



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Katedra genetiky a zemědělských biotechnologií

Diplomová práce

Monitoring výskytu patogenů

Paenibacillus larvae, *Melissococcus plutonius* a *Ascosphaera apis* ve
včelstvech na území ČR

Autorka práce: Bc. Markéta Josková

Vedoucí práce: Ing. Irena Hoštičková Ph.D.

České Budějovice
2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne

.....
Podpis

Abstrakt

Tato diplomová práce v teoretické části shrnuje informace o biologii včely medonosné, bakterií *Paenibacillus larvae* a *Melissococcus plutonius* a o parazitické houbě *Ascospheara apis*. Tyto mikroorganismy napadají včelí larvy a způsobují významné choroby včel.

Hlavním cílem bylo v praktické části vyhodnotit výskyt těchto patogenů, v různých místech České republiky pomocí izolace DNA včel z více než 200 odebraných vzorků z 50 stanovišť v rámci celé České republiky. Detekce přítomnosti původců nemocí byla provedena metodou PCR. Ze vzorků byly 3 pozitivní na bakterii *Paenibacillus larvae* a 4 pozitivní na bakterii *Melissococcus plutonius*. Houba *Ascospheara apis* nebyla v žádném ze vzorků detekována.

Klíčová slova: včela medonosná, patogeny včely medonosné, *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius*, *Ascospheara apis*

Abstract

The aim of this thesis was to summarize the theoretical informations about biology of honeybees and bacteria *Paenibacillus larvae* and *Melissococcus plutonius* and parasitic fungi *Ascospheara apis*. This organisms attack bee larvae and cause bee diseases.

The major part of this thesis was focused on the evaluation of the occurrence of these pathogens in various places in Czech Republic by isolating bee DNA from more than 200 bee samples from 50 locations within whole Czech Republic. Detection pathogens was performed using PCR method. There were 3 samples positive for *Paenibacillus larvae* and 4 positive for *Melissococcus plutonius*. The fungus *Ascospheara apis* did not occur in any of the samples.

Keywords: honeybee, honeybee pathogens, *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius*, *Ascospheara apis*

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat Ing. Ireně Hoštičkové Ph.D. za vedení mé diplomové práce, za odbornou pomoc a čas, který mi věnovala. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a blízkým, kteří mě motivovali a podporovali.

Obsah

Úvod.....	6
1 Teoretická část	7
1.1 Včela medonosná	7
1.1.1 Včelstvo.....	7
1.1.2 Stavba těla	8
1.1.3 Chov včel	9
1.1.4 Onemocnění včel.....	10
1.2 <i>Paenibacillus larvae</i>	14
1.3 <i>Melissococcus plutonius</i>	22
1.4 <i>Ascospaera apis</i>	29
2 Cíle práce	36
3 Materiál a metody	37
3.1 Vzorky	37
3.2 Příprava vzorků	38
3.3 Izolace	38
3.4 PCR	40
3.5 Gelová elektroforéza	42
3.6 Sekvenování	43
4 Výsledky	45
5 Diskuse.....	59
Závěr	62
Seznam použité literatury.....	63
Seznam obrázků	78
Seznam tabulek	80
Seznam použitých zkratk.....	81

Úvod

Včela medonosná patří mezi nejdůležitější opylovatele rostlin. Hraje tak podstatnou roli v zachování biodiverzity krajiny a přirozeného koloběhu přírody. Chov včel se řadí mezi jedno z nejstarších odvětví živočišné výroby, jehož přínosem je produkce medu a dalších včelích produktů. Kromě tohoto důvodu jsem si toto téma vybrala také

Včelařství značně ovlivňuje celá řada mikroorganismů, která napadá včelstva a způsobují jim onemocnění, jejichž následky mohou mít velký dopad na úbytek včel. Mezi tyto mikroorganismy se řadí různé bakterie, houby, prvoci, viry nebo roztoči.

Bakterie *Paenibacillus larvae* je původcem závažného onemocnění moru včelího plodu. Napadá larvy a při objevení ve včelstvu je nutný včasný zásah, jinak hrozí úhyn celé kolonie včelstva. Další bakterií napadající včelí larvy s podobnými klinickými příznaky je *Melissococcus plutonius*, původce hniloby včelího plodu. Ne tolik závažným onemocněním je zvápenatění včelího plodu způsobené parazitickou houbou *Ascospaera apis*. Ta sice zřídka vede k úhynu celých kolonií, přesto by se choroba neměla podceňovat. Tato onemocnění jsou rozšířena po celém světě včetně České republiky.

Nejdůležitějším krokem proti včelím chorobám je prevence a dodržování hygieny. Při potvrzení přítomnosti patogenního mikroorganismu je nutné se řídit příslušnými opatřeními.

Touto prací bych také chtěla zachovat památku mého pradědy Josefa Josky, který byl známým chovatelem včel, autorem několika knih o včelařství a zakladatelem, dále i ředitelem první včelařské školy v Nasavrkách (1951).

1 Teoretická část

1.1 Včela medonosná

Včela medonosná (*Apis mellifera*) patří k nejrozšířenějším zástupcům říše hmyzu (*Insecta*) do třídy blanokřídlých (*Hymenoptera*). Včela je nejznámějším sociálním hmyzem a důležitým opylovačem entomofilních (hmyzosubných) rostlin, který opyluje jak přirozenou vegetaci, tak i hospodářské plodiny a umožňuje rozmnožování rostlin. Proto hraje významnou roli v zachování přirozeného koloběhu přírody a velmi významně přispívá k udržení biodiverzity krajiny v přírodních ekosystémech. (Rejnič, 1987, Cramp, 2013). Samozřejmě zjevným benefitem jsou užitečné včelí produkty - tj. vosk, med, propolis, jed, a mateří kašička, jež jsou využívány nejen v potravinářství, kosmetice, ale i léčitelství. Tyto produkty mají ale jen triviální hodnotu ve srovnání s hluboce důležitou rolí opylovatelů.

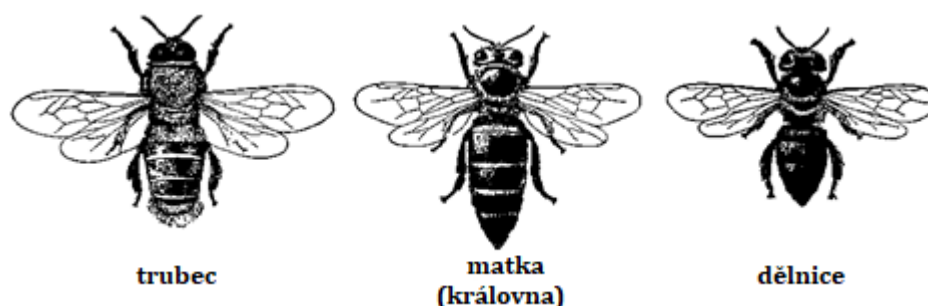
Jako každý hmyz s proměnou dokonalou, prochází čtyřmi vývojovými fázemi. Základem je vajíčko, z něhož se líhne larva. Ta se zakuklí a vzniká dospělý jedinec (Rejnič, et al., 1990; Michener, 2007).

Včela medonosná je vývojově nejdokonalejším druhem rodu včela (Cramp, 2013), jejíž oblastí původního rozšíření je Evropa, Afrika a Přední Asie. Do Ameriky, Austrálie a celého Nového světa se dostala z Evropy v době kolonizace v 17. století. V dnešní době je rozšířena v obyvatelném území po celém světě (Veselý, 2013).

1.1.1 Včelstvo

Včely žijí ve společenstvech (včelstvech), která jsou zpravidla složena z jedné matky, několika desítek tisíc dělnic a několika stovek trubců (Švamberk, 2000). Jednotliví členové jsou na sobě závislí a každý má ve včelstvu svoji roli, vzájemně se doplňují. Trvalá existence včelstva bez některé ze tří pohlavních forem je nemožná (Joska, 1958; Veselý, 2013). Jejich úkolem je zajistit přežití kolonie a jejích potomků (Veselý, 2013). Včelí matka neboli královna je jediná samička, která je plodná a schopna reprodukce. Její prací je klást vajíčka (Cramp, 2013), kterých je za den až 1500 (Veselý et al., 2003). Z oplozených vajíček se líhnou dělnice, které patří mezi nejpočetnější skupinu včelstva, podle níž se hodnotí jeho síla. Dělnice se rodí se zakrnělými pohlavními orgány, a nejsou tedy schopny rozmnožování (Joska, 1958). Jejich činnost se přizpůsobuje potřebě včelstva. Např. budování pláství, sběru pylu nebo krmení larev (Drašar, 1978). Trubci, včelí samečci mají jeden úkol, a to oplodnit matku. Soutěží mezi sebou.

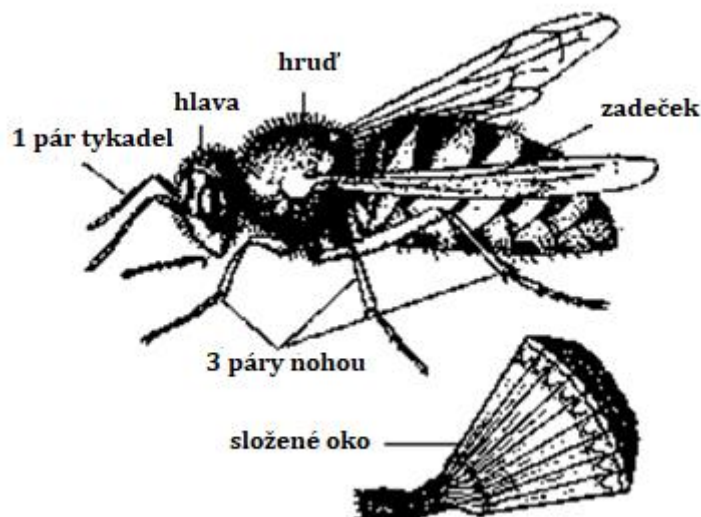
A ten, který uspěje, oplodní včelí královnu a umírá. Ostatní trubci jsou odmítnuti a vykázáni z úlu (Veselý, 2013).



Obrázek 1.1: Pohlavní formy včelstva (Pleva, 2020)

1.1.2 Stavba těla

Tělo včel se dělí do tří hlavních částí – hlavy, hrudi a zadečku. Je pokryté ochranným krunýřem z polysacharidu chitinu neboli vnitřní kostrou těla. K ochraně vnitřních tělních orgánů slouží pokožka (Spürgin, 2013; Veselý, 2013). Na hlavě je pět očí. Dvě složené (nápadné jsou svou velikostí hlavně u trubce) a nad nimi tři jednoduché (Joska, 1958). Dále jsou na hlavě sídla čichu a hmatu – dvě tykadla, také se zde nachází ústa s kusadly a sosáčkem (Spürgin, 2013). Součástí hrudi jsou dva páry blanitých křídel a tři páry nohou (Hanousek, 1991). Na zadečku je žihadlo se zpětným háčkem spojený s váčkem jedovým. Zadeček dělnic a matky je zašpičatělý, u trubce je tupý a zaoblený. Matka včel se na první pohled výrazně liší svou velikostí naproti mnohem menším dělnicím a trubcům (Joska, 1958). Včely mají neuzavřený krevní oběh, kde proudí hemolymfa. Nervová soustava má hlavní středisko v hlavě a další v hrudi a zadečku. Pohlavní soustavu mají plně vyvinutou pouze trubci a matka. K vývinu vajíček dochází u matky asi v 200 vaječných rourkách. K oplození vajíček probíhá v pochvě matky, poté se vajíčka ukládají do buňky plástů kladélkem (Hanousek, 1991).



Obrázek 1.2: Stavba těla včely (ZŠ Nučice, 2019)

1.1.3 Chov včel

Včelařství patří k jednomu ze základních odvětví zemědělství a řadí se mezi jedno z nejstarších odvětví živočišné výroby (Šefčík, 2014). Z chovu včel má v EU společnost zisk 14, 2 miliardy EUR ročně. Na opylování včelami je závislé 84 % druhů rostlin a 76 % potravinové výroby. Současně velkou částí přispívá k zachování ekonomického přínosu pro společnost, zachování ekologické rovnováhy v krajině a ochraně rozmanitosti přírody (Žižka, 2017).

Včelařství je nejstarší činností, kterou si naši předci obstarávali obživu. První dochovaný důkaz o sběru medu se nachází na stěně Cueva de la Araña (Pavoučí jeskyně) ve vesnici Bicorp u Valencie z konce starší doby kamenné (cca 10 tisíc let p. n. l.) (Jeníková, 2018). Historii chovu lze rozdělit do několika etap, které se liší zacházením a péčí (Veselý a kol., 2003). První etapa lovecká se vyznačovala tím, že člověk vybíral med z plástů lesních včel, aniž by jim poskytoval nějakou péči (již před 4000 lety p. n. l.) (Škrobal a kol., 1967). V etapě lesní včelaření (brtnictví) lidé začali vyřezávat pouze části plástů, pro šetrnější zacházení se včelami, kdy jich tolik neuhyne jako při vybírání celých hnízd. V tomto období také vzrostla poptávka po medu a vosku (Nepraš, 1971). V třetí etapě (rolnické) začali lidé přemísťovat včelstva s celými kmeny, aby byla blíže k polím a příbytkům, kde hospodařili. Včelstva lidé opatřili stříškou (Veselý a kol., 2013). Etapa čtvrtá – racionální včelaření – je datována 18. stoletím. Objevuje se prvně sestavení rámku, kde bylo poprvé možno zavěšovat včelí

díla na trámky (Beránek, 2003). V 19. století se začaly používat rámy s mezistěnou a i medomety (Veselý a kol., 2013).

Chov včel v České republice

Ve druhé polovině 18. století došlo k rozkvětu českého včelařství díky panovnici Marii Terezii, která chov včel podporovala a propagovala. Podpořila i vznik odborných škol včelaření. Roku 1775 se Morava (později Čechy) dočkala patentu ochranných opatření pro chovatele včel týkající se volného prodeje medu a vosku bez zdanění. Ve Vídni založila roku 1769 první státní včelařskou školu na světě (Kulhánek, 2021)

V období Československa v roce 1951 byla v Nasavrkách na Chrudimsku otevřena první dvouletá včelařská škola, jejímž ředitelem byl zkušený včelař Josef Joska. (Novotná, 2019; Kulhánek, 2021).

V 90. letech 20. století došlo k velkému snížení počtu včelstev a včelařů kvůli ekonomickým důvodům, na rozdíl od okolních států, kde hrály roli problémy zdravotní. Ale díky finanční podpoře státu se včelařství stabilizovalo a počet včelstev se zvyšoval. Na konci roku 2016 narostl počet na 662 253 včelstev a zvýšilo se i množství chovatelů na 56 921 (Žižka, 2017). Nárůst počtu včelstev i včelařů je zapříčiněn také systematickou podporou včelařství ústředními orgány státní správy. Ministerstvo zemědělství podporuje rozvoj oboru a tvorbu vhodných podmínek pro včelařství s ČSV (Český svaz včelařů, z. s.) i ostatními včelařskými spolky (Šefčík, 2014). Českomoravská společnost chovatelů (ČSCH) evidovala v dubnu roku 2020 skoro 64 tisíc včelařů, v EU jsme tak v absolutním počtu na třetím místě. Počet včelstev přesahuje nyní 685 tisíc a máme třetí nejvyšší míru zavčelení hned po Maďarsku a Řecku. Při přepočtu včelstev na obyvatelstvo jich má naše země mezi státy EU nejvíce, a to 58 včelstev na každých 10 tisíc lidí (Dostál a Procházka, 2020). Také se Česko může chlubit tím, že je čtvrtou největší včelařskou velmocí na světě (Jeníková, 2018).

V současné době (rok 2020) je evidováno ČSV více než 54 tisíc členů, což představuje 98 % všech včelařů v Česku; s 575 000 včelstvy. Česko se tak řadí mezi státy s nejvyšší organizovaností včelařů na světě (Český svaz včelařů, 2021).

1.1.4 Onemocnění včel

Patogeny včely medonosné způsobují vážné ztráty v produkci včelstev a zapříčiňují úbytek jejich populací. Ne ve všech státech, včetně ČR není povoleno léčit včelstva

antibiotiky a pesticidy. Používání těchto léčiv může vést k negativnímu dopadu na schopnost včel vyvinout rezistenci vůči vlastním patogenům. Ve výsledku pak umožňuje šíření virulentnějších kmenů (Cox, 2000). To snižuje průměrnou délku života včel (Martel et al., 2006) a způsobuje nerovnováhu v mikroflóře úlu (Charbonneau et al., 1992), což zvyšuje riziko kontaminace zařízení a produktů (Lauro et al., 2003). Například mohou v medu přetrvávat chemické zbytky, které ovlivňují jeho kvalitu pro lidskou spotřebu (Martel et al., 2006).

Vzhledem k ekonomickému a ekologickému významu včel je bezpochyby nutné vyvinout účinné, udržitelné a ekologické strategie pro tlumení chorob včel. Patří mezi ně změna strategií řízení, rozmnožování včelích linií vykazujících přirozenou odolnost vůči chorobám nebo hygienickému chování (Spivak a Reuter, 2001) a používání biologických ochranných látek (Lee et al., 2009). Snížené množství používaných antibiotik a pesticidů může vést ke zvýšené bezpečnosti medu a včelích produktů pro lidskou spotřebu a vzhledem k dlouhodobě škodlivému vlivu těchto látek na zdraví včel, může podpořit přirozenou obranyschopnost včel.

Je velmi důležité, aby včelař dokázal rozpoznat první příznaky nemoci nebo napadení v úlech a věděl, jak pokračovat s jejím odstraněním (Arbia a Babbay, 2010). Výskyt onemocnění u včel závisí na třech faktorech:

1. Genetika včel – hygienické chování a odolnost vůči chorobám je založeno na genetickém založení včelích královen.
2. Patogen (přítomnost, virulence, infekční zátěž) – pro projevení nemoci je třeba přítomnost odpovědného patogenu (viry, bakterie, houby, prvoci), důležité je také jeho množství a schopnost šíření
3. Prostředí (teplota, relativní vlhkost, přítomnost rostlin) – podmínky prostředí a sezónní faktory silně ovlivňují nástup nemoci a v mnoha případech jsou klíčovými spouštěči (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2018)

Nemocím včel se dá předcházet preventivními opatřeními jako je udržování včelstva v dobrém fyzickém i duševním stavu a pravidelnou kontrolou chovatelem. (Cramp, 2013). I přes veškerá opatření může dojít k nákaze. Potom je zapotřebí odstraňovat ze včelstva mrtvé jedince pro zbránění šíření (Tautz, 2016). Včely patří mezi hospodářská zvířata, proto choroby včelstev má na starosti Státní veterinární správa.

Rozdělení

Včely i jejich plod mohou trpět buď nenakažlivými nebo nakažlivými nemocemi (Veselý et al., 1985). Nenakažlivé nemoci, které se nešíří mezi včelstvem, mohou být způsobené těžko stravitelnou a špatnou potravou nebo narušením vhodných tepelných podmínek pro vývoj. (Kubišová a Háslbachová, 1992). Mezi tato onemocnění patří tam hynutí plodu hladem při nedostatku potravy ke konci zimy a na jaře, dále hynutí plodu zimou a přehřátím nebo např. průjem a zácpa včel (Hanousek, 1991; Kubišová a Háslbachová, 1992). Mezi nakažlivé nemoci řadíme nemoci infekční, které způsobují bakterie, viry, houby nebo různé parazité (Švamberk, 2003).

Viry

Viry jsou velmi malé nebuněčné organismy, menší než bakterie. Nejsou pozorovatelné pouhým okem. Jejich velikost je udávána v miliontinách milimetru (nm) (Veselý, 2013; Čermák et al., 2016). Viry včel se množí jak v tělech dospělých, tak i plodu. Jeho přítomnost v koloniích i u jednotlivých včel nemusí mít na oko žádný projev, ale s určitými podmínkami může mít vážné viditelné klinické příznaky a včelstva může nejen oslabit, ale i úplně zlikvidovat. Viry mohou způsobit také změny v chování jako např. špatnou orientaci nebo změnu péče o plod. Doposud byly popsány dvě desítky virů včel (Výzkumný ústav včelařský, 2021), z toho se šest vyskytuje v ČR (Ryba et al., 2012). Při virózách včel se rozpadají buňky určité tkáně, což má za následek smrt nakaženého jedince. Proti virovým nemocem není žádný dostupný lék. Infekce se dá ale snižovat spálením uhynulých včel a vydezinfikováním částí úlů. Hlavně je nutné dodržovat prevenci (Veselý a kol. 1985).

Mezi viry včel můžeme zařadit virus deformovaných křídel, projevuje se, jak už název napovídá, deformací křídel včel a zkrácením zadečku. Tento vir napadá plod, ale projeví se až u dospěléce. Dále sem můžeme zařadit viry paralýzy včel, kdy jedinci nejsou schopni letu nebo ztrácejí obrvení a jsou na pohled černé (Výzkumný ústav včelařský, 2021) a virová nákaza včelího plodu (pytlíčkový plod), kdy larvy vypadají jako pytlíčky s tekutinou a hynou (Kubišová a Háslbachová, 1992).

Houby

Mezi velice rozšířenou houbovou chorobou včel patří nose móza. Je to onemocnění dospělých včel způsobené jednobuněčnými houbami patřícími do třídy *Microsporidia*.

Existují dva různé poddruhy *Nosema*, které jsou zodpovědné za dvě různé formy choroby včely medonosné. Patří tam *Nosema apis* a *Nosema ceranae* (Martín-Hernández et al., 2012). *N. apis* je zodpovědná za známou formu onemocnění, která se šíří zejména ve vlhkých a studených místech. Včely trpí střevními potížemi jako je průjem, což je základní znak pro diagnózu onemocnění. Včely nejsou schopny vylučovat mateří kašičku, některé včely nejsou schopny letu, nakonec umírají. Důležitá prevence onemocnění je udržování pravidel při chovu jako např. vhodné umístění úlu (suchá místa, nevystavená chladnému větru). Pokud je nemoc ve včelstvu rozšířena, je doporučeno jeho zničení a sterilizace úlů (Copley et al., 2012; Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2018). Nový druh mikrosporidia je *N. ceranae* má od klasické nose mózy odlišné klinické příznaky, neprojevuje se průjmem. Tyto příznaky může mít po celý rok (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2018). Existuje také plísňové onemocnění plodu, způsobené *Ascospheara apis* (viz níže). Tyto mikroorganismy napadají larvy nebo kukly, zatímco dospělé včely zůstávají zdravé.

Roztoči

Nejznámějším a nejrozšířenějším roztočem zodpovědným za nemoci u včel je *Varroa destructor*, který způsobuje varroázu (Arbia a Babbay, 2010). Tento roztoč je silně adaptabilní, proto způsobuje hlavní ekonomické ztráty ve včelařském oboru. Ovlivňuje jak plod, tak i dospělé včely. Saje jim hemolymfu, čímž je oslabuje a jsou více náchylnější k jiným chorobám. Mezi hlavní symptomy patří včely s deformovanými křídly, vysoká úmrtnost larev nebo oslabené kolonie. Vývoj nemoci není příliš zřejmý, proto je velmi důležitá pravidelná kontrola v každém úlu (počet roztočů na dně úlu, viditelnost roztočů na tělech včel) (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2018; Čermák et al., 2016).

Bakterie

Škodlivé bakterie jsou příčinou mnoha závažných onemocnění plodu i včel. Řadíme mezi ně hnilobu a mor včelího plodu (Pohl, 2008). Základní bakteriální onemocnění – mor včelího plodu způsobené *Paenibacillus larvae*, je pro napadené kolonie smrtelná choroba. Dále celosvětově rozšířená je bakterie *Melissococcus plutonius* (viz níže)

(Arbia a Babbay, 2010). Jsou to dvě ekonomicky nejvýznamnější bakterie způsobující choroby včel, které postihují plod a jsou široce distribuovány. Potenciálně jsou smrtelné i pro infikované kolonie (Forsgren, 2010).

1.2 *Paenibacillus larvae*

Taxonomie (Sedláček, 2007):

Doména: *Bacteria*

Kmen: *Firmicutes*

Třída: *Bacilli*

Řád: *Bacillales*

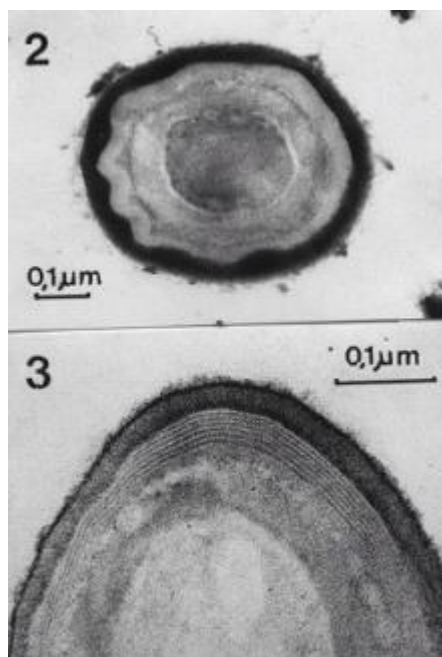
Čeleď: *Paenibacillaceae*

Rod: *Paenibacillus*

Základní charakteristika

Mor včelího plodu je závažnou chorobou způsobenou bakterií *Paenibacillus larvae* napadající, jak napovídá název, plod včel (Hansen a Brodsgaard, 1999). Tyto bakterie zabíjejí nejen infikované larvy, ale pokud není proveden včasný zásah, je také smrtelná pro celé kolonie včelstva (Genersch, 2010). Nemoc je rozšířena globálně a může mít na svědomí značné ekonomické ztráty (De Graaf et al, 2015).

Paenibacillus larvae je sporotvorná, grampozitivní bakterie ve tvaru tyčinky (De Graaf et al, 2015). Pohybuje se pomocí dlouhých bičíků, které má po celém povrchu. Fakultativně anaerobní tyčinky se vyskytují buď jednotlivě, nebo vytvářejí řetězky (Kubišová a Halsbachová, 1992) a jsou velmi odolné vůči chemickým i fyzikálním vlivům (Kollar, 2010). Spory mohou přežívat v prostředí s teplotami více než 100 °C (Madara, 2009) a jsou chráněny několikvrstevným obalem (viz obrázek 1.3). Bakterie produkují velké množství proteáz, které inhibují včelí imunoproteiny, což vede k úhynu larev (Veselý et al., 2003; Bzdil, 2010).



Obrázek 1.3: Spora bakterie s mnohovrstevnými obaly, které chrání bakterii před nepříznivými podmínkami (Ludvík, 2018)

Historie

Poprvé byla nemoc, která se projevila hnilobným zápachem popsána roku 1769 (Hansen a Brodsgaard, 1999), a proto byla nazvána hnilobou plodu. O více než sto let později bylo objeveno, že hniloba má dvě etiopatologické formy, a to mírnou a léčitelnou u otevřeného plodu (dnes hniloba včelího plodu) a druhá forma zhoubná a nevléčitelná otevřeného plodu (dnes mor včelího plodu) (Genersch, 2010). Později byl mor detailněji popsán mikrobiologem Whitem v USA, proto je většinou nazýván jako „American Foulbrood“ (AFB) (Hansen a Brødsgaard, 1999). Také si jako první uvědomil, že existují dvě nemoci s podobnými příznaky, ale způsobené odlišnými bakteriemi. První byla bakterie *Melissococcus plutonius*, způsobující Europe Foulbrood (EFB) a American Foulbrood zapříčiněný bakterií *Paenibacillus larvae* (Genersch, 2010).

Genotypy

Mnohokrát došlo ke změnám pojmenování bakterie. Nejdříve se používal název *Bacillus larvae*, dále byla objevena podobná nová bakterie s názvem *Bacillus pulvificiens* (Katznelson, 1950). Podle analýz byly ale tyto bakterie značně odlišné od rodu

Bacillus, proto vznikl nový rod *Paenibacillus*. Nově pojmenované bakterie *Paenibacillus larvae* a *P. pulvificiens* prošly znovu analýzou a byly přearženy do jednoho druhu *Paenibacillus* a do dvou poddruhů *P. larvae larvae* a *P. larvae pulvificiens* (Ash et al., 1993; Heyndrickx et al., 1996). Poslední změnou bylo zařazení *P. l. larvae* a *P. l. pulvificiens* do společného druhu *Paenibacillus larvae* (Genersch et al., 2006).

Později bylo zjištěno že existuje pouze *Paenibacillus larvae*, který má čtyři genotypy zjištěny pomocí ERIC primerů, a to genotypy ERIC I – IV (Genersch et al., 2006). Jednotlivé genotypy se liší např. virulencí, povrchem spor, barvou kolonií. Nejrozšířenějšími genotypy jsou ERIC I a II (Genersch et al., 2006; Rauch et al., 2009).

Průběh infekce a klinické příznaky

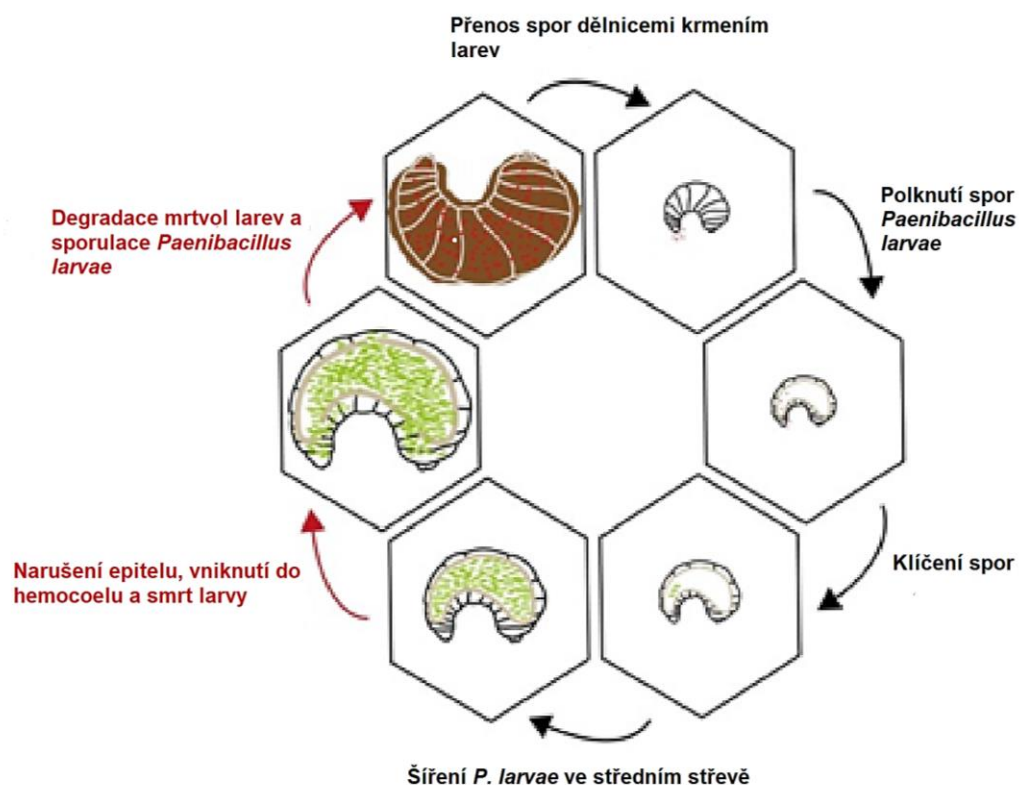
Mladé larvy včel se infikují požitím pouhých deseti spor bakterie z kontaminované potravy. Spory pak vyklíčí ve vegetativní stádium, při této fázi nejsou u larvy viditelné žádné změny (Yue et al., 2008; Djukic et al., 2014; Locke et al., 2019). Proliferují ve středním střevě, kde vylučují sekundární metabolity a tím potlačují přirozenou mikroflóru larvy. Navíc vykazují cytotoxickou aktivitu narušující buňky (Garcia-Gonzalez et al., 2014; Müller et al., 2015).

Nejkritičtějším je pro larvu pátý den života, kdy jsou intenzivně a často krmeny včelami krmičkami. Příznaky se projeví, až když je plod zavíčkovaný a je vidět nepravidelné zaklazení plodu v plástu. Víčka jsou tmavá, propadlá a proděravělá (Pokorný, 2013). Otvor ve víčku plástu dělají včely při kontrole nakaženosti (Titěra, 2009).

Bakterie napadají larvální tkáň a tím zabíjejí larvu hostitele. Jak infekce pokračuje, uhynulé larvy mění barvu z perleťově bílé na šedožlutou až tmavohnědou polotekutou hmotu podobnou lepidlu s charakteristickým zápachem (viz obrázek 1.6) (Duben, 2013; Locke et al., 2019). To je možné odhalit tzv. zápalkovým testem, kdy se vloží sirka do buňky plástve a při vytahování se za sirkou táhne vlákno z rozkládající se larvy (viz obrázek 1.5) (Titěra, 2009). Tato vzniklá „ropná“ hmota a zápach jsou primárním klinickým příznakem diagnostiky AFB (Locke et al., 2019). Poté larvy schnou (Duben, 2013).

Postupující nákazou se rodí čím dál méně mladušek, včelstvo slábne a nakonec uhynie (Titěra et al., 2018). Zbytky mrtvých larev obsahují miliardy extrémně houževnatých bakteriálních spor, díky kterým se toto onemocnění šíří uvnitř kolonií a mezi nimi. Tyto bakteriální spory mohou být životaschopné po celá desetiletí, jsou schopné odolávat dezinfekci a přežít nepříznivé podmínky, jako jsou vysoké teploty nebo UV

záření. Tato odolná povaha bakteriálních spor *P. larvae* představuje obtížný problém pro prevenci a kontrolu AFB (Locke et al., 2019). Cyklus infekce je znázorněn na obrázku 1.4.



Obrázek 1.4: Cyklus infekce bakterie *Paenibacillus larvae* (upraveno podle Popping a Genersch, 2015)



Obrázek 1.5: Zápalkový test, za sirkou se táhne vlákno rozložené uhynu (Titěra et al., 2018)



Obrázek 1.6: Porovnání infikovaných (nečlámkovaných a hnědých) larev se zdravými (Siegbert et al., 2010)

Nejdůležitějším mechanismem odolnosti vůči moru je hygienické chování dospělých včel vůči infikovaným larvám. Toto chování projevují dělnice, které odstraňují infikované larvy z úlu. Spory se objevují přibližně 10–11 dní po vylíhnutí vajíček, kdy se vývojová stádia před kuklou – prepupa vyvíjejí v kutikule pod buňkou uzavřenou voskem. Sporulace je doprovázena smrtí prepupy. Včely odstraňují víčka a odstraňují larvy pod uzavřenými buňkami, když je bakterie ještě ve vegetativní, neinfekční fázi (než zemřou prepupy). Tímto způsobem mohou včely odstranit infikované larvy dříve, než je nemoc pro lidské oko viditelná. Jednotlivé včely mají různé odolnosti vůči nemoci. Mladé larvy (mladší 36–48 hodin) jsou náchylné k infekci, pokud konzumují bakteriální spory v potravě, kterou jim vylučují včely. Starší larvy jsou odolnější (Spivak a Reuter, 2001). Dospělé včely sice spory bakterie přenášejí, ale nikdy se jimi nenakazí (Titěra et al., 2018).

Šíření

Za normálních včelařských podmínek je tato nemoc vysoce nakažlivá, protože její šíření je snadné. A to díky infikované potravě, včelám (přelétávajícím mezi úly a koloniemi) a přenášením medu včelami ze slabších kolonií (Locke et al., 2019). Přenos je možný i roztoči (*Varroa destructor*) a jinými škůdci (Pokorný, 2013). Ale běžná výměna rámu úlu, včely mezi koloniemi a udržování úlů v těsné blízkosti zrychlují šíření nemoci rychleji. Logickou cestou ke snížení počtu epidemií AFB by proto měly být zdokonalení strategie řízení (Locke et al., 2019) a dodržování hygienických pravidel

(nepoužívat staré úly neznámého původu, znečištěné náradí, nepoužívat nedezinfikovaný vosk nebo nenakupovat včelstva bez odborné prohlídky) (Veselý et al., 1985). Jednou strategií je izolovat nemocné kolonie, aby se zabránilo možnosti dalšího šíření nemoci. Včasná detekce je zásadní. Optimálně by měly být spory detekovány v koloniích dříve, než se objeví klinické příznaky. Toho lze nejlépe dosáhnout kultivací bakterií ze vzorků dospělých včel (Locke et al., 2019).

Opatření

V mnoha zemích je mor chorobou, která podléhá hlášení a opatření řídicí se příslušnými zákony. Spalování kolonií a kontaminovaného materiálu je považováno za jediné proveditelné opatření, které zabrání dalšímu šíření nemoci. Je to obvyklým zákonným požadavkem, alespoň ve většině evropských zemí. Když je kolonie infikovaná, ale ještě ne klinicky nemocná, někdy se používá metoda, kdy se včely setřesou na nový hřebenový základ a infikovaný hřeben se zničí. (Ohne, 2003; Pernal et al., 2008; Genersch, 2010).

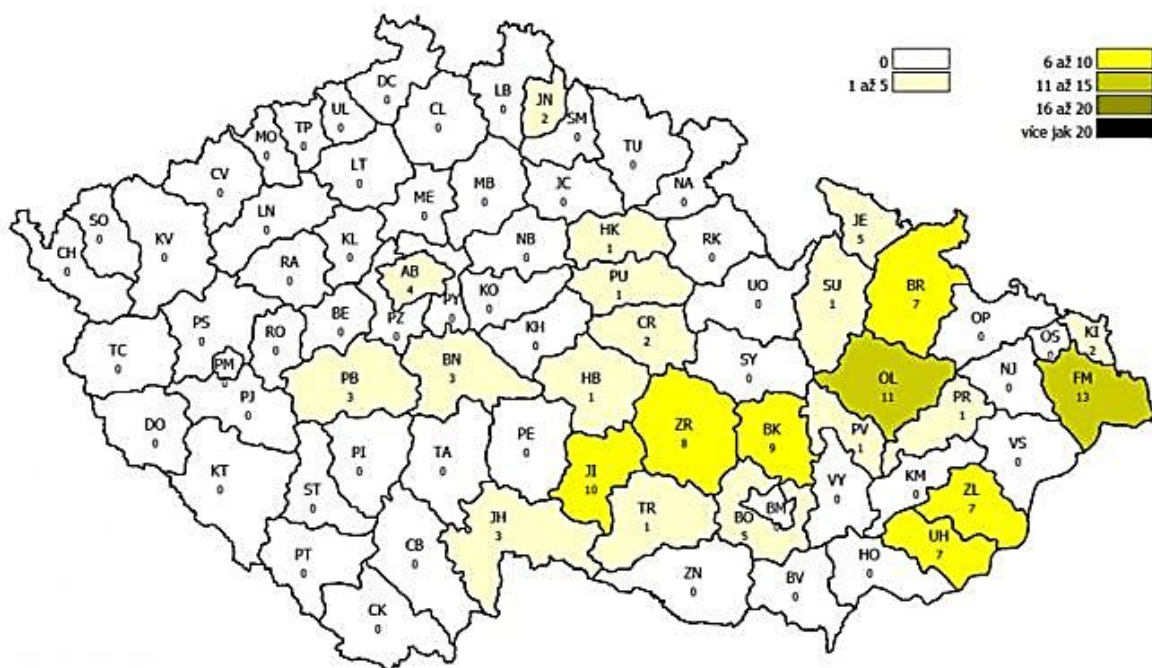
Kvůli této velice nebezpečné nákaze moru včelího plodu (příloha č. 2 zákona č. 166/1999 Sb., o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů-veterinární zákon), jsou radikální opatření nutností, pokud se výskyt nákazy na stanovišti ověří. Při podezření na výskyt této choroby je to chovatel včel povinen oznámit příslušné Krajské veterinární správě (Státní veterinární správa, 2021). Tlumení moru se provádí v následujících krocích: vyhlášení ohniska nákazy a jeho likvidace, stanovení a vyšetření ochranného pásma a v něm omezení pohybu včel, zrušení ochranného pásma době pozorovací (Titěra et al., 2018).

Když se prokáže nákaza s klinickými příznaky a laboratorními testy, vyhlásí Krajská veterinární správa v souladu se zákonem a předpisy ohnisko nákazy a stanoví mimořádná opatření (Dubská, 2018). Pokud je chorobou nakaženo jedno včelstvo, musí se odstranit všechna na daném stanovišti, protože likvidace pouze infikovaného úlu není řešení a odstranění ostatních včelstev je jen otázka času. Problém je tak jen oddálen. Včelaři dostávají podle ustanovení veterinárního zákona náhradu za škodu, ale začínání od nuly není snadné. Bohužel je to jediné opatření, jak nákazu úspěšně zničit nebo aspoň zamezit jejímu šíření (Duben, 2013).

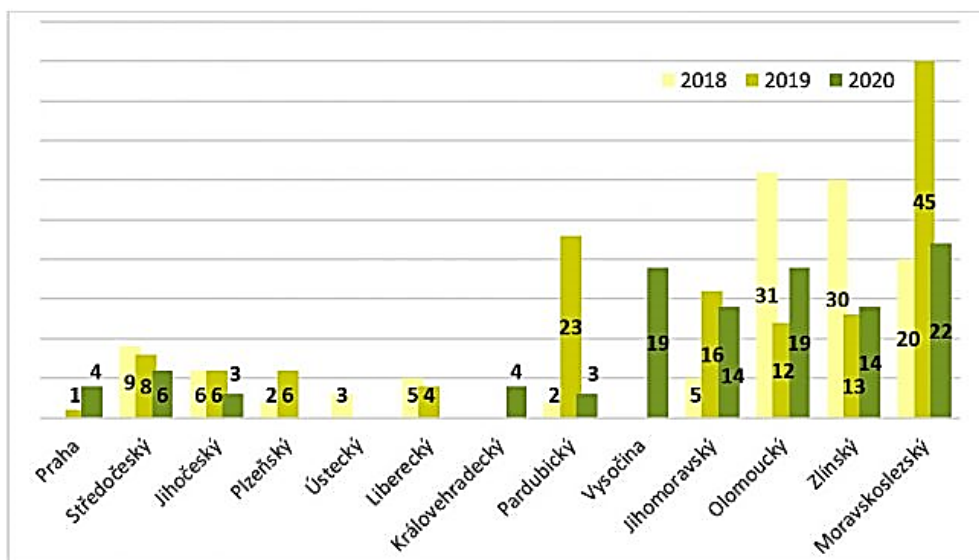
Včely mohou být nakaženy ze zbytků dováženého medu, zejména ze zemí, kde se včely pokoušejí léčit. Při uvolňování těchto medů na trh je zaměřena pozornost na detekci přítomnosti původce nákazy (Duben, 2013).

Zrušení mimořádných opatření může vyhlásit KVS ve shodě se zákonem, což je možné nejdříve po třech měsících od likvidace včelstev. Zavčelování je znovu povoleno po kontrole nálezové situace (Titěra et al., 2018).

V České republice bylo v roce 2020 celkem 108 ohnisek moru včelího plodu. Na rozdíl od předchozího roku došlo k mírnému poklesu v počtu nových ohnisek za rok. Jejich nejvyšší počet z roku 2020 byl v kraji Moravskoslezském, Olomouckém a kraji Vysočina (viz obrázek 1.7) (Státní veterinární správa, 2021). Pro porovnání počtu ohnisek v jednotlivých krajích z roku 2018, 2019 a 2020 je zobrazeno v grafu na obrázku 1.8. V roce 2019 narostl počet vyhlášených ohnisek o téměř 16 % ve srovnání s rokem 2018. V roce 2020 došlo k mírnému poklesu v počtu nově nových ohnisek za rok.



Obrázek 1.7: Výskyt moru včelího plodu v jednotlivých okresech ČR v roce 2020 (Státní veterinární správa, 2021)



Obrázek 1.8: Výskyt ohnisek moru včelího plodu v jednotlivých krajích v letech 2018 až 2020 (Státní veterinární správa, 2021)

Léčba

Antibiotika se mohou používat jako profylaktická léčba v několika zemích, včetně USA a Kanady (Locke et al., 2019). Ale ve většině evropských zemí včetně ČR je užívání antibiotik při léčbě chorob včel zakázáno, včetně ČR. V zemích s povolením se používá buď oxytetracyklin hydrochlorid (OTC) nebo sulfathiazol (Locke et al., 2019). Antibiotická léčba však není udržitelnou strategií, protože pouze maskuje příznaky AFB a neničí bakteriální spory, které řídí šíření nemoci. Navíc chemické zbytky léčiv mohou přetrvávat v medu a tím ovlivnit bezpečnou spotřebu, proto současná legislativa ve většině evropských zemích antibiotika zakazuje. Také mohou mít dopad na vitalitu a životnost larev (Titěra et al., 2018; Locke et al., 2019). Problémem je ale vznik nových rezistentních kmenů, a nutnost vývoje nových antibiotik, i když vznik nových kmenů zůstane stálým problémem (Genersch, 2010). Kvůli zákonům je nutná alternativní léčba např. chov včel se zvýšenou imunitní odpovědí vůči AFB nebo ošetření přírodními antibakteriálními látkami (éterické oleje různých rostlin) (Genersch, 2010).

Paenibacillus larvae může ve vzácných případech uškodit i člověku, kdy se dostane do lidského těla do krve. Jedním příkladem je nákaza z kontaminovaného medu, který použili drogově závislí lidé k ředění látek. Nakažení trpěli horečkami, slabostí, nevolností, ospalostí, slizničním krvácením, chudokrevností nebo se u nich objevovaly problémy s dýcháním a játry (Rieg et al., 2010).

Detekce

Pro potvrzení onemocnění na základě zjištěných klinických příznaků se provádějí laboratorní testy (Dubská, 2018). Moru se totiž může podobat i nemoc způsobená bakterií *Melissococcus plutonius* (Allen a Ball, 1993; Titěra et al., 2018). Přípravují se mikroskopické preparáty, kde se rozeznávají vegetativní sporangia se spory. Dále se pokračuje s kultivací na živných médiích. Jako vzorek pro vyšetření se dá použít nejen plod, ale i med, měl, vosk nebo jiný materiál. Nejmodernější technikou pro detekci moru včelího plodu jsou molekulárně genetické metody PCR (polymerase chain reaction) (Titěra, 2018).

1.3 *Melissococcus plutonius*

Taxonomie (Bailey a Collins, 1982):

Doména: *Bakterie*

Kmen: *Firmicutes*

Třída: *Bacilli*

Řád: *Lactobacillales*

Čeleď: *Enterococcaceae*

Rod: *Melissococcus*

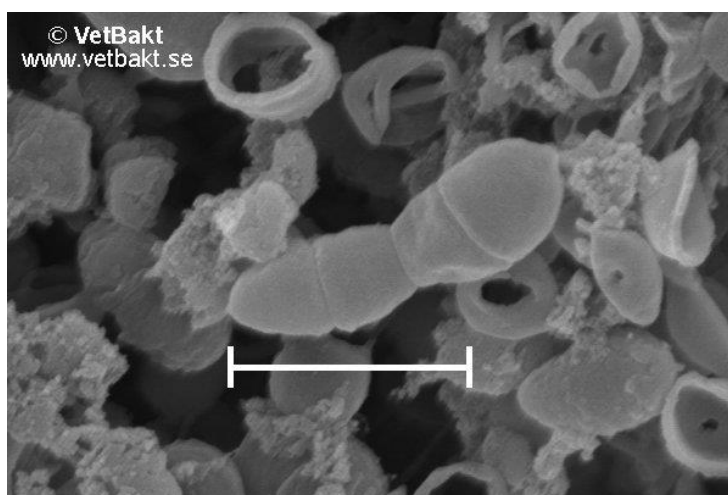
Základní charakteristika

Melissococcus plutonius je bakterie způsobující významné onemocnění včelstva nazvané hniloba včelího plodu. Tato choroba napadá larvy několika druhů včel a je globálně rozšířena. V některých oblastech představuje rostoucí problém a ekonomicky může způsobit velké škody ve včelařství (Forsgren, 2010; Nakamura et al., 2016).

Grampozitivní bakterie *Melissococcus plutonius* je nesporulující, mikroareofická (Cheshire and Cheyne, 1885) a v laboratorních podmínkách se dá přivyknout i na aerobní podmínky. Někdy může být pleomorfní. Podle dostupnosti vzduchu tvoří tvar kokální (v anaerobním prostředí) nebo tyčinkovitou (v prostředí aerobním) (Bailey, 1957). Bakteriální buňky se vyskytují buď jednotlivě, v párech, nebo v různě

dlouhých řetězcích. Pro svůj růst v anaerobním prostředí potřebuje oxid uhličitý (Cheshire and Cheyne, 1885). I když byla bakterie objevena téměř před sto lety, mnohé základní aspekty její patogeneze jsou stále neznámé (Forsgren, 2010).

Hniloba včelího plodu se může příznaky podobat moru včelího plodu, která je způsobena původcem *P. larvae*. Včelaři nemají s touto nemocí příliš velké zkušenosti, kvůli řídkému výskytu v posledních třech desetiletích. Proto není vhodné se spoléhat na klinickou diagnostiku a pro ověření je vhodné nechat vzorky testovat v laboratoři. Hniloba včelího plodu se považuje za ne tak nebezpečnou jako včelí mor, ale některé kmeny jsou velmi virulentní. (Titěra et al., 2018).



Obrázek 1.9: *M. plutonius* ze skenovacího elektronového mikroskopu (Forsgren et al., 2013): délka měřítka odpovídá 1 μm , neporušená bakterie je viditelná uprostřed obrázku

Historie

Hniloba včelího plodu je nazývána jako European foulbrood (EFB). Název „foulbrood“ byl poprvé představen jako popisný název pro včelí chorobu charakterizovanou zápachem (Ashiralieva a Genersch, 2006). Příznaky nemoci byly dále popsány na konci 19. století (Cheshire a Cheyne, 1885), ale až v roce 1912 vyšlo najevo, že jde o dvě nemoci včelího plodu (White, 1912) způsobené sporetvornou bakterií *Paenibacillus larvae* (Genersch et al., 2006) a European foulbrood způsobený bakterií *Melissococcus plutonius*.

I když tato bakterie byla popsána již před sto lety, správné zařazení dostala až nedávno. Nejprve nesla název *Bacillus pluton* (Bailey, 1956), poté kvůli řetězkovým tvarům *Streptococcus pluton* (Bailey 1957). Později podle nových dat byl vytvořen nový taxon a navrženo nové jméno *Melissococcus pluton*. (Bailey a Collins 1982).

V dnešní době je součástí kmene *Firmicutes* čeledi *Enterococcaceae*, jako samostatný rod, a je jeho jediným zástupcem (Forsgren 2009).

Kmeny

U kmenů *M. plutonius* bylo nalezeno 34 sekvenčních typů, které lze rozdělit do tří geneticky odlišných skupin (CC3, CC12 a CC13) podle jejich podobnosti. Liší se např. virulencí. Mezi nejagresivnější komplex patří CC12, kam se řadí atypické kmeny (Budge, et al., 2014; Nakamura et al., 2016).

Průběh infekce a klinické příznaky

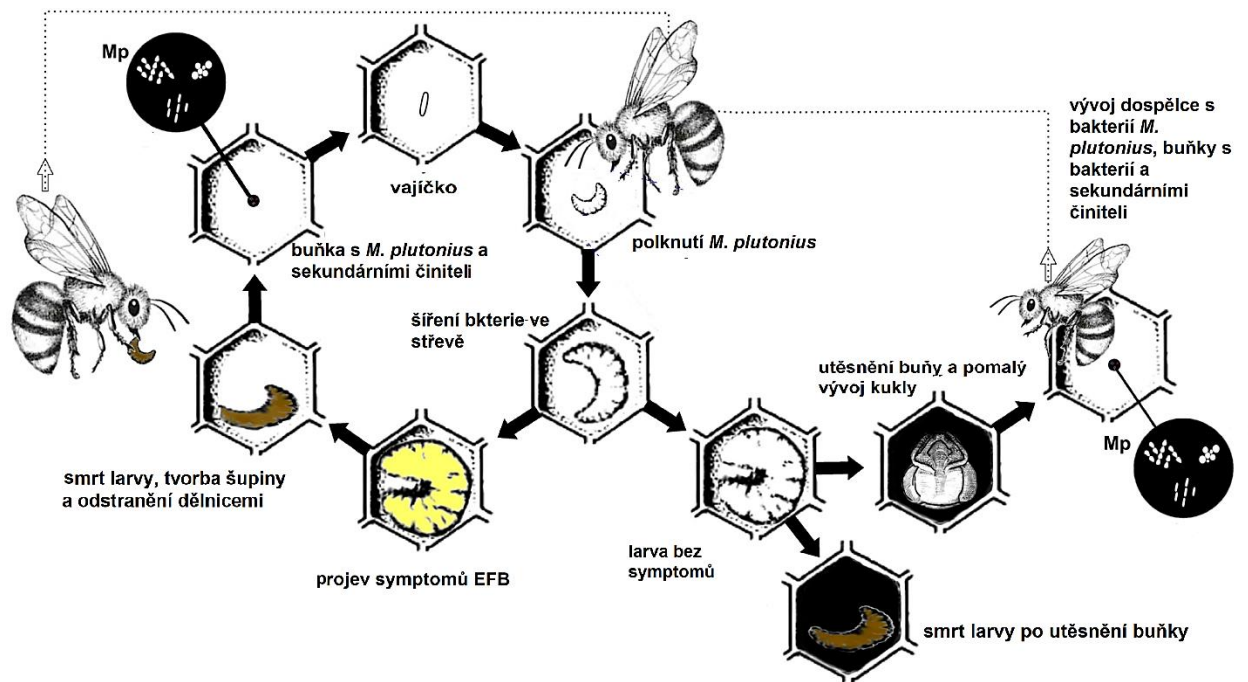
Hniloba včelího plodu ovlivňuje hlavně neuzavřené buňky a larvy včel (Forsgren, 2010). Infekce se do larev dostane požitím kontaminované potravy. Následně *M. plutonius* kolonizuje larvální střevo, kde se masivně množí, dokud nedojde k úmrtí larvy (Williams et al., 2000), která umírá obvykle ve stáří čtyř až pěti dní. (Forsgren, 2010). Larvy jsou náchylné v jakékoli fázi, ale čím jsou starší, tím méně jsou infekcí postiženy (Bailey a Ball, 1991). Méně, než sto bakteriálních buněk dokáže způsobit infekci (Bailey, 1960).

Infikovaná larva, když umírá, má v buňce namísto normální svinuté polohy polohu zkroucenou kolem stěn nebo podélně protaženou. Barva larev se mění z perlově bílé na žlutou. Když nakonec hynou, začnou se rozkládat. Poté měknout a mají nahnědlou barvu (viz obrázek 1.11) (Williams et al., 2000). Po zaschnutí tvoří příškvár, který lze na rozdíl od moru včelího plodu snadno vytáhnout (Titěra et al., 2018).

Většina larev umírá již před zavíčkováním (Titěra et al., 2018), ale některé mohou také zemřít po utěsnění buňky, což má za následek vzhled víčka připomínající příznaky moru včelího plodu. Rozdíly příznaků *M. plutonius* a *P. larvae* jsou shrnuty v tabulce 1.1. Pokud uhynie vysoký podíl larev, buňky vypadají nepravidelně a při přemnožení *Enterococcus faecalis* mají hnilobný nebo kyselý zápach (Forsgren, 2010; Titěra et al., 2018). Larvy hynou působením *M. plutonius* a dále jsou napadány sekundárními bakteriemi, kvůli kterým bylo dříve obtížné identifikovat původce choroby. Byly považovány za jejího spolupůvodce (Tarr, 1938; Bailey, 1957). Mezi některé z nich patří např. *Achromobacter eurydice*, *Enterococcus faecalis* nebo *Paenibacillus alvei* (Bailey, 1957).

Vypuknutí choroby může být spojeno se stresovými podmínkami kolonií jako je nedostatek jídla nebo vody. Svou roli mohou hrát také genetické faktory, počasí a geografie (Bailey, 1961).

Cyklus šíření bakterie *Melissococcus plutonius* je shrnut na obrázku 1.10.



Obrázek 1.10: Cyklus šíření infekce bakterie *Melissococcus plutonius* (upraveno podle De León-Door et al., 2020)



Obrázek 1.11: Příznaky hniloby včelího plodu (Titěra, 2018)

Tabulka 1.1: Shrnutí hlavních klinických rozdílů mezi morem a hnilobou včelího plodu (Vorlíček, 2019)

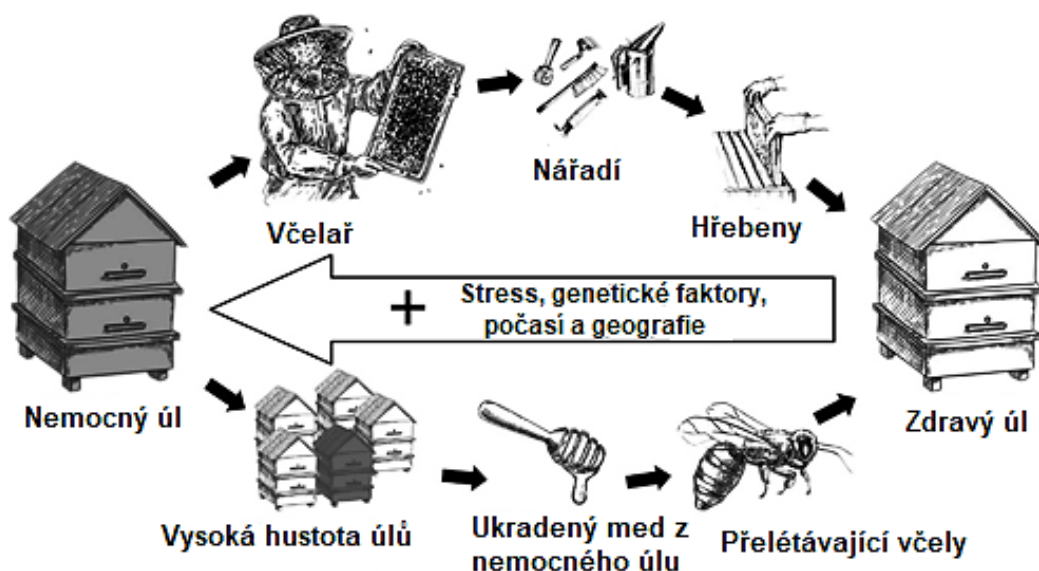
	Mor včelího plodu	Hniloba včelího plodu
Postižený plod	Ve stádiu zavíčkované larvy	Nezavíčkovaný plod
Mezerovitost plodu	Ano	Ano
Vzhled larvy	Ztráta článkování těla, hnědá barva, táhne se za sirkou	Ztráta článkování, žlutá nebo šedohnědá barva
Příškvary	Pevně lpí na buňce	Lze snadno odstranit ze dna buňky
Zápach	Klihovitý zápach	Kyselý zápach

Šíření

Ve včelstvu závisí přenos a přetrvávání patogenů na přežití infikovaných jedinců, kterými se při zakuklení dostávají bakterie spolu s jejich výkaly do hřebenu (Bailey, 1959). *M. plutonius* zůstává v těchto ložiscích životaschopný a potenciálně infekční. Zvládá přežít dlouhá období. Pokud infikovaná larva zemře dříve, než se zakuklí, většina bakterií v ní je z kolonie odstraněna dospělými včelami, které nakažené larvy rychle rozpoznají (Forsgren et al., 2005). Tímto se tvoří nepravidelný vzor, označován

jako mezerovitost plodu, kdy jsou zavíčkované a nezavíčkované buňky po odstranění larev náhodně rozmístěny (Forsgren et al. 2013). Ne všichni jedinci v kolonii jsou zpravidla bakteriemi kolonizováni (Forsgren et al., 2005).

Dospělé včely jsou hlavními roznašeči bakterie, a to nejen v kolonii, ale i mezi včelínů a koloniemi navzájem (Belloy et al., 2007). *P. larvae* se vyskytuje především v tělech dospělých včel, co se starají o potomstvo (Roetschi et al., 2008), ale i v medu a pylu přenášeném infikovanou kolonií (McKee et al., 2004). Pro přenos EFB je důležité rozmístění včelínů. Bylo prokázáno, že vysoká hustota kolonií a včelínů přenos patogena jen podporuje (Belloy et al., 2007). K přenosu bakterie mezi včely mohou také přispět běžné včelařské postupy (Forsgren, 2010), proto je důležité dodržovat zásady správné chovatelské praxe, dezinfekce, výměny rámků a dalšího vybavení (Vorlíček, 2020).



Obrázek 1.12: Cyklus šíření bakterie *Melissococcus plutonius* (upraveno podle De León-Door et al., 2020)

Opatření

Po prokázání výskytu hniloby laboratorními metodami vydává místně příslušná Krajská veterinární správa mimořádná veterinární opatření, která chovatelé včel musí provést. Je vymezeno ohnisko nákazy a ochranné pásmo (Titěra et al., 2018). Včelstva s klinickými příznaky hniloby (Veselý et al. 2003) a materiál se zařízením, které mohlo dojít ke styku s nákazou, musí být zlikvidovány nebo se musí účinně dezinfikovat. Hniloba včelího plodu se nedá přenést na další hospodářská zvířata a člověka (Titěra

et al., 2018). Za likvidaci včelstva má chovatel právo na náhradu. Ochranné pásmo zahrnuje území v okruhu minimálně 5 km kolem ohniska nákazy, kde musí včelaři dodržovat opatření (přesun včelstev a sledování příznaků). Při podezření na výskyt choroby informuje včelař příslušnou Krajskou veterinární správu. (Vorlíček, 2020).

V ČR byla v roce 2019 nákaza po třech letech objevena na území Semilská, ale ze severu se nerozšířila do dalších míst. Celkem v tomto roce Krajské veterinární správy musely likvidovat celkem 16 ohnisek hniloby. V roce 2020 byla zaznamenána na třech územích v Libereckém kraji opět v okrese Semily (v obcích Horní Štěpanice, Horní Branná a Víchová nad Jizerou) a dále v Královéhradeckého regionu (ve Vrchlabí a obci Podhůří-Harta). Hniloba se tedy nerozšířila do jiných míst republiky a všechna ohniska se nacházejí na pomezí dvou zmíněných krajů (Vorlíček, 2020).

Léčba

Stejně jako u moru včelího plodu se dají v některých zemích pro léčbu použít antibiotika jako je OTC, který inhibuje množení *M. plutonius* (Thompson a Brown, 2001). Ale na rozdíl od *Paenibacillus larvae* nebyla projevována rezistence a bakterie jsou stále na antibiotika citlivé (Waite et al., 2003). Např. ve Velké Británii mohou být infikované kolonie léčeny buď OTC nebo metodou otřeseného roje (třepáním včel na nový základ hřebenu, který je poté zničen). Ale při vyhodnocení, že včelstva jsou silně infikována, musí být zničena (Wilkins et al., 2007).

V některých zemích, kde je léčba antibiotiky zakázána, jsou zkoušeny alternativní metody, využívající bakteriostatický účinek přírodních látek, např. extraktů z mechorostů (*Bryophyta*), které mají srovnatelnou aktivitu užívaných antibiotik (Gahtori et al., 2011). Další alternativou je např. aplikace esenciálních olejů (tea tree olej) (Santos et al. 2014). Včely i larvy obsahují přirozeně laktobacily, jedním z nich je *Lactobacillus kunkeei*, který je hojně v larvách a některé jeho kmeny inhibují růst *M. plutonius*, proto by mohly být použity pro vývoj probiotik (Endo a Salminen, 2013).

Léčení hniloby v ČR nepřichází v žádném případě v úvahu (Titěra et al., 2018).

Detekce

Protože je hniloba včelího plodu velice závažná nemoc a doposud nebyla objevena žádná dostatečná léčba, je včasná detekce pro záchranu kolonií a zabránění dalšímu

šířením velice důležitá (Bailey, 1959). Příznaky EFB lze snadno zaměnit s jinými chorobami nebo abnormalitami v plodu, což ztěžuje diagnostiku (Allen a Ball, 1993). Testování může být také komplikované přítomností sekundárních bakterií (Alippi, 1991). Proto jsou důležité laboratorní metody, které nemoc potvrdí. Existují selektivní média pro kultivaci *M. plutonius* zahrnující anaerobní inkubaci na médiu s kvasinkovým extraktem doplněném o cukr, škrob, cystein a draslík (Allen a Ball, 1993). Ačkoli lze *M. plutonius* izolovat z medu a nemocného plodu kultivací, metody bakteriální kultivace nejsou příliš citlivé (Djordjevic et al., 1998). Do laboratoře je nejlepší poslat celý plást, který by měl být pečlivě popsán a prodyšně zabalený. Je vhodné použít papír a karton, kde se vzorky nemohou zapařit a zplesnivit. Podle tvaru bakteriálních typů se volí typ kultivace. Po prokázání hlavního původce hniloby je nutné použít anaerobní podmínky, protože sekundární bakterie *Paenibacillus alvei* může narůst i za aerobních podmínek na obvyklých živných médiích (Titěra et al., 2018).

Testy založené na imunologii (ELISA) a hybridizační analýza založená na sondě jsou další metody, které se dají využít pro detekci a identifikaci *M. plutonius* (Forsgren, 2010). Amplifikace DNA pomocí metody PCR byla použita v řadě různých aplikací, včetně detekce *M. plutonius*. Na konci 90. let byla publikována PCR pro detekci *M. plutonius* u nemocných larev (Govan et al., 1998). Molekulární metody, jako je PCR, umožňují detekovat infekci dřívě, než jsou viditelné klinické příznaky onemocnění (Roetschi et al., 2008).

1.4 *Ascospaera apis*

Taxonomie (Lumbsch a Huhndorf, 2007):

Doména: *Houby*

Kmen: *Ascomycota*

Třída: *Pezizomycotina*

Řád: *Onygenales*

Čeleď: *Ascosphaeraceae*

Rod: *Ascospaera*

Základní charakteristika

Ascospaera apis je parazitická houba napadající včelí larvy a je původcem onemocnění s názvem zvápenatění včelího plodu. I když je smrtelná pro larvy, zřídka zabíjí

celé infikované kolonie. Může ji ale oslabit, a to to vede ke sníženému výnosu medu a náchylnosti k dalším včelím škůdcům i chorobám (Aronstein a Murray, 2010). Toto onemocnění není obvykle tak závažné, protože zdravá včelstva jsou k němu tolerantní. Výskyt je obecně vyšší, když je kolonie vystavena teplotním změnám nebo jiným zdrojům stresu. Mezi některé stresory mohou patřit dlouhá období mokra nebo sucha, špatná výživa, selhávající včelí královna nebo pohyb úlů (Spivak a Reuter, 2001). I když není infekce hlášena veterinární správě, protože není zařazen mezi nebezpečné, není dobré toto onemocnění ignorovat (Titěra et al., 2018). Vyskytuje se po celém světě včetně České republiky (Čermák et al., 2016).

Ascosphaera apis patří mezi heterotalickou houbu, což znamená, že má oddělená pohlaví se dvěma odlišnými formami mycelií. Ta se mohou množit pohlavně po interakci s jiným jedincem odlišného pohlaví (Anderson a Gibson, 1998; Albo et al., 2017; Castagnino et al., 2020). Výsledkem reprodukce jsou kulovité plodnice hnědé barvy, které obsahují sporové koule podobné vakům. Sporové koule se tvoří ve velkém množství a když uzrají, jejich barva se mění od bílé k hnědé, a nakonec černé (Bissett, 1988). Jsou pokryty silnou transparentní vrstvou, ve které jsou askospory, které mají díky této vrstvě velkou odolnost vůči extrémním teplotám, UV záření a různým druhům dezinfekčních prostředků. Proto mohou v prostředí přežít mnoho let (Aronstein a Murray, 2010). Zvápenatění včelího plodu ovlivňuje larvy včel, trubce, a někdy dokonce i královnu (Castagnino et al., 2020).

Historie

Choroba zvápenatění včelího plodu u včel byla objevena počátkem 20. století v roce 1913 Massem, který ji pojmenoval *Pericistic apis* (Maassen, 1913; Albo et al., 2017). Avšak byla přejmenována na *Ascosphaera apis* (Castagnino et al., 2020).

Až do druhé poloviny 20. století nebyla mimo Evropu široce rozšířena (Dreher, 1938; Albo et al., 2017). Jedna z prvních zpráv o houbě mimo Evropu byla na Novém Zélandu v roce 1957 (Seal, 1957). V Severní Americe byla nalezena v polovině 60. let a od roku 1971 začala mít ekonomický dopad (Hitchcock a Christensen, 1972). Nejstarší zprávy o nemoci ve Spojených státech pocházely z Utahu v roce 1965. Později byla v Austrálii poprvé identifikována v Queenslandu v roce 1993, ale za několik let se rozšířila do všech australských států (Hornitzky, 2001). Migrační povaha komerčního včelařství v Severní Americe a Austrálii je pravděpodobně nejdůležitějším faktorem, který přispívá k rychlému šíření choroby na těchto dvou kontinentech (Aronstein

a Murray, 2010). V dnešní době je napadena především severní polokoule (Teixeira, et al., 2018). V posledních desetiletích se v ČR výskyt této nemoci zvyšuje, což může být způsobeno i některými pesticidy a antibiotiky (Čermák et al., 2016).

Infekce a klinické příznaky

Zvápenatění včelího plodu se objevuje nejčastěji na jaře, kdy jsou teploty chladnější. Plody se rychle rozšiřují a menší pracovní síla včel nemůže udržet teplotu hnízda (Borum a Ulgen, 2008; Morawetz et al., 2019), z toho vyplývá, že růst houby ovlivňují faktory jako jsou náhlé změny v teplotách, vlhkost a špatná ventilace v kolonii. Zejména pokud je málo dospělých včel (Natsopoulou et al., 2016).

Kromě podmínek prostředí mohou výskyt a závažnost onemocnění ovlivnit interakce mezi biotickými faktory, jako jsou rozdíly v kmenech hub a genetika včel (různé kmeny mají různou virulenci, vysoká koncentrace spor zvyšuje pravděpodobnost infekce) (Aronstein a Murray, 2010; Castagnino et al., 2020). Hygienickým chováním včel lze předcházet nebo aspoň potlačit onemocnění odstraněním postižených larev (Formato et al., 2007).

První larvy, které jsou postiženy chorobou jsou obvykle ty, které se vyvíjejí kolem okrajů, kde je pro včely obtížnější udržovat teplo. Choroba se šíří, když larvy pohltnou spory hub spolu s potravou (Formato et al., 2007). Nakonec klíčící spora způsobí, že larva umírá hladem, obvykle po uzavření buněk plástů (Veselý, 2013).

Živiny jsou z larev absorbovány částmi hub známých jako mycelia (shluky hyf), tato vlákna pronikají střevní stěnou larvy. Když se rozšíří do celého těla, zahájí se produkce plodnic s novou generací spor (Peroutka a Drobníková, 1987; Jensen et al., 2013; Sarwar, 2016; Albo et al., 2017). Mrtvé kukly jsou pokryté myceliem, které vypadá podobně jako bílá plíseň na chlebu nebo velmi jemná vata. Kukly mohou být také suché a křehké, připomínající kousky křídý, z čehož také vznikl název „chalkbrood“ (Castagnino et al., 2020). Po několika dnech růstu v těle larvy se mycelium vylomí z konce larvy, obvykle ponechá hlavu nedotčenou (Albo et al., 2017; Peroutka a Drobníková, 1987). Larva a houba bobtnají, dokud nenaplní buňku a poté po několika dnech růstu ztvrdne a vytvoří hrudku podobnou „mumii“ (viz obrázek 1.14), kterou můžeme z buňky snadno vyjmout (Titěra et al., 2018). Plodnice nakonec praská a vřeska se sporama se dostanou ven. Po prasknutí se uvolní výtrusy (Peroutka a Drobníková, 1987). 24 hodin po infekci se první příznaky projeví snížením výživy, po 48

hodinách plod včel umírá a nakonec po 72 hodinách se na povrchu mrtvoly jsou viditelná plísňová mycelia (Albo et al., 2017). Mumifikovaná larva mění barvu z bílé na šedočernou, což znamená dokončení životního cyklu hub a vytvoření nových spor schopných infikovat nového hostitele larev (Hornitzky, 2001). Každá mrtvá larva produkuje miliony spor (Formato et al., 2007), které se lepí na komponenty úlu, pyl a dospělé včely, med a také může přežít v půdě (Čermák et al., 2016). Víčka s infikovaným plodem jsou skvrnitá a lehce propadlá, což naznačuje odstraňování larev hygienickým chováním dělnic (Peroutka, Drobníková, 1987; Sarwar, 2016). Plod tvoří kašovitou hmotu, poté začínají být viditelné chomáčky bělavých hyf (Peroutka, Drobníková, 1987). Před úly jsou vynešené mumie larev, které mohou být pozorovány i na dně úlu (Čermák et al., 2016; Titěra et al., 2018).



Obrázek 1.13: Larvy prorostlé *Ascospaera apis* (Titěra, 2018)



Obrázek 1.14: Zvápenatěné mumie larev (Castagnino, 2020)

Šíření

Pokud včely dělnice odstraní mumifikované larvy z úlu před vytvořením spor (před přechodem mumifikovaných larev do šedočerné barvy), bude šíření houby v úlu omezeno. Rychlost šíření onemocnění je pravděpodobně závislá na úrovni produkce konkrétního plísňového kmene (rychlost klíčení spor a účinnosti šíření) (Flores et al., 2005). I když dospělé včely nejsou náchylné k tomuto patogenu, mohou přenášet nemoc uvnitř úlu i mezi nimi. Přenos infekce mezi dospělými včelami v kolonii probíhá prostřednictvím sdílené potravy jejím přenášením na larvy, které jsou krmeny. Za přenosu mezi spravovanými koloniemi je většinou zodpovědný včelař kvůli kontaminovaným materiálům, kdy převádí hřebeny. Náchylné je především oslabené včelstvo. Rizikové je také příliš blízké uspořádání úlů vedle sebe. (Gilliam a Vandenberg, 1997; Simone-Finstrom et al., 2018) a rovněž i dovoz medu nebo pylu s přítomností spor *A. apis* do míst, z nichž se může zvápenatění včelího plodu dostat do regionů, kde nemoc ještě není rozšířena (Castagnino et al., 2020). Spory se mohou hromadit na všech částech úlu a ve všech produktech (např. základový vosk, skladovaný pyl a med). Zůstávají životaschopné po dobu nejméně 15 let. Jakýkoli materiál úlu kontaminovaný spory hub slouží jako dlouhodobý zdroj infekce (Anderson et al., 1997; Flores et al., 2005).

Opatření

Pokud je identifikována nákaza ve včelstvu, je třeba je ho co nejvíce zúžit (Švancer, 1977). Toto onemocnění nepodléhá hlášení veterinární správě (včetně ČR), ale při přítomnosti napadení včelstva je nutno vyřadit napadené plásty, které se však nemusí

pálit. Stačí použít teplotu zpracování vosku, která dokáže výtrusy zneškodnit (Peroutka, Drobníková, 1987). Účinná je také aplikace par kyseliny mravenčí (Formidol) (Kamler et al., 2018). Houba *A. apis* je rezistentní vůči biocidům jako je kyselina sírová, jodované látky a další produkty, které běžně slouží k dezinfekci úlů infikovaných nemocí. Odstranění ohniska nemoci se tedy stává obtížnějším úkolem (Wilson et al., 2015). Úl, pracovní oděv s a náradí je třeba pečlivě dezinfikovat (Peroutka, Drobníková, 1987). V několika zemích se považuje zvápenatění včelího plodu za chorobu podléhající hlášení úřadům při objevení příznaků (Jensen et al. 2013).

Léčba

Bylo testováno mnoho léků, ale přetrvávání spor dělá chorobu neodstranitelnou. Nejlepším řešením se zdá být podávání sirupu sacharózy okyseleného citronovou šťávou, octem nebo kyselinou askorbovou. Důležitá je samozřejmě prevence, jako jsou správné postupy řízení včelína (výběr vhodných míst a odolných královen, zajištění dostatek potravinových zásob v úlu, popřípadě také umělé krmení) (Formato et al., 2007). Studie prokázaly další chování kolonie ve snaze snížit možnost infekce *A. apis*.

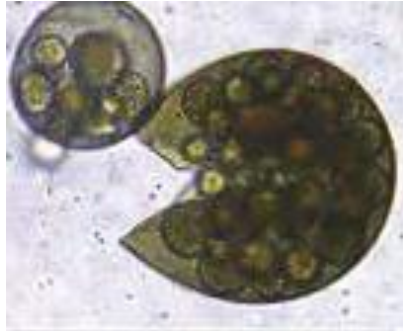
Včely rozpoznají tuto nemoc a reagují na zamoření zvýšením teploty v oblasti s plody. Cílem je tímto zvýšením teploty snížit růst mycelia a zbránění infekci zdravých larev protože *A. apis* jsou citlivé a nevyvíjejí se při teplotě nad 35 °C (Starks et al., 2000).

Proběhlo mnoho studií se zaměřením na účinky přírodních látek proti této chorobě. Např. éterické oleje z aromatických rostlin (*Litsea cubeba*, *Pelargonium graveolens*, *Croton bonplandianus*) prokázaly značnou účinnost (Ansari et al., 2015; Nardoni et al., 2018). Jiným produktem netoxickým pro včely je propolis, který má antimikrobiální aktivitu (Wilson et al., 2015). Další možností může být selekce včel s lepším hygienickým chováním vybraných královen. Není ale snadné takové včely selektovat a chovat (Liu et al., 2016).

Detekce

Choroba se detekuje především podle klinických příznaků, které ale mohou být zaměněny s jinými onemocněními jako je např. zkamenění včelího plodu (Čermák et al., 2016). Proto se zkoumají výtrusy hub, které jsou snadno rozeznatelné pod mikroskopem díky plodnici, jež má charakteristická otevírající se vřevka s výtrusy (viz obrázek

1.15) (Peroutka a Drobníková, 1987). Identifikace houby se dá provést i kultivací na médiích především s velkým obsahem cukru, na kterých tvoří hustá bílá mycelia. Pro přesnou detekci se používají molekulární diagnostiky, díky specifických primerů metodou PCR (Castagnino et al., 2020). Garrido-Bailón a kolektiv objevil PCR metodu, která dokáže detekovat více patogenních bakterií včel najednou, jako je *P. larvae*, *M. plutonius* a *A. apis* (Garrido-Bailón et al., 2013).



Obrázek 1.15: Vřecko s výtrusy houby *Ascospaera apis* (Li, 2018)

2 Cíle práce

1. Izolace DNA z včelích dělnic pomocí CTAB pro následnou PCR analýzu.
2. PCR analýza vzorků včelstev na nemoci způsobené patogeny *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius*, a *Ascosphaera apis*.
3. Přечиštění a úprava vybraných pozitivních vzorků na sekvenování.
4. Ověření specifity použitých primerů pomocí sekvenování amplifikovaných fragmentů.

3 Materiál a metody

3.1 Vzorky

Vzorky včel byly odebrány z různých míst velkých měst a oblastí České republiky pro porovnání výskytu onemocnění v místech různě ovlivněných zemědělstvím. Vzorky byly odebrány z měst a okolí Českých Budějovic, Prahy, Plzně, Ostravy, Brna a Šumavy. Informace jsou podrobně shrnuty v tabulce 3.1.

Pro detekci patogenů byly použity včelí dělnice z jednotlivých včelstev na stanovištích, které byly usmrceny na místě zamražením v suchém ledu a uchovány při teplotě -80 °C. DNA ze včel jednoho stanoviště byla izolována pro každý úl zvlášť. Všechna izolovaná DNA z celého stanoviště byla smíchána do jednoho vzorku pro vyhodnocení pomocí PCR.

Tabulka 3.1: Vzorky odebrané z různých stanovišť ČR

Číslo vzorku	Stanoviště	Číslo vzorku	Stanoviště
	<u>České Budějovice město</u>	26.	SB
1.	HKG	27.	BŠ
2.	SR	28.	PS
3.	PK		<u>Plzeň město</u>
4.	VP	29.	KB
5.	BK		<u>Plzeň okolí</u>
	<u>České Budějovice okolí</u>	30.	TK
6.	MS	31.	NŠ
7.	DK	32.	NH
8.	MŠB	33.	NM
9.	KŠI	34.	MŠP
10.	MB		<u>Ostrava město</u>
	<u>Šumava</u>	35.	BZ
11.	AŠ	36.	BČ
12.	PČ	37.	LVF
13.	PVČ	38.	MR

14.	BG	39.	SV
15.	KT		<u>Ostrava okolí</u>
16.	DM	40.	RVS
	<u>Praha město</u>	41.	HSŽ
17.	SN	42.	BN
18.	SH	43.	FMV
19.	ČFU	44.	HOB
20.	HIU	45.	HSF
21.	ZMU		<u>Brno město</u>
22.	ZKK	46.	CHF
	<u>Praha okolí</u>	47.	MHJ
23.	UJV	48.	MHJ2
24.	BKB	49.	BS
25.	OB	50.	MP

3.2 Příprava vzorků

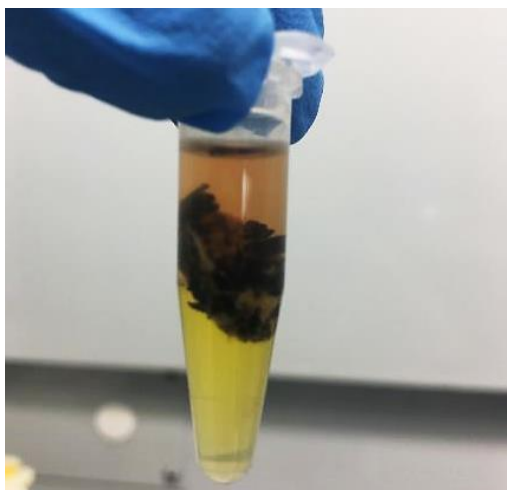
Vzorky včel z jednotlivých úlů byly rozdrceny ve sterilizované keramické třecí misce za použití kapalného dusíku, aby jednotlivé vzorky zůstaly zmrazené pro snadnější homogenizaci a zabránění enzymatické degradaci vzorku.

3.3 Izolace

Metodám laboratorní identifikace onemocnění včel předchází izolace DNA. Kvalita vyizolované DNA je předpokladem pro správnou detekci. Princip metody při použití CTAB (cetyltrimetylamoniumbromidu) jako detergentu je jeho schopnost vytvářet komplex s nukleovými kyselinami, který je rozpustný při vysoké koncentraci solí, ale při koncentraci snížené tvoří sraženinu. CTAB má také důležité vlastnosti, díky kterým dokáže uvolnit DNA z membrán a proteinů, což je hlavním účelem při extrakci. Díky rozdílné rozpustnosti CTAB s DNA se oddělují a získá se tak dostatečně čistá DNA (Murray a Thompson 1980).

Postup izolace DNA

1. Předehřála jsem extrakční pufr (495 μ l extrakčního pufru CTAB a 5 μ l b-merkapt ethanolu).
2. Do sterilních 1,5ml mikrocentrifugačních zkumavek jsem připravila cca 50-200 mg vzorku včel.
3. Přidala jsem připravený extrakční pufr a směs jsem zhomogenizovala.
4. Roztok jsem nechala inkubovat 5 minut při 65 °C a během inkubace 1x lehce promíchala.
5. Přidala jsem 500 μ l chloroform-IAA a 5 minut nechala protřepávat.
6. Směs jsem nechala centrifugovat 5 minut na maximální rychlost při pokojové teplotě
7. Vodnou fázi (viz obrázek 3.1) jsem přepipetovala do nových zkumavek a přidala 2/3 objemu izopropanolu (200 μ l) a lehce promíchala.
8. Přepipetovaný roztok jsem nechala inkubovat 10 minut v mrazáku (-20 °C)
9. Poté jsem vzorky centrifugovala 5 minut při 4 °C na maximální rychlost a odstranila supernatant.
10. Přidala 1 ml ledového 70% etanolu, dala do centrifugy na 5 minut na maximální rychlost při 4 °C.
11. Odstranila jsem supernatant a usušila pelet.
12. Pelet jsem rozpustila při 37 °C ve 150 μ l TE – pufru
13. DNA se uchovává v mrazáku při -20 °C.



Obrázek 3.1: Oddělená pevná a vodná fáze při izolaci DNA

3.4 PCR

Účelem PCR je amplifikace určitých úseků DNA, kdy jsou známy nukleotidové sekvence, jimiž je zkoumaný úsek DNA ohraničen. Na tyto sekvence komplementárně nasedají primery (reverse a forward), které jsou součástí PCR směsi. Do této směsi patří také Master Mix jehož složkami je DNA polymeráza, čtyři druhy deoxynukleosidtrifosfátů, Mg_2^+ ionty pufr. Dále se přidává voda a DNA se zkoumaným úsekem. Množství těchto složek použité v této práci jsou v tabulce 3.2.

K detekci moru, hniloby a zvápenatění včelího plodu byla použity specificky navržené primery, charakteristické pro danou chorobu. Tyto primery fungují za určité teploty nasedání. Při amplifikaci vzniká fragment určité délky. Tyto informace jsou shrnuty v tabulce 3.3.

PCR metoda probíhá v cyklicky se opakujících reakcích v několika fázích závislých na teplotě (denaturace, annealing, elongace). Teplota denaturace je závislá na počtu párů guanin-cytosin, které jsou vázány trojnou vazbou. Tato vazba je odolnější než vazba dvojná, proto je nutná vyšší teplota pro rozpojení řetězců. Vhodná teplota pro annealing se vybírá podle složení, délky a teploty tání specifických primerů. Teplota elongace závisí na použité DNA polymeráze. Tabulky 3.4-3.6 znázorňují tento cyklus reakce pro jednotlivé patogeny. Celkový objem reakce byl 10 μ l.

Tabulka 3.2: Složení směsi pro PCR reakci

Látka	Množství (μl)
Master Mix	5
F primer	0,25
R primer	0,25
Voda	3,5
DNA	1

Tabulka 3.3: Sekvence použitých primerů

Patogen	Sekvence primerů	Velikost fragmentu	Teplota nasedání	Zdroj
<i>Paenibacillus larvae</i>	GCTCTGTTGCCAAGGAAGAA	451 bp	55 °C	Bakonyi et al. (2003)
	AGGCGGAATGCTTACTGTGT			
<i>Melissococcus plutonius</i>	GAAGAGGAGTAAAAGGCGC	812 bp	55 °C	Govan et al. (1998)
	TTATCTCTAAGGCGTTCAAAGG			
<i>Ascosphaera apis</i>	TGTGTCTGTGCGGCTAGGTG	136 bp	60 °C	Garrido-Bailón et al. (2013)
	GCTAGCCAGGGGGGA ACTAA			

Tabulka 3.4: Průběh PCR reakce pro *Paenibacillus larvae* (Govan et al., 1999)

Krok	Teplota (°C)	Čas
Denaturace a aktivace	95	5 min
Denaturace	95	30 s
Annealing	55	30 s
Elongace	72	40 s
Opakování kroků 2-4		35 x
Závěrečná elongace	72	5 min
Chlazení	4	∞

Tabulka 3.5: Průběh PCR reakce pro *Melissococcus plutonius* (Govan et al., 1998)

Krok	Teplota (°C)	Čas
Denaturace a aktivace	95	5 min
Denaturace	95	30 s
Annealing	55	30 s
Elongace	72	1 min
Opakování kroků 2-4		35 x
Závěrečná elongace	72	5 min
Chlazení	4	∞

Tabulka 3.6: Průběh PCR reakce pro *Ascospaera apis* (Garrido-Bailón et al., 2013)

Krok	Teplota (°C)	Čas
Denaturace a aktivace	95	5 min
Denaturace	95	10 s
Annealing	60	30 s
Elongace	72	1 min
Opakování kroků 2-4		35x
Závěrečná elongace	72	10 min
Chlazení	4	∞

3.5 Gelová elektroforéza

Kontrola výsledků PCR reakce byla vyhodnocena gelovou elektroforézou, při které se oddělují od sebe různě dlouhé fragmenty DNA díky elektrickému proudu. Na gelu se DNA se záporným nábojem pohybuje k anodě. Amplifikovaný fragment dvouvláknové DNA je pomocí EtBr (ethidium bromid) vizualizován pod UV světlem. Pro tuto analýzu byl použit 1,5% agarózový gel a pro porovnání velikostí separovaných DNA fragmentů byl použit 100bp marker (ladder). Poloha jednotlivých bandů markeru se porovnává s polohou separovaných fragmentů pro zjištění jejich velikostí. Výsledný gel byl pomocí UV transiluminátoru vyhodnocen a snímán pod fotoaparátem.

3.6 Sekvenování

DNA s pozitivními výsledky na choroby včel, byly pod UV z gelu vyříznuty a následně přečištěny pomocí kitu Nucleospin[®] and PCR Clean-up (Macherey Nagel). Podle doporučení výrobce. Po opakované amplifikaci byly PCR produkty zbaveny pomocí enzymatické směsi Exo/SAP nenávaných nukleotidů a primerů. Nakonec byly vzorky zaslány do laboratoře firmy SEQme, kde byly osekvenovány. Získané sekvence byly porovnány s referenční sekvencí z databáze NCBI (Benson et al., 2018).

Postup přečištění (izolace) DNA z agarózového gelu a příprava vzorku na sekvenování

1. Vyříznutý DNA fragment z gelu jsem dala do sterilní 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky
2. Přidala jsem 200 µl pufr NTI.
3. Vzorek jsem inkubovala 5-10 minut na 50 °C a vortexovala každé 2-3 minuty, dokud nebyl gel úplně rozpuštěn.
4. NucleoSpin[®] Gel a PCR Clean-up zkumavku s filtrem jsem umístila do sběrné zkumavky a přidala 700 µl vzorku.
5. Vzorek jsem vložila do centrifugy na 1 minutu na 11 000 x g.
6. Odstranila jsem přefiltrovanou fázi a zkumavku vložila zpět do sběrné zkumavky.
7. Přidala jsem 700 µl pufru NT3 do zkumavky a centrifugovala na 1 minutu na 11 000 x g.
8. Odstranila jsem přefiltrovanou fázi a umístila zkumavku zpět do sběrné zkumavky.
9. Vzorek jsem vložila do centrifugy na 1 minutu na 11 000 x g pro úplné odstranění pufru NT3.
10. NucleoSpin[®] Gel a PCR Clean-up zkumavku jsem umístila do nové 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky a přidala 20 µl pufru NE.
11. Vzorek jsem inkubovala při pokojové teplotě na 1 minutu a vložila do centrifugy na 1 minutu při 11 000 x g.
12. S přečištěnou DNA jsem znovu provedla PCR reakci s příslušnými primery. Přidala jsem 2 µl směsi Exo/SAP a dala do termocykleru na příslušný program (viz tabulka 3.7).
13. Nakonec jsem přidala do vzorku 5 µl forward primeru, který značí začátek sekvenování.

Exo/SAP

Metoda přečištění Exo/SAP využívá dva hydrolytické enzymy. Exonukleázu I a alkalickou fosfatázu pro odstranění nadbytečných dNTP a primerů. Exonukleáz I rozštěpí jednořetězcové primery a alkalická fosfatáza defosforyluje zbytkové dNTPs (USB Corporation, 2000; Nádvorník, 2019). PCR produkt se inkubuje při 37 °C a tepelně inaktivuje na 15 minut při 80 °C. Poté se směs nechá zchladit na 4 °C (Nádvorník, 2019 (viz tabulka 3.7).

Tabulka 3.7: Program při přečištění směsi Exo/SAP

Teplota (°C)	Čas (min)
37	15
80	15
4	∞

4 Výsledky

4.1 Koncentrace DNA

Kvalita a dostatečná koncentrace získané DNA směsných vzorků byla ověřena pomocí spektrofotometru BiospecNano (Shimadzu). Koncentrace jednotlivých stanovišť jsou zaznamenány v tabulce 4.1.

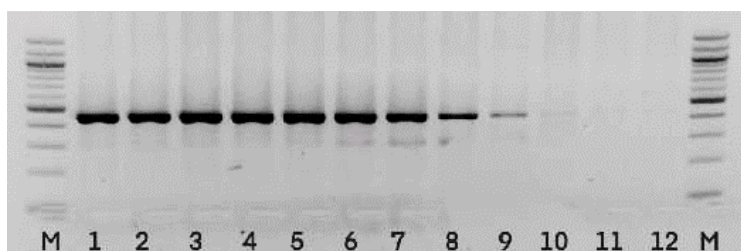
Tabulka 4.1: Koncentrace DNA vzorků z jednotlivých stanovišť

Stanoviště	Koncentrace DNA (ng/μL)	Stanoviště	Koncentrace DNA (ng/μL)
<u>České Budějovice město</u>		SB	386,45
HKG	687,45	BŠ	234,24
SR	313,67	PS	699,67
PK	662,33	<u>Plzeň město</u>	
VP	780,56	KB	447,46
BK	661,84	<u>Plzeň okolí</u>	
<u>České Budějovice okolí</u>		TK	637,24
MS	179,76	NŠ	359,52
DK	462,86	NH	589,56
MŠB	348,65	NM	863,56
KŠI	525,78	MŠP	252,13
MB	727,84	<u>Ostrava město</u>	
<u>Šumava</u>		BZ	301,56
AŠ	1011,42	BČ	693,76
PČ	124,32	LVF	484,59
PVČ	130,41	MR	896,42
BG	771,27	SV	283,36
KT	155,10	<u>Ostrava okolí</u>	
DM	645,56	RVS	571,36
<u>Praha město</u>		HSŽ	400,51
SN	505,63	BN	346,56
SH	563,87	FMV	619,17

ČFU	471,35	HOB	593,24
HIU	812,32	HSF	527,37
ZMU	507,34	<u>Brno město</u>	
ZKK	616,23	CHF	1019,34
<u>Praha okolí</u>		MHJ	570,33
UJV	710,46	MHJ2	868,18
BKB	970,89	BS	373,23
OB	358,28	MP	342,69

4.2 Gradientová PCR

Pro upřesnění teploty nasedání primerů u bakterie *Paenibacillus larvae* kvůli falešným pozitivním výsledkům byla provedena gradientová PCR. Specifické nasedání primerů bylo vyhodnocováno od teploty 45-65 °C (viz obrázek 4.1).

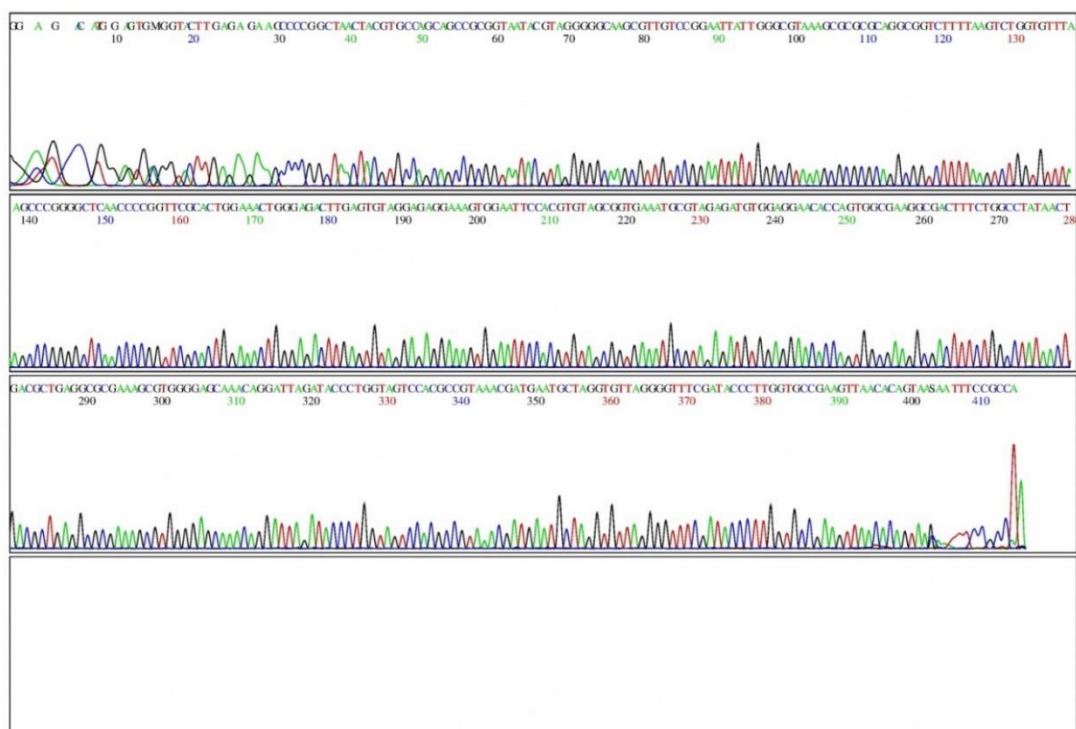


Obrázek 4.1 Elektroforeogram gradientové PCR primerů specifických pro *Paenibacillus larvae*: Sloupec M – 100bp marker, 1 – 44,9 °C, 2 – 45,3 °C, 3 – 46,6 °C, 4 – 48,5 °C, 5 – 50,8 °C, 6 – 53,4 °C, 7 – 56,1 °C, 8 – 58,7 °C, 9 – 61,1 °C, 10 – 63,1 °C, 11 – 64,5 °C, 12 – 65,1 °C

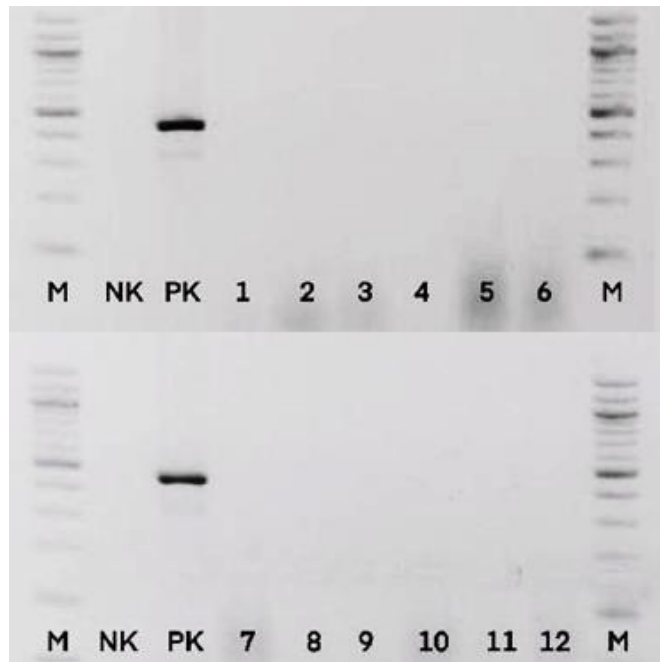
Na výsledném elektroforeogramu gradientové PCR pro optimalizaci teplot nasedání primerů u *Paenibacillus larvae* (obrázek 4.1) byl pro kontrolu použit 100bp marker (M). Nejvhodněji vyšla pro použití teplota 50,8 °C, u které je zobrazena největší koncentrace amplifikovaných fragmentů a nezobrazoval se navíc fragment s kratší délkou.

4.3 *Paenibacillus larvae*

Z dat získaných ze sekvenování v podobě chromatogramu (viz obrázek 4.2) byl vybrán fragment a vložen do databáze NCBI (Zhang, et al., 2000) pro nalezení shodujících se sekvencí a jejich porovnání. Fragment se shodoval s nalezenou sekvencí pro bakterii *Paenibacillus larvae* na 100 %.

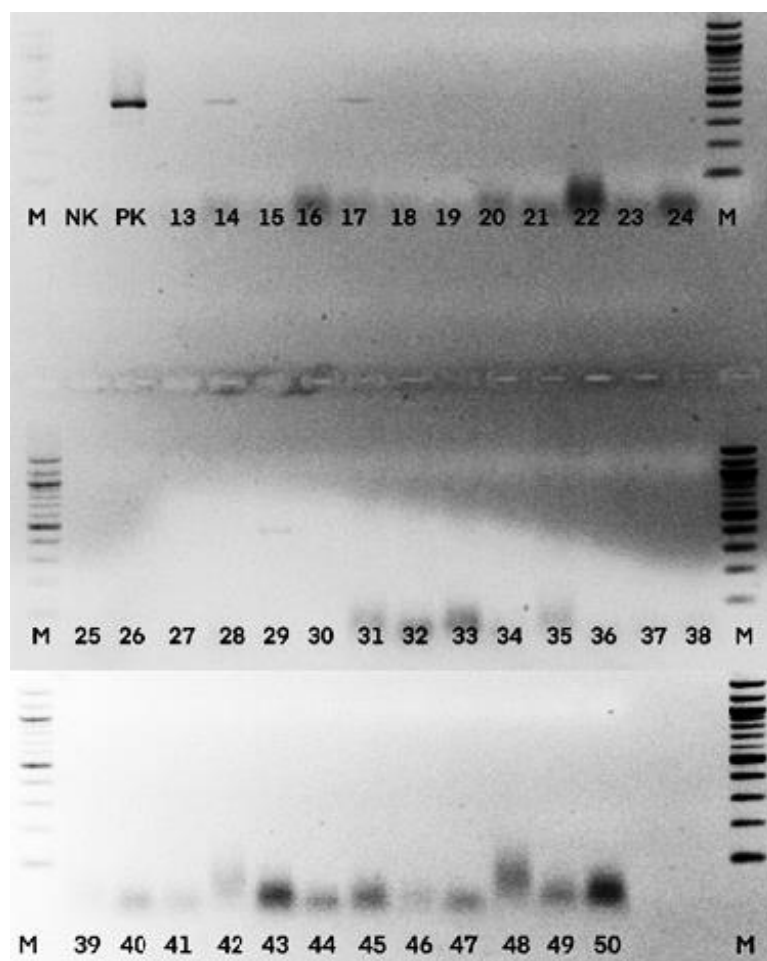


Obrázek 4.2: Sekvence fragmentu amplifikovaného pomocí primerů pro *Paenibacillus larvae*



Obrázek 4.3: Elektroforeogram vzorků 1-12 amplifikovaných pomocí primerů specifických pro *Paenibacillus larvae*: Sloupec M – 100bp marker, NK – negativní kontrola, PK – pozitivní kontrola, 1-12 analyzované vzorky, 1 – KB, 2 – TK, 3 – NŠ, 4 – MŠP, 5 – NM, 6 – NH, 7 – AŠ, 8 – PČ, 9 – PČV, 10 – BG, 11 – KT, 12 – DM

Na obrázku 4.3 je zobrazen elektroforeogram analýzy vzorků 1-12 testovaných na přítomnost bakterie *Paenibacillus larvae*. Pro kontrolu a porovnání byl použit negativní vzorek bez DNA (NK), pozitivní vzorek s DNA daného patogenu (PK) a 100 bp marker (M). Pozitivně nebyl patogen detekován u žádného ze vzorku.

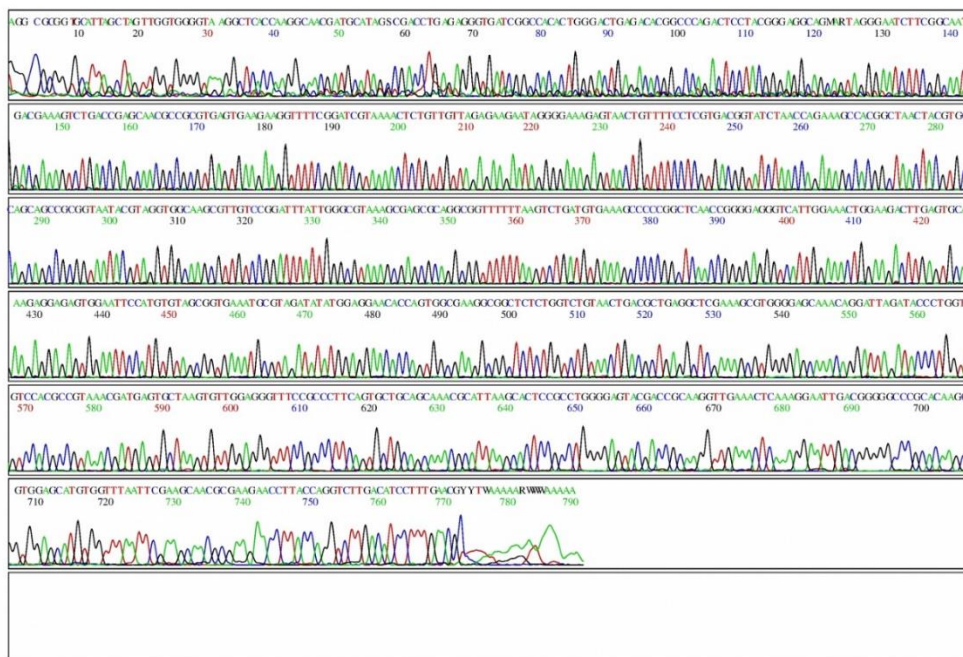


Obrázek 4.4: Elektroforeogram vzorků 13-50 amplifikovaných pomocí primerů specifických pro *Paenibacillus larvae*: Sloupec M – 100bp marker, NK – negativní kontrola, PK – pozitivní kontrola, 13-50 analyzované vzorky, 13 – BZ, 14 – BČ, 15 – LVF, 16 – MR, 17 – SV, 18 – RVS, 19 – HSŽ, 20 – BN, 21 – FMV, 22 – HOB, 23 – HSF, 24 – CHF, 25 – MHJ, 26 – MHJ2, 27 – BS, 28 – MP, 29 – SN, 30 – SH, 31 – ČFU, 32 – HIU, 33 – ZMU, 34 – ZKK, 35 – UJV, 36 – BKB, 37 – OB, 38 – SB, 39 – BŠ, 40 – PS, 41 – HKG, 42 – SR, 43 – PK, 44 – VP, 45 – BK, 46 – MS, 47 – DK, 48 – MŠB, 49 – KŠI, 50 – MB

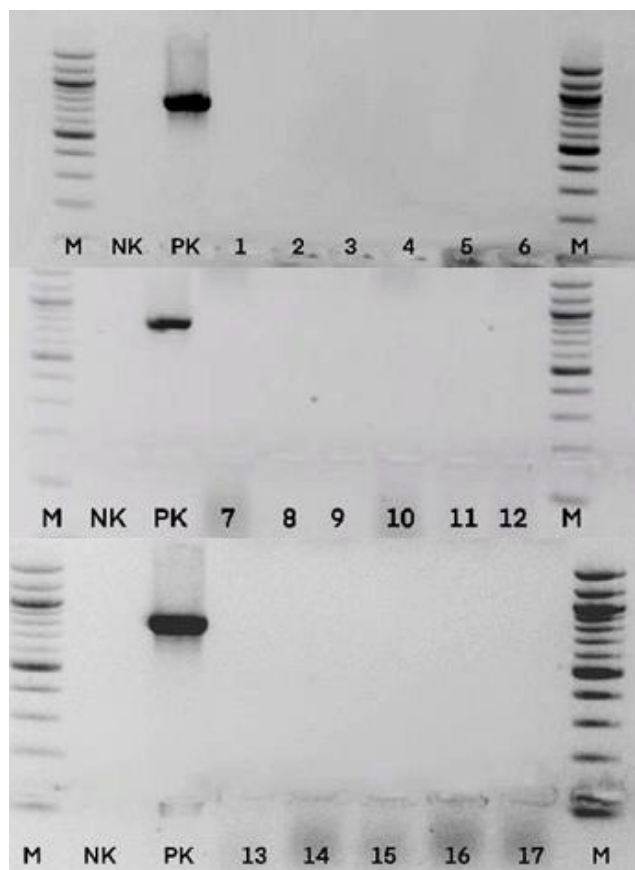
Na obrázku 4.4 je zobrazen elektroforeogram analýzy vzorků 13-50 testovaných na přítomnost bakterie *Paenibacillus larvae*. Pro kontrolu a porovnání byl použit negativní vzorek bez DNA (NK), pozitivní vzorek s DNA daného patogenu (PK) a 100 bp marker (M). Pozitivně byl patogen detekován u vzorku 14 (BČ), 17 (SV) a 29 (SN).

4.4 *Melissococcus plutonius*

Z dat získaných ze sekvenování v podobě chromatogramu (viz obrázek 4.5) byl vybrán fragment DNA a vložen do databáze NCBI (Zhang, et al., 2000) pro nalezení shodujících se sekvencí a jejich porovnání. Fragment se shodoval s nalezenou sekvencí pro *Melissococcus plutonius* na 100 %.

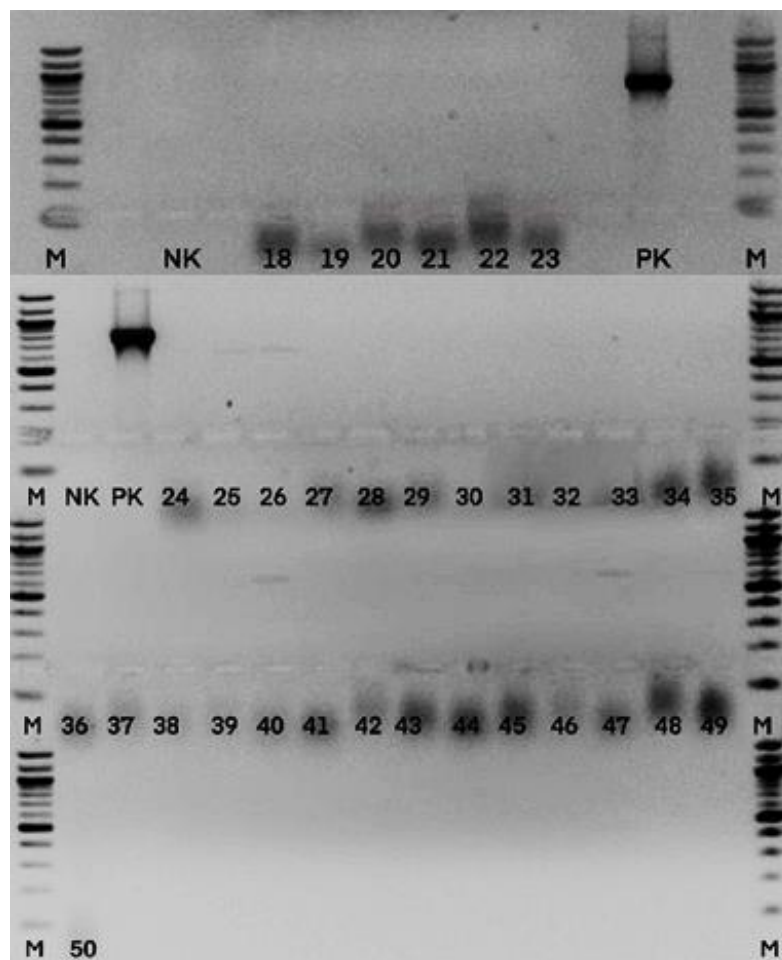


Obrázek 4.5: Sekvence fragmentu amplifikovaného pomocí primerů pro *Melissococcus plutonius*



Obrázek 4.6: Elektroforeogram vzorků 1-12 amplifikovaných pomocí primerů specifických pro *Melissococcus plutonius*: Sloupec M – 100bp marker, NK – negativní kontrola, PK – pozitivní kontrola, 1-17 analyzované vzorky, 1 – KB, 2 – TK, 3 – NŠ, 4 – MŠP, 5 – NM, 6 – NH, 7 – AŠ, 8 – PČ, 9 – PČV, 10 – BG, 11 – KT, 12 – DM, 13 – BZ, 14 – BČ, 15 – LVF, 16 – MR, 17 – SV

Na obrázku 4.6 je zobrazen elektroforeogram analýzy vzorků 1-17 testovaných na přítomnost bakterie *Melissococcus plutonius*. Pro kontrolu a porovnání byl použit negativní vzorek bez DNA (NK), pozitivní vzorek s DNA daného patogenu (PK) a 100 bp marker (M). Pozitivně nebyl patogen detekován u žádného ze vzorku.

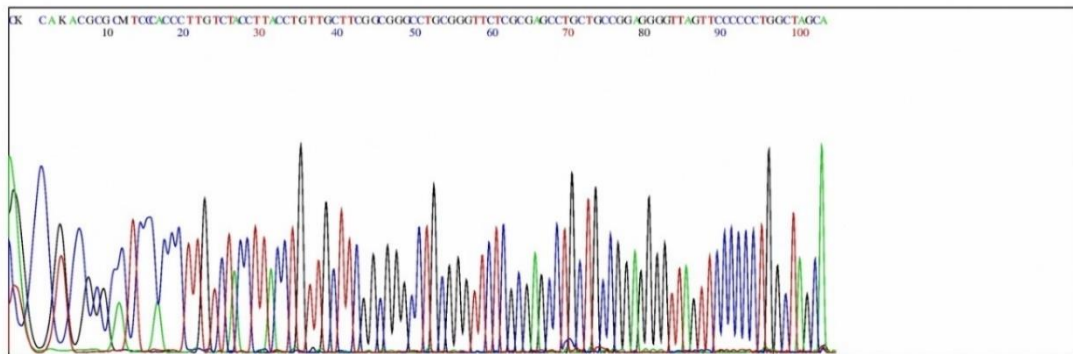


Obrázek 4.7: Elektroforeogram vzorků 18-50 amplifikovaných pomocí primerů specifických pro *Melissococcus plutonius*: Sloupec M – 100bp marker, NK – negativní kontrola, PK – pozitivní kontrola, 18-50 analyzované vzorky, 18 – RVS, 19 – HSŽ, 20 – BN, 21 – FMV, 22 – HOB, 23 – HSF, 24 – CHF, 25 – MHJ, 26 – MHJ2, 27 – BS, 28 – MP, 29 – SN, 30 – SH, 31 – ČFU, 32 – HIU, 33 – ZMU, 34 – ZKK, 35 – UJV, 36 – BKB, 37 – OB, 38 – SB, 39 – BŠ, 40 – PS, 41 – HKG, 42 – SR, 43 – PK, 44 – VP, 45 – BK, 46 – MS, 47 – DK, 48 – MŠB, 49 – KŠI, 50 – MB

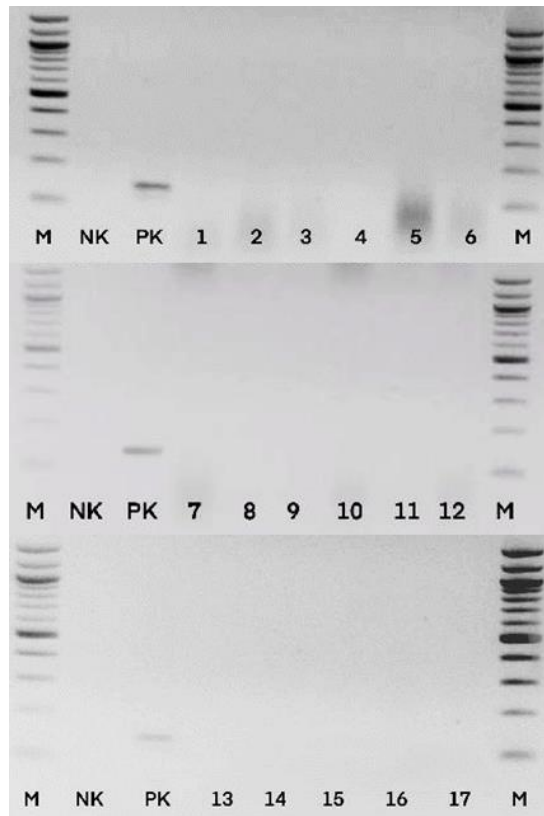
Na obrázku 4.7 je zobrazen elektroforeogram analýzy vzorků 18-50 testovaných na přítomnost bakterie *Melissococcus plutonius*. Pro kontrolu a porovnání byl použit negativní vzorek bez DNA (NK), pozitivní vzorek s DNA daného patogenu (PK) a 100bp marker (M). Pozitivně byl patogen detekován u vzorku 25 (MHJ), 26 (MHJ2), 40 (PS) a 47 (DK).

4.5 *Ascospaera apis*

Z dat získaných ze sekvenování v podobě chromatogramu (viz obrázek 4.8) byl vybrán fragment DNA a vložen do databáze NCBI (Zhang, et al., 2000) pro nalezení shodujících se sekvencí a jejich porovnání. Fragment se shodoval s nalezenou sekvencí pro *Ascospaera apis* na 100 %. Tyto informace jsou shrnuty v tabulce 4.5.

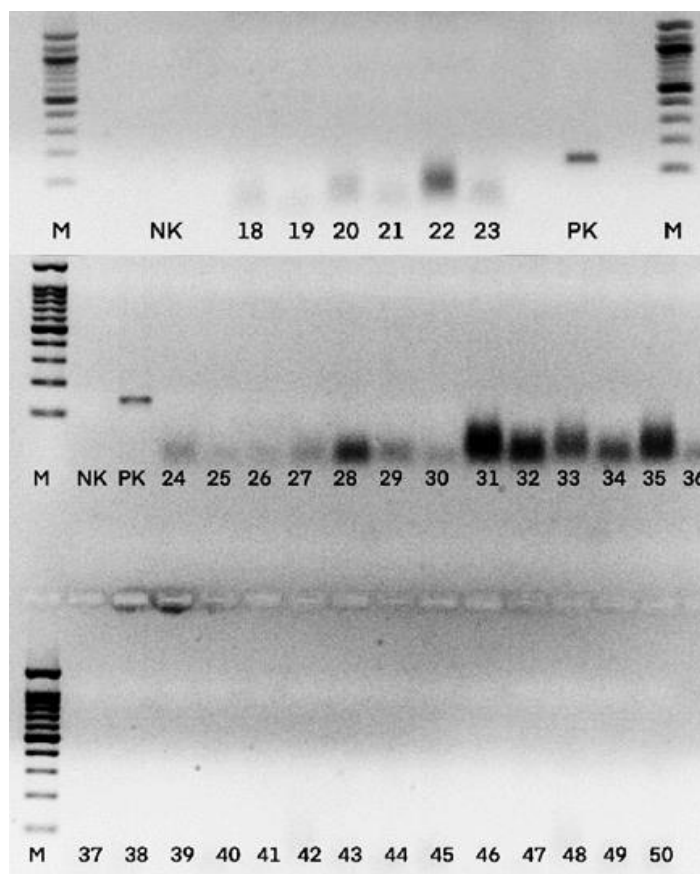


Obrázek 4.8: Sekvence fragmentu amplifikovaného pomocí primerů pro *Ascospaera apis*



Obrázek 4.9: Elektroforeogram vzorků 1-17 amplifikovaných pomocí primerů specifických pro *Ascosphaera apis*: Sloupec M – 100bp marker, NK – negativní kontrola, PK – pozitivní kontrola, 1-17 analyzované vzorky, 1 – KB, 2 – TK, 3 – NŠ, 4 – MŠP, 5 – NM, 6 – NH, 7 – AŠ, 8 – PČ, 9 – PČV, 10 – BG, 11 – KT, 12 – DM, 13 – BZ, 14 – BČ, 15 – LVF, 16 – MR, 17 – SV

Na obrázku 4.9 je zobrazen elektroforeogram analýzy vzorků 1-17 testovaných na přítomnost bakterie *Ascosphaera apis*. Pro kontrolu a porovnání byl použit negativní vzorek bez DNA (NK), pozitivní vzorek s DNA daného patogenu (PK) a 100bp marker (M). Pozitivně nebyl detekován žádný ze vzorků.



Obrázek 4.10: Elektroforeogram vzorků 18-50 amplifikovaných pomocí primerů specifických pro *Ascospaera apis*: Sloupec M – 100bp marker, NK – negativní kontrola, PK – pozitivní kontrola, 18-50 analyzované vzorky, 18 – RVS, 19 – HSŽ, 20 – BN, 21 – FMV, 22 – HOB, 23 – HSF, 24 – CHF, 25 – MHJ, 26 – MHJ2, 27 – BS, 28 – MP, 29 – SN, 30 – SH, 31 – ČFU, 32 – HIU, 33 – ZMU, 34 – ZKK, 35 – UJV, 36 – BKB, 37 – OB, 38 – SB, 39 – BŠ, 40 – PS, 41 – HKG, 42 – SR, 43 – PK, 44 – VP, 45 – BK, 46 – MS, 47 – DK, 48 – MŠB, 49 – KŠI, 50 – MB

Na obrázku 4.10 je zobrazen elektroforeogram analýzy vzorků 18-50 testovaných na přítomnost bakterie *Ascospaera apis*. Pro kontrolu a porovnání byl použit negativní vzorek bez DNA (NK), pozitivní vzorek s DNA daného patogenu (PK) a 100bp marker (M). Pozitivně nebyl detekován žádný ze vzorků.

Všechny pozitivní a negativních výsledky jednotlivých patogenů jsou shrnuty v tabulce 4.2.

Tabulka 4.2: Souhrn výsledků detekce *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius* a *Ascosphaera apis* u všech testovaných vzorků: (+): pozitivní výsledek, (-): negativní výsledek

Stanoviště	<i>Paenibacillus larvae</i>	<i>Melissococcus plutonius</i>	<i>Ascosphaera apis</i>
<u>České Budějovice město</u>			
HKG	-	-	-
SR	-	-	-
PK	-	-	-
VP	-	-	-
BK	-	-	-
<u>České Budějovice okolí</u>			
MS	-	-	-
DK	-	+	-
MŠB	-	-	-
KŠI	-	-	-
MB	-	-	-
<u>Šumava</u>			
AŠ	-	-	-
PČ	-	-	-
PVČ	-	-	-
BG	-	-	-
KT	-	-	-
DM	-	-	-
<u>Praha město</u>			
SN	+	-	-
SH	-	-	-
ČFU	-	-	-
HIU	-	-	-
ZMU	-	-	-
ZKK	-	-	-

<u>Praha okolí</u>			
UJV	-	-	-
BKB	-	-	-
OB	-	-	-
SB	-	-	-
BŠ	-	-	-
PS	-	+	-
<u>Plzeň město</u>			
KB	-	-	-
<u>Plzeň okolí</u>			
TK	-	-	-
NŠ	-	-	-
NH	-	-	-
NM	-	-	-
MŠP	-	-	-
<u>Ostrava město</u>			
BZ	-	-	-
BČ	+	-	-
LVF	-	-	-
MR	-	-	-
SV	+	-	-
<u>Ostrava okolí</u>			
RVS	-	-	-
HSŽ	-	-	-
BN	-	-	-
FMV	-	-	-
HOB	-	-	-

HSF	-	-	-
<u>Brno město</u>			
CHF	-	-	-
MHJ	-	+	-
MHJ2	-	+	-
BS	-	-	-
MP	-	-	-

5 Diskuse

V mé práci jsem se zaměřila na detekci tří významných patogenů napadajících larvy včel na území ČR. Bakterie *Paenibacillus larvae*, způsobující závažné onemocnění – mor včelího plodu, původce hniloby včelího plodu – *Melissococcus plutonius* a parazitická houba *Ascosphaera apis*, která způsobuje zvápenatění včelího plodu.

Ze vzorků včel byla izolována DNA metodou CTAB postupem uvedeným v kapitole 3.3. U velmi malých organismů jako jsou včely, se může použít pro izolaci celý jedinec. Při použití celého těla včely je ve vzorku DNA přítomnost vyššího množství rostlinné DNA z potravy a DNA případných parazitů a patogenů (Zima et al., 2004). CTAB je sice časově náročnější metoda, ale poskytuje vysoce čistou DNA, a proto je zde i menší riziko inhibice PCR (Murray a Thompson 1980; Bustin, 2004) jako bylo potvrzeno i v této práci. Vhodnost použití metody CTAB pro izolaci DNA včel potvrdil také Modabber et al. (2016).

Detekovat patogeny včel lze mnoha způsoby. Jedním z nich je PCR, kterou jsem použila v této práci stejně jako Hornitzky (2001), Garrido-Bailón (2013), či Ryba et al. (2012) pro její citlivost a spolehlivost. Detekce se může provádět také např. kulturačním stanovením, které použili pro svá vyšetření Kamler a Titěra (2005). Dalším vhodným postupem jsou imunologické metody jako uvádí Herczeg, (2019). Při PCR je důležité vhodné zvolení specifických primerů a optimalizace reakčních podmínek (Reynaldi et al, 2015), což se potvrdilo i v mé práci, kdy jsem převzala teploty PCR pro *Paenibacillus larvae* od Bakonyi et al. (2003). Ale objevoval se nespecifický fragment navíc. Proto byla provedena gradientová PCR a teplota nasedání primerů byla podle výsledku na elektroforeogramu (viz obrázek 4.1) změněna z teploty 55 °C na teplotu 50,8 °C.

Podle Dieffenbach et al., 1993 se primery skladují při -20 °C (až pět let), ale mohou být uchovány i při 4 °C až na 6 měsíců. Jsou ale citlivé k opakovanému rozmrazování a zamrazování. Pokud jsou rozmrazeny více než pětkrát, primery degradují (Dieffenbach et al., 1993). Primery použité v této práci pro *P. larvae* bylo potřeba uchovávat v mrazáku na -20 °C. Protože byly citlivější a při uchovávání v lednici na 4 °C, i když pouze na pár dní, ačkoli nebyly opakovaně rozmrazovány, docházelo pravděpodobně k degradaci a nebylo možné je již dále použít. Při PCR docházelo k falešným pozitivním výsledkům. Pravděpodobnou příčinou může být obsah kontaminantů z výroby, které urychlují degradaci.

Po zavedení těchto opatření došlo pomocí specifických primerů každého z patogenů ke správnému chodu reakce a úspěšné amplifikaci fragmentů.

Celkem jsem testovala směsné vzorky z 50 stanovišť, které byly odebrány z více než 200 úlů. Při vizualizaci výsledků pomocí gelové elektroforézy byla většina mých výsledků negativních na přítomnost *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius* a *Ascospheara apis*.

Přítomnost bakterie *Paenibacillus larvae* byla nalezena u 3 analyzovaných vzorků – dva z Ostravy a jeden z Prahy. Tyto vzorky měly nízkou koncentraci amplifikovaných fragmentů (viz obrázek 4.4), což může znamenat, že patogen není ve včelstvu dostatečně rozšířen a nejsou viditelné žádné klinické příznaky. Ve své zprávě z roku 2005 uvádějí Kamler a Titěra ohledně monitoringu původce moru včelího plodu pozitivitu u 15,3 % vyšetřených vzorků. Těch bylo odebráno 780 v různých lokalitách ČR. Ve své práci jsem prokázala pozitivitu pouze u 6 % vzorků. Kamler a Titěra odlišovali i různé kmeny bakterie. To může být předmětem pokračování mé práce. V ČR bylo v roce 2020 vyhlášeno celkem 108 ohnisek včelího moru, nejvíce v kraji Moravskoslezském, Olomouckém a Kraji Vysočina (Státní veterinární správa, 2021). Mé pozitivní vzorky pocházely z území Prahy, dále z Ostravy, která se také nachází v Moravskoslezském kraji, ale stanoviště se nenacházejí v nálezové oblasti.

U bakterie *Melissococcus plutonius* byly pozitivně detekovány čtyři vzorky (8 %). Stejně jako u *P. larvae* bylo namnoženo malé množství fragmentů (viz obrázek 4.7), proto zde také včelstvo nemusí vykazovat žádné známky choroby. V roce 2020 byla choroba zaznamenána na třech územích v Libereckém kraji, v okrese Semily a v Královéhradeckém regionu (Vorlíček, 2020). U mých výsledků byly pozitivní vzorky nalezeny na území Prahy, Českých Budějovic a Brna.

V případě pozitivních nálezů patogenů, je nutno klást velký zřetel na zdravotní stav včelstva a při výskytu některých z klinických příznaků je nutno ihned zakročit a včelař je povinen oznámit objevení příznaků *P. larvae* a *M. plutonius* Krajské veterinární správě, která vyhlásí příslušná opatření. Včelstva s příznaky a materiál se zařízením, které mohlo být ve styku s nákazou, musí být zlikvidováno (Titěra et al., 2018).

Zvápenatění včelího plodu nepatří mezi tak závažné choroby jako nemoci předchozí (Spivak a Reuter, 2001) a při objevení klinických příznaků se nemusí informovat Krajská veterinární správa. Příznaky však není dobré zanedbávat (Titěra et al., 2018). V 50 analyzovaných vzorcích nebyly žádné detekované jako pozitivní na zwápenatění včelího plodu. S použitými primery pro *A. apis* vyšel u pozitivní kontroly velice krátký

fragment se slabou koncentrací DNA. Proto by bylo vhodné v příští práci použít primery detekující delší fragment této bakterie pro spolehlivější detekci. V roce 2019 bylo testováno 20 vzorků na území ČR, ze kterých bylo 8 (40 %) identifikováno jako pozitivních (Prokopová, 2019). V České republice byl objeven zvýšený výskyt této nemoci (Veselý et al., 2013), což ale nemohu dle mých výsledků potvrdit. Vzhledem k tomu, že dělnice aktivně proti tomuto onemocnění bojují pomocí svého čistícího pudu (Sarwar, 2016), je možné, že výskyt spor je v pozitivních včelstvech tak nízký, že není detekovatelný metodou, kterou jsem použila. V rámci dalšího výzkumu na pracovišti by mělo proběhnout i vyhodnocení dotazníků, ve kterých jednotliví chovatelé uvedli případné příznaky. Na základě získaných výsledků bude možné případně upravit metodiku pro další testování tohoto onemocnění ve včelstvech.

Závěr

Včely hrají důležitou roli v zachování biodiverzity krajiny, proto je potřeba dávat velký zřetel na jejich zdravotní stav a předcházet tím snížení počtu včelstev.

V rámci mé diplomové práce jsem testovala 50 vzorků včel z více než 200 stanišť na přítomnost patogenů způsobujících závažná onemocnění včelího plodu. U 6 % vzorků byla detekována přítomnost bakterie *Paenibacillus larvae*. Tyto vzorky pocházely z území Prahy a Ostravy. Přítomnost bakterie *Melissococcus plutonius* byla detekována u 8 % vzorků, které byly nalezeny na území Prahy, Českých Budějovic a Brna. *Ascospaera apis* nebyla detekována u žádného vzorku.

Z mých výsledků vyplývá, že *Ascospaera apis* se naproti analýzám minulých roků po České republice nerozšířila. Přítomnost bakterie *Melissococcus plutonius* byla dle mé detekce rozšířena do území krajů, které nebyly v roce 2020 zařazeny mezi ohniska nákazy.

Včelstva, u nichž se vyskytla přítomnost bakterie *Paenibacillus larvae* a *Melissococcus plutonius* sice nevykazovala žádné známky klinických příznaků, je u nich však třeba zvýšit kontrolu jejich zdravotního stavu kvůli závažným onemocněním, která tyto bakterie způsobují. Rozšířenost těchto nemocí není v České republice kritická, přesto se nesmí příznaky zanedbávat.

Pro detailnější analýzu stavu rozšíření nemocí v ČR by byl třeba odběr vzorků a detekce z více stanišť.

Seznam použité literatury

Albo, G. N. et al. (2017). Chalkbrood: pathogenesis and the interaction with honeybee defenses. *International Journal of Environmental & Agriculture Research*, 3(1):71-80.

Alippi, A. M. (1991). Techniques for the detection of significant bacteria of the honey bee, *Apis mellifera*, in Argentina. *Journal of Apicultural Research*, 30:75–80.

Allen, M. F. a Ball B.V. (1993). The cultural characteristics and serological relationships of isolates of *Melissococcus pluton*. *J. Apicult. Res.*, 32:80-88.

Anderson, D. L. et al. (1997). Detection and thermal destruction of the chalkbrood fungus (*Ascosphaera apis*) in honey. *J. Apicult. Res*, 36:163-168.

Anderson, D. L. a Gibson, N. L. (1998). New species and isolates of spore-cyst fungi (Plectomycetes:Ascosphaerales) from Australia. *Australian Systematic Botany*, 11(1):53-72.

Ansari, M. J. et al. (2015). In vitro evaluation of the effects of some plant essential oils on *Ascosphaera apis*, the causative agent of Chalkbrood disease. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(5):1001-1006.

Arbia, A. a Babbay B. (2010). Management Strategies of Honey Bee Diseases. *Journal of Entomology*, 8(1):1-15.

Aronstein, K. A. a Murray, K. D. (2010). Chalkbrood disease in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(1):20-29.

Ash, C. et al. (1993). Molecular identification of rRNA group 3 bacilli using a PCR probe test. *Antonie van Leeuwenhoek*, 64(3-4):253–260.

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

Bailey L. (1959). An improved method for the isolation of *Streptococcus pluton*, and observations on its distribution and ecology. *J. Insect. Pathol.*, 1:80-85.

Bailey L. (1960). The epizootiology of European foulbrood of the larval honey bee, *Apis mellifera* Linneaus. *J. Insect. Pathol.*, 2:67-83.

Bailey, L. a Ball B. (1991). *Honey Bee Pathology*. Druhé. Academic Press, London. ISBN 9781483288093.

Bailey, L. (1956). Etiology of european foul brood; A disease of the larval honey-bee. *Nature*, 178:1130.

Bailey, L. (1957). European foul brood: A disease of the larval honeybee (*Apis mellifera* L.) caused by a combination of streptococcus pluton (*Bacillus pluton* white) and *Bacterium eurydice* white. *Nature*, 180(4596):1214–15.

Bailey, L. a Collins M. D. (1982). Reclassification of ‘*Streptococcus pluton*’ (White) in a new genus *Melissococcus*, as *Melissococcus pluton* nom. rev.; comb. nov.". *Journal of Applied Bacteriology*, 2(58):215-217.

Bakonyi, T. et al. (2003). Development and evaluation of PCR assays for the detection of *Paenibacillus* larvae in honey samples: comparison with isolation and biochemical characterization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(3):1504–1510.

Benson, D.A., et al. (2018). GenBank. *Nucleic Acids Res.*, 46:41–47.

Belloy, L. et al. (2007). Charriere Spatial distribution of *Melissococcus plutonius* in adult honey bees collected from apiaries and colonies with and without symptoms of European foulbrood. *Apidologie*, 38:136-140.

Beránek, V. (2003). *Když plásty tekly medem*. První. Stegbauer J. – Ostrov, Praha 6. ISBN 80-86289-31-1.

Bissett, J. (1988). Contribution towards a monograph of the genus *Ascospaera*. Canadian. *Journal of Botany*, 66(12):2541-2560.

Borum, A.E. a Ulgen, M. (2008). Chalkbrood (*Ascospaera apis*) infection and fungal agents of honey bees in north-west Turkey. *J. Apicult. Res.*, 47(2):170-171.

Budge, G. E. et al. (2014). Molecular epidemiology and population structure of the honey bee brood pathogen *Melissococcus plutonius*. *The ISME Journal*, 8:1588–1597.

Bustin, S. A. (2004). *A-Z of quantitative PCR*. International University Line, La Jolla, CA, USA. ISBN 978-0-9636817-8-2.

Bzdil, J. (2010). *Nové metody v diagnostice moru včelího plodu*. Disertační práce, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí.

Castagnino, G. L. B. et al. (2020). Etiology, symptoms and prevention of chalkbrood disease: a literature review. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 21:1-16.

Copley, T. et al. (2012). Detection of *Nosema apis* and *N. ceranae* in honeybeebottom scraps and frass in naturally infected hives. *Apidologie, Springer Verlag (Germany)*, 43(6):753-760.

Cox, R.L. (2000). Incidence of oxytetracycline-resistance *Paenibacillus larvae* spores in honey samples from Iowa. *Am. Bee. J.*, 140:903-903.

Cramp, D. (2013). *Včelařství: obrazový průvodce: od pořízení včelstev po medobraní: více než 400 návodných fotografií*. Rebo, Čestlice. ISBN 978-80-255-0714-8.

Čermák, K. et al. (2016). *Včelařství*. PSNV, České Budějovice. ISBN 978-80-260-9090-8.

Český svaz včelařů, z.s., (2021). *Český svaz včelařů*. [online] [cit. 14. 02. 2021]. Dostupné z: <https://www.vcelarstvi.cz/>

De Graaf, D. C. et al. (2015). Standard methods for American foulbrood research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1):1-28.

Dieffenbach, C. W. et al. (1993), General concepts for PCR primer design. *PCR Methods Appl*, 3(3):30-37.

Djordjevic, S. P. et al. (1998). Development of a hemi-nested PCR assay for the specific detection of *Melissococcus pluton*. *J. Apicult. Res.*, 37:165-174.

Djukic, M. et al. (2014). How to kill the honey bee larva: genomic potential and virulence mechanisms of *Paenibacillus larvae*. *PLoS ONE*, 9(3):1–14.

Dostál, D. a Procházka J. (2020). *Království včel: Co Čech, to včelař*. Mladá fronta a. s.: Profit, Praha. ISSN 1805-2592.

Drašar, J. (1978). *Včelařství*. První. Státní zemědělské nakladatelství, Praha. ISBN 07-079-78.

Dreher, K. (1938). Auftreten von Bienenkrankheiten in Niedersachsen und Braunschweig im Jahre 1937. *Niedersächsische Imker*, 73(12):282-284.

Duben, J. (2013). Prevence nákaz včel. *Včelařství*. 2013(4):114-115.

Dubská, M. (2018). Státní veterinární správa a zdravotní problematika včel v ČR. [online] *Státní veterinární správa ČR* [cit. 16. 04. 2021]. Dostupné z: https://www.svscr.cz/wp-content/files/zvirata/01_Dubsk_Zdravotn_problematika_vel_v_R.pdf

Endo, A. a Salminen S. (2013). Honeybees and beehives are rich sources for fructophilic lactic acid bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(6):444–48.

Flores, J. M. et al. (2005). The role of pollen in chalkbrood disease in *Apis mellifera*: transmission and predisposing conditions. *Mycologia*, 97:1171-1176.

Food and agriculture organization of the united nations, (2018). *Main bee diseases: Good beekeeping practices*. [online] [cit. 17. 02. 2021]. Dostupné z: <http://www.fao.org/3/i9466en/I9466EN.pdf>

Formato, G. et al. (2007). Chalkbrood and stonebrood. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 1(1):1-3.

Forsgren, E. et al. (2005). Fries Distribution of *Melissococcus plutonius* in honeybee colonies with and without symptoms of European foulbrood. *Microbial Ecol.*, 50:369-374.

Forsgren, E. (2009). *Molecular Diagnosis and Characterization of Honey Bee Pathogens*. Disertační práce. Acta Universitatis Agriculturae Sueciae. Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences.

Forsgren, E. et al. (2013). Standard methods for European foulbrood research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1):1–14.

Forsgren, Eva. (2010). European foulbrood in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1(103):5-9.

Gahtori, D. et al. (2011). Using bryophytes as a tool to cure European foulbrood disease of honey bee: An eco-friendly approach. *Current Science*, 101(3):420–23.

Garcia-Gonzalez, E. et al. (2014). Biological effects of paenilamicin, a secondary metabolite antibiotic produced by the honey bee pathogenic bacterium *Paenibacillus larvae*. *MicrobiologyOpen*, 3(5):642–656.

Garrido-Bailón, E. et al. (2013). The prevalence of the honeybee brood pathogens *Ascosphaera apis*, *Paenibacillus larvae* and *Melissococcus plutonius* in Spanish apiaries determined with a new multiplex PCR assay. *Microbial Biotechnology*, 6(6):731-739.

Genersch, E. (2010). American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1(103):10–19.

Gilliam, M. a Vandenberg, J. D. (1997). Fungi. Honey Bee Pests, Predators, and Diseases. *AI Root*, 81–110.

Govan, V. A. et al. (1998). PCR detection method for rapid identification of *Melissococcus pluton* in honeybee larvae *Appl. Environ. Microbiol.*, 64:1983-1985.

Govan V. A. et al. (1999). A PCR Detection Method for Rapid Identification of *Paenibacillus larvae*. *Appl Environ Microbiol*, 65(5):2243–2245.

Hanousek, L. (1991). *Začínáme včelařit*. První. Brázda, Praha. ISBN 80-209-0194-9.

Hansen, H. a Brodsgaard C. J. (1999). American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. *Bee World*, 1(80):5-23.

Heyndrickx, M. et al. (1996). Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash et al. 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended description of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(1):270–279.

Hitchcock, J. D. a Christensen, M. (1972). Occurrence of chalk brood (*Ascosphaera apis*) in honey bees in the United States. *Mycologia*, 64(5):1193-1198.

Hornitzky, M. (2001). Literature review of chalkbrood. *A report for the RIRDC*, 1(150):1-20.

Charbonneau, R. et al. (1992). Irradiation and American foulbrood. *Am. Bee J.*, 132:249-251.

Cheshire, F. R. a Cheyne, W. W. (1885). The pathogenic history and the history under cultivation of a new bacillus (*B Alvei*), the cause of a disease of the hive bee hitherto known as foul brood J. Roy. *Microsc. Soc.*, 5:581-601.

Jeníková, J. (2018). *Včely všude, kam se podíváte*. Mladá fronta a. s.: Profit, Praha. ISSN 1805-2592.

Jensen, A. B. et al. (2013). Standard methods for fungal broad disease research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1):1-20.

Joska, J. (1958). *Chov včel pro začátečníky*. Československý svaz včelařů, Praha.

Kamler, M. a Titěra D. (2005). Výroční zpráva za rok 2005 o plnění úkolů vyplývajících ze Smlouvy o dílo č. 9-16230-2005 uzavřené mezi MZe ČR a VÚVČ Dol k zajištění monitoringu výskytu původce moru včelího plodu v ČR, udržování a doplňování sbírky bakteriálních kmenů původců moru. *Výzkumný ústav včelařský, s.r.o.*, 1(1):1-14.

Kamler, M. et al. (2018). *Postupy pro diagnostiku, tlumení, dezinfekci a obnovu včelařských provozů při výskytu bakteriálních chorob včel – manuál pro chovatele včel*. Výzkumný ústav včelařský, s.r.o., Dol. ISSN 978-80-87196-40-3.

Katznelson, H. (1950). *Bacillus pulvifaciens* (n. sp.), an organism associated with powdery scale of honeybee larvae. *Journal of Bacteriology*, 59(2):153–155.

Kollar, S. (2010). Mor včelího plodu. [online] *Vysoká škola Hluboká* [cit. 25. 03. 2021]. Dostupné z: <http://www.vshluboka.estranky.cz/clanky/nemoci-vcel/mor-vceliho-plodu.html>

Kulhánek, Z. (2021). Nasavrcká škola v proměnách sedmi desetiletí. *Včelařství*, 3:94-96.

Kubišová, S. a Halsbachová, H. (1992) *Včelařství*. Vysoká škola zemědělská, Brno. ISBN 80-7157-024-9.

Lauro, F.M. et al. (2003). Rapid detection of Paenibacillus larvae from honey and hive samples with a novel nested PCR protocol. *Int. J. Food Microbiol.*, 81:195-201.

Lee, H. et al. (2009). Isolation and characterization of a protective bacterial culture isolated from honey active against American Foul-brood disease. *FEMS. Microbiol. Lett*, 296:39-44.

Liu, Y. et al. Larva-mediated chalkbrood resistance-associated single nucleotide polymorphism markers in the honey bee *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, 25(3):239-50.

Locke, B. et al. (2019). An integrated management strategy to prevent outbreaks and eliminate infection pressure of American foulbrood disease in a commercial beekeeping operation. *Preventive Veterinary Medicine*, 1(167):48-52.

Lumbsch, H. T. a Huhndorf, S. M. (2007). Outline of Ascomycota, Myconet, 13(1):1-58.

Maassen, A. (1913). Weitere Mitteilungen über die seuchenhaften Brutkrankheiten der Bienen [Further communication on the epidemic brood disease of bees] Mitteilungen aus der Kaiserlichen Biologischen. *Anstalt für Land-und Forstwirtschaft*, 14:48-58.

Madara, V. (2009). Mor včelího plodu se dá úspěšně potlačit. *Včelařství*, 9(9):270-273.

Martel, A.C. et al. (2006). Tetracycline residues in honey after hive treatment. *Food Addit. Contam.*, 23:265-273.

Martín-Hernández, R. (2012). Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*?. *Environ Microbiol*, 14: 2127–2138.

McKee, B. A. et al. (2004). The transmission of European foulbrood (*Melissococcus plutonius*) to artificially reared honey bee larvae (*Apis mellifera*). *J. Apicult. Res.*, 43:93-100.

Michener, D. (2007). *The Bees of the World*. Druhé. The Johns Hopkins University Press, Baltimore. ISBN 9780801885730.

Modabber, M. et al. (2016). Evaluation of efficiency of four DNA extraction methods in *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 4(5):576-578.

Morawetz, L. et al. (2019). Health status of honey bee colonies (*Apis mellifera*) and disease-related risk factors for colony losses in Austria. *PLoS One*, 14(7).

Müller, S. et al. (2015). Involvement of secondary metabolites in the pathogenesis of the American foulbrood of honey bees caused by *Paenibacillus* larvae. *Natural Product Reports*, 32(6):765–778.

Murray, M.G. Thompson W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8(19):4321-4326.

Nádvorník, R. (2019). Známé neznámé DNA sekvenování – Část I. [online] SEQme [cit. 06. 04. 2021]. Dostupné z: <https://www.seqme.eu/cs/magazine/sanger-troubleshooting-part-one>

Nakamura, K. et al. (2016). Virulence Differences among *Melissococcus plutonius* Strains with Different Genetic Backgrounds in *Apis mellifera* Larvae under an Improved Experimental Condition. *Scientific Reports*, 6(1).

Nardoni, S. et al. (2018). Stonebrood and chalkbrood in *Apis mellifera* causing fungi: in vitro sensitivity to some essential oils. *Natural Product Research*, 32(4):385-390.

Natsopoulou, M. E. et al. (2016). Parasites modulate withincolony activity and accelerate the temporal polyethism schedule of a social insect, the honey bee. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 70(7):1019-1031.

Nepraš, J. (1971). *České včelařství*. První. Mír, Praha 1. ISBN 07-050-71.

Novotná, M. (2019). V Nasavrkách nezapomínáme. *Včelařství*, 11:392.

Pernal, S. F. (2008). Evaluation of the shaking technique for the economic management of American foulbrood disease of honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J Econ Entomol.*, 101(4):1095-104

Peroutka, M. a Drobníková, V. (1987). *Nemoci včel*. První. Ministerstvo zemědělství a výživy ČSR, České Budějovice.

Pohl, F. a Aumeier P. (2008). *Varroáza: jak ji poznat a úspěšně potírat*. Víkend, Líbeznice. ISBN 978-80-86891-90-3.

Pokorný, T. (2013). Mor včelího plodu. [online] JC včelaři [cit. 10. 03. 2021]. Dostupné z: <http://www.jcvcelari.cz/mor-vceliho-plodu>

Prokopová, T. (2019). Zvápenatění včelího plodu a jeho vliv na včelstvo. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta.

Rauch, S. et al. (2009). Negative correlation between individual-insect-level virulence and colony-level virulence of *Paenibacillus* larvae, the etiological agent of American foulbrood of honeybees. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(10):3344–3347.

Rejnič, J. et al. (1987). *Včelařství*. První. Institut výchovy a vzdělávání MZVŽ ČSR, Praha.

Rejnič, J. et al. (1990). *Včelářstvo*. Druhé. Příroda, Bratislava. ISBN 80-07-00329-0.

Reynaldi, F. J. et al. (2015). Differentiation of *Ascosphaera apis* isolates by rep-PCR fingerprinting and determination 50 of chalkbrood incidence in Argentinean honey samples. *Journal of Apicultural Research*, 42(4):68-76.

Rieg, S. et al. (2010). *Paenibacillus* larvae bacteremia in injection drug users. *Emerging Infectious Diseases*, 16(3):487–489.

Roetschi, A. et al. (2008). Imdorf Infection rate based on quantitative real-time PCR of *Melissococcus plutonius*, the causal agent of European foulbrood, in honeybee colonies before and after apiary sanitation. *Apidologie*, 39:362-371.

Ryba, Š. et al. (2012). Prevalence of honeybee viruses in the Czech Republic and co-infections with other honeybee disease, 2012. *Agris*, 67(3):590-595.

Santos, R. Ch. V. et al. (2014). Antimicrobial activity of tea tree oil nanoparticles against American and European foulbrood diseases agents. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 17(3):343–47.

Sarwar, M. (2016). Challenges due to bacterial infections of the honey bees and contributions to manage pest problems. *International Journal of Entomological Research*, 1(1):4-10.

Seal, D. W. A. (1957). Seal Chalk brood disease of bees. *New Zealand J. Agricult*, 95:562.

Sedláček, I. (2007). *Taxonomie prokaryot*. Masarykova univerzita, Brno. ISBN 80-210-4207-9.

Simone-Finstrom, M. et al. (2018). Gamma irradiation inactivates honey bee fungal, microsporidian, and viral pathogens and parasites. *Journal of Invertebrate Pathology*, 153(1):57-64.

Snustad, D. P. et al. (2009). *Genetika*. Masarykova univerzita, Brno. ISBN 978-80-210-4852-2.

Spivak, M. a Reuter G. S. (2001). Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie*, 1(32):555–565.

Spivak, M. a Reuter, G.S. (2001). Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies, *Apis mellifera*, bred for hygienic behavior. *Apidologie*, (32):555-565.

Spürgin, A. (2013). *Zázračné včely*. První. Víkend s.r.o., Praha 9. ISBN 978-80-7433-069-8.

Starks, P.T. et al. (200). Fever in honeybee colonies. *Naturwissenschaften*, 87(1):229-231.

Státní veterinární správa. (2021). Mor včelího plodu [online] *Státní veterinární správa* [cit. 12.03 2021]. Dostupné z: <https://www.svscr.cz/zdravi-zvirat/mor-vceliho-plodu/>

Šefčík, J. (2014). *Začínáme včelařit*. První. Grada Publishing, a.s., Praha 7. ISBN 978-80-247-4857-3.

Škrobal, D. (1967). *Včelařův rok*. Druhé. Státní zemědělské nakladatelství, Praha.

Švamberg, V. (2000). *Tajemství svět včel*. První. Víkend, Český Těšín. ISBN 80-7222-120-5.

Švamberg, V. (2003). *Záhadné včely-Tajemný svět včel II*. Duhé. FINIDR, s.r.o., Český Těšín. ISBN 80-7222-285-6.

Švancer, Ľ. (1977). *Boj proti chorobám včiel*. Příroda, Bratislava. ISBN 64-075-77. 64-075-77.

Tarr, H. L. A. (1938). Studies on European Foul Brood of Bees: Iv. on the Attempted Cultivation of *Bacillus Pluton*, the Susceptibility of Individual Larvae To Inoculation With This Organism and Its Localization Within Its Host. *Annals of Applied Biology*, 25(4):815–21.

Tautz, J. (2016). *Fenomenální včely*. Třetí. Brázda, Praha. ISBN 978-80-209-0415-7.

Teixeira, É. W. (2018). Spores of *Paenibacillus* larvae, *Ascosphaera apis*, *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in bee products supervised by the Brazilian Federal Inspection Service. *Revista Brasileira de Entomologia*, 62(3):188-194.

Thompson, H. a Brown, M. (2001). Is contact colony treatment with antibiotics an effective control for European foulbrood?. *Bee World*, 82:130-138.

Titěra, D. (2009). *Mor včelího plodu*. Výzkumný ústav včelařský, Dol. ISBN 978-80-87196-02-1.

Titěra, D. et al. (2018). *Mor včelího plodu: Diagnostika, prevence a tlumení*. Praha. ISBN 978-80-87196-37-6.

Veselý, V. (1985). *Včelařství*. První. Státní zemědělské nakladatelství, Praha 1. ISBN 07-056-85.

USB Corporation. (2000). ExoSAP-IT. [online] FIMM [cit. 06. 04. 2021]. Dostupné z: https://www.fimm.fi/sites/default/files/SeqLab_Exosap_USB.pdf

Veselý, V. (2013). *Včelařství*. Třetí. Brázda, Praha. ISBN 978-80-209-0399-0.

Veselý, V. (2003). *Včelařství*. První. Brázda, Praha. ISBN 80-209-0320-8.

Veselý, V. et al. (2003). *Včelařství*. Druhé. Brázda, Praha. ISBN 978-80-209-0320-4.

Ohne, W. (2003). Control of American Foulbrood by using alternatively eradication method and artificial swarms. *Journal Apistica*, 38.

Výzkumný ústav včelařský. (2021). *Nemoci* [online] [cit. 17. 02. 2021]. Dostupné z: <https://www.beedol.cz/nemoci>

Waite, R. et al. (2003). Controlling European foulbrood with the shook swarm method and oxytetracycline in the UK. *Apidologie*, 34:569-575.

Watt, K. E. (2005). Decontamination techniques in ancient DNA analysis. *Simon Fraser University*.

White, G. F. (1912). The Cause of European Foulbrood, *U.S. Department of Agriculture Circular*, 1(157):1–15.

Wilkins, S. (2007). The incidence of honey bee pests and diseases in England and Wales. *Pest Manag. Sci.*, 63:1062-1068.

Williams, D.L. (2000). A Veterinary Approach to the European Honey Bee (*Apis mellifera*). *The Veterinary Journal*, 160(1):61-73.

Wilson, M. et al. (2015). Regional variation in composition and antimicrobial activity of US propolis against *Paenibacillus* larvae and *Ascosphaera apis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 124(1):44-50.

Yue et al. (2008). Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and *Paenibacillus* larvae, the causative agent of American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*): FISH analysis of AFB pathogenesis. *Environmental Microbiology*, 10(6):1612–1620.

Zima, J. (2004). *Genetické metody v zoologii*. Karolinum, Praha, ISBN 80-246-0795-6.

Zhang, Z. et al. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 2000; 7(1-2):203-14.

Zvárová, J. a Mazura I. (2012). *Metody molekulární biologie a bioinformatiky*. První. Karolinum, Praha. ISBN 978-80-246-2150-0.

Žižka, M. (2017). *Situační a výhledová zpráva: Včely*. První. Ministerstvo zemědělství, Praha. ISBN 978-80-7434-396-4.

Seznam obrázků

Obrázek 1.1: Pohlavní formy včelstva (Pleva, 2020)	8
Obrázek 1.2: Stavba těla včely (ZŠ Nučice, 2019)	9
Obrázek 1.3: Spora bakterie s mnohvrstevnými obaly, které chrání bakterii před nepříznivými podmínkami (Ludvík, 2018)	15
Obrázek 1.4: Cyklus infekce bakterie <i>Paenibacillus larvae</i> (upraveno podle Popping a Genersch, 2015)	17
Obrázek 1.5: Zápalkový test, za sirkou se táhne vlákno rozložené uhynu (Titěra et al., 2018).....	17
Obrázek 1.6: Porovnání infikovaných (nečláňkovaných a hnědých) larev se zdravými (Siegbert et al., 2010)	18
Obrázek 1.7: Výskyt moru včelího plodu v jednotlivých okresech ČR v roce 2020 (Státní veterinární správa, 2021)	20
Obrázek 1.8: Výskyt ohnisek moru včelího plodu v jednotlivých krajích v letech 2018 až 2020 (Státní veterinární správa, 2021)	21
Obrázek 1.9: <i>M. plutonius</i> ze skenovacího elektronového mikroskopu (Forsgren et al., 2013): délka měřítka odpovídá 1 μ m, neporušená bakterie je viditelná uprostřed obrázku.....	23
Obrázek 1.10: Cyklus šíření infekce bakterie <i>Melissococcus plutonius</i>	25
Obrázek 1.11: Příznaky hniloby včelího plodu (Titěra, 2018).....	26
Obrázek 1.12: Cyklus šíření bakterie <i>Melissococcus plutonius</i> (upraveno podle De León-Door et al., 2020).....	27
Obrázek 1.13: Larvy prorostlé <i>Ascospaera apis</i> (Titěra, 2018).....	32
Obrázek 1.14: Zvápenatěné mumie larev (Castagnino, 2020).....	33
Obrázek 1.15: Vřecko s výtrusy houby <i>Ascospaera apis</i> (Li, 2018)	35
Obrázek 3.1: Oddělená pevná a vodná fáze při izolaci DNA	40
Obrázek 4.1 Elektroforeogram gradientové PCR primerů specifických pro <i>Paenibacillus larvae</i> : Sloupec	46
Obrázek 4.2: Sekvence fragmentu amplifikovaného pomocí primerů pro <i>Paenibacillus larvae</i>	47
Obrázek 4.3: Elektroforeogram vzorků 1-12 amplifikovaných pomocí primerů specifických pro <i>Paenibacillus larvae</i>	48

Obrázek 4.4: Elektroforeogram vzorků 13-50 amplifikovaných pomocí primerů specifických pro <i>Paenibacillus larvae</i>	49
Obrázek 4.5: Sekvence fragmentu amplifikovaného pomocí primerů pro <i>Melissococcus plutonius</i>	50
Obrázek 4.6: Elektroforeogram vzorků 1-12 amplifikovaných pomocí primerů specifických pro <i>Melissococcus plutonius</i>	51
Obrázek 4.7: Elektroforeogram vzorků 18-50 amplifikovaných pomocí primerů specifických pro <i>Melissococcus plutonius</i>	52
Obrázek 4.8: Sekvence fragmentu amplifikovaného pomocí primerů pro <i>Ascospaera apis</i>	53
Obrázek 4.9: Elektroforeogram vzorků 1-17 amplifikovaných pomocí primerů specifických pro <i>Ascospaera apis</i>	54
Obrázek 4.10: Elektroforeogram vzorků 18-50 amplifikovaných pomocí primerů specifických pro <i>Ascospaera apis</i>	55

Seznam tabulek

Tabulka 1.1: Shrnutí hlavních klinických rozdílů mezi morem a hnilobou včelího plodu (Vorlíček, 2019).....	26
Tabulka 3.1: Vzorky odebrané z různých stanovišť ČR.....	37
Tabulka 3.2: Složení směsi pro PCR reakci.....	41
Tabulka 3.3: Sekvence použitých primerů.....	41
Tabulka 3.4: Průběh PCR reakce pro <i>Paenibacillus larvae</i> (Govan et al., 1999).....	41
Tabulka 3.5: Průběh PCR reakce pro <i>Melissococcus plutonius</i> (Govan et al., 1998).....	42
Tabulka 3.6: Průběh PCR reakce pro <i>Ascosphaera apis</i> (Garrido-Bailón et al., 2013).....	42
Tabulka 3.7: Program při přečištění směsí Exo/SAP.....	44
Tabulka 4.1: Koncentrace DNA vzorků z jednotlivých stanovišť.....	45
Tabulka 4.2: Souhrn výsledků detekce <i>Paenibacillus larvae</i> , <i>Melissococcus plutonius</i> a <i>Ascosphaera apis</i> u všech testovaných vzorků.....	56

Seznam použitých zkratk

AFB	mor včelího plodu
CTAB	cetyltrimetylamoniumbromid
ČR	Česká republika
ČSCH	Českomoravská společnost chovatelů
ČSV	Český svaz včelařů
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EFB	hniloba včelího plodu
ELISA	z angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ERIC	z angl. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus
EU	Evropská unie
EUR	společná evropská měnová jednotka
KVS	Krajská veterinární správa
OTC	oxytetracyklin hydrochlorid
PCR	polymerázová řetězcová reakce
UV	ultrafialové
μl	mikrolitr
