

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta

Katedra: Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

Studijní program: Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Molekulární epidemiologie druhů *Crithidia mellificae*
a *Lotmaria passim* v populaci včelstev**

Autor: Bc. Kateřina Vočadlová

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

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

České Budějovice

2018

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

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina VOČADLOVÁ**
Osobní číslo: **Z16349**
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**
Studijní obor: **Zemědělské biotechnologie**
Název tématu: **Molekulární epidemiologie *Crithidia mellifcae* a *Lotmaria passim*
v populaci včelstev**
Zadávací katedra: **Katedra speciální produkce rostlinné**

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

Cíl práce: Ověřit incidenci *Crithidia mellifcae* a *Lotmaria passim* na vybraném vzorku včelstev.

- 1) Úvod - základní informace o Včele medonosné.
- 2) *Crithidia mellifcae* - stručný popis, historie, epidemiologie, šíření, diagnostika.
- 3) *Lotmaria passim* - stručný popis, historie, epidemiologie, šíření, diagnostika.
- 4) Experiment:
 - a) Odběr vzorků na stanovištích
 - b) PCR test - detekce přítomnosti DNA patogenů.
- 5) Výsledková část - uspořádání výsledků testů do tabulek, příp. fotografie.
- 6) Diskuze - porovnání dosažených výsledků s literárními údaji.
- 7) Závěr - shrnutí výsledků vlastní práce.
- 8) Seznam použité literatury


Rozsah grafických prací: 5 - 10 stran
Rozsah pracovní zprávy: 40 - 50 stran
Forma zpracování diplomové práce: tištěná
Seznam odborné literatury:

D.F. Langridge, R.B. McGhee, *Crithidia mellificae* n. sp.: An acidophilic trypanosomatid of honey bee *Apis mellifera*. J. Protozool., 14 (1967) 485
M. Popp, H.M. Lattorff. A quantitative in vitro cultivation technique to determine cell number and growth rates in strains of *Crithidia bombi* (Trypanosomatidae), a parasite of bumblebees. J. Eukaryot. Microbiol., 58 (2011), pp. 7-10
C. Runckel, J. DeRisi, M.L. Flenniken. A draft genome of the honey bee trypanosomatid parasite *Crithidia mellificae*. PLoS ONE, 9 (2014), p. e95057
A.G. Simpson, J.R. Stevens, J. Lukes. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. Trends Parasitol., 22 (2006), pp. 168-174
Jevrosima Stevanovic, Ryan S. Schwarz, Branislav Vejnovic, Jay D. Evans, Rebecca E. Irwin, Uros Glavinic, Zoran Stanimirovic. Species-specific diagnostics of *Apis mellifera* trypanosomatids: A nine-year survey (2007-2015) for trypanosomatids and microsporidians in Serbian honey bees. Journal of Invertebrate Pathology, Volume 139, September 2016, Pages 6-11
Nolberto Arismendi, Alex Bruna, Nelson Zapata, Marisol Vargas. PCR-specific detection of recently described *Lotmaria passim* (Trypanosomatidae) in Chilean apiaries. Journal of Invertebrate Pathology, Volume 134, February 2016, Pages 1-5


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

Datum zadání diplomové práce: 10. února 2017

Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2018


prof. Ing. Miroslav Soch, CSc., dr. h. c.
děkan


JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 1660, 370 05 České Budějovice


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

V Českých Budějovicích dne 10. února 2017

Prohlášení

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

Datum

Podpis studenta

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala RNDr. Mgr. Štěpánu Rybovi, Ph. D. za vlídnost a poskytnuté materiály, členům katedry genetiky a speciální produkce rostlinné, zejména pak Ing. Ireně Jelínkové, za cenné rady a ochotu. Velké poděkování patří všem, kteří poskytli vzorky pro empirickou část mé práce. Svým blízkých jsem vděčná za ohleduplnost, podporu a potřebné rozptýlení.

Abstrakt

Zvýšené ztráty chovaných včelstev v posledním desetiletí vzbudily značnou pozornost vědců i veřejnosti. Příčinou těchto ztrát je pravděpodobně řada biotických a abiotických faktorů, především však působení patogenů a parazitů. Jednohostitelská trypanosomatida v trávicím traktu včel – *Lotmaria passim* a *Crithidia mellificae*, byla dosud poněkud opomíjena, avšak výsledky nedávných studií naznačují, že tyto druhy mají pravděpodobně podíl na úhynech včelstev. Do řádu Trypanosomatida patří také nebezpeční původci lidských onemocnění, jako je spavá nemoc, Chagasova choroba nebo leishmanióza. Mechanismus vlivu trypanosomatid na zdraví včelstev dosud není zcela znám.

Cílem práce bylo ověřit incidenci trypanosomatid v populaci včelstev v Plzeňském a Jihočeském kraji. Na základě detekce specifických úseků DNA byla potvrzena přítomnost druhu *L. passim*, který byl detekován ve většině vzorků, celkem v 71 %. Oproti tomu druh *C. mellificae* nebyl nalezen v žádném z testovaných vzorků.

Klíčová slova: *Apis mellifera*, ztráty včelstev, trypanosomatida, *Lotmaria passim*, *Crithidia mellificae*, PCR detekce

Abstract

The increased honey bee colony losses in the last decade gain a considerable attention of scientists and public. The causes of these losses include a wide range of biotic and abiotic factors, but pathogens and parasites are probably the main ones. Monoxenous trypanosomatids in honey bee gut – *Lotmaria passim* and *Crithidia mellificae* were neglected for a long time but according to recent studies they seem to participate in those colony declines. Trypanosomatids are widespread parasites, including also the causes of some human illnesses, such as sleeping sickness, Chagas disease and leishmaniasis. The mechanism of the effect on honey bee health is not well understood so far.

The aim of this thesis was to verify the occurrence of the trypanosomatids in honey bee samples from two regions in Czech Republic. The methods, based on detection of specific DNA loci, confirm the high prevalence of *L. passim*, which was founded in majority (71 %) of the samples. On the contrary, no samples were positive to *C. mellificae*.

Key words: *Apis mellifera*, honey bee declines, trypanosomatids, *Lotmaria passim*, *Crithidia mellificae*, PCR detection

Seznam zkratek

- ABPV – virus akutní paralýzy včel, z ang. *Acute Bee Paralysis Virus*
- ATCC – americká kolekce typových kultur, z ang. *American Type Culture Collection*
- CCD – syndrom zhroucení včelstev, z ang. *Colony Collapse Disorder*
- COLOSS – z ang. *Prevention of honey bee COlony LOSSes*
- DWV – virus deformovaných křídel, z ang. *Deformed Wing Virus*
- EPILOBEE – *Epidemiological Surveillance Programme On Honeybee Colony Mortality*
- gGAPDH – glykozomální glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenáza, z ang. *glycosomal Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*
- IAPV – izraelský virus akutní paralýzy, z ang. *Israeli Acute Bee Paralysis Virus*
- ITS – z ang. *Internal transcribed spacer*
- kDNA – kinetoplastová deoxyribonukleová kyselina
- NK – negativní kontrola
- PCR – polymerázová řetězová reakce, z ang. *Polymerase Chain Reaction*
- PK – pozitivní kontrola
- POLA – katalytický polypeptid DNA polymerázy α , z ang. *DNA polymerase alpha catalytic subunit*
- RPB1 – velká podjednotka RNA polymerázy II, z ang. *RNA polymerase II large subunit*
- RPOIILS – největší podjednotka RNA polymerázy II, z ang. *RNA Polymerase II Largest Subunit*
- SE – pomalu se vyvíjející, z ang. *Slow Evolving*
- SEM – rastrovací elektronová mikroskopie, z ang. *Scanning electron microscope*
- SL RNA – z ang. *Spliced Leader*
- SODE – vysolovací metoda extrakce DNA, z ang. *Salting-out DNA Extraction*
- SSU rRNA – malá ribozomální podjednotka, z ang. *Small Subunit Ribonucleic acid*
- TBE – Tris-Borát-EDTA
- TOPII – DNA topoizomeráza II

Obsah:

Abstrakt

Seznam zkratk

1	ÚVOD	11
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
2.1	Včela medonosná	12
2.1.1	Význam včel.....	12
2.1.2	Zdravotní stav včelstev.....	13
2.1.3	Původci onemocnění včel.....	14
2.1.4	Syndrom zhroucení včelstev	14
2.1.5	Monitoring ztrát včelstev	18
2.2	Trypanosomatida v trávicím traktu včel.....	19
2.2.1	Obecná charakteristika trypanosomatid	19
2.2.2	Specifické vlastnosti trypanosomatid.....	21
2.3	Určování druhů z řádu Trypanosomatida.....	25
2.3.1	Původní způsob klasifikace	25
2.3.2	Metody molekulární biologie	25
2.4	<i>Crithidia mellificae</i>	26
2.4.1	Charakteristika druhu	27
2.4.2	Hostitelské spektrum druhu.....	28
2.4.3	<i>Crithidia bombi</i> - příbuzný druh, parazitující na čmelácích	28
2.5	<i>Lotmaria passim</i>	29
2.5.1	Charakteristika druhu	29
2.5.2	Hostitelské spektrum druhu.....	30
2.5.3	Rozšíření druhu	30
2.6	Šíření trypanosomatid včel.....	31
2.7	Odlišení druhů <i>C. mellificae</i> a <i>L. passim</i>	31
3	CÍL PRÁCE.....	33
4	MATERIÁL A METODIKA	33
4.1	Sběr a příprava vzorků	33
4.2	Izolace DNA.....	33
4.3	Amplifikace vybraných úseků DNA	34
4.4	Ověření výsledků na agarózovém gelu	36

4.5	Příprava vzorků na sekvenaci.....	36
5	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	37
5.1	DNA extrakce.....	37
5.2	Amplifikace úseku SSU rRNA	37
5.3	Amplifikace úseku genu pro gGAPDH druhu <i>L. passim</i>	38
5.4	Amplifikace úseku genu pro cytochrom b druhu <i>Crithidia mellificae</i>	39
5.5	Další způsoby detekce a odlišení trypanosomatid.....	40
5.6	Trypanosomatida v testovaných vzorcích	41
5.7	Rozšíření trypanosomatid a jejich vliv na zdraví včelstev	44
5.7.1	Variabilita ve vnímavosti k patogenům	46
5.8	Vztahy mezi mikroorganismy v trávicím traktu včel.....	47
5.8.1	Interakce mezi trypanosomatidy a druhem <i>Nosema ceranae</i>	47
5.8.2	Význam symbiotických mikroorganismů	48
6	ZÁVĚR.....	50
7	PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY	51

1 Úvod

Včela medonosná je jedním z nejvýznamnějších hmyzích opylovačů. Opylením je zvýšena produkce kulturních plodin, sníženo riziko napadení květu škůdci, ale je také udržována genetická diverzita planě rostoucích plodin, na kterých jsou závislé další organismy.

V současné době získalo téma zdraví včely medonosné značnou pozornost, a to především vzhledem ke zvýšeným úhynům chovaných včelstev v USA a Evropě v posledním desetiletí. Na těchto ztrátách se pravděpodobně podílí řada abiotických a biotických faktorů, ovšem předpokládá se, že zásadní význam mají patogenní organismy a parazité, kterým musí včelstva čelit. Včela medonosná je hostitelem pro široké spektrum patogenů a parazitů, mezi něž se řadí viry, využívající roztoče *Varroa destructor* jako vektor, bakterie nebo jednobuněčná eukaryota.

Trypanosomatida jsou široce rozšíření jednobuněční paraziti, kteří napadají rostliny, bezobratlé i obratlovčí hostitele, včetně člověka. Druhy *Lotmaria passim* a *Crithidia mellificae* osidlují trávicí trakt včel a podle současných studií by se mohly podílet na zvýšených úhynech včelstev. Ačkoliv mechanismus působení těchto druhů na zdravotní stav včelstev není dosud uspokojivě prostudován, jsou známé negativní účinky některých příbuzných druhů, např. druhu *Crithidia bombi*, parazitujícího na čmelácích (*Bombus* spp.) nebo některých vícehostitelských druhů, způsobujících onemocnění člověka, jako je spavá nemoc neboli africká trypanozomiáza, Chagasova choroba (původci rodu *Trypanosoma*) nebo leishmanióza (rod *Leishmania*).

Úpadek včelstev by znamenal značné ekonomické a ekologické problémy, negativně by se mohl projevit také na zdravotním stavu lidské populace, vzhledem ke zhoršené dostupnosti některých výživově významných potravin, především zeleniny, ovoce a olejin. Studium příčin těchto ztrát, působení patogenů, parazitů a jejich vzájemných interakcí je proto velmi důležité.

2 Literární přehled

2.1 Včela medonosná

Počet druhů včel je odhadován asi na 30 tisíc. Zhruba polovina byla dosud zaznamenána entomology a zařazena do sedmi čeledí. Včely medonosné, rodu *Apis* z čeledě *Apidae* (*Hymenoptera: Apidae: Apis*), zahrnují více než deset druhů. Pouze některé z nich jsou ovšem vhodné pro chov v úlech. V současné době je nejvíce chovaným druhem včela medonosná *Apis mellifera*, někdy označována jako včela západní, pocházející z Afriky, Evropy a Středního východu. V chovech jsou celosvětově využívána především evropská plemena tohoto druhu (*A. m. carnica*, *A. m. iberica* a *A. m. ligustica*). V Asii je dosud také využíván druh včely východní *Apis cerana* (Bradbear 2009; Thompson et al. 2014).

2.1.1 Význam včel

Chov včel přináší velkou škálu hodnotných a užitečných produktů - včelí med, vosk, propolis, mateří kašičku, včelí jed. Díky svým unikátním vlastnostem mají tyto produkty nezastupitelné postavení v lidském jídelníčku, využití nalézají také v přírodní medicíně (tzv. apiterapii), kosmetice a dalších odvětvích. V globálním měřítku je ovšem významnější opylovací funkce včel. Opylením je zajištěn přenos pylu cizosprašných rostlin a zvýšení výnosu kulturních plodin pro lidskou potřebu. Opylovači mají také důležitou roli v přírodním ekosystému, opylují totiž planě rostoucí rostliny, na jejichž produkci jsou závislé další organismy, a zachovávají tak biodiverzitu nejen zemědělské krajiny. Existuje celá řada opylovačů, pro monokultury plodin je ovšem včela medonosná celosvětově nejvýznamnější (Ravoet et al. 2013; Runckel, DeRisi a Flenniken 2014).

Obecně se odhaduje, že přibližně jedna třetina plodin využívaných jako potraviny je závislá na opylení živočichy, především včelami. Ekonomická hodnota opylování se s rostoucí potřebou potravin neustále zvyšuje; v roce 2008 byla celosvětově odhadnuta na 153 miliard euro (Gallai et al. 2008). Na opylení jsou nejvíce závislé druhy zeleniny a ovoce, včetně skořápkových plodů, a olejnin (např.

brukev řepka olejka a slunečnice). Ve Spojených státech amerických mají například včely zásadní funkci v opylování mandloní. Přibližně 60 % z 2,5 milionů komerčně chovaných včelstev v USA je každý rok transportováno do Kalifornie, odkud pochází až 80 % světové produkce mandlí (Glenny et al. 2017).

Opylování včelami má vliv také na utváření kvantitativních a kvalitativních vlastností plodin. Podle studie prováděné na jahodách měly včelami opylované plody ve srovnání s rostlinami opylenými větrem nebo vlastním pylem sytější barvu (Klatt et al. 2013). Opylování může zvýšit také jejich trvanlivost udržením dlouhodobější pevnosti plodů (Klatt et al. 2013). U brukve (*Brassica*) je opylením dosaženo vyššího obsahu oleje v semenech. Pokud je v blízkosti pole dostatečné množství včel, je zajištěno opylení květů přibližně ve stejnou dobu a tedy i dozrání semen jednotlivých rostlin je stejnoměrné. V dostatečném počtu včel je opylení rychlejší, čímž je také sníženo riziko napadení květu škůdci (Bradbear 2009).

2.1.2 Zdravotní stav včelstev

Ačkoliv je včela medonosná chovaná člověkem již několik tisíc let, oproti jiným hospodářským zvířatům není ovlivněna natolik, aby mohla být považována za domestikovaného živočicha. Donedávna se předpokládalo, že včelstva chovaná včelařem by byla schopna dobře přežívat i bez jeho zásahů ve volné přírodě. Přibližně v posledním desetiletí ovšem zaznamenali včelaři globálně zvýšené úhyny včelstev, které jsou spojovány především s výskytem parazitů a patogenů, kterým včelstva mnohdy nejsou sama schopna čelit. V Evropě by například včelstva nepřežila bez ošetření proti parazitickému roztoči *Varroa destructor* (Bradbear 2009; Veselý 2013).

Vlivů, které negativně ovlivňují zdraví a životaschopnost včelstva je ale celá řada – škůdci a patogeny včel, genetické založení včelstva, počasí, výživa, chovatelská technika a agrochemie (Cornman et al. 2012; Ravoet et al. 2013). Přestože patogeny mají největší vliv na zdraví včelstev, ztráty jsou obvykle připisovány vzájemnému působení výše vypsanych faktorů (Glenny et al. 2017).

Odhalení všech vlivů na úmrtnost včelstev je vzhledem k jejich možné vzájemné interakci poněkud obtížné. Studium včelích patogenů navíc komplikuje fakt, že jejich výskyt je odlišný v různých obdobích a geografických lokacích.

Limitující jsou také dosud omezené diagnostické metody, které by přispěly k lepšímu pochopení některých onemocnění včel (McFadden et al. 2016).

2.1.3 Původci onemocnění včel

Nakažlivá onemocnění včel mohou být rozdělena podle původce na infekční, způsobená viry, bakteriemi nebo houbami a invazivní, neboli parazitární (Veselý 2013).

U včel bylo detekováno přes 24 druhů virů (Steinhauer et al. 2018), z nichž jsou se ztrátami včelstev během zimy spojovány především virus akutní paralýzy včel (ABPV, z angl. *Acute Bee Paralysis Virus*), virus deformovaných křídel (DWV, z angl. *Deformed Wing Virus*) a izraelský virus akutní paralýzy (IAPV, z angl. *Israeli Acute Bee Paralysis Virus*). Tyto viry spadají do skupin *Iflaviridae* a *Dicistroviridae* (Dainat et al. 2012). Ochrana včelstva před virovým onemocněním je úzce spjata s monitorováním a tlumením roztoče *V. destructor* (Steinhauer et al. 2018).

Včela medonosná je hostitelem také pro velké množství bakterií. Některé jsou nepatogenní, symbiotické a pomáhají udržovat zdraví včelstva. Z patogenních bakterií, devastující včelstva, jsou známe především dva druhy – původce moru včelího plodu, *Paenibacillus larvae*, a původce hniloby včelího plodu, *Melissococcus plutonius* (Steinhauer et al. 2018).

Se ztrátami včelstev jsou dále mnohdy spojovány mikrosporídie rodu *Nosema*. Patogeny rodu *Nosema* mají negativní vliv na zdraví včely a podílejí se pravděpodobně na zimních úhynech. Z publikované literatury ovšem nelze zcela jednoznačně určit, jak velký vliv má mikrosporídie *N. ceranae* na ztráty včelstev (Steinhauer et al. 2018).

V současné době je věnována pozornost také dalším dosud málo popsáným patogenním druhům, jako jsou trypanosomatida, *Crithidia mellifica* a *Lotmaria passim* nebo bakterie rodu *Spiroplasma* (Ravoet et al. 2013).

2.1.4 Syndrom zhroucení včelstev

Vzhledem k množství parazitů a patogenů, kterému jsou včelstva vystavena, jsou určité ztráty včelstev obvyklé. V současných letech ovšem včelaři pozorují

výrazně vyšší úhyny chovaných včelstev a někteří včelaři se potýkají s nezvyklým jevem, který získal označení „syndrom zhroucení včelstev“ (CCD z angl. *Colony Collapse Disorder*). Tento jev byl poprvé pozorován roku 2006 v USA a projevuje se náhlou ztrátou dospělé populace dělnic, aniž by zůstala uvnitř nebo v okolí úlu uhynulá těla. V úlu zůstává pouze matka obklopena skupinkou několika nově vylíhnutých včel, se zavičkovaným plodem a zásobami. Vzhledem k značným, negativním dopadům, které mohou takové ztráty včelstev přinášet, je tato problematika zájmem včelařů, vědců i veřejnosti (Ratnieks a Carreck 2010).

Existují různá vysvětlení CCD, příčinou mohou být podle studií nemoci a škůdci včel, pesticidy používané v zemědělství, environmentální a ekonomické faktory nebo klimatické podmínky. Někteří vědci se domnívají, že vliv mohou mít také kontroverzní geneticky modifikované plodiny. Příčiny CCD stále nejsou zcela pochopeny, je ale patrné, že zásadním problémem pro včelstvo, a tedy i pro včelaře, je působení škůdců a patogenů (Ratnieks a Carreck 2010).

S CCD jsou mnohdy spojováni tyto paraziti a patogeny:

Varroa destructor

Schopnost patogenů zahubit včelstvo závisí také na přítomnosti dalších faktorů, jako je například výskyt roztoče *V. destructor*, který byl často ve včelstvech s CCD identifikován. Původním hostitelem tohoto roztoče je asijský druh včely *Apis cerana*. Po introdukci druhu *Apis mellifera* do Asie kolonizuje přibližně od poloviny 20. století *V. destructor* i tento druh včel. V současné době se *V. destructor* vyskytuje po celém světě, kromě Austrálie, kde rovněž nebyl pozorován syndrom náhlého zhroucení včelstev.

V. destructor je ektoparazit a žije se hemolymfou vyvíjejícího se plodu a dospělých včel, čímž oslabuje jejich imunitní systém. U plodu pak může docházet k různým fyzickým deformacím a snížené hmotnosti těla. Příčinou ztrát včelstev ovšem většinou není pouze působení roztoče *V. destructor*, tou je především velké množství včelích virů, které přenáší. Potlačením imunitního systému včel roztočem může mít i běžná virová infekce letální účinky. Dosud byla prokázána spojitost mezi tímto parazitem a virem deformovaných křídel (DWV z ang. *Deformed Wing Virus*),

který je v chovaných včelstvech v Evropě nejhojnější (Ravoet et al. 2013; Thompson et al. 2014).

V současné době je využíváno mnoho opatření a prostředků proti roztoči *V. destructor*, ovšem v některých oblastech, především v USA a Evropě, již byla u roztoče vyvinuta rezistence na některé chemické látky, kterými jej lze zneškodnit (Ratnieks a Carreck 2010). Nevýhodami využívání těchto látek je také jejich vysoká cena a rezidua, která se dostávají do medu a mohou být škodlivé pro konzumenty (Cha 2009).

Včelstva druhu *Apis cerana* mají oproti druhu *Apis mellifera* vyvinuté vlastnosti, kterými jsou schopna se roztoči bránit. Jednou z hlavních vlastností, která je s rezistencí proti roztoči spojena, je hygienické chování včelstva. Tato vlastnost je proto pokládána za potenciální selekční vlastnost spojenou s odolností nejen proti roztoči *V. destructor*, ale také moru včelího plodu nebo zvápenatění plodu (Boecking, Bienefeld a Drescher 2000; J.-L. Wu et al. 2017). Výzkum porovnávající odolnější a citlivější včelstva k roztoči ukázal, že u odolnějších včelstev jsou rozdíly v expresi genů, které jsou zodpovědné za nervovou vzrušivost a čichové vjemy. Odolnější včelstva jsou tak pravděpodobně vnímavější k vnějším podnětům a dokáží lépe rozpoznat napadené buňky. Kombinace těchto projevů souvisí právě s hygienickým chováním a s hřebelcováním, tzv. „grooming“ (Lattorff et al. 2015).

Ztráty způsobené roztočem *V. destructor* jsou hodnoceny na základě množství uhynulých včel v úlu. Oproti tomu při CCD se v úlu ani jeho okolí uhynulé včely nevyskytují (Cox-Foster et al. 2007). Kombinace virů a roztoče *V. destructor* je v současné době považována za hlavní příčinu ztrát včelstev po celém světě (Roberts, Anderson a Durr 2017).

Nosema ceranae

Mezi potenciální původce CCD je mnohdy řazena mikrosporidie *N. ceranae*, parazitující původně, podobně jako *Varroa*, u asijské včely východní (*Apis cerana*). *N. ceranae* má podle studií pravděpodobně vyšší stupeň patogenity než endemický evropský druh *N. apis*. Mezi těmito dvěma druhy je kompetitivní vztah. V současné době druh *N. ceranae* ve včelstvech převládá, ovšem žádná konkrétní kompetitivní výhoda nebyla zjištěna.

Druh *N. ceranae* poškozují střevní stěnu, potlačují imunitní reakci, čímž zvyšují pravděpodobnost virových infekcí, a redukuje dlouhověkost včel (Retschnig et al. 2014). Ačkoliv byl druh *N. ceranae* objeven ve včelstvu s příznaky CCD, molekulární studie ukázaly, že tato mikrosporidie se vyskytuje i v prosperujících včelstvech již po desetiletí, dlouho předtím než byl objeven CCD (Ratnieks a Carreck 2010; Tritschler et al. 2017).

Viry

Se ztrátami včelstev je spojena řada virů. Ve studii, porovnávající výskyt virů ve zdravých včelstvech a ve včelstvech s CCD (Roberts, Anderson, a Durr 2017) byl pouze IAPV detekován ve včelstvech s CCD a nikoliv ve zdravých včelstvech. Před výskytem roztoče *V. destructor* nebyly považovány za závažný problém pro zdraví včelstva, v současné době se ovšem viry v kombinaci s roztočem značně podílejí na ztrátách přezimujících včelstev. Patogenita virů je ovlivněna výskytem dalších patogenů (*V. destructor*) a stresorů, například pesticidů nebo špatnou výživou včelstva, a proto se těžko hodnotí jejich samostatné působení na včelstvo (Cox-Foster et al. 2007; Roberts, Anderson a Durr 2017).

Někteří autoři se přiklánějí k názoru, že příčinou CCD je dosud neznámý, nově introdukovaný infekční druh. Pravděpodobně totiž může být tento jev při opětovném použití včelařského náčiní ze včelstva s CCD přenesen na zdravé včelstvo. Přenosu lze ovšem zabránit ozářením tohoto náčiní před jeho opětovným použitím (Cox-Foster et al. 2007).

V současné době jsou po celém světě rozšířena především evropská plemena včely medonosné, a jsou tak potlačeny autochtonní druhy a plemena. Původní plemena představují zdroj unikátních kombinací genů a znaků formovaných dlouhodobou přirozenou selekcí, které jim umožňují koexistovat s patogeny a parazity. Ačkoliv příměs nepůvodních plemen může zvýšit genetickou diverzitu, může způsobit zánik těchto unikátních kombinací genů a také narušit geny spojené s adaptací na místní podmínky (Pinto et al. 2014). Spolu s nepůvodními druhy jsou navíc do oblastí zavlečeny také neznámé patogenní druhy, což může mít likvidační následky. Příkladem mohou být značné ztráty včelstev po zavlečení roztoče *V. destructor* do Severní Ameriky (De La Rúa et al. 2009).

2.1.5 Monitoring ztrát včelstev

Za účelem větší kontroly nad ztrátami včelstev byly zavedeny některé epidemiologické programy. Program EPILOBEE (*Epidemiological Surveillance Programme On Honeybee Colony Mortality*) na monitorování ztrát včelstev v EU proběhl poprvé v roce 2012 a bylo do něj zapojeno 17 zemí. Ztráty byly vyhodnoceny na základě tří odborných prohlídek náhodně vybraných včelstev: na podzim, na jaře (vyhodnocení zimních úhynů) a v létě, v průběhu včelařské sezóny.

V roce 2012/2013 byla vysoká zimní úmrtnost včelstev především v Belgii (31,73 %), nejnižší pak v Itálii (5,01 %). Sezónní mortalita byla nejvyšší ve Francii (9,63 %) a nejnižší v Litvě (0,09 %). V následujícím roce (2013/2014) byly ztráty nižší, po zimním období byly rovněž nejvyšší v Belgii (13,85 %) a během sezóny ve Francii (8,06 %). Nejnižší zimní i sezónní úmrtnost včelstev byla v druhém roce průzkumu v Litvě (2,16 % resp. 0,16 %). Tyto hodnoty jsou odhadem skutečných ztrát včelstev v dané zemi vypočítané z reprezentativního vzorku populace včely medonosné (Jacques et al. 2016).

Dalším projektem, kterým jsou monitorovány ztráty včelstev prostřednictvím mezinárodně jednotného dotazníkového šetření, je COLOSS (*Prevention of honey bee COlony LOSSes*). Do projektu se v roce 2015/2016 zapojilo bezmála 20 tisíc včelařů (19 952) z 29 zemí. Během zimy v tomto roce dosahovaly průměrné ztráty včelstev zapojených včelařů 12 %. Vyšší zimní ztráty byly pozorovány například v Irsku (29,5 %), Walesu (22,4 %) a Španělsku (22,1 %). Je nutné ovšem brát tyto hodnoty pouze jako orientační údaje, výše ztrát může být ovlivněna také nízkou účastí respondentů v projektu, a nemusí být proto odrazem skutečných průměrných ztrát včelstev v dané zemi (Brodtschneider et al. 2016).

Hraniční hodnota ztrát přezimujících včelstev, kterou lze považovat za přijatelnou, se v průběhu let v různých zemích kvůli měnícím se biotickým a abiotickým podmínkám mění. V Evropě lze považovat za přijatelnou hodnotu do 10 % (Jacques et al. 2016).

V USA jsou ztráty včelstev vyšší. Zatímco v letech 2011/2012 a 2014/2015 byly celkové zimní ztráty 22 %, v roce 2007/2008 dosahovaly 36 %. V roce 2015/2016 byly ztráty v zemích USA v zimě a v létě rozmezí 2,4 – 60,1 % resp. 5,3 – 55,2 %. Po zavlečení roztoče *V. destructor* do USA se akceptovatelné ztráty

zvýšily z rozmezí 5-10 % na 15-25 %. V posledních letech akceptovatelná hodnota ztrát v USA mírně poklesla – 21,7 % v roce 2007 a 13,7 % v roce 2012 (Kulhanek et al. 2017).

Situace v České republice

Od roku 2014 je Česká republika zapojena do projektu COLOSS - Monitoring úspěšnosti zimování včelstev. Počet zapojených včelařů od počátku projektu stoupl; zatímco po spuštění studie se do projektu zapojilo 556 včelařů, v sezóně 2016/2017 se jich zúčastnilo 1191. Průměrné zimní ztráty monitorovaných včelstev v roce 2016/2017 dosahovaly 15 %. O rok dříve byly zimní ztráty včelstev v České republice nižší, 6,4 %. V roce 2014/2015 byly zaznamenány 19% ztráty. Podle získaných informací od včelařů byla v tomto roce nejpravděpodobnější příčinou ztrát varoóza.

Projekt COLOSS přináší již čtvrtým rokem informace o úspěšnosti zimování včelstev v České republice, dosud zapojení včelaři ovšem zauímají pouze malou část všech včelařů, kterých je u nás evidováno kolem 50 tisíc (Brodschneider et al. 2016; Daníhlík 2017).

2.2 Trypanosomatida v trávicím traktu včel

2.2.1 Obecná charakteristika trypanosomatid

V současné době již jsou známé některé jednobuněčné organismy, parazitující v trávicím traktu včel. Jedná se o zástupce ze skupin Amoebozoa (měňavka včelí *Malpighamoeba mellificae*), Chromalveolata, Excavata a Opisthokonta (rod *Nosema*; Schwarz et al. 2015).

Trypanosomatida je řád spadající do třídy *Kinetoplastida* (bičivky; Tabulka 1). Jedná se o evolučně velmi úspěšné a široce rozšířené cizopasníky, napadající teplokrevné i studenkrevné obratlovce, bezobratlé, prvoky i rostliny. Poměrně dobře prostudované jsou rody *Leishmania* a *Trypanosoma*, které zahrnují také původce některých lidských onemocnění, např. Chagasovy choroby (*T. cruzi*), africké spavé nemoci (*T. brucei*) nebo leishmaniózu (druhy rodu *Leishmania*, např.

L. major). Předchůdci těchto organismů žili pravděpodobně již před 100 miliony lety, a přestože je již popsáno okolo tisíc druhů jednohostitelských trypanosomatid s hmyzím hostitelem, předpokládá se, že bude popsáno až 100 tisíc druhů (Lopes 2010; Hammarton, Monnerat a Mottram 2007).

Tabulka 1: Taxonomické zařazení trypanosomatid

superskupina:	Excavata
kmen:	<i>Euglenozoa</i> (krásnoočka)
třída:	<i>Kinetoplastida</i>
řád:	<i>Trypanosomatida</i>
čeleď:	<i>Trypanosomatidae</i>
podčeleď:	<i>Leishmaniinae</i>
infrafamily:	<i>Leishmaniatae</i>

Zdroj: Volf a Horák 2007; Schwarz et al. 2015; Kostygov a Yurchenko 2017

Životní cyklus trypanosomatid

Životní cyklus trypanosomatid je buď monoxenní, zahrnující pouze jeden hostitelský organismus, nebo dixenní se dvěma hostitelskými organismy. Jednohostitelská Trypanosomatida napadají trávicí ústrojí hmyzu – velké rody *Leptomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Herpetomonas* a dva menší rody – *Rhynchoidomonas* a *Wallaceina*, případně kolují mezi fytofágním hmyzem a rostlinami – rod *Phytomonas*. Rody *Leishmania*, *Trypanosoma* a *Endotrypanum* mají dvouhostitelské životní cykly, střídající bezobratlého a obratlovčího hostitele (Yurchenko et al. 2008). V současné době jsou popsány nové rody trypanosomatid, např. *Lotmaria*, *Porcisia* nebo *Novymonas* (Kaufer et al. 2017).

2.2.2 Specifické vlastnosti trypanosomatid

Trypanosomatida mají řadu neobvyklých strukturálních a biochemických vlastností, jako je kinetoplastová DNA, mitochondriální RNA editace, uzavřený průběh glykolýzy v glykosomech nebo mechanismy ochrany proti oxidačnímu stresu. Tyto znaky jsou pravděpodobně pozůstatky endosymbiózy s fotosyntetickými bakteriemi a laterálním přenosem bakteriálních genů, které se podílejí na metabolismu sacharidů. Potenciálními donory specifických genů mohou být také viry z trávicího traktu hostitelského hmyzu. Laterálním přenosem genů pravděpodobně vznikla také komplexní struktura kinetoplastové DNA, k jejíž replikaci je nezbytná řada enzymů ze skupiny polymeráz a ligáz. Geny získané endosymbiózou s nepříbuznými organismy umožnily trypanosomatidům adaptovat se na široké spektrum různých hostitelů (Opperdoes a Michels 2007).

Polymorfie

Významnou vlastností trypanosomatid je polymorfie, tedy schopnost vytvářet během vývoje morfologicky a fyziologicky odlišná stádia (morfy). Tato stádia jsou typická pro určité rody i pro různé fáze životního cyklu, mohou být ovlivněny také podmínkami životního prostředí a kultivace. Umožňují trypanosomatidům přizpůsobit se prostředí hostitele a podmínkám, které obnáší přesun na dalšího hostitele. U trypanosomatid je pozorována velká variabilita morf, v literatuře je obvyklé uváděno šest až osm těchto forem (Volf a Horák 2007; Lopes 2010; Wheeler, Gluenz a Gull 2013)

Morfologická stádia trypanosomatid se liší tvarem, délkou bičíku, přítomností undulující membrány, hlavními určujícími znaky jsou ale především pozice kinetosomu (bazálního tělíska), kinetoplastu a flagelární kapsy. Starší názvy morfotypů byly odvozovány také od rodů, pro které je daná forma typická (Obrázek 1; Wheeler, Gluenz a Gull 2013):

Amastigot (leishmaniová forma, rod *Leishmania*): redukovaný bičík, nevyčnívá z flagelární kapsy na vrcholu okrouhlého těla a není proto při pozorování světelným mikroskopem vidět.

Promastigot (leptomonádová forma, rod *Leptomonas*): bičík vychází z předního konce dlouhého štíhlého těla. Jedná se o jediný morfotyp pozorovaný u rodu *Leptomonas* (Yurchenko et al. 2008).

Epimastigot (critidiová forma, rod *Blastocrithidia*): bičík je vsazen uprostřed štíhlého těla a vytváří krátkou undulující membránu.

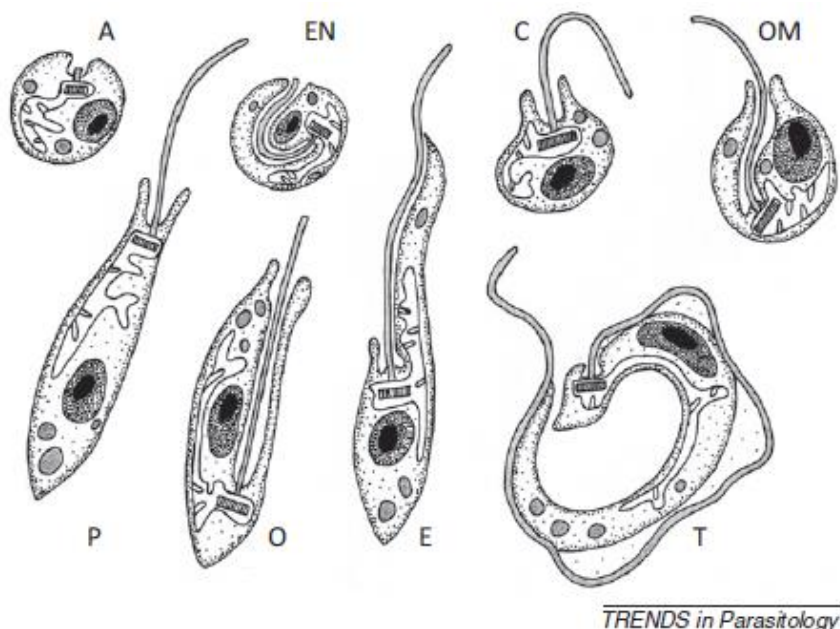
Trypomastigot (trypanosomová forma, rod *Trypanosoma*): bičík je vsazen na zadním konci štíhlé buňky a vytváří dlouhou undulující membránu.

Opistomastigot (rod *Herpetomonas*, *Wallaceina*): bičík probíhá z flagelární kapsy na zadním konci dlouhým kanálkem na přední konec štíhlého těla, kde se vynořuje.

Choanomastigot (rod *Crithidia*): hruškovitý tvar buňky, okraj apikální flagelární jamky, z níž bičík vpředu vychází, je vytažen jako široký límeec.

Sféromastigot: krátký bičík vychází z buňky kulovitého tvaru (vyskytuje se ve výjímavém cyklu trypanosom).

Paramastigot: bičík vychází z dlouhého kanálku jako u opistomastigotu, ale je krátký a tělo je kulovitého tvaru (ve vývojovém cyklu leishmanií).



Obrázek 1: Základní morfotypy trypanosomatid, sloužící jako jeden z určujících znaků jednotlivých rodů a druhů v klasickém způsobu klasifikace. Zkratky: A, amastigot; C, choanomastigot; E, epimastigot; EN, endomastigot; O, opistomastigot; OM, opisthomorf; P, promastigot; T, trypomastigot; Zdroj: Maslov et al. 2013

Pro *in vitro* kultivaci jsou nejvhodnější stádia, která se vyskytují v trávicím traktu hmyzu a hojně zde množí. V *in vitro* kulturách obvykle nejlépe rostou buňky ve stádiu promastigotu. Výjimku tvoří rod *Crithidia*, který je nejčastěji pozorován ve stádiu choanomastigotu (Lopes 2010).

Kinetoplast

Společným znakem zástupců třídy *Kinetoplastea* je přítomnost tzv. kinetoplastu, tedy úseku mitochondrie, ve kterém je nahromaděno velké množství DNA (až 40 % celkové DNA organismu).

Kinetoplastová DNA je uspořádána do kruhových molekul, minikroužků a maxikroužků, které tvoří společně jednotnou síť. Maxikroužky jsou analogické k mitochondriální DNA vyšších eukaryot. Minikroužky kódují tzv. guide RNA, které modifikují transkripty maxikroužků inzercí nebo delecí uridinových zbytků. Tento proces je známý jako RNA editace. Kinetoplastová DNA (kDNA) se využívá jako zdroj genetického materiálu ve fylogenetice (Volf a Horák 2007; Schwarz et al. 2015; Szalanski et al. 2016).

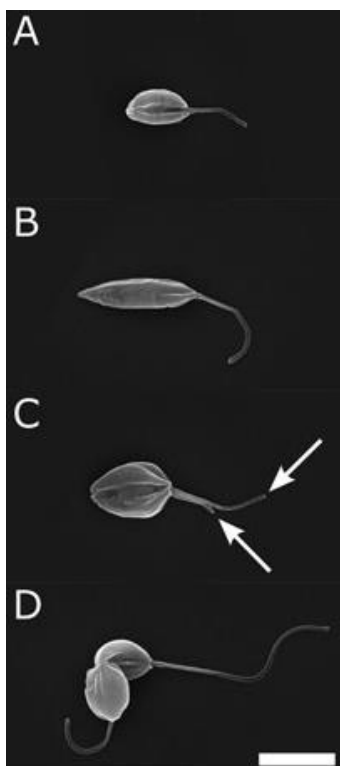
Glykosomy

Některé geny trypanosomatid mají zřejmě původ u rostlin nebo bakterií. Produkty těchto horizontálně získaných genů u trypanosomatid plní svou funkci v glykosomech, kulovitých organelách, ohraničených fosfolipidovou dvojrivrstvou. Glykosomy jsou evolučně příbuzné s peroxisomy, a mají proto některé společné funkce, například chrání buňku před kyslíkovými radikály, podílí se na β -oxidaci mastných kyselin a na biosyntéze éterových lipidů.

V glykosomech se nachází většina glykolytických enzymů, které se podílejí na přeměně glukosy na pyruvát, a některé další enzymy, které jsou součástí metabolické dráhy sacharidů. Oddělení těchto procesů do organel je unikátní vlastnost třídy *Kinetoplastea*. Toto oddělení a schopnost měnit v průběhu životního cyklu enzymatický obsah glykosomu umožňuje rychlejší adaptaci na okolní podmínky během životního cyklu a dokonce přežití krátké doby v anaerobních podmínkách. U jiných organismů probíhá glykolýza v cytosolu (Opperdoes a Michels 2007; Lopes 2010).

Buněčný cyklus a rozmnožování trypanosomatid

Trypanosomatida se zpravidla rozmnožují nepohlavně, binárním dělením. Buněčný cyklus byl popsán u druhu *Leishmania mexicana* (Wheeler, Gluenz a Gull 2011). Celková délka buněčného cyklu je 7,1 hod. K duplikaci jádra, bičíku a kinetoplastu dochází spíše v pozdní fázi buněčného cyklu a pouze jednou (Obrázek 2). Nový bičík se vyvíjí z flagelární kapsy v 5,2 hod, k segregaci DNA během mitózy dochází v 6,3 hod na rozdělení kinetoplastu probíhá v 6,6 hod buněčného cyklu. Buňky vytváří v médiu tzv. rozety, tedy shluky buněk vedle sebe s bičíky směřujícími do středu shluku. Některé buňky *in vitro* kultuře mohou zůstat některé buňky spojené zadní částí těla tzv. cytoplazmatickým mostem, což je následkem nedokonalé cytokineze (Wheeler, Gluenz a Gull 2011).



Obrázek 2: Dělení buňky promastigotu druhu *L. mexicana* zobrazeny pomocí rastrovací elektronové mikroskopie (SEM, z ang. Scanning electron microscope). Fáze A–D vyobrazují základní morfologické rysy jednotlivých stádií dělení buňky. Bílé šipky (C) znázorňují nově se tvořící bičík, který je obvykle kratší než bičík mateřské buňky. Na spodní části obrázku je zobrazena pozdní fázi cytokineze. Zdroj: Wheeler, Gluenz a Gull 2011

Nepohlavním rozmnožováním jsou tvořeny populace identických jedinců – klonů. Předpokládalo se, že genetická variabilita mezi populacemi klonů je dána především vlivem mutací spíše než výměnou genetické informace mezi již existujícími liniemi parazitů. Klonální model byl ovšem zpochybněn objevením některých hybridních druhů u vícehostitelských trypanosomatid (např. *Trypanosoma brucei*, *T. cruzi* nebo *Leishmania major*). Pohlavní rozmnožování se tedy u těchto parazitických prvoků vyskytuje, ale pouze zřídka a pravděpodobně jen u některých druhů. Existenci výměny genetické informace potvrdili Schmid-Hempel et al. (2011) také u jednohostitelských trypanosomatid, na základě studia koinfekcí kmenů druhu *C. bombi* v hostiteli *Bombus terrestris* (Schmid-Hempel et al. 2011). K rozmnožování dochází především v zadní části trávicí soustavy (v ileu a rektu) hostitele (Kaufer et al. 2017).

2.3 Určování druhů z řádu Trypanosomatida

2.3.1 Původní způsob klasifikace

Klasický způsob klasifikace byl dlouhou dobu založen pouze na morfologii, hostitelském spektru a životním cyklu daného druhu (Kostygov a Yurchenko 2017). Vzhledem k omezenému množství rozlišovaných morfotypů a hostitelské specifitě, která není tak striktní, jak se dříve předpokládalo, poskytují ovšem tyto znaky informace k určení pouze několika málo taxonů - rodů a druhů (Maslov et al. 2013). V bičíkatém stádiu je možné od sebe některé zástupce vzájemně odlišit na základě tvaru, spolehlivé určení druhu ovšem vyžaduje molekulárně biologické metody (Schwarz et al. 2015).

2.3.2 Metody molekulární biologie

S rozvojem molekulárních metod jsou druhy klasifikovány na základě genetického založení. Pro pochopení taxonomických vztahů z evolučního hlediska jsou analyzovány především pomalu se vyvíjející (SE, z ang. *Slow Evolving*) úseky DNA, které mají vypovídající hodnotu především v delším časovém rozmezí.

Ve fylogenetice jsou využívány geny malé ribozomální podjednotky (SSU rRNA), ovšem analýza těchto úseků nemusí být vzhledem k jejich pomalému vývoji vždy spolehlivá, například při určování druhů ze stejné čeledi (Kaufer et al. 2017).

K rozlišení druhů jsou proto využívány také některé tzv. „housekeeping“ geny, které kódují proteiny potřebné pro běžné procesy v buňce. Jedná se například o geny pro glykozomální glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenázu (gGAPDH), největší podjednotku RNA polymerázy II (RPOIILS), katalytický polypeptid DNA polymerázy α (POLA) nebo některé proteiny teplotního šoku, tzv. „heat shock“ proteiny (Kaufer et al. 2017).

Druhy a populace mohou být odlišeny také na základě sekvencí SL RNA (z ang. *Spliced Leader*) a ITS (z ang. *Internal Transcribed spacer*) oblasti (Merzlyak et al. 2001; Maslov et al. 2013; Lukeš et al. 2014).

Ve fylogenetice umožnily tyto molekulární metody sjednocení dixenního rodu *Leishmania* s monoxenními rody *Leptomonas* a *Crithidia* do vyšší taxonomické skupiny – podčeledi *Leishmaniinae*. Autoři Kostygov a Yurchenko (2017) mimoto navrhli zřízení dvou podskupin (infracamilies) – *Leishmaniatae* a *Crithidiatae*. Podskupina *Crithidiatae* by zahrnovala rody *Crithidia*, *Leptomonas* a *Lotmaria* (Kostygov a Yurchenko 2017).

2.4 *Crithidia mellifica*

Druh *C. mellifica* byl popsán v roce 1967 ve státě Victoria v Austrálii (Langridge a McGhee 1967). Autoři Langridge a McGhee (1967) se po první experimentální infekci druhem *C. mellifica* domnívali, že nemá patogenní účinky na jedince a včelstvo. Druh byl následně z toho důvodu po více než čtyřicet let přehlížen. V souvislosti s celosvětově vyššími ztrátami včelstev v posledním desetiletí si tento poměrně málo prozkoumaný druh, spolu s dalšími parazity včel, získává opět pozornost vědců. Nedávné studie navíc prokázaly, že trypanosomatida mají pravděpodobně vedle roztoče *V. destructor* a mikrosporidie *N. ceranae* vliv na zvýšenou mortalitu včelstev.

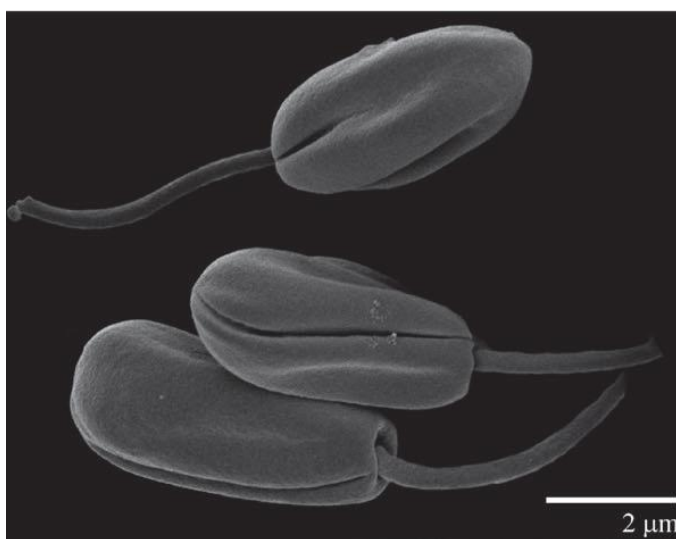
U čmeláků je v současné době dobře popsán příbuzný druh *Crithidia bombi*, který má zásadní negativní vliv na zdraví a životaschopnost kolonií. Navzdory této

znalosti jsou účinky druhu *C. mellificae* na včelstvo poněkud málo prostudované (Szalanski et al. 2016).

2.4.1 Charakteristika druhu

Druh *C. mellificae* spadá do řádu *Trypanosomatida*. Tvar těla má převážně ovoidní, s viditelnou zadní částí a s bičíkem, který nemusí být patrný u fixovaných preparátů (Obrázek 3). Pro druh *C. mellificae* je typická především forma choanomastigotu, může se vyskytovat také ve formě podlouhlého promastigotu. Průměrná délka a šířka těla je 7,04 μm resp. 5,48 μm v živých organismech a 6,47 μm resp. 3,16 μm v kultuře.

Bylo zjištěno, že kultury rostou nejlépe při nižších hodnotách pH mezi 5 a 6, jedná se tedy o acidofilní organismy. Druh *C. mellificae* napadá rektální papily včel, rektum a zadní část ilea, a to jak volně, tak připojením ke stěně rekta. Zpravidla je rektum kolonizováno větším množstvím sféroidů, nepohyblivými kulovitými buňkami, čímž je vytvořena kompaktní vrstva parazitů na povrchu střevní stěny (Langridge a McGhee 1967; Schwarz et al. 2015).



Obrázek 3: Snímek druhu *C. mellificae* kmene 30254 z rastrovací elektronové mikroskopie (ang. *Scanning electron microscope*, SEM); měřítko 2 μm ; zdroj: Schwarz et al., 2015

2.4.2 Hostitelské spektrum druhu

Původním hostitelem druhu *C. mellifica* je pravděpodobně evropský druh včely medonosné *A. mellifica*, schopnost infikovat včelu východní ale *A. cerana* není vyloučena (Morimoto et al. 2013).

Hostitelské spektrum druhu *C. mellifica* zahrnuje více druhů blanokřídlého hmyzu – včely medonosné (*Apidae: Apis: Apis mellifera*), vosy druhu *Vespula squamosa* (*Vespidae: Vespula*), druh samotářské včely zednice (*Megachilidae: Osmia: Osmia bicornis*) a další (Schwarz et al. 2015).

Roku 1974 byla buněčná kultura z amerických vzorků včely medonosné, uschována do sbírky jako kmen ATCC 30254 (ATCC, z ang. *American Type Culture Collection*) a byla rovněž uschována kultura ze vzorků vos (*Vespula squamosa*) – ATCC 30862 (Xu et al. 2018). Druh *C. mellifica* byl detekován v Austrálii, Belgii a USA. K potvrzení výskytu druhu v Austrálii v 60. letech ovšem nejsou dostupná molekulární data (Ravoet et al. 2015).

2.4.3 *Crithidia bombi* - příbuzný druh, parazitující na čmelácích

Druh *C. bombi* parazituje na čmelácích (rodu *Bombus*) a může jim způsobovat vážné zdravotní komplikace (Ravoet et al. 2015; Szalanski et al. 2016). Donedávna se jednalo o jediný popsáný druh z řádu *Trypanosomatida* u čmeláků; v roce 2010 byl popsán a odlišen nový druh, parazitující v trávicím traktu čmeláků, *C. expoeki* (Schmid-Hempel a Tognazzo 2010).

K infekci čmeláci matky dochází především na jaře, což je kritické období v životním cyklu čmeláků, zásadní pro úspěšné založení kolonie. Vysoká prevalence druhu *C. bombi* je v období opylování a shánění potravy, kdy jich může být infikováno až 80 % (Ruiz-González a Brown 2006). Druh *C. bombi* není podobně jako druh *C. mellifica* pouze rodově specifický; byl identifikován u dvou druhů samotářských včel – *Osmia bicornis* a *Andrena vaga* (*Andrenidae: Andrena*; Ravoet et al. 2014).

Virulence, intenzita infekce, rozšíření a také vnímavost jedince k nákaze druhem *C. bombi* je určována také genotypem hostitele a hostitelskou heterogenitou. Ve vztahu parazita a hostitele jsou pozorovány interakce obou genotypů. U kmenů

C. bombi s rychlým životním cyklem je běžný přesun v rámci jedné kolonie, oproti tomu kmeny s pomalým životním cyklem nebo ty, odolné k vysychání, jsou přizpůsobeny přenosu mezi koloniemi.

V běžných podmínkách není napadení druhem *C. bombi* pro čmeláky fatální, napadené matky ovšem nejsou tak úspěšné při zakládání kolonií a napadené kolonie jsou následně méně početné a je u nich pozorován zpomalený růst. Narušena je také jejich schopnost rozpoznávat a vybírat květy k opylení na základě znaků jako je barva, vůně, velikost apod. (Ruiz-González a Brown 2006; Stuart et al. 2008; Schmid-Hempel et al. 2011).

2.5 *Lotmaria passim*

Donedávna byl druh *C. melliferae* považován za jediný druh trypanosomatid u včel. V roce 2015 poukázali Schwarz et al. (2015) ve své studii na nutnost přezkoumat a přehodnotit taxonomické zařazení skupin patřících mezi trypanosomatida s využitím fylogenetiky, nikoliv morfologie. Zároveň popsali nový druh, *L. passim*. Byl pojmenován po mikrobiologovi a odborníkovi na včely, Ruth Lotmarovi, který publikoval v polovině 20. století rozsáhlou práci, zkoumající trypanosomatida u blanokřídlých (Schwarz et al. 2015; McFadden et al. 2016). Druhový název je z latinského slova *passim*, tedy „všude,“ vyjadřující globální a hojné rozšíření druhu v populacích včely medonosné, *A. mellifera*. Obsahuje také anagram „apis m,“ odkazující na typického hostitele druhu, *Apis mellifera*.

L. passim podle současných studií u včel převažuje, naopak druh *C. melliferae* se u včel objevuje jen zřídka (Schwarz et al. 2015).

2.5.1 Charakteristika druhu

Ve formě promastigotu má druh *L. passim* kopinatý až kapkovitý tvar těla s jedním volným bičíkem vnořeným do flagelární kapsy. Promastigot je vodorovně zploštělý s rýhou, zužující se do prodloužené zadní části (Obrázek 4). Průměrná délka těla je 7,44 μm (4,66–11,40 μm) a šířka 3,15 μm (1,50–4,65 μm). Sféroidi (3–4 μm) adherují ke střešní stěně a tvoří jednotnou hustou vrstvu, především mezi rektálními papilami v přední části rekta a v koncové části ilea. Pozorovatelná jsou

polymorfická stádia v rozmezí mezi promastigotem a sféroidní formou (Schwarz et al. 2015).



Obrázek 4: *Lotmaria passim*, kmen BRL; SEM; měřítko 4 μ m; zdroj: Schwarz et al. 2015

2.5.2 Hostitelské spektrum druhu

První údaje o výskytu druhu *L. passim* v trávicím traktu včel jsou datovány od roku 2010. Dosud byl tento druh izolován pouze z včely medonosné a v jednom případě také z včely východní (*Apis cerana*; Schwarz et al. 2015).

Buněčná kultura ATCC PRA 403 kmene SF byla uložena do sbírky původně jako druh *C. mellifica* (Runckel et al. 2011). Autoři Schwarz et al. (2015) buněčnou kulturu přiřadili k novému druhu, *L. passim*. V mnoha dřívějších studiích jsou ovšem druhy *C. mellifica* a *L. passim* zaměňovány. Pro identifikaci druhu je rovněž k dispozici hapantotypový vzorek kmene BRL (ATCC PRA-422).

2.5.3 Rozšíření druhu

Druh *L. passim* byl popsán teprve v roce 2015. Dříve byl identifikován v Belgii, USA, Číně, Itálii, Japonsku, Švýcarsku a Turecku. V těchto studiích byly ovšem získané sekvence původně přiřazeny k druhu *C. mellifica*. Druh byl identifikován také např. ve Švýcarsku, v České republice, na Slovinsku (Runckel, DeRisi a Flenniken 2014; Schwarz et al. 2015; Hubert et al. 2017; Cersini et al. 2015). Výskyt tohoto druhu ve včelstvech se předpokládá i v dalších zemích.

2.6 Šíření trypanosomatid včel

Monoxenní trypanosomatida mohou infikovat hostitele několika způsoby: pozřením parazitických buněk v podobě amastigotu z výkalů infikovaného hmyzu, pozřením jiného infikovaného druhu nebo druhu příbuzného (kanibalismus; Kaufer et al. 2017).

Přenos trypanosomatid byl popsán u příbuzného druhu *C. bombi*. Po požití hostitelem se parazitické buňky připojí ke střevní stěně, kde dochází k jejich rozmnožování. V určitém stádiu vývoje opouští stovky až tisíce parazitických buněk tělo hostitele společně s výkaly a dostávají se na květy a do půdy. Na květy může být parazit přenesen také přímo na těle hmyzu. Infikované květy jsou pak zdrojem nákazy pro další hostitelské organismy. Není dosud známo, jak dlouho je parazit takto schopný v prostředí přežít (Ruiz-González a Brown 2006; Cersini et al. 2015).

Autoři Ruiz-González and Brown (2006) se zabývali otázkou, zda může dojít k infekci včely medonosné druhem *C. bombi* a naopak infekci čmeláka trypanosomatidy včel. Bylo zjištěno, že včela medonosná může sloužit jako vektor druhu *C. bombi*. Parazit může být přenesen na těle včely a dokonce přežít průchod včelím trávicím traktem a vyčkat do období, kdy včela vylétává z úlu a infikuje květy rostlin výkaly. Při nepříznivém počasí zůstávají dělnice v úlu a mohou zde šířit parazitické buňky výkaly na další včely, čímž se ještě zvyšuje počet včelích vektorů. Během experimentu byly parazitické buňky druhu *C. bombi* v trávicím traktu včely medonosné i pět dní po inokulaci schopné infikovat svého specifického hostitele. Infekce včely ale nebyla pozorována. Podobně také nedošlo k infekci čmeláků druhem *C. melliferae* (Ruiz-González a Brown 2006). Druhy *C. melliferae* a *L. passim* byly detekovány ve vzorcích čmeláků také v současných studiích (např. Tripodi, Szalanski a Strange 2018; Bartolomé et al. 2018).

2.7 Odlišení druhů *C. melliferae* a *L. passim*

Ačkoliv se druhy *C. melliferae* a *L. passim* liší morfologickými vlastnostmi, není možné je pod světelným mikroskopem bezpečně rozpoznat. K odlišení druhů *C. melliferae* a *L. passim* se využívá několik molekulárně biologických metod.

V současné době je již v databázi GenBank zařazeno mnoho sekvencí DNA druhů *L. passim* a *C. mellificae*. Pro identifikaci a odlišení druhů trypanosomatid jsou nejvíce využívány lokusy SSU rRNA a gGAPDH. Oba druhy jsou si v těchto nukleotidových sekvencích navzájem značně podobné, ovšem je možné nalézt specifická místa umožňující jejich odlišení (Arismendi et al. 2016).

K určení druhů se využívá také gen pro cytochrom b, který je součástí kDNA. Tento lokus byl použit například pro identifikaci blízce příbuzných druhů rodu *Crithidia* – *C. bombi* a *C. expoeki*, napadající čmeláky (Schmid-Hempel a Tognazzo 2010; Schwarz et al. 2015).

3 Cíl práce

Podle nedávných studií se dlouho přehlížená trypanosomatida vyskytují běžně v trávicím traktu včel a mohou se podílet na zvýšených úhynech včelstev v posledních letech. Jejich výskyt a působení by proto neměly být opomíjeny.

Cílem práce bylo ověřit incidenci druhů *C. mellificae* a *L. passim* ve včelstvech v České republice, konkrétně v Plzeňském a Jihočeském kraji. Aktuálně publikované metody detekce specifických úseků DNA umožňují identifikovat a bezpečně odlišit tyto druhy.

4 Materiál a metodika

4.1 Sběr a příprava vzorků

Sběr vzorků probíhal v srpnu a září 2017. Do flakonků, mateřích klíček nebo plastových krabiček s otvory bylo z každého úlu odebráno cca 10 živých dělnic. Vzorky včel pocházely z Jihočeského (n = 85) a Plzeňského kraje (n = 36), kde byly poskytnuty především drobnějšími chovateli. Včelstva působila na pohled zdravě, bez zjevných příznaků chorob. Celkem bylo odebráno 121 vzorků včel ze shodného počtu úlů. Vzorky včel byly převezeny do laboratoře, kde byly mrazem usmrceny a krátkodobě uchovány při -20 °C do extrakce DNA.

Před samotnou izolací byl pod binokulární lupou pomocí dvou sterilních pinzet vypreparován trávicí trakt včel. Z každého vzorku bylo použito 5–10 včel. Střevní trakty včel byly před izolací DNA zhomogenizovány tyčinkou s malým množstvím homogenizačního písku.

4.2 Izolace DNA

K izolaci DNA vzorků byl použit E.Z.N.A.®Tissue DNA kit (OMEGA biotek, USA). Izolace byla provedena podle postupu uvedeného výrobcem a zahrnovala tyto kroky:

1. Lyze buněk

2. Zajištění vhodných podmínek navázání DNA na membránu
3. Navázání DNA na membránu
4. Promývání navázané DNA (3x opakování)
5. Vysušení membrány
6. Eluce navázané DNA

Zhomogenizovaný materiál byl inkubován s lyzačním pufrem po dobu 3–12 hodin. Mezi výše uvedenými kroky byly vzorky stočeny v centrifuze podle postupu uvedeného výrobcem.

4.3 Amplifikace vybraných úseků DNA

K identifikaci druhů *C. melliferae* a *L. passim* (*Cm + Lp*) byl použit primer pro amplifikaci SSU úseku rRNA podle Schwarze et al. (2015). Pro identifikaci druhu *C. melliferae* byl použit primer podle autorů Stevanovic et al. (2016). Těmito primery byly amplifikovány úseky mitochondriální DNA, kódující protein cytochrom B, o délce cca 140 bp. Druh *L. passim* byl identifikován pomocí primerů pro amplifikaci úseku genu pro gGAPDH druhu *L. passim* (*Lp*) o délce cca 402 bp (Arismendi et al. 2016). Sekvence primerů jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2: Přehled použitých primerů pro PCR

Primer	Sekvence	Specifita	Úsek	Zdroj
CmCyt b_F	AGTTTGAGCTGTTGGATTTGTT	<i>Cm</i>	Cyto B	Stevanovic et al., 2016
CmCyt b_R	AACCTATTACAGGCACAGTTGC			
Lp-gF Lp-gR	TTGCGAAGAGCTCGCCTGAGGT TCGCCGTGTAGGAGTGAATGGTC	<i>Lp</i>	gGAPDH	Arismendi et al., 2016
SSU-F SSU-R	GCGTCTTTTGACGAACAAC TACGTTCTCCCCGAACTAC	<i>Cm + Lp</i>	SSU rRNA	Schwarz et al., 2015

PCR reakce o celkovém objemu 20 μ l obsahovala Master Mix, jeden pár primerů, DNA templát a H₂O určenou pro PCR (Tabulka 3). Poměr komponent v PCR reakční směsi byl stejný při amplifikaci úseku SSU rRNA trypanosomatid, genu pro gGAPDH druhu *L. passim* i genu pro cytochrom B druhu *C. mellificae*. Při reakci byly použity také vzorky pro pozitivní kontrolu (PK). Společně se vzorky proběhla v každé reakci kontrola použitých chemikálií, obsahující všechny komponenty PCR reakce bez DNA templátu (NK).

Pozitivní vzorky druhu *L. passim* byly získány po první reakci s primery pro SSU rRNA. Pozitivní vzorek druhu *C. mellificae* byl poskytnut autorkou navržených primerů použitých pro detekci tohoto druhu.

Tabulka 3: Složení reakční směsi na PCR

Master Mix	10 μ l
H ₂ O	7 μ l
Primer (forward)	0,5 μ l
Primer (reverse)	0,5 μ l
DNA teplát	2 μ l
celkový objem	20 μ l

Pro použité páry primerů byly nastaveny odlišné teplotní podmínky (Tabulka 4) na termocykleru, podle protokolu autorů uvedených v Tabulce 2.

Tabulka 4: Teplota a čas jednotlivých kroků PCR reakcí

Krok	Cm CytoB	Lp gGAPDH	SSU rRNA
Poč. denaturace	95 °C / 2 min	94 °C / 3 min	95 °C / 5 min
Denaturace	95 °C / 30 s	94 °C / 30 s	95 °C / 45 s
Annealing	/ 30 s	60 °C / 20 s	60 °C / 45 s
Elongace	72 °C / 20 s	72 °C / 45 s	72 °C / 1,5 min
Záv. elongace	72 °C / 2 min	72 °C / 7 min	72 °C / 10 min
Počet cyklů	40	35	35

4.4 Ověření výsledků na agarózovém gelu

K ověření PCR produktů byla provedena horizontální elektroforéza. Gel byl připraven z TBE pufru (Tris-Borát-EDTA) a agarózy s výslednou koncentrací 1–2,5 %, podle velikosti separovaných fragmentů (Tabulka 5). Pro vizualizaci pod UV lampou bylo před elektroforézou do gelu přidáno interkalační barvivo – Ethidium bromid. Pro určení velikosti PCR produktu byl použit 100bp ladder.

Tabulka 5: Podmínky elektroforetické separace PCR amplikonů

Specifita	Velikost amplikonu	Koncentrace agarózového gelu
<i>Cm</i>	140 bp	2,5 %
<i>Lp</i>	402 bp	1,5 %
<i>Cm + Lp</i>	763/773 bp	1 %

4.5 Příprava vzorků na sekvenaci

Naamplifikované úseky genu pro SSU rRNA vybraných dvou vzorků byly pro ověření osekvenovány.

K 10 μ l PCR produktu byly přidány 2 μ l ExoSAP-IT reagent. Vzorky byly následně inkubovány 20 minut při 37 °C. Pro inaktivaci enzymu byly vzorky následně inkubovány 15 minut při 80 °C. Po uplynutí inkubační doby bylo k oběma vzorkům přidáno 5 μ l forward primeru pro SSU rRNA trypanosomatid. Připravené vzorky byly odeslány do firmy SEQme a osekvenovány metodou dle Sangera.

5 Výsledky a diskuse

5.1 DNA extrakce

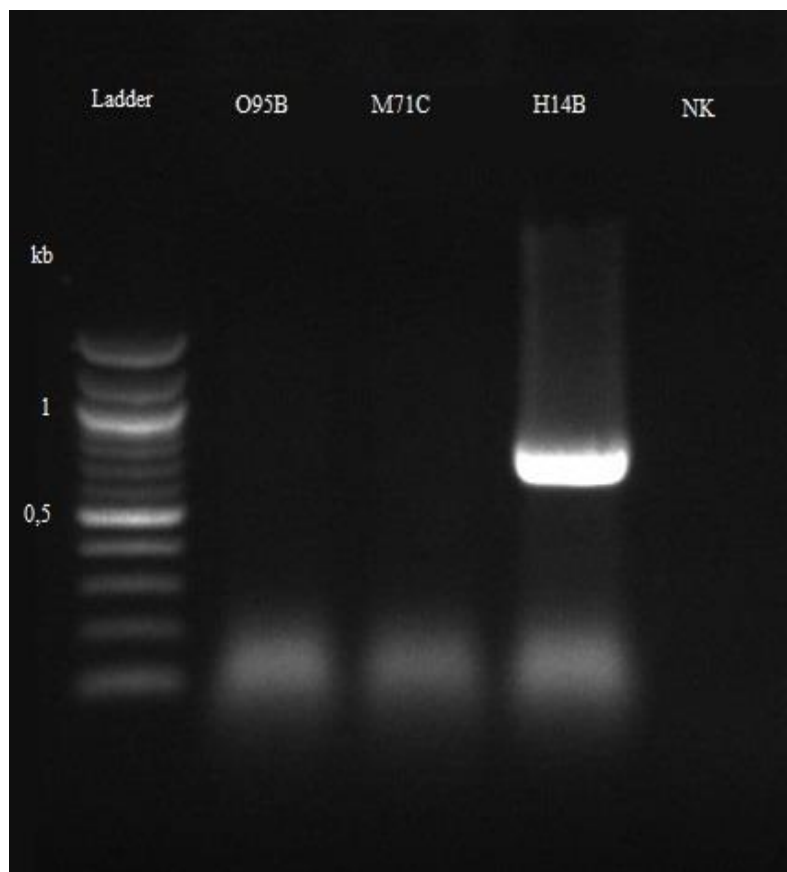
Použitím kitu bylo získáno dostatečné množství čisté DNA pro následnou PCR. Komerční kity umožňují rychlou a snadnou izolaci nukleových kyselin bez použití toxických látek, jako při fenol-chloroformové extrakci. Nevýhodou použití kitů je ovšem jejich vyšší cena. Pro extrakci DNA trypanosomatid byla publikována také vysolovací metoda SODE (z ang. *salting-out DNA extraction*). Tato metoda nevyžaduje žádná organická rozpouštědla pro extrakci a zahrnuje pouze čtyři kroky, provedené v jediné zkumavce (Rotureau, Gego, a Carme 2005).

5.2 Amplifikace úseku SSU rRNA

Pro amplifikaci úseku SSU rRNA byly použity primery, které navrhli Schwarz et al. (2015). PCR produkt o odpovídající délce cca 770 bp (Tabulka 5) byl vizualizován a zachycen pod UV zářením (Obrázek 5).

Rozdíl v délce fragmentů mezi druhem *C. mellificae* (763 bp), kmeny 30254 a 30862, a *L. passim* (773 bp), kmen BRL a SF, je dán jednonukleotidovými polymorfismy (SNP, z ang. *Single Nucleotide Polymorphism*) a insercemi a delecemi (tzv. indely; Schwarz et al. 2015). Rozdíl 10 bp je ovšem při elektroforéze obtížně detekovatelný, a je proto třeba PCR produkt ověřit sekvenováním. Dva (vzorky O94D a R2) byly proto namátkou vybrány, osekvenovány a porovnány s databází GenBank. Sekvence byly identické z 99–100 % se zařazenými sekvencemi SSU rRNA druhu *L. passim* v databázi a vzorky byly pro následné reakce použity jako pozitivní kontrola.

Trypanosomatida byla pomocí této metody detekována v 67 % vzorcích (81/121). Při potřebě odlišit druhy *C. mellificae* a *L. passim* je časově a finančně výhodnější specifitější metoda bez nutnosti sekvenování.



Obrázek 5: Výsledek elektroforézy po amplifikaci úseku SSU rRNA trypanosomatid pod UV lampou; 1% gel, 90 V/45 min; NK – negativní kontrola

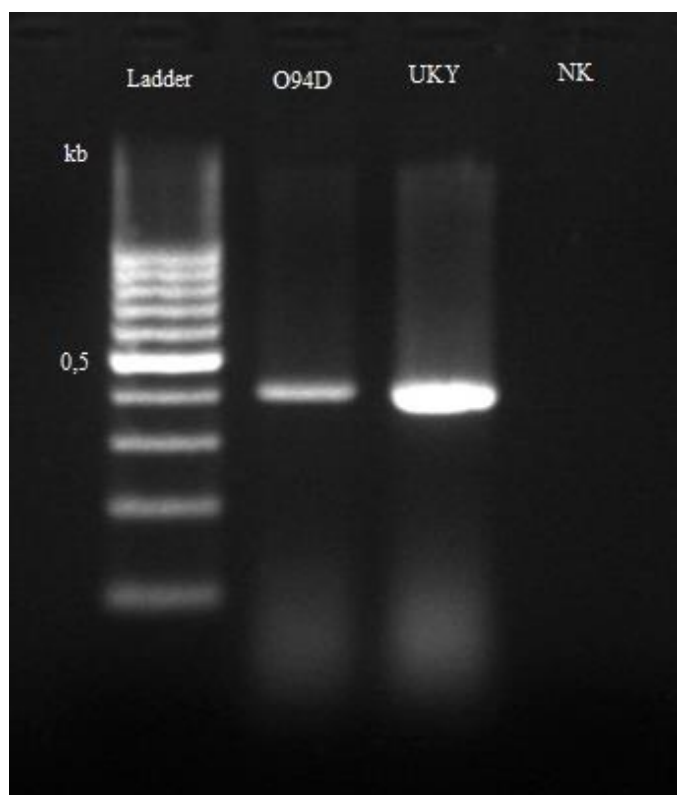
Pro specifickou detekci obou druhů byly použity primery navržené na úsek genu pro gGAPDH (*L. passim*) a genu pro cytochrom B (*C. mellificae*). Variabilita mezi těmito sekvencemi obou druhů je dána SNPs (Schwarz et al. 2015).

5.3 Amplifikace úseku genu pro gGAPDH druhu *L. passim*

Pro druhově specifickou identifikaci druhu *L. passim* byly použity primery pro amplifikaci úseku gGAPDH (Arismendi et al. 2016). PCR produkt o délce cca 400 bp (Tabulka 5) byl amplifikován u 71 % vzorků (86/121; Obrázek 6).

U pěti vzorků byl namnožen úsek genu pro gGAPDH, přestože nebyl získán PCR produkt s primery pro detekci SSU rRNA. Mezi dosud zaznamenanými sekvencemi kmenů druhu *L. passim* BRL a SF není stoprocentní identita, a to především v nukleotidové sekvenci gGAPDH (98,7–99 %). Oproti tomu identita

nukleotidových sekvencí SSU rRNA je při porovnání kmenů BRL a SF vyšší (99,7–100 %; Schwarz et al. 2015)



Obrázek 6: Výsledek elektroforézy po amplifikaci úseku gGAPDH druhu *L. passim*; 1,5% gel, 90 V/45 min; NK – negativní kontrola

Arismendi et al. (2016) ověřili specifitu těchto primerů také na vzorcích trypanosomatid, *C. mellificae* a *C. bombi*, které nebyly těmito primery amplifikovány (Arismendi et al. 2016). V diplomové práci byl pro ověření specifity použit vzorek DNA druhu *C. mellificae*. Porovnáním nukleotidových sekvencí genu pro gGAPDH druhů *C. mellificae* a *L. passim*, o délce 1041 bp, bylo zjištěno, že jsou z 91,1 až 93,8 % identické. U těchto druhů byly porovnány také predikované proteinové sekvence, kódované genem pro gGAPDH. Identita mezi oběma druhy byla napříč 347 aminokyselinami v rozmezí od 92,7 % do 95,9 %.

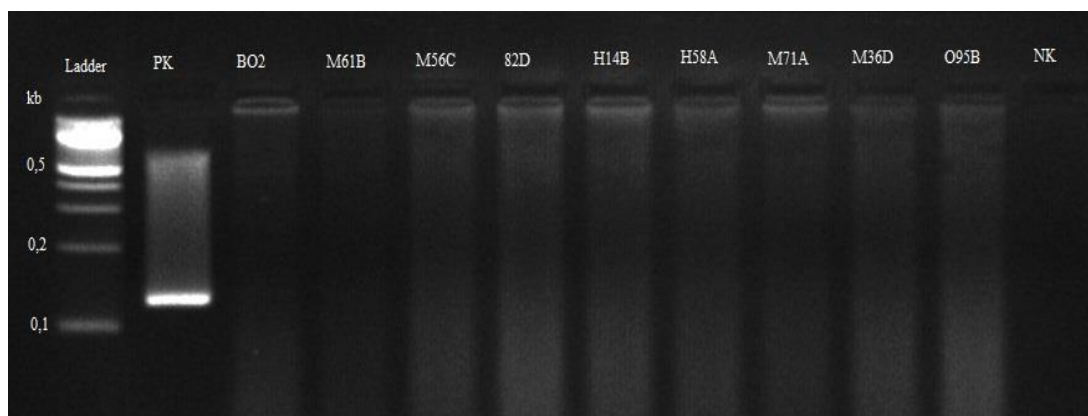
5.4 Amplifikace úseku genu pro cytochrom b druhu *Crithidia mellificae*

Primery pro detekci druhu *C. mellificae*, použité v této práci, by měly amplifikovat fragmenty o délce 140 bp (Obrázek 7), ovšem žádný ze vzorků nebyl

pozitivní. Úspěšnost amplifikace úseku genu pro cytochrom b byla tak ověřena pouze pozitivní kontrolou zaslouanou autorkou navržených primerů (Stevanovic et al. 2016).

Gen pro cytochrom b je vhodný úsek pro detekci druhové příslušnosti vzhledem k 11–12% mezidruhové variabilitě a nízké variabilitě (>1 %) v rámci druhu. Identita v nukleotidové sekvenci genu pro cytochrom b (o délce 589 bp) byla mezi druhy *L. passim* a *C. melliferae* v rozmezí od 88 do 88,6 %. Z celkem 195 predikovaných aminokyselin genu pro cytochrom b byla shoda mezi druhy od 97,9 do 98,4 % (Stevanovic et al. 2016; Schwarz et al. 2015).

Testováním vzorků včel se smíšenou infekcí trypanosomatidy bylo v publikované studii zjištěno, že dříve navržené primery, specifické pro druh *C. melliferae*, Trypan F1/R (Cox-Foster et al. 2007) a druh *C. bombi*, CB-SSUrRsNA-F2/B4 (Schmid-Hempel a Tognazzo 2010), detekují rovněž druh *L. passim*. To může vést k falešně pozitivním výsledkům při detekci trypanosomatid (Arismendi et al. 2016).



Obrázek 7: Naamplifikovaný úsek genu pro cytochrom b druhu *C. melliferae*; 2,5% gel; 90V/45 min; PK – pozitivní kontrola (získaná DNA druhu); NK – negativní kontrola

5.5 Další způsoby detekce a odlišení trypanosomatid

Další metodou odlišení druhů trypanosomatid je například využití lokusů s délkovým polymorfismem. Ravoet et al. (2015) navrhl jeden pár primerů, amplifikující úsek ITS1 (z ang. *Internal Transcribed Spacer*) trypanosomatid včel a čmeláků – *L. passim*, *C. melliferae*, *C. bombi* a *C. expoeki*. Druhy jsou od sebe

odlišeny na základě variability v délce tohoto lokusu. Velikost fragmentu ITS1 se pohybuje v rozmezí od 314 do 318 nukleotidů u *C. mellifica*e a od 384 do 400 nukleotidů u *L. passim*. Využití tohoto úseku se jeví jako vhodný způsob identifikace a odlišení obou trypanosomatid bez nutnosti následného sekvenování. Úspěšnost amplifikace ITS1 markeru ovšem zřejmě závisí také na míře infekce vzorků (Ravoet et al. 2015).

V současné době bylo snahou vytvořit metodu, kterou je možné detekovat více druhů trypanosomatid v jedné reakci a ušetřit tak čas i výdaje. Szalanski et al. (2016) publikovali metodu pro detekci druhu *L. passim* a *Crithidia* spp. v jedné reakci. Druhově specifické primery ovšem obsahují palindromické sekvence, a nebyly proto použity v této práci.

Pro rychlou identifikaci trypanosomatid u včel (*Apis* spp.) a čmeláků (*Bombus* spp.) publikovali Bartolomé et al. (2018) postup založený na multiplexové PCR. Autoři vzali v úvahu možnost přenosu parazitických buněk trypanosomatid z včel na čmeláky a naopak a navrhli primery pro detekci velké podjednotky RNA polymerázy II (RPB1) druhu *L. passim*, gGAPDH druhu *C. mellifica*e a DNA topoizomeráza II (TOPII) druhu *C. bombi* (Bartolomé et al. 2018).

Xu et al (2018) navrhli triplex real-time PCR pro amplifikaci genu pro cytochrom b a interní kontroly. Detekce patogenů metodou PCR může podle autorů u vzorků sbíraných v polních podmínkách vykazovat falešně negativní výsledky, způsobené např. některými inhibičními látkami. Je proto vhodné použití interní kontroly, jako je 18S rRNA genu blanokřídlých. Neúspěšná amplifikace této kontroly indikuje nesprávnou DNA extrakci vzorku nebo inhibici PCR a umožňuje interpretaci falešně negativních výsledků (Xu et al. 2018).

5.6 Trypanosomatida v testovaných vzorcích

Z celkového množství testovaných včelstev (n=121) byla ve většině vzorků prokázána přítomnost druhu *L. passim*, celkem v 71 % (86/121). Tento druh byl již dříve v České republice identifikován ve vzorcích včel z roku 2014 (Hubert et al. 2017). Naopak druh *C. mellifica*e se nevyskytoval v žádném testovaném včelstvu, stejně jako ve studii Huberta et al. (2017), a pravděpodobně tak není v dosud

publikované literatuře k dispozici důkaz o výskytu tohoto druhu u nás. Výsledek detekce trypanosomatid u jednotlivých vzorků je v Tabulce 6.

Tabulka 6: Přehled testovaných vzorků a výsledků PCR detekce trypanosomatid; „+“ – pozitivní výsledek; prázdná buňka – negativní výsledek; „-/+“ – odlišný výsledek s SSU rRNA a gGAPDH primery

Vzorek	Měsíc sběru	Okres	<i>Lotmaria passim</i>	<i>Crithidia mellificae</i>
BO1	srpen	Plzeň-město		
BO3	srpen	Plzeň-město	+	
BO2	srpen	Plzeň-město	+	
HK	srpen	Plzeň-město	+	
HA15	srpen	Plzeň-město	+	
HA3	srpen	Plzeň-město	+	
JV1	srpen	Jindřichův Hradec	+	
JV2	srpen	Jindřichův Hradec	+	
JV3	srpen	Jindřichův Hradec	+	
JV4	srpen	Jindřichův Hradec	+	
JV5	srpen	Jindřichův Hradec	+	
K5	srpen	Plzeň-město		
K1	srpen	Plzeň-město	+	
K2	srpen	Plzeň-město	+	
K3	srpen	Plzeň-město	+	
K4	srpen	Plzeň-město	+	
L1	srpen	Jindřichův Hradec	+	
L2	srpen	Jindřichův Hradec	+	
L3	srpen	Jindřichův Hradec	+	
L4	srpen	Jindřichův Hradec	+	
L5	srpen	Jindřichův Hradec	+	
MA1	srpen	Plzeň-město	+	
MA2	srpen	Plzeň-město	+	
MA3	srpen	Plzeň-město	+	
M2	srpen	Plzeň-město	+	
M1	srpen	Plzeň-město	+	
M3	srpen	Plzeň-město	+	
MU3	srpen	Plzeň-jih	+	
MU1	srpen	Plzeň-jih	+	
MU2	srpen	Plzeň-jih	-/+	
NO2	srpen	Plzeň-město	+	
NO1	srpen	Plzeň-město	+	
NO3	srpen	Plzeň-město	+	
R2	srpen	Plzeň-jih	+	
R1	srpen	Plzeň-jih	+	
R3	srpen	Plzeň-jih	+	
R5	srpen	Plzeň-jih	+	
R4	srpen	Plzeň-jih	+	
ST	srpen	Plzeň-město	+	

ST5	srpen	Plzeň-město	+
ST1	srpen	Plzeň-město	+
U14	srpen	Plzeň-město	+
U68	srpen	Plzeň-město	+
UKY	srpen	Plzeň-město	+
U18	srpen	Plzeň-město	+
NB1	srpen	Plzeň-jih	+
77B	září	Český Krumlov	+
77C	září	Český Krumlov	+
77D	září	Český Krumlov	+
77A	září	Český Krumlov	
81A	září	Český Krumlov	
81B	září	Český Krumlov	
81C	září	Český Krumlov	
81D	září	Český Krumlov	+
82D	září	Český Krumlov	+
82A	září	Český Krumlov	
82C	září	Český Krumlov	+
82B	září	Český Krumlov	+
83A	září	Český Krumlov	
85A	září	Český Krumlov	
85D	září	Český Krumlov	+
105A	září	Český Krumlov	-/+
105D	září	Český Krumlov	
105B	září	Český Krumlov	+
105C	září	Český Krumlov	
H12B	září	České Budějovice	
H12C	září	České Budějovice	+
H14C	září	České Budějovice	+
H14B	září	České Budějovice	+
H14A	září	České Budějovice	+
H14D	září	České Budějovice	+
H16D	září	České Budějovice	+
H16A	září	České Budějovice	+
H16C	září	České Budějovice	
H16B	září	České Budějovice	
H58D	září	České Budějovice	+
H58A	září	České Budějovice	
H58C	září	České Budějovice	
H58B	září	České Budějovice	+
H60C	září	České Budějovice	+
H60A	září	České Budějovice	+
H60D	září	České Budějovice	
H66A	září	České Budějovice	
H66B	září	České Budějovice	
H66C	září	České Budějovice	+
H67C	září	České Budějovice	+
H67D	září	České Budějovice	+
H67B	září	České Budějovice	

H67A	září	České Budějovice	+
M15B	září	České Budějovice	
M15C	září	České Budějovice	
M36C	září	České Budějovice	+
M36D	září	České Budějovice	
M36A	září	České Budějovice	
M56D	září	České Budějovice	+
M56B	září	České Budějovice	-/+
M56C	září	České Budějovice	+
M61B	září	České Budějovice	+
M61D	září	České Budějovice	
M61C	září	České Budějovice	
M71A	září	České Budějovice	
M71C	září	České Budějovice	-/+
M71B	září	České Budějovice	-/+
O94D	září	České Budějovice	+
O94A	září	České Budějovice	+
O94C	září	České Budějovice	
O94B	září	České Budějovice	
O95D	září	České Budějovice	+
O95C	září	České Budějovice	
O95B	září	České Budějovice	
O96C	září	České Budějovice	
O96B	září	České Budějovice	+
O96D	září	České Budějovice	
O97B	září	České Budějovice	+
O97D	září	České Budějovice	+
O97A	září	České Budějovice	+
O97C	září	České Budějovice	+
O98A	září	České Budějovice	+
O98B	září	České Budějovice	+
O98C	září	České Budějovice	
O98D	září	České Budějovice	

5.7 Rozšíření trypanosomatid a jejich vliv na zdraví včelstev

Druh *L. passim* (do roku 2015 označován jako *C. mellificae*) se vyskytoval hojně ve většině nedávných studií a je považován téměř za všudypřítomný.

Trypanosomatida se ve včelstvu vyskytují na jaře, v létě i na podzim, ovšem na jaře je jejich výskyt oproti letním a podzimním měsícům značně nižší. Ve Švýcarsku se trypanosomatida vyskytovala ve vzorcích na jaře (56 %), v létě (70 %) i na podzim (63 %). Míra infekce je pravděpodobně nejvyšší v zimě (Arismendi et al. 2016; Hartmann et al. 2015).

Autoři studií včelích trypanosomatid se mnohdy příliš neshodují v tvrzení, do jaké míry včelstvu tyto parazité škodí a zda se podílejí na zimních úhynech včelstev (Arismendi et al. 2016).

V Jižní Americe byla doposud zvýšená zimní úmrtnost a snížená produktivní schopnost včelstev připisována především druhu *N. ceranae*. Prevalence tohoto druhu u analyzovaných včelstev v Chile byla ovšem značně nižší (18 %) než prevalence druhu *L. passim* (90 %). Druh *L. passim* se podle výsledků jeví jako další možný faktor působící ztráty včelstev v této oblasti (Arismendi et al. 2016).

V devítiletém průzkumu včelstev (2007–2015) v Srbsku se prevalence druhu *L. passim* pohybovala v rozmezí od 44 % do 92 %. Oproti tomu, druh *C. melliferae* se nevyskytoval v žádném z testovaných včelstev (Stevanovic et al. 2016).

V belgické studii byl druh *L. passim* nalezen v 70,5 % (256/363) vzorcích (Ravoet et al. 2013). Ravoet et al. (2013) zjistil, že na základě výskytu druhu *L. passim* společně s roztočem *V. destructor* a mikrosporídií *N. ceranae* v letním období lze předpovídat, zda včelstvo bude úspěšně přezimovat nebo uhyne. Patogenní organismy ovšem mnohdy působí synergicky a obecně lze říci, že se zvyšujícím se množstvím patogenních druhů ve včelstvu jsou pozorovány také vyšší ztráty přezimujících včelstev. Při větším množství detekovaných druhů patogenů (nad šest) se ovšem úmrtnost stabilizuje okolo 50 % (Ravoet et al. 2013).

Někteří autoři naopak nepovažují trypanosomatida za významný faktor ovlivňující ztráty včelstev. Hartman et al. (2015) sledovali výskyt trypanosomatid od července do ledna (2010 resp. 2011) ve Švýcarsku. Trypanosomatida se hojně vyskytovala ve včelstvech, která úspěšně zimovala, a lze tedy podle autorů předpokládat malý nebo žádný negativní vliv těchto parazitů na zdraví včelstev.

Výsledky mohou být ovlivněny také životní fází trypanosomatid. Sféroidní forma druhu *C. melliferae* se pravděpodobně nepodílí na zvýšených úhynech včelstev a neovlivňuje jejich dlouhověkost. Patogenita v různých fázích životního cyklu trypanosomatid se může měnit, podobně tak může být dosaženo odlišných výsledků v *in vitro* a v přírodních podmínkách (Higes et al. 2016).

5.7.1 Variabilita ve vnímavosti k patogenům

V diplomové práci byl použit vzorek z několika včel z každého úlu. Při výzkumu ve Švýcarsku byly včely analyzovány individuálně, a přestože druh *L. passim* je považován již za běžného parazita včel, u většiny vzorků se nevyskytoval. Podobně tomu bylo také v případě mikrosporidie *N. ceranae*, která je rovněž ve včelstvech velmi rozšířena. To může být způsobeno odlišnou náchylností dělnic k tomuto druhu. Genetická odlišnost uvnitř včelstva je dána především polyandrií včelí matky, která je při páření oplozena až dvanácti trubci a včelstvo se následně skládá z mnoha tzv. patrilinií. Míra infekce pravděpodobně závisí na genetickém založení jednotlivých včel, ale také na jejich věku a výživě (Tritschler et al. 2017).

Hartmann et al. (2015) zjišťovali ve své studii přítomnost trypanosomatid v tělech různě starých včel. Na základě analýzy vzorků zimních včel a včel v prvním, druhém a třetím týdnu po vylíhnutí zjistili, že trypanosomatida kolonizují nejvíce trávicí trakt starších dělnic. Trypanosomatida se vyskytovala v trávicím traktu včel až v druhém a třetím týdnu (ve 30 % resp. 42 %). Trypanosomatida byla ovšem detekována v tělech včel po vyjmutí trávicího traktu, a to ve všech třech týdnech odběru (ve 12 %, 33 % resp. 58 %). U zimních včel byla prevalence trypanosomatid v trávicím traktu nejvyšší (54 %), určité množství trypanosomatid bylo detekováno také v tělech dělnic s odebraným trávicím traktem (17 %).

Studie interakcí mezi patogenními organismy včely medonosné byly dosud zaměřené především na dělnice a matky než na trubce. Trubci jsou v porovnání se samičím zastoupením včelstva fyziologicky i chováním poměrně odlišní. Předpokládá se, že absence heterozygotnosti v lokusech spojených s imunitou může být zodpovědná za odlišnosti v imunokompetenci, tedy schopnosti čelit onemocněním. Bylo zjištěno, že trubci jsou náchylnější k roztoči *V. destructor*, ale pravděpodobně méně náchylní k DWV, který je tímto roztočem přenášen. Vnímavost k mikrosporidiím se liší, zatímco k druhu *N. apis* je srovnatelná u obou pohlaví, k druhu *N. ceranae* jsou pravděpodobně trubci vnímavější. V experimentálních podmínkách vedla inokulace sporami ke zvýšeným úhynům a nižší hmotnosti těla trubců. Úmrtnost byla pozorována již během prvního týdne od inokulace (Retschnig et al. 2014). Dosud nebyla provedena studie, zkoumající případné odlišnosti ve vnímavosti dělnic a trubců k infekci trypanosomatidy.

5.8 Vztahy mezi mikroorganismy v trávicím traktu včel

Zdravá a produktivní včelstva jsou schopna čelit řadě organismů, které je osidlují, bez patogenních symptomů. Vzájemnou koevolucí hostitele s parazity a patogeny dochází k určité rovnováze, která ovšem může být narušena některými dalšími faktory, např. přítomností dalších parazitů (jako je *V. destructor*, *N. spp.* nebo trypanosomatida), pesticidy aj. (Schwarz, Moran a Evans 2016). Mikrobiální druhy v trávicím traktu včely mohou tvořit společně různé mezidruhové vztahy, a to symbiotický (koexistence), synergický (vzájemně nebo jednostranně posilující) nebo antagonický (vzájemně nebo jednostranně inhibující). Tyto vztahy významně ovlivňují rozšíření a virulenci patogenních druhů, a je proto vhodné sledovat výskyt běžných patogenů a parazitů včel současně (Retschnig et al. 2014; Hartmann et al. 2015).

Určitý synergický efekt může být pozorován například při narušení střevní stěny parazitem a umožnění tak průběhu sekundární infekce jiným parazitem. Hartman et al. (2015) pozorovali naopak negativní vztah mezi trypanosomatidy a AmFV, kdy vzorky včel bez výskytu trypanosomatid vykazovaly značně vyšší množství AmFV.

5.8.1 Interakce mezi trypanosomatidy a druhem *Nosema ceranae*

Mezi druhy *L. passim* a *N. ceranae* je pravděpodobně určitý pozitivní vztah. Ačkoliv byl vliv na ztráty včelstev nižší při kombinaci obou patogenů než součet působení každého zvlášť, Ravoet et al. (2013) pozoroval také zesilující efekt při koinfekci těmito patogeny. Častá koinfekce oběma druhy byla pozorována také v devítiletém průzkumu včelstev v Srbsku (Stevanovic et al. 2016). Většina včelstev (60,5 %, 98/162) byla infikována oběma druhy a pouze tři včelstva (1,9 %) byla během výzkumu infikována samostatně druhem *L. passim* (Stevanovic et al. 2016).

Mezi druhy je ovšem v infikovaném hostiteli prostorové oddělení. Zatímco druh *L. passim* kolonizuje především zadní část trávicího traktu, mikrosporidie byla detekována v žaludku, kde dochází k rozmnožování a vývinu spor, ale také v jiných částech těla, např. ve slinných žlázách, malpighiho trubicích nebo v buňkách tukových tělísek. Švýcarští vědci uvedli, že nedochází ke kompetici

mezi druhy *L. passim* a *N. ceranae*, a jsou mezi nimi proto malé nebo žádné interakce. Ovšem vzhledem k pozitivní korelaci mezi mírou infekce v hostiteli napadeném oběma druhy nevylučují autoři studie určitou kooperaci mezi druhy (Tritschler et al. 2017). Koinfekcí druhů *C. mellificae* a *N. ceranae* je pravděpodobně snížena produkce některých látek spojených se spuštěním imunitní reakce hostitele (Schwarz a Evans 2013).

Vztahy mezi těmito parazity mohou pravděpodobně vysvětlit kontroverzní názory na vliv mikrosporídie *N. ceranae* na zimní úmrtnost včelstev (Ravoet et al. 2013).

5.8.2 Význam symbiotických mikroorganismů

K pochopení mechanismů umožňujícím včelám adaptovat se na měnící se podmínky životního prostředí přispívá znalost a zkoumání genomu včel. V souvislosti se zdravím včel je ovšem nutné brát v úvahu také genomy jejich symbiotických mikroorganismů. Většina studií byla dosud zaměřena spíše na mikroorganismy, které mohou být původci chorob, než na nepatogenní mikroorganismy, které mají velký vliv na zdraví včely a celého včelstva. Podílejí se například na tvorbě vitamínů, obraně proti patogenům a vývinu imunity. Mimo jiné také kompetitivně inhibují invazi patogeny, adherencí ke střevní stěně. Genom včely a těchto mikroorganismů se vyvíjejí společně a přizpůsobují se měnícím se podmínkám životního prostředí (Schwarz, Huang a Evans 2015; Wu et al. 2013).

Narušením rovnováhy mikrobiální populace v trávicím traktu včely může být také zvýšena náchylnost včelstva k infekčním chorobám a parazitům. Zvýšený výskyt patogenů a parazitů, včetně trypanosomatid, může pak vést ke značným úhynům včelstev. Jedním z faktorů, který může mikrobiální osídlení narušit je například používání antibiotik k léčbě včelstva (Raymann, Shaffer, a Moran 2017). Narušená rovnováha v trávicím traktu včel může souviset s výskytem CCD. Ve včelstvech s pozorovaným CCD bylo pozorováno rapidní zvýšení gammaproteobakterií, betaproteobakterií a zástupců kmene firmicutes a zároveň snížení alfa proteobakterií a aktinomycet v porovnání se zdravými včelstvy (Schwarz, Moran a Evans 2016).

V souvislosti s trypanosomatidy byl studován vliv dodání symbiotické bakterie *S. alvi* před infekcí druhem *L. passim*. U včelstva ovšem takto došlo k narušení nebo dysbióze v trávicím traktu a zároveň ke zvýšené vnímavosti včelstev k druhu *L. passim*. Včelstva s přirozeně získanou mikrobiální populací v trávicím traktu byla schopna účinněji omezovat tohoto parazita (Schwarz, Moran a Evans 2016). Při zkoumání vlivu trypanosomatid na mikrobiální osídlení trávicího traktu včely nebyl pozorován žádný vliv druhu *L. passim*. Druh *C. melliferae* nebyl nalezen v žádném z testovaných vzorků, a do tohoto experimentu proto nebyl zahrnut (Hubert et al. 2017).

6 Závěr

Působení patogenů a parazitů je považováno za hlavní příčinu zvýšených ztrát včelstev v posledních letech. V této souvislosti si získala pozornost také jednohostitelská trypanosomatida včel – *Crithidia mellificae* a *Lotmaria passim*. Dříve byl u včel znám pouze první z vyjmenovaných druhů, v roce 2015 byla přehodnocena taxonomie a byl popsán odlišný druh, *L. passim*. Tento druh v současné době ve včelstvech převládá, na rozdíl od druhu *C. mellificae*, který se vyskytuje spíše zřídka.

Výskyt trypanosomatid byl otestován na vzorcích včel z Jihočeského a Plzeňského kraje. Metodou PCR byl detekován úsek genu pro SSU rRNA trypanosomatid, genu pro gGAPDH druhu *L. passim* a genu pro cytochrom b druhu *C. mellificae*. Použitými primery bylo možné identifikovat a odlišit oba druhy sekvenováním, u druhově specifických primerů pak i bez nutnosti sekvenování.

Druh *L. passim* byl detekován ve většině včelstev, celkem v 71 % (86/121). Oproti tomu druh *C. mellificae* nebyl nalezen v žádném vzorku. Dosud tak u nás tento druh pravděpodobně nebyl detekován. V testovaných včelstvech je dále třeba zjistit souvislost mezi výskytem druhu *L. passim* a úspěšností přezimování.

Odlišné výstupy studií v souvislosti s vlivem trypanosomatid na včelstvo mohou být způsobeny různými faktory, například podmínkami, ve kterých jsou experimenty prováděny, nebo buněčnými stádii, které jsou pro experimentální infekci včel použity. Vliv trypanosomatid může být také odlišný při nerovnováze v mikrobiálním osídlení trávicího traktu včel nebo při jejich interakci s některými dalšími patogenními druhy.

Trypanosomatida jsou evolučně úspěšní a široce rozšíření parazité, kteří mohou způsobovat značné zdravotní komplikace svému hostiteli. Působení trypanosomatid na životaschopnost včelstva by mělo být s ohledem na výše zmíněné faktory nadále studováno.

7 Přehled použité literatury

- Arismendi, N., A. Bruna, N. Zapata, a M. Vargas. 2016. „PCR-specific detection of recently described *Lotmaria passim* (Trypanosomatidae) in Chilean apiaries". *Journal of Invertebrate Pathology* 134: 1–5.
- Bartolomé, C., M. Buendía, M. Benito, P. De la Rúa, C. Ornos, R. Martín-Hernández, M. Higes, a X. Maside. 2018. „A new multiplex PCR protocol to detect mixed trypanosomatid infections in species of *Apis* and *Bombus*". *Journal of Invertebrate Pathology* 154: 37–41.
- Boecking, O., K. Bienefeld, a W. Drescher. 2000. „Heritability of the *Varroa*-specific hygienic behaviour in honey bees (Hymenoptera: Apidae)". *Journal of Animal Breeding and Genetics* 117 (6): 417–24.
- Bradbear, N. 2009. „Bees and their role in forest livelihoods". *Food and Agricultural Organization*, 194.
- Brodtschneider, R., A. Gray, R. van der Zee, N. Adjlane, V. Brusbardis, J. D. Charrière, R. Chlebo, et al. 2016. „Preliminary analysis of loss rates of honey bee colonies during winter 2015/16 from the COLOSS survey". *Journal of Apicultural Research* 55 (5): 375–78.
- Cersini, A., V. Antognetti, R. Conti, F. Velletrani, a G. Formato. 2015. „First PCR isolation of *Crithidia mellificae* (Euglenozoa: Trypanosomatidae) in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in Italy". *Fragmenta Entomologica* 47 (1): 45.
- Cornman, R. S., D. R. Tarpy, Y. Chen, L. Jeffreys, D. Lopez, J. S. Pettis, D. VanEngelsdorp, a J. D. Evans. 2012. „Pathogen webs in collapsing honey bee colonies". *PLoS ONE* 7 (8): e43562.
- Cox-Foster, D. L., S. Conlan, E. C. Holmes, G. Palacios, J. D. Evans, N. A. Moran, P. L. Quan, et al. 2007. „A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder". *Science* 318: 283–87.
- Dainat, B., J. D. Evans, Y. P. Chen, L. Gauthier, a P. Neumann. 2012. „Predictive markers of honey bee colony collapse". *PLoS ONE* 7 (2): e32151.
- Danihlík, J. 2017. „První výsledky monitoringu". *Moderní včelař*, č. 7: 32–34.
- Gallai, N., J. Salles, J. Settele, B. E. Vaissière, L. Pollinisation, E. Abeilles, U. M. R. Abeilles, A. Cedex, U. M. R. Lameta, a M. Cedex. 2008. „Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline".

Ecological Economics 68 (3): 810–21.

- Glenny, W., I. Cavigli, K. F. Daughenbaugh, R. Radford, S. E. Kegley, a M. L. Flenniken. 2017. „Honey bee (*Apis mellifera*) colony health and pathogen composition in migratory beekeeping operations involved in California almond pollination". *PLoS ONE* 12 (8): 1–24.
- Hammarton, T. C., S. Monnerat, a J. C. Mottram. 2007. „Cytokinesis in trypanosomatids". *Current Opinion in Microbiology* 10 (6): 520–27.
- Hartmann, U., E. Forsgren, J. D. Charrière, P. Neumann, a L. Gauthier. 2015. „Dynamics of *Apis mellifera* filamentous virus (AmFV) infections in honey bees and relationships with other parasites". *Viruses* 7 (5): 2654–67.
- Higes, M., C. Rodríguez-García, T. Gómez-Moracho, A. Meana, C. Bartolomé, X. Maside, L. Barrios, a R. Martín-Hernández. 2016. „Short communication: Survival of honey bees (*Apis mellifera*) infected with *Crithidia mellificae* (Langridge and McGhee: ATCC® 30254TM) in the presence of *Nosema ceranae*". *Spanish Journal of Agricultural Research* 14 (3): e05SC02.
- Hubert, J., M. Bicianova, O. Ledvinka, M. Kamler, P. J. Lester, M. Nesvorna, J. Kopecky, a T. Erban. 2017. „Changes in the Bacteriome of Honey Bees Associated with the Parasite *Varroa destructor*, and Pathogens *Nosema* and *Lotmaria passim*". *Microbial Ecology* 73 (3): 685–98.
- Cha, N. 2009. „Multi-level selection for hygienic behaviour in honeybees", 609–15.
- Jacques, A., M. Laurent, M. Ribiere-Chabert, M. Saussac, S. Bougeard, P. Hendrikx, a M. P. Chauzat. 2016. „Statistical analysis on the EPILOBEE dataset: explanatory variables related to honeybee colony mortality in EU during a 2 year survey". *EFSA Supporting Publications*, 228 s.
- Kaufer, A., J. Ellis, D. Stark, a J. Barratt. 2017. „The evolution of trypanosomatid taxonomy". *Parasites and Vectors* 10 (1). Parasites & Vectors: 1–17.
- Klatt, B. K., A. Holzschuh, C. Westphal, Y. Clough, I. Smit, E. Pawelzik, a T. Tschardtke. 2013. „Bee pollination improves crop quality, shelf life and commercial value". *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 281 (1775): 20132440
- Kostygov, A. Y., a V. Yurchenko. 2017. „Revised classification of the subfamily Leishmaniinae (Trypanosomatidae)". *Folia Parasitologica* 64: 1–5.
- Kulhanek, K., N. Steinhauer, K. Rennich, D. M Caron, R. R Sagili, J. S Pettis, D. J. Ellis, et al. 2017. „A national survey of managed honey bee 2015–2016 annual

- colony losses in the USA". *Journal of Apicultural Research* 56 (4). Taylor & Francis: 328–40.
- La Rúa, P. De, R. Jaffé, R. D. Olio, I. Muñoz, a J. Serrano. 2009. „Biodiversity , conservation and current threats to European honeybees". *Apidologie* 40 (3): 263–84.
- Langridge, D. F., a R. B. McGhee. 1967. „Crithidia mellificae n. sp. an Acidophilic Trypanosomatid of the Honey Bee *Apis mellifera*". *The Journal of Protozoology* 14 (3): 485–87.
- Lattorff, H. M. G., J. Buchholz, I. Fries, a R. F. A. Moritz. 2015. „Infection, Genetics and Evolution A selective sweep in a Varroa destructor resistant honeybee (*Apis mellifera*) population". *Infection, Genetics and Evolution* 31: 169–76.
- Lopes, A. H. 2010. „Trypanosomatids: Odd Organisms, Devastating Diseases". *The Open Parasitology Journal* 4 (1): 30–59.
- Lukeš, J., T. Skalický, J. Týč, J. Votýpka, a V. Y. Yurchenko. 2014. „Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates". *Molecular and Biochemical Parasitology* 195 (2): 115–22.
- Maslov, D. A., J. Votýpka, V. Yurchenko, a J. Lukeš. 2013. „Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: All that is hidden shall be revealed". *Trends in Parasitology* 29 (1): 43–52.
- McFadden, A. M. J., J. Mackay, O. Borowick, a R. M. Goodwin. 2016. „Investigation of bee mortality in a beekeeper operation in the Coromandel district". *Surveillance* 43 (1): 9–11.
- Merzlyak, E., V. Yurchenko, A. A. Kolesnikov, K. Alexandrov, S. A. Podlipaev, a D. A. Maslov. 2001. „Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: Polyphyly of *Leptomonas* and *Blastocrithidia*". *Journal of Eukaryotic Microbiology* 48 (2): 161–69.
- Morimoto, T., Y. Kojima, M. Yoshiyama, K. Kimura, B. Yang, G. Peng, a T. Kadowaki. 2013. „Molecular detection of protozoan parasites infecting *Apis mellifera* colonies in Japan". *Environmental Microbiology Reports* 5 (1): 74–77.
- Opperdoes, F. R., a P. A. M. Michels. 2007. „Horizontal gene transfer in trypanosomatids". *Trends in Parasitology* 23 (10): 470–76.
- Pinto, M. A., D. Henriques, J. Chávez-galarza, P. Kryger, R. V. D. Zee, B. Dahle, G. Soland-reckeweg, et al. 2014. „Genetic integrity of the Dark European honey bee (*Apis mellifera mellifera*) from protected populations : a genome-wide

- assessment using SNPs and mtDNA sequence data Genetic integrity of the Dark European honey bee (*Apis mellifera mellifera*) from prote". *Journal of Apicultural Research* 53 (2): 269–78. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.53.2.08>.
- Ratnieks, F. L. W., a N. L. Carreck. 2010. „Clarity on honey bee collapse?" *Science* 327: 152–53.
- Ravoet, J., J. Maharramov, I. Meeus, L. De Smet, T. Wenseleers, G. Smagghe, a D. C. de Graaf. 2013. „Comprehensive Bee Pathogen Screening in Belgium Reveals *Crithidia mellificae* as a New Contributory Factor to Winter Mortality". *PLoS ONE* 8 (8): e72443.
- Ravoet, J., R. S. Schwarz, T. Descamps, O. Yañez, C. O. Tozkar, R. Martin-Hernandez, C. Bartolomé, et al. 2015. „Differential diagnosis of the honey bee trypanosomatids *Crithidia mellificae* and *Lotmaria passim*". *Journal of Invertebrate Pathology* 130. Elsevier Inc.: 21–27.
- Ravoet, J., L. De Smet, I. Meeus, G. Smagghe, T. Wenseleers, a de Graaf D. C. 2014. „Widespread occurrence of honey bee pathogens in solitary bees". *Journal of Invertebrate Pathology* 122. Elsevier Inc.: 55–58.
- Raymann, K., Z. Shaffer, a N. A. Moran. 2017. „Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honeybees". *PLoS Biology* 15 (3): 1–22.
- Retschnig, G., G. R. Williams, M. M. Mehmman, O. Yañez, J. R. De Miranda, a P. Neumann. 2014. „Sex-specific differences in pathogen susceptibility in honey bees (*Apis mellifera*)". *PLoS ONE* 9 (1): e85261.
- Roberts, J. M.K., D. L. Anderson, a P. A. Durr. 2017. „Absence of deformed wing virus and *Varroa destructor* in Australia provides unique perspectives on honeybee viral landscapes and colony losses". *Scientific Reports* 7 (1). Springer US: 1–11.
- Rotureau, B., A. Gego, a B. Carme. 2005. „Trypanosomatid protozoa: A simplified DNA isolation procedure". *Experimental Parasitology* 111 (3): 207–9.
- Ruiz-González, M. X., a M. J.F. Brown. 2006. „Honey bee and bumblebee trypanosomatids: Specificity and potential for transmission". *Ecological Entomology* 31 (6): 616–22.
- Runckel, C., J. DeRisi, a M. L. Flenniken. 2014. „A draft genome of the honey bee trypanosomatid parasite *crithidia mellificae*". *PLoS ONE* 9 (4): e95057.
- Runckel, C., M. L. Flenniken, J. C. Engel, J. G. Ruby, D. Ganem, R. Andino, a J. L. DeRisi. 2011. „Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four

- novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, Nosema, and Crithidia". *PLoS ONE* 6 (6): e20656.
- Schmid-Hempel, R., R. Salathé, M. Tognazzo, a P. Schmid-Hempel. 2011. „Genetic exchange and emergence of novel strains in directly transmitted trypanosomatids". *Infection, Genetics and Evolution* 11 (3): 564–71.
- Schmid-Hempel, R., a M. Tognazzo. 2010. „Molecular divergence defines two distinct lineages of crithidia bombi (Trypanosomatidae), parasites of bumblebees". *Journal of Eukaryotic Microbiology* 57 (4): 337–45.
- Schwarz, R. S., G. R. Bauchan, C. A. Murphy, J. Ravoet, D. C. De Graaf, a J. D. Evans. 2015. „Characterization of two species of trypanosomatidae from the Honey Bee *Apis mellifera*: *Crithidia mellificae* Langridge and McGhee, and *Lotmaria passim* n. gen., n. sp." *Journal of Eukaryotic Microbiology* 62 (5): 567–83.
- Schwarz, R. S., a J. D. Evans. 2013. „Single and mixed-species trypanosome and microsporidia infections elicit distinct, ephemeral cellular and humoral immune responses in honey bees". *Developmental and Comparative Immunology* 40. Elsevier Ltd: 300–310.
- Schwarz, R. S., Q. Huang, a J. D. Evans. 2015. „Hologenome theory and the honey bee pathosphere". *Current Opinion in Insect Science* 10. Elsevier Inc: 1–7.
- Schwarz, R. S., N. A. Moran, a J. D. Evans. 2016. „Early gut colonizers shape parasite susceptibility and microbiota composition in honey bee workers". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (33): 9345–9350.
- Steinhauer, N., K. Kulhanek, K. Antúnez, H. Human, P. Chantawannakul, M. P. Chauzat, a D. VanEngelsdorp. 2018. „Drivers of colony losses". *Current Opinion in Insect Science* 26: 1–7.
- Stevanovic, J., R. S. Schwarz, B. Vejnovic, J. D. Evans, R. E. Irwin, U. Glavinic, a Z. Stanimirovic. 2016. „Species-specific diagnostics of *Apis mellifera* trypanosomatids: A nine-year survey (2007–2015) for trypanosomatids and microsporidians in Serbian honey bees". *Journal of Invertebrate Pathology* 139: 6–11.
- Stuart, K., R. Brun, S. Croft, A. Fairlamb, R. E. Gürtler, J. McKerrow, S. Reed, a R. Tarleton. 2008. „Kinetoplastids: Related protozoan pathogens, different diseases". *Journal of Clinical Investigation* 118 (4): 1301–10.
- Szalanski, A. L., C. E. Trammel, A. D. Tripodi, D. Cleary, L. Rusert, a D. Downey.

2016. „Molecular Diagnostics of the Honey Bee Parasites *Lotmaria passim* and *Crithidia* spp. (Trypanosomatidae) Using Multiplex PCR". *Florida Entomologist* 99 (4): 793–95.
- Thompson, C. E., J. C. Biesmeijer, T. R. Allnutt, S. Pietravalle, a G. E. Budge. 2014. „Parasite pressures on feral honey bees (*Apis mellifera* sp.)". *PLoS ONE* 9 (8): 1–8.
- Tripodi, A. D., A. L. Szalanski, a J. P. Strange. 2018. „Novel multiplex PCR reveals multiple trypanosomatid species infecting North American bumble bees (Hymenoptera: Apidae: *Bombus*)". *Journal of Invertebrate Pathology* 153: 147–55.
- Tritschler, M., G. Retschnig, O. Yañez, G. R. Williams, a P. Neumann. 2017. „Host sharing by the honey bee parasites *Lotmaria passim* and *Nosema ceranae*". *Ecology and Evolution* 7 (6): 1850–57. <https://doi.org/10.1002/ece3.2796>.
- Veselý, V. 2013. *Včelařství*. 3. Praha: Brázda, 272 s.
- Volf, P., a P. Horák. 2007. *Paraziti a jejich biologie*. 1.vyd. Praha: Triton, 318 s.
- Wheeler, R. J., E. Gluenz, a K. Gull. 2011. „The cell cycle of *Leishmania*: Morphogenetic events and their implications for parasite biology". *Molecular Microbiology* 79 (3): 647–62.
- Wheeler, R. J., E. Gluenz, a K. Gull. 2013. „The limits on trypanosomatid morphological diversity". *PLoS ONE* 8 (11): e79581.
- Wu, J-L., C-X. Zhou, P-J. Wu, J. Xu, Y-Q. Guo, F. Xue, A. Getachew, a S. Xu. 2017. „Brain metabolomic profiling of eastern honey bee (*Apis cerana*) infested with the mite *Varroa destructor*". *Plos One* 12 (4): 1–14.
- Wu, M., Y. Sugimura, D. Taylor, a M. Yoshiyama. 2013. „Honeybee Gastrointestinal Bacteria for Novel and Sustainable Disease Control Strategies". *Journal of Developments in Sustainable Agriculture* 8 (2): 85–90.
- Xu, G., E. Palmer-Young, K. Skyrn, T. Daly, M. Sylvia, A. Averill, a S. Rich. 2018. „Triplex real-time PCR for detection of *Crithidia mellificae* and *Lotmaria passim* in honey bees". *Parasitology Research* 117 (2). Parasitology Research: 623–28.
- Yurchenko, V. Y., J. Lukeš, M. Tesařová, M. Jirků, a D. A. Maslov. 2008. „Morphological Discordance of the New Trypanosomatid Species Phylogenetically Associated with the Genus *Crithidia*". *Protist* 159 (1): 99–114.