

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH
BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N4103 Zootechnika

Studijní obor: Zootechnika

Katedra: Katedra zootechnických věd

Vedoucí katedry: prof. Ing. Václav Matoušek, CSc.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Infestace včelstev *Nosema spp.* v průběhu roku v různých lokalitách

Vedoucí diplomové práce: Ing. Jitka Rutkayová, Ph.D.

Konzultant: Ing. Miroslav Kašparů

Autor diplomové práce: Bc. Pavel Durčanský

České Budějovice, 2019

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

Jméno a příjmení: **Bc. Pavel DURČANSKÝ**
Osobní číslo: **Z17019**
Studijní program: **N4103 Zootechnika**
Studijní obor: **Zootechnika**
Název tématu: **Infestace včelstev *Nosema spp.* v průběhu roku v různých lokalitách**
Zadávací katedra: **Katedra zootechnických věd**

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

Parazitární a infekční tlak na včelstva včely medonosné chované v tuzemsku v posledních letech vzrůstá. Spolu s varroózou je často zmiňováno napadení včelstev mikrosporidii *Nosema apis* a *Nosema ceranae*, původci střevního onemocnění včel

- nose mózy. Nebezpečí, především v případě *N. ceranae* ovšem spočívá v nejednoznačných projevech onemocnění a složitější diagnostice přímo na stanovišti. Skrytý průběh onemocnění oslabuje včelstvo, které je pak náchylnější k dalším infekcím a často může uhynout.

Cílem diplomové práce je sledovat výskyt a promořenost vybraných včelstev *Nosemou spp.* v návaznosti na klimatické podmínky a zjištění míry závislosti mezi rozvojem *N. apis*, *ceranae*, klimatickými podmínkami a stavem včelstva.

V teoretické části práce se zaměříte na biologii *Nosema apis* a *N. ceranae*, vliv těchto parazitárních hub na rozvoj včelstva, přirozené způsoby zoohygieny, prevenci a dále na možnosti aplikace léčivých přípravků a jejich charakteristiku. U vybraných chovatelů včel ve stanovených časových úsecích zaznamenáte napadení včelstev houbami *N. apis* a *ceranae*, zároveň podchytíte mikroklimatické podmínky stanoviště a vybrané vlastnosti sledovaných včelstev.

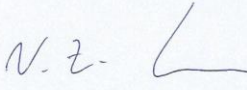
Získané údaje zpracujete vhodným způsobem, vyhodnocení výsledků provedete pomocí příslušných metod. Ze zjištěných výsledků vyvodíte závěry a doporučení pro chovatelskou praxi.

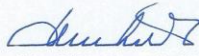
Rozsah grafických prací: 5 tabulek, 5 grafů
Rozsah pracovní zprávy: 40 - 50 stran
Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická
Seznam odborné literatury:

Veselý V. et al. (2013): Včelařství. Praha: Brázda, 270 s. ISBN 978-80-209-0399-0.
Human H. et al. (2013): Miscellaneous standard methods for *Apis mellifera* research. *Journal of Apicultural Research*, 52(4).
Fries I. et al. (2013): Standard methods for *Nosema* research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1): 1-28.
Sammataro D. et al. (2011): *The Beekeeper's Handbook*. Ithaca: Comstock Pub. Associates, Division of Cornell University Press, 308 p. ISBN 9780801449819.
Čermák K. et al. (2016): Včelařství I. České Budějovice: PSNV. 180 s. ISBN 9788026090908.
Odborné články týkající se sledované problematiky v časopisech *Journal of Apicultural Research*, *Plos One*, *Apidologie*, *Research in Veterinary Science*, *Journal of Insect Physiology*, *Včelařství*, *Moderní včelař* a dále ve sbornících z odborných konferencí, aj.

Vedoucí diplomové práce: Ing. Jitka Rutkayová, Ph.D.
Katedra zootechnických věd
Konzultant diplomové práce: Ing. Miroslav Kašparů
Katedra zootechnických věd

Datum zadání diplomové práce: 21. března 2018
Termín odevzdání diplomové práce: 15. dubna 2019


prof. Ing. Miroslav Soch, CSc., dr. h. c.
děkan
JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Bourbálova 1509, 370 05 Česká Budějovice


prof. Ing. Václav Matoušek, CSc.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 17. září 2018

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

Tímto bych rád poděkoval vedoucí mé diplomové práce Ing. Jitce Rutkayové, Ph.D., za cenné rady, odbornou pomoc a trpělivost. Dále děkuji všem včelařům, kteří se podíleli na vzniku této práce poskytnutím biologického materiálu.

Tato práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (GAJU028/2019/Z; řešitel: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D., spoluřešitel: Ing. Jitka Rutkayová, Ph.D.).

Abstrakt

Nosemová nákaza je celosvětově rozšířená nemoc včel, kterou způsobují dvě mikrosporidie (*Nosema apis* a *Nosema ceranae*).

Cílem diplomové práce je sledovat výskyt a promořenost vybraných včelstev *Nosemou spp.* v návaznosti na klimatické podmínky a zjištění míry závislosti mezi rozvojem *N. apis*, *N. ceranae*, klimatickými podmínkami a stavem včelstva.

V práci bylo využito dvou způsobů identifikace původce. Prvním byla mikroskopie, při které se zjistily značné změny v počtu spór na 1 včelu v průběhu roku. Zaznamenaný počet spór byl po skončení experimentu vyhodnocen ve vztahu k venkovní teplotě, vlhkosti, počtu obsednutých rámků, počtu nástavků, mírnosti včel a sezení na plástech. Druhým způsobem bylo využití metody PCR. Touto metodou se stanovilo procento pozitivních včelstev na vybraných stanovištích. Dále byl určen procentuální výskyt každého z původců a vyhodnocení, zda dochází k vzájemnému ovlivňování *Nosema spp.* ve včelstvech.

Klíčová slova: včelařství, včela, *Nosema spp.*, *Nosema apis*, *Nosema ceranae*.

Abstract

The nosem infection is a worldwide spread bee illness caused by two microsporidia (*Nosema apis* and *Nosema ceranae*).

The aim of this thesis is to follow the occurrence of *Nosema spp.* and density of infection in the selected bee colonies considering the relation between *N. apis*, *N. ceranae*, climatic conditions and the condition of each bee colony concerned.

In my thesis, I have used two ways of originator identification. The first was microscopy, using which we have discovered significant changes in the number of spores in one bee colony within one year. After the experiment had finished, we evaluated the number of measured spores in connection with the outside temperature, humidity, number of colonized frames, extenders, gentleness of bees and their sitting on the honey combs.

The second way was using the PCR method. Through this method we have identified the percentage of positive bee colonies on the selected locations. Furthermore, we have confirmed the occurrence of each of the originators and evaluated if there is a mutual influence of *Nosema spp.* between bee colonies.

Key words: bee, apiculture, *Nosema spp.*, *Nosema apis*, *Nosema ceranae*.

Obsah

1 Úvod.....	9
2 Literární přehled.....	10
2.1 Nosemóza	10
2.1.1 Včela — hostitel.....	10
2.1.2 Trávící a vyměšovací ústrojí — místo vývoje a výskytu nose mózy.....	11
2.1.3 Původce ze třídy <i>Microsporidia</i>	13
2.1.4 <i>Nosema apis</i> a <i>Nosema ceranae</i>	13
2.1.5 Rozvoj <i>Nosema ceranae</i> v Evropě a dalších částech světa.....	14
2.1.6 Vliv <i>N. ceranae</i> na včely.....	15
2.1.7 Vývojový cyklus	17
2.1.8 Zdroj a šíření infekce	19
2.1.9 Klinické příznaky	20
2.1.10 Diagnostika	21
2.1.11 Léčba a prevence.....	23
2.1.12 Dezinfekce.....	24
3 Metodika a materiál.....	26
3.1 Mikroskopické vyšetření	26
3.1.1 Materiál	26
3.1.2 Odběr vzorků k mikroskopickému vyšetření	26
3.1.3 Příprava vzorků a vlastní mikroskopování.....	27
3.1.4 Počítání v Bürkerově komůrce.....	27
3.2 Vyšetření PCR.....	28
3.2.1 Materiál	28
3.2.2 Odběr vzorků k vyšetření PCR	28
3.2.3 Příprava vzorků na PCR.....	28
3.2.4 Genotypizace.....	29
3.2.5 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	30
3.2.6 Gelová elektroforéza	32
3.2.7 Extrakce DNA z gelu (Gen Elute Sigma)	32
3.2.8 Sekvenace.....	33
3.3 Vyhodnocení dat.....	33
4 Výsledky	34
4.1 Mikroskopie.....	34
4.2 PCR	40
5 Diskuze.....	43
5.1 Mikroskopování.....	43

5.2 PCR	45
6 Závěr	47
7 Bibliografické citace	50

1 Úvod

Význam chovu včel spočívá v opylování hmyzosubných rostlin. Během chovu dochází i k produkci včelích produktů, kterými jsou například včelí med, mateří kašička a propolis s antibakteriálními účinky. S narůstající intenzitou zemědělské produkce nabývá včelařství ještě na větším významu. Z početné třídy hmyzu se právě včela podílí největší částí na opylování rostlin. Bez včel by se jen do omezené míry dokázala udržovat rozmanitost krajiny i existence některých rostlin. Mimo jiné včelařství patří mezi nejstarších oborů lidské činnosti. Také nikterak nenarušuje životní prostředí.

Včelař, jenž má zájem o chov včel, by měl podnikat takové kroky, jenž mu zajistí zdravá a silná včelstva. Neboť jen taková včelstva jsou schopna vysokých medných výnosů. Přispět tomu může správnou technikou chovu, včasným poskytnutím cukerného roztoku na zimu, správným zazimováním a vhodným zacházením s léčivými přípravky využívanými ve včelařství. Léčivé preparáty přírodního i průmyslového původu se používají v boji s infekčními chorobami, které dělíme na mykózy (zvápenatění včelího plodu, zkamenění včelího plodu), virózy (virová nákaza včelího plodu, virová paralýza včel), parazitózy (nosemová nákaza, roztočková nákaza, varroáza) a nemoci bakteriálního původu (mor včelího plodu). Během léčení se nesmí zapomínat na problémy související s léčbou včel. Mezi ně bychom mohli zařadit vznikající rezistence a přítomnost reziduálních látek v medu i dalších produktech. S nemocemi neinfekčního původu je včelař schopen bojovat i bez léčivých preparátů, jelikož do této skupiny řadíme například průjmy, zácpu, hynutí včel hladem a zimou.

Práce je zaměřena na infekční nemoc nazývaná nosemová nákaza. Tuto nákazu u včel způsobují dva původci, jenž řadíme do třídy hmyzomorky. Prvním je *Nosema apis*, která byla poprvé zaznamenána ve včelích výkalech. Druhým možným původcem je *Nosema ceranae*. Prokázání tohoto původce ve včelstvu bylo prováděno pomocí mikroskopie a PCR vyšetření. Odběr vzorků pro mikroskopické vyšetření probíhal z devíti včelstev, které se nacházely na třech různých stanovištích. Pro metodu PCR bylo odebráno 40 vzorků z osmi stanovišť v Jihočeském kraji.

2 Literární přehled

2.1 Nosemóza

Nosemóza (dříve nazývaná nosematóza) je invazivní a plošně se vyskytující onemocnění dospělých včel (Titěra, 2017). Včela může být infikována dvěma druhy mikrosporidií: *Nosema apis* a *Nosema ceranae* (Milbrath *et al.*, 2015). V minulosti převažoval výskyt *N. apis*, ale v posledních letech se stále častěji setkáváme s *N. ceranae*. Není ani výjimkou smíšená infekce oběma druhy (Titěra, 2017). Rostoucí prevalence mikrosporidiových infekcí u medonosných včel je v posledních letech pozorována po celém světě (Botías *et al.*, 2012a). V České republice jsou původci zaznamenáváni přibližně u 50 % včelstev, avšak míra nákazy značně kolísá (Titěra, 2017).

2.1.1 Včela — hostitel

Včelu řadíme mezi členovce pro své typicky článkované tělo, které se skládá z hlavy, hrudi a zadečku. Celé tělo je hustě pokryto chloupky různých tvarů s rozdílnými funkcemi (Toporčák, 1999).

Na hlavě se nachází potřebné smyslové orgány z části kryté chitinizovaným kožním krunýřem. Oční soustavu tvoří 3 oči jednoduché sloužící k zachycení obrazu v krátké vzdálenosti a 2 oči složené pro vidění do dálky (Toporčák, 1999). Dalším multifunkčním orgánem jsou tykadla, pomocí nichž včela rozlišuje hmatové, chuťové i čichové vjemy společně s vnímáním teploty, vlhkosti a koncentrace CO₂. Na hlavě lze také nalézt čelní štítek, horní pysk, dolní pysk, kusadla a sosák (Daníhlík *et al.*, 2017).

Hrud' je tvořena třemi původními hrudními články (předohrud', středohrud', zadohrud') a prvním zadečkovým článkem (bedry). Na každém z hrudních článků lze nalézt část hřbetní a břišní, které odděluje část boční (Veselý *et al.*, 2003). Na předohrudí jsou výběžky kryjící první hrudní průduch společně s prvním párem končetin. Největším z článků je středohrud' nesoucí další pár končetin a první dvojici křídel. Na zadohrud' se upíná poslední pár křídel i končetin. Bedra se zadečkem jsou

propojena stopkou, v níž vede jícen s aortou, nervovou páskou a vzdušnicí (Daníhlík *et al.*, 2017).

V zadečku je umístěna většina vnitřních orgánů včetně trávicího, pohlavního, vyměšovacího ústrojí, cévní, dýchací i nervové soustavy. U dělnic i včelí matky se zadeček skládá z šesti článků tvořených břišní (*sternit*) a hřbetní částí (*tergit*) (Veselý *et al.*, 2003). Trubec má o jeden článek více (Hanousek, 1991). Volné membránové spojení *sternitů* a *tergitů* umožňuje rozšiřování a smršťování zadečku potřebné k správné činnosti jednotlivých soustav (Veselý *et al.*, 1985).

2.1.2 Trávicí a vyměšovací ústrojí — místo vývoje a výskytu noseμόzy

Trávicí ústrojí slouží k přijímání, přesunu a zpracování potravy. Společně s vyměšovacími ústrojími dochází k odstraňování nestrávené potravy i jejímu dočasnému skladování v době snížených možností výletů z úlu (Veselý *et al.*, 2003).

Trávicí ústrojí se dělí na tři části. Přední část (*stomodeum*) je složena z hltanu, jícnu a medového váčku. Ve střední části (*mesenteron*) se nachází žaludek a zadní část (*proctodeum*) je složena z tenkého střeva, výkalového vaku a konečníku (Toporčák, 1999).

Jediný žaludek byl vytvořen z vnitřního zárodečného listu, proto má vlastní žláznatý epitel umožňující trávení. Jelikož zbývající dvě části byly utvořeny vchlípením vnějšího zárodečného listu, jsou podobné svou stavbou pokožce (Veselý *et al.*, 2003).

Vstup do trávicího ústrojí začíná ústy pokračující hltanem, jenž pomocí roztahování a stahování vnitřních svalů přijímá a posunuje potravu. Stěny hltanu pokrývají dvě hltanové destičky po stranách vyústující v hltanové žlázy. Už v hlavě dochází k zužování hltanu v jícen, procházející hrudí až do zadečku, kde se rozšiřuje v medový váček (Svoboda *et al.*, 1968). Tento velmi roztažený váček je umístěn v přední části zadečku, který při naplnění může dosahovat až 50 mm³ (Daníhlík *et al.*, 2017). Medový váček má tenkou epiteliální vrstvu se svalstvem situovaným uvnitř epitelu. Jeho hlavní funkcí je transport vody, medovice a nektaru, ale i pylu, jenž je dále přesouván do žaludku nebo může být vrácen obsah zpět do sosáčku (Svoboda *et al.*, 1968). Jako další orgán trávicí soustavy je česlo ve tvaru nálevky. Jeho přední část vyčnívá v medovém váčku a protější konec vstupuje do žaludku.

U vstupu do česla se nachází čtyři svalové chlopně, které mají silně krytý vnitřní okraj chloupky. Hlavním důvodem přítomnosti těchto chloupků je zachytávání pevných částic. Mimo pylu jsou z volátka odstraňovány také patogeny (například spóry původců moru včelího plodu či nosematózy). Tento orgán lze zařadit mezi důležitou složku imunity včelstva, protože seskupené organismy mají sníženou patogenitu a jsou včelami vylučovány společně s výkaly mimo úl (Daníhlík *et al.*, 2017). Následující žaludek je od deseti do devatenácti milimetrů dlouhý ve tvaru rourky tvořící smyčku s řasnatě složenou stěnou, čímž dochází ke zvětšení plochy kryté epiteliálními buňkami. Z přední i zadní části je oddělen pomocí chlopní (Veselý *et al.*, 1985). Zde přítomné epitelové buňky jsou schopny tvořit síť pevných vláken (*rhabdorium*). U těchto vláken dochází k jejich odlučování po vrstvách do lumina žaludku a vytvoření ochranné bariéry (peritrofická membrána). Význam této membrány spočívá v ochraně před ostrými objekty v obsahu žaludku (např. před ostrými vnějšími blanami pylových zrn) (Daníhlík *et al.*, 2017). Naopak propouští trávicí enzymy, strávené živiny, ale i bičíky spor hmyzomorky (*Nosema apis*) (Veselý *et al.*, 2003). Dalším orgánem je tenké střevo, začínající svalnatou chlopní, rozmělnující potravu (Svoboda *et al.*, 1968). Uvnitř střeva je přítomna mikroflóra, která umožňuje další trávení potravy, umělé vytváří některé vitamíny a brání pronikání patogenů (Daníhlík *et al.*, 2017). Poslední část trávicího ústrojí tvoří konečník (výkalový vak). Jeho funkce spočívá v hromadění nestrávené potravy v době, kdy včelám není umožněn výlet mimo úl. Výkalový vak má stěnu složenou do hustých záhybů. Díky těmto záhybům, okružnímu a podélnému svalstvu je schopen nabývat velkého objemu (až 57 % hmotnosti dospělé včely) (Veselý *et al.*, 2003). Překročení výše zmíněného procenta v zimních měsících vede ke kálení uvnitř úlu (Toporčák, 1999). Rektální žlázy konečníku brání svým sekretem kvašení nevyužitých zbytků potravy a nejspíše ovlivňují i vodní režim včely (Veselý *et al.*, 1985).

Vyměšovací ústrojí tvoří takzvané Malpighiovy trubice, které vykonávají podobnou funkci jako ledviny u obratlovců (Hanousek, 1991). Jejich uložení je v zadečku, kde mají podobu asi sto padesáti slepě končících trubic. Druhý konec ústí do tenkého střeva v oblasti pyloru (Svoboda *et al.*, 1968). Malpighiho trubice omývá hemolymfa, v níž jsou zachytávány odpadní látky za pomoci výstelkových buněk, shromažďovány do vezikul a vpuštěny do dutin soustavy. Poté dochází

k přesunu přes tenké střevo do výkalového vaku a jejich následnému vyloučení společně s výkaly (Daníhlík *et al.*, 2017).

2.1.3 Původce ze třídy *Microsporidia*

Mikrosporidie jsou parazitické organismy bezobratlých i obratlovců (Mathis *et al.*, 2005). Jako parazity je nazýváme z důvodu jejich žití na úkor hostitelského organismu. Jedná se o velice početnou skupinu mikroorganismů, protože čítá zhruba 1300 druhů. Dle dříve používaného českého pojmenování mikrosporidií – hmyzomorky – můžeme odvodit, že jejich hostiteli jsou různí zástupci z třídy hmyzu. Jejich hlavním znakem je způsobení oportunní (příležitostné) infekce (Titěra, 2017). Rozvoj mikrosporidií probíhá výhradně v infikovaných hostitelských buňkách (vývoj mimo buňku nebyl nikdy popsán). Proces infekce začíná klíčením spór, tj. vymrštěním pólového vlákna, které prochází membránou hostitelské buňky a přenáší sporoplazmu do cílové buňky. Životní cyklus se dělí na fázi proliferační a sporogonickou (Gisder *et al.*, 2011).

Většina mikrosporidiových infekcí se přenáší orálním požitím spór, avšak rozvoj nemoci probíhá až v gastrointestinálním traktu (Xu *et Weiss*, 2005). U hostitelů napadených mikrosporidii dochází ke vzniku infekce bez projevení klinických příznaků, dokud nedojde k narušení imunitního systému vlivem dalších faktorů např. špatnou výživou. Poté by došlo i ke značnému namnožení parazita a projevu klinických příznaků u hostitele (Titěra, 2017).

Pro rozlišení jednotlivých druhů rodu *Nosema spp.* je jedním z určujících znaků počet závitů v polárním vláknu (Burges *et al.*, 1974).

2.1.4 *Nosema apis* a *Nosema ceranae*

Nosema apis je prvok, který má české pojmenování hmyzomorka včelí. Jeho první zachycení ve včelích výkalech bylo v roce 1857, kdy ho nesprávně zařadili mezi plísně. Až v roce 1909 došlo ke správnému zařazení (Peroutka *et Drobníková*, 1987).

Tento parazit tvoří spóry o přibližné velikosti 6 x 4 μm. Tato spóra je uložena v chitinovém obalu s otvorem na jednom konci, kde dochází k vymrštění pólového

vlákna 80krát většího než samotná spóra (Svoboda, 1968). Dále se uvnitř nachází dvoujaderný sporont (Peroutka *et* Drobníková, 1987). Při pokusech stanovení životaschopnosti spóry bylo zjištěno, že při běžných podmínkách vydrží nejméně 7 měsíců a ve fyziologickém roztoku přežívají po dobu nejméně 2 let (Svoboda *et al.*, 1968). Ve vnějším prostředí se nejčastěji vyskytuje u společných napajedel (Sammataro *et* Avitabile, 2011).

Při mikroskopické diagnostice se *N. ceranae* prezentuje jako menší, válcovitá a špičatěji zakončená spóra (Titěra, 2017). Při hodnocení rozměrů bychom měli naměřit přibližnou délku 4,7 μm a šířku 2,7 μm (Fries *et al.*, 1996). Pouze zanedbatelný podíl spór (4 %) měl střední velikost mezi uvedenými typickými rozměry *N. apis* a *N. ceranae* (Titěra, 2017). Vně je dvoujaderný sporont. Polární vlákno je isofilární s průměrem 96-102 nm a je uspořádáno ve 20-23 závitěch v zadní a střední části spór. V přední části jsou těsně zabalené přibližně 11 nm silné lamely. Zadní lamely jsou tlustší a méně pravidelné. V zadní části zralého sporu bylo často pozorováno dobře fixované posteriorní tělo interpretované jako *posterosom* (Fries *et al.*, 1996).

Infekce *N. ceranae* vede k vyšším zatížením sporů než *N. apis*. *N. ceranae* indukovala jemně, i když ne významně, vyšší úmrtnost než *N. apis* (Sinpoo *et al.*, 2018).

2.1.5 Rozvoj *Nosema ceranae* v Evropě a dalších částech světa

Mikrosporidíóza (nosemová choroba) včel se rozšířila po celém světě a způsobila těžké ekonomické ztráty ve včelařství (Huang *et al.*, 2007). *Nosema ceranae*, dříve považována za parazita pouze u včely východní (*Apis cerana*), v posledních několika letech překvapila o rozsahu svého rozšíření (Paxton *et al.*, 2007). První záznam o přirozené infekci u včely medonosné byl v roce 2005 ve Španělsku. Do této doby byla vědecky popsána v roce 1996 pouze u včely východní (Titěra, 2017). Avšak při rozboru archivovaných vzorků včel z Finska v letech 1986-2006 dochází ke zjištění, že *N. ceranae* je přítomna v Evropě nejméně od roku 1998 (Paxton *et al.*, 2007). První záznam ze Španělska o přítomnosti *N. ceranae* v medu je z roku 2000 (Botías *et al.*, 2012b).

V současnosti se jedná o celosvětové rozšíření na místa chovu včely medonosné. Souvislost *N. ceranae* se ztrátami včelstev byla dokázána v teplejších zemích jako např. Řecko, Španělsko. V zemích s chladnějším klimatem k tomuto prokázání zatím nedošlo (Titěra, 2017).

2.1.6 Vliv *N. ceranae* na včely

Nosema ceranae je relativně nový parazit západní včely (*Apis mellifera*), který vyvolává novou formu nose mózy. Ve srovnání s *Nosema apis*, která infikovala včely delší dobu, se zdá, že u tohoto hostitele způsobila více virulentní onemocnění (Martín-Hernández *et al.*, 2011).

N. ceranae má významný vliv na chování infikovaných včel (Naug *et Gibbs*, 2009). Výsledky jejich experimentu naznačují, že infikované včely jsou více vnímavé na sacharózu a méně náchylné sdílet tento zdroj energie s jinými včelami. Toto naznačuje vyšší úroveň hladovění (Naug *et Gibbs*, 2009).

Prostřednictvím dalších experimentů s krmením včel v zajetí se ukázala vyšší konzumace cukrového sirupu u včel infikovaných *N. ceranae* oproti včelám infikovaných *N. apis* a skupinou kontrolních včel. Spotřeba cukrového sirupu byla také vyšší u včel infikovaných *N. apis* než u kontrolních (Martín-Hernández *et al.*, 2011). Při mikrosporidii se zvýšila úmrtnost a konzumace cukrového sirupu v závislosti na rostoucím množství spór, které byly podány pro infekci. Rozdíly v energetických požadavcích mezi *Nosema spp.* nejsou stejné, což může záviset na vztazích mezi hostitelem a parazitem (Martín-Hernández *et al.*, 2011).

Koevoluce mezi hostitelem a patogenem vede k vzájemným adaptacím, jenž umožňují patogenu zvýšit vykořisťování hostitele nebo hostiteli, aby minimalizoval náklady na infekci (Kurze *et al.*, 2016). Vzhledem k tomu, že rezistence vůči patogenům je často spojena se značnými náklady, tolerance může být evoluční alternativou. Kurze *et al.* (2016) zkoumali energetický stav v nosema tolerantních a citlivých včelách, které čelí infekci. Kvantifikovali tři hlavní hemolymfové karbohydráty (fruktózu, glukózu a trehalózu) za použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Úroveň trehalózy v hemolymfě byla negativně spojena s intenzitou infekce *N. apis* a infekcí *N. ceranae* bez ohledu na intenzitu infekce u citlivých včel. Tato zjištění naznačují, že dostupnost energie u tolerantních včel

nebyla infekcí ohrožena (Kurze *et al.*, 2016). Tento výsledek získaný na individuální úrovni může mít také důsledky na úrovni kolonie, kde mohou dělnice i přes infekci nosema stále fungovat, stejně jako zdravé včely, což udržuje produktivitu kolonií (Kurze *et al.*, 2016).

Průměrná výživa bílkovinami podporuje zdraví včely a snižuje náchylnost k onemocnění (Basualdo *et al.*, 2014). O vlivu stravy na vývoj *Nosema ceranae* narušující proteinový metabolismus včel je však známo jen málo. Proto Basualdo *et al.* (2014) zkoušeli vliv přírodních a nepřírodních bílkovinných diet na titr hemolymfových bílkovin a na tvorbu spór. Přírozená strava vedla k vyšším hladinám bílkovin a rozvoji parazita, avšak přežití včel bylo vyšší než u náhradní stravy (Basualdo *et al.*, 2014).

Při pokusu Zheng *et al.* (2014) zaznamenali vztah mezi množstvím spór a příjmem pylu. Krmení pylem zvýšilo spórné zatížení medonosných včel ihned několikanásobně. Změnou v množství pylu spotřebovaného včelami v zajetí se ukázalo, že zatížení sporama se zvyšuje se zvyšováním přijatého pylu (Zheng *et al.*, 2014). Nosemové infekce snižují životnost medonosných včel a transkripci vitellogeninu, a to buď s podáváním pylu nebo bez něj. Snižování spotřeby pylů však mělo větší vliv na životnost včel a hladinu vitellogeninu, než na nárůst počtu spór, způsobených podáváním pylu. Tyto výsledky naznačují, že zátěž spór nemusí být použita sama jako přímý indikátor závažnosti infekce *N. ceranae* u včel (Zheng *et al.*, 2014).

Benvau *et Nieh* (2017) prokázali infikaci larev včely medonosné původcem *Nosema ceranae*. Při pokusu infikování larev různě vysokými dávkami spór se zjistilo, že nízká dávka 10 K vedla k významně vyšší infekci než vysoká dávka 40 K a to 1,3krát více spórů a 1,5krát více infikovaných včel (Eiri *et al.*, 2015). Může se jednat o diferenciální imunitní aktivaci, jestliže vyšší dávka vyvolala silnější imunitní odpověď larvy, která vyústila v méně spór u dospělých (Eiri *et al.*, 2015).

Infikované buňky, mohou působit proti invazivnímu patogenu iniciováním vlastní smrti (apoptózou) jako obrannou strategií. K určení, zda *N. ceranae* blokuje apoptózu v infikovaných buňkách, byla buněčná smrt hodnocena pomocí testu TUNEL a imunohistochemie pro kaspázu-3. Ventrikulární epiteliální buňky z infikovaných včel byly větší než v neinfikovaných kontrolních včelách a obsahovaly *N. ceranae* ve zralých i nezralých stádiích (Higes *et al.*, 2013). Apoptotická jádra byla pozorována pouze v některých omezených oblastech, zatímco

apoptóza byla typicky pozorována v epitelu u neinfikovaných včel. Apoptotický index byl skutečně vyšší u neinfikovaných versus infikovaných včel. Výsledky naznačovaly, že *N. ceranae* zabraňuje apoptóze v epiteliálních buňkách infikovaných komor, což je mechanismus, který je navržen tak, aby zvyšoval vývoj parazitů (Higes *et al.*, 2013).

Správný obsah bioelementů je zásadní pro zdraví všech organismů, včetně včel. Nicméně situace je v těchto důležitých opylovačích komplikovanější vzhledem k tomu, že během zimy mění svou fyziologii, aby přežila relativně drsné klimatické podmínky (Ptaszyńska *et al.*, 2018). V zimě mají výrazně vyšší obsah: Fe, Mn, Ni a Cd. Ptaszyńska *et al.* (2018) zjistili, že infekce *N. ceranae* vedla ke zvýšenému obsahu: S, Sr a Pb. U včel bez nosemy byly zaznamenány vyšší množství B a Si. Proto navrhuje, aby nedostatek Fe, Mn, Ni a Na pozorovaný u včel infikovaných noseou, mohl být důvodem vyšší úmrtnosti včel během přezimování. Kromě toho může být nedostatek bioelementů, jako jsou B a Si, důvodem pro zrychlené stárnutí, které je pozorováno po infekci *N. ceranae* (Ptaszyńska *et al.*, 2018). V zimě byl obsah bioelementu silněji ovlivněn infekcí *N. ceranae* než v létě. Výsledkem je zjištění silného vztahu mezi obsahem bioelementů, sezónou (léto nebo zima) a infekcí nosema (Ptaszyńska *et al.*, 2018). I u plodu, který byl vychován nemocnými včelami, byly zjištěny změny v hodnotách mikroelementů (Peroutka *et Drobníková*, 1987).

U infikovaných včel, které jsou krmeny *ad libitum* se došlo k závěru, že jejich délka života je stejná jako u včel prostých nákazy (Mayack *et Naug*, 2009).

2.1.7 Vývojový cyklus

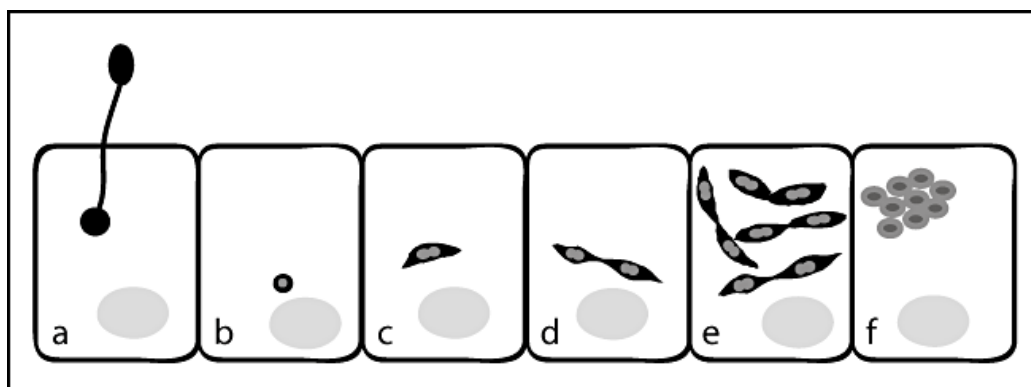
Společně s potravou může včela přijmout i spory *Nosema spp.*, které mají svůj typicky oválný tvar s charakteristickou velikostí (Svoboda, 1968). Svým vývojem a reprodukcí jsou jednotlivé druhy vázány na buňky různých tkání svých hostitelů. K jejich množení dochází až poté, co do nich proniknou (odborně proces nazýváme obligátně intracelulární parazitismus) (Titěra, 2017). Po přenesení spór do vhodného prostředí se prvok může začít rozmnožovat (Hanousek, 1991). Za vhodné prostředí je považován prostor žaludku a střev (Titěra, 2017). Avšak spóry *N. ceranae* byly zaznamenány i v hypofaryngeálních žlázách, slinných žlázách, malpighických

trubicích a tukové tkáni (Chen *et al.*, 2009). Pro správný vývoj parazita je také potřebná optimální teplota 30 až 35 °C (Čermák *et al.*, 2016).

Jakmile se spóry dostanou do žaludku dojde k vymrštění dutého pólového vlákna, skrz něj prochází planont, jenž je tímto způsobem vpraven do epitelální buňky (Veselý *et al.*, 2003). Také je zde sporoplazma převedena do cytoplazmy hostitelské buňky (Xu *et Weiss.*, 2005). Buňky, které posloužily k rozvoji parazita, odchází spolu se vzniklými sporami do vnitřního prostoru žaludku, odtud putují do tenkého střeva a následně do výkalového vaku (Hanousek, 1991). Ve výkalovém vaku se může nashromáždit až 180 miliónů spór (Hanousek, 1991).

Existují důkazy, že *N. ceranae* je virulentnější než *N. apis*, protože *N. apis* více podléhá environmentálním faktorům, jako je klima (Gisder *et Genersch*, 2013). Zkoumáním vlivu teplot se zjistilo, že při teplotách 25 a 37 ° C je biotický potenciál *N. ceranae* vyšší než u *N. apis* (Martín-Hernández *et al.*, 2009). Zachování životnosti spór *N. ceranae* po ošetření při teplotě 60 ° C naznačuje dobrou odolnost vůči vysokým teplotám. Avšak zahřívání sporů *N. apis* po dobu nejméně 15 minut při 60 °C zcela parazita zabije. Byla pozorována lepší adaptace *N. ceranae* než *N. apis* na teplotu (Fenoy *et al.*, 2009). Infekce *N. apis* se během roku vyskytuje více v mírnějším období, jako je jaro a podzim (Martín-Hernández *et al.*, 2007).

Schématické znázornění událostí v životním cyklu *N. ceranae* je znázorněno v obrázku 1.



Obrázek 1. Vývojový cyklus *N. ceranae* (Gisder *et al.*, 2011).

Spóry extrudují polární trubici, která propichuje buněčnou membránu cílové buňky, následovanou injekcí sporoplazmy do hostitelské buňky (a). Sporoplasma se v hostitelské buňce objevuje jako malé sférické tělo (b), pak se vyvíjí do větnovitého meronu (c), který se začíná dělit, což vede ke vzniku párových merontů (d). Tyto dvojice merontů pak podstoupí několik kol buněčného dělení (e), až se oddělí a rozvinou do oválných sporontů, jenž jsou kondenzovány a charakterizovány zesílenou plazmovou membránou (f) (Gisder *et al.*, 2011).

Zahájení tvorby spórů *N. ceranae* in vivo bylo pomalejší ve srovnání s *N. apis*. Při použitých infekčních dávkách spór byly pozorovány zralé spóry *N. apis* čtyři dny po infekci, zatímco současně nebyly detekovány žádné zralé spory *N. ceranae*. Plně vyvinutá infekce v žaludku se však zdála být dosažena asi 10-12 dní po infekci u obou parazitů, přičemž byl přítomen podobný počet spór (přibližně $20 \pm 4 \times 10^6$ spór) (Forsgren *et Fries*, 2010).

2.1.8 Zdroj a šíření infekce

Zdrojem nosemové nákazy jsou spóry, které se vyskytují jako součást výkalů na díle, rámcích, stěnách úlu a v napajedle (Svoboda *et al.*, 1968). Včely během odklizení výkalů v úlu přijímají současně i spóry (Kubišová *et Háslbachová*, 1992). Tento proces (*koprofagii*), podporuje hlavně fakt, že exkrementy při nosemové nákaze jsou sladké (Titěra, 2017). Další možností šíření mohou být takzvaní pasivní přenašeči. Do této skupiny řadíme čmeláky, vosy, mravence a zavíječe, jež jsou pouze hostiteli spór. Původce je zde bez ztráty životnosti, ale současně i bez možnosti množení (Kubišová *et Háslbachová*, 1992). Mezi nositele můžeme nově

zařadit také malého brouka (*Aethina tumida*), u kterého byla zjištěna přítomnost DNA *Nosema ceranae* (Cilia *et al.*, 2018). I včelař může přispět k zanesení infekce do včelstva, když spojuje slabá včelstva se zdravými nebo přemísťováním plástů a souší mezi včelstvy (Titěra, 2017).

Z důvodu rychlého rozšíření *N. ceranae* došlo i k vyšetření trubců na přítomnost spór. Výsledek bylo zjištění, že i trubci mohou být nakaženi tímto parazitem. S ohledem ke sklonu těchto včelích samců zalétávat do jiných úlů, jedná se o dalšího možný způsob přenosu mezi včelstvy (Traver *et Fell*, 2011). Také byla zjištěna infekce i ve spermatu. Vzhledem k tomuto zjištění se může hovořit o pohlavně přenosné nemoci včel (Roberts *et al.*, 2015). I *N. apis* je přítomna v pohlavních orgánech trubců. Přítomnost spór v reprodukční tkáni má vliv na plodnost (Peng *et al.*, 2015).

U experimentálně infikovaných včelích matek *N. apis* Webster *et al.* (2015) zaznamenali přítomnost spór na místech typických pro tuto nákazu, ale žádná spóra se nevyskytovala na vaječnicích. Toto zjištění navádí k myšlence, že *N. apis* není schopna vertikálního přenosu (Webster *et al.*, 2015). Traver *et Fell* (2012) zjistili při vyšetření včelích matek na *N. ceranae* přítomnost tohoto parazita i ve vaječnicích. V tomto případě se dá hovořit o vertikálním přenosu *N. ceranae* (Traver *et Fell*, 2012). U infikovaných matek dochází ke změnám v množství feromonů a hladinám vitellogeninu (Alaux *et al.*, 2011). Také byl zjištěn vliv věku na vznik infekce, kdy mladší matka je více náchylnější ke vzniku infekce než starší (Chaimanee *et al.*, 2014). Horizontální přenos je také možností přenosu ve včelstvu. K infikovaným dělnicím 5 000 životaschopnými spórami byla přidána matka, která byla následně nakažena. Vzniklá infekce způsobila smrt matky do 3 týdnů (Higes *et al.*, 2009).

2.1.9 Klinické příznaky

U včelstva, ve kterém jsou přítomny spóry nosemy se nemusí vždy vyskytovat klinické příznaky (Titěra, 2017). Někdy v zimním období můžeme pozorovat neklid ve včelstvu projevující se neplnohodnotným vytvořením zimního chomáče (Rytíř, 1937). Nemocná včela nemůže zcela správně trávit přijatou potravu a využívat z ní živiny. Toto je důvod, proč je včela nucena přijímat více potravy, což má za následek rychlejší naplnění výkalového vaku v zimním období (Marek, 1978).

Následně se objevuje zduření zadečku, bezletnost, průjem a kálení v úle nebo na česně (Čermák *et al.*, 2016). Nakažené včely slábnou a hynou v křečích doprovázených chvěním křídel zhruba o jeden týden dříve (Marek, 1978). Ztráty dělnic mohou způsobit neplnohodnotné obsedání plodu, který zachladne. Nově vzniklé včely ze zastydnutého plodu se líhnou se zakrněnými křídly (Rytíř, 1937). Při individuální kontrole včely se zvětšeným zadečkem můžeme preparací zjistit zvětšený žaludek bělavé barvy na rozdíl od zdravého žaludku žluté barvy (Titěra, 2017). Během kontroly včelstva bychom mohli zaznamenat neobvykle vysoký poměr mladušek k celkovému stavu včel. Největší pravděpodobnost projevů klinických příznaků je koncem dubna a začátkem května. U *N. ceranae* i v průběhu letního období (Čermák *et al.*, 2016).

2.1.10 Diagnostika

Mikroskopická diagnostika

Pro spolehlivé určení nosemové nákazy můžeme využít mikroskopického vyšetření obsahu střev nebo výkalů včely. Pro diagnostické účely se využívají uhynulé včely nebo živé včely, které je nutno před vlastním pokusem usmrtit. Živé včely usmrtíme za použití éteru, chloroformu nebo zmrazením. Jediný případ, kdy se nepřístupuje k usmrcení včely je vyšetření matky (Svoboda *et al.*, 1968).

Z uhynulých nebo utracených včel většinou použijeme celé zadečky. U skupinového vyšetření se odstříhne 30 zadečků mrtvolek, vložíme do třecí misky a přidáme vodu (Peroutka *et Drobníková*, 1987). Té přidáváme od 0,5 do 1 ml na 1 včelu (Titěra, 2017). Směs důkladně rozetřeme a vzniklou suspenzi nakápneme na podložní sklo. Poté přikryjeme krycím sklíčkem a pozorujeme při 400x zvětšení (Peroutka *et Drobníková*, 1987).

Pracovní postup dle University of Minnesota

1. Oddělíme zadečky z 25 včel a vložíme do misky.
2. Pomocí tloučku rozmělníme obsah v třecí misce.
3. Pokud používáme hemocytometr, přidáme pro každou včelu 0,5 ml vody.

4. Pomocí pipety důkladně promícháme zkušební vzorek a poté odebereme dílčí vzorek.
5. Pro zajištění přesnosti vyplníme obě strany komůrky.
6. Umístíme komůrku pod mikroskopickou čočku a najdeme počítací mřížku. Použijeme nízké zvětšení (100x), dokud nenajdeme mřížku v pohledu. Poté přepneme na větší zvětšení (400x).
7. Spóry *Nosema spp.* jsou pravidelně tvarované ovály s tmavým obrysem.
8. Spočítáme počet spór v pěti čtvercích.
9. Vynásobme počet spór v 5 čtvercích 25 000, abychom získali počet spór na vzorek. Například 100 spór celkem v pěti čtvercích x 25 000 = 2,5 milionu spór na včelu.
10. Před dalším vzorkem opláchneme veškeré zařízení a osušíme (Reuter *et* Spivak, 2012).

Spóry nosemy jsou pod mikroskopem nápadné svým pravidelným tvarem, velikostí a světlolomností. Rozlišení obou druhů nosemy je možné, ale vyžaduje značnou zkušenost a standartní vzorky pro porovnání. Spóry nyní stále častější *Nosema ceranae* jsou o něco menší, vřetenovitého tvaru na rozdíl od větších a oválných spór *Nosema apis* (Titěra, 2017).

Vyšetření včelích matek se provádí koprologickou metodou. Matku necháme, aby se vykálela na připravené podložní sklíčko. To poté přikryjeme krycím sklíčkem a pozorujeme pod mikroskopem přítomnost spór (Svoboda, 1968).

Vyhodnocení množství nalezených spór

Při objemu suspenze 0,005 μ l v zorném poli mikroskopu odpovídá 1 nalezená spóra 1 milionu spór ve vzorku. V laboratořích je prováděno hodnocení na křížky:

- 0 bez nálezu;
- + ojedinělý výskyt spór (méně než 3 spóry/zorné pole);
- ++ slabá invaze (3-10 spór/zorné pole);
- +++ středně silná invaze (10-100 spór/zorné pole);
- ++++ silná invaze (více než 100 spór/zorné pole) (Titěra, 2017).

Více v kapitole metodika.

Molekulární diagnostika

Přesná diferenciacie mezi *N. apis* a *N. ceranae* je nejlépe dosažená molekulárními metodami (Gisder *et* Genersch, 2013). Použitím PCR a specifických primerů lze rozlišit jednotlivé druhy *Nosema spp.* (Smart *et* Sheppard, 2012). Infekci je také možné zjistit pomocí qPCR umožňující současnou detekci jedné nosemy i koinfekci obou druhů (Copley *et al.*, 2012).

Podrobnější popis v kapitole metodika.

Sérologická metoda

Také byla vyvinuta nová metoda detekce parazita *Nosema ceranae*. Došlo k porovnání této metody ELISA s mikroskopií a kvantitativní PCR v reálném čase (qRT), které se v současné době používají. ELISA je v citlivosti s qRT-PCR méně nákladná a rychlejší. Tento test poskytuje první sérologickou metodu pro detekci *N. ceranae* u včel, která je stejně citlivá jako amplifikace DNA. Lze ji snadno použít v laboratoři i terénu (Aronstein *et al.*, 2013).

2.1.11 Léčba a prevence

Důležitou podmínkou pro boj s nosemovou nákazou je síla včelstva a matka schopna reprodukce (Hanousek, 1991). K léčbě se dříve využívalo účinku antibiotika fumagillin. V současné době není tento přípravek na území EU registrován a nesmí se používat (Čermák *et al.*, 2016). Hlavním problémem neproběhlé registrace je ne zcela známý účinek na včelu a problematika výskytu reziduí. Doposud není stanovena maximální hranice reziduí v medu (Titěra, 2017). Jedná se o produkt plísně *Aspergillus fumigatus* (Peroutka *et* Drobníková, 1987). Hlavní účinek fumagillinu spočívá v zasažení do syntézy DNA parazita v průběhu vývojového cyklu (Toporčák, 1999). Včelám se podává jako součást cukerného roztoku nebo medocukrového těsta (Marek, 1978). Dalším prostředkem je kyselina mravenčí, která vyvolává devitalizaci spór (Čermák *et al.*, 2016). Také fytotherapeutika mohou být použita v boji s nosemovou nákazou. Jedná se o léčiva rostlinného původu. Nejvýznamnějším přípravkem je extrakt z dubové kůry, cukrové řepy nebo solí kyseliny salicylové. Většinu léčebných postupů praktikujeme při krmení včelstev na období zimy (Titěra, 2017). Dalším přípravkem dříve používaného k léčbě

včelstva je tuzemský výrobek Nitekabin *a.u.v.* Spofa. Jeho složkami jsou guanidínhydrochlorid, formalin, glycerin a voda (Peroutka *et* Drobníková, 1987). Tento přípravek aplikujeme v jarním období do krmiva (Kubišová *et* Háslbachová, 1992).

Základním preventivním opatřením je chov včelstev s kvalitními matkami. Během přípravy na zimu je nutné zajistit včelstvu včas kvalitní krmivo. V jarním období poskytneme včelám hygienicky nezávadnou vodu. Staré úly můžeme dezinfikovat či nahradit za nové (Svoboda *et. al.*, 1968). Jako další krok při tlumení noseμόzy patří umožnit včelstvu obměnu díla (alespoň jednu třetinu v průběhu celého roku). V krajním případě u vyššího zamoření můžeme i celé včelstvo přenést na nové mezistěny. Hlavním aspektem pro zachování síly včelstva je dostatečný zdroj pylu (Titěra, 2017). Také pravidelná dezinfekce slouží jako prostředek k tlumení choroby (Hanousek, 1991).

2.1.12 Dezinfekce

Úl a celé jeho vnitřní vybavení bývá u nemocného včelstva silně zamořeno spórami nosemy. Z tohoto důvodu se provádí dezinfekce (Marek, 1978). Pod tímto pojmem si můžeme představit zneškodňování mikroorganismů pomocí fyzikálních, chemických nebo kombinovaných postupů. Cílem je dosáhnout prostředí bez patogenních mikrobů, které by mohly mít negativní vliv na vnímavého jedince (Titěra, 2017). Před vykonáním dezinfekce se nejdříve přistupuje k mechanické očištění (Svoboda, 1968). Na základě nákazové situace dělíme dezinfekci na ochrannou a ohniskovou (průběžnou a závěrečnou) (Titěra *et al.*, 2009).

U dezinfekce starých úlů a rámků se nejprve provede mechanická očista. Seškrábaná hmota se spálí (Svoboda, 1968). Takto připravené úly dezinfikujeme za použití ohně. Kdy stěny z obou stran opálíme do hněda (Veselý *et al.*, 2003). Jelikož oheň nemusí zapůsobit ve všech místech úlu, je vhodné doplnit tento krok o dezinfekci některým chemickým prostředkem (louhy) (Marek, 1978). Mezi nejpoužívanější louhy patří hydroxid sodný nebo draselný. Ve vzniklém zásaditém prostředí spóra vystřelí pólové vlákno a dojde ke ztrátě její infekčnosti (Titěra, 2017). Dezinfekce rámků probíhá stejným způsobem. Také je můžeme vložit na 15 minut do vařící čisté vody (Veselý *et al.*, 2003).

Dezinfekci plástů provádíme pomocí par kyselin a plynů. Mezi používané kyseliny patří kyselina mravenčí, octová, peroxyoctová a siřičitá. Používaným plynem je etylenoxid (Titěra *et al.*, 2009). Další možnost dezinfekce plástů je za použití pětiprocentního roztoku formalinu. Tento přípravek se nechává účinkovat po dobu 24 hodin (Svoboda, 1968). Také můžeme využít slunečního záření při tavení plástů ve slunečním tavidle (Titěra *et al.*, 2009).

Med a zásoby získané ze včelstva se ředí přidáním vody (Titěra, 2017). Takto vzniklou směs povaříme 15 minut (Veselý *et al.*, 2013). Po daném ošetření můžeme směs použít k příkrmu (Peroutka *et Drobníková*, 1987).

K dezinfekci napajedel se používá pětiprocentní roztok louhu nebo formalinu. Poté povrch opláchneme čistou vodou a naplníme (Svoboda, 1968). Dezinfekce náradí se provádí za použití vysokých teplot nebo pomocí komerčně vyráběných přípravků (Titěra, 2017). Při dezinfekci půdy před úly se používá vápenné mléko. U zpevněného prostoru se používá formalin (Svoboda, 1968).

3 Metodika a materiál

3.1 Mikroskopické vyšetření

3.1.1 Materiál

Jednotlivá stanoviště jsou popsána v tabulce 1.

Tabulka 1. Lokality odběru vzorků

Stanoviště	Počet včelstev na stanovišti	Místo	Označení stanoviště
Šindlovy Dvory	5	Zahrada	1
Šindlovy Dvory	8	Les	2
Dobšice	20	Les	3

3.1.2 Odběr vzorků k mikroskopickému vyšetření

Odběr vzorků probíhal v průběhu sezóny roku 2018. První odběr včel se uskutečnil 7.3. 2018 a poslední proběhl 14.11. 2018. V tomto datovém rozmezí proběhlo celkem 13 odběrů na třech různých stanovištích. Na každém stanovišti se vyšetřovala 3 včelstva. Po celou dobu výzkumu byly na každém stanovišti uloženy datalogery, které průběžně zaznamenávaly teplotu a vlhkost. Frekvence záznamu byla nastavena po 60 minutách. Po ukončení sledování se ze získaných hodnot vytvořily denní průměry a následně průměry, které charakterizovaly období mezi jednotlivými odběry. Teplotní i vlhkostní průměry byly rozděleny do tříd za použití Sturgesova pravidla. Při odběru včel se současně hodnotila mírnost na bodové stupnici 1 až 4 (1 velmi mírné, 2 mírné, 3 nervózní, 4 bodavé) a sezení na rámcích na stejné hodnotící škále (1 pevně sedí na plodu, 2 pohyblivé na plodu, 3 přechází na med, 4 opouští rámek) (Veselý *et al.*, 2013).

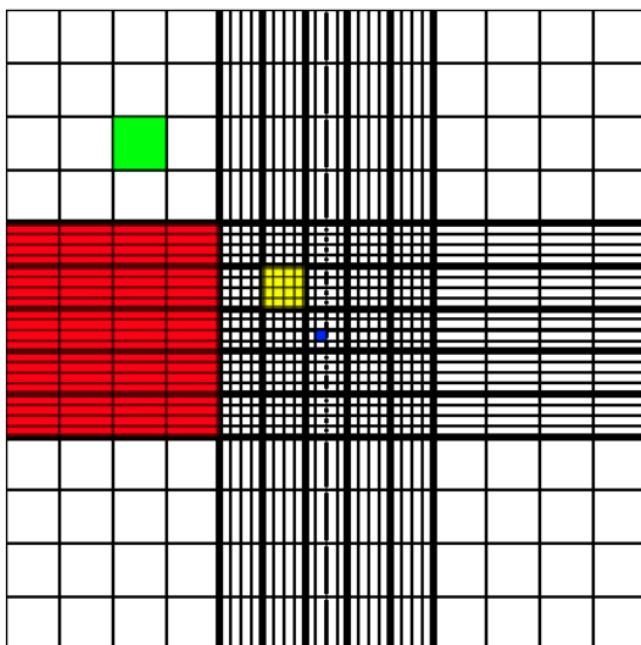
Odchyt včel pro vyšetření probíhal z vrchních louček medných rámků v medníku. Celkem se odchytávalo 20 včel (dělnic) z každého úlu do předem připravených sterilních nádobek s uzavíratelným hrdlem. Takto zajištěné vzorky byly konzervovány v alkoholu do doby vyšetření.

3.1.3 Příprava vzorků a vlastní mikroskopování

Prvním krokem bylo vyjmutí včel z konzervantu. Poté se postupně všem včelám odstříhly zadečky, které se následně rozetřely tloučkem v třecí misce s vodou. Na každý zadeček byl přidán 1 ml vody. Vzniklá směs byla důkladně přefiltrována do nové kádinky. Dalším krokem bylo přenesení potřebného objemu za pomoci melanžeru do Bürkerovy komůrky a následné mikroskopování. Práce probíhala na mikroskopu se zvětšením 400x. Celkem bylo vyhodnoceno 10 malých čtverců o ploše 0,04 mm², hloubce 0,1 mm a o objemu 0,001 mm³. V těchto čtvercích se hledaly spóry *Nosema ceranae* a *Nosema apis*. Po každém vzorku byly veškeré použité pomůcky důkladně očištěny.

3.1.4 Počítání v Bürkerově komůrce

Počítají se spóry v 10 čtverečcích o velikosti 1/25 mm² (Obrázek 2), které se nachází uvnitř čtverečku a dotýkající se levé a horní hrany. Spóry, které se nachází při pravé a dolní lince, se nepočítají. Počet spór na jednu včelu se zjistí vynásobením průměrného počtu spór v jednom čtverečku hodnotou 50 000 (Louda *et al.*, 2001).



Obrázek 2. Pohled na počítací mřížku (Human *et al.*, 2013).

3.2 Vyšetření PCR

3.2.1 Materiál

Jednotlivá stanoviště jsou popsána v tabulce 2.

Tabulka 2. Lokality odběru vzorků

Stanoviště	Počet včelstev na stanovišti	Místo	Označení stanoviště
Štipoklasy	20	Sad	1
Tuchonice	29	Okraj lesa	2
Pořežany	26	Louka (kočovný vůz)	3
Pořežany (Křížek)	30	Okraj lesa	4
Horní Kněžeklady	38	Okraj lesa	5
Štipoklasy (sever)	19	Les	6
Dobšice	20	Les (kočovný vůz)	7
Třítim	37	Louka	8

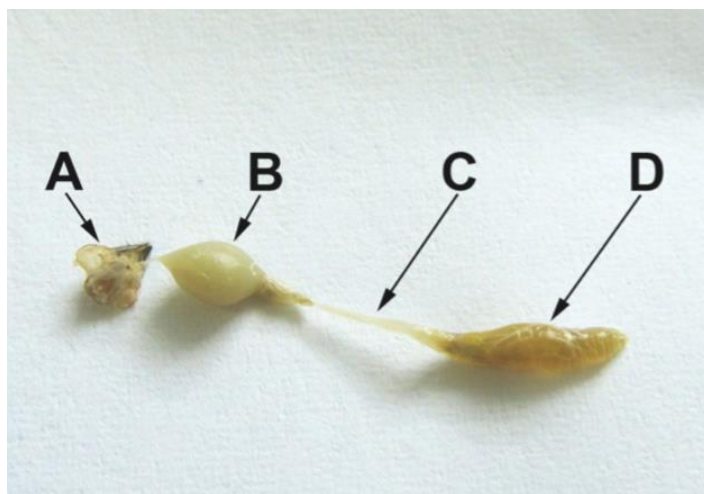
3.2.2 Odběr vzorků k vyšetření PCR

K PCR vyšetření bylo odebráno celkem 40 včelstev z 8 různých stanovišť. Přičemž na každém stanovišti bylo vyšetřeno pět náhodně vybraných včelstev. Odběr včel probíhal zcela totožně jako u předchozího vyšetření. Konzervace byla v tomto případě provedena šokovým zmrazením včel. Odběr proběhl jednorázově poslední týden v říjnu roku 2018.

3.2.3 Příprava vzorků na PCR

Jako první krok bylo vyjmutí včel z mrazicího boxu. Následně byly připraveny mikroskopavky, které byly řádně označeny pořadovým číslem. Dalším úkolem bylo vypreparování zadečku každé z dvaceti dělnic. Vypreparováním se získal žaludek

a střeva (Obrázek 3). Získaný materiál byl vzápětí vložen do mikrozkušavky a začal vlastní proces PCR.



Obrázek 3. Vypreparovaná část trávicího ústrojí včely

Zadní část trávicího ústrojí dělnic: A = žihadlo; B = konečník; C = tenké střevo; a D = *ventriculus* (Fries *et al.*, 2013).

3.2.4 Genotypizace

Izolace DNA

Celková DNA byla extrahována přímo z včelích žaludků a střev pomocí Exgene Stool DNA mini (Gene All Biotechnology) podle následujícího postupu:

1. Vložit vzorky do Safe-Lock-Tube.
2. Přidat 0,5 mm skleněné kuličky a 1 mm zirkonové kuličky a 1 ml Lysis FL pufr.
3. Rozbít pomocí FastPrep[®] - 24 Instrument (MP Bio) 1 minutu při rychlosti 5,5 m/s.
4. Inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě a centrifugovat 5 minutu při 14 000 g.
5. Veškerý supernatant přenést na Ezpass kolonu.
6. Centrifugovat 1 minutu při 14 000 g, vylít odpad ze sběrné zkumavky.
7. Na kolonku napipetovat 100 µl EB pufru, inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě, centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
8. Vyhodit bílou kolonku a napipetovat 500 µl PB pufru do sběrné zkumavky a promíchat pipetováním.

9. Veškerý obsah sběrné zkumavky přenést na mini spin column.
10. Centrifugovat 1 minutu při 14 000 g a vylít odpad ze sběrné zkumavky.
11. Napipetovat 500 µl NW pufru na střed kolony a centrifugovat při 14 000 g.
12. Vylít odpad ze sběrné zkumavky a centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
13. Přenést kolonu na čistou ependorfku.
14. Napipetovat 200 µl EB pufru na kolonu, inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě a centrifugovat 1 minutu při 14 000 g. Získanou DNA skladovat při – 20 °C.

3.2.5 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

V této studii byly použity primery zaměřené na malou podjednotku 16S rRNA genu *N. apis* a *N. ceranae* (Khezri *et al.*, 2018). Součástí každé reakce byla pozitivní a negativní kontrola. Pozitivní kontrola byla použita z DNA, která byla vyizolovaná z pozitivních včel.

Nukleotidové sekvence specifických primerů (Khezri *et al.*, 2018)

Nosema ceranae

Primer - Forward 5'-CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTAA- 3'

Primer - Reverse 5'-CCCGGTCATTCTCAAACAAAAACCG- 3'

Nosema apis

Primer - Forward 5'-GGGGGCATGTCTTTGACGTAAGTATGTA- 3'

Primer - Reverse 5'-GGGGGGCGTTTAAAATGTGAAACAAGTATG- 3'

Objemy použité v reakční směsi jsou vypsány v tabulce 3.

Tabulka 3. Reakční směs pro PCR

Reagencie	Množství
AccuPower® Taq PreMix (Bioneer, Jižní korea)	
Taq DNA polymeráza	1 U
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	250 µM (každý)
reakční pufr (s 1,5mM MgCl ₂)	1x
Deionizovaná H ₂ O (Top-Bio, ČR)	17,0 µl
Primer 5' (10 µM, Generi Biotech, ČR)	0,5 µl
Primer 3' (10 µM, Generi Biotech, ČR)	0,5 µl
DNA	2,0 µl
Celkový objem	20,0 µl

Při PCR byl použit amplifikační program. Postup od denaturace po finální extenzi se odehrával v 35 cyklech.

Amplifikační program pro termocycler je popsán v tabulce 4.

Tabulka 4. Amplifikační program pro termocycler

KROK	TEPLOTA (°C)	ČAS
Počáteční denaturace	94	3 min.
Denaturace	94	45 sec.
Nasedání primerů	62	45 sec.
Dosyntetizování nového řetězce	72	60 sec.
Finální extenze	72	7 min.

3.2.6 Gelová elektroforéza

Velikost PCR fragmentů byla vyhodnocována pomocí gelové elektroforézy. Na 1% agarózovém gelu s přidavkem ethidium-bromidu byl zachycen výsledný produkt PCR a posléze vizualizován pomocí UV transiluminátoru (302 nm).

Chemikálie:

1. TAE pufr (242 g tris báze; 57,1 ml ledové kyseliny octové; 100 ml 0,5 M EDTA pH 8, 00)
2. 100 bp DNA Ladder (O'Gene Ruler™, Biogen, ČR)
3. ethidium-bromid (Sigma-Aldrich, ČR)
4. agaróza (Biotech, ČR)

Postup:

1. Smíchat agarózu s TAE pufrem (pro 1% gel smíchat 0,4 g agarózy se 40 ml TAE pufru; pro získání 2% gelu smíchat 0,8 g agarózy se 40 ml TAE pufru).
2. Rozpustit agarózu v mikrovlnné troubě a za použití studené tekoucí vody zchladit na teplotu 50 °C.
3. Přidat 3 µl ethidium-bromidu a důkladně promíchat.
4. Do předem připravené formy nalít vychlazený gel, vložit hřeben a nechat samovolně ztuhnout.
5. Formu s gelem vložit do elektroforetické vany s TAE pufrem.
6. Do jamek vytvořených hřebem nanést 10 µl ladderu a 20 µl PCR produktů.
7. Nastavit napětí na 90 V a vyvíjet po dobu potřebnou pro separaci fragmentů (přibližně 60 minut).
8. Za použití UV transiluminátoru vizualizovat fragmenty DNA.

3.2.7 Extrakce DNA z gelu (Gen Elute Sigma)

1. Vyříznout fragment DNA z gelu čistým skalpelem a přenést ho do sterilní 1,5 ml mikrozkušavky.
2. Do ependorfky s fragmentem DNA z gelu připipetovat 500 µl Gel Solubilization Solution.

3. Inkubovat 10 minut při teplotě 50 °C v termobloku, za pravidelného míchání každé 2–3 minuty během inkubace.
4. Předehřát pcr vodu na 65 °C
5. Sestavit Binding Column G, napipetovat 500 µl Column Preparation Solution a centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
6. Ke vzorku připipetovat 150 µl isopropanolu a promíchat.
7. Přepipetovat vškerý objem na kolonu a centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
8. Vylít odpad ze sběrné zkumavky, připipetovat 700 µl Wash Solution G, centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
9. Vylít odpad ze sběrné zkumavky a opět centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
10. Otočit zkumavku v centrifuze o 180° a znovu centrifugovat 3 minuty při 14 000 g.
11. Kolonu dát do nové ependorfky, provést eluci napipetováním 30 µl pcr vody předehřáté na 65 °C, inkubovat 1 minutu a centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
12. Získanou DNA skladovat při – 20 °C.

3.2.8 Sekvenace

Vybrané PCR produkty byly sekvenovány za použití příslušných primerů. K přípravě vzorků k sekvenaci se použil ABI BigDye® Terminator v 3.1. Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a ABI3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem).

3.3 Vyhodnocení dat

Ke zpracování dat bylo využito programů Microsoft Office 365 ProPlus (Microsoft Word a Microsoft Excel) a statistického programu Statistica 12 StatSoft® (Anova, Tukeyův HSD test, Spearmanovy korelace, Chí-kvadrát test, 2x2 tabulka a Kruskal-Wallisův test). K rozložení dat do tříd u zjištěných teplotních a vlhkostních hodnot se využilo Sturgesova pravidla.

4 Výsledky

4.1 Mikroskopie

Cílem diplomové práce je sledovat výskyt a promořenost vybraných včelstev *Nosemou spp.* v návaznosti na klimatické podmínky a zjištění míry závislosti mezi rozvojem *N. apis*, *N. ceranae*, klimatickými podmínkami a stavem včelstva.

Míra závislosti jednotlivých kritérií získaných v rámci stanovišť byla vyhodnocena pomocí statistické metody (Neparametrické statistiky → Spearmanovy korelace) a následně byly vyhodnoceny jednotlivé vztahy mezi sebou. Tento test byl zvolen pro zjištění závislostí, protože data neměla normální rozdělení, tedy nesplňovala podmínky pro použití Pearsonova korelačního koeficientu. Nulová hypotéza (H_0) je, že mezi sledovanými proměnnými neexistuje lineární závislost. Červeně označené hodnoty jsou korelační koeficienty pro $p < 0,05$ (H_0 zamítnuta ve prospěch alternativní). Závislost byla prokázána.

U stanoviště 1 je patrná mírná záporná korelace počtu spór s vlhkostní třídou, počtem nástavků a počtem rámků (Tabulka 5). Na stanovišti 2 se projevuje význačná záporná závislost teplotní třídy, počtu nástavků a záporná velká závislost počtu rámků s počtem spór (Tabulka 6). Pro stanoviště 3 je charakteristický význačný signifikantně negativní vztah vlhkostní a teplotní třídy. Mírnost je v mírném záporném vztahu k počtu spór (Tabulka 7). Z výsledků vyplývá, že pouze na jednom stanovišti (stanoviště 2) se korelační závislost teplotní třídy a počtu spór projevila signifikantně (korelace negativní, $r_s = -0,56$). Také signifikantně negativní korelace vlhkostní třídy s počtem spór byla na stanovišti 1 ($r_s = -0,38$). Je zajímavé, že u těchto dvou stanovišť na zvolené hladině významnosti byla prokázána závislost počtu spór i s počtem rámků (respektive s počtem nástavků), ale v mírném (stanoviště 1) až středním (stanoviště 2) stupni závislosti Spearmanovy korelace.

Tabulka 5. Korelační vazby jednotlivých proměných na stanovišti 1

Proměnná	Spearmanovy korelace ChD vynechány párově Označ. korelace jsou významné na hl. p <,05000						
	počet spor	teplotní třída	vlhkostní třída	počet nástavků	počet rámků	Mírnost	Sezení
počet spor	1,00	0,06	-0,38	-0,41	-0,40	-0,21	-0,13
teplotní třída	0,06	1,00	-0,65	0,57	0,70	-0,05	-0,01
vlhkostní třída	-0,38	-0,65	1,00	-0,38	-0,45	0,08	-0,08
počet nástavků	-0,41	0,57	-0,38	1,00	0,92	-0,02	-0,05
počet rámků	-0,40	0,70	-0,45	0,92	1,00	0,00	-0,02
Mírnost	-0,21	-0,05	0,08	-0,02	0,00	1,00	0,45
Sezení	-0,13	-0,01	-0,08	-0,05	-0,02	0,45	1,00

Tabulka 6. Korelační vazby jednotlivých proměných na stanovišti 2

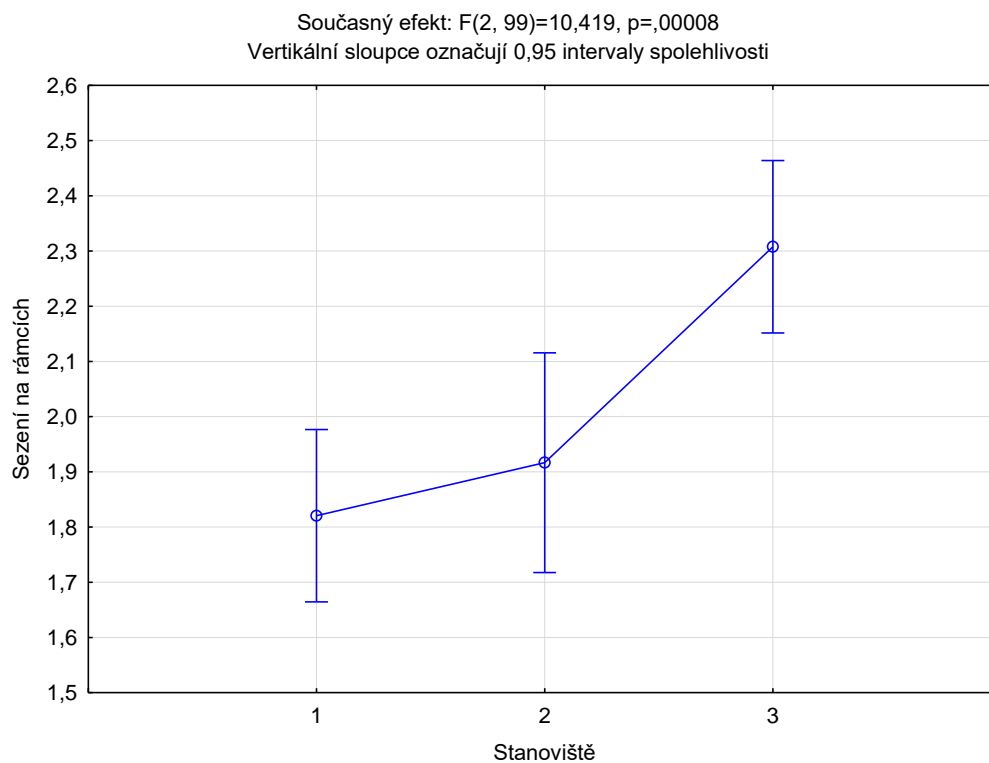
Proměnná	Spearmanovy korelace ChD vynechány párově Označ. korelace jsou významné na hl. p <,05000						
	počet spor	teplotní třída	vlhkostní třída	počet nástavků	počet rámků	Mírnost	Sezení
počet spor	1,00	-0,56	-0,32	-0,68	-0,72	-0,08	0,25
teplotní třída	-0,56	1,00	0,30	-0,11	0,09	0,10	-0,33
vlhkostní třída	-0,32	0,30	1,00	0,51	0,46	0,28	-0,13
počet nástavků	-0,68	-0,11	0,51	1,00	0,93	0,42	0,11
počet rámků	-0,72	0,09	0,46	0,93	1,00	0,51	0,14
Mírnost	-0,08	0,10	0,28	0,42	0,51	1,00	0,47
Sezení	0,25	-0,33	-0,13	0,11	0,14	0,47	1,00

Tabulka 7. Korelační vazby jednotlivých proměných na stanovišti 3

Proměnná	Spearmanovy korelace ChD vynechány párově Označ. korelace jsou významné na hl. $p < ,05000$						
	počet spor	teplotní třída	vlhkostní třída	počet nástavků	počet rámků	Mírnost	Sezení
počet spor	1,00	0,22	-0,25	-0,19	-0,20	-0,32	0,05
teplotní třída	0,22	1,00	-0,54	0,31	0,63	0,55	0,44
vlhkostní třída	-0,25	-0,54	1,00	-0,10	-0,29	-0,25	-0,49
počet nástavků	-0,19	0,31	-0,10	1,00	0,92	0,28	0,41
počet rámků	-0,20	0,63	-0,29	0,92	1,00	0,43	0,46
Mírnost	-0,32	0,55	-0,25	0,28	0,43	1,00	0,45
Sezení	0,05	0,44	-0,49	0,41	0,46	0,45	1,00

Pomocí Anovy byly při porovnání stanovišť zjištěny rozdíly u vlhkostní třídy a u sezení na plástech. Nulová hypotéza (H_0) nám říká, že se stanoviště neliší. Jelikož p -hodnota je $< 0,05$ zamítáme H_0 ve prospěch alternativní (H_1). Rozdíl je průkazný na hladině významnosti $\alpha=0,05$. Následné mnohonásobné porovnání pomocí Tukeyova HSD testu pro nestejná N prokázalo, že se průkazně liší stanoviště 3 od ostatních. Ostatní kritéria musela být porovnána K-W testem, protože nebyly splněny předpoklady pro použití Anovy. K-W testem nebyly zaznamenány žádné další rozdíly mezi stanovišti.

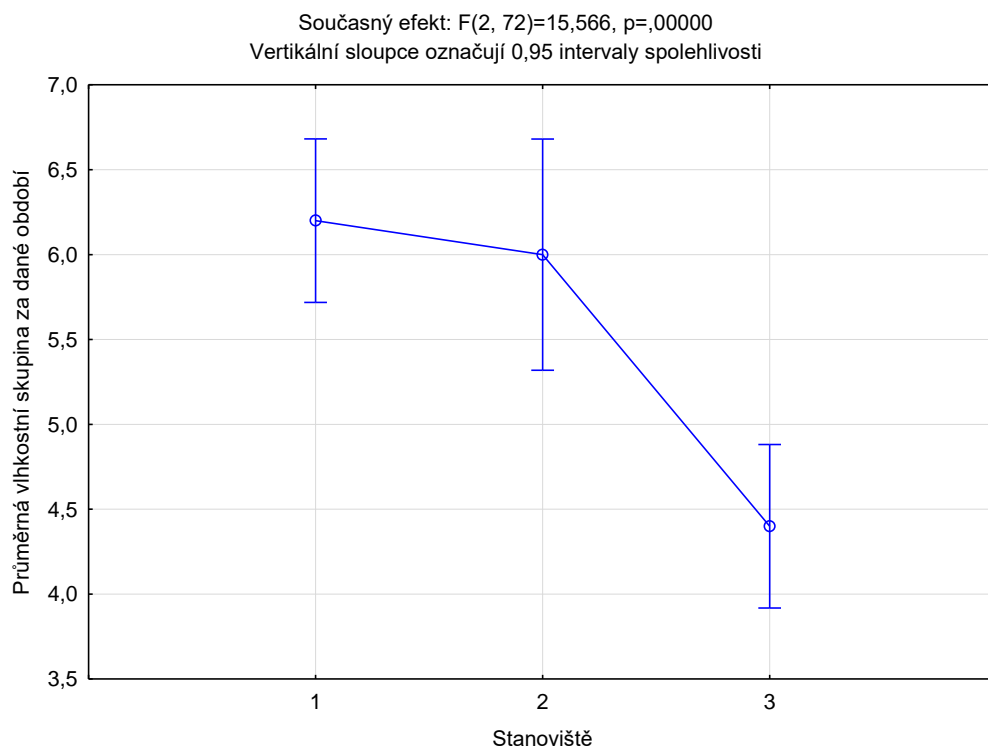
Průkazné rozdíly zaznamenané u kritéria sezení na plástech jsou vyznačeny na obrázku 4. V průměrných hodnotách u sezení na plástech se liší stanoviště 1 (průměrná hodnota 1,82 bodu) o 0,49 bodu a stanoviště 2 (průměrná hodnota 1,92 bodu) o 0,39 bodu od stanoviště 3, kde je průměrná hodnota 2,31 bodu.



Obrázek 4. Kritérium sezení včel na jednotlivých stanovištích

Obrázek znázorňuje rozdíly v rámci stanovišť u hodnocení sezení včel na rámcích. Průměrná hodnota ze všech stanovišť byla 2,03. Maximum je 3 a minimum je 1. P hodnota vyšla menší než 0,001.

U vlhkostních tříd je průměr za všechny stanoviště 5,44. Minimální zaznamenaná třída byla 2 a maximální byla třída 9. Stanoviště 1 charakterizuje průměrná třída 6,2. Na stanovišti 2 je průměrná třída 6,0 a na posledním stanovišti 4,4 (Obrázek 5).



Obrázek 5. Průměrná vlhkost na jednotlivých stanovištích

Počty zaznamenaných spór na jednu včelu během jednotlivých odběrů jsou zaznamenané v tabulce 8 až 10.

Tabulka 8. Počet spór přepočtený na 1 včelu pro stanoviště 1

Pořadí odběru	Včelstvo 1	Včelstvo 2	Včelstvo 3
1.	225000	760000	230000
2.	310000	450000	220000
3.	65000	100000	40000
4.	30000	45000	25000
5.	25000	50000	15000
6.	10000	20000	5000
7.	10000	25000	0
8.	0	0	0
9.	0	5000	10000
10.	0	0	0
11.	0	5000	0
12.	0	0	0
13.	10000	10000	0

Tabulka 9. Počet spór přepočtený na 1 včelu pro stanoviště 2

Pořadí odběru	Včelstvo 1	Včelstvo 2	Včelstvo 3
1.	890000	345000	300000
2.	170000	180000	335000
3.	175000	295000	105000
4.	40000	25000	20000
5.	20000	10000	10000
6.	10000	0	0
7.	5000	5000	0
8.	5000	0	5000
9.	-	-	-
10.	-	-	-
11.	-	-	-
12.	-	-	-
13.	-	-	-

Na tomto stanovišti došlo před 9. odběrem ke ztrátě včelstev.

Tabulka 10. Počet spór přepočtený na 1 včelu pro stanoviště 3

Pořadí odběru	Včelstvo 1	Včelstvo 2	Včelstvo 3
1.	405000	180000	520000
2.	360000	145000	280000
3.	95000	50000	160000
4.	30000	15000	50000
5.	10000	20000	5000
6.	10000	10000	20000
7.	0	5000	20000
8.	10000	5000	0
9.	0	5000	0
10.	0	0	5000
11.	5000	0	0
12.	0	0	0
13.	10000	0	5000

Na všech třech stanovištích je patrný klesající počet spór v průběhu roku.

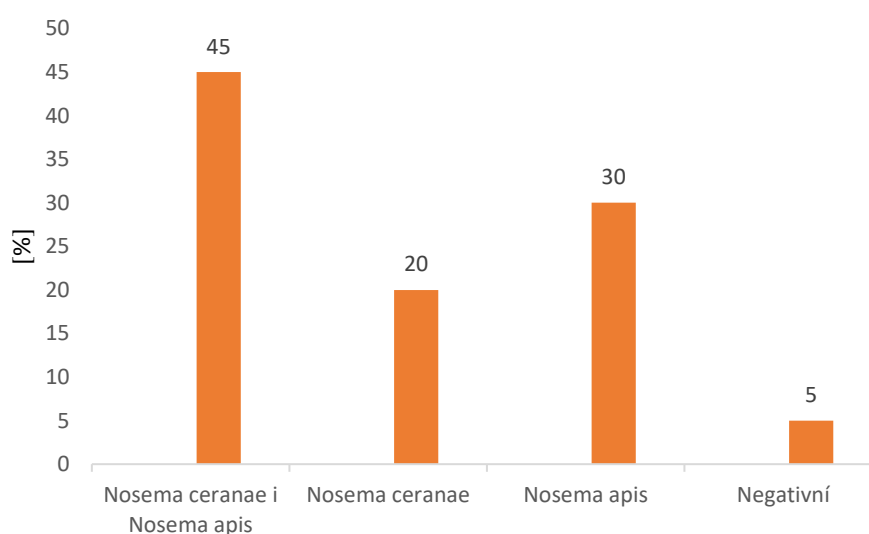
Průměrné vlhkostní a teplotní hodnoty z jednotlivých stanovišť jsou uvedeny v tabulce 11.

Tabulka 11. Průměrné hodnoty za sledované období na jednotlivých stanovištích

	Stanoviště 1	Stanoviště 2	Stanoviště 3
Průměrná teplota (°C)	17,8	18,64	18,31
Průměrná vlhkost (%)	72,4	71,89	64,52

4.2 PCR

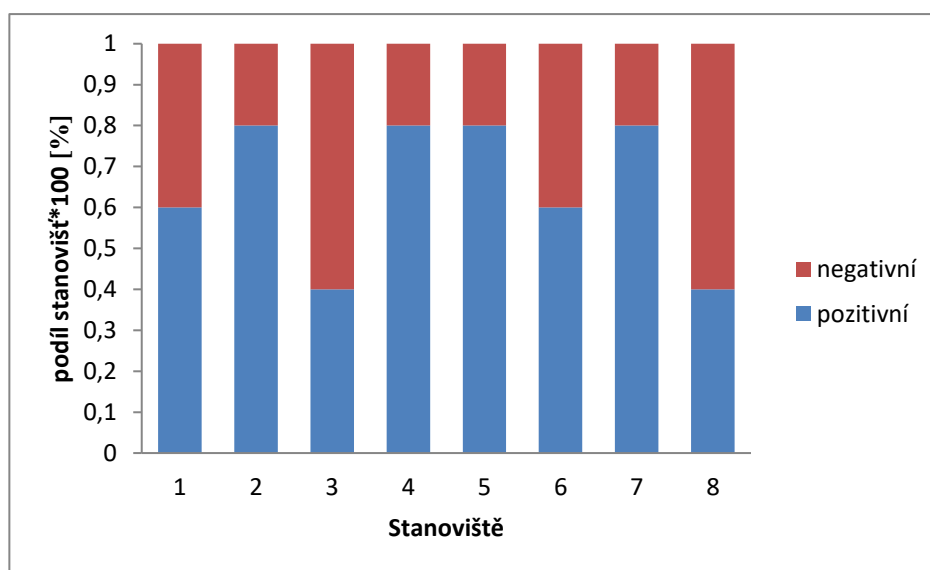
Vyšetřením 40 vzorků z 8 různých stanovišť v Jihočeském kraji bylo zjištěno, že *Nosema apis* se vyskytuje jako samostatná infekce u 30 % včelstev. Zamořenost způsobená pouze původcem *Nosema ceranae* dosahuje 20 %. Smíšená infekce je na úrovni 45 %. Tudíž *N. apis* se vyskytuje u 75 % včelstev a druhý z původců je zaznamenáván ve výši 65 %. Pouze u 5 % včelstev není přítomen ani jeden z patogenů (Obrázek 6).



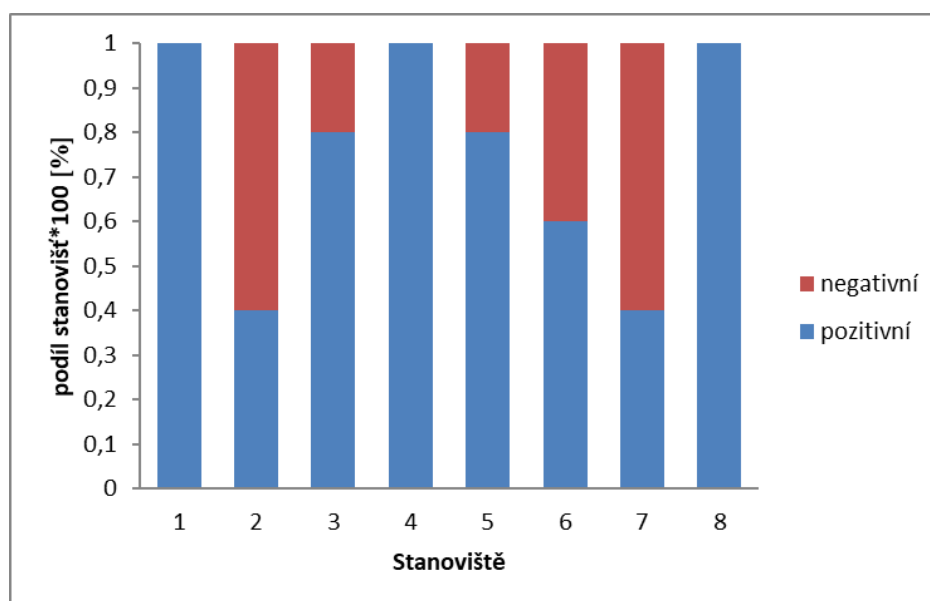
Obrázek 6. Zastoupení *Nosema spp.* v chovech

Pro ověření, zda je rozdíl v poměru mezi pozitivními a negativními včelstvy na stanovištích 1 až 8 byl použit Chí-kvadrát test. U *Nosema ceranae* na hladině spolehlivosti $\alpha=0,05$ nezamítáme hypotézu H_0 (Chí-kvadrát=4,83517, sv=7, $p=,680071$, p hodnota je větší než 0,05), to nám říká, že není rozdíl mezi jednotlivými stanovišti. Avšak stanoviště Tuchonice, Pořežany (Křížek), Horní Kněžeklady a Dobšice se vyznačují nejvýraznějším rozdílem mezi pozitivními a negativními

včelstvy. Ostatní stanoviště mají vyrovnaný poměr v přítomnosti a nepřítomnosti původce (Obrázek 7). Při porovnání výsledků u *Nosema apis* také došlo k nezamítnutí hypotézy H_0 (Chí-kvadrát= 12,2667, sv=7, $p=,092123$) na hladině spolehlivosti $\alpha=0,05$. Nicméně výsledná p hodnota byla větší než 0,05 a současně menší než 0,1. Tyto hodnoty naznačují, že daná stanoviště mají tendenci se mezi sebou lišit. Značný podíl pozitivních včelstev byl na stanovišti Štipoklasy, Pořežany, Pořežany (Křížek), Horní Kněžeklady a Třitim. Tuchonice a Dobšice jsou stanoviště s menším podílem pozitivních včelstev (Obrázek 8).



Obrázek 7. Zastoupení včelstev pozitivních na *N. ceranae* a negativních včelstev



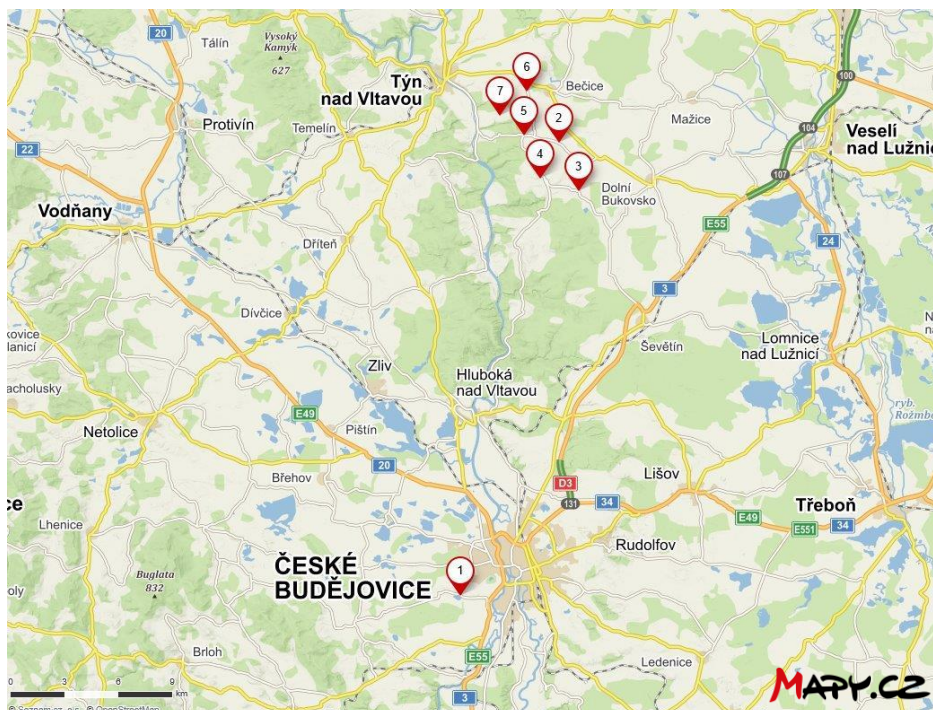
Obrázek 8. Zastoupení včelstev pozitivních na *N. apis* a negativních včelstev

Pro zjištění vzájemné závislosti výskytu mezi *Nosema spp.* byl použit neparametrický test (2x2 tabulka). Dle výsledku *p*-hodnoty (0,25), která je větší než 0,05 nezamítáme H_0 . U výskytu *N. apis* a *N. ceranae* nedochází ke vzájemnému ovlivňování (Tabulka 12).

Tabulka 12. Vzájemný vliv *Nosema spp.* na výskyt

	Tabulka 2x2		Řádek (celkem)
	<i>Nosema ceranae</i> (pozitivní)	<i>Nosema ceranae</i> (negativní)	
<i>Nosema apis</i> (pozitivní)	18	12	30
Procent z celku	45 %	30 %	75 %
<i>Nosema apis</i> (negativní)	8	2	10
Procent z celku	20 %	5 %	25 %
Sloupec celkem	26	14	40
Procent z celku	65 %	35 %	
Chi-kvadrát (sv=1)	1,32	p= ,2508	

Jednotlivá stanoviště, na kterých proběhly odběry včel, jsou vyznačena na obrázku 9.



Obrázek 9. Stanoviště odběru včel: Šindlový Dvory (1), Štípkovské (2), Tuchonice (3), Pořežany (4), Horní Kněžeklady (5), Dobšice (6), Třítim (7)

Zdroj: Mapy.cz, 2019 (upraveno).

5 Diskuze

5.1 Mikroskopování

Během mikroskopického vyšetřování včel, které začalo na jaře roku 2018 a skončilo na podzim téhož roku bylo zjištěno, že na začátku výzkumu se ve včelách nacházel vysoký počet spór. S počtem odběrů se počet spór následně snižoval. Toto zjištění potvrzují i výsledky, jenž uvádí Traver *et al.* (2012). Výsledky, které zaznamenali, popisují rozdíly v úrovni infekce kolonií v různých obdobích roku. Nejvyšší hodnoty byly zaznamenány v průběhu jara a nejnižší na podzim (Traver *et al.*, 2012). I Botías *et al.* (2012a) uvádějí, že výsledek analyzování dílčích vzorků může být velice ovlivněn měsícem odběru.

Při porovnávání vlivů na stanovištích se zjistilo několik korelačních vztahů, ať v kladném či záporném směru, v různých stupních závislosti. Korelační vazba vlhkosti mimo úly a počtu spór na pozorovaných stanovištích demonstruje mírný stupeň závislosti, nicméně vztah není signifikantní, vyjma jednoho stanoviště (stanoviště 1). Zde byla prokázána statisticky významná korelační závislost na zvolené hladině významnosti ($\alpha = 0,05$). Eouzan *et al.* (2019) píše, že výkyvy ve vlhkosti probíhající ve vnějším prostředí nemají žádný nebo zcela zanedbatelný vliv na regulaci vlhkosti uvnitř včelstva. Mírné rozdíly by mohly nastat v jarním období, kdy dochází ke zvýšené aktivitě uvnitř včelstva (Eouzan *et al.*, 2019). Z tohoto důvodu lze souhlasit s Eouzanem *et al.* (2019), že probíhá regulace vlhkosti uvnitř úlu bez vlivu vlhkosti mimo úl.

Během hodnocení vlivu venkovní teploty a množství spór na sledovaných stanovištích se souvislost projevila výhradně na stanovišti číslo 2 (statisticky významná záporná korelace, $p < 0,05$). Retschnig *et al.* (2017) se také zabývali vlivem venkovní teploty na vývoj noseμόzy. Jejich úkolem bylo zhodnotit jaký je podíl dnů s nízkou teplotou (pod 10 °C) umožňující prolet včelám. Výsledky ukázaly negativní korelaci poměru dnů umožňující prolet a množstvím spór. Zjištění naznačuje pozitivní vliv nízkých teplot na intenzitu a rozvoj nemoci, jelikož včely mají sníženou možnost proletu spojenou s defekací (Retschnig *et al.*, 2017). Toto zjištění částečně potvrzuje i výsledek této práce (zejména na stanovišti 2), protože během prvních odběrů byla zjištěná intenzita spór přepočítaná na jednu včelu na nejvyšší úrovni z celého období odběru. V případě celoročního zaznamenávání teploty

a současného vyhodnocování počtu spór, lze předpokládat, že by byla prokázána signifikantní korelace i u zbývajících stanovišť. Je však pravděpodobné, že by se nacházela v jiném stupni korelační závislosti.

Z dalšího vyhodnocení korelačních vztahů se zjistilo, že počet nástavků, který je doprovázen počtem rámků, má signifikantní význam pro počet spór. Na stanovišti 1 a 2 byla zaznamenána záporná korelace vázaná na počet spór. Se vzrůstající průměrnou denní teplotou dochází k postupnému zvyšování počtu včel v úle. Včelař musí na tento stav reagovat navyšováním počtu rámků i nástavků, aby umožnil dostatečný prostor pro všechny jedince ve včelstvu včetně plodu i zásob. Navýšením počtu včel v úle během včelařské sezóny, doprovázené o zvýšenou možnost defekace včel mimo úl, dochází k zaznamenání původce v nižších hodnotách, což potvrzuje zjištěná korelace (stanoviště 2, $r_s = -0,56$).

U mírnosti včel se pouze na stanovišti 3 podařilo prokázat signifikantní korelaci s množstvím spór. Vzájemný vztah byl v mírné záporné korelaci. Další sledované kritérium bylo sezení na rámcích, u kterého byl zkoumán stejný vztah ke spórám. Ze statistických výsledků vyplývá, že ani na jednom ze stanovišť se neprojevila žádná korelace. Na vlivu sezení na rámcích a mírnosti včel se podílí individualita každého včelstva. Podle Veselého *et al.* (2003) mají na vliv chování feromony, které se tvoří ve specifických žlázách. Například poplašné feromony mají za úkol vyvolání agresivity a útočnosti. Během několika málo sekund dochází k hromadné reakci všech včel. Shromažďovací feromony a feromony včelího plodu jsou například hlavním důvodem soudržnosti včel (Veselý *et al.*, 2003). Mírnost včel a pud sezení na rámcích se z tohoto důvodu spíše odvíjí dle vlastností každého včelstva než na okolnostech spojených s nosemovou nákazou.

Při vzájemném porovnání stanovišť byl zjištěn rozdíl v kritériu sezení na rámcích. Od průměrné hodnoty 1,82 (stanoviště 1) a hodnoty 1,92 (stanoviště 2) se liší stanoviště 3 se svou hodnotou 2,31. Odlišný stav na posledním stanovišti může být opět způsoben feromony včelstev, nikoliv nemocí. Také se liší ve vlhkostní třídě. Stanoviště 1 má průměrnou hodnotu 6,2. Na stanovišti 2 se průměrná hodnota drží na 6,0 a poslední stanoviště je charakterizováno průměrnou třídou 4,4. Rozdílná hodnota na posledním stanovišti může být způsobena tím, že včelstva na tomto stanovišti jsou ve včelařském voze a dataloger byl také uložen vně tohoto vozu.

5.2 PCR

Na 8 stanovištích v Jihočeském kraji byla zkoumána přítomnost *N. ceranae*, *N. apis* a smíšená infekce. Z výsledků vyplývá vyšší počet vzorků s pozitivním nálezem *N. apis* a to ve výši 75 %. O 10 % méně vzorků je napadeno původcem *N. ceranae*. Smíšená infekce byla prokázána u 45 % včelstev. Napadení včelstev pouze *N. apis* je na úrovni 30 %. A samostatný výskyt *N. ceranae* je u 20 % vzorků. Pouze u 5 % včelstev nedošlo k pozitivnímu nálezu ani jednoho z původců. V Kanadě byly také vyšetřovány vzorky včel použitím PCR. Cílem bylo zjistit, zda je možný výskyt obou druhů současně. Výsledkem bylo nalezení spór u 86,5 % vzorků. *N. apis* se vyskytovala u 18,9 %, *N. ceranae* u 48,6 % a smíšený stav se projevil na úrovni 18,9 % ze všech pozorovaných včelstev (Burgher-Maclellan *et al.*, 2010). Ve Švédsku proběhl na jaře roku 2007 výzkum, při kterém bylo odebráno 967 vzorků od 521 včelařů. Po PCR vyšetření byla zjištěna jasná převaha *N. apis* (Forsgren *et Fries*, 2013). V České republice byl také proveden pokus pro zjištění intenzity pozitivních včelstev. Kamler *et al.* (2011) uvádí další odlišné hodnoty. Ze 4010 odebraných vzorků bylo 2167 pozitivních (54 %). *N. apis* byla zaznamenána v 16,9 %, *N. ceranae* v 28,3 % a smíšená infekce ve včelstvech byla pozorována u 8,9 % vzorků (Kamler *et al.*, 2011).

Z výše zmíněných záznamů vychází, že jsou rozdíly v zastoupení jednotlivých původců v rámci let i v rámci stanovišť. V porovnání s výsledky na území České republiky se tato práce liší v procentu pozitivních vzorků celkem o 40 %. Rozdíl v zastoupení samostatné infekce v porovnání s prací je u *N. apis* přibližně o 13 % vyšší, ale u *N. ceranae* je nález nižší o 8 %. Následně však došlo k nárůstu u smíšené infekce o 36 %. V porovnání se Švédskem se na našem území vyskytuje *N. ceranae* poměrně v hojném stavu. S výsledky z Kanady je míra infekce vyšší o necelých 9 %.

Při zhodnocení *N. ceranae* mezi stanovišti nic nenasvědčuje tomu, že by měl existovat nějaký rozdíl ve výskytu v rámci stanovišť. Tudiž nedošlo k prokázání vlivu stanoviště na přítomnost původce. Avšak pro stanoviště Tuchonice, Pořežany (Křížek), Horní Kněžeklady a Dobšice je charakteristický nepoměr v počtu pozitivních a negativních včelstev. Ostatní stanoviště mají vyrovnaný poměr v přítomnosti a nepřítomnosti původce. U *N. apis* je tomu jinak. Z výsledků vyplývá odlišný stav napadnutelnosti mezi stanovišti. Například na stanovišti Štipoklasy,

Pořežany (Křížek) a Třítim jsou všechna vyšetřovaná včelstva pozitivní. Tuchonice a Dobšice jsou stanoviště s menším podílem pozitivních včelstev.

Vzájemné porovnání výskytu *N. apis* a *N. ceranae* u daných včelstev naznačuje, že se daní původci navzájem neovlivňují. Patrná je i 45% pravděpodobnost výskytu obou dvou původců v jednom včelstvu. Například vyšetřením včel ve Švédsku se došlo k závěru, že nedochází k jevu, který by naznačoval nahrazování jednoho původce za druhý (Forsgren *et* Fries, 2013). Zde totiž zůstává i nadále dominantní *N. apis* bez zjevné tendence nahrazení druhým původcem nosemové nákazy (Forsgren *et* Fries, 2013). Stejného názoru o nenahrazování jednoho původce za druhý jsou i Gisder *et al.* (2017).

6 Závěr

Pomocí příslušných metod byla ve vzorcích detekována *N. ceranae* i *N. apis*.

Při mikroskopickém vyšetření, které probíhalo od jara do podzimu roku 2018, se projevila klesající intenzita počtu spór v průběhu roku. Největší míra napadení včel probíhala na začátku roku. Na jednu včelu se počet spór v této části výzkumu pohyboval od 150 000 do 750 000. Od šestého odběru, jenž proběhl 20.6.2018 se začaly vyskytovat vzorky bez nálezu spór. Při vyhodnocování vlivů na stanovištích se zjistily korelační vztahy v kladném i záporném směru různé intenzity. U vlhkosti se podařilo prokázat korelaci pouze u jednoho stanoviště. Z uvedeného důvodu toto kritérium není směrodatné při rozvoji nosemové nákazy. U venkovní teploty byla korelace prokázána také jen u jednoho stanoviště. Vliv na rozvoj původce je stejný jako u předchozího kritéria. Počet nástavků a počet rámků se projevoval na dvou stanovištích v záporné korelaci k počtu spór, tj. odpovídá rozvoji včelstva a snižujícímu se počtu spór. Vazba mírnosti včel a počtu spór byla detekována na základě korelační analýzy pouze u jednoho stanoviště, zatímco vazba pudu sezení na rámcích a počtu spór nebyla vůbec detekována. Podle mírnosti a pudu sezení na plástech nelze usuzovat o propojení s nosemovou nákazou, neboť se jedná o vlivy, které jsou hlavně ovlivňovány feromony každého včelstva. Při porovnání stanovišť byly zjištěny rozdíly u vlhkostních tříd a v sezení na rámcích. Tato zjištění nejspíš nemají žádnou spojitost s nákazou.

Z PCR vyšetření vychází, že u chovatelů, od kterých byly vzorky odebrány, se pohybuje procento pozitivních včelstev na úrovni 95 %. Uvedené procentické zastoupení je vyšší, než uvádí literatura popisující stav v České republice. Byly zaznamenány samostatné infekce i výskyt obou původců současně. *N. ceranae* byla prokázána u 65 % včelstev. Na jednotlivých stanovištích se počet pozitivních případů pohyboval v rozmezí 2 až 4 nálezů z 5 vyšetřovaných včelstev. Při hodnocení výskytu *N. apis* se zjistilo, že je přítomna u 75 % včelstev. Na stanovištích Štipoklasy, Pořežany (Křížek) a Třitim se zjistil výskyt původce dokonce na všech vyšetřovaných včelstvech. V Tuchonicích a Dobšicích jsou 2 včelstva pozitivní a 3 negativní na *N. apis*. Při porovnání výskytu obou původců na vyšetřovaných stanovištích se zjistilo, že *N. apis* ani *N. ceranae* nemají tendenci vedoucí ke vzájemnému nahrazování.

Ve sledovaných včelstvech se může vyskytovat pouze jeden z původců (*N. apis*, *N. ceranae*) nebo mohou být evidováni oba původci současně nebo lze evidovat i včelstva nosemové nákazy prostá.

Z výsledků práce je zřejmé dosažení stanoveného cíle, přesto pro objektivizaci výsledků doporučuji získání většího rozsahu dat z pozorovaných ukazatelů a zajištění opakování provedených analýz (včetně PCR), aby byly veškeré vazby zcela evidentní.

Seznam tabulek

Tabulka 1. Lokality odběru vzorků.....	26
Tabulka 2. Lokality odběru vzorků.....	28
Tabulka 3. Reakční směs pro PCR	31
Tabulka 4. Amplifikační program pro termocycler	31
Tabulka 5. Korelační vazby jednotlivých proměných na stanovišti 1	35
Tabulka 6. Korelační vazby jednotlivých proměných na stanovišti 2.....	35
Tabulka 7. Korelační vazby jednotlivých proměných na stanovišti 3	36
Tabulka 8. Počet spór přepočtený na 1 včelu pro stanoviště 1	38
Tabulka 9. Počet spór přepočtený na 1 včelu pro stanoviště 2.....	39
Tabulka 10. Počet spór přepočtený na 1 včelu pro stanoviště 3	39
Tabulka 11. Průměrné hodnoty za sledované období na jednotlivých stanovištích .	40
Tabulka 12. Vzájemný vliv <i>Nosema spp.</i> na výskyt.....	42

Seznam obrázků

Obrázek 1. Vývojový cyklus <i>N. ceranae</i>	19
Obrázek 2. Pohled na počítací mřížku	27
Obrázek 3. Vypreparovaná část trávicího ústrojí včely.....	29
Obrázek 4. Kritérium sezení včel na jednotlivých stanovištích.....	37
Obrázek 5. Průměrná vlhkost na jednotlivých stanovištích.....	38
Obrázek 6. Zastoupení <i>Nosema spp.</i> v chovech	40
Obrázek 7. Zastoupení včelstev pozitivních na <i>N. ceranae</i> a negativních včelstev .	41
Obrázek 8. Zastoupení včelstev pozitivních na <i>N. apis</i> a negativních včelstev	41
Obrázek 9. Stanoviště odběru včel: Šindlovy Dvory (1), Štipoklasy (2), Tuchonice (3), Pořežany (4), Horní Kněžeklady (5), Dobšice (6), Třitim (7).....	42

7 Bibliografické citace

Alaux, Cédric, Morgane Folschweiller, Cynthia McDonnell, Dominique Beslay, Marianne Cousin, Claudia Dussaubat, Jean-Luc Brunet a Yves Le Conte. Pathological effects of the microsporidium *Nosema ceranae* on honey bee queen physiology (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* [online]. 2011, **106**(3), 380-385 [cit. 2019-03-01]. DOI: 10.1016/j.jip.2010.12.005. ISSN 00222011.

Aronstein, K.A., T.C. Webster a E. Saldivar. A serological method for detection of *Nosema ceranae*. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2013, **114**(3), 621-625 [cit. 2019-02-14]. DOI: 10.1111/jam.12066. ISSN 13645072.

Basualdo, Marina, Sergio Barragán a Karina Antúnez. Bee bread increases honeybee haemolymph protein and promote better survival despite of causing higher *Nosema ceranae* abundance in honeybees. *Environmental Microbiology Reports* [online]. 2014, **6**(4), 396-400 [cit. 2019-02-14]. DOI: 10.1111/1758-2229.12169. ISSN 17582229.

Benvau, Lee R. a James C. Nieh. Larval honey bees infected with *Nosema ceranae* have increased vitellogenin titers as young adults. *Scientific Reports* [online]. 2017, **7**(1) [cit. 2019-02-14]. DOI: 10.1038/s41598-017-14702-4. ISSN 2045-2322.

Botías, Cristina, Raquel Martín-Hernández, Aránzazu Meana a Mariano Higes. Critical aspects of the *Nosema spp.* diagnostic sampling in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Parasitology Research* [online]. 2012(a), **110**(6), 2557-2561 [cit. 2019-02-14]. DOI: 10.1007/s00436-011-2760-2. ISSN 0932-0113.

Botías, Cristina, Raquel Martín-Hernández, Encarna Garrido-Bailón, Amelia González-Porto, Amparo Martínez-Salvador, Pilar De La Rúa, Aránzazu Meana a Mariano Higes. The growing prevalence of *Nosema ceranae* in honey bees in Spain, an emerging problem for the last decade. *Research in Veterinary Science* [online]. 2012(b), **93**(1), 150-155 [cit. 2019-02-14]. DOI: 10.1016/j.rvsc.2011.08.002. ISSN 00345288.

Burges, H.D., E.U. Canning a I.K. Hulls. Ultrastructure of *Nosema oryzaephili* and the taxonomic value of the polar filament. *Journal of Invertebrate Pathology* [online]. 1974, **23**(2), 135-139 [cit. 2019-02-14]. DOI: 10.1016/0022-2011(74)90176-1. ISSN 00222011.

Burgher-MacLellan, Karen L., Geoffrey R. Williams, Dave Shutler, Kenna Mackenzie a Richard E.L. Rogers. Optimization of duplex real-time PCR with melting-curve analysis for detecting the microsporidian parasites *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*. The Canadian Entomologist [online]. 2010, 142(03), 271-283 [cit. 2019-03-31]. DOI: 10.4039/n10-010. ISSN 0008-347X.

Cilia, Giovanni, Ilaria Cardaio, Pedro Emanuel Jarmela Dos Santos, James D. Ellis a Antonio Nanetti. The first detection of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in the small hive beetle, *Aethina tumida* Murray (Coleoptera: Nitidulidae). *Apidologie* [online]. 2018, **49**(5), 619-624 [cit. 2019-03-01]. DOI: 10.1007/s13592-018-0589-8. ISSN 0044-8435.

Copley, Tanya R., Pierre Giovenazzo a Suha H. Jabaji. Detection of *Nosema apis* and *N. ceranae* in honeybee bottom scraps and frass in naturally infected hives. *Apidologie* [online]. 2012, **43**(6), 753-760 [cit. 2019-02-14]. DOI: 10.1007/s13592-012-0147-8. ISSN 0044-8435.

Čermák, K., Gruna B., Hajdušková J., Holub P., Klíma Z., Kovařík I., Navrátil S., Rytina L., Texl P., Texl F., Tůme Z. *Včelařství svazek I.*, 1.st ed.; Grafotechna plus: Praha, 2016.

Danihlík, J., Dostálková S., Hroncová Z., Petřivalský M. *Včelařství svazek II.*, 1.st ed.; Grafotechna plus: Praha, 2017.

Eiri, Daren M., Guntima Suwannapong, Matthew Endler, James C. Nieh a Guido Favia. *Nosema ceranae* Can Infect Honey Bee Larvae and Reduces Subsequent Adult Longevity. *PLOS ONE* [online]. 2015, **10**(5) [cit. 2019-02-14]. DOI: 10.1371/journal.pone.0126330. ISSN 1932-6203.

Eouzan, Iris, Garnery, Lionel Garnery, Pinto, M. Alice Pinto, Damien, Catia J. Neves, Francis Fabre, Jerome Lesobre, Sylvie Houte, Andome Estonba, Iratxe Montes, Telesphore Sime-Ngando, David G. Biron. Hygroregulation, a key ability for eusocial insects: Native Western European honeybees as a case study. *PLOS ONE* [online]. 2019, 14(2) [cit. 2019-03-31]. DOI: 10.1371/journal.pone.0200048. ISSN 1932-6203.

Fenoy, S., C. Rueda, M. Higes, R. Martín-Hernández a C. Del Aguila. High-Level Resistance of *Nosema ceranae*, a Parasite of the Honeybee, to Temperature and Desiccation. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2009, **75**(21), 6886-6889 [cit. 2019-03-01]. DOI: 10.1128/AEM.01025-09. ISSN 0099-2240.

Forsgren, Eva a Ingemar Fries. Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Veterinary Parasitology* [online]. 2010, **170**(3-4), 212-217 [cit. 2019-03-01]. DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.02.010. ISSN 03044017.

Forsgren, Eva a Ingemar Fries. Temporal study of *Nosema spp.* in a cold climate. *Environmental Microbiology Reports* [online]. 2013, 5(1), 78-82 [cit. 2019-03-31]. DOI: 10.1111/j.1758-2229.2012.00386.x. ISSN 17582229.

Fries, Ingemar, Feng Feng, Alexandre Da Silva, Susan B. Slemenda a Norman J. Pieniazek. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, *Nosematidae*), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology* [online]. 1996, **32**(3), 356-365 [cit. 2019-02-14]. DOI: 10.1016/S0932-4739(96)80059-9. ISSN 09324739.

Fries, Ingemar, Marie-Pierre Chauzat, Yan-Ping Chen, Vincent Doublet, Elke Genersch, Sebastian Gisder, Mariano Higes, Dino P McMahon, Raquel Martín-Hernández, Myrsini Natsopoulou, Robert J Paxton, Gina Tanner, Thomas C Webster a Geoffrey R Williams. Standard methods for *Nosema* research. *Journal of Apicultural Research* [online]. 2013, **52**(1), 1-28 [cit. 2019-03-10]. DOI: 10.3896/IBRA.1.52.1.14. ISSN 0021-8839.

Gisder, Sebastian a Elke Genersch. Molecular differentiation of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* based on species-specific sequence differences in a protein coding gene. *Journal of Invertebrate Pathology* [online]. 2013, **113**(1), 1-6 [cit. 2019-02-14]. DOI: 10.1016/j.jip.2013.01.004. ISSN 00222011.

Gisder, Sebastian, Nadine Möckel, Andreas Linde a Elke Genersch. A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important honey bee-pathogenic microsporidia. *Environmental Microbiology* [online]. 2011, **13**(2), 404-413 [cit. 2019-03-01]. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2010.02346.x. ISSN 14622912.

Gisder, Sebastian, Vivian Schüller, Lennart L. Horchler, Detlef Groth a Elke Genersch. Long-Term Temporal Trends of *Nosema spp.* Infection Prevalence in Northeast Germany: Continuous Spread of *Nosema ceranae*, an Emerging Pathogen of Honey Bees (*Apis mellifera*), but No General Replacement of *Nosema apis*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 2017, 7 [cit. 2019-03-31]. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00301. ISSN 2235-2988.

Hanousek, L. *Začínáme včelařit*, 1.st ed.; Brázda: Praha, 1991.

Higes, Mariano, Ángeles Juarranz, Joyce Dias-Almeida, Silvia Lucena, Cristina Botías, Aránzazu Meana, Pilar García-Palencia a Raquel Martín-Hernández. Apoptosis in the pathogenesis of *Nosema ceranae* (Microsporidia: *Nosematidae*) in honey bees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology Reports* [online]. 2013, **5**(4), 530-536 [cit. 2019-02-14]. DOI: 10.1111/1758-2229.12059. ISSN 17582229.

Higes, Mariano, Raquel Martín-Hernández, Pilar Garcia-Palencia, Pilar Marin a Aranzazu Meana. Horizontal transmission of *Nosema ceranae* (*Microsporidia*) from worker honeybees to queens (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology Reports* [online]. 2009, **1**(6), 495-498 [cit. 2019-03-01]. DOI: 10.1111/j.1758-2229.2009.00052.x. ISSN 17582229.

Huang, Wei-Fone, Jing-Hao Jiang, Yue-Wen Chen a Chung-Hsiung Wang. A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie* [online]. 2007, **38**(1), 30-37 [cit. 2019-02-14]. DOI: 10.1051/apido:2006054. ISSN 0044-8435.

Human, Hannelie, Robert Brodschneider, Vincent Dietemann, Galen Dively, James D Ellis, Eva Forsgren, Ingemar Fries, Fani Hatjina, Fu-Liang Hu, Rodolfo Jaffé, Annette Bruun Jensen, Angela Köhler, Josef P Magyar, Asli Özkýrým, Christian W W Pirk, Robyn Rose, Ursula Strauss, Gina Tanner, David R Tarpy, Jozef J M van der Steen, Anthony Vaudo, Fleming Vejsnæs, Jerzy Wilde, Geoffrey R Williams a Huo-Qing Zheng. Miscellaneous standard methods for *Apis mellifera* research. *Journal of Apicultural Research* [online]. 2013, **52**(4), 1-53 [cit. 2019-03-10]. DOI: 10.3896/IBRA.1.52.4.10. ISSN 0021-8839.

Chaimanee, Veeranan, Panuwan Chantawannakul, Yanping Chen, Jay D. Evans a Jeffery S. Pettis. Effects of host age on susceptibility to infection and immune gene expression in honey bee queens (*Apis mellifera*) inoculated with *Nosema ceranae*. *Apidologie* [online]. 2014, **45**(4), 451-463 [cit. 2019-03-01]. DOI: 10.1007/s13592-013-0258-x. ISSN 0044-8435.

Chen, Yanping P., Jay D. Evans, Charles Murphy, Robin Gutell, Michael Zuker, Dawn Gundensen-Rindal a Jeff S. Pettis. Morphological, Molecular, and Phylogenetic Characterization of *Nosema ceranae*, a Microsporidian Parasite Isolated from the European Honey Bee, *Apis mellifera*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* [online]. 2009, **56**(2), 142-147 [cit. 2019-03-01]. DOI: 10.1111/j.1550-7408.2008.00374.x. ISSN 10665234.

Kamler, František, Dalibor Titěra a Martin Kamler. *Závěrečná zpráva za rok 2011: Rozšíření, patogeneze a návrh opatření v chovech včel ohrožených mikrosporidii Nosema ceranae* [online]. 11.2011 [cit. 2019-04-01]. Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/file/142451/Zaver_zprava_Nosema_2011_final.pdf

Khezri, Mohammad, Mojtaba Moharrami, Hossain Modirrousta, Maryam Torkaman, Saleh Salehi, Babak Rokhzad a Homan Khanbabai. Molecular detection of *Nosema ceranae* in the apiaries of Kurdistan province, Iran. *Vet Res Forum* [online]. 2018, 9(3): 273–278 [cit. 2019-03-10]. DOI: 10.30466/vrf.2018.32086.

Kubišová, S., Háslbachová H. *Včelařství*, 1.st ed.; Vysoká škola zemědělská v Brně: Brno, 1992.

Kurze, Christoph, Christopher Mayack, Frank Hirche, Gabriele I. Stangl, Yves Le Conte, Per Kryger a Robin F. A. Moritz. *Nosema spp.* infections cause no energetic stress in tolerant honeybees. *Parasitology Research* [online]. 2016, 115(6), 2381-2388 [cit. 2019-02-14]. DOI: 10.1007/s00436-016-4988-3. ISSN 0932-0113.

Louda, F., Čeřovský, J., Ježková A., Stádník, L.: Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnických metod. Skripta ČZU, 2001, 225 s.

Mapy.cz [online]. 2019 [cit. 2019-04-10]. Dostupné z: <https://mapy.cz>.

Marek, Veterinární péče v chovech včel, 1.st ed.; Ústav veterinární osvěty: Pardubice, 1978.

Martín-Hernández, Raquel, A. Meana, L. Prieto, A. M. Salvador, E. Garrido-Bailon a M. Higes. Outcome of Colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2007, 73(20), 6331-6338 [cit. 2019-03-01]. DOI: 10.1128/AEM.00270-07. ISSN 0099-2240.

Martín-Hernández, Raquel, A. Meana, P. Garcia-Palencia, P. Marin, C. Botias, E. Garrido-Bailon, L. Barrios a M. Higes. Effect of Temperature on the Biotic Potential of Honeybee Microsporidia. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2009, 75(8), 2554-2557 [cit. 2019-03-01]. DOI: 10.1128/AEM.02908-08. ISSN 0099-2240.

Martín-Hernández, Raquel, Cristina Botías, Laura Barrios, Amparo Martínez-Salvador, Aránzazu Meana, Christopher Mayack a Mariano Higes. Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). *Parasitology Research* [online]. 2011, 109(3), 605-612 [cit. 2019-02-14]. DOI: 10.1007/s00436-011-2292-9. ISSN 0932-0113.

Mathis, A., R. Weber a P. Deplazes. Zoonotic Potential of the Microsporidia. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2005, **18**(3), 423-445 [cit. 2019-02-14]. DOI: 10.1128/CMR.18.3.423-445.2005. ISSN 0893-8512.

Mayack, Christopher a Dhruba Naug. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *Journal of Invertebrate Pathology* [online]. 2009, **100**(3), 185-188 [cit. 2019-02-14]. DOI: 10.1016/j.jip.2008.12.001. ISSN 00222011.

Milbrath, Meghan O., Toan Van Tran, Wei-Fong Huang, Leellen F. Solter, David R. Tarpy, Frank Lawrence a Zachary Y. Huang. Comparative virulence and competition between *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* [online]. 2015, **125**, 9-15 [cit. 2019-02-14]. DOI: 10.1016/j.jip.2014.12.006. ISSN 00222011.

Naug, Dhruba a Ann Gibbs. Behavioral changes mediated by hunger in honeybees infected with *Nosema ceranae*. *Apidologie* [online]. 2009, **40**(6), 595-599 [cit. 2019-02-14]. DOI: 10.1051/apido/2009039. ISSN 0044-8435.

Paxton, Robert J., Julia Klee, Seppo Korpela a Ingemar Fries. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie* [online]. 2007, **38**(6), 558-565 [cit. 2019-02-14]. DOI: 10.1051/apido:2007037. ISSN 0044-8435.

Peng, Yan, Barbara Baer-Imhoof, A. Harvey Millar a Boris Baer. Consequences of *Nosema apis* infection for male honey bees and their fertility. *Scientific Reports* [online]. 2015, **5**(1) [cit. 2019-03-01]. DOI: 10.1038/srep10565. ISSN 2045-2322.

Peroutka, M., Drobníková V. *Nemoci včel*, 1.st ed.; Ministerstvo zemědělství a výživy ČR: České Budějovice, 1987.

Ptaszyńska, Aneta A., Marek Gancarz, Paul J. Hurd, Grzegorz Borsuk, Dariusz Wiącek, Agnieszka Nawrocka, Aneta Strachecka, Daniel Załuski, Jerzy Paleolog. Changes in the bioelement content of summer and winter western honeybees (*Apis mellifera*) induced by *Nosema ceranae* infection. *PLOS ONE* [online]. 2018, **13**(7) [cit. 2019-02-14]. DOI: 10.1371/journal.pone.0200410. ISSN 1932-6203.

Retschnig, Gina, Geoffrey Williams, Annette Schneeberger a Peter Neumann. Cold Ambient Temperature Promotes *Nosema spp.* Intensity in Honey Bees (*Apis mellifera*). *Insects* [online]. 2017, **8**(1) [cit. 2019-03-31]. DOI: 10.3390/insects8010020. ISSN 2075-4450.

Reuter, Gary S. a Marla Spivak. *Testing for Nosema spores* [online]. 14.5.2012 [cit. 2019-04-01]. Dostupné z: <https://articles.extension.org/pages/25556/testing-for-nosema-spores>

Roberts, K. E., S. E. F. Evison, B. Baer a W. O. H. Hughes. The cost of promiscuity: sexual transmission of *Nosema* microsporidian parasites in polyandrous honey bees. *Scientific Reports* [online]. 2015, **5**(1) [cit. 2019-03-01]. DOI: 10.1038/srep10982. ISSN 2045-2322.

Rytíř, J., *O nemocech a škůdcích včely medonosné*, 1.st ed.; Zemské ústředí včelařských spolků pro Čechy: Praha, 1937.

Sammataro, Diana, Alphonse Avitabile. *The beekeeper's handbook*, 4th ed.; Cornell University: London, 2011

Sinpo, Chainarong, Robert J. Paxton, Terd Disayathanoowat, Sasiprapa Krongdang a Panuwan Chantawannakul. Impact of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* on individual worker bees of the two host species (*Apis cerana* and *Apis mellifera*) and regulation of host immune response. *Journal of Insect Physiology* [online]. 2018, **105**, 1-8 [cit. 2019-02-14]. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2017.12.010. ISSN 00221910.

Smart, Matthew D. a Walter S. Sheppard. *Nosema ceranae* in age cohorts of the western honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* [online]. 2012, **109**(1), 148-151 [cit. 2019-02-14]. DOI: 10.1016/j.jip.2011.09.009. ISSN 00222011.

Svoboda J. *Metodiky tlumení infekčních a parazitárních včelích nemocí*, 1.st ed.; Československý svaz včelařů: Praha, 1968.

Svoboda J., Haragsimová L., Hanko J., Haragsim O. *Nemoci a škůdci včely medonosné*, 1.st ed.; Státní zemědělské nakladatelství: Praha, 1968.

Titěra D. *Včely zdravé a nemocné*, 1.st ed.; Brázda: Praha, 2017.

Titěra, D., Bednář M., Dolínek J., Haklová M., Jaša T., Kamler F., Veselý V. *Dezinfekce ve včelařství*, VÚVČ DoI, 2009

Toporčák J. *Zdravotné včelárske vademecum*, 1.st ed.; Štátna veterinárna správa Slovenskej republiky: Bratislava, 1999.

Traver, Brenna E. a Richard D. Fell. Low natural levels of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* queens. *Journal of Invertebrate Pathology* [online]. 2012, **110**(3), 408-410 [cit. 2019-03-01]. DOI: 10.1016/j.jip.2012.04.001. ISSN 00222011.

Traver, Brenna E. a Richard D. Fell. *Nosema ceranae* in drone honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* [online]. 2011, **107**(3), 234-236 [cit. 2019-03-01]. DOI: 10.1016/j.jip.2011.05.016. ISSN 00222011.

Traver, Brenna E., Matthew R. Williams a Richard D. Fell. Comparison of within hive sampling and seasonal activity of *Nosema ceranae* in honey bee colonies. *Journal of Invertebrate Pathology* [online]. 2012, 109(2), 187-193 [cit. 2019-03-31]. DOI: 10.1016/j.jip.2011.11.001. ISSN 00222011.

Veselý V., Bacílek J., Drobníková V., Haragsim O., Kamler F., Knížek F., Kodoň S., Krieg P., Kubišová S., Peroutka M., Ptáček V., Škrobal D., Tempír Z., Titěra D. *Včelařství*, 1.st ed.; Státní zemědělské nakladatelství: Praha, 1985.

Veselý, V., Bacílek J., Čermák K., Drobníková V., Haragsim O., Kamler F., Krieg P., Kubišová S., Peroutka M., Ptáček V., Škrobal D., Titěra D. *Včelařství*, 2.nd ed.; Brázda: Praha, 2003.

Veselý, V., Bacílek J., Čermák K., Drobníková V., Haragsim O., Kamler F., Krieg P., Kubišová S., Peroutka M., Ptáček V., Škrobal D., Titěra D. *Včelařství*, 3.rd ed.; Brázda: Praha, 2013.

Webster, Thomas C., Etta M. Thacker, Kirk Pomper, Jeremiah Lowe a Greg Hunt. *Nosema apis* infection in honey bee (*Apis mellifera*) queens. *Journal of Apicultural Research* [online]. 2015, **47**(1), 53-57 [cit. 2019-03-01]. DOI: 10.1080/00218839.2008.11101423. ISSN 0021-8839.

Xu, Yanji a Louis M. Weiss. The microsporidian polar tube: A highly specialised invasion organelle. *International Journal for Parasitology* [online]. 2005, **35**(9), 941-953 [cit. 2019-02-25]. DOI: 10.1016/j.ijpara.2005.04.003. ISSN 00207519.

Zheng, Huo-Qing, Zhe-Guang Lin, Shao-Kang Huang, Alex Sohr, Lyman Wu a Yan Ping Chen. Spore Loads May Not be Used Alone as a Direct Indicator of the Severity of *Nosema ceranae* Infection in Honey Bees *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology* [online]. 2014, **107**(6), 2037-2044 [cit. 2019-02-14]. DOI: 10.1603/EC13520. ISSN 00220493.