a velikostí i tvarem připomíná matku. Trubci zformují tzv. trubčí kometu, kterou může tvořit od pár do několika set jedinců (Connor, 2008).



Obr. 1: Pozice matky a trubce při kopulaci

Spouštěčem částečné everze penisu je pro trubce detekce otevřené žihadlové komory matky (Drašar et al., 1978). Tato částečná everze probíhá díky stahům hrudního a břišního

svalstva. Neevertovaný penis je blanitý orgán uložený v břišní dutině, během everze se naplní vzduchem a hemolymfou. Během everze se také postupně vypuzuje sperma z chámojemu a hlenových žláz do cibulky penisu (Veselý et al., 2003). Trubec následně zasune endofalus do kopulačního orgánu samice, což je doprovázeno kompletní everzí. Po spojení trubcova penisu a matčiny žihadlové komory stoupá v endofalu tlak (Drašar et al., 1978). Zvyšujícím tlakem dochází k druhé fázi kopulace. Stupňujícím se tlakem je způsobeno vychlípení endofalu, trubec se s matkou pevně spojí – do žihadlové komory zapadnou lepivá lůžka vrcholu penisu. Následuje ejakulace, kterou končí druhá fáze kopulace (Veselý et al., 2003). Úplné everzi penisu napomáhá i matka mohutnou kontrakcí poševní svaloviny (Tautz, 2010). Během třetí fáze páření stále stoupá tlak v penisu, což má za následek prasknutí jeho stěny (Veselý et al., 2003), čímž se trubec od matky oddělí. Samice letí dál, samec již během everze endofalu uhynul (Drašar et al., 1978) v důsledku odkrvení důležitých orgánů (Veselý et al., 2003).

V poševní dutině vznikne tzv. oplozovací znaménko. Jedná se o část chitinových destiček endofalu, ejakulovaný hlen a oranžový povlak, který odráží ultrafialové záření. Oplozovací znaménko značně láká další samce, a to odrazem ultrafialového spektra a svým pachem (Tautz, 2010). Oplozovací znaménko po posledním trubci, se kterým se matka pářila před návratem do úlu, odstraňují matce dělnice (Connor, 2008).



Obr. 2: Dělnice odstraňující matce oplozovací znaménko

Ejakulát jednoho trubce obsahuje většinou šest až dvanáct milionů spermií. Sperma trubců, se kterými se matka pářila, se přechodně uchovává v párových vejcovodech.

Do matčiny spermatéky migruje zhruba pět až šest milionů spermií z celkového objemu získaného od trubců, se kterými se matka spářila (Rhodes et al., 2011) – což odpovídá většinou zhruba deseti procentům získaného spermatu (Tautz, 2010). Ve spermatéce jsou spermie skladovány a následně po malých dávkách uvolňovány jakmile matka začne klást (Rhodes et al., 2011). Většina spermatu je nakonec z matky vyloučena (Rhodes et al., 2011). Přebytké sperma spolu s hlenem matka postupně vytlačuje z těla. Avšak úplné odstranění všech přebytků trvá dalších dvanáct až dvacet čtyři hodin (Drašar et al., 1978).

Jelikož se na trubčím shromaždišti páří s matkou hned několik samců, kteří navíc pocházejí ze včelstev žijících porůznu v krajině, má tento způsob reprodukce velký potenciál v šíření virů mezi odlehlými populacemi a na nová území.

3.1.2 Reprodukční soustava matky

Hlavní pohlavní žlázou matky jsou párové vaječníky, vyplňující většinu objemu zadečku matky. Každý vaječník je složen ze sto padesáti až dvou set vaječných rourek (ovariol). Ve vaječných rourkách probíhá vývoj pohlavních buněk od zárodečné buňky až ke zralému vajíčku. To poté putuje do kalichu vejcovodu (*oviductus*). Ten se postupně zužuje a je zakončen krčkem s blankou, kterou protrhne vajíčko při kladení. Poté se vejcovody mírně rozšiřují a pokračují ke společnému vyústění v pochvě. Pochva se rozšiřuje v žihadlovou komoru, kde se nachází poševní chlopeň a spermatéka (Veselý et al., 2003).

Spermatéka dosahuje velikosti mezi 1,5 až 1,8 mm a slouží jako deposit spermií k postupnému oplodňování vajíček. Spermie sem musí aktivně doputovat z vaječnicků, kam je sperma deponováno během páření (Veselý et al., 2003). Spermatéka je obklopena tracheální sítí a matčinou hemolymfou. Toto prostředí je velmi bohaté na glukózu, fruktózu a trehalózu, které dále vyživují uložené spermie. (Connor, 2008).

Ve spermatéce jsou spermie přítomny do konce života matky a ročně oplodní až dvě stě tisíc vajíček (Tautz, 2010), přičemž za jeden den je matka schopná naklást přes dva tisíce vajíček, což je srovnatelné s její tělesnou váhou (Drašar et al., 1978).

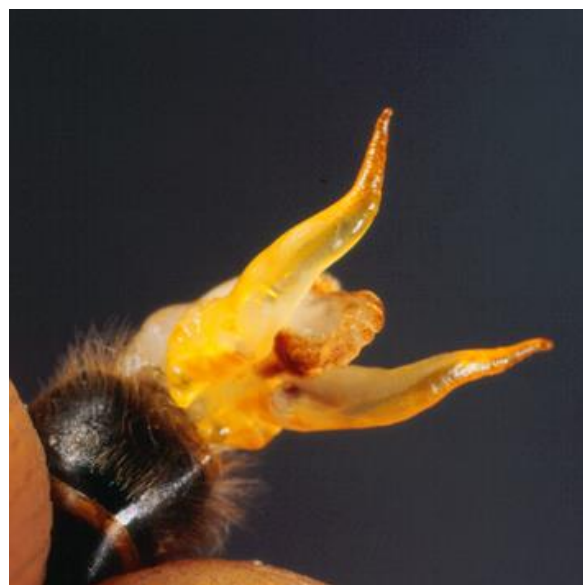
Spermie jsou přechovávány neaktivní a aktivují se jen jednotlivé buňky k procesu oplození vajíčka, při kontaktu s mikropylem vajíčka procházejícím pochvou. Na toto vajíčko jsou spermie vystříknuty díky semenné pumpičce. Jedná se o soustavu šesti svalů: tři ohybače a tři svěrače (Veselý et al., 2003).

3.1.3 Samčí reprodukční soustava

Spermiogeneze je zajišťována varlaty (*testes*). U trubců jsou varlata párovým orgánem o délce 4 až 5 mm a šířce 1,6 až 1,8 mm (Veselý et al., 2003). Největší jsou varlata ve stádiu kukly a během života trubce postupně degenerují (Czekonska et al., 2013). Jejich strukturu tvoří kolem dvou set semenných rourek ústících do chámovodu. Na začátku semenných rourek se vytvářejí zárodečné semenné buňky, které se průchodem rourkou shlukují a vytváří spermatocyty. V těch následně vznikne semeno složené ze spermií a semenné plazmy (Veselý et al., 2003).



Obr. 3: Postupná everze endofalu – foto 1



Obr. 4: Postupná everze endofalu – foto 2



Obr. 5: Postupná everze endofalu – foto 3



Obr. 6: Evertovaný endofalus s ejakulátem

Semeno se začíná vytvářet již během larválního stádia a jeho tvorba je ukončena během stádia kukly. Hned po ukončení vývoje v kukle je semeno transportováno z varlat do chámojemů (*vesicula seminalis*), kde zůstává až do ejakulace (Czekonska et al., 2013).

Vývody chámojemů jsou lokalizovány při bázi hlenových žláz (*gladula mucosa*), které ústí do chámometu (*ductus ejaculatoris*), na který navazuje samotný kopulační orgán (penis, endofalus) (Veselý et al., 2003). Sperma a hlen jsou ejakulovány po sobě, odděleně. Schopnost této fázové ejakulace je tzv. „říjnost“ a trubci jí získávají až mezi desátým a dvanáctým dnem života. Říjnost během stárnutí trubců neklesá, ale naopak se jim zvyšuje pohlavní vzrušivost. Nezralí trubci, kteří se spáří před získáním této schopnosti, nejsou schopni řádné ejakulace a oddělení od matky. Pokud se trubec neoddělí od matky řádně, má to často za následek úhyn matky (Drašar et al., 1978).

Pro trubce je specifické uložení celého penisu uvnitř zadečku a během páření jej musí celý evertovat z pohlavního otvoru tak, že dojde k vychlípění orgánu původně uloženého „na ruby“ uvnitř těla samce. Jak je již výše uvedeno, při everzi penisu samec ztrácí vědomí a poté umírá bez ohledu na to, zda došlo k ejakulaci či nikoli (Veselý et al., 2003).

3.1.3.1 Složení trubčího ejakulátu

Trubec ejakuluje dva druhy tekutiny, jednou je samotné žlutohnědé sperma, které se čistě odebrává pro inseminační účely. Druhou tekutinou je bílý hlen, který se nachází uvnitř ejakulované kapky obklopený spermatem (viz. obr. 6) (Tyl et Titěra, 2013).

Jeden trubec vyprodukuje maximálně $1,5 \text{ mm}^3$ čistého spermatu, v průměru kolem $0,4 \text{ mm}^3$ (Tyl et Titěra, 2013). Počet spermií v ejakulátu může dosahovat až 11 milionů (Tautz, 2010). Spermie jsou nitkovitého tvaru o délce okolo $0,275 \text{ mm}$ a šířce $0,005 \text{ mm}$. Stejně jako savčí spermie, i trubčí je složená z hlavičky, krčku a bičíku. Jádro buňky je uloženo v hlavičce, bičík slouží k pohybu a krček obsahuje dělicí tělísko (centrozom) (Veselý et al., 2003). Vrchol hlavičky obsahuje akrozomální komplex. Na konci je hlavička mírně ohnutá (Jamieson, 1987). Akrozomální komplex je tvořen kónickým akrozomálním váčkem a vnitřně uloženým perforatoriem (Lino-Neto et al., 2000). Akrozomální komplex má nízkou optickou hustotu (Jamieson, 1897). Celková délka akrozomálního komplexu je $5 \mu\text{m}$. Jádro spermie je homogenní, má vysokou elektronovou hustotu a celkově měří $5 \mu\text{m}$. Stejně jako akrozomální komplex, i jádro má kónický tvar. K jeho konci se připojují dva mitochondriální deriváty a axonema bičíku (Lino-Neto et al., 2000).

Bičík je tvořen dvěma mitochondriálními deriváty, axonemou a dvěma pomocnými tělísky. Axonema má pro hmyz typické 9+9+2 uspořádání mikrotubulů. Mitochondriální

tělíska mají rozdílnou velikost a jsou uložena rovnoběžně s axonemou. Větší z mitochondriálních derivátů je členěn na čtyři části, menší na tři. Jejich matrix má amorfni a parakrystalickou strukturu. Pomocná tělíska mají trojúhelníkovitý tvar a leží mezi axonemou a mitochondriálním deriváty (Lino-Neto et al., 2000).



Obr. 7: Mikrofotografie trubčích spermií. Spermie s červenými hlavičkami jsou mrtvé.

Poměr spermií a semenné plasmy bývá mezi 1:1 a 1:2 v závislosti na klimatických podmínkách, pH se pohybuje v rozmezí 6,8 až 7,0 (Stort et Goncalves, 1986). Ejakulát dále obsahuje fruktózu, glukózu a trehalózu. Tyto cukry jsou přítomny v celé samčí reprodukční soustavě (Blum et al., 1962). Pravděpodobně slouží jako energetický zdroj pro spermie. Obzvláště fruktóza je spermii velmi rychle metabolizována – čtyřicet minut po ejakulaci je úroveň fruktózy v ejakulátu zredukována na minimum (Stort et Goncalves, 1986).

Kromě cukrů je v ejakulátu velké množství iontů. Nalezneme zde mj. ionty hořčíku, vápníku, sodíku, železa, mědi a manganu (Blum et al., 1962). Přičemž spermatická buňka obsahuje pouze ionty železa, mědi a hořčíku. Další podstatnou složkou jsou aminokyseliny, jak volné tak vázané. Jsou obsaženy v plasmě i v samotných spermii. Jedná se o tyrosin, metionin, leucin, cystein, izoleucin, tryptofan, lysin, fenylalanin, arginin, kyselinu glutamovou, glycin, alanin, kyselinu asparagovou, serin a treonin (Stort et Goncalves, 1986).

Z enzymů jsou zde hlavně enzymy dehydrogenázové skupiny podílející se na metabolismu α -glycerofosfátu, laktátu, glukosa-6-fosfátu, isocitrátu, glutamátu,

NADH₂ a NADPH₂ (Stort et Goncalves, 1986). Dále ejakulát obsahuje katalázu, glutation S-transferázu a superoxid dismutázu (Weirich et al., 2002). V ejakulátu také byly objeveny volné mastné kyseliny, triglyceridy, fosfolipidy a esteroly (Stort et Goncalves, 1986). Extrahované lipidy jsou převážně přítomny v spermatických buňkách, v semenné plasmě jsou pouze ve stopovém množství (Blum et al., 1967).

Důležitou složkou trubčího ejakulátu jsou i proteiny, ty mají důležitou roli v přežití spermií v reprodukční soustavě matky. Na životaschopnosti spermií ve spermatéce se dále podílí sekret, který vylučuje samotná spermatéka (Boer et al., 2009).

3.1.3.2 Faktory ovlivňující kvalitu trubců a jejich spermatu

Jedením z faktorů ovlivňujících kvalitu spermatu je věk trubce, ve kterém dochází k jeho spáření s matkou či odběru spermatu k inseminaci. Při manuálním odběru spermatu neejakuluje zhruba 40 % dvanácti denních trubců a až 90 % dvaceti denních jedinců (Rhodes et al., 2011).

Objem a koncentrace spermatu jsou ovlivněny sezónním efektem. Jarní trubci produkují výrazně více ejakulátu než letní a podzimní jedinci. Avšak trubci vylíhnutí na podzim vytvářejí více spermií než trubci letní. Letní trubci zároveň produkují větší počet spermií než trubci jarní. Přičemž čím větší objem má ejakulát daného jarního samce, tím obsahuje menší počet spermií (Rhodes et al., 2011). Také trubci chovaní ve vyšších teplotách mají méně životaschopné spermie (Czekonska et al., 2013).

Dalším faktorem ovlivňujícím množství spermií je velikost trubce (Rhodes et al., 2011). Trubci z kolonií s omezeným přístupem k pylu jsou menší a mají menší množství ejakulátu (Czekonska et al., 2015). Vliv mezi velikostí trubce a počtem spermií zkoumal Schluns et al. (2003), který porovnával množství spermií a velikost křídel trubců ze stejných úlů. I jeho výzkum ukazuje, že menší trubci (trubci s kratšími křídly) produkují výrazně menší počet spermií. Avšak také se ukázalo, že počet spermií v poměru k velikosti těla je u malých trubců větší.

Množství a kvalita je také samozřejmě ovlivněna věkem trubce. Starší publikace udávají, že staří trubci mají nižší životaschopnost spermií, avšak bez změny motility. Czekonska et al. (2013) zjistili, že s věkem klesá objem ejakulátu, avšak zvyšuje se životaschopnost spermií a jejich počet, přičemž byli zkoumáni trubci staří v rozmezí mezi patnácti a třiceti dny. Také byly potvrzeny starší výzkumy, které zjistily, že životaschopnost spermií není ovlivněna matkou, od které trubec pochází.

Dalším faktorem ovlivněným věkem trubce je i barva a viskozita. Ejakulát trubců starých dva týdny je nažloutlý a řidší. Trubci ve věku čtyř týdnů mají sperma hnědé a více viskózní. Pro inseminaci i přirozenou plemenitbu jsou ideální trubci staří deset až dvacet jedna dní. Mladší trubci nejsou zralí a starší trubci mají příliš viskózní sperma. Pokud dojde k oplodnění příliš hustým spermatem, matka ukládá méně spermií do spermatéky a má potíže s odstraňováním přebytečného ejakulátu (Czekonska et al., 2013).

Co se týká reprodukční úspěšnosti, ukázalo se, že mezi trubci z velkých úlů je větší procento trubců, kteří se úspěšně spáří a tito trubci mají také větší podíl na výsledném potomstvu (Czekonska et Chuda-Mickiewicz, 2015).

Kvalita spermií je ovlivněna i insekticidy. Neonikotinoidní insekticidy mají subletální účinky na necílové složky ekosystému. Dva používané neonikotinoidy snižují životaschopnost spermií trubců včely medonosné, snižují množství živých spermií v ejakulátu až o třicet devět procent a zkracují život samotných trubců (Straub et al., 2016).

3.2 Parazitózy ovlivňující přenos a působení virů ve včelstvu

Část virových onemocnění včel se výrazněji projeví až po nakažená včelstva parazitickou houbou noseou včelí (dříve též hmyzomorka včelí) *Nosema apis* (Zander, 1909) nebo po invazi roztoče *Varroa destructor* (Ribiere et al., 2008). Nyní se ukázalo, že hmyzomorka *Nosema ceranae* (Fries et al., 1996) na některých místech zcela vytlačila houbu *Nosema apis* a to díky své výrazně vyšší virulenci (Kamler et al., 2015). V Evropě se *Nosema ceranae* vyskytuje minimálně od roku 1998 (Paxton et al., 2007). Taktéž je pravděpodobně přenášena roztočem *Varroa destructor*, u kterého byla prokázána v hemolymfě (Kamler et al., 2015). *Nosema apis*, *Nosema ceranae* a *Varroa destructor* mohou ovlivňovat i chování jedince, na kterém parazitují. U těchto parazitů byl například dokázán vliv na orientaci včely, kterou mají napadení jedinci nižší. Což ovšem může být i interpretováno jako obecný mechanismus včel, kterým snižují zatížení včelstva patogeny (Krajl et Fuchs, 2010).

Ve zvířecí říši se i běžně vyskytuje rozdíl v náchylnosti na patogeny v závislosti na pohlaví. Níže rozepsané viry mají jiné projevy u samic a samců. Samci včely medonosné jsou výrazně náchylnější na infekci houbou *Nosema ceranae* než dělnice. Avšak roli v náchylnosti hraje i velikost jedince (Retsching et al., 2014).

Vztah mezi konkrétním virem a parazity je dále případně rozveden v podkapitole věnující se danému viru.

3.2.1 *Varroa destructor*

Varroa destructor byl původně parazitem včely východní *Apis cerana* (Fabricius, 1793), která dokáže s parazitem udržovat životní rovnováhu a účinně regulovat jeho stavy (Čermák et al., 2016). K nejmasivnějšímu rozšíření v Evropě došlo v osmdesátých letech. V té době bylo možné nalézt v Německu včelstva napadené sedmi až jedenácti tisíci jedinci roztočů. Avšak dnes již tři až čtyři tisíce roztočů vedou ke kolapsu včelstev. Důvodem je snížená životaschopnost včelstva v důsledku masivního rozšíření virů, kterým v některých případech i *Varroa destructor* slouží jako přenašeč (Kamler et al., 2015).

Do úlu je tento parazit přivlečen včelami vracejícími se z rojení, loupežení či zalétnutí do jiného úlu. A to v podobě oplozených samic roztoče na těle včely. Nejvíce jsou napadeni v rámci úlu trubci, takže přenos mezi včelstvy prostřednictvím trubce z jiného úlu, je také velmi významný faktor šíření. Dalším faktorem disperze tohoto roztoče je přemísťování nakažených včelstev a posílání matek z nakažených úlů. Samotné matky jsou napadány nejméně, avšak při odesílání jsou s nimi posílány i doprovodné dělnice (Veselý et al., 2003).

Vývojový cyklus začíná na plodu včel, kam oplozená samice roztoče *Varroa destructor* přichází krátce před zavíčováním buňky. Poté co dojde k zavíčkování, naklade samice roztoče *Varroa destructor* na včelí plod obvykle dvě až pět vajíček (Veselý et al., 2003). Následnými stadii roztoče je protonymfa a deuteronymfa (Čermák et al., 2016). Vývoj pohlavně zralých samečků trvá sedm dní (Veselý et al., 2003) a vyvíjejí se z neoplozených vajíček (Čermák et al., 2016). Samiččin vývoj k pohlavní dospělosti trvá devět dní. Samečci se okamžitě paří a hynou, aniž by opustily buňku. Samičky se po oplodnění přichytávají na dospělé včelu a spolu s ní opouští buňku. Všechna vývojová stadia tohoto roztoče se živí včelí hemolymfou. Ztráta hemolymfy včely oslabuje a zranění způsobená během krmení roztoče jsou velmi snadnou bránou pro přenos virů (Veselý et al., 2003)

Varroa destructor preferuje parazitovat na trubčím plodu, u včely východní se rozmnožuje výhradně na něm. Nebylo doposud zjištěno, že by roztoč *Varroa destructor* napadal jiný blanokřídlý hmyz (Veselý et al., 2003).

3.2.2 *Nosema apis*, *Nosema ceranae*

Onemocnění způsobené hmyzomourkou *Nosema apis* a *Nosema ceranae* se označuje jako nosematóza neboli „Nosema disease“ a má jednu z největších prevalencí mezi chorobami dospělých včel (Chen et al., 2008). Jedná se o jediné dva zástupce třídy hmyzomerek

Microsporidia (Balbiani 1882), u kterých byla dokázána parazitace na včele medonosné (Paxton et al., 2007).

Rod *Nosema* *Nosema* sp. (Nageli, n. d.) se rozmnožuje, jako jiná houbová onemocnění, pomocí spor. Jedinci se nejčastěji nakazí orálně prostřednictvím infikovaných výkalů při jejich uklizení či infikovanou potravou. Spory cestují do střeva jedince, kde jejich sporoplasmy napadnou buňky střevního epitelu, v nich dochází k tvorbě dalších spor. Tvorba nových spor je rychlá a během pár týdnů od začátku infekce můžeme ve střevním epitelu napadeného jedince najít miliony nových spor (Chen et al., 2008).

Infekce způsobuje nakaženým včelám zažívací potíže, kratší život a snižuje velikost populace, produkci a opylovací schopnost dané kolonie. Ovšem tyto symptomy nejsou silně viditelné (Chen et al., 2008), případně onemocnění hmyzomorkou *Nosema apis* může probíhat asymptomaticky (Paxton et al., 2007). Infekce houbou *Nosema ceranae* má poměrně dlouhou asymptomatickou fázi. Tento patogen je dáván do souvislosti s náhlým kolapsem včelstev. Takže zaniknou kolonie, které byly zdánlivě v pořádku. Také se ukázalo, že koloniím nakaženým tímto patogenem hrozí až šestkrát větší riziko depopulace. *Nosema ceranae* lze regulovat antibiotikem fumagilinem (Higes et al., 2008).

Paraziti obecně mohou způsobovat hostitelům energetický stres. Míra tohoto stresu je nižší v případě, že hostitelsko-parazitický komplex již prošel obdobím koevoluce. Vyšší virulence druhu *Nosema ceranae* by mohla být způsobena právě mimo jiné i energetickým stresem, který hostitelskému jedinci způsobuje. Včely infikované patogenem *Nosema ceranae* mají větší pocit hladu. Konkrétně je energetický stres způsoben metabolickými změnami, které u infikované včely houba *Nosema* sp. způsobuje. Nakažené včely mají nižší hladinu proteinů, což vede ke snížení aktivity hltanové žlázy a změně složení mastných kyselin v hemolymfě. Dále také *Nosema* sp. pravděpodobně dokáže využívat sacharidy v epitelu střeva, přičemž sacharidy jsou pro metabolismus včel zásadní zdroj energie. Nejvyšší spotřeba sacharidů je při letu, přičemž létavky jsou mezi dělnicemi nejvíce touto chorobou zatížené. Pokud mají infikované a neinfikované včely v laboratorních podmínkách neustálý přístup k potravě, jejich míra přežití je stejná, avšak v přirozených podmínkách mají infikovaní jedinci přežitelnost nižší. Což naznačuje, že snížená míra přežití infikovaných včel je způsobena právě energetickým stresem. Dále mají nakažené včely tendence ke krmení i za riskantních podmínek (Mayack et Naug, 2009), méně se v úlu dělí o potravu s jinými dělnicemi a častěji o jídlo žebrají (Naug et Gibbs, 2009).

3.3 Virová onemocnění včelstev

U včel je popsáno okolo dvaceti virových onemocnění (Dostert et al., 2008). Mezi v současnosti nejvýznamnější virové infekce včelstev patří virus deformovaných křídel „deformed wings virus“ (dále DWV), virus pytlíčkovitého plodu „sacbrood virus“ (dále SBV), virus černání matečnic „black queen cell virus“ (dále BQCV), virus akutní paralýzy včel „acute bee paralysis virus“ (dále ABPV) a chronická paralýza včel „chronic bee paralysis virus“ (dále CBPV) (Ribiere et al., 2008). Mezi další známé včelí virové patogeny patří mj. kašmírský virus včel „kashmir bee virus“ (dále KBV), izraelský virus akutní paralýzy „israeli acute paralysis virus“ (dále IAPV), „*Varroa destructor* Macula-like virus“ (dále VdMLV) a vláknitý virus včely medonosné „*Apis mellifera* filamentou virus“ (dále AmFV).

Virové infekce spolu s působením parazitického roztoče *Varroa destructor* nebo houbou *Nosema apis* mohou významně přispět ke kolapsu včelstva. Kamler et al. (2015) zkoumal souvislost mezi koinfekcemi těchto virů (spolu s nimi byl ještě zkoumán vir izraelské akutní paralýzy IAPV) a kolapsem včelstev. Ukázalo se, že v uhynulých koloniích byly přítomny vždy minimálně dva druhy virů a že virové koinfekce (případně tzv. superinfekce) jsou jedním z hlavních rizik, které mohou vést ke kolapsu.

Základní dělení přenosu virů je horizontální a vertikální. Horizontální nastává mezi jedinci stejné generace, zatímco vertikální z rodičů na potomstvo, přičemž u včel jsou známy oba dva druhy přenosu. První pokusy potvrzující vertikální přenos virů u včely medonosné pochází z roku 2006. Ukázaly tuto možnost přenosu u BQCV a DWV (Chen, Y. P. et al., 2006).

Některé z virů samozřejmě mohou napadat i jiné druhy. Je známo, že zhruba šedesát procent ze všech patogenů má více hostitelských druhů. Například BQCV a DWV může napadat čmeláka zemního *Bombus terrestris* (Linnaeus, 1758), čmeláka polního *Bombus pascuorum* (Scopoli, 1763), a *Bombus huntii* (Greene, 1860) (Zhang et al., 2012). Čmelák zemní se může orálně nakazit IAPV a KBV od infikované včely (Meeus et al., 2014). U některých čmeláků je rovněž známé ABPV (Ribiere et al., 2008). Druhy mimo rod včel *Apis* sp. (Linnaeus, 1758) může infikovat i SBV (Zhang et al., 2012).

3.3.1 ABPV a CBPV

Původcem těchto dvou onemocnění je celá skupina virů, v některých včelstvech jsou viry přítomny bez propuknutí onemocnění (Veselý et al., 2003). Bylo zjištěno, že CBPV

je způsoben jednovláknovým RNA virem (Gisder et Genersch, 2015). ABPV bylo objeveno během pokusů o identifikaci infekčních agens CBPV (Ribiere et al., 2008).

ABPV patří do stejné skupiny jako IAPV a KBV. Jedná se o velmi blízké viry z čeledi *Dicistroviridae* (de Miranda et al., 2010). Viry této čeledi jsou jednovláknové RNA viry s délkou genomu 8500 až 10200 nukleotidů (Mullapudi et al., 2017). Sdílejí některé charakteristiky, jako způsoby přenosu, životní fázi hlavního hostitele či některé ze symptomů. Dále jsou tyto viry poměrně vysoce variabilní, což značně znesnadňuje jejich diagnostiku a výzkum. Do této skupiny patří spousta virů způsobujících paralýzu, jako např. virus způsobující paralýzu cvrčků či virus způsobující letální paralýzu mšic (de Miranda et al., 2010).

Pokud se včela nakazí ABPV nebo CBPV, dostaví se během několika dní typický třes a paralýza (Ribiere et al., 2008). Obecně mezi další projevy patří zrychlená dechová frekvence. Dochází k částečnému vyvrácení křídel, zvětšení zadečku, infikovaní jedinci kálí v úle, může dojít i ke ztrátě ochlupení a ztmavnutí zbarvení těla (Veselý et al., 2003). CBPV se dle symptomů dá dělit na dva typy. U prvního typu dochází k abnormálnímu chvění těla i křídel, nafouknutí břicha, nemocné dělnice se shlukují u česna a lezou po zemi. Druhý typ je spojen se ztrátou chlupů na břicho, což vede k lesklému tmavému vzhledu dělnice. S postupem rozvíjení symptomů druhého typu CBPV postupně dělnice ztrácí schopnost letu a umírá (Amiri et al., 2014).

Včely infikované ABPV umírají dříve než jedinci vystavení CBPV. Příznaky ABPV se objevují dva až čtyři dny po nakažení a jeden až dva dny poté postižení jedinci umírají (Ribiere et al., 2008). CBPV na rozdíl od ABPV nemůže napadat i čmeláky (Veselý et al., 2003).

U matky je průběh CBPV podobný jako u dělnic. Avšak je rozdíl v tom, zda je v kontaktu s nemocnými nebo se zdravými dělnicemi. Pokud je nucena ke kontaktu s dělnicemi projevujícími symptomy nemoci, projevy se u ní dostaví dříve a replikace viru v matčině organismu je rychlejší, než když se o ní starají dělnice zdravé. Pokud se o matku starají symptomatické dělnice, symptomy se u matky objeví průměrně po šesti dnech. Avšak při péči zdravými dělnicemi se symptomy objevují většinou až o tři dny později. Ale běžně je v úlu matka nucena ke kontaktu se symptomatickými jedinci pouze v extrémních případech. Díky specifické behaviorální strategii včel je nemocným dělnicím za normálních okolností zamezen k matce přístup či dokonce někdy samy opouštějí úl (Amiri et al., 2014).

CBPV napadá všechny kasty a vývojová stádia včel. Avšak výrazně vyšší koncentrace jsou u dělnic střežících česno. Matky jsou obecně méně náchylné k CBPV (Amiri

et al., 2014). V přírodě probíhá přenos výměšky slinných žláz (Ribiere et al., 2008). Jedinci s projevy nemoci jsou okusovány zdravými dělnicemi, které se takto nakazí. Dále dochází k hromadění virů v medovém včáku, ovšem není zatím prokázáno, jestli dochází k přenosu zásobami (Veselý et al., 2003). CBPV se ve vysokých koncentracích hromadí v mozku, a to hlavně ve vyšších nervových oblastech jako je optické centrum, senzorycké neuropile či centrální komplex (Amiri et al., 2014). Některé virové sekvence byly nalezeny i ve spermatu, takže možná dochází i k vertikálnímu přenosu (Ribiere et al., 2008). CBPV se lépe množí v jedinci, který byl infikován perorálně než v jedinci infikovaném přes pokožku (Amiri et al., 2014). ABPV byl zjištěn ve spermatu trubců (de Miranda et al., 2010).

Před světovým rozšířením *Varroa destructor* nebyly ABPV a CBPV detekovány v mrtvých dospělých nebo plodu, dokonce ani nebyly celkově spojovány s mortalitou. V Británii byla známá neustále přetrvávající slabá latentní nákaza ABPV. U zdánlivě zdravých včel se objevovala i slabá nákaza CBPV (Ribiere et al., 2008).



Obr. 8: Dospělci nakažená CBPV – typ se symptomem vypadávání chlupů

Po příchodu *Varroa destructor* do Evropy začaly být v mrtvých dospělých a nemocném plodu krátce před kolapsem včelstva detekovány sérologickými testy vysoké

hladiny ABPV. Nejvíce případů těžce nakažených kolonií se vyskytuje v létě. Ve vzorcích z Nizozemí a Německa byla silná korelace mezi mírou napadení *Varroa destructor* a koncentrací ABPV (Ribiere et al., 2008). *Varroa destructor* funguje jako dobrý přenašeč pro ABPV, úspěšnost nakažení kukel a dospělých včel je touto cestou padesát až osmdesát procent (v závislosti na citlivosti použité diagnostické metody) (de Miranda et al., 2010). Avšak pravděpodobně na parazitovi nedochází k replikaci viru. Viry se mohou do roztoče dostat spolu s hemolymfou nakažených včel. Z trávicího traktu se poté dostanou regurgitací obsahu střev během krmení – podobně jako u některých rostlinných virů přenášných brouky *Coleoptera* (Linnaeus, 1758) (Ribiere et al., 2008).

Zatímco ABPV je úzce propojen s roztočem *Varroa destructor*, u CBPV toto spojení zatím nebylo prokázáno a virus v parazitovi nebyl nalezen (Tantillo et al., 2015). Výskyt ABPV vykazuje jistou míru cykličnosti v průběhu roku (Ribiere et al., 2008) Ukázal se vztah mezi podzimní nákazou ABPV a zimním kolapsem včelstva (Genersch, 2010). U výskytu CBPV nebyly sezónní výkyvy zjištěny (Tantillo et al., 2015).

Na průběh onemocnění u CBPV a ABPV má vliv i teplota. Ukázalo se, že ABPV při nižších teplotách zabíjí včely rychleji. Zatímco u CBPV je opačný trend a CBPV rychleji způsobuje úhyn při působení za vyšších teplot. Konkrétně bylo zkoumáno rozmezí 30 až 35 °C (Bailey et Ball, 2013).

3.3.2 KBV

Tento vir byl objeven v roce 1974 (de Miranda et al., 2010). Jedná se o vir velmi podobný ABPV (Ribiere et al., 2008).

V laboratorních podmínkách je pro dospělé včely injekčně vpravený KBV rychle smrtelný. Mezi obvyklé projevy tohoto viru nepatří paralýza, která je typická pro ABPV. KBV je jedním z nejvirulentnějších virů napadajícím včely. K nakažení jedince je nutné malé množství viru a následně se ve včele rychle množí. Ke smrti jedince dochází během tří dnů. KBV se nikdy nepojí s jasnými klinickými symptomy (Ribiere et al., 2008).

K přenosu může dojít orálně. KBV byl zjištěn v mateří kašičce, pylu, potravě pro plod a medu a může napadat všechna vývojová stádia včel (Chen, Y. et al., 2006). Také může dojít k nakažení pozřením infikovaného trusu nebo kanibalizací nakaženého plodu (de Miranda et al., 2010).

KBV vykazuje podobně jako ABPV cykličnost ve výskytu a v některých obdobích roku je jeho titr vyšší (de Miranda et al., 2010). Na rozvoj infekce má možná vliv i *Varroa destructor*. Je pravděpodobné, že iniciaci množení KBV napomáhají cizí proteiny,

kteře se dostanou včele do hemolymfy, když se na ní krmí *Varroa destructor*. Případně může *Varroa destructor* rozvoji KBV napomáhat imunosupresivními mechanismy – podobně jako je tomu u DWV (viz. níže). Dále se *Varroa destructor* ukázal jako možný významný přenašeč KBV. Byl potvrzen výskyt viru ve slinách tohoto roztoče. Během pokusu, ve kterém byly zdravé kukly vystaveny infikovaným jedincům *Varroa destructor*, se nakazilo sedmdesát procent kukel. A dále byla korelace mezi počtem roztočů v buňce a množstvím RNA tohoto viru v kukle (Ribiere et al., 2008).

3.3.3 IAPV

IAPV je poměrně nově objevený virus, prvně byl popsán v roce 2004 v Izraeli. Infikované včely měly třes křídel, postupně se u nich rozvíjela paralýza a následně zemřely mimo úl (Palacios et al., 2008). Mezi symptomy IAPV, stejně tak jako u ABPV, obecně patří rychle postupující paralýza letálně nakažených jedinců, ztráta schopnosti letu, třes. Dalšími projevy jsou postupná ztráta chlupů a tmavnutí hrudníku a břicha. Až osmdesát procent včel nakažených orálně zemře do týdne od nakažení (de Miranda et al., 2010).

IAPV, ABPV i KBV se běžně vyskytují jako skrytá infekce bez zjevných příznaků. Přičemž jsou tyto patogeny značně virulentní při přímém injekčním vpravení do kukly nebo dospělce a k infekci, která způsobí do několika dní smrt takto infikovaného jedince, stačí dávka méně než sta částic viru. Stejný účinek má orální nakažení včely dávkou nad tisíc jedenáct částic (de Miranda et al., 2010).

IAPV, ABPV a KBV se prakticky nevyskytují u larev a mají rychlé množení, což jsou charakteristiky naznačující, že mohou hrát velkou roli v kolapsu včelstev. Tyto vlastnosti totiž zajistí rychlou ztrátu velkého podílu dospělých jedinců v jinak zdánlivě zdravém včelstvu (de Miranda et al., 2010).

Díky tomu, že IAPV byl objeven poměrně nedávno, není zatím známo mnoho informací o způsobu jeho přenosu. Je možné, že byl dříve při studiích často klasifikován jako kmen KBV (de Miranda et al., 2010).

3.3.4 BQCV

Toto virové onemocnění způsobuje ztráty královských larev, kdy jsou v tmavých buňkách nacházeny mrtvé larvy (Ribiere et al., 2008). Larvy mají podobně pytlíčkovitý vzhled jako je tomu u SBV (viz níže). Infikované larvy rychle tmavnou a případně zhnědnou či zčernají i stěny buňky (Sammataro et Yoder, 2012).

Na rozdíl od některých jiných nemocí včelstev (např. SBV) se BQCV nedokáže množit na dospělci. Adultní jedinci se nakazí pouze za přítomnosti infekce houbou *Nosema apis*, se kterou je spojen i AmFV a tzv. „bee virus Y“ (Ribiere et al., 2008). Nakažení dospělci tímto virem je tedy závislé na ročním cyklu výskytu *Nosema apis*, který má vrchol během jara a počátkem léta (Tantillo et al., 2015).

Nákaza dělnic a trubců probíhá zpravidla asymptomaticky. První případ poškození a úhynu trubčího plodu díky BQCV byl zaznamenán v roce 2001 v Německu (Siede et Buchler, 2003). Během laboratorních testů pitev královen se ukázala možnost existence vertikálního přenosu. Virus byl nalezen ve střevě a vaječnicích královen, avšak nikoli v hemolymfě, spermatéce, hlavě nebo schránce (Ribiere et al., 2008). Také je známý přenos potravou (Tantillo et al., 2015).

BQCV může infikovat i *Varroa destructor*. Ten se ale zatím neukázal jako významný vektor tohoto onemocnění (Sammataro et Yoder, 2012).



Obr. 9: Zčernalá larva uvnitř matečnicku

3.3.5 DWV

Pojmenování tohoto viru vychází z hlavního symptomu onemocnění – jedinci v infikovaném včelstvu se rodí s deformovanými či špatně vyvinutými křídly (Dostert et al., 2008). Takto deformovaní vylíhnutí jedinci nejsou životaschopní a do šedesáti sedmi hodin umírají (Genersch, 2010). Původně byl tento projev přisuzován vlivu krmicích se parazitů *Varroa destructor*. Deformace křídel se totiž začala objevovat pouze

u úlů zasažených tímto roztočem, avšak posléze se ukázalo, že i v buňkách bez parazita se vyvíjí takto postižení jedinci (Dostert et al., 2008).

DWV může infikovat všechna vývojová stadia, od vajíčka po dospělé, avšak v kuklách se více replikuje (Tantillo et al., 2015). Infekce se neprojeví u všech nakažených včel. Pokud se nakazí adultní včela, již se jí křídla nedeformují. K projevu deformování křídel musí dojít k nakažení během vývoje v buňce (Ribiere et al., 2008). Ovšem onemocnění probíhající symptomaticky i asymptomaticky vždy způsobuje nižší životaschopnost jedince (Tantillo et al., 2015). Stejně tak jako se může virem nakazit každé vývojové stadium, je DWV infekční i pro všechny kasty - s tím rozdílem, že trubci mají vyšší rezistenci než ostatní skupiny (Chen, Y. et al., 2006).



Obr. 10: Dospělí jedinci s deformovanými křídly v důsledku DWV

Obecně DWV patří mezi virové nákazy s malou patogenitou, které dosáhnou projevů až po výrazně stresové situaci, jakou v tomto případě může být invaze včelstva roztočem *Varroa destructor* (Tantillo et al., 2015). Tento roztoč má výraznou roli v rozšíření DWV, jelikož funguje jako jeho přenašeč a virus se v něm i dokáže replikovat. Také má výrazné vlivy na projevy viru. Bez přítomnosti roztoče *Varroa destructor* probíhá DWV skrytě, tzn. bez klinických příznaků a takováto infekce není považována za tolik závažnou. V přítomnosti parazita *Varroa destructor* je nákaza DWV virulentnější a virus má vyšší koncentraci. Kromě celkového oslabení přispívá *Varroa destructor* k nákaze viry

i tím, že inhibičně působí na imunitní systém napadeného jedince (Anguiano-Baez et al., 2016). Sám DWV je také schopný způsobit u včel imunosupresi. DWV a *Varroa destructor* jsou ve vzájemné mutualistické symbióze, který zahrnuje smyčku snižování imunity napadené včely (Di Prisco et al., 2016).

Co se týká interakce mezi DWV a *Nosema ceranae*, byla prokázána negativní korelace mezi výskytem těchto dvou patogenů. Ukázalo se, že jedinec většinou není napaden oběma zároveň (Kamler et al., 2015).

U dospělých včel dochází k hromadění viru v epitelárních buňkách středního a zadního střeva, nahromaděný vir je dále uvolňován do lumenu. Také se akumuluje v žlázových částech mozku a reprodukčních orgánech (de Miranda et Freis, 2008). Virus se tedy vyskytuje ve stolici dospělých včel, žlázových sekretech dělnic, spermatu zdánlivě zdravých trubců a ve vajíčkách. Což poukazuje na možnost vertikálního i horizontálního přenosu (Tantillo et al., 2015).

3.3.6 SBV

SBV je další z onemocnění napadajících vyvíjející se plod. Způsobuje úhyn a charakteristický pytlíčkovitý vzhled mrtvého plod. Na nákazu jsou nejnáchylnější dva dny staré larvy. Za normálních podmínek se plod kuklí čtvrtý den po uzavření buňky, avšak larvám nakaženým SBV se zakuklení nepodaří. Tekutina, která za normálních okolností vzniká po zakuklení, se tak hromadí mezi tělem plodu a jeho schránkou. Takto hromadící se tekutina vytváří typický vak. Proces je doprovázen změnou zbarvení z perleťového do světle žlutého, až nakonec larva od hlavové části postupně hnědne (Ribiere et al., 2008). Dále má napadená buňka propadlé či proděravěné víčko (Čermák et al., 2016). Po několika dnech plod zemře a začne vysychat (Ribiere et al., 2008).

Toto onemocnění druhotně ovlivňuje celé včelstvo. Dělnice méně udržují čistotu úlu, ztrácí zájem o výstavbu, střežení česna a vyletování (Čermák et al., 2016). Obecně u dělnic SBV přetrvává jako latentní infekce a zkracuje délku jejich života (Kamler et al., 2015).

Mrtvé larvy jsou dělnicemi odstraňovány den až dva po úmrtí, kdy je virus stále infekční. Dělnice se od larev pravděpodobně nakazí pozřením částí nakažené larvy, zejména pozřením tekutiny ve vaku. Mezi dospělci se virus šíří prostřednictvím potravinových zásob (Tantillo et al., 2015). Larvy se nakazí přes trávicí trakt pozřením mateří kašičky od nakažených dělnic, je možný i transovariální přenos od nakažené matky (Čermák et al., 2016). SBV byl zjištěn i v medu a pylu (Chen, Y. et al., 2006).

Násobení viru probíhá na dospělých, a to bez viditelných příznaků a pravděpodobně snižuje jejich životaschopnost. Násobení viru je nejintenzivnější v hlavové části přenašeče. Vir se vyskytuje i v hltanových žlázách dělnic (Ribiere et al., 2008), které produkují mateří kašičku (Veselý et al., 2003). V laboratorních podmínkách lze dosáhnout infekce trubců, jejich náchylnost se zvyšuje s teplotou a věkem. U trubců probíhá infekce bez viditelných projevů (Ribiere et al., 2008). Vektorem infekce může být i *Varroa destructor*. Virus byl detekován hlavně v hlavové části a trávicím traktu zkoumaných parazitů (Tantillo et al., 2015).



Obr. 11: Larva napadená SBV po vyjmutí z buňky

3.3.7 AmFV

Většina známých virů napadajících včelstva jsou RNA viry. Mezi včelími viry je pouze jeden DNA vir a to AmFV. Jedná se o dlouhý dvouvláknový DNA virus. Jeho genom je stočený a uzavřen v nukleokapsidu s rozměry 3000 na 40 nm (Hartmann et al., 2015).

Během průběhu nákazy pravděpodobně dochází k lýze tkání jedince např. v tukovém tělísku. To má za následek typický příznak, kterým je mléčné zabarvení hemolymfy (Hartmann et al., 2015). Nakažení jedinci se shlukují u vchodu do úlu a vypadají zesláble (Gauthier et al., 2015). Avšak symptomy spojené s akutní formou AmFV nejsou příliš časté a v minulosti byly málokdy spojovány se ztrátami včel (Hartmann et al., 2015). Obecně byl

tento vir považován za slabě patogenní vir s nízkým dopadem na hostitele (Gauthier et al., 2015).

Jeho interakce s parazity a prevalence nejsou zatím příliš prozkoumány. Avšak je pravděpodobné, že se u něj vyskytuje jak horizontální tak vertikální přenos. Dále má poměrně široké hostitelské spektrum, protože kromě včely medonosné byl objeven i u soliterních druhů včel. Není jasné, do jaké míry může být tento virus patogenní a to zejména v případě koinfekcí. Je možné, že symptomatická infekce propukne pouze v případě napadení včelstva zatím neznámými faktory, které jsou ve vztahu s AmFV. Je možné, že synergický vliv na AmFV mohou mít hmyzomorky či trypanozomy *Trypanosoma* (Gruby, 1843) a jejich spolupůsobení s tímto virem vyvolá jeho symptomatický průběh a oslabení včelstva. Objevil se i názor, že AmFV by mohl být spojen s BQCV (Hartmann et al., 2015).

Během výzkumu provedeným Hartmannem et al. (2015) se ukázalo, že infekce je velmi rozšířená mezi dělnicemi a až sedmdesát pět procent včel se nakazí do týdne po vzejití z kukly. Konkrétně bylo sledováno množství viru ve střevě včel. První týden je důležitý kvůli kolonizaci střeva různými symbionty. Po tomto prvním týdnu je množství DNA viru v hostiteli konstantní, což poukazuje na latentní chronickou infekci. Dále se ukázala významná korelace mezi RNA viry a AmFV. Konkrétně se jednalo o kladnou korelaci s DWV, SBV a BQCV.

Výskyt AmFV nemá výrazné sezónní tendence. Avšak na jaře se zdá být virová zátěž včelstva vyšší. AmFV byl také nalezen v přezimujících jedincích, ale nemělo to zjevný dopad na úspěšnost jejich přezimování (Hartmann et al., 2015).

3.3.8 Diagnostika

3.3.8.1 Odběr a uchování vzorků

Jak již bylo výše zmíněno, odebírá se pouze čisté sperma bez příměsi hlenu. Hlen při přirozené plemenitbě zůstává v žihadlové dutině matky a na penisu trubce, do vejcovodů se tedy dostane pouze čisté sperma (Drašar et al., 1978).

V praxi je k odběru spermatu trubců nejvíce využívána manuální metoda. Při ní se nejprve stlačí hrudník trubce, nebo je jemně mnut mezi prsty. V důsledku tlaku dojde ke kontrakci břišních svalů, které způsobí následné částečné natažení kopulačního orgánu (Czekonska et Chuda-Mickiewicz, 2015). Dojde k everzi nahnědlých růžků endofalu. Poté se trubec opět trochu stlačí a dojde k druhé fázi, při níž se endofalus již plně evertuje

a následně ejakuluje. Jak již bylo výše zmíněno, odebírá se pouze čisté sperma bez příměsí bílého hlenu. (Tyl et Titěra, 2013).

Druhou používanou metodou je vystavení trubce působení chloroformu. Díky chloroformu dojde u trubce k částečné everzi endofalu, k plnému vysunutí dojde po postupném stlačování boků břicha, stejně tak jako je tomu u manuální metody (Czekonska et Chuda-Mickiewicz, 2015).

Objevují se problémy s nedostatečnou everzí kopulačního orgánu či nedojde k ejakulaci. To je často zapříčiněno nezralostí trubce, dalším faktorem můžou být vývojové anomálie anebo vliv virových nákaz či roztoče *Varroa destructor*. Případně může dojít k lidské chybě během odběru (Czekonska et Chuda-Mickiewicz, 2015).

Viry se mohou diagnostikovat i ze somatických buněk. K takovému stanovění je ideální vzorek z minimálně deseti jedinců. Ti se usmrtí zmrazením v lednici a až do odeslání do laboratoře se zde uchovávají. K balení odesílaného vzorku je vhodné použít papírový sáček, krabičku či obálku (Prodělalová, 2016).

Pro následnou diagnostiku je velmi důležité i správné uchovávání vzorku. Během níže popsaného PCR se zjišťuje přítomnost virové RNA. Ta je velmi náchylná na vlivy okolního prostředí a snadno podléhá rozkladu. Dlouhodobé skladování somatické tkáně k následné analýze vyžaduje teploty od -80 do -60 °C, případně použití specifické chemické směsi. Od včelaře je možné získat čerstvý vzorek odeslaný krátce po odběru poštou. Správně balený vzorek tak lze i po tří denní cestě poštou (a to i během letních a jarních měsíců) použít pro diagnostiku (Prodělalová, 2016).

Dále je nutné během celého procesu odběru i vyhodnocování dbát na co největší možnou sterilitu, aby vzorek nebyl infikován patogeny z okolí a výsledky byly relevantní.

3.3.8.2 Rozbor vzorků

Diagnostika virových onemocnění je u včel velmi problematická. Mnoho jich totiž, jak je již výše zmíněno, probíhá u některých vývojových stádií bez výrazných klinických projevů jako skrytá infekce. Prvotní diagnostika samozřejmě vychází ze symptomů objevujících se ve včelstvu (Kukielka et al., 2007). Avšak v případě latentních infekcí a koinfekcí nelze na tuto formu diagnostiky spoléhat a je nutný laboratorní rozbor vzorků.

Klasické diagnostické metody byly dříve založeny na sérologických rozbořech a elektronové mikroskopii. Sérologie je často nejednoznačná, jelikož se u jedince může objevit koinfekce více virových nákaz a dokázané protilátky nejsou dostatečně specifické

pro určení konkrétních onemocnění. Dnes se čím dál tím více rozmáhá využívání různých forem PCR (Kukielka et al., 2007).

Před zavedením citlivých molekulárních metod se používaly hlavně biologické testy. Tato metoda je založená na schopnosti viru rychle se množit poté co ho injekčně vpravíme do dospělé včely nebo kukly. Většina včelích virů se takto rychle v novém hostiteli namnoží do koncentrace, kterou lze prokázat sérologickými testy. Viry se poté rozlišovali na příklad dle koncentrace nutné k usmrcení kukly nebo koncentrace nutné k začátku viditelných změn ve vývoji oka kukly, což poté může sloužit k včasné indikaci infekce úlu. Tímto způsobem bylo zjištěno několik velmi důležitých virů, včetně ABPV, CBPV či KBV a může být dále užitečná v objevování nových virů bez evidentních klinických příznaků. Nezastupitelné místo má samozřejmě i klasická mikroskopie. Její přínos je ovšem spíše v popisu nových virů než v jejich rutinní detekci (de Miranda, 2008).

Nejvíce se v současnosti využívají molekulární metody. Tedy metody založené na prokázání přítomnosti nukleových kyselin virů (Prodělalová, 2016). Ty často využívají molekulární sondy, které jsou specifické pro daný virus. Interakce mezi virem a sondou je dále zvýrazněna pomocí tagů, markerů a barviv. Detekce je u některých zviditelnění možná pouhým okem, případně se využívají automatizované přístroje. Mezi nejcitlivější a nej přesnější markery a tagy patří radioaktivní izotopy běžných prvků (vodík, kyslík, dusík, síra, fosfor). Běžně jsou používány izotopy P32, P33 a S35. Stále více jsou ale radioaktivní prvky nahrazovány jinými stejně citlivými neradioaktivními markery (de Miranda, 2008).

Dalšími použitelnými markery jsou kupříkladu enzymy zpracovávající kalorimetrické nebo luminiscentní substráty. Nejčastěji jde o alkalické fosfatázy nebo křenovou peroxidázu. Jsou chemicky dostatečně silné na to, aby byly aktivní i po chemických úpravách potřebných k jejich připojení k sondě. Enzymatické markery zesilují signály a zvyšují citlivost reakce mezi virem a sondou. Navázáním některých enzymů na sondu lze dosáhnout i signalizace pomocí chemiluminiscence. Pro tyto účely se používají například peroxidáza, fosfatáza a luciferázy (de Miranda, 2008).

Existuje i spousta barviv použitelných pro barvení nukleových kyselin. Tradičně se používají ethidiumbromid, propidium jodid, aktinomycin-D a akridinové barviva, nověji cyaninová barviva. Většina z nich po navázání na nukleovou kyselinu začne fluoreskovat (de Miranda, 2008). Mnohé studie zaměřené na viry včely medonosné používají barvivo „SYBR[®] Green“ (de Miranda et al., 2010; Amiri et al., 2014; Blanchard et al., 2014; Hartmann et al., 2015; Di Prisco et al., 2016).

3.3.8.2.1 PCR

Nejčastěji se v současnosti k diagnostice virových onemocnění u včel používá PCR (neboli polymerázová řetězová reakce, z anglického „Polymerase Chain Reaction“) (Frydrychová, 2014). PCR lze považovat za základní molekulárně-genetickou metodu. Jejím účelem je vytvoření dostatečného množství určité DNA k následným analýzám. Případně lze některými modifikovanými formami PCR sledovat polymorfismus zkoumaného vzorku (Knoll et Vykoukalová, 2002).

Základním principem této metody je mnohonásobná rychlá amplifikace vybraného úseku DNA. Využívá procesu buněčné replikace DNA, kdy DNA polymeráza syntetizuje komplementární vlákno k jednořetězcové molekule DNA. Začátkem replikace je krátký oligonukleotid (primer) komplementárně navázaný na jednořetězcový (templátový) úsek DNA. Výsledkem je tedy dvouřetězcová molekula DNA. Ta se následně během PCR denaturací separuje na dvě jednořetězcová vlákna, kterým opět DNA polymeráza syntetizuje komplementární vlákno. Druhým hlavním principem PCR je cyklické opakování (Frydrychová, 2014). Během každého cyklu se počet molekul zdvojnásobí a získáme tak 2^n kopií původního templátu, kde n značí počet provedených cyklů (Knoll et Vykoukalová, 2002).

Denaturace dvouvláknové DNA probíhá při teplotě mezi 94 a 98 °C. Toto zahřívání trvá dvacet až třicet minut a má za následek porušení vodíkových můstků, které drží dvouvláknovou strukturu molekuly. V další fázi na jednovláknové molekuly DNA nasednou primery. Pro toto spojení je nutné snížit teplotu na 50 až 60 °C. DNA polymeráza přisedne na takto vzniklý dvouvláknový úsek složený z DNA a primeru. Syntéza komplementárního DNA vlákna probíhá po zvýšení teploty na 72 až 80 °C, což je teplota optimální pro nejběžněji užívanou Taq polymerázu. Syntéza probíhá od 5' konce k 3' konci (Frydrychová, 2014).

PCR má několik modifikací: touchdown PCR, nested PCR, hot-started PCR, realtime PCR, inverzní PCR, alelově-specifické PCR a mnoho dalších (Frydrychová, 2014).

Při RT-PCR se využívá přepisu RNA na tzv. cDNA (Knoll et Vykoukalová, 2002). RT-PCR je využíváno k rozlišení ABPV a KBV. Tyto dva viry jsou si sérologicky, biologicky a geneticky podobné. Lze je rozlišit na základě VP4 proteinu během RT-PCR (Ribiere et al., 2008). VP4 je malý protein připojený k vnitřní straně kapsidy (Mullapudi et al., 2017). Tato metoda byla použita např. Kamlerem et al. (2015) k detekci ABPV, DWW, SBV, KBV, BCQV a CBPV či Blanchardem et al. (2014) k detekci KBV. Dále RT-PCR použil Bakonyi et al. (2002) k detekci ABPV v jedincích včely medonosné a parazita *Varroa destructor*.

Ke zjišťování CBPV je používáno real-time PCR. To umožňuje detekovat virus ve všech vývojových stádiích a kastách včel (Amiri et al., 2014). Tato metoda byla užita i k detekci KBV (Ward et al., 2007). Pro diagnostiku virů je vhodné i kvantitativní real-time PCR (de Miranda, 2008). Real-time PCR je založeno na sledování PCR v reálném čase díky hodnocení intenzity fluorescenčních signálů (Knoll et Vykoukalová, 2002).

Pro detekci DWV a BCQV se může použít i kombinace dvou předchozích metod, tzv. real-time RT-PCR (real-time PCR s použitím reverzní transkriptázy), kterou již úspěšně pro detekci virů včely medonosné použilo několik studií (Kukielka et al., 2007).

Na PCR dále navazují různé metody sekvenování a vyhodnocení. V námi prováděném výzkumu byla použita agarózová elektroforéza. Elektroforéza slouží k separaci nukleových kyselin a je založena na dělení látek v elektrickém poli mezi katodou a anodou. Do jamek ve vaničce se ztuhlým agarózovým gelem je vpraven vzorek z PCR. DNA segmenty díky svému elektrickému náboji migrují v gelu k anodě (Knoll et Vykoukalová, 2002).

3.4 Vertikálně přenosné choroby jiných bezobratlých

Pravděpodobnost vertikálního přenosu se ukázala i u onemocnění některých jiných bezobratlých. U krevet se objevuje velmi agresivní virus tzv. „infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus“ (dále IHHNV). První nález tohoto viru pochází z Havaje, jednalo se o nakaženou krevetku druhu *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson, 1871). Kromě tohoto druhu napadá IHHNV i *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), u kterých způsobuje vývojové a růstové abnormality. Nakažené populace mají o 10 až 50 % nižší ekonomický výnos než populace zdravé (Motte et al., 2003).

Laboratorně byl zjištěn přenos nakaženou vodou, pozřením infikovaného materiálu a injekčně. Na farmách je možný přenos pozřením uhynulých jedinců. Na možnost vertikálního přenosu poukazuje nález viru v oocytech a vaječnicích. Vertikální přenos byl potvrzen u *L. vannamei*. Bylo též zjištěno, že k replikaci viru dochází v naupliovém stádiu a vajíčka kladená silně nakaženými matkami se nevyvinou a nedojde k vykulení (Motte et al., 2003).

U krevet se též vyskytuje tzv. „white spot syndrome virus“ (dále WSSV). Šíří se horizontálně i vertikálně. Jedná se o vysoce letální virus, jehož působení je závislé na stresu. Infikuje velký počet druhů vodních korýšů (jako jsou krevety a mořští kraby) s různou mírou výsledné mortality. Přenašeči mohou být nejen samotní infikovaní korýši, ale i jiní vodní členovci, mořští ptáci a další. Nákaza se objevuje i u sladkovodních druhů, např. u raka signálního *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) a krevetky Rosenbergovy

Macrobrachium rosenbergii (De Man, 1879). Vertikálně se mohou nakazit i vajíčka žabronožek *Artemia* (Leach, 1819), ale ty se nákazy zbaví během vykulení (Sanchez-Martinez et al., 2007).

Hlavním příznakem onemocnění jsou bílé skvrny na těle jedince. Jedná se o usazeniny vápníku. (Ovšem tento příznak doprovází i bakteriální syndrom bílých skvrn anebo může být způsoben vysokou alkalitou vody.) Úmrtnost bývá 90 až 100 % a smrt nastává tři až deset dní od objevení příznaků. Většinou jsou nakaženými juvenilní jedinci (Sanchez-Martinez et al., 2007).

Mezi blanokřídlými *Hymenoptera* (Linnaeus, 1758) se objevují vertikálně přenosné virové infekce např. i u *Microplitis croceipes* (Cresson, 1872) z čeledi lumčíkovitých *Braconidae*. Je napadán virem „nonoccluded baculovirus“ (McNOBV). V hostiteli se McNOBV šíří převážně hemolymfou. Infikované buňky trávicího traktu se uvolňují do lumenu střev a stykem s výkaly se tak mohou infikovat další jedinci (Chittihunsa et Sikorowski, 1996).

U hmyzu je problematika přenosu virů hojně zkoumána zejména u druhů, které fungují jako vektory pro choroby kulturních plodin. Konkrétně například skupina polokřídlých *Hemiptera* (Linnaeus, 1758), mezi které patří mšice *Aphidoidea* (Geoffroy, 1762), křískovití *Cicadellidae* (Latreille, 1802) či třásnokřídlí *Thysanoptera* (Haliday, 1836). Viry se do rostliny dostávají zejména v průběhu vektorova krmení (Hogenhout et al., 2008).

Molice jsou hostiteli mnohých virů z rodu *Begomovirus*. Ovšem výsledky prací ohledně přenosu a množení virů se různí. Není jisté, zda dochází k množení viru v dospělých a jestli dochází k transovariálnímu přenosu či jakým způsobem vir snižuje fitness nakažených jedinců. Např. virus způsobující zkroucení a žloutnutí listů rajčat tzv. „tomato yellow leaf curl virus“ (dále TYLCV) snižuje fitness jedince a s velkou pravděpodobností se ve svém vektoru množí. Zatímco virus skvrnitosti rajčat tzv. „tomato mottle virus“ (dále ToMoV) se ve vektoru nemnoží ani nesnižuje jeho fitness (Hogenhout et al., 2008). DNA TYLCV bylo za použití PCR a Shouhern blotingu nalezeno v embryích a vajíčkách molice, což ukazuje na transovariální přenos (Ghanim et al., 1998). Dále se ukázalo, že se virus může přenášet i sexuálně (Hogenhout et al., 2008). Potomstvo, u kterého byl zjištěn obsah DNA TYLCV v embryonální fázi, úspěšně nakazilo v dospělosti tímto virem cílové rostliny (Ghanim et al., 1998).

Z rostlinných virů byl transovariální přenos dále dokázán u mnohých zástupců čeledi Bunyavirů *Bunyaviridae*, kteří využívají jako vektor členovce. Křísci, mšice a svítilky *Fulgoromorpha* (Kirkaldy, 1907) přenášejí rabdoviry *Rhabdoviridae*. Tyto viry způsobují

svému vektoru chronická onemocnění a i u některých z nich byl prokázán transovariální přenos. Křísci dále přenáší např. virus napadající kukuřice tzv. „maize stripe virus“ (dále MStV) patřící do rodu *Tenuivirus*. V rámci tohoto rodu se transovariální přenos potvrdil u celé řady patogenů. Konkrétně pro MStV platí, že nymfy jsou pro něj účinnějším vektorem než dospělci a účinnost přenosu se snižuje se stoupajícím věkem vektoru. Transovariálně se MStV nakazí dvacet až sto procent potomstva. Skupinou rostlinných virů, u které byl hojně popsán vertikální přenos u hmyzích vektorů, je i čeleď reovirů *Reoviridae*, mezi které patří např. vir způsobující virovou sterilní zakrslost ovsa či patogen virové zakrslosti rýže (Hogenhout et al., 2008).

Dalším významným rostlinným patogenem přenášeným hmyzem je bakterie z rodu fytoplasma způsobující tzv. „white leaf“ u cukrové řepy. Jejím rezervoárem je křísek *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura, n. d.). Za použití PCR a následného sekvenování byla bakterie nalezena ve vajíčkách, dospělcích a nymfách první i druhé zkoumané generace tohoto kříška, což jasně poukazuje na možnost vertikálního přenosu (Hanboonsong et al., 2002).

3.5 Přirozená obrana před patogeny

Biologie včel dává šíření virů hned několik vhodných podmínek. K horizontálnímu přenosu přispívá způsob života, při kterém jsou včely v neustálém kontaktu s jinými jedinci úlu. Vertikálnímu, jak již bylo výše zmíněno, polyandrický způsob rozmnožování. Avšak u včel samozřejmě můžeme najít i mnoho mechanismů, které bojují proti nákazám či slouží jako prevence.

3.5.1 Imunita

První obranou včely jako jedince je kutikula potažená tenkou vrstvou vosku, která slouží jako mechanická bariéra pro průstup patogenů do organismu (Tautz, 2010). Jako mechanická bariéra se u hmyzu může počítat i stěna tracheí, epitel střeva a peritrofická membrána (Glinski et al., 1999). Patogen ovšem může tyto mechanické bariéry překonat (např. prostřednictvím poranění vzniklého při krmení parazita *Varroa destructor*).

Pokud patogen do organismu pronikne, zapojuje se imunitní systém složený z molekulárního systému a imunitních buněk v hemolymfě (Tautz, 2010). Obecně se imunitní systém dělí na buněčnou a humorální složku.

Buňky – hemocyty – buněčné imunity zajišťují reakce jako je fagocytóza, nodulace, enkapsulace (Negri et al., 2016) (tzn. obalení melaninem a dalšími chemickými látkami,

čímž je patogen izolován od okolního prostředí) (Petr, 2016) a uzavírání ran. Hemocyty tedy mají schopnost rozpoznat a zareagovat na cizí částice. Fagocytóze podléhají drobné částice, u větších dochází k nodulaci či enkapsulaci. Nodulace je využívána pro eliminaci velkého množství bakterií v hemolymfě. Enkapsulace je aplikována zejména při boji s mnohobuněčnými parazity (Negri et al., 2016).

Do humorální složky řadíme rozpustné efektorové molekuly, jako například antimikrobiální peptidy, proteiny komplementu a enzymové kaskády, které regulují kupříkladu tvorbu a srážení melaninu (Negri et al., 2016).

Látky humorální imunity jsou vylučovány hemocyty a v tukovém tělísku (Daníhlík et al., 2013). Např. u čmeláků, mezi ně patří lysozym, defensin, fenoloxidázový systém a antimikrobiální peptidy (dále AMP), jako je apidaecin, abaecin a hymenoptaecin. AMP se v hemolymfě objevují zhruba dvě hodiny po proniknutí patogenu do těla čmeláka a vrcholu jejich hladina dosáhne během dvaceti čtyř hodin (Glinski et al., 1999). U včel jsou tyto AMP také přítomny, dále u včel nalezneme syntázu oxidu dusného, lysozym, melitin či proteiny obsahující thioestery (Dostert et al., 2008). Melitin je hlavní součást včelího jedu (Dostert et al., 2008), ve včelím jedu nalezneme i apamin. Některé z látek humorální imunity jsou v hemolymfě přítomny neustále (lektiny), jiné jsou tvořeny v závislosti na pohlavní fázi a věku (fenoloxidáza), případně jsou to látky vylučované na základě odezvy na mikrobiální infekci či septické zranění (AMP, thioestery obsahující protein) (Daníhlík et al., 2013). Mnoho látek s antibakteriálním účinkem samozřejmě nalezneme i v mateří kašičce a to konkrétně royalisin či skupina tzv. „jelleines“ (Fratini et al., 2016). Royalisin patří do skupiny defensinů. Tzv. „jelleines“ jsou sekretovány výhradně do mateří kašičky (Dostert et al., 2008).

V posledních letech se věnovala velká pozornost objasnění role a funkce antimikrobiálních peptidů. Jedná se o klíčové komponenty humorální imunity mnoha organismů. Působí na bakterie, houbové patogeny a protozou. Ve včelí hemolymfě jich bylo zjištěno sedm. Jedná se o apidaeciny, abaecin, hymenoptaecin a defensiny. Některé se navzájem funkčně doplňují. Některé AMP jsou specifické např. na gramnegativní bakterie apod. Jedním z mechanismů působení AMP je interakce s intracelulárními proteiny a nukleovými kyselinami. U bakterií inhibují translaci a skladbu proteinů. Krátké peptidy bohaté na prolin jsou schopny přechodu přes membránu a vazby na bakteriální DNA. Eukaryotické buňky jsou zpravidla vůči AMP rezistentní. AMP totiž selektivně působí na prokaryotu kvůli nižšímu membránovému potenciálu, který je důsledkem nižšího obsahu cholesterolu a aniontových lipidů v membráně. Některé AMP reagují i na virová onemocnění,

např. transkripce abaecinu ve střevním epitelu koreluje s hladinou DWV (Daníhlík et al., 2013).

Fenoloxidázové kaskády jsou aktivovány lipopolysacharidy a peptidoglykany z membrán bakteriálních buněk nebo -1,3-glukany z hub. Produkty z fenoloxidázových reakcí jsou vysoce reaktivní a toxické chinony, které se dále polymerizují na melanin. Fenoloxidáza se podílí na stimulaci fagocytózy a enkapsulaci. Optimální teplota pro její aktivitu je 20 °C, přičemž teplota uvnitř úlu se pohybuje kolem 34,5 °C. Tudiž tento enzym nepatří mezi zásadní faktory imunity včel. Kromě teploty jeho aktivitu ovlivňuje i věk jedince. V prvních dvou dnech vývoje plodu není fenoloxidáza vůbec detekována, poté se během vývoje jedince aktivita fenoloxidázy postupně navyšuje. U starých včel je menší počet hematocytů a zároveň větší aktiva fenoloxidázy (Daníhlík et al., 2013).

Bezobratlí nemají specifickou imunitní složku, tzn. nemají receptory tvořené lymfocyty, které specificky reagují s určitým antigenem. Skutečná specifická imunita je vytvořena až u obratlovců. Avšak i přes to u hmyzu do jisté míry dochází ke specifickým imunitním reakcím, i když ne tak masivně jako u obratlovců. Na pokusech s octomilkou *Drosophila* (Fallén, 1823) se mimo jiné ukázalo, že imunitní systém tohoto hmyzu pravděpodobně dokáže rozpoznat, zda je napaden virem, bakterií či plísní (Dostert et al., 2008).

3.5.2 Hygiena hnízda

U eusociálního hmyzu se předpokládá existence tzv. sociální imunity (Daníhlík et al., 2013) (hygienické chování, čistící pud) (Veselý et al., 2003). Jedná se např. o vzájemné očišťování mezi dělnicemi, péče o čistotu matky, vyklízení zbytků z komůrek pláství před naklazením nových vajíček či odstraňování mrtvých jedinců (Tautz, 2010). Šíření nákazy kolonií se zabráňuje také odklizením evidentně napadených larev (Daníhlík et al., 2013).

Taktéž se dělnice agresivně zbavují nemocných jedinců. Přesný mechanismus jejich rozpoznávání není detailně známý, avšak pravděpodobně se zahrnuje změny chování a vylučování pozměněných chemických látek nemocnými jedinci. Nemocní jedinci jsou eliminováni i tím, že některé patogeny narušují jejich orientační smysl a již nejsou schopni se po výletu vrátit zpět do úlu (Tautz, 2010).

Významnou složkou hygieny hnízda je i propolis (Tautz, 2010) (neboli včelí tmel, dluž či smoluňka) (Veselý et al., 2003), který slouží jako desinfekce – má antibakteriální a antimykotické účinky (Tautz, 2010). Jeho složení je proměnlivé a podíl jednotlivých složek kolísavý. Velmi výrazné antibakteriální a antimykotické účinky mají konkrétně těkavé látky,

flavonoidy a některé deriváty organických kyselin, které se uvolňují při zahřívání stěn úlu pokrytých propolisem. Bakteriostatické účinky má např. na salmonely *Salmonella* (Salmon, 1884), stafylokoky *Staphylococcus* (Rosenbach, 1884) a bacil senný *Bacillus subtilis* (Ehrenberg, 1835) (Veselý et al., 2003).

Propolis je tvořen z pryskyřice, kterou včely sbírají na poupatech (Tautz, 2010). Konkrétně se surovina pro tvorbu propolisu sbírá na topolu *Populus* (Linnaeus, 1753), bříze *Betula* (Linnaeus, 1753), olši *Alnus* (Miller, 1768), jehličnanech *Pinopsida* (Burnett, 1835), jilmu *Ulmus* (Linnaeus, 1753) a jírovci maďalovi *Aesculus hippocastanum* (Linnaeus, 1753). Dále je pryskyřice upravována slinnými žlázami dělnice (Veselý et al., 2003) a zabudována do pláství (Tautz, 2010). Kromě vyztužení pláství a zatmelení trhlin dělnice propolisem také pokrývají usmrčené vetřelce, které nejsou schopny z úlu odstranit (Veselý et al., 2003).

Důležitý je i boj s parazity, kteří mohou přenášet řadu patogenů. V úlech se občas objevují štírci *Pseudoscorpionida* (Haeckel, 1866), kteří jsou pro včely prospěšní tím, že se živí roztoči *Acari* (Nitzsch, 1818) a housenkami zavíječovitých *Pyralidae* (Latreille, 1802) (Veselý et al., 2003).

3.6 Souhrn literární části

Rozmnožování včel je velmi komplexní problematika, které se již věnovala řada výzkumů. Kvalitu trubců a jejich spermatu ovlivňuje celá škála faktorů, od věku a výživy trubce až po insekticidy v prostředí.

Díky polyandrickému způsobu reprodukce se viry vyskytující ve spermatu mohou snadno šířit. Avšak ukázalo se, že kolonie s matkou, která byla oplodněna polyandricky, mají lepší produkci. Taktéž zatím byla přítomnost virů ve spermatu zjištěna pouze u několika patogenů (DWV, ABPV). Účinek patogenů na včelstvo je často dáván do spojitosti s vlivem roztoče *Varroa destructor*, případně houby *Nosema apis* či *Nosema ceranae*.

K diagnostice virů u včel můžeme použít širokou škálu metod. Dříve byly metody založené na sérologických rozborech a mikroskopickém pozorování, případně byly používány biologické testy. V současnosti se k diagnostice virů u včel nejčastěji používá různě modifikované PCR.

4 Materiál a metody

4.1 Odběr a původ vzorků

Bylo celkem odebráno osmnáct vzorků, sedm vzorků pocházelo z Výzkumného ústavu včelařského Dol, s.r.o. (dále stanoviště 1), dva od trubců chovatele Horsta Preissla z Tribuswinkelu v Rakousku (dále stanoviště 2), tři od Stefana Luffa z Arbegu v Německu (dále stanoviště 3), tři od trubců patřících chovateli Enikö Szalai z Kecskemetu v Maďarsku (dále stanoviště 4), jeden vzorek byl odebrán ve výzkumné stanici VUVČ Dol v Liběchově (dále stanoviště 5), jeden u Hanse Beera v Haidecku v Německu (dále stanoviště 6) a jeden u Marcela Klotze v Längenfeldu v Rakousku (dále stanoviště 7). Odběry provedl Ing. Dalibor Titěra, CSc. a to v rozmezí mezi 24. 5. 2016 až 18. 7. 2016.

Vzorky byly uchovávány ve skelných kapilárách při pokojové teplotě. Každá kapilára byla uzavřena pryžovou zátkou (viz. obr. 12). Kontaminaci spermatu bylo předcházeno hygienou odběru, která zahrnovala použití jednorázových kapilár a oplachování jehly etanolem mezi odběry.

Následně byly vzorky osobně předány na analýzu RNDr. Janě Prodělalové, Ph.D. z Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v. v. i., Hudcova 70, Brno.



Obr. 12: Uzavřená kapilára s odebraným spermatem

4.2 Rozbor vzorků

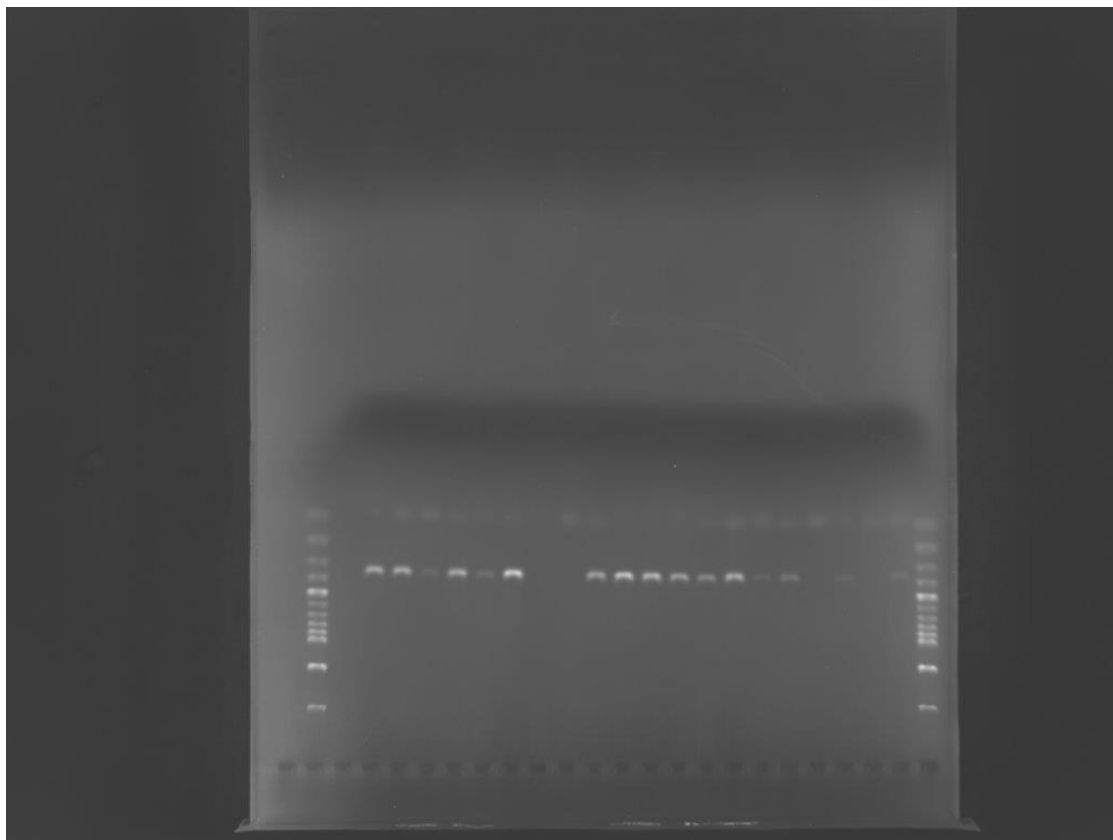
Laboratorní rozbor vzorků provedla RNDr. Jana Prodělalová, Ph.D. Byly zkoumány DNA i RNA viry. Konkrétně CBPV, ABPV, DWV, KBV, BQCV, IAPV, VdMLV, AmFV, SBV, LSV (tzv. „Lake Sinai virus“) a BSRV (tzv. „Big Sioux River virus“).

Nejprve byly k vzorkům přidány rozbíjecí částice Garnet Bead Tukes 0,70 mm, které slouží k narušení buněk a tzv. „rozbití vzorku“. Následně byly zkumavky vloženy do jednoduchého homogenizátoru (vortexu). Následovala pipetace a přidání směsi ze soupravy Chemagical Viral DNA/RNA Kit. Ten obsahuje magnetické částice, na které se navážou nukleové kyseliny ze vzorku. Slouží tedy k jeho izolaci. Po přidání kitu byly vzorky uskladněny v -80°C, aby nedošlo před dalším zpracováním k degradaci nukleových kyselin.

Pro detekci RNA virů bylo nutné RNA ve vzorku za pomoci reverzní transkriptázy převést na cDNA. Konkrétně byl použit produkt ProtoScript® II Reverse Transcriptase. Avšak reverzní transkriptázy mají obecně malou účinnost a proto značně snižují citlivost testu. Následovalo PCR s použitím mixu nespecifických primerů, které jsou ideální pro detekci více virů najednou. Byla použita reakční směs Aptamer Hot Start Master Mix (výrobce Top-Bio, Praha).

K diagnostice některých virů bylo použito více různých primerů, aby se poté z výsledků dalo určit, který je pro diagnostiku nejvhodnější. Více primerů bylo použito například pro DWV, jednalo se o primery amplifikující různé cílové části genomu tohoto viru. Konkrétně byl použit DWV1 20F/578R (v tabulce výsledků označen jako DWV1) amplifikující část genomu nekódující žádný protein, u které málokdy dochází k zásadním mutacím. Dále DWV 4 2345F/2779R (v tabulce s výsledky jako DWV 4) amplifikující část genu kódující proteiny virionu a jako třetí primer byl použit DWV10 8934F/9599R (v tabulce výsledků jako DWV10), který amplifikuje část genu pro RNA polymerázu. Více primerů bylo použito i pro diagnostiku CBPV a AmFV. Pro určení BQCV a ABPV byly použity taktéž dva druhy primerů. U každého z těchto dvou virů byl použit primer, který ve starších studiích byl užit při multiplexové PCR (v tabulkách výsledků jako mplex BQCV a mplex ABPV). Konkrétně šlo o primery použité ve výzkumu provedeném Grabensteinerem et al. (2007).

Po PCR byla provedena gelová agarózová elektroforéza. K obarvení vzorků byla použita barva svítící pod UV zářením.



Obr. 13: Ukázka UV snímku vzorku po provedení agarózové elektroforézy

Poté byly odebrány vzorky gelu se zkoumanými fragmenty nukleových kyselin a odeslány do sekvenční firmy Eurofins. Byla použita vzorkovací souprava od této firmy typu Mix2Seq Kit.

4.3 Analýza dat

Pořadí bází z výsledků, které zaslala firma Eurofins, byly dále vyhodnoceny za pomoci NCBI databáze, která přiřadila k sekvencím bází daný název viru.

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

Apis mellifera filamentous virus isolate CH-CO5, partial genome

Sequence ID: [KR819915.1](#) Length: 496396 Number of Matches: 1

Range 1: 443423 to 443966 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
987 bits(534)	0.0	541/544(99%)	1/544(0%)	Plus/Plus
Query 4	ATGCATCTTGGCCTTCTTTGCACCGAGCGACGGTATCGTCGGTGAGAATCTGGTGACGCG			63
Sbjct 443423	ATGCATCTTGGCCTTCTTTGCACCGAGCGACGGTATCGTCGGTGAGAATCTGGTGACGCG			443482
Query 64	TTTCTACGAAATGGTAGTGTACACCGAGGCCCGCTACTTCTACGCGTTCCAAGCCGCAAT			123
Sbjct 443483	TTTCTACGAAATGGTAGTGTACACCGAGGCCCGCTACTTCTACGCGTTCCAAGCCGCAAT			443542
Query 124	GGAGAACATTACGCCGAGGTTCTACAGTCAAGTCAAGACTAATTCGGAACGAAGA			183
Sbjct 443543	GGAGAACATTACGCCGAGGTTCTACAGTCAAGTCAAGACTAATTCGGAACGAAGA			443602
Query 184	CGAACAGCGGTCATCTTCTCATCGTTCATGACCACGCCAGGCATCACCGAAAAGACTCG			243
Sbjct 443603	CGAACAGCGGTCATCTTCTCATCGTTCATGACCACGCCAGGCATCACTGAAAAGACTCG			443662
Query 244	CTGGGCAAAACAGTGGCTCGAACGAGAAAATCTCAGCTTCGTGAGCGATTAGTCGCTTT			303
Sbjct 443663	CTGGGCAAAACAGTGGCTCGAACGAGAAAATCTCAGCTTCGTGAGCGACTAGTCGCTTT			443722
Query 304	TGCTGTGGTTCGAAGGACTGTTGTTTAGCGGCAGCTTT-GCCTCCATCTTCTGGTTGAAA			362
Sbjct 443723	TGCTGTGGTTCGAAGGACTGTTGTTTAGCGGCAGCTTTAGCCTCCATCTTCTGGTTGAAA			443782
Query 363	AGCGTGGACTTATGCACGGTCTGACCTTTAGTAACGAACTGATCAGTCGGGACGAGGGTT			422
Sbjct 443783	AGCGTGGACTTATGCACGGTCTGACCTTTAGTAACGAACTGATCAGTCGGGACGAGGGTT			443842
Query 423	TGCATTGCGACTTCGCCTGTCTTCTACACCAAACACATCGTGACAAGCTGCCCAACA			482
Sbjct 443843	TGCATTGCGACTTCGCCTGTCTTCTACACCAAACACATCGTGACAAGCTGCCCAACA			443902
Query 483	ATGTGATCTACAACATCGTACGTGAAGCCGTACATGCTGAGTCCATATTTGGTCATG			542
Sbjct 443903	ATGTGATCTACAACATCGTACGTGAAGCCGTACATGCTGAGTCCATATTTGGTCATG			443962
Query 543	CACT 546			
Sbjct 443963	CACT 443966			

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

Uncultured virus clone BRL.10.2008 ribonucleotide reductase small subunit gene, partial cds

Sequence ID: [GU980896.1](#) Length: 546 Number of Matches: 1

Range 1: 14 to 546 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
952 bits(515)	0.0	527/533(99%)	0/533(0%)	Plus/Plus
Query 4	ATGCATCTTGGCCTTCTTTGCACCGAGCGACGGTATCGTCGGTGAGAATCTGGTGACGCG			63
Sbjct 14	ATGCATCTTGGCCTTCTTTGCACCAAGCGACGGTATCGTCGGTGAGAATCTGGTGACGCG			73

Obr. 14: Ukázka vyhodnocení sekvence databázi NCBI

BLAST » blastn suite » RID-BZNTP/HT016 Home Recent Results Saved Strategies Help

BLAST Results

Edit and Resubmit Save Search Strategies Formatting options Download YouTube How to read this page Blast report description

Job title: FR13563457.ab1

RID: BZNTP/HT016 (Expires on 03-09 17:04 pm)

Query ID: IdlQuery_107019
 Description: FR13563457.ab1
 Molecule type: nucleic acid
 Query Length: 550

Database Name: nt
 Description: Nucleotide collection (nt)
 Program: BLASTN 2.6.1+ » Citation

Other reports: Search Summary [Taxonomy reports] [Distance tree of results] [MSA viewer]

Graphic Summary

Distribution of the top 4 Blast Hits on 4 subject sequences

Mouse over to see the title, click to show alignments

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select All None Selected 0

Alignments Download GeneBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Asix mellifera filamentous virus isolate CH-CO5, partial genome	987	987	96%	0.0	99%	KR819915.1
Uncultured virus clone BR_10_2008 ribonucleotide reductase small subunit gene, partial cds	952	952	96%	0.0	99%	GU692896.1
PREDICTED: Diachasma alleium ribonucleotide-diphosphate reductase subunit M2 B (LOC107042826), transcript variant X2, mRNA	73.1	73.1	19%	7e-09	79%	XM_015284924.1
PREDICTED: Diachasma alleium ribonucleotide-diphosphate reductase subunit M2 B (LOC107042826), transcript variant X1, mRNA	73.1	73.1	19%	7e-09	79%	XM_015284923.1

Obr. 15: Pokračování ukázky vyhodnocení databází NCBI

5 Výsledky

Byl potvrzen výskyt DWV, ABPV, BQCV, AmFV. Ani v jednom ze zkoumaných vzorků nebyl nalezen KBV, SBV, VdMLV, LSV a BSRV.

DWV byl celkem diagnostikován v třinácti vzorcích (tzn. 72,22 %) a to na pěti ze sedmi sledovaných stanovištích. Byl rozdíl v úspěšnosti jednotlivých primerů (viz. tab. 1 a graf 1). ABPV se podařilo detekovat pouze primerem v tabulce označeným jako mplex ABPV a to pouze na stanovišti 4, které vyšlo na tento virus kompletně pozitivní. Z celkového počtu vzorků šlo o 22,22 %. BQCV bylo určeno pozitivní pouze ve dvou vzorcích (11,11 % vzorků), a to na stanovišti 1 a 5 (viz. tab. 2). AmFV byl diagnostikován ve čtrnácti vzorcích (77,78 % vzorků). U diagnostiky AmFV nebyl rozdíl v použitých primerech.

Stanoviště 2 a 7 vyšla kompletně negativní na všechny zkoumané viry. Největší počet pozitivních virů na stanoviště byly tři viry. Tento počet mělo stanoviště 1, 4 a 5. U stanoviště 1 se jednalo o DWV, BQCV a AmFV, přičemž u šesti z jeho sedmi vzorků bylo určeno DWV, v případě jednoho vzorku pouze jedním primerem, v případě pěti všemi třemi primery (viz. tab. 1). Na stanovišti 4 byli nalezeny DWV, ABPV a AmFV. Přičemž DWV bylo pozitivně diagnostikovanou pouze primerem DWV 1. Na stanovišti 5 byly prokázány DWV, BQCV a AmFV. Konkrétní výsledky pro všechny stanoviště viz. tab. 1, 2 a 3. Pro lepší zobrazení rozdílů ve výsledcích je přiloženo několik grafů.

Stanoviště	DWV 1	DWV 4	DWV 10	ABPV 1	mplex ABPV
1	Poz	Poz	Sl. Poz	Neg	Neg
1	Poz	Poz	Poz	Neg	Neg
1	Poz	Poz	Poz	Neg	Neg
1	Poz	Poz	Poz	Neg	Neg
1	Poz	Poz	Poz	Neg	Neg
1	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
1	Neg	Sl. Poz	Neg	Neg	Neg
2	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
2	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
3	Poz	Poz	Neg	Neg	Neg
3	Poz	Poz	Neg	Neg	Neg
3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
4	Poz	Neg	Neg	Poz	Poz
4	Poz	Neg	Neg	Poz	Poz
4	Poz	Neg	Neg	Poz	Poz
5	Poz	Poz	Neg	Neg	Neg
6	Poz	Neg	Neg	Neg	Neg
7	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

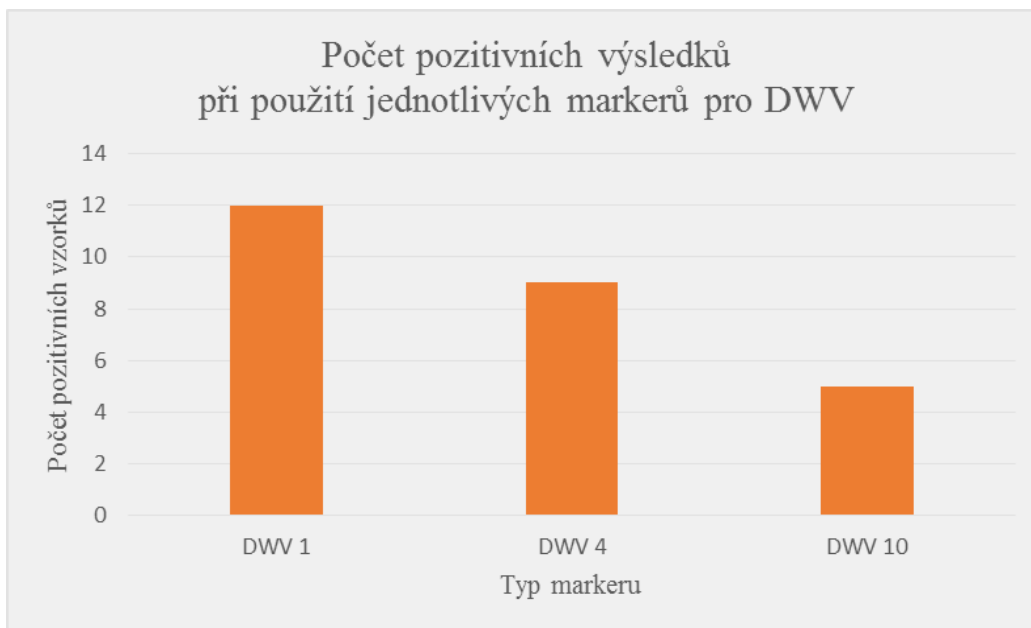
Tab. 1: Výsledky diagnostiky virů na jednotlivých stanovištích – část 1

Stanoviště	KBV	IAPV	mplex BCQV	BCQV	CBPV 1	CBPV 2
1	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
1	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
1	Neg	Neg	Poz	Sl. poz	Neg	Neg
1	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
1	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
1	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
1	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
2	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
2	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
5	Neg	Neg	Poz	Neg	Neg	Neg
6	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
7	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

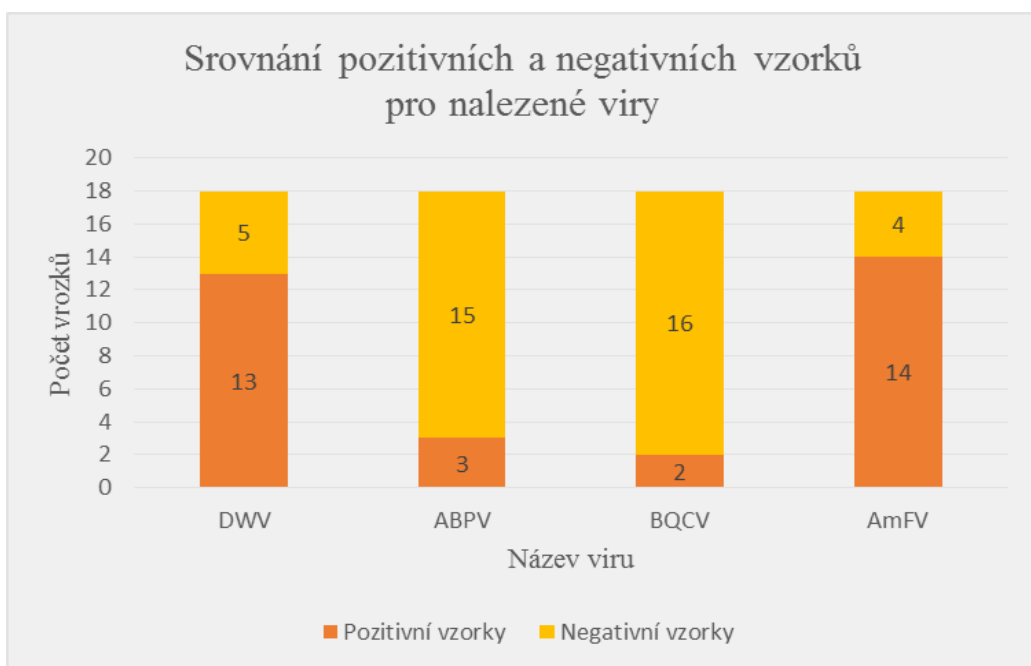
Tab. 2: Výsledky diagnostiky virů na jednotlivých stanovištích – část 2

Stanoviště	AmFV 1	AmFV 2	SBV	VdMLV	LSV	BSRV
1	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
1	Poz	Poz	Neg	Neg	Neg	Neg
1	Poz	Poz	Neg	Neg	Neg	Neg
1	Poz	Poz	Neg	Neg	Neg	Neg
1	Poz	Poz	Neg	Neg	Neg	Neg
1	Poz	Poz	Neg	Neg	Neg	Neg
1	Poz	Poz	Neg	Neg	Neg	Neg
2	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
2	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
3	Poz	Poz	Neg	Neg	Neg	Neg
3	Poz	Poz	Neg	Neg	Neg	Neg
3	Poz	Poz	Neg	Neg	Neg	Neg
4	Poz	Poz	Neg	Neg	Neg	Neg
4	Poz	Poz	Neg	Neg	Neg	Neg
4	Poz	Poz	Neg	Neg	Neg	Neg
5	Poz	Poz	Neg	Neg	Neg	Neg
6	Poz	Poz	Neg	Neg	Neg	Neg
7	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

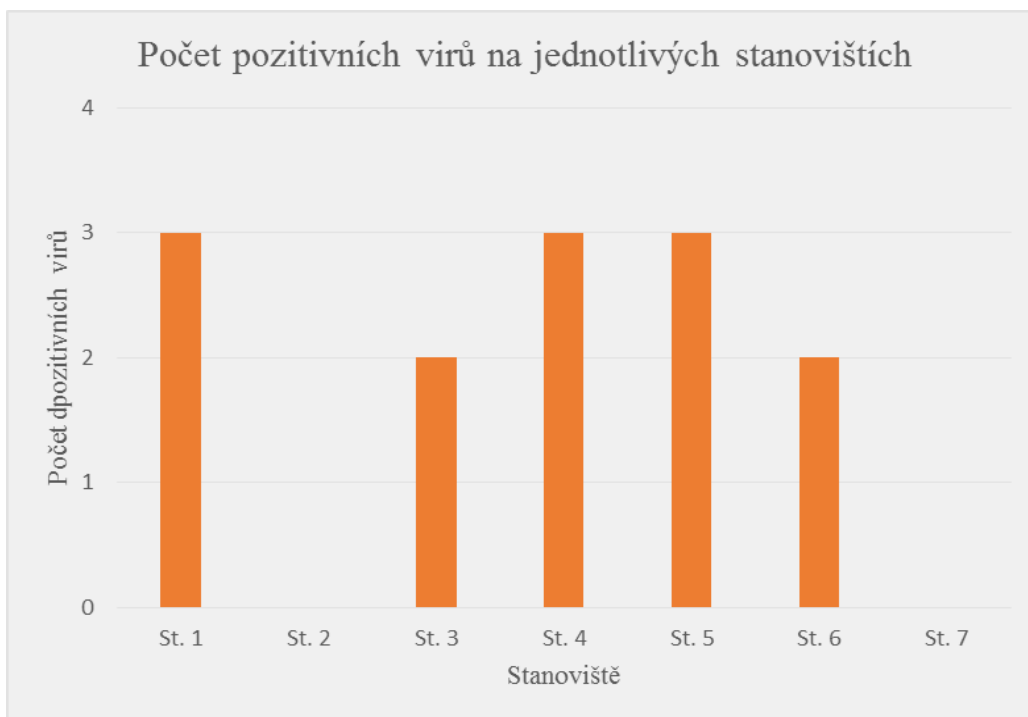
Tab. 3: Výsledky diagnostiky virů na jednotlivých stanovištích – část 3



Graf 1.



Graf 2.



Graf 3.

5.1 Statistické zhodnocení

Jak je již výše uvedeno, v našich odběrech trubčího spermatu jsme porovnávali výskyt virů ve vzorcích ze sedmi stanovišť. Dvě stanoviště byla bez nálezu a na ostatních pěti byl nález dvou nebo tří druhů virů.

I když se zdá na první pohled, že rozdíl mezi negativními a pozitivními stanovišti je zásadní a laicky řečeno významný, podrobili jsme výsledky χ^2 – testu dobré shody (Kába, 1973).

Nulovou hypotézou bylo, že není statisticky významný rozdíl mezi daty ze zkoumaných stanovišť. Alternativní hypotéza tedy říkala, že existuje statisticky prokazatelný rozdíl mezi alespoň dvěma zkoumanými stanovišti.

V testu jsme jako skutečné hodnoty porovnali s očekávanými. Vzhledem k prozatím malému počtu zhodnocených stanovišť nemáme dostatečně dobrý odhad na výskyt virů v základním souboru. Jako první model jsme použili průměrný výskyt virů v celém souboru jako hodnotu očekávanou.

Použité symboly:

N_j – nalezený počet virů

O_j – očekávaný počet virů

Testovací kritérium χ^2 se počítá podle vztahu

$$\chi^2 = \text{suma } (N_j - O_j)^2 / O_j$$

Kritická hodnota je tabelovaná pro různé hladiny významnosti a příslušný počet stupňů volnosti ($n-1$), kde n je počet porovnávaných stanovišť.

Výpočetní tabulka je zde:

Stanoviště	1	2	3	4	5	6	7
Nalezený počet virů	3	0	2	3	3	2	0
Očekávaný počet virů	2	2	2	2	2	2	2
$N_j - O_j$	1	2	0	1	1	0	2
$(N_j - O_j)^2 / O_j$	0,5	2	0	0,5	0,5	0	2

Testovací kritérium 5,5

Kritická hodnota

$p=0,01$ (6) 16,8

Kritická hodnota

$p=0,05$ (6) 12,6

Vzhledem k tomu, že testovací kritérium je menší než kritická hodnota pro obě zvolené hladiny významnosti při 6 stupních volnosti, přijímáme nulovou hypotézu. Stanoviště se statisticky významně neliší v počtu nalezených virů, bereme-li za očekávanou hodnotu průměrný výskyt virů na stanovišti v našich pokusech.

Pokud bychom však vzali za očekávanou hodnotu nález jednoho viru na stanovišti, byla by stanoviště statisticky významně odlišná na hladině 0,05.

Stanoviště	1	2	3	4	5	6	7
Nalezený počet virů	3	0	2	3	3	2	0
Očekávaný počet virů	1	1	1	1	1	1	1
$N_j - O_j$	2	-1	1	2	2	1	-1
$(N_j - O_j)^2 / O_j$	4	1	1	4	4	1	1

Testovací kritérium 16

Kritická hodnota

$p=0,01$ 16,8

Kritická hodnota

$p=0,05$ 12,6

5.1.1 Závěr statistického hodnocení

Vzhledem k malému rozsahu naměřených hodnot jsou zjištěné rozdíly na hranici statistické průkaznosti.

6 Diskuze

Bylo potvrzeno, že zkoumané viry se mohou vyskytovat ve spermatu trubců a tudíž pravděpodobně jeho prostřednictvím i přenášet. I pro zkoumané populace se tedy potvrdily poznatky ze starých studií, které dokázaly možnost přítomnosti DWV (Ribiere et al., 2008) a ABPV (de Miranda et al., 2010) ve spermatu. Dále byl u několika vzorků pozitivní výsledek na BQCV, který byl dříve zjištěn například ve vaječnicích královny (Ribiere et al., 2008).

Díky přenosu virů spermatem se může nakazit zdravá matka a následně nákazu přenést na potomky. Je ovšem otázkou, zda se vir z kontaminovaného ejakulátu dostane u zdravé matky i do spermatéky a zda tato matka naklade infikovaná vajíčka. Například KBV byl detekován v povrchově sterilizovaných vajíčkách (de Miranda et al., 2010). Některé studie poukazují na možnost transovariální přenosu SBV (Čermák et al., 2016). Konkrétně na náš výzkum navážou pokusy o diagnostiku virů ve spermatéce oplodněné matky a nakladených vajíčkách. Další výzkum se bude zabývat například tím, jaké je minimální množství vajíček k diagnostice. Domníváme se, že by přítomnost virů mohla být úspěšně diagnostikovatelná již z deseti vajíček.

Také není doposud známé, v jaké části ejakulátu se konkrétní viry nachází – zda ve spermiích či semenné plazmě. Tento problém je taktéž nutné zahrnout do dalšího výzkumu.

Jedním ze zkoumaných faktorů byla samotná metodika. Ukázalo se, že PCR je pro detekci těchto virů ve spermatu vhodné a to i v podmínkách naší konkrétní laboratoře. Detekovat lze již množství jednoho mikro litru. Avšak je mnohdy problematické získat sperma z kapiláry, do které se odebírá. Běžně používané kapiláry jsou vhodné spíše pro odběr spermatu od více samců, avšak pokud je odběr prováděn pouze u jednoho jedince a pokud má navíc podprůměrný objem spermatu, sperma se v kapiláře během uskladnění a manipulace rozprostře po stěnách a ulpí na nich. Bylo by tedy vhodné pro další výzkumy tohoto typu používat kapiláry s menším průměrem či ependorfovy zkumavky (Prodělalová, 2017, v tisku).

U některých virů (např. DWV, AmFV, BQCV, ABPV) bylo k diagnostice použito více druhů markerů. Jak se ukázalo, některé markery jsou účinnější než jiné, což lze vysvětlit možným polymorfismem daných virů. Srovnání výsledné úspěšnosti použitých markerů nám může pomoci optimalizovat postup při další diagnostice.

Negativní výsledky některých testů nemusí vždy znamenat, že vir se v daném vzorku nevyskytoval. Je možné, že se jednalo o kmen, jehož nukleové kyseliny nejsou diagnostikovatelné použitými markery. Tímto se dají například vysvětlit stanoviště a viry,

kteře vyšly kompletně negativní. Není doposud jasné, co vše může být pod názvem některých zkoumaných onemocnění obsaženo a některé viry byly objeveny poměrně nedávno (např. IAPV) a nejsou zatím příliš prozkoumány. Avšak na druhou stranu, kompletně negativní výsledky měly zejména viry, které nejsou pro státy, na jejichž území se nacházejí zkoumaná stanoviště, typické či na jejich území nebyly doposud prokázány (KBV, IAPV, BSRV, LSV).

Obecně je KBV typický pro Severní Ameriku a Nový Zéland, IAPV pro Střední východ a Austrálii (de Miranda et al., 2010). KBV byl z evropských zemí nalezen např. ve Francii, a to prvně ve vzorcích pocházejících z roku 2012 (Blanchard et al., 2014), v roce 2004 ve Španělsku, roku 2007 v Dánsku (de Miranda et al., 2010) a ve Velké Británii (Ward et al., 2007). Ve výzkumu provedeným Rybou et al. (2012) obsahujícím vzorky z včelstev z území ČR z let 2006 až 2009 nebyl KBV diagnostikován ani v jednom. Ve výzkumu Forgacha et al. (2008), při kterém bylo zkoumáno padesát dva vzorků z let 1999 až 2004 z Maďarska nebyl nalezen CBPV ani KBV. V Rakousku rozšíření virů zkoumal např. Berenyi et al. (2006). I v tomto výzkumu vyšel KBV ve všech vzorcích negativní. IAPV se z evropských zemí objevil například ve Francii (de Miranda et al., 2010). LSV byl objeven ve vzorcích z Belgie odebraných v roce 2011 (Ravoet et al., 2015) či v rozboru Španělských vzorků, které byly též pozitivní na IAPV (Granberg et al., 2013).

Některé viry nemají tak silnou prevalenci jako jiné. V již zmíněné studii Ryby et al. (2012) byl zjištěn CBPV pouze ve třech procentech vzorků, avšak například DWV v třiceti jedna procentech všech vzorků a čtyřiceti šesti procentech vzorků infikovaných některým ze zkoumaných virů. Druhým nejfrekventovanějším virem byl ABPV se sedmnácti procenty a dále BQCV s jedenácti. Nízkou prevalenci CBPV zjistil i Berenyi et al. (2006). V jeho studii byl CBPV zjištěn pouze v devatenácti procentech vzorků.

Další z následných pokusů by se mohl zabývat i zkoumáním, jak se úspěšnost a možnosti diagnostiky mění v průběhu sezóny. Například u ABPV a KBV byla zjištěna mírná cykličnost výskytu v průběhu roku (de Miranda et al., 2010). Je otázkou jaký je minimální titr viru v tkáni, který umožní efektivní diagnostiku. Proto by jeden z následujících pokusů mohl zahrnovat i kvantitativní určení množství viru v dané tkáni či spermatu s ohledem na velikost použitého vzorku.

Včelstva se proti nálezám přirozeně chrání hygienickým pudem a jedinci jako takoví svou imunitou. Pokud některá z testovaných kolonií měla úroveň hygienického pudu výrazně odlišnou (nižší či vyšší), mohlo to taktéž hrát roli v nakažení včelstva. Případně hraje roli i síla imunity jedince, ze kterého pochází konkrétní vzorek.

U některých virů byla dokázána spojitost mezi napadením včelstva roztočem *Varroa destructor* a zvýšeným nakažením včelstva daným virem a propuknutí klinických znaků u dříve latentních infekcí. Tato spojitost je známá např. u DWV (Tantillo et al., 2015). U DWV je také prokázána negativní korelace s hmyzomorkou *Nosema ceranae* (Kamler et al., 2015). Můžeme se tedy domnívat, že případné napadení hmyzomorkou *Nosema ceranae* hraje roli u populací, ve kterých nebyl DWV zjištěn.

Dalším faktorem, který mohl ovlivnit výsledky je faktor lidské chyby. Ten je vysoký zejména u sekvenace vzorků v externí firmě.

Po optimalizaci metodiky by bylo vhodné komerčně nabídnout chovatelům vyšetření spermatu trubců před jejich použitím k inseminaci. Takovéto testování by mohlo minimalizovat přenos těchto virů při inseminaci a chovatel by po porovnání výsledků vzorků z různých trubčích včelstev měl jistotu, že jím vybraní samci z kolonie s nejmenším počtem pozitivních nálezů budou relativně méně patogenní než jedinci z úlů, u kterých test prokázal více chorob.

7 Závěr

Výsledky potvrdily několik starších výzkumů, které prokázali možnost výskytu některých virů v trubčím spermatu. V některých vzorcích byl prokázán výskyt DWV, ABPV, BQCV a AmFV. Ani v jednom ze zkoumaných vzorků nebyl nalezen KBV, SBV, VdMLV, LSV a BSRV. Mezi stanovišti byly nalezeny statistické rozdíly, avšak vzhledem k malému rozsahu naměřených hodnot jsou zjištěné rozdíly na hranici statistické průkaznosti.

Metodika se ukázala jako vhodná pro tuto diagnostiku a bylo nalezeno i několik možností pro její budoucí optimalizaci. Můžeme prohlásit, že by bylo účelné zavést možnost testování trubčího spermatu, které by bylo dostupné pro chovatele.

8 Seznam literatury

Anguiano-Baez, R., Guzman-Novoa, E., Hamiduzzuman, M. M., Espinosa-Montano, L. G., Correa-Benitez, A. 2016. *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) Parasitism and Climate Differentially Influence the Prevalence, Levels, and Overt Infections of Deformed Wing Virus in Honey Bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Insect Science*. 16 (1). p. 1-7.

Amiri, E., Meixner, M., Buchler, R., Kryger, P. 2014. Chronic Bee Paralysis Virus in Honeybee Queens: Evaluating Susceptibility and Infection Routes. *Viruses*. 6. p. 1188-1201.

Bailey, L., Ball, B. V. 2013. *Honey Bee Pathology* Second edition. Academic Press INC. San Diego. 208 p. ISBN: 978-0-12-073481-8.

Bakonyi, T., Farkas, R., Szendroi, A., Dobos-Kovacs, M., Rusvai, M. 2002. Detection of acute bee paralysis virus by RT-PCR in honey bee and *Varroa destructor* field samples: rapid screening of representative Hungarian apiaries. *Apidologie*. 33. p. 63-74.

Berenyi, O., Bakonyi, T., Derakhshifar, I., Koglberger, H., Nowotny, N. 2006. Occurrence of Six Honeybee Viruses in Diseased Austrian Apiaries. *Applied and Environmental Microbiology*. 72 (4). p. 2414-2420.

Blanchard, P., Carletto, J., Siede, R., Shurr, F., Thiere, R., Ribiere, M. 2014. Identification of Kashmir bee virus in France using a new RT-PCR method which distinguishes closely related viruses. *Journal of Virological Methods*. 198. p. 82-85.

Blum, M. S., Glowska, Z., Taber, S. 1962. Chemistry of the Drone Honey Bee Reproductive System. II. Carbohydrates in the Reproductive Organs and Semen. *Annals of the Entomological Society of America*. 55 (1). p. 135-139.

Blum, M. S., Bumgarner, J. E., Taber, S. 1967. Composition and possible significance of fatty acids in the lipid classes in honey bee semen. *Journal of Insect Physiology*. 13 (9). p. 1301-1308.

Boer, S. P. A., Boomsma, J. J., Baer, B. 2009. Honey bee males and queens use glandular secretions to enhance sperm viability before and after storage. *Journal of Insect Physiology*. 55 (6). p. 538–543.

Chen, Y., Evans, J., Feldlaufer, M. 2006. Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 92 (3). p. 152-159.

Chen, Y., Evans, J. D., Smith, I. B., Pettis, J. S. 2008. *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology*. 97. p. 186-188.

Chen, Y. P., Pettis, J. S., Collins, A., Feldlaufer, M. F. 2006. Prevalence and Transmission of Honeybee Viruses. *Applied And Environmental Microbiology*, 72 (1), p. 606-611.

Chittihunsa, T., Sikorowski, P. P. 1996. Transmission of *Microplitis croceipes* (*Hymenoptera: Braconidae*) nonoccluded baculovirus (*Baculoviridae: subgroup C*). *Environmental Entomology*. 25 (1). p. 192-197.

Connor, L. J. 2008. *Bee Sex Essential*. Wicwas Press. Michigan. 152 p. ISBN: 1-878075-22-5.

Czekonska, K., Chuda-Mickiewicz, B., Chorbinski, P. 2013. The influence of honey bee (*Apis mellifera*) drone age on volume of semen and viability of spermatozoa. *Journal of Apicultural Science*. 57 (1). p. 61-66.

Czekonska, K., Chuda-Mickiewicz, B. 2015. The ability of honey bee drones to ejaculate. *Journal of Apicultural Science* 59 (2). p. 127-133.

Czekonska, K., Chuda-Mickiewicz, B., Samborski, J. 2015. Quality of honeybee drones reared in colonies with limited and unlimited access to pollen. *Apidologie*. 46. p. 1-9.

Čermák, K., Gruna, B., Hajdušková, J., Holub, P., Klíma, Z., Kovařík, I., Navrátil, S., Rytina, L., Texl, P., Texl, F., Tůma, Z. 2016. *Včelařství, Svazek I. Zootechnika včelaření*,

Nemoci včel – prevence a terapie. Pracovní společnost nástavkových včelařů. Praha. 180 s. ISBN: 978-80-260-9090-8.

Danihlík, J., Aronstein, K., Petřivalský, M. 2013. Antimicrobial peptides: a key component of honey bee innate immunity. *Journal of Apicultural Research*. 54 (2). p. 123-136.

De Miranda, J. R. 2008. Diagnostic techniques for virus detection in honey bees. In: Aubert, M., Ball, B., Freis, I., Moritz, R., Milani, N., Bernardinelli, I. (eds). *Virology and the Honey Bee*. European Communities. Belgie. p. 121-232. ISBN 92-79-00586-3.

De Miranda, J. R., Freis, I. 2008. Venereal and vertical transmission of deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera L.*). *Journal of Invertebrate Pathology*. 98. p. 184-189.

De Miranda, J. R., Cordoni, G., Budge, G. 2010. The Acute bee paralysis virus – Kashmir bee virus – Israeli acute paralysis virus complex. *Journal of Invertebrate Pathology*. 103. p. S30-S47.

Di Prisco, G., Annoscia, D., Marigotta, M., Ferrara, R., Varricchio, P., Zanni, V., Caprio, E., Nazzi, F., Pennacchio, F. 2016. A mutualistic symbiosis between a parasitic mite and a pathogenic virus undermines honey bee immunity and health. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 113 (12). p. 3203-3208.

Dostert, C., Gliana-Arnoux, D., Imler, J. L. 2008. Innate immunity of insects to infection. In: Aubert, M., Ball, B., Freis, I., Moritz, R., Milani, N., Bernardinelli, I. (eds). *Virology and the Honey Bee*. European Communities. Belgie. p. 311-346. ISBN 92-79-00586-3.

Drašar, J., Bacílek, J., Haragsim, O., Kodoň, S., Peroutka, M., Škrobal, D., Veselý V. 1978. *Včelařství*. Státní zemědělské nakladatelství. Praha. 312 s. ISBN: 07-079-78.

Forgach, P., Bakonyi, T., Tapasztai, Z., Nowotny, N., Rusvai, M. 2008. Prevalence of pathogenic bee viruses in Hungarian apiaries: Situation before joining the European Union. *Journal of Invertebrate Pathology*. 98. p. 235 – 238.

Fratini, G., Cilia, G., Mancini, S., Felicioli, A. 2016. Royal Jelly: An ancient remedy with remarkable antibacterial Properties. *Microbiological Research*. 192. p. 130-141.

Frydrychová, R. 2014. Polymerázová řetězová reakce (pcr) [online]. *Labguide*. 10. října 2014 [cit. 2016-12-15]. Dostupné z <<http://labguide.cz/metody/pcr/>>.

Fuchs, S., Schade, V. 1994. Lower performance in honeybee colonies of uniform paternity. *Apidologie*. 25. p. 155-168.

Gauthier, L., Cornman, S., Hartmann, U., Cousserans, F., Evans, J. D., de Miranda, J. R., Neumann, P. 2015. The *Apis mellifera* Filamentous Virus Genome. *Viruses*. 7 (7). p. 3798-3815.

Ghanim, M., Morin, S., Zeidan, M., Czosnek, H. 1998. Evidence for Transovarial Transmission of Tomato Yellow Leaf Curl Virus by Its Vector, the Whitefly *Bemisia tabaci*. *Virology*. 240. p. 295-303.

Genersch, E. 2010. Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. *Appl Microbiol Biotechnol*. 87 (1). p. 87-97.

Gisder, S., Genersch, E. 2015. Special Issue: Honey Bee Viruses. *Viruses*. 7(10). p. 5603-5608.

Glinski, Z., Jarosz, J. Mlynarska, M. 1999. Immune defenses in bumble bees. *MEDYCYNA WETERYNARYJNA*. 55 (12). p. 800-805.

Grabensteiner, E., Bakonyi, T., Ritter, W., Pechhacker, H., Nowotny, N. 2007. Development of a multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of three viruses of the honeybee (*Apis mellifera* L.): acute bee paralysis virus, Black queen cell virus and Sacbrood virus. *Journal of Invertebrate Pathology*. 94 (3). p. 222-225.

Granberg, F., Vicente-Rubiano, M., Bubio-Guerri, C., Karlsson, O. E., Kukielko, D., Belak, S., Sanchez-Vizcaino, J. M. Metagenomic Detection of Viral Pathogens in Spanish Honeybees: Co-Infection by Aphid Lethal Paralysis, Israel Acute Paralysis and Lake Sinai

Viruses [online]. PLOS ONE. 27. února 2013 [cit. 2017-03-28]. Dostupné z <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0057459>>.

Hanboonsong, Y., Choosai, C., Panyim, S., Dmamak, S. 2002. Transovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in the insect vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura). *Insect Molecular Biology*. 11 (1). p. 97-103.

Hartmann, U., Forsgren, E., Charriere, J. D., Neumann, P., Gauthier, L. 2015. Dynamics of *Apis mellifera* Filamentous Virus (AmFV) Infections in Honey Bees and Relationships with Other Parasites . *Viruses*. 7. p. 2654-2667.

Higes, M., Martin-Hernandez, R., Botias, C., Bailon, E. G., Gonzalez-Porto, A. V., Barrios, L., del Nozal, M. J., Bernal, J. L., Jimenez, J. J., Garcia Palencia, P., Meana, A. 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental mikrobiology*. 10 (10). p. 2659-2669.

Hogenhout, S. A., Ammar, E., Whitfield, A. E., Redinbaugh, M. G. 2008. Insect Vector Interactions with Persistently Transmitted Viruses. *Annual Review of Phytopathology*. 46. p. 327-359.

Jamieson, B. G. M. 1987. *The Ultrastructure and Phylogeny of Insect Spermatozoa*. Cambridge University Press. ISBN: 0 521 34441 7.

Kamler, M., Prodlalová, J., Titěra, D. 2015. Interakce patogenů včely medonosné jako příčina kolapsů včelstev. *Veterinářství*. 65 (6). str. 453-456.

Knoll, A., Vykoukalová, Z. 2002. *Molekulární genetika zvířat (Metody detekce polymorfizmů DNA genů)*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. Brno. ISBN: 80-7157-616-6.

Krajl, J., Fuchs, S. 2010. *Nosema sp.* influences flight behavior of infected honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *Apidologie*. 41 (1). p. 21-28.

- Kukielka, D., Esperon, F., Higes, M., Snachez-Vizcaino, J. M.** 2007. A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detection of deformed wing virus and black queen cell virus in honeybee *Apis mellifera*. *Journal of Virological Methods*. 147. p. 275-281.
- Lino-Neto, J., Bao, S. N., Dolder, H.** 2000. Sperm ultrastructure of the honey bee (*Apis mellifera*) (L) (*Hymenoptera, Apidae*) with emphasis on the nucleusflagellum transition region. *Tissue & Cell*. 32 (4). p. 322-327.
- Mayack, CH., Naug, D.** 2009. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *Journal of Invertebrate Pathology*. 100. p. 185-188.
- Meeus, I. de Miranda, J. R., de Graaf, D. C., Smagghe, G.** 2014. Effect of oral infection with Kashmir bee virus and Israeli acute paralysis virus on bumblebee (*Bombus terrestris*) reproductive success. *Journal of Invertebrate Pathology*. 121. p. 64-69.
- Motte, E., Yugcha, E., Luzardo, J., Castro, F., Leclercq, G., Rodriguez, J., Miranda, P., Borja, O., Serrano, J., Terreros, M., Montalvo, K., Narvaez, A., Tenorio, N., Cedeno, V., Mialhe, E., Boulo, V.** 2003. Prevention of IHHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 219, p. 57-70.
- Mullapudi, E., Fuzik, T., Přidal, A., Plevka, P.** 2017. Cryo-electron Microscopy Study of the Genome Release of the Dicistrovirus Israeli Acute Bee Paralysis Virus. *Journal of Virology*. 91(4). p. e02060-16.
- Naug, D., Gibbs, A.** 2009. Behavioral changes mediated by hunger in honeybees infected with *Nosema ceranae*. *Apidologie*. 40 (6). p. 595-599.
- Negri, P., Maggi, M., Ramirez, L., Szwariski, N., De Feudis, L., Lamattina, L., Eguaras, M.** 2016. Cellular immunity in *Apis mellifera*: studying hemocytes brings light about bees skills to confront threats. *Apidologie*. 47. p. 379-388.
- Palacios, G., Hui, J., Quan, P. L., Kalkstein, A., Honkavouri, K. S., Bussetti, A. V., Conlan, S., Evans, J., Chen, Y. P., van Engelsdorp, D., Efrat, H., Pettis, J., Cox-Foster, D., Holmes, E. C., Briese, T., Lipkin, W.** 2008. Genetic Analysis of Israel Acute Paralysis

Virus: Distinct Clusters Are Circulating in the United States. *Journal of Virology*. 82 (13). p. 6209-6127.

Paxton, R. J., Klee, J., Koplara, 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. p. 558-565.

Petr, J. 2016. Symbióza *Varroa destructor* s virem deformovaných křídel. *Včelařství*. 69 (5). s. 163.

Prodělalová, J. 2016. Virové nemoci včel z pohledu diagnostiky. *Včelařství*. 69 (151). s. 274-275.

Prodělalová, J. 2017. Diagnostika virů v trubčím spermatu. *Veterinářství*. V tisku.

Ravoet, J., De Smet, L., Wensellers, T., de Graff, D. C. 2015. Genome sequence heterogeneity of Lake Sinai Virus found in honey bees and Orf1/RdRP-based polymorphisms in a single host. *Virus Research*. 201. p. 67-72.

Retsching, G., Williams, G. R., Mehmman, M. M., Yanez, O., de Miranda, J. R., Neumann, P. Sex-Specific Differences in Pathogen Susceptibility in Honey Bees (*Apis mellifera*) [online]. *PLOS ONE*. 17. ledna 2014 [cit. 2017-03-28]. Dostupné z <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0085261>>.

Rhodes, J. W., Harden, S., Spooner-Hart, R., Anderson, D. L., Wheen, G. 2011. Effects of age, season and genetics on semen and sperm production in *Apis mellifera* drones. *Apidologie*. 42. p. 29-38.

Ribiere, M., Ball, B., Aubert, M. F. 2008. Natural history and geographical distribution of honey bee viruses. In: Aubert, M., Ball, B., Freis, I., Moritz, R., Milani, N., Bernardinelli, I. (eds). *Virology and the Honey Bee*. European Communities. Belgie. p. 15-84. ISBN: 92-79-00586-3.

- Ryba, S., Titěra, D., Schodelbauerova-Traxmandlova, I., Kindlmann, P.** 2012. Prevalence of honeybee viruses in the Czech Republic and coinfections with other honeybee disease. *Biologia*. 67 (3). p. 590-595.
- Sammataro, D., Yoder, J. A.** 2012. Honey Bee Colony Health: Challenges and Sustainable Solutions. CRC Press. USA. 320 p. ISBN: 9781439879405.
- Sanchez-Martinez, J. G., Aguirre-Guzman, G. A., Mejia-Ruiz, H.** 2007. White Spot Syndrome Virus in cultured shrimp: A review. *Aquaculture Research*. 38. p. 1339-1354
- Schluns, H., Schluns, E. A., van Praagh, J., Moritz, R. F. A.** 2003. Sperm numbers in drone honeybees (*Apis mellifera*) depend on body size. *Apidologie*. 34 (6). p. 577-584.
- Siede, R., Buchler, R.** 2003. Symptomatic Black Queen Cell Virus Infection of drone brood on hessian bee yards. *Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*. 116 (3-4). p. 130-133.
- Stort, A. C., Goncalves, L. S.** 1986. Storage of Germplasm. In: Rinderer, T. E. (ed.). Bee genetic and breeding. Academic Press INC. London. p. 345-360. ISBN: 0-12-588920-8.
- Straub, L., Villamar-Bouza, L., Bruckner, S., Chantawannakul, P., Gauthier, L., Khongphinitbunjong, K., Retschnig, G., Troxler, A., Vidondo, B., Neumann, P., Willians, G. R.** 2016. Neonicotinoid insecticides can serve as inadvertent insect contraceptives. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*. 283 (1835). article 20160506.
- Tantillo, G., Bottaro, M., Di Pinto, A., Martella, V., Di Pinto, P., Terio, V.** 2015. Virus Infection of Honeybees *Apis Melifera*. *Italian journal of Food Safety*. Vol 4. p. 157-167.
- Tautz, J.** 2010. Fenomenální včely. Brázda. Praha. 289 s. ISBN: 978-80-209-0376-1.
- Tyl, J., Titěra, D.** 2013. Zdařilá inseminace včelích matek. VÚVč Dol. Libčice and Vltavou. 39 s. ISBN: 978-80-87196-14-4.

Veselý, V., Bacílek, J., Čermák, K., Drobníková, V., Haragsim, O., Kamler, F., Krieg, P., Kubišová, S., Peroutka, M., Ptáček, V., Škrobal, D., Titěra, D. 2003. *Včelařství*. Brázda. 272 s. ISBN: 80-209-0320-8.

Ward, L., Waite, R., Boonham, N., Fisher, T., Pescod, K., Thompson, H., Chantawannakul, P., Brown, M. 2007. First detection of Kashmir bee virus in the UK using real-time PCR. *Apidologie*. 28. p. 181-190.

Weirich, G. F., Collins, A. M., Williams, V. P. 2002. Antioxidant enzymes in the honey bee. *Apis mellifera*. *Apidologie*. 33 (1). p. 3-14.

Zhang, X., He, S. Y., Evans J. D., Pettis, J. S., Yin, G. F., Chen, Y. P. 2012. New evidence that deformed wing virus and black queen cell virus are multi-host pathogens. *Journal of Invertebrate Pathology*. 109. p. 156-159.

9 Zdroje obrázků

Obr. 1: Veselý, V., Bacílek, J., Čermák, K., Drobníková, V., Haragsim, O., Kamler, F., Krieg, P., Kubišová, S., Peroutka, M., Ptáček, V., Škrobal, D., Titěra, D. 2003. Včelařství. Brázda. 272 s. ISBN: 80-209-0320-8.

Obr. 2: Tautz, J. 2010. Fenomenální včely. Brázda. Praha. 289 s. ISBN: 978-80-209-0376-1.

Obr. 3, 4, 5, 6, 12: Tyl, J., Titěra, D. 2013. Zdařilá inseminace včelích matek. VÚVě Dol. Libčice and Vltavou. 39 s. ISBN: 978-80-87196-14-4.

Obr. 7: Borenstein, S. Common pesticide appears to reduce live bee sperm [online]. Phys.org . 27. července 2016 [cit. 2017-29-03]. Dostupné z <<https://phys.org/news/2016-07-common-pesticide-bee-sperm.html>>

Obr. 8, 10: Moore, P. A., Wilson, M. E., Skinner, J. A. Honey bee viruses, the deadly varro mite associates [online]. Articles extension. 29. listopadu 2016 [cit. 2017-29-03]. Dostupné z <<http://articles.extension.org/pages/71172/honey-bee-viruses-the-deadly-varroa-mite-associates>>

Obr. 9: Anon. Black queen cell virus [online]. Beeware. N. d. [cit. 2017-28-03]. Dostupné z <<http://beeaware.org.au/archive-pest/black-queen-cell-virus>>

Obr. 11: Anon. Sacbrood [online]. AFB. N. d. [cit. 2017-26-03]. Dostupné z <<http://www.afb.org.nz/sacbrood>>

Obr. 13, 14, 15: Prodělalová, J. 8. března 2017. pers. comm.