



Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

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

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH  
BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

Katedra Genetiky a zemědělských biotechnologií

**Diplomová práce**

Monitoring výskytu virů SBV, SBPV a ABPV ve včelstvech  
na území ČR

Autorka práce: Bc. Aneta Bláhová

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

České Budějovice  
2021

# JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Zemědělská fakulta

Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Aneta BLÁHOVÁ**  
Osobní číslo: **Z19399**  
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**  
Studijní obor: **Zemědělské biotechnologie**  
Téma práce: **Monitoring výskytu virů SBV, SBPV a ABPV ve včelstvech na území ČR**  
Zadávací katedra: **Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné**

### Zásady pro vypracování

Rešeršní část diplomové práce bude zaměřena na včelu medonosnou, její biologii a chov v ČR. Hlavní část bude věnována virovým onemocněním způsobovanými RNA viry SBV, SBPV a ABPV, způsobům jejich přenosu a okrajově budou popsány i potenciální vektory těchto virů.

V praktické části bude proveden monitoring výskytu RNA virů SBV, SBPV a ABPV ve včelstvech České republiky pomocí RT-PCR. Získané výsledky budou porovnány s úhynem sledovaných včelstev v průběhu zimy a předjaří. Získaná data budou vyhodnocena pomocí základních statistických metod.

Rozsah pracovní zprávy: **40 – 50 stran**  
Rozsah grafických prací: **10 – 15 stran**  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

STŘEDNÍ ŠKOLA  
KATEDRA GENETIKY A SPECIÁLNÍ  
PRODUKCE ROSTLINNÉ  
PŘÍRODNÍ VÝROBKŮ  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Seznam doporučené literatury:

- BUENDIA, Maria, Raquel MARTIN-HERNANDEZ, Concepcion ORNOSA, Laura BARRIOS, Carolina BARTOLOME a Mariano HIGES, 2018. Epidemiological study of honeybee pathogens in Europe: The results of Castilla-La Mancha (Spain). Spanish Journal of Agricultural Research [online]. 16(2), e0502. ISSN 1695-971X. Dostupné z: doi:10.5424/sjar/2018162-11474
- DE MIRANDA, Joachim R., Lesley BAILEY, Brenda V. BALL, Philippe BLANCHARD, Giles E. BUDGE, Nor CHEJANOVSKY, Yan-Ping CHEN, Laurent GAUTHIER, Elke GENERSCH, Dirk C. DE GRAAF, Magali RIBIERE, Eugene RYABOV, Lina DE SMET a Jozef J. M. VAN DER STEEN, 2013. Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. Journal of Apicultural Research [online]. 52(4), UNSP 52.4.22. ISSN 0021-8839. Dostupné z: doi:10.3896/IBRA.1.52.4.22
- DESAI, Suresh D. a Robert W. CURRIE, 2015. Genetic diversity within honey bee colonies affects pathogen load and relative virus levels in honey bees, *Apis mellifera* L. Behavioral Ecology and Sociobiology [online]. 69(9), 1527-1541. ISSN 0340-5443, 1432-0762. Dostupné z: doi:10.1007/s00265-015-1965-2
- EMSEN, Berna, Mollah Md HAMIDUZZAMAN, Paul H. GOODWIN a Ernesto GUZMAN-NOVOA, 2015. Lower Virus Infections in *Varroa destructor*-Infested and Uninfested Brood and Adult Honey Bees (*Apis mellifera*) of a Low Mite Population Growth Colony Compared to a High Mite Population Growth Colony. Plos One [online]. 10(2), e0118885. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0118885
- RYBA, Stepan, Dalibor TITERA, Iva SCHODELBAUEROVA-TRAXMANDLOVA a Pavel KINDLMANN, 2012. Prevalence of honeybee viruses in the Czech Republic and coinfections with other honeybee disease. Biologia [online]. 67(3), 590-595. ISSN 1336-9563. Dostupné z: doi:10.2478/s11756-012-0038-5

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Irena Hoštičková, Ph.D.**  
Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

Datum zadání diplomové práce: **20. ledna 2020**  
Termín odevzdání diplomové práce: **15. dubna 2021**



prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.  
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA  
studijní oddělení  
Studentů 1868 390 05 Česká Budějovice



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

## **Prohlášení**

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

V Českých Budějovicích dne.....

.....

Podpis

## **Poděkování**

Ráda bych z celého srdce poděkovala mým skvělým spolužákům: Bc. Kateřině Haškové, Bc. Petře Javůrkové, Bc. Markétě Joskové, Bc. Petru Štoidlovi, Bc. Václavu Zahradníkovi a Bc. Haně Žákové. Děkuji za všechny rady, oporu a přátelství, které jsme si poskytly za celé dva krásné roky.

Děkuji své rodině za důvěru, oporu a výdrž, kterou s mojí osobou měli. V neposlední řadě chci poděkovat své vedoucí Ing. Ireně Hoštičkové, Ph.D., za její pomoc a cenné rady.

## Abstrakt Česky

V této diplomové práci se věnuji jednomu z aktuálních témat, a to celosvětovému úbytku včelstev. Včela medonosná čelí řadě faktorů, které ovlivňují její zdravotní stav, kondici a životaschopnost. Mezi tyto faktory patří mimo jiné i včelí viry, z nichž řada vyvolává virózu pytlíčkového plodu nebo včelí paralýzu ať už akutní či pomalou. Kvůli virovým onemocněním nemohou infikované včely plnit svoji roli v úlu a vzrůstající počet postižených včel může negativně ovlivnit celé včelstvo.

V praktické části této práce jsem pomocí základních metod molekulární biologie provedla detekci tří včelích virů ve vzorcích včel, získaných z 50 stanovišť v rámci celého území České republiky. První dva viry způsobují paralýzu včel – virus akutní včelí paralýzy (*Acute bee paralysis virus*, ABPV) a virus pomalé včelí paralýzy (*Slow bee paralysis virus*, SBPV). Třetím detekovaným virem byl *Sacbrood virus* (SBV).

V případě ABPV jsem detekovala 20 pozitivních případů z 50 stanovišť (40 %). Naopak SBPV nebyl detekován v žádném stanovišti. V 6 stanovištích se objevila nákaza SBV (12 %), z toho ve 4 případech byl detekován ABPV společně se SBV (8 %).

### Klíčová slova

Včela medonosná, Virus akutní paralýzy včel, Virus pomalé paralýzy včel, *Sacbrood virus*, izolace DNA, PCR, Sekvenování

## **Abstract**

In this diploma thesis I deal with one of the current topics, namely the worldwide decline of bee colonies. The honey bee faces a number of factors that affect its health, condition and viability. These factors include, but are not limited to, bee viruses, many of which cause bag fetal virus or bee paralysis, whether acute or slow. Due to viral diseases, infected bees cannot play their role in the hive and the growing number of affected bees can negatively affect the entire bee colony.

In the practical part of this work, using basic methods of molecular biology, I detected three bee viruses in bee samples obtained from 50 habitats throughout the Czech Republic. The first two viruses cause bee paralysis - Acute bee paralysis virus (ABPV) and slow bee paralysis virus (SBPV). The third virus detected was *Sacbrood Virus* (SBV).

In the case of the ABPV, I detected 20 positive cases from 50 habitats (40%). In contrast, SBPV was not detected at any site. SBV infection (12%) occurred in 6 sites, of which ABPV was detected together with SBV (8%) in 4 cases.

## **Key word**

Honey bee, Acute bee paralysis virus, Slow bee paralysis virus, *Sacbrood virus*, izolation DNA, PCR, Sequencing

# Obsah

Úvod.....	10
1. Literární přehled .....	11
1.1 Včela medonosná .....	11
1.1.1 Stavba těla.....	12
1.1.2 Hlava.....	12
1.2 Vývojová stádia včely medonosné.....	14
1.2.1 Matka .....	14
1.2.2 Dělnice .....	16
1.2.3 Trubci.....	17
1.3 Med .....	18
1.3.1 Výroba medu .....	18
1.3.2 Plásty.....	19
1.4 Virová onemocnění .....	20
1.5 Šíření včelích viróz .....	20
1.5.1 Horizontální přenos .....	21
1.5.2 Vertikální přenos .....	22
1.5.3 Přenos viru kontaminovaným nektarem .....	23
1.6 Akutní paralýza včel – ABPV.....	24
1.6.1 Cripavirus .....	24
1.6.2 Onemocnění .....	24
1.7 Virus pomalé včelí paralýzy - SBPV .....	26
1.7.1 Iflavirus.....	26
1.7.2 Onemocnění .....	26
1.8 Sacbrood virus - SBV .....	27
1.8.1 Iflavirus.....	27
1.8.2 Onemocnění .....	27
1.9 Včelí imunita.....	29
1.9.1 Lidské faktory .....	29
1.9.2 Přírodní faktory.....	30
2. Cíle práce.....	31
3. Metodika.....	32
3.1.1 Materiál.....	32



3.1.2	Příprava vzorku.....	32
3.1.3	Měření koncentrace RNA .....	34
3.1.4	Přepis RNA do cDNA .....	34
3.1.5	PCR (Polymerázová řetězová reakce) .....	35
3.1.6	Příprava primerů .....	37
3.1.7	Vlastní PCR .....	38
3.1.8	Optimalizace reakce.....	40
3.1.9	Elektroforéza.....	41
3.1.10	Vyřezávání z gelu .....	42
3.1.11	DNA extrakce z agarózového gelu .....	43
3.1.12	Přečištění PCR produktu pomocí Exosapu.....	43
3.1.13	Sekvenování.....	44
4.	Výsledky.....	45
4.1	ABPV .....	47
4.2	SBPV .....	50
4.3	SBV .....	51
5.	Diskuze .....	56
	Závěr .....	59
	Seznam použité literatury.....	60
	Seznam obrázků .....	64
	Seznam tabulek .....	65
	Seznam zkratk .....	66

---

## Úvod

Včela medonosná (*Apis mellifera*) hraje zásadní roli v zemědělství tím, že zajišťuje opylení mnoha rostlin a plodin, zvláště těch nutričně a ekonomicky výhodných. Dále jsou také důležité pro udržení ekologických a genetických rozmanitostí rostlin. Avšak tyto služby, které nám včely zajišťují jsou ve velkém úpadku, kvůli úhynu včelstev, který je zapříčiněn stále se rozšiřujícími onemocněními včel, ať už bakteriálními, kvasinkovými či virovými.

Včely jsou hostiteli velkého množství virů. Některé viry skrytě přetrvávají v populaci včel a ve vhodných podmínkách následně vytvoří ohnisko nákazy. Taková ohniska některých virů mohou mít fatální následky pro jednotlivce, ale i pro celé kolonie.

Akutní paralýza včel (ABPV) je způsobena *Cripavirem* z rodiny *Dicistroviridae*. U infikovaných včel se rozvíjí paralýza, neschopnost létání, nakonec včely ztmavnou a mnohdy následně umírají.

Infekce pomalé paralýzy včel (SBPV) a *Sacbrood viru* (SBV) je zapříčiněna *Iflavirem*, který se řadí do řádu *Pisonivirales*. SBV postihuje larvy a znemožní jejich růst. SBPV je skrytá infekce bez projevů klinických symptomů, i přesto je však letální pro dospělé včely.

---

# 1. Literární přehled

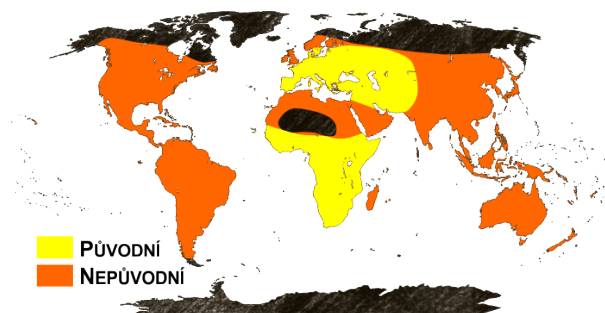
## 1.1 Včela medonosná

Včela medonosná (lat. *Apis mellifera*) se řadí mezi blanokřídly hmyz. Jedná se o jednoho z nejnámějších zástupců tohoto řádu (Tabulka 1.1) (Smrčka, 2020). Včela medonosná se řadí do vysoce sociálního hmyzu s velmi vyvinutým způsobem dělby práce a komunikace prostřednictvím včelího tance a vypouštěných feromonů (Dufková, 2013).

Tabulka 1.1 Taxonomie včely medonosné (zdroj: Prokop, 2013)

<i>Včela medonosná</i>		<i>Latinský název</i>
<b>Kmen:</b>	<i>Členovci</i>	<i>Arthropoda</i>
<b>Podkmen:</b>	<i>Šestinozí</i>	<i>Hexapoda</i>
<b>Třída:</b>	<i>Hmyz</i>	<i>Insecta</i>
<b>Řád:</b>	<i>Blanokřídli</i>	<i>Hymenoptera</i>
<b>Podřád:</b>	<i>Štíhlopasí</i>	<i>Apocrita</i>
<b>Čeleď:</b>	<i>Včelovití</i>	<i>Apidae</i>
<b>Podčeleď:</b>	<i>Včely</i>	<i>Apinae</i>
<b>Rod</b>	<i>Včela</i>	<i>Apis</i>

Pravděpodobně včela medonosná vznikla mutací včely východní (*Apis cerana*) asi před 10 000 lety. Původně žila pouze v Evropě, Asii a Africe. Avšak v 17. století byla dovezena i do Ameriky, Austrálie a Nového Zélandu (Obrázek 1.1) (Smrčka, 2020).

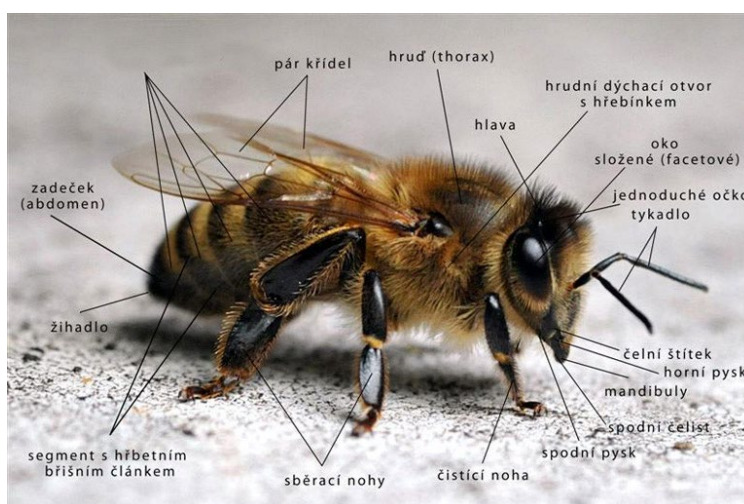


Obrázek 1.1 Mapa rozšíření Včely medonosné (zdroj: zoochleby.cz)

---

### 1.1.1 Stavba těla

Dospělá včela má stejnou stavbu těla jako ostatní hmyz (Obrázek 1.2). Její tělo se skládá ze tří hlavních částí: hlavy, hrudi a zadečku. Tyto části jsou od sebe oddělené zúžením, které umožňuje jejich vzájemnou pohyblivost. Z hrudi vystupují dva páry křídel a tři páry nohou (Williams, 2019)



Obrázek 1.2 Stavba těla včely medonosné (zdroj: iVčelařství.cz)

### 1.1.2 Hlava

Hlava vznikla pevným srůstem šesti článků, které nelze rozlišit. Na prvním článku po stranách hlavy jsou umístěné dvě složené oči a tři jednoduché oči. Ty jsou na vrcholu temene. Na rozdíl od lidského oka, včela vidí ultrafialové barvy, díky kterým vyhledává květiny. K vidění používá pouze složené oči. Temenní oči slouží ke světelnému dráždění. V jednom složeném oku dělnice se nachází asi 3000 jednotlivých oček (facet), zatímco u trubce asi 6500. Očka následně skládají z bodového obrazu celkový obraz. Včely také mohou vnímat polarizované světlo, které je důležité pro orientaci při zatažené obloze (Williams, 2019)).

Na druhém článku hlavy se nachází dva orgány, které jsou ve středu přední strany – tykadla. Na nich jsou umístěné smyslové vjemy jako jsou např. čich, orientace ve tmě, vnímání teploty, rychlosti vzduchu a hmat. Prochází jimi nervy i hemolymfa. U dělnic jsou složena tykadla ze 12 článků a u trubců ze 13. Čtvrtý, pátý a šestý článek nese kusadla, čelist a spodní pysk. Kusadla jsou velmi ostrá, zvláště u dělnic. Spodní pysk a čelist společně tvoří sosák, který slouží k sání tekutin a následnému krmení larev (Prokop, 2013).

---

Tvar včelí hlavy je u matky srdcovitý, u dělnice trojúhelníkový a u trubce kruhovitý. S hrudí je spojena tenkým, a však pevným pohyblivým krkem, kterým procházejí z hlavy do těla orgánová ústrojí (Williams, 2019).

### 1.1.3 Hrud'

V hrudi se nachází centrum pohybového aparátu. Mohutné vnitřní svalstvo v hrudi ovládá hlavu, zadeček, nohy i křídla. Celý pohybový aparát je kontrolován nervovým systémem. Včela má 3 páry nohou a každou nohu tvoří 6 článků. Které jsou navzájem spojeny klouby. Jednotlivé klouby mají omezenou pohyblivost, ta je kompenzována velkým počtem kloubů a jejich postavení v různých úhlech, udávají směr pohybu (Williams, 2019).

Na prvním páru nohou je tvrdé ochlupení a významný čistící orgán, který je umístěn na patě. Včela jím protahuje svá tykadla po každém kontaktu s květem, aby je zbavila pylu a prachu, a tím udržovala správnou funkci tykadel. Druhý pár nohou má na sobě kartáček a trn, který slouží k vypichování pylové rousky z košíčků. Na třetím páru se nachází orgán pro sběr pylu. (Prokop, 2013)

Včela má na bocích 2 páry blanitých křídel. První pár křídel je větší než druhý a má bohatší žilkování, které slouží jako kostra. S hrudí jsou spojeny klouby. Na křídlech jsou umístěny háčky. Pomocí různého spojení malých a velkých křídel je včela schopna letět odlišnými směry nebo stát na místě (Williams, 2019).

### 1.1.4 Zadeček

Zadeček je složen z velkého hřbetního a malého břišního segmentu. Zadeček je s hrudí spojen krátkou stopkou, díky tomu se může včela volně pohybovat ve všech směrech. Zadeček se může zvětšovat a stahovat zpět. To je nutné kvůli přítomným orgánům, jejichž tvar se v průběhu roku výrazně mění. Roztahování zadečku také pomáhá při dýchání a při výměně tlaku tělních tekutin (Prokop, 2013).

V zadečku jsou uloženy trávicí orgány s medovým váčkem, žaludkem, česlem a konečníkem. Dále pak voskové žlázy, vonné žlázy, srdce, tukové tělísko, dýchací systém, pohlavní orgány a žihadlo s jedovatým váčkem o obsahu jedu 0,26 mg.

Žihadlo má tři funkčně odlišné části; motorická část, propichovací část a část napojenou na jedový váček. V propichovací části se nachází stylet a lancety, které jsou zakryty ostny ve tvaru čtyřstěnu. Tyto ostny znemožňují včelám při útěku zatáhnout

---

žihadlo z kůže savců. Tato situace může vést k oddělení žihadla a jeho přidružených svalů od břicha. Včely následně umírají za 18 – 114 hodin (Pucca et al., 2019).

## 1.2 Vývojová stádia včely medonosné

Včely žijí ve společenství, které se nazývá včelstvo. V každém včelstvu nalezneme jednu matku – královnu, mnoho dělnic a proměnlivé množství trubců. Množství trubců je závislé na síle včelstva, ročním období, přístupnosti k pylu a nektarové snůšky. Všichni členové včelstva jsou na sobě závislí (Jones, 2017) a každý má svou roli v úlu, která je jasně dána (Smrčka, 2020).

Četnost včel se v průběhu roku mění. Včelstvo má kolem 20 000 dělnic a v létě jejich počet stoupá na 40 000 – 60 000. K nim se připočítává přibližně 300–600 trubců a jedna královna (Pleva, 2019).

Vývoj včely medonosné je započat nakladením oplozených vajíček do včelí buňky nebo do mateří misky. Neoplozená vajíčka klade matka do trubčích buněk. Z vajíčka se vylíhne larva v červíčkovitém tvaru potažena chitinovou pokožkou. Larva je bohatě živena, a proto velmi rychle roste, dokud nedosáhne potřebné velikosti a síly. Poté se zapředě do zámotku a promění se v kuklu. V ní probíhá vyvíjení těla a kůže včely, pigmentace očí a nárůst ochlupení. Když je včela dovyvinutá, vylíhne se připravený hmyz (Obrázek 1.3). Tento popsany proces trvá 21 dní, pokud se jedná o dělnici. V případě matky, která je nepřetržitě krmena mateří kašičkou (výměšek hltanových žláz mladých dělnic) vývoj trvá jen 16 dní. Nejdéle však trvá vývoj u trubce a to 24 dní (Pleva, 2019).



Obrázek 1.3 Vývoj včely medonosné (zdroj: iVčelařství.cz)

---

### 1.2.1 Matka

Včelí matka (Obrázek 1.4) je jediná plnohodnotná samice ve včelstvu a je nejdůležitějším členem. Ačkoli včel může být ohromné množství, bez matky včelstvo nevytvoří. Matka vypouští feromon (materí látka), kterým informuje ostatní včely o svém stavu (Linhart, 2019).

Matky hned po vylíhnutí bojují o post královny. Nejsilnější vyhrává, poražené umírají. Asi 6 den po vylíhnutí vyletují za tzv. snubním letem, kdy poprvé a naposled za svůj život opustí úl. Při snubním letu se spáří až s 6 - 10 (i více) trubci. Jejich sperma si uchová v semenném vaku a postupně celý život s ním oplodňuje vajíčka. Protože při kladení procházejí vajíčka okolo vývodu semenného vaku a matka na každé vajíčko vystříkne několik spermií. Páření již nikdy neopakuje. Tudíž její hlavním úkolem je žít v úlu a klást vajíčka. A protože to je její jediná úloha, dělá ji velice dobře. V době vrcholného rozvoje včelstva je schopna naklásat i více než 2000 vajíček za den. Klade 2 druhy vajíček. Z oplozených se stávají matky a dělnice a z neoplozených se líhnou trubci (Prokop, 2013).

Během dospělého života se od ostatních včel liší svou velikostí. Měří kolem 20-25 mm (to je o 1 cm více než dělnice) a váží až 260 mg. Dožívá se 3-5 let, přičemž včelaři si je nechávají 2-3 roky, pokud nezemřou sami (Pleva, 2019).



Obrázek 1.4 Matka mezi dělnicemi (zdroj: vlastní)

### 1.2.2 Dělnice

Jsou nedokonalé samice, ale zastávají většinu práce v úlu. Vyrůstají se z oplozených vajíček jako matky, ale na rozdíl od matky mají pro práci uzpůsobené tělo (trny, košíčky,...). Dělnice mají zakrnělé pohlavní orgány, a proto se nemohou spářit (Prokop, 2019). Fáze vývoje se odvíjí od jejich věku (Tabulka 1.2).

Tabulka 1.2 Vývojové fáze dělnice (zdroj: ivcelarstvi.cz)

<i>Včelí dělnice</i>		
<i>Den</i>	<i>Stádium</i>	<i>Činnost</i>
<i>po 2-3 hodinách</i>	<i>Čistička</i>	<i>Čištění buněk</i>
<i>4. den</i>	<i>Krmička</i>	<i>Krmení larev</i>
<i>7.den</i>	<i>Kojička</i>	<i>Krmení matky mateří kašičkou</i>
<i>11.den</i>	<i>Stavitelka</i>	<i>Stavění včelího díla</i>
<i>14. den</i>	<i>Skladnice</i>	<i>Přebírá med od létavek a uskládňuje jej do pláství</i>
<i>16. den</i>	<i>Termostatka</i>	<i>Udržuje klima v úlu</i>
<i>18.den</i>	<i>Strážkyně česna</i>	<i>Střežení vchodu do úlu</i>
<i>22.den</i>	<i>Létavka</i>	<i>Zajišťování potravy do úlu</i>

Dělnice mají dlouhý sosák (průměrně 6,4 mm), který je přizpůsobený k sání nektaru, medovice a vody. Produkují vosk, pomocí voskotvorných žláz, které mají umístěné na břišních šupinách a využívají ho na stavbu včelího úlu. V hlavě mají hltanové žlázy, jimiž vytváří mateří kašičku jako potravu pro mateří larvy a matky v době kladení. Dělnice obstarávají veškerou potřebnou potravu jako je např. voda, pyl, nektar, medovice, ale i tmel, který slouží jako hmota na potahování úlu. Uvnitř úlu vykonávají potřebné práce: ukládají potravu, zahušťují nektar s medovicí a pomocí enzymů je



---

přetvářejí v med, dále pak krmí a ošetřují včelí matku. Udržují také čistotu v úlu a provádějí stavařské práce, aby se jim obydlí nezničilo (vytmelují škvíry, stěny, rámy i povrch plástů) (Prokop, 2019).

Dělnice jsou v úlu nejdrobnější. Měří kolem 12-14 mm a váží 100 mg. Délka života se odvíjí podle ročního období. V létě se včely dožívají 6-8 týdnů, zatímco včely narozené koncem léta a na podzim se dožívají 6-8 měsíců (Pleva, 2019).

### **1.2.3 Trubci**

Trubci jsou včelí samečci, kteří se líhnou z neoplozených vajíček. Jejich hlavním úkolem je spářit se s matkou. Oproti včelám jsou větší a robustnější a nemají žihadlo, voskotvornou a hltanovou žlázu a ve včelstvu se téměř nezúčastňují žádné činnosti. Avšak v úlu pomáhají alespoň udržovat konstantní teplotu, a to tím, že zahřívají plod. V prvních dnech po vylíhnutí je krmí dělnice, poté o ně ztratí zájem a trubci se musí začít krmít sami (Pleva, 2019).

Trubci měří kolem 15-17 mm a váží až 220 mg. Nedožívají se dlouho, přibližně jen 24 dní (nejstarší objevení trubci byli staří 45 až 50 dní). Včely nenechají trubce ve včelstvu přezimovat. Zralý trubec má 1-1,5 mm<sup>3</sup> spermatu, tj. 6-9 miliónů spermií (Prokop, 2013).

---

## 1.3 Med

Zvláště na jaře, kdy rozkvétají různé druhy květin a příroda hýří krásnými barvami, se začínají objevovat tisíce včel medonosných všude kolem. Včely létavky sedají na květy a začínají sbírat nektar nebo pyl. Avšak se jím neživí jako např. motýli. Tím, že provádějí snůšku, tím zajišťují i opylení květů (The power of Honey, 2006).

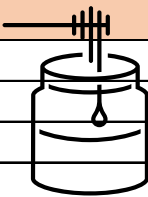
Jestliže létavka našla nový vydatný zdroj nektaru, dolétne do úlu a svým včelím tancem upozorní ostatní létavky a ukáže jim směr. Naviguje pomocí natřásání zadečku a pohybem ve směru k novému zdroji. Během nepravidelných krátkých přestávek, dává létavka ochutnat nektar i ostatním včelám. Létavky vyráží za zdrojem dříve, než tanec skončí (Ptáček, 2007).

### 1.3.1 Výroba medu

Na dně každého květu na včelu čeká kapka nektaru, tu nasaje do medného váčku a než doletí do úlu odpaří se z nektaru 50% vody. Nektar si létavka předává s 1-3 skladnicemi pomocí kusadel a přední částí sosáku. Nektar z květů je roztok obsahující jednoduché cukry. Jak prochází hltanovými žlázami včel, pomocí peristaltických pohybů se mísí s aminokyselinami a enzymy, které mění glukózu s fruktózou na medovici. (Ptáček, 2007).

Následně po předání nektaru se včela skladnice přesune do klidnějšího místa k plástvím. Dále zaujme vertikální pozici hlavou vzhůru. V této poloze sedí nečinně, a přitom dále zpracovává nektar pomocí ústního ústrojí, dokud se z nektaru neodpaří voda a její obsah nečiní 14 %. Tento proces kolísavě trvá až 20 minut. Poté včela vyhledá vhodnou buňku v plástvích a uloží do ní kapku, kterou zahustila. Do buňky vstupuje břišní stranou hlavou dolu a je-li buňka prázdná, potírá medem zadní konec horní stěny. Odtud med stéká po dnu buňky. Pokud buňka již med obsahuje, pomocí kusadel jednoduše přidá svou porci. Med nakonec dosáhne cukernatosti 80 %. Med je hustý a bohatý na různé výživné složky (Tabulka 1.3 Hlavní složky medu (zdroj: pharmanews.cz) Tabulka 1.3) (Ptáček, 2007).

Tabulka 1.3 Hlavní složky medu (zdroj: pharmanews.cz)

HLAVNÍ SLOŽKY MEDU		
<b>Fruktóza</b>	30 - 38 %	
<b>Glukóza</b>	26 - 33 %	
<b>Sacharóza</b>	1 - 5 %	
<b>Vyšší cukry</b>	1 - 10 %	
<b>Voda</b>	17 - 18 %	
<b>Enzymy</b>	0,1 - 0,6 %	(glukozooxidáza, fosfatáza, invertáza, diastáza, kataláza)
<b>Vitamíny</b>	0,1%	(kyselina pantotenová, B1, B2, B3, biotin, C)
<b>Minerály</b>	0,1 - 1,0 %	(K, Na, Ca, Mg, Fe, P, S, Mn, Zn, Cu)
<b>Organické kyseliny</b>	0,1 - 0,5 %	(kyselina pyrohroznová, glukonová, jablečná, citrónová)
<b>Aminokyseliny</b>	0,1 - 0,5 %	(fanylalanin, prolin, alanin, valin)
<b>Hormonální látky</b>	(noradrenalin, acetylcholin, adrenalin, dopamin, látky z mateří kašičky)	
<b>Barviva</b>	( rutin, kverutin, akacetin, karoten)	
<b>Vonné látky</b>	(diacetyl, acetaldehyd a 50 dalších)	

Včelstvo spotřebuje ročně 100-120 kg medu a 80 kg pylu jen pro své vlastní potřeby. Včela se živí hotovým medem, kdy po nakrmením 1 g medu uletí mnoho desítek kilometrů. Med je také důležitý pro výživu při přezimování včel, protože je pro ně jedinou potravou. Výroba medu je časově náročná, na jednu lžičku medu je potřeba, aby létavka sesbírala nektar na 50 000 květech. Jedna kolonie ve svém úlu skladuje až 5 kg medu (The Power of Honey, 2006)

### 1.3.2 Plásty

Voskové plásty jsou největším orgánem včelstva, zajišťují mnoho funkcí jako např. skladování, zásobárnu medu a pylu nebo plodové hnízdo potomstva. Jsou považovány za stavební kostru úlu, také zajišťují informační síť a paměť mezi včelami. A jsou důležité hlavně jako první obrana včelstva ať už fyzická, chemická nebo imunitní (The Power of Honey).

---

## 1.4 Virová onemocnění

Virus je drobná částice, která je tvořena pouze bílkovinným pouzdrém. Uvnitř pouzdra se skrývá dědičná informace ve formě DNA nebo RNA. Viry jsou mnohem menší než bakterie. To znamená, že je obtížné je vidět v běžném světelném mikroskopu, a tedy je nutné použít mikroskop elektronový. To komplikuje diagnostiku virových onemocnění. Ta se provádí většinou nepřímo, na základě příznaků nemoci, případně průkazem protilátek. Zvýšená hladina protilátek v organismu je důkazem, že se tělo s virovou infekcí setkalo a začalo si proti ní vytvářet protilátky (Rosypal, 1994). Detekce virů se může provádět pomocí molekulárně-biologických metod (PCR).

Viry způsobují velké množství významných infekčních chorob u všech organismů. Díky jednoduché struktuře se viry mohou snadno měnit a přizpůsobovat se podmínkám (Rosypal, 1994). Tudíž naprostá většina i včelích virů má schopnost rychle mutovat a modifikovat své vlastnosti (Chen et al., 2006).

## 1.5 Šíření včelích viróz

Virózy byly poprvé popsány v České republice veterinářem, výzkumníkem a autorem několika desítek odborných článků MVGr. Jaroslavem Rytířem v roce 1926 (Valtera, 2018). Do dnešní doby již bylo popsáno kolem 20 včelích viróz, většinu z nich není možné rozpoznat podle klinických příznaků (Schläppi et al., 2020). Tyto viry se mohou množit v těle dospělých včel i plodu, některé i v přenašečích. Přítomnost viru v jednotlivých včelách i ve včelstvu se nemusí navenek nijak projevit. Za určitých podmínek se ale nákaza viry může negativně projevit viditelnými klinickými příznaky a může včelstva zeslabit nebo zničit. Viry jsou taky schopny vyvolat u nakažených jedinců změny v chování, které jsou škodlivé pro ně samotné (ztráta orientace) nebo i pro celé včelstvo (změny v péči o plod, vliv na dlouhověkost). Zajímavá je třeba ztráta schopnosti adaptace na nízké teploty (Titěra, 2017).

Vědci stále vedou spory o to, zda považovat viry za živé organismy, či spíše za komplikované molekuly. Viry sice mají jako jiné živé organismy vlastní dědičnou informaci a jsou také schopny se rozmnožovat. Však nic z toho nedokážou bez hostitelské buňky, protože nemají žádný vlastní metabolismus jako zdroj energie (Rosypal, 1994). Podle způsobu přenosu viru, rozlišujeme dva směry šíření infekčních částic, a to vertikální nebo horizontální způsob přenosu.

---

### 1.5.1 Horizontální přenos

K horizontálnímu přenosu virů dochází v rámci jedinců jedné generace včel. Může k němu docházet buď přímou nebo nepřímou cestou. Obecně platí, že infekce přenášené horizontálně jsou virulentnější a jsou často doprovázené pozorovatelnými klinickými příznaky (Chen et al. 2006).

#### Přímý horizontální přenos

Tento způsob přenosu vyžaduje těsný fyzický kontakt s nakaženým jedincem, pobyt v infikované oblasti nebo pozření infikované potravy. Co se týče jednoho včelstva, hraje velkou roli při přenosu viru rozdělení úkolu jednotlivých dělnic. Každá dělnice se při své činnosti vystavuje kontaktu s infikovanými jedinci, zásobami nebo materiálem a zároveň se může stát potencionálním přenašečem. U řady virů se běžně vyskytuje přenos z dospělé včely na larvu prostřednictvím infikované potravy. Dělnice potravu produkuje pomocí hltanových žláz, které jsou často viry napadány. Proto nemusí být infikovaná jen larvální potrava, či mateří kašička, ale i další včelí produkty, které přijdou do kontaktu se slinami (Chen et al. 2006).

Další možností horizontálního přenosu, je přenos viru prostřednictvím infikovaných výkalů, kdy je včely mohou pozřít, ale tento přenos nemá silný účinek. Vir se může také přenášet pohlavním stykem trubců s matkou, ale tento způsob není zcela prozkoumaný. Nabízí se možnost, že za přenos viru je zodpovědný i včelař tím, že spojuje slabá včelstva, aby vytvořil včelstvo silnější, nebo vyměňuje materiál mezi úly (Chen et al., 2006).

#### Nepřímý horizontální přenos

Nepřímý přenos viru je zapříčiněn pomocí přenašečů. Za jednoho z nejznámějších přenašečů je považován *Varroa destructor*.

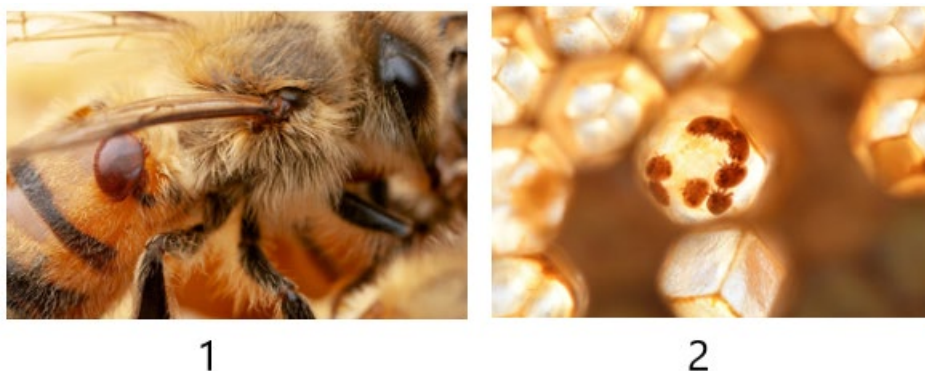
#### **Varroa destructor**

*Varroa destructor* (kleštík včelí) je považován za nejvýznamnějšího parazitického roztoče včely medonosné. Je hlavní příčinou rozšiřování a vyvolávání virových infekcí u včel. Pochází z Asie a do Evropy se dostal na počátku 20. století, odkud se rozšířil do celého světa. V Československu byl objeven v roce 1978. Jeho původní hostitel včela východní si vyvinul v rámci evoluce, obranné systémy, které však včela

---

medonosná postrádá. Tedy bez zásahu člověka je invaze kleštíka do včelstva devastující (Kamler et al., 2017)

Trubci jsou hlavními přenašeči *Varroa destructor*, protože často zalétají do cizích úlů, a tak je jednoduché, aby roztoč seskočil z jejich těla, na kterém je přichycený (Obrázek 1.5, 1.). Avšak podobně jsou přenašeči i dělnice, které roztoče šíří při loupežích nebo rojení. Za šíření *Varroa destructor* však může i včelař, který přemísťuje plásty a úly (Hubert, 2018).



Obrázek 1.5 1. *Varroa destructor* na včele; 2. Kleščík včelí v plástvy (zdroj: news.utexas.edu; blog-veto-pharma.com)

Samičky *Varroa destructor* jsou viditelné okem. Mají lesklou černohnědou až hnědou barvu a vyvíjí se u nich tvrdý hřbetní štít. Samičky jsou větší než samečci. Samečci jsou šedobílí a mají měkkou pokožku. Vývojový cyklus probíhá na včelím plodu. Před zavíčováním do buňky přejde oplozená samička *Varroa destructor* z dospělé včely a poté nasedne na včelí larvu (Obrázek 1.5, 2.). V hodnou chvíli naklade své vajíčka na stěnu buňky. Během 7 dnů se vyvinou pohlavně zralí jedinci. Samečci po spáření hynou a samičky se uchytávají na včelí larvu. Poté společně opouštějí buňku (Kamler et al., 2017).

Na plástech přežívá samička roztoče až 40 dnů, na uhynulých včelách 11–17 dnů. Mimo včelu žije roztoč v závislosti na vnějších podmínkách 6–7 dnů. Během zimy přibližně uhynie 10 % samiček (Hubert, 2018).

### 1.5.2 Vertikální přenos

Jedná se o způsob přenosu viru z rodiče na potomstvo, tedy na další generaci. Dochází k němu prostřednictvím vaječnicků, pokud se jedná o matku, nebo pomocí spermatu, jestliže se jedná o otce. U přenosu z matky na potomstvo, můžeme posuzovat přenos viru podle závislosti styku virových částí s vývojovou fází vajíčka. Tedy rozlišujeme,

---

zda jsou virové části na povrchu nebo vně vajíčka. Tento způsob přenosu byl zaznamenán např. u SBV (Chen et al., 2006)

### 1.5.3 Přenos viru kontaminovaným nektarem

Nektar může sloužit jako jeden z prostředků pro přenos včelích virů. Bylo zjištěno, že *iflaviry* (DWV, SBV), *Cripavirus* (KBV, ABPV) a *Triatovirus* (BQCV) mohou med kontaminovat (Chen et al., 2006).

Med začíná jako nektar, který je získávaný včelami z květů rostlin. Dále jej včely ukládají do plástů, kde se nektar rozpadá na jednotlivé cukry. Neustálé větrání zabezpečené křídly včel způsobuje odpařování vody a vytváří sladkou tekutinu medu. Viry se poté šíří podáváním kontaminovaného medu včelím larvám. Včely se také mohou infikovat virem při čištění buněk obsahujících infikované larvy (Chen et al., 2007).

Detekce včelích virů v medu naznačuje, že virová kontaminace může pocházet z nektaru. Je to však pravděpodobně méně častý způsob kontaminace medu. Včely medonosné zpracovávají nektar na med tak, že jej smíchají se sekretem z hypofaryngeálních žláz v jejich hlavách. V nich se nachází spousta enzymů (např. Invertázy), které jsou používány k přeměně sacharózy na glukózu a fruktózu. U infikovaných včel mohou být tyto žlázy naplněny virem, a proto jsou žlázové sekrece nejpravděpodobnějším zdrojem virové kontaminace medu. Je také možné, že med je někdy v kolonii kontaminován pomocí malého množství pylu, který je virem infikovaný. V případech, kdy dojde k přenosu virových částic na med pomocí nektaru obsahující vir, nejpravděpodobněji to bude výsledkem náhodného ukládání kontaminovaných výkalů opylovače do květů (Jones, 2018).

V důsledku horizontálního přenosu viru, ke kterému dochází prostřednictvím kontaminovaného nektaru, je zřejmé, že model šíření virů v populaci včel se podobá těm modelům pro přenos pylem. V situacích, kdy populace opylovačů, všech druhů, z nichž každý se vyskytuje ve velkém počtu a virová infekce je rozšířená, je velká pravděpodobnost, že tato přenosová cesta přispěje k výskytu nových hmyzích virů. Důvodem je neustálý přísun kontaminovaných květů patřících k různým druhům kvetoucích rostlin, ze kterých by mohla opakovaně získávat viry řada kolonií a různých druhů hmyzu. (Jones, 2018)

---

## 1.6 Akutní paralýza včel – ABPV

Včela medonosná čelí řadě faktorů, které ovlivňují její zdravotní stav, kondici a životaschopnost. Mezi tyto faktory patří mimo jiné i včelí viry, z nichž řada vyvolává včelí paralýzu. Kvůli paralýze nemohou infikované včely plnit svoji roli v úlu a vzrůstající počet postižených včel může negativně ovlivnit celé včelstvo (Čukanová et al., 2020).

### 1.6.1 Cripavirus

Virus akutní paralýzy včel patří do rodiny *Dicistroviridae*, která se řadí pod řád *Picornavirales*. Viriony *Cripaviru* nemají žádné pouzdro a jejich průměr se pohybuje kolem 30 nm. Genetická informace je uložena do jednovláknové RNA (ssRNA) pozitivní polaritě o velikosti přibližně 8500 – 10 200 bp s obsahem GC v rozmezí od 35 % do 45 %. Kapsid je organizovaný v pseudo T=3 ikosahedrál ní symetrie. Virion tvoří RNA (30 %) a proteiny (70 %). Viriony obsahují tři hlavní strukturní (kapsidové) virové proteiny – VP1, VP2 a VP3. RNA obsahuje dva čtec í rámce (ORF), kterými se liší od většiny zástupců třídy *Picornavirales*. *Cripavirus* je v přírodě volně rozšířený a infikuje bezobratlé (mšice, včely, mravence apod.) (King et. al; 2012).

### 1.6.2 Onemocnění

V roce 1963 byl poprvé popsán virus akutní paralýzy včel (ABPV), který má vlastnosti podobné řádu *Picornavirales*. Ačkoli byl ABPV schopen způsobit paralýzu dospělých včel při injekčním podání, zpočátku se ve Velké Británii nehlásilo, že by virus mohl souviset s přirozeně se vyskytujícími příznaky choroby. Od té doby se však zjistilo, že ABPV zabíjí larvy, kukly a dospělé včely v koloniích v jiných částech světa, pokud jsou úhyny nalezeny ve spojení s parazitickým roztočem *Varroa destructor* (Granoff a Webster, 1999).

Např. ve Velké Británii je ABPV nejčastěji detekován během pozdních letních měsíců, kdy je počet kolonií nejvyšší, ale během podzimních a zimních měsíců rychle klesá na nízkou úroveň (Granoff a Webster, 1999).

ABPV byl původně objeven jako inaparentní infekce v laboratorních experimentech. Šíří se prostřednictvím sekrece slinných žláz dospělých včel. ABPV byl identifikován jako hlavní faktor způsobující vysokou úmrtnost včel ve včelstvech, která byla napadena roztočem *Varroa jacobsoni* (Benjeddou et al., 2001).



---

ABPV může vyvolat úmrtnost dospělých včel, které nejprve předcházejí symptomy. Nejdříve se projevuje postupující paralýza – třepající se pohyb, neschopnost létat, ztráta ochlupení na hrudníku, a nakonec postupné ztmavnutí těla (Obrázek 1.6) (Schläppi et al., 2020).



foto. @GrażynaTopolska

**Obrázek 1.6** ABPV symptomy (zdroj: windowbee.com)

---

## 1.7 Virus pomalé včelí paralýzy - SBPV

Paralýza včel byla poprvé popsána ve 30. letech 20. století ve Spojených státech. V roce 1945 byl poprvé potvrzený virus, který nemoc způsobuje (C. E. Burnside). V Bulharsku paralýzy označovali jako „květnová nemoc“. Nakonec se všechny hypotézy spojili v roce 1966 kdy v Itálii vyšetřovali etiologii tzv. černé nemoci včel (Fijan, 1966). V Anglii byl objeven v roce 1974, během experimentů, který zahrnoval detekování tehdejšího viru X (Miranda et al., 2010).

### 1.7.1 Iflavirus

Virus pomalé včelí paralýzy se řadí do rodiny *Iflaviridae*, která se řadí do řádu *Pisonivirales*. Neobalené viry mají velikost v průměru 22-30 nm. Genetická informace virionu je tvořena jednovláknovou RNA pozitivní polaritě (+ssRNA) o velikosti 9 000 – 11 000 bp. Kapsid je organizovaný v pseudo T=3 ikosahedrál ní symetrie. IRES umožňuje přímé translace polyproteinu. Ten je zpočátku zpracován virovou proteázou na různé prekurzory a zralé proteiny za vzniku strukturních proteinů, které nakonec vedou k lýze hostitelských buněk. *Iflavirus* napadá bezobratlý hmyz a přenáší se prostřednictvím *Varroa destructor* (Procházková et al., 2020).

### 1.7.2 Onemocnění

Virus pomalé včelí paralýzy (SBPV) je jedním z několika virů včel spojených s vysokou úmrtností kolonií zamořených ektoparazitickým roztočem *Varroa destructor* (Carreck et al., 2010). Jako většina včelích virů se přenáší prostřednictvím žlázových sekretů a SBPV přetrvává přirozeně jako skrytá infekce (Miranda et al., 2010).

Byl nalezen u včel ve Velké Británii a při experimentech, kdy pozorovali symptomy zjistili, že přibližně po 10-12 dnech po injekčním podání viru, SBPV způsobuje ochrnutí dospělých včel (Granoff a Webster, 1999). Na jedné straně se objevila vysoká akumulace viru, která byla nalezena v hlavě, hypofaryngeálních, mandibulárních a slinných žlázách, tukovém těle a předních končetinách. Na druhé straně se našlo menší množství v oblasti zadních končetin, středních střev, konečníku a hrudníku (Denholm, 1999).

Jak název napovídá, tato infekce a její patologie ji odlišuje od rychle působících virů akutní a chronické paralýzy (Granoff a Webster, 1999).

---

## 1.8 Sacbrood virus - SBV

Z včel medonosných byla izolována celá řada virů podobných třídě *Picornaviridae*. „Filtrovaný virus“, který byl později v roce 1964 identifikován jako *Sacbrood virus* (SBV), byl poprvé izolován v roce 1913 a přičítán virové infekci v roce 1917 (Grabensteiner, et al. 2001). Izolován byl z včely medonosné a později i z včely asijské (*Apis cerana*) (Granoff a Webster, 1999).

### 1.8.1 Iflavirus

Viz - 1.7.1 Iflavirus

### 1.8.2 Onemocnění

Virus SBV společně s virem chronické paralýzy včel (CBPV) produkují jako jedni z mála klinické příznaky onemocnění. Včelaři jsou schopni jasně příznaky identifikovat na rozdíl od ostatních příznaků jiných virových onemocnění včel. Z jedné strany se předpokládá, že většina virů způsobuje přetrvávající, né však podobné infekce. Na druhou stranu souvislost virové infekce s úmrtím včelstev zůstává stále nevysvětlené (Tentcheva et al., 2004).

SBV je způsobena virem, který se přenáší z dospělých včel do mladých larev. Larvy jsou nejcitlivější ve věku 2 dnů a jsou infikovány žlázovými sekrety infikovaných krmíček (Wang et. al., 2019). SBV se přenáší prostřednictvím roztoče *Varroa destructor* (Grabensteiner et al., 2001)

SBV způsobuje virovou infekci ovlivňující plod včel, která má za následek smrt larev. Larvy postihnuté SBV selhávají a aktivní enzymatická ekdysiální tekutina bohatá na vir, se hromadí pod jejich kůží a tvoří váček. Infikované larvy mění barvu z perlově bílé na bledě žlutou a krátce po smrti vyschnou a vytvoří tmavě hnědý gondolový tvar (Obrázek 1.7) (Grabensteiner et al., 2001; Berényi et al., 2006).



Obrázek 1.7 Gondolový tvar larvy (zdroj: University of Georgia)

---

SBV může také ovlivnit dospělou včelu, ale v tomto případě chybí zjevné klinické příznaky onemocnění. Infikované včely však mohou mít sníženou délku života. SBV se vyskytuje nejčastěji na jaře, kdy kolonie rostou nejrychleji a je k dispozici velké množství vnímavých larev a mladých dospělých včel (Grabensteiner et al., 2001).

---

## 1.9 Včelí imunita

### 1.9.1 Lidské faktory

Některé horizontální virózy lze snadno eliminovat snížením počtu *Varroa destructor* (*Varroa destructor*) ve včelstvu. K šíření viróz také napomáhá šíření infekčních pylových zásob. Je prokázáno, že viry „přežijí“ v pylu po dobu půl roku při běžném skladování plástů (teploty od -6 do +30 °C) (Přidal a Svoboda, 2012)

Viry nelze vymýtit, v podstatě drtivá většina včel je infekční na virózy vyskytující se na našem území. Podle Smrčky (2020) je pro léčbu viróz vhodné použití schválených léčiv pro Českou republiku, které pracují na principu odpařování kyseliny mravenčí – přírodní látka, která nezanechává rezidua a ani roztoči, ani mikroorganismy se proti ní nedokážou bránit. Kyselina je použita v podobě Formidolu.

Formidol (Obrázek 1.8) je preventivní léčivo, které lze použít i bez veterinárního předpisu. Je to odpařovací deska s kyselinou mravenčí o obsahu: 40 ml 85% kyseliny mravenčí v jedné desce. Formidol lze použít od jara do podzimu 3 – 4x ročně (Přidal a Svoboda, 2012)



Obrázek 1.8 Deska formidolu (zdroj: vceliobchod.cz)

Včely se dají také šlechtit na odolnost vůči virům. Existují včelstva, která zkolabují na virózu při nízkém napadení *Varroa destructor* (kolem 3000 roztočů na včelstvo), ovšem jiná včelstva vydrží napadení i mnohatisícové (5 – 12000), bez velkého propuknutí klinických příznaků viróz. Šlechtitel následně vybírá ta včelstva, která snesou vyšší tlak bez poškození virózou (Schittny et al., 2020). Včelaři ovšem také šlechtí na mírnost a vysokou produkci medu (Titěra, 2017).

---

## 1.9.2 Přírodní faktory

Včely se řadí do skupiny „Sociálního hmyzu“ společně s mravenci a termity. Tato skupina je ideálním modelem pro studium mechanismů regulujících přenos nemocí v sociálních skupinách. Sociální hmyz poskytuje ideální prostředí pro přenos patogenů, protože šíření nemoci v koloniích je silně závislé na sociálních interakcích mezi jedinci. I když jsou včely medonosné terčem velkého počtu patogenů, mají podstatně méně genů spojených s vrozenou imunitní odpovědí ve srovnání se „Soliterními druhy hmyzu“. To naznačuje, že včely medonosné si mohli vyvinout alternativní strategii na boj proti patogenům (Evans et al., 2006)

U sociálního hmyzu se vyvinulo několik behaviorálních adaptací, které zajišťují obranu proti parazitům a patogenním infekcím. Behaviorální adaptace se rozdělili do tří skupin. První skupina chování zahrnuje odstranění infikovaných jedinců nebo vyhýbání se zdroji infekce. Včely medonosné snižují dopad patogenních bakterií, hub a parazitů prostřednictvím hygienického chování, kdy dělnice identifikují a odstraňují infikované larvy ze zdravého plodu. Včely medonosné mohou také vyvolat „sociální horečku“, kdy dělnice zvyšují teplotu v plodu, aby zabili larví patogeny (Richard et al., 2008).

Druhý projev behaviorálních odpovědí na infekci zahrnuje změnu chování infikovaného jedince, aby se snížil přenos nemoci. Z infikované včely se stává Létavka, aby měla menší kontakt s plody a královnou. Ačkoli tyto modifikace chování mohou snížit šance a/nebo rychlost parazitického šíření v kolonii, mohly by také odrážet určitou parazitní manipulaci hostitele (Richard et al., 2008).

Třetí skupina chování zahrnuje změnu sociálních interakcí mezi zdravými a nemocnými úly. Zvýšený kontakt mezi zdravými a infikovanými jedinci může mít za následek „očkování“ zdravého jedince a tím zvýšení jeho imunity i imunity včelstva. Snížená pohyblivost infikovaného jedince by mohla snížit šíření patogenů v kolonii (Richard et al., 2008).

Tyto studie naznačují, že včely mohou rozlišovat zdravé a nezdravé jedince, ačkoli v mnoha případech je třeba provést studie na úrovni kolonií, aby se zjistilo, zda úpravy chování skutečně snižují šíření nemoci. Kromě toho nejsou známy mechanismy, pomocí nichž by včely rozlišovaly nemocné a zdravé jedince (Richard et al., 2008).

---

## 2. Cíle práce

- 1) Izolace RNA ze vzorků včelstev vyskytujících se na různém území České republiky.
- 2) Detekce přítomnosti viru akutní paralýzy včel (ABPV), pomalé paralýzy včel (SBPV) a viru pytlíčkovitosti plodu (SBV)
- 3) Shrnutí výskytu virových onemocnění včel v České republice

---

## 3. Metodika

### 3.1.1 Materiál

Pro metodickou část byli k dispozici vzorky zimní generace včel, které byly odebrány v říjnu roku 2019 na území pěti velkých českých měst – Praha, Brno, Plzeň, Ostrava a České Budějovice. Dále pak na pěti zemědělsky intenzivně využívaných oblastí v okolí těchto měst a také pak ve zvláště chráněných územích, které tolik zemědělsky dotčené nejsou. Z každé z 11 oblastí bylo vybráno 5 včelařských lokalit, kde z 5 náhodně vybraných úlů byly odebrány vzorky cca 50 včel. Včely byly okamžitě po odběru usmrceny podchlazením v suchém ledu. Dále byly uchovány při teplotě - 80 °C.

### 3.1.2 Příprava vzorku

Uchované včely v mrazáku v - 80 °C jsem přesunula do polystyrenové misky s nalitým tekutým dusíkem, aby byly včely stále na mrazu a netály. Poté jsem je homogenizovala v třecí misce pomocí tloučku, které byly předem vychlazeny v mrazáku. (Obrázek 3.1). Musela jsem dbát na řádné rozdrcení měkkých tkání včel.



Obrázek 3.1 Rozdrcení včel (zdroj: vlastní)

Rozdrcené včely jsem rychle přesunula pomocí mikrolžičky do označené mikrokumavky o objemu 1,5 ml, ve které byl již napipetovaný roztok TriReagentu čiré růžové barvy (500 ul). Celou práci jsem prováděla v laminárním boxu. Nechala jsem vzorek inkubovat 5 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci jsem do mikrokumavky přidala 200 ul chloroformu (bez IAA – kyselina indol-3-octová) (Obrázek 3.2, 1) a řádně zvortexovala po dobu 15 s, dokud se vzorek



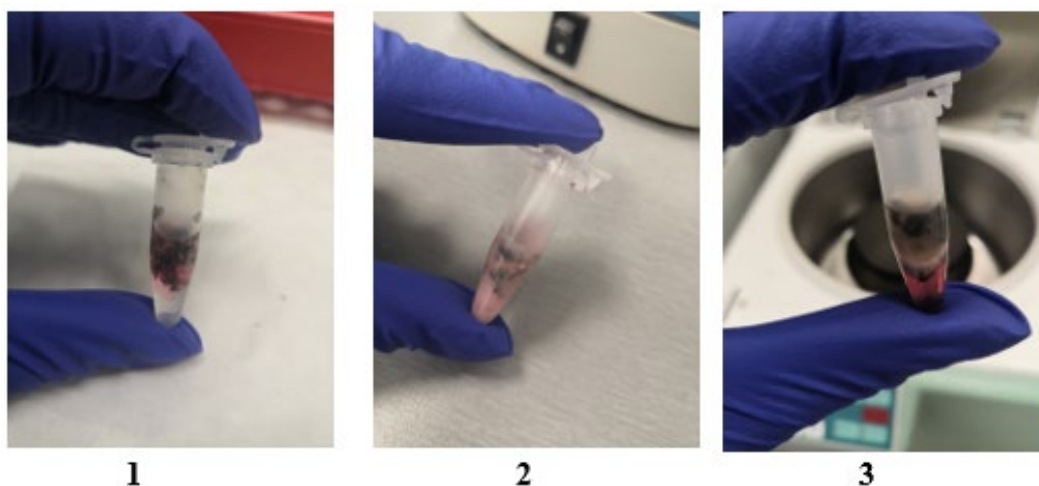
---

nezhomogenizoval. (Obrázek 3.2, 2). Pokud by se tak nestalo, včely v mikrozkušavce vytvoří zábranu mezi reagensii a chloroform se s TriReagentem nesmíchá. A ani po centrifugaci by nenastala v mikrozkušavce žádná změna.

Po třiminutové inkubaci při pokojové teplotě jsem dala vzorky centrifugovat při 14000 rpm na 15 min, při teplotě 4 °C. Následně jsem oddělila supernatant (čirá tekutina) od sedimentu (růžová tekutina a rozdrčené včely) (Obrázek 3.2, 3).

V další fázi izolace jsem k supernatantu přidala 500 ul isopropanolu a opatrně jsem je spolu promíchala pomalým převracením ze strany na stranu, abych nerozbila řetězce RNA. Poté jsem vzorek inkubovala 10 minut při pokojové teplotě a dala jsem ho centrifugovat při 14 000 rpm na 10 minut při 4 °C. Opět jsem oddělila supernatant od sedimentu (vysrážená RNA). V tomto případě mě zajímal sediment, a proto jsem supernatant opatrně odpipetovala do odpadu.

Do mikrozkušavky k sedimentu jsem napipetovala 1 000 ul 75 % ethanolu, aby se RNA shlukla a tím se separovala z roztoku. Poté jsem dala vzorek opět zcentrifugovat při 14 000 rpm na 5 minut při 4 °C a supernatant jsem z mikrozkušavky odstranila. Pelet jsem dala na 30 minut usušit na pracovní plochu. Nakonec jsem pelet dala rozpustit na 10 minut ve 100 ul DEPC vody při 60 °C, přičemž jsem v průběhu vzorek vortexovala. Rozpuštěný vzorek jsem dala na led, aby izolovaná RNA nedegradovala.



Obrázek 3.2 Izolace (zdroj: vlastní)

---

### 3.1.3 Měření koncentrace RNA

K měření koncentrace vyizolované RNA jsem použila „spektrofotometr pro biologické vědy“ BioSpec-nano.

Tento spektrofotometr je vhodný pro měření koncentrace vzorků nukleových kyselin. Kvantifikace DNA a RNA lze rychle a jednoduše provést s velmi málo objemnými vzorky v rozmezí od 1 ul. Propustnost analýzy je vylepšena díky specializovaným funkcím, jako je automatické čtení vzorků, následné vyčištění plochy a snadno použitelný operační software spektrofotometru. (Shimadzu, 2020)

Po zapnutí a automatickém nastavení přístroje, jsem napipetovala 1 ul DEPC vody na měřicí terčík a změřila BLANK. Poté jsem napipetovala 1 ul vyizolovaného RNA vzorku na měřicí terčík. V počítačovém programu jsem vzorek nadepsala příslušným názvem a zvolila tlačítko „Measure“. Na obrazovce se poté objevila naměřená hodnota a graf. Biotech-nano si následně sám terčík vyčistil. Vzorek jsme pak vrátili do ledu a dali uchovat do -80 °C. Ideální naměřená hodnota byla nad 100 ng/ul.

### 3.1.4 Přepis RNA do cDNA

Reverzní transkripci provádíme z důvodu, že RNA nelze amplifikovat pomocí *Tag* polymerázy v běžné PCR reakci. Protože v momentální době nebyla nalezena RNA termostabilní polymeráza, která by se dala použít v PCR reakci. Proto je nutné RNA přepsat do formy cDNA. V této části práce se snažíme mít co nejčastěji RNA na ledu.

Vzorky RNA jsem přesunula z mrazáku (-80 °C) na led. Jako první jsem potřebovala přečistit RNA. K tomu jsem použila komerčně dostupný kit na přečištění. Do nové označené mikrozkušavky jsem napipetovala reagenty:

- 2 ul objemu „10x DNase buffer“
- 1 ul rDNase
- 20 ul vzorku vyizolované RNA

Reagenty jsem promíchala pomocí vortexu a dala inkubovat na 20 minut při 37 °C. Poté jsem do směsi přidala 2 ul objemu DNase inactivation reagentu a nechala stát 2 minuty při pokojové teplotě. Mikrozkušavku se vzorkem jsem dala do centrifugy, která byla nastavena na 10 000 rpm na 90 s. Poté jsem oddělila supernatant (přečištěná RNA) od sedimentu (nečistoty) a přenesla ho do nové označené mikrozkušavky.

---

Po přečištění RNA jsem mohla přejít k vlastní syntéze cDNA, ke které jsem použila komerčně dostupný kit. Celou syntézu jsem pracovala na ledu. Jako první se museli navázat primery na RNA. Do čistě mikrozkuřavky jsem napipetovala:

- 1 ul Nuklease free H<sub>2</sub>O
- 1 ul Oligo (dT) 15 primer
- 3 ul přečištěné RNA

Tuto směs jsem dala inkubovat na 5 minut při 70 °C. Mezitím jsem si v jiné mikrozkuřavce připravila Master mix pro reverzní transkripci o celkovém objemu 15 ul:

- 6,6 ul Nuclease free H<sub>2</sub>O
- 1 ul dNTP
- 1 ul RxN Buffer
- 2,4 ul MgCl<sub>2</sub>
- 1 ul RT enzym – V teple je nestabilní, proto jsem ho musela přidat až nakonec

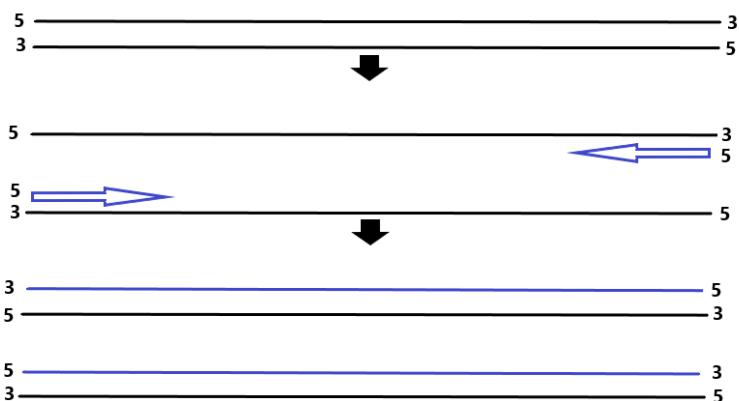
Celé množství namíchaného Master mixu jsem přepipetovala k RNA s primerem a nechala inkubovat 5 minut při 25 °C a poté 60 minut při 42 °C. Nakonec jsem vzorek naředila stejným množstvím, tedy 20 ul, PCR vodou.

### 3.1.5 PCR (Polymerázová řetězová reakce)

K této práci jsem použila end-point PCR, kdy výsledek vidíme až po skončení reakce, oproti např. Real-time PCR, při které výsledky můžeme pozorovat v průběhu reakce.

Polymerázová řetězová reakce využívá podobného principu jako při replikaci v buňce. Aby došlo k syntéze DNA využívá se termostabilní DNA polymerázy, která nasedá na templátový úsek DNA s již nasedlým primerem. Polymeráza tak startuje od primeru (námi navrhnutý krátký oligonukleotid) a pomocí volných nukleotidů sestavuje druhé vlákno podle komplementarity bazí. Tím ve výsledku vzniknou dvě komplementární vlákna.

Při reakci se využívají 3 reakční fáze. Pomocí denaturace je dvouřetězové vlákno separováno na dvě jednořetězová vlákna a reakce může dále probíhat na stejném principu. Při následné fázi annealingu nasedá primer na jednořetězové vlákno. A nakonec následuje fáze elongace, při které DNA polymeráza dosyntetizuje úsek DNA (Obrázek 3.3).



Obrázek 3.3 Schéma PCR reakce (zdroj: vlastní)

Tyto kroky se cyklicky opakují obvykle 35x a následně vzniká více než 1 miliarda molekul DNA.

Pro tuto práci jsem použila Termocycler T 3000 od společnosti Biometra (Obrázek 3.4). Tento termocycler má k dispozici 3 bloky, které se dají nastavit na různé programy. Programování je jednoduché a usnadňuje ho vysoce jasný grafický LCD displej. Celková kapacita je 1500 programovacích kroků, což odpovídá 250 průměrným programům. Termocycler má teplotní rozsah od -3 °C až 99,9 °C. (Biocomare, 2007).



Obrázek 3.4 Termocycler T3000 (zdroj: vlastní)

### 3.1.6 Příprava primerů

Jako první jsem si připravila primery. Primery přišly od výrobce (MacroGen) v lyofilizovaném stavu, a proto jsem je musela nejdříve naředit, a to na koncentraci 100 pmol/ul. Množství sterilní vody, které jsem musela přidat k primeru, bylo napsané na zkumavce (množství vody je specifické pro množství zaslaného primeru). Po přidání vody jsem primer dala zahřát na 37 °C. Dále jsem primer dostatečně zvortexovala a stočila. Tím vznikl zásobní roztok primeru, který jsem musela znovu naředit v poměru 1:10. Do nové mikrozkuhavky jsem napipetovala 10 ul primeru a 90 ul sterilní vody. Při ředění jsem používala špičky s filtrem, aby nedošlo k žádné kontaminaci.

V mé práci byly použity primery ABPV a SBV navržené podle Tencheva et al. (2004). Pro SBPV jsem použila primery navržené dle Miranda et al. (2010). Použité primery jsou znázorněny v tabulce (Tabulka 3.1).

Tabulka 3.1 Použité primery (zdroj: Tencheva et al. 2004; Miranda et al. 2010)

Vir	Sekvence primeru (5'-3')	Velikost produktu (bp)	Publikováno
ABPV	<i>TGAGAACACCTGTAATGTGG (F)</i>	452	Tencheva et al. (2004)
	<i>ACCAGAGGGTTGACTGTGTG (R)</i>		
SBPV	<i>GCGCTTTAGTTCAATTGCC (F)</i>	226	Miranda et al. (2010)
	<i>ATTATAGGACGTGAAAATATAC</i>		
SBV	<i>GGATGAAAGGAAATTACCAG (F)</i>	426	Tencheva et al. (2004)
	<i>CCACTAGGTGATCCACACT (R)</i>		

### 3.1.7 Vlastní PCR

Nejdříve jsem si nastavila programy pro detekci jednotlivých virů (Tabulka 3.2; Tabulka 3.3; Tabulka 3.4).

Tabulka 3.2 PCR ABPV

<i>ABPV</i>		
<i>Fáze</i>	<i>Teplota</i>	<i>Čas</i>
<i>1. Denaturace</i>	95 °C	5 min
<i>Denaturace</i>	95 °C	45 s
<i>Annealing</i>	48 °C	30 s
<i>Ellongace</i>	72 °C	1 min
<i>Cykly</i>	35x	
<i>Závěrečná ellongace</i>	72 °C	10 min
<i>Závěr</i>	4 °C	∞

Tabulka 3.3 PCR SBPV

<i>SBPV</i>		
<i>Fáze</i>	<i>Teplota</i>	<i>Čas</i>
<i>1. Denaturace</i>	95 °C	5 min
<i>Denaturace</i>	95 °C	45 s
<i>Annealing</i>	60 °C	30 s
<i>Ellongace</i>	72 °C	1 min
<i>Cykly</i>	35x	
<i>Závěrečná ellongace</i>	72 °C	10 min
<i>Závěr</i>	4 °C	∞

Tabulka 3.4 PCR SBV

<i>SBV</i>		
<i>Fáze</i>	<i>Teplota</i>	<i>Čas</i>
<i>1. Denaturace</i>	<b>95 °C</b>	<b>5 min</b>
<i>Denaturace</i>	<b>95 °C</b>	<b>45 s</b>
<i>Annealing</i>	<b>48 °C</b>	<b>30 s</b>
<i>Ellongace</i>	<b>72 °C</b>	<b>1 min</b>
<i>Cykly</i>	<b>35x</b>	
<i>Závěrečná ellongace</i>	<b>72 °C</b>	<b>10 min</b>
<i>Závěr</i>	<b>4 °C</b>	<b>∞</b>

Připravila jsem si vychlazený stojánek, polystyrenovou misku s ledem a popsané mikrozkuhavky (stripy) o objemu 0,1 ml. Z mrazáku jsem vyndala roztoky pro PCR a přeepsané vzorky do cDNA, které jsem následně rozmrazila, zvortexovala a stočila v mikrocentrifuze. Poté jsem je dala zpátky na led.

Do mikrozkuhavek jsem napipetovala:

- 1 ul cDNA
- 5 ul Master mixu
- 2 ul PCR H<sub>2</sub>O
- 1 ul Primeru Forward
- 1 ul Primeru Revers

Tím jsem připravila reakční směs o objemu 10 ul. Pro PCR reakci jsem také připravila negativní kontrolu, abych zjistila, jestli se primer neváže nespecificky. Do stripu jsem napipetovala vše dle návodu, kromě DNA. Vzorky jsem řádně promíchala, stočila a dala zpátky na led. Mezitím jsem zapnula PCR reakci, aby se nahřál bloček na stripy. Když byl bloček dostatečně nahřátý, zmáčkla jsem tlačítko „pause“ a umístila vzorky do termocycleru. Pak jsem zmáčkla tlačítko „pokračovat“ a PCR pokračovala podle nastaveného programu.

---

### 3.1.8 Optimalizace reakce

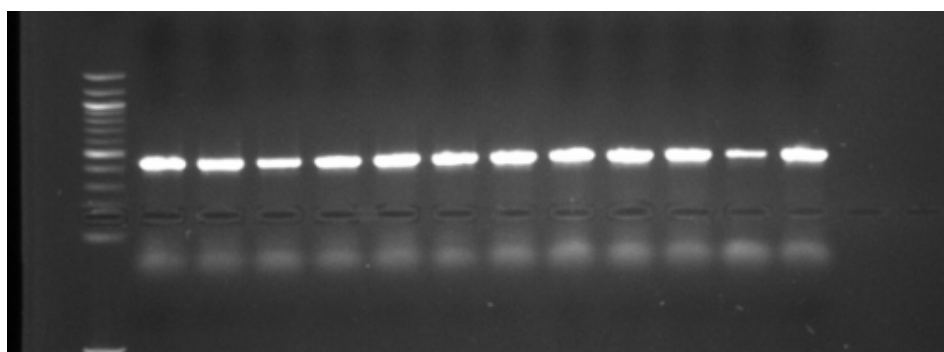
Když mi reakce PCR nevyšla podle doporučených teplot (vznik nespecifických fragmentů), použila jsem metodu PCR gradient. Pomocí této metody se optimalizuje vhodná teplota annealingu pro primer v jedné reakci.

Při této reakci jsem použila jeden vzorek, který jsem namíchala do 12 mikrozkušavek ve stejném množství. A ve stejném složení jako při předešlé PCR. Protože jsem prováděla gradient pro ABPV, který měl teplotu annealingu 48 °C, nastavila jsem teplotu gradientu od 48,0 °C do 55,6 °C (Tabulka 3.5). A provedla PCR.

Tabulka 3.5 Nastavené teploty gradientu (zdroj: vlastní)

Teplota (°C)											
48,0	48,7	49,4	50,1	50,8	51,5	52,2	52,9	53,6	54,3	55,0	55,6

PCR produkty jsem umístila na 1,5 % agarózový gel. U výsledné elektroforézy (Obrázek 3.5) se neobjevily žádné nespecifické proužky, a proto jsem použila prostřední hodnotu navrhované teploty 52,0 °C.



Obrázek 3.5 Elektroforéza - Gradient



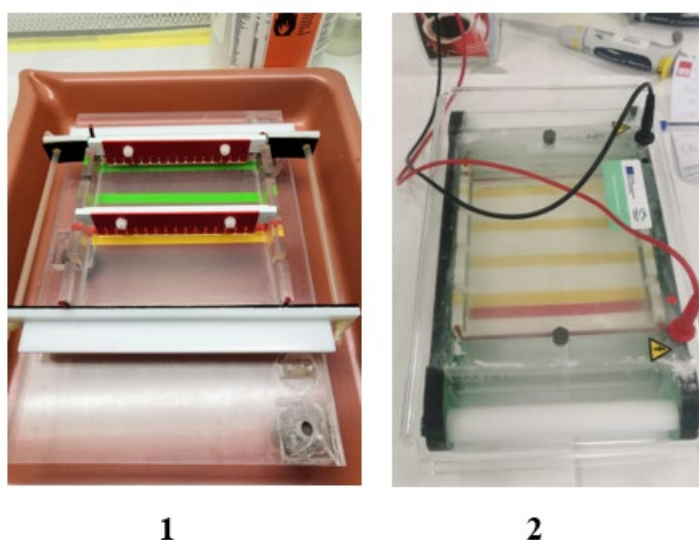
### 3.1.9 Elektroforéza

Separční metoda založená na rozdílné pohyblivosti složek vzorku v elektrickém poli. Vzorek se separuje do gelu na základě jeho molekulární hmotnosti.

Jako první jsem si nařadila Lader (žebřík). Do mikrozkušavky jsem z komerčně dostupného kitu napipetovala 1 ul Ladderu, 2 ul barvy a 10 ul vody.

Navázila jsem si 1,5 g agarózy a kvantitativně převedla do baňky spolu se 110 ml pufru, abych získala 1,5 % agarózový gel. Roztok jsem zahřívala v mikrovlnné troubě, dokud se agaróza plně nerozpustila a roztok se nestal čirým. Zahřátý gel jsem schladila pod tekoucí vodou na cca 70 °C a přidala do něj 8 ul ethyidium bromidu, díky kterému se zviditelní vzorek na gelu pod UV lampou. (pracovala jsem v rukavicích a s pečlivostí, protože ethyidium bromid je vysoce karcinogenní látka). Tekutý gel jsem vylila do formy na gel s bočním těsněním, aby tekutina nevytekla a s hřebínkem pro vytvoření určitých jamek pro umístění vzorku (Obrázek 3.6, 1). Po 10 minutách byl gel již dostatečně ztuhlý, aby se z něj dalo sundat těsnění. Gel jsem přemístila do elektroforetické vany s nalitým TBE puftrem a podle potřeby ho doplnila.

Ladder jsem napipetovala na první místo v gelu a na druhé místo jsem umístila negativní kontrolu. PCR produkt, který už je smíchaný s kontrastní látkou (z Master Mixu), jsem po 5 ul napipetovala do vzniklých jamek v gelu od třetího místa. Elektroforetickou vanu jsem zavřela víkem a napojila elektrody do zdroje (Obrázek 3.6, 2). Zdroj jsem nastavila nejprve na 120 V na prvních 10 minut a poté snížila na 90 V na délku zbylých 40 minut.



Obrázek 3.6 Elektroforéza (zdroj: vlastní)

---

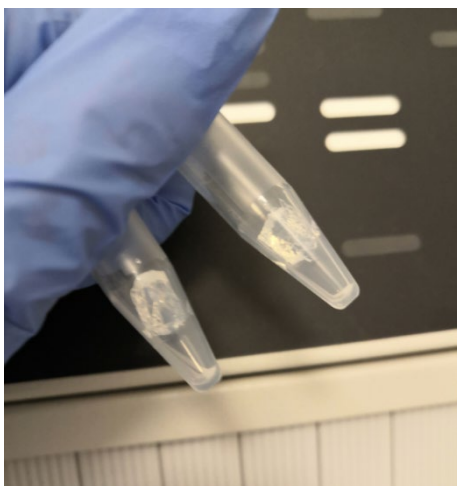
Hotový gel jsem přesunula na UV lampu do transluminátoru a otevřela obraz v počítačovém programu příslušného zařízení. Gel jsem vyfotografovala a upravila v programu.

### 3.1.10 Vyřezávání z gelu

Do transluminátoru jsem vložila gel a vyfotila jsem si ho. Vypnula UV světlo. V programu jsem z fotografie zjistila vznik/umístění proužku, který následně pošlu na sekvenování. Otevřela jsem dvířka transluminátoru a vysunula stolek s gelem. Před přístroj jsem si postavila plexisklový štít, abych zabránila kontaktu očí s UV světlem.

Rozsvítla jsem si UV světlo (vypnutím pojistky v horním pravém rohu), a tím jsem si zviditelnila proužky. Použila jsem očištěný skalpel a vyřízla proužek s co nejméně zbytečným gelem okolo. Mezi každým vzorkem jsem pomůcky očistila, aby se vzorek nekontaminoval. Vyříznutý gel jsem přesunula pomocí očištěné pinzety do připravené mikrozkušavky (Obrázek 3.7).

Pracovat jsem musela rychle, aby UV světlo nevysvítlo ethydium bromid. Pak by proužek nebyl dále vidět.



Obrázek 3.7 Vyříznutý gel v mikrozkušavce  
(zdroj: vlastní)

---

### 3.1.11 DNA extrakce z agarózového gelu

Abych mohla pokračovat s DNA, která byla obsažena v gelu, musela jsem gel převést do tekutého stavu pomocí kitu „NucleoSpin Gel and PCR Clean-up“.

Před vlastním rozpouštěním gelu jsem nejdříve nechala nahřát inkubátor na 50 °C. Do stejné mikrozkušavky s vyříznutým gelem jsem napipetovala 200 ul roztoku NTL. Vzorek jsem zvortexovala a umístila do nahřátého bločku na 5-10 minut. Během inkubace jsem vzorek průběžně promíchávala, aby se gel snadněji rozpustil.

Připravila jsem si kolonku, do které jsem následně převedla vzorek (minimálně 700 ul). Kolonku jsem dala zcentrifugovat při 11 000 rpm na 30 s při pokojové teplotě, DNA se zachytila na kolonku a sediment ve spodní části jsem vylila. Dále jsem na kolonku napipetovala 700 ul roztoku Buffer NT3. Opět jsem dala vzorek centrifugovat při 11 000 rpm na 30 s při pokojové teplotě. Spodní část jsem vylila a tento krok jsem znovu opakovala.

Při posledním kroku jsem kolonku přesunula do nové označené mikrozkušavky, ve které budu DNA dále uchovávat. Pozorně jsem napipetovala 20 ul roztoku Buffer NE na bílý terčík na kolonce. Mikrozkušavku s kolonkou jsem dala centrifugovat na 1 minutu při pokojové teplotě na maximální výkon.

V mikrozkušavce mi zůstalo 20 ul DNA a kolonku jsem vyhodila.

### 3.1.12 Přečištění PCR produktu pomocí Exosapu

Nejdříve jsem provedla PCR reakci následovanou přečištěním produktu pomocí Exosapu. Exosap je enzym, který se musí uchovávat v mrazu, aby nedegradoval. Proto jsem ho před použitím dala do vychlazeného stojánku a po použití hned zpátky do mrazáku.

Jako první jsem si nechala nahřát inkubátory na 37 °C a na 80 °C. K rozpuštěnému gelu (PCR produkt) v mikrozkušavce jsem napipetovala 2 ul Exosapu a zvortexovala. Získala jsem vzorek o objemu 20 ul. Poté jsem vzorek dala inkubovat na:

- 15 minut při 37 °C
- 15 minut při 80 °C

Po inkubaci jsem k vzorku přidala 5 ul Forward primeru.

---

### 3.1.13 Sekvenování

Sangerova metoda sekvenování využívá proces replikace DNA jako při PCR. Typické provedení metody se provádí tak, že k jednořetězcové DNA nasedá 15-25 bp dlouhý primer, který je komplementární k řetězci DNA. Od navázaného primeru probíhá syntéza DNA pomocí DNA polymerázy. Syntéza probíhá za přítomnosti deoxynukleotidů (dNTP - dATP, dCTP, dGTP, dTTP) a jednoho z dideoxynukleotidu (ddNTP – ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP), který je zastoupen v poměru 1:100 deoxynukleotidům.

Dříve se prováděla metoda v jednotlivých zkumavkách (zkumavka pro jeden ddNTP). V dnešní době se Sangerova metoda již provádí v kapilárním sekvenátoru. Sekvenování se provádí z velké části ve specializovaných pracovištích. Jednotlivé fragmenty DNA jsou předpřipravené v PCR, tedy jsou amplifikované. Při jednom běhu sekvenátoru jsme schopni získat maximálně 96 sekvencí o délce cca 700 bp a tedy maximální výtěžek z jednoho běhu sekvenátoru je cca 67 bp. Chybovost metody se pohybuje kolem 1,5 % (Klasické metody sekvenování, 2019).

Vzorky získané z PCR, které jsem vyřízla z gelu, jsem následně rozpustila pomocí komerčně dostupnému kitu. Rozpuštěné vzorky jsem přečistila Exosapem za působení dvou různých teplot. Poté jsem přidala ke vzorkům 5 ul příslušného Forward primeru. Získala jsem výsledný objem vzorku 25 ul. Vytvořila jsem objednávku do specializované firmy SEQme (vzorek jsem namíchala dle instrukcí firmy). Mikrozkušavky jsem řádně označila a odnesla do sběrné schránky, umístěné na přírodovědecké fakultě.

Výsledky jsem dostala za 2 dny v elektronické podobě ve třech formách uložení (FASTA, .phd, .seq). Soubor FASTA jsem vyhodnotila v počítačovém programu BioEdit. Poté jsem přečtené báze zkopírovala a vložila do webového nástroje BLAST (Madden et al., 1996) od internetové domény <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (NCBI Resouce Coordinators, 2018). V programu jsem zjistila, zda jsem hledaný vir opravdu detekovala a s jakou procentuální přesností odpovídá stejným/podobným virům uloženým v databázi.

---

## 4. Výsledky

V rámci výzkumu včelích onemocnění, byly získány vzorky zimní generace včel, odebrané v říjnu roku 2019 na území pěti velkých českých měst – Praha, Brno, Plzeň, Ostrava a České Budějovice. Z každé z 11 oblastí bylo vybráno 5 včelařských lokalit, kde z 5 náhodně vybraných úlů byly odebrány vzorky cca 50 včel.

Následně bylo izolováno 206 vzorků včel z 50 stanovišť a změřena koncentrace vyizolované RNA (Tabulka 4.1). Dále pak byla RNA přepsána do cDNA, na ní byla provedena PCR a pozitivní vzorky byly následně zaslány na sekvenování.

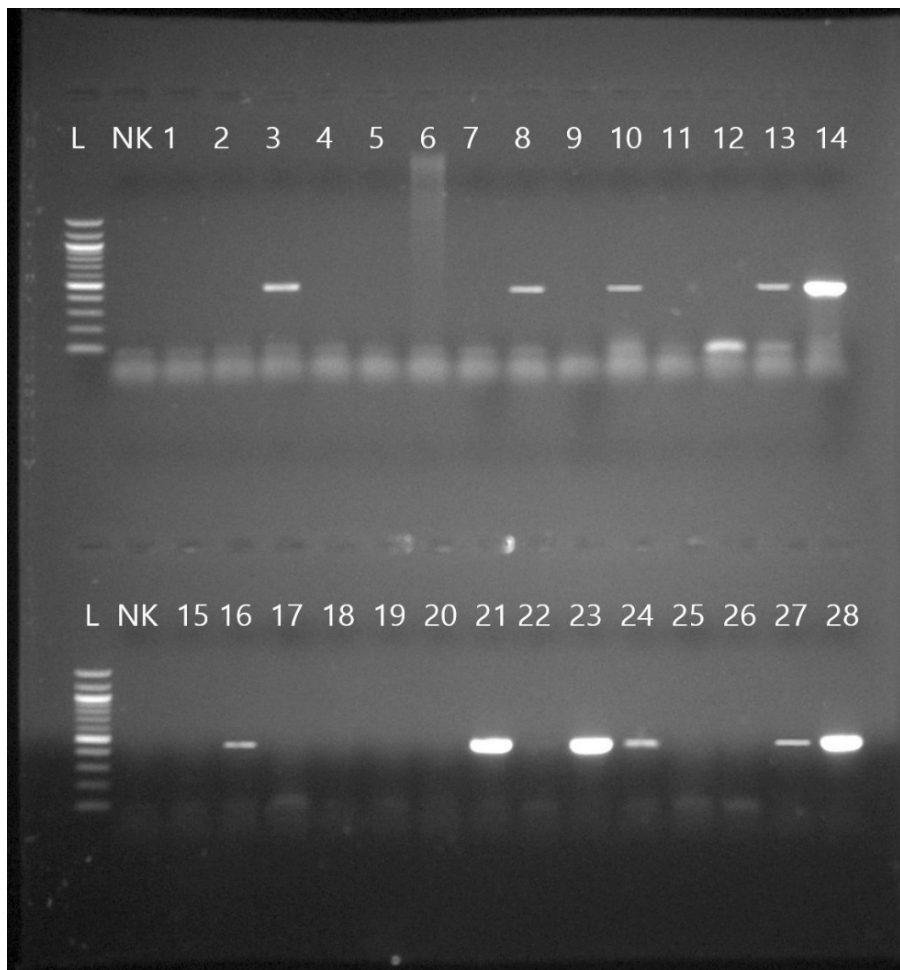
Tabulka 4.1 Naměřená koncentrace RNA

Číslo vzorku	Stanoviště	Naměřená Koncentrace (ng/ul)	Číslo vzorku	Stanoviště	Naměřená Koncentrace (ng/ul)
	<b>České Budějovice centrum</b>		26	NS	304,41
1	HU	163,95	27	BY	463,14
2	ST	121,46	28	SP	479,11
3	PL	196,30		<b>Plzeň centrum</b>	
4	VR	137,11	29	BP	624,24
5	BM	648,05		<b>Plzeň venkov</b>	
6	CHB	128,45	30	TŘ	194,94
	<b>České Budějovice venkov</b>		31	ŠN	104,46
7	DO	241,53	32	HN	140,41
8	MA	261,25	33	MAN	362,78
9	IB	151,73	34	SM	248,76
10	MAL	235,67		<b>Ostrava centrum</b>	
	<b>Šumava</b>		35	ZOB	535,70
11	AR	289,58	36	BO	343,10
12	PO	380,23	37	OL	276,46
13	VN	262,69	38	OM	1048,23
14	GB	570,02	39	OS	193,90
15	KV	446,67		<b>Ostrava venkov</b>	
16	DE	312,23	40	RV	340,76
	<b>Praha centrum</b>		41	HJ	171,79
17	PS	531,57	42	BU	328,97
18	PSS	293,72	43	VF	381,00
19	PF	453,52	44	HA	96,01
20	PHI	545,44	45	HSP	357,77
21	PZM	695,72		<b>Brno centrum</b>	
22	PZK	493,85	46	BC	593,96
	<b>Praha venkov</b>		47	MH	456,30
23	UJ	1017,45	48	MH2	376,45
24	BK	652,50	49	BB	160,23
25	BO	364,28	50	BM	648,05

---

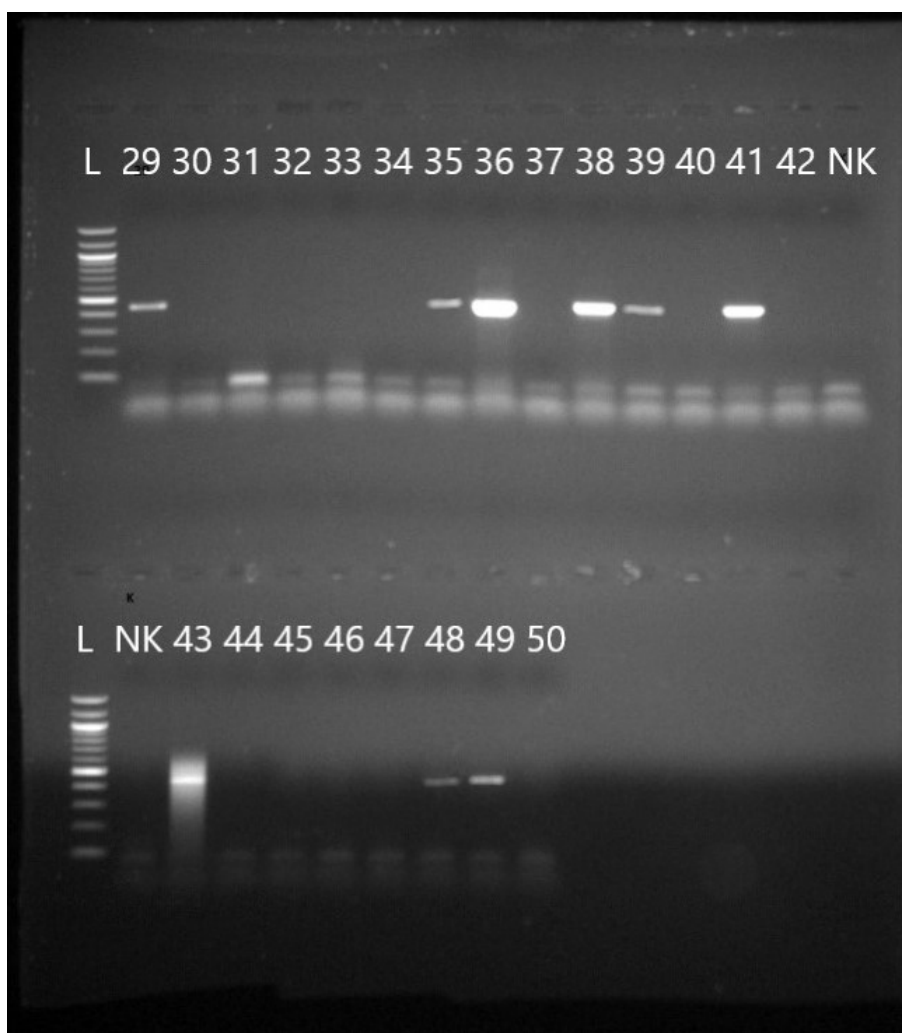
## 4.1 ABPV

Po přepsání RNA do cDNA byla provedena PCR reakce. Byla použita teplota annealingu 52,0 °C.



Obrázek 4.1 Elektroforeogram PCR vyšetření vzorků č. 1 – 28 na přítomnost viru ABPV: L – Ladder (100bp), NK – Negativní kontrola, 1- vzorek č.1 (HU), 2 - vzorek č. 2 (ST), 3 – vzorek č. 3 (PL), 4- vzorek č.4 (VR), 5 - vzorek č. 5 (BM), 6 – vzorek č. 6 (CHB), 7- vzorek č.7 (DO), 8 - vzorek č. 8 (MA), 9 – vzorek č. 9 (IB), 10- vzorek č.10 (MAL), 11 – vzorek č. 11 (AR), 12 - vzorek č. 12 (PO), 13 – vzorek č. 13 (VN), 14- vzorek č.14 (GB), 15 - vzorek č. 15 (KV), 16 – vzorek č. 16 (DE), 17- vzorek č. 17 (PS), 18 - vzorek č. 18 (PSS), 19 – vzorek č. 19 (PF), 20- vzorek č.20 (PHI), 21 - vzorek č. 21 (PZM), 22 – vzorek č. 22 (PZK), 23- vzorek č.23 (UJ), 24 - vzorek č. 24 (BK), 25 – vzorek č. 25 (BO), 26- vzorek č.26 (NS), 27 - vzorek č. 27 (BY), 28 – vzorek č. 28 (SP)

Na obrázku Obrázek 4.1 je zobrazen výsledek PCR detekce viru ABPV u vzorků č. 1-28. Z obrázku vyplývá, že pozitivní výsledek vyšel u vzorků č. **3, 8, 10, 13, 14, 16, 21, 23, 24, 27 a 28**. Vzorky č. 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 15, 17, 18, 19, 20, 22, 25 a 26 vyšly s negativním výsledkem.



Obrázek 4.2 Elektroforeogram PCR vyšetření vzorků č. 29 – 50 na přítomnost viru ABPV: L – Ladder (100bp), NK – Negativní kontrola, 29- vzorek č. 29 (BP), 30 - vzorek č. 30 (TR), 31 – vzorek č. 31 (SN), 32- vzorek č.32 (HN), 33 - vzorek č. 33 (MAN), 34 – vzorek č. 34 (SM), 35- vzorek č.35 (ZOB), 36 - vzorek č. 36 (BO), 37 – vzorek č. 37 (OL), 38- vzorek č.38 (OS), 39 - vzorek č. 39 (RV), 40 – vzorek č. 41 (HJ), 42- vzorek č.42 (BU), 43 - vzorek č. 43 (VF), 44 – vzorek č. 44 (HA), 45- vzorek č.45 (HSP), 46 - vzorek č. 46 (BC), 47 – vzorek č. 47 (MH), 48- vzorek č.48 (MH2), 49 - vzorek č. 49 (BB), 50 – vzorek č. 50 (BM)

Z výsledného PCR viru ABPV, u vzorků 29-50 (Obrázek 4.2), bylo detekováno 9 pozitivních vzorků a to vzorky č. **29, 35, 36, 38, 39, 41, 43, 48** a **49**. Vzorky č. 30, 31, 32, 33, 34, 37, 40, 42, 44, 45, 46, 47, 50 vyšly s negativním výsledkem.

Celkem bylo nalezeno 20 pozitivních ABPV vzorku. Vzorek č. 41 byl vybrán k následnému sekvenování. Jeho proužek byl vyříznut z gelu, rozpuštěn a přečištěn pomocí Exosapu. Poté byl k vzorku přidán Forward primer viru ABPV a byl zaslán



na sekvenování do firmy SEQme. Výsledná sekvence byla zkontrolována v počítačovém programu BioEdit (Obrázek 4.3).



Obrázek 4.3 Výsledná sekvence ABPV vz. č. 41

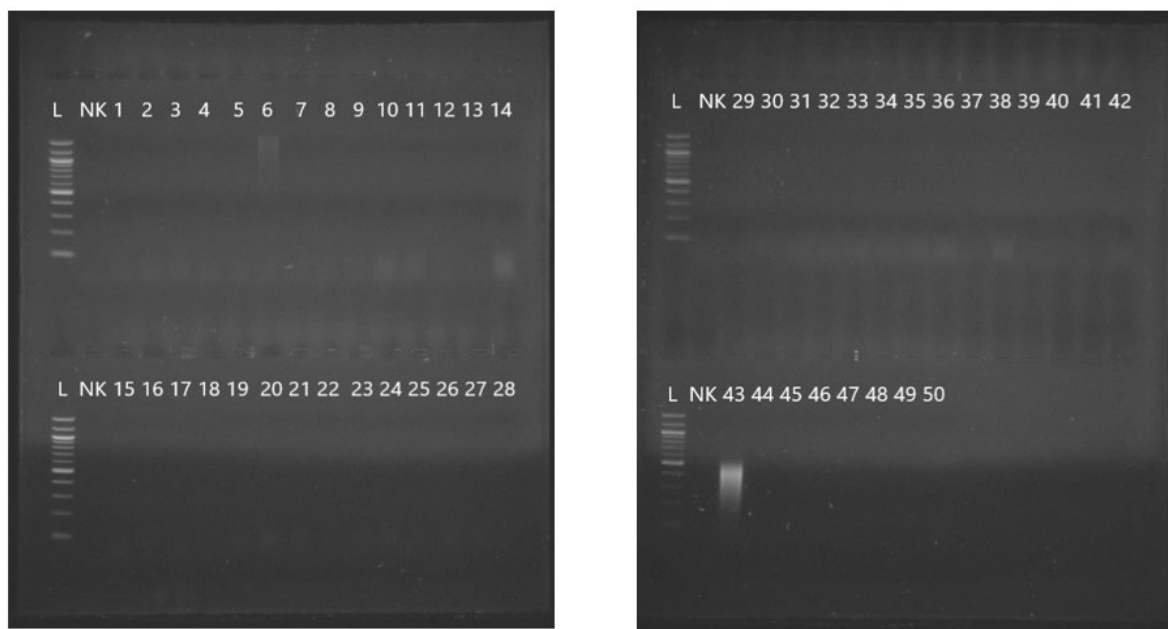
Sekvenci vzorku jsem následně vložila do webového nástroje BLAST, abych zjistila, zda jsou použité primery specifické (Obrázek 4.4). Sekvence vykazovala téměř 100 % shodu se sekvencemi viru ABPV v databázi NCBI.

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Acute bee paralysis virus isolate 277/2017 nonstructural protein gene, partial cds</a>	<a href="#">Acute bee paraly...</a>	481	481	100%	1e-131	99.25%	408
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Acute bee paralysis virus isolate 247/2016 nonstructural protein gene, partial cds</a>	<a href="#">Acute bee paraly...</a>	481	481	100%	1e-131	99.25%	408
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Acute bee paralysis virus isolate 246/2016 nonstructural protein gene, partial cds</a>	<a href="#">Acute bee paraly...</a>	481	481	100%	1e-131	99.25%	408

Obrázek 4.4 Analýza sekvence vzorku č. 41 pomocí webového nástroje BLAST

## 4.2 SBPV

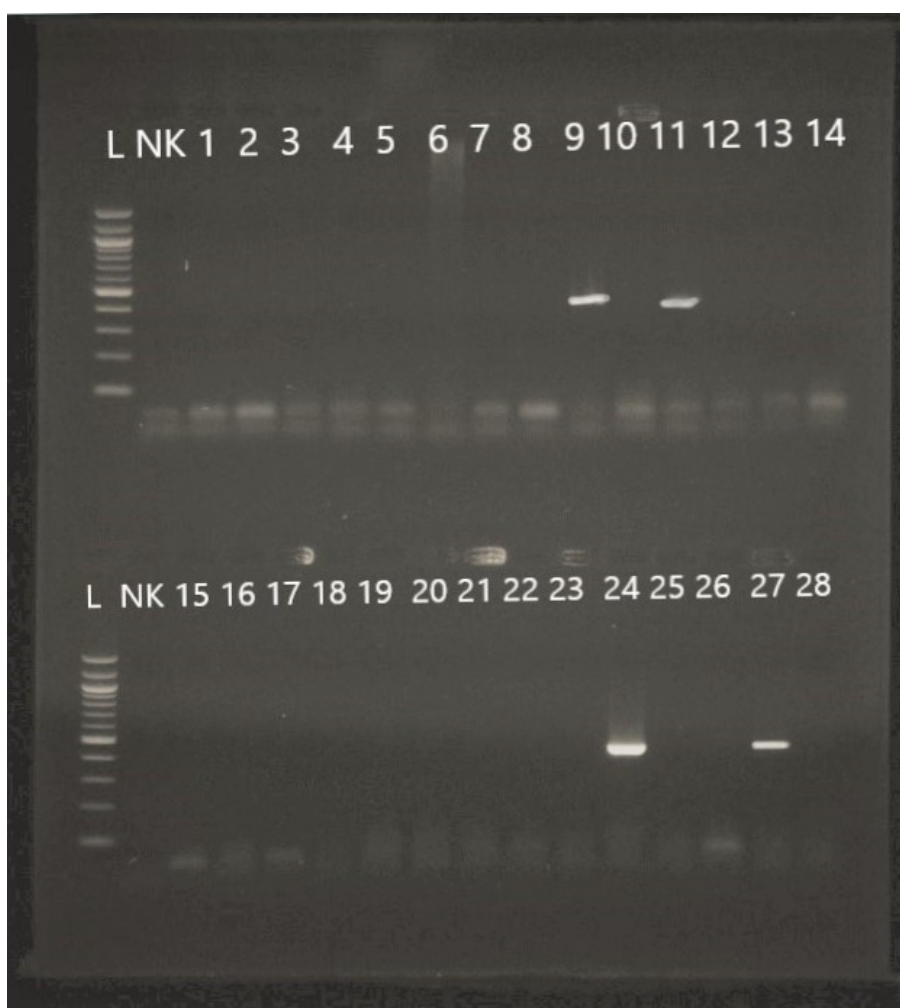
Po izolaci byla převedena RNA do cDNA, aby mohla proběhnout detekce pomocí PCR. V rámci doporučených hodnot annealingu, byla použita teplota 60 °C (Obrázek 4.5). Všechny vzorky byly negativní.



Obrázek 4.5 Elektroforeogram PCR vyšetření vzorků č. 1 – 28 a 29 – 50 na přítomnost viru SBPV: L – Ladder (100bp), NK – Negativní kontrola, 1- vzorek č.1 (HU), 2 - vzorek č. 2 (ST), 3 – vzorek č. 3 (PL), 4- vzorek č.4 (VR), 5 - vzorek č. 5 (BM), 6 – vzorek č. 6 (CHB), 7- vzorek č.7 (DO), 8 - vzorek č. 8 (MA), 9 – vzorek č. 9 (IB), 10- vzorek č.10 (MAL), 11 – vzorek č. 11 (AR) 12 - vzorek č. 12 (PO), 13 – vzorek č. 13 (VN), 14- vzorek č.14 (GB), 15 - vzorek č. 15 (KV), 16 – vzorek č. 16 (DE), 17- vzorek č. 17 (PS), 18 - vzorek č. 18 (PSS), 19 – vzorek č. 19 (PF), 20- vzorek č. 20 (PHI), 21 - vzorek č. 21 (PZM), 22 – vzorek č. 22 (PZK), 23- vzorek č.23 (UJ), 24 - vzorek č. 24 (BK), 25 – vzorek č. 25 (BO), 26- vzorek č.26 (NS), 27 - vzorek č. 27 (BY), 28 – vzorek č. 28 (SP), 29- vzorek č.29 (BP), 30 - vzorek č. 30 (TRĚ), 31 – vzorek č. 31 (ŠN), 32- vzorek č.32 (HN), 33 - vzorek č. 33 (MAN), 34 – vzorek č. 34 (SM), 35- vzorek č.35 (ZOB), 36 - vzorek č. 36 (BO), 37 – vzorek č. 37 (OL), 38- vzorek č.38 (OS), 39 - vzorek č. 39 (RV), 40 – vzorek č. 41 (HJ), 42- vzorek č.42 (BU), 43 - vzorek č. 43 (VF), 44 – vzorek č. 44 (HA), 45- vzorek č.45 (HSP), 46 - vzorek č. 46 (BC), 47 – vzorek č. 47 (MH), 48- vzorek č.48 (MH2), 49 - vzorek č. 49 (BB), 50 – vzorek č. 50 (BM)

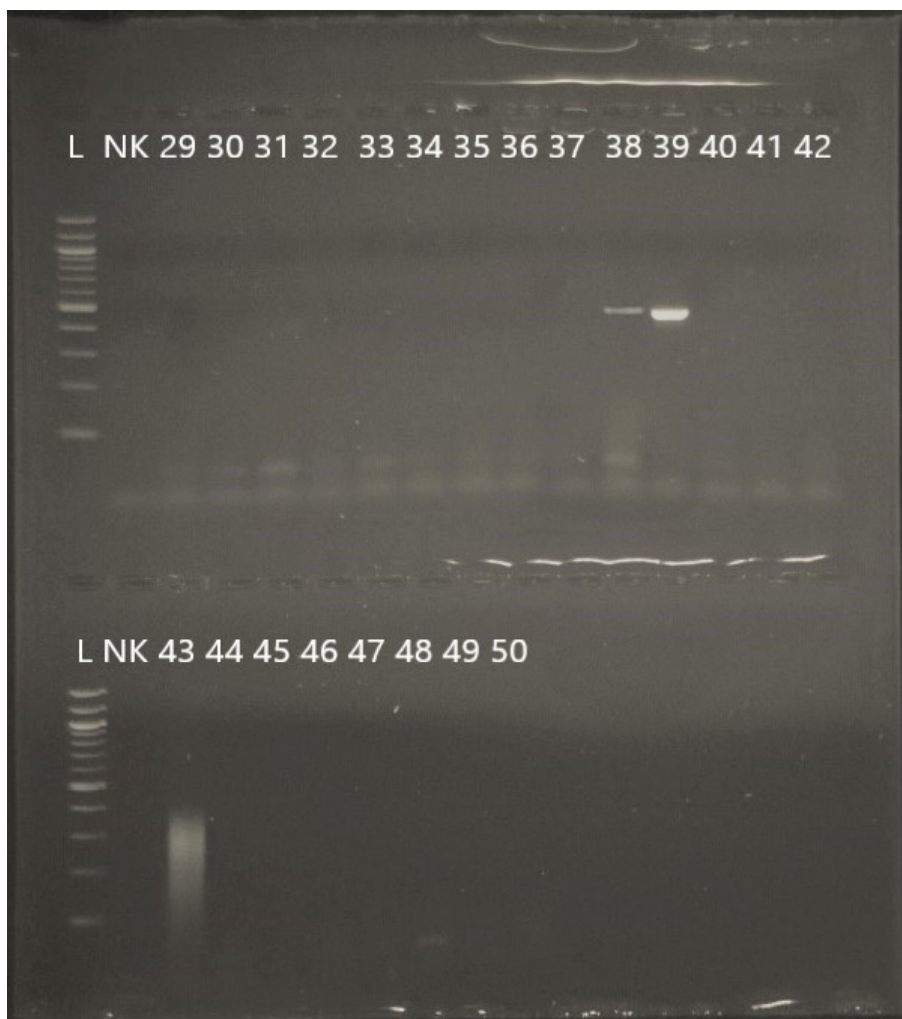
### 4.3 SBV

Vyizolovaná RNA byla přepsána do cDNA a následně bylo provedeno PCR s doporučenou vhodnou teplotou annealingu 48 °C.



Obrázek 4.6 Elektroforeogram PCR vyšetření vzorků č. 1 – 28 na přítomnost viru SBV: L – Ladder (100bp), NK – Negativní kontrola, 1- vzorek č.1 (HU), 2 - vzorek č. 2 (ST), 3 – vzorek č. 3 (PL), 4- vzorek č.4 (VR), 5 - vzorek č. 5 (BM), 6 – vzorek č. 6 (CHB), 7- vzorek č.7 (DO), 8 - vzorek č. 8 (MA), 9 – vzorek č. 9 (IB), 10- vzorek č.10 (MAL), 11 – vzorek č. 11 (AR) 12 - vzorek č. 12 (PO), 13 – vzorek č. 13 (VN), 14- vzorek č.14 (GB), 15 - vzorek č. 15 (KV), 16 – vzorek č. 16 (DE), 17- vzorek č. 17 (PS), 18 - vzorek č. 18 (PSS), 19 – vzorek č. 19 (PF), 20- vzorek č. 20 (PHI), 21 - vzorek č. 21 (PZM), 22 – vzorek č. 22 (PZK), 23- vzorek č.23 (UJ), 24 - vzorek č. 24 (BK), 25 – vzorek č. 25 (BO), 26- vzorek č.26 (NS), 27 - vzorek č. 27 (BY), 28 – vzorek č. 28 (SP)

Na obrázku Obrázek 4.6 je zobrazen výsledek PCR detekce viru ABPV u vzorků č. 1-28. Z obrázku vyplývá, že pozitivní výsledek vyšel u vzorků č. **9, 11, 24 a 27**. Vzorky č. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 26 a 28 vyšly s negativním výsledkem.

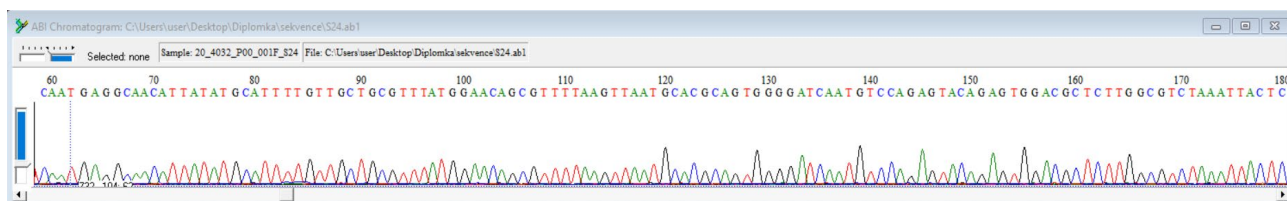


Obrázek 4.7 Elektroforeogram PCR vyšetření vzorků č. 29 – 50 na přítomnost viru SBV: L – Ladder (100bp), NK – Negativní kontrola, 29- vzorek č. 29 (BP), 30 - vzorek č. 30 (TR), 31 – vzorek č. 31 (ŠN), 32- vzorek č.32 (HN), 33 - vzorek č. 33 (MAN), 34 – vzorek č. 34 (SM), 35- vzorek č.35 (ZOB), 36 - vzorek č. 36 (BO), 37 – vzorek č. 37 (OL), 38- vzorek č.38 (OS), 39 - vzorek č. 39 (RV), 40 – vzorek č. 41 (HJ), 42- vzorek č.42 (BU), 43 - vzorek č. 43 (VF), 44 – vzorek č. 44 (HA), 45- vzorek č.45 (HSP), 46 - vzorek č. 46 (BC), 47 – vzorek č. 47 (MH), 48- vzorek č.48 (MH2), 49 - vzorek č. 49 (BB), 50 – vzorek č. 50 (BM)

Z výsledného PCR viru SBV, u vzorků 29-50 (Obrázek 4.7), byly detekovány 2 pozitivní vzorky č. **38** a **39**. Vzorky č. 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 a 50 byly negativní.

Celkem bylo nalezeno šest pozitivních SBV vzorků. Následně byly vybrány 2 vzorky č. 24 a 29. Jejich proužky byly vyříznuty z gelu, rozpuštěny a přečištěny pomocí Exosapu. Poté k nim bylo přidáno Forward primer viru SBV a byly zaslány na sekvenování do firmy SEQme. Výsledné sekvence byly zkontrolovány

v počítačovém programu BioEdit (Obrázek 4.9; Obrázek 4.10) a zkontrolována v internetovém programu BLAST (Obrázek 4.8; Obrázek 4.11).

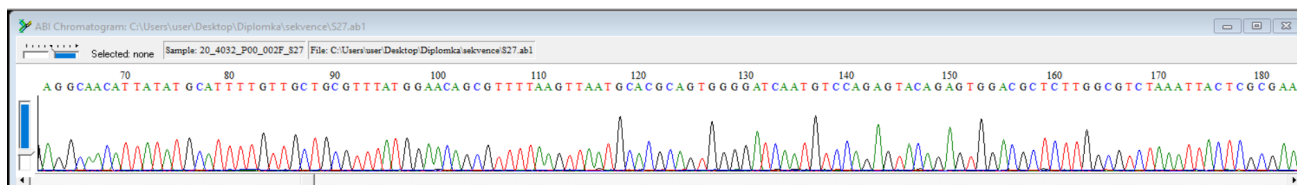


Obrázek 4.9 Výsledná sekvence vzorku č. 24

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Sacbrood virus isolate 3062 nonstructural protein gene, partial cds</a>	<a href="#">Sacbrood virus</a>	416	416	99%	4e-112	96.79%	356
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Sacbrood virus isolate SBV_MR, complete genome</a>	<a href="#">Sacbrood virus</a>	409	409	100%	6e-110	96.02%	8830
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Sacbrood virus isolate MD2, complete genome</a>	<a href="#">Sacbrood virus</a>	409	409	100%	6e-110	96.02%	8861

Obrázek 4.8 Analýza sekvence vzorku č. 24 pomocí webového nástroje BLAST

V BLASTU bylo potvrzeno osekvenování viru ve vzorku č. 24. Byly zjištěny procentuální hodnoty Query Cover a Percent Identity, které vykazovaly téměř 100 % shodu se sekvencemi viru SBV v NCBI.



Obrázek 4.10 Výsledná sekvence vzorku č. 29

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Sacbrood virus isolate 3062 nonstructural protein gene, partial cds</a>	<a href="#">Sacbrood virus</a>	418	418	100%	1e-112	96.80%	356
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Sacbrood virus isolate SBV_MR, complete genome</a>	<a href="#">Sacbrood virus</a>	411	411	99%	2e-110	96.39%	8830
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Sacbrood virus isolate MD2, complete genome</a>	<a href="#">Sacbrood virus</a>	407	407	100%	2e-109	96.00%	8861

Obrázek 4.11 Analýza sekvence vzorku č. 29 pomocí webového nástroje BLAST

U vzorku č. 29 byla potvrzena detekce viru SBV. Sekvence vykazovala téměř 100 % shodu se sekvencemi viru SBV v databázi NCBI. (Obrázek 4.11 Obrázek 4.11).

Tabulka 4.2 Shrnutí výsledků Tabulka 1

	Stanoviště	VIR		
	České Budějovice centrum	ABPV	SBPV	SBV
1	HU	Neg.	Neg.	Neg.
2	ST	Neg.	Neg.	Neg.
3	PL	Pozit.	Neg.	Neg.
4	VR	Neg.	Neg.	Neg.
5	BM	Neg.	Neg.	Neg.
6	CHB	Neg.	Neg.	Neg.
x	<b>České Budějovice venkov</b>	x	x	x
7	DO	Neg.	Neg.	Neg.
8	MA	Pozit.	Neg.	Neg.
9	IB	Neg.	Neg.	Pozit.
10	MAL	Pozit.	Neg.	Neg.
x	<b>Šumava</b>	x	x	x
11	AR	Neg.	Neg.	Pozit.
12	PO	Neg.	Neg.	Neg.
13	VN	Pozit.	Neg.	Neg.
14	GB	Pozit.	Neg.	Neg.
15	KV	Neg.	Neg.	Neg.
16	DE	Pozit.	Neg.	Neg.
x	<b>Praha centrum</b>	x	x	x
17	PS	Neg.	Neg.	Neg.
18	PSS	Neg.	Neg.	Neg.
19	PF	Neg.	Neg.	Neg.
20	PHI	Neg.	Neg.	Neg.
21	PZM	Pozit.	Neg.	Neg.
22	PZK	Neg.	Neg.	Neg.
x	<b>Praha venkov</b>	x	x	x
23	UJ	Pozit.	Neg.	Neg.
24	BK	Pozit.	Neg.	Pozit.
25	BO	Neg.	Neg.	Neg.
26	NS	Neg.	Neg.	Neg.

Tabulka 4.3 Shrnutí výsledků Tabulka 2

	Stanoviště	VIR		
	Praha venkov	ABPV	SBPV	SBV
27	BY	Pozit.	Neg.	Pozit.
28	SP	Pozit.	Neg.	Neg.
x	<b>Plzeň centrum</b>	x	x	x
29	BP	Pozit.	Neg.	Neg.
x	<b>Plzeň venkov</b>	x	x	x
30	TŘ	Neg.	Neg.	Neg.
31	ŠN	Neg.	Neg.	Neg.
32	HN	Neg.	Neg.	Neg.
33	MAN	Neg.	Neg.	Neg.
34	SM	Neg.	Neg.	Neg.
x	<b>Ostrava centrum</b>	x	x	x
35	ZOB	Pozit.	Neg.	Neg.
36	BO	Pozit.	Neg.	Neg.
37	OL	Neg.	Neg.	Neg.
38	OM	Pozit.	Neg.	Pozit.
39	OS	Pozit.	Neg.	Pozit.
x	<b>Ostrava venkov</b>	x	x	x
40	RV	Neg.	Neg.	Neg.
41	HJ	Pozit.	Neg.	Neg.
42	BU	Neg.	Neg.	Neg.
43	VF	Pozit.	Neg.	Neg.
44	HA	Neg.	Neg.	Neg.
45	HSP	Neg.	Neg.	Neg.
x	<b>Brno centrum</b>	x	x	x
46	BC	Neg.	Neg.	Neg.
47	MH	Neg.	Neg.	Neg.
48	MH2	Pozit.	Neg.	Neg.
49	BB	Pozit.	Neg.	Neg.
50	BM	Neg.	Neg.	Neg.

---

## 5. Diskuze

Úbytek včelstev je jedno z aktuálních témat v celosvětovém měřítku. Včela medonosná hraje zásadní roli v zemědělství tím, že zajišťuje opylení mnoha rostlin a plodin, zvláště těch nutričně a ekonomicky výhodných. Dále jsou také důležité pro udržení ekologických a genetických rozmanitostí rostlin (Berényi, 2006). Avšak tyto služby, které nám včely zajišťují jsou ve velkém úpadku, kvůli úhynu včelstev, který je zapříčiněn stále se rozšiřujícími onemocněními včel, ať už bakteriálními, kvasinkovými či virovými (Paudel et al, 2015).

Tato diplomová práce je zaměřena na jeden z hlavních faktorů, který způsobuje úhyn včel, a tím jsou infekce způsobené včelími viry. Do dneška vědci identifikovali kolem 20 včelích viróz (Schlächli et al., 2020). Včely jsou hostiteli velkého množství virů a některé z nich přetrvávají skrytě v populaci včel a ve vhodných podmínkách následně vytvoří ohnisko nákazy. Taková ohniska některých virů mohou mít fatální následky pro jednotlivce, ale i pro celé kolonie. Kvůli virovým onemocněním nemohou infikované včely plnit svoji roli v úlu a vzrůstající počet postižených včel může negativně ovlivnit celé včelstvo (Titěra, 2017).

V rámci výzkumu včelích onemocnění, jehož součástí je má diplomová práce, byly získány vzorky zimní generace včel, odebrané v říjnu roku 2019 na území pěti velkých měst České republiky – Praha, Brno, Plzeň, Ostrava a České Budějovice. Z každé z 11 oblastí bylo vybráno 5 včelařských lokalit, kde z 5 náhodně vybraných úlů byly odebrány vzorky cca 50 včel. Následně bylo izolováno a dále testováno celkově 206 vzorků z 50 stanovišť.

Akutní paralýza včel (ABPV) je onemocnění způsobené *Cripavirem*, který patří do rodiny *Dicistroviridae* (Tentcheva et al., 2004). Včely infikuje virem roztoč *Varroa destructor*, který je přenašečem onemocnění. ABPV může vyvolat úmrtnost dospělých včel. (Schlächli, D. et al., 2020).

Přítomnost ABPV jsem detekovala pomocí RT-PCR při teplotě annealingu 48 °C. Primery byly navrženy podle Tentcheva et al. (2004). Po zobrazení nespecifických proužků po první RT-PCR, jsem následně použita metodu optimalizace reakce PCR a zjistila jsem vhodnější teplotu annealingu 52 °C. Tentcheva et al. (2004) ve svém výzkumu pracuje s teplotou annealingu 56 °C, proto předpokládám, že použití teploty 52 °C bylo přiblížení k vhodné teplotě annealingu, což se následně potvrdilo i ve výsledku. 4 pozitivní proužky na gelu byly v porovnání



---

s proužky z PCR reakce provedené s původními teplotními podmínkami výraznější, když byla použita teplota 52 °C. Navíc bylo detekováno pozitivní ABPV u 4 dalších vzorků.

*Sacbrood virus* (SBV) je virové onemocnění, které je způsobené *Iflavirem*. Tento vir spadá pod řád *Pisonivirales*. SBV je způsobena virem, který se přenáší z dospělých včel do mladých larev. SBV se přenáší prostřednictvím roztoče *Varroa destructor* (Grabensteiner et al., 2001). Jedná se o virovou infekci ovlivňující plod včel, která má za následek smrt larev. (Grabensteiner et al., 2001; Berényi et al., 2006).

Pro detekci SBV byla použita metoda RT-PCR s doporučenou teplotou nasedání primerů 48 °C. Primery byly použity podle studie Tentcheva et al. (2004). V jejich výzkumu byla použita teplota annealingu 56 °C. Avšak nižší použitá teplota nevytvořila žádné nespecifické proužky, a proto se o vyšších teplotách dále neuvažovalo.

Pomalá paralýza včel (SBPV) je onemocnění způsobené *Iflavirem* který spadá pod řád *Pisonivirales*. Jako předešlé včelí viry se SBPV přenáší prostřednictvím roztoče *Varroa destructor* a následně žlázovými sekrety včel. SBPV přetrvává přirozeně jako skrytá infekce v těle včel (Miranda et al., 2010).

Ve Velké Británii a při experimentech pozorovali symptomy onemocnění. Následně zjistili, že přibližně po 10-12 dnech po injekčním podání viru, SBPV způsobuje ochrnutí dospělých včel. Jak název napovídá, rozvoj infekce a její patologie ji odlišuje od rychle působících virů akutní a chronické paralýzy (Granoff a Webster, 1999). Dle Miranda et al. (2010) se výskyt SBPV jeví jako vzácný, protože jej v 90. letech 20. st. detekovali pouze v Anglii, Fidži a západní Samo.

Přítomnost SBPV ve včelstvech byla detekována prostřednictvím RT-PCR při teplotě annealingu 60 °C. Primery byly použity podle Miranda et al. (2010). Výsledek všech 50 stanovišť byl na výskyt SBPV negativní. Dle výsledků Miranda et al. (2010) detekovali SBPV v různých státech EU (Tabulka 5.1), a tím potvrdili, že výskyt pomalé paralýzy včel je opravdu vzácný. V rámci výsledků detekce SBPV v této diplomové práci se toto též potvrdilo.

Tabulka 5.1 Testování SBPV v EU (zdroj: Miranda et al., 2010)

Stát	Rok	Počet testovaných kolonií	SBPV
Francie	2002	360	Negativní
Švýcarsko	2007	100	Negativní
	2008	29	Pozitivní (5 kolonií)
	2009	100	Pozitivní (3 kolonie)
Švédsko	2008	9	Negativní
Anglie	2008	360	Pozitivní (4 kolonie)

U detekce akutní paralýzy včel (ABPV) se potvrdilo 20 pozitivních výsledků z celkových 50 vzorků (stanovišť). Což odpovídá procentuálnímu zastoupení 40 %. Pokud porovnáme zastoupení pozitivních ABPV v České republice se sousedícím Rakouskem (Berényi et al., 2006), kde prokázali 68 % pozitivních a s Francií (Tentcheva et al., 2004) s pozitivními 58 % je výskyt tohoto virového onemocnění v České republice v menším měřítku než v ostatních zemích.

*Sacbrood virus* (SBV) byl pozitivně detekován v 6 případech z celkových 50 vzorků (stanovišť). Což odpovídá procentuálnímu zastoupení 12 %. Oproti Rakousku, kde detekovali 49 % případů (Berényi et al., 2006) a Francii, ve které měli zamoření SBV v 86 % případů (Tentcheva et al., 2004), je v České republice malé množství nemocných včel. Avšak je nutné podotknout, že ve Francii, kde bylo detekováno velké množství, byl odebíráán i plod. V Rakousku a v České republice nikoli a potvrzené případy jsou čistě z dospělých včel.

Ve 4 pozitivních případech byla detekována přítomnost obou virů ABPV a SBV (8 %).

---

## Závěr

V rámci výzkumu včelích onemocnění, jehož součástí je i tato diplomová práce, byly získány vzorky zimní generace včel, odebrané v říjnu roku 2019 na území pěti velkých měst České republiky – Praha, Brno, Plzeň, Ostrava a České Budějovice. Z každé z 11 oblastí bylo vybráno 5 včelařských lokalit, kde z 5 náhodně vybraných úlů byly odebrány vzorky cca 50 včel. Následně bylo izolováno 206 vzorků dospělých včel.

Tato diplomová práce se zabývá detekcí viru akutní paralýzy včel (ABPV), viru pomalé paralýzy včel (SBPV) a *Sacbrood viru* (SBV).

V rámci velkých měst České republiky byly detekovány 3 případy ABPV a 1 případ SBV na území Českých Budějovic, 3 případy ABPV a 1 případ SBV na Šumavě. Dále pak bylo detekováno 5 případů ABPV a 2 případy SBV na území Prahy. Ve dvou stanovištích, byla detekována přítomnost obou virů ABPV a SBV. Následně byly zjištěny 2 pozitivní případy ABPV na území Brna a 1 pozitivní stanoviště na území Plzně. Dále pak bylo detekováno 6 případů ABPV a 2 případy SBV na území Ostravy, kdy se opět detekovali dvě stanoviště s přítomnými viry ABPV i SBV.

Dohromady bylo prokázáno 20 pozitivních výsledků ABPV z celkových 50 stanovišť (40 %), 6 pozitivních výsledků SBV (12 %). SBPV nebyla detekována v žádném z 50 stanovišť.

---

## Seznam použité literatury

Benjeddou, M., et al. (2001). Detection of Acute Bee Paralysis Virus and Black Queen Cell Virus from Honeybee by Reverse Transcriptase PCR, *American Society for Microbiology, Applied and Environmental Microbiology*, 67(5): 2384-2387.

Berényi, O. et al. (2006). Occurrence of Six Honeybee Viruses in Diseased Austrian Apiaries, *American Society for Microbiology, Applied and Environmental Microbiology*, 72(4): 2414-2420.

Biocompare.com (2007). *The Buyer's Guide for Life Scientists*. [online] [cit. 22. 2. 2021]. Dostupné z: <https://www.biocompare.com/Product-Reviews/41494-Biometra-T3000-Thermocycler-From-Labrepc/>

Carreck, N. L. et al. (2010). Honey bee colony collapse and changes in viral prevalence associated with *Varroa destructor*. *J Apic Res* 49(1): 93–94.

Čukanová, E. et al. (2020). Virové paralýzy včely medonosné (*Apis mellifera*). Viral paralysis of honeybee (*Apis mellifera*), *Veterinářství*; 70(6): 376-382.

Denholm, C. H. (1999). *Inducible honey bee viruses associated with Varroa jacobsoni*. PhD thesis, Keele University, Keele, UK.

Dufková, K. (2013). *Včela medonosná* [online]. Zoonchleby.cz [cit. 6. 2. 2021] Dostupné z: <http://www.zoonchleby.cz/vcela-medonosna-5952/>

Evans, J. et. al. (2006) Immune pathways and defense mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Mol Biol*, 15: 645-656.

Grabensteiner, E., et al. (2001). Sacbrood Virus of the Honeybee (*Apis mellifera*): Rapid Identification and Phylogenetic Analysis Using Reverse Transcription-PCR, *American Society for Microbiology, Clinical and Vaccine Immunology*, 8(1): 93-104.

Granoff, A. a Webster, R. (1999). *Encyclopedia of Virology, Picornaviruses - insect 2*. USA: Academic Press. ISBN 978-0-12-227030-7.

- 
- Hubert, J. (2018) *Certifikovaná metodika pro hodnocení rezistence roztoče Varroa destructor vůči tau-fluvalinátu*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby. ISBN 978-80-7427-280-6.
- Chen, Y. a Siede, R. (2007). Honey bee viruses. *Adv Virus*, 70: 33–80.
- Chen, Y. et al. (2006). Prevalence and transmission of honeybee viruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (1): 606-611.
- Jones, G. (2017). *Z larvy včela: Z kukly motýl*. Svojtka & Co., Praha. ISBN 978-80-256-2192-9.
- Jones, R. (2018). *Plant and Insect Viruses in Managed and Natural Environments*, Novel and Neglected Transmission Pathways, England, pp. 2-339. ISBN: 978-0-12-814415-2
- Kamler, F. et. al. (2017). *Celý rok proti varroáze: podle metodik Výzkumného ústavu včelařského v Dole*. Sedmé přepracované vydání. V Dole. ISBN 978-80-87196-22-9.
- King, A. et al. (2012). *Virus taxonomy: Family - Dicistroviridae*. [online] sciencedirect.com [cit. 5. 3. 2021]. dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/book/9780123846846/virus-taxonomy>
- Labguide.cz (2019). *Klasické metody sekvenování*, [online] [cit. 6. 3. 2021]. Dostupné z: <https://labguide.cz/klasicke-metody-sekvenovani/>
- Linhart, R. (2019). *Včelařit jako včela: jak včelařit s respektem vůči včelám*. Mladá fronta, Praha. ISBN 978-80-204-5210-8.
- Madden, T. L. et al. (1996) Applications of network BLAST server. *Meth. Enzymol.* 266:131-141.
- Miranda, R. J., et al. (2010). Genetic characterization of slow bee paralysis virus of the honeybee (*Apis mellifera* L.), *Journal of General Virology*, 91(1): 10
- NCBI Resouce Coordinators (2018) Database resources of the Nation Center for Biotechnology Information. *Nucleid Acids Res.* 46(D1): D8-D13.
-

---

Paudel, P. Y., et al. (2015). Honey bee (*apis mellifera* L.) and Pollination Issue: Current Status, Impacts, and Potential Drivers of Decline, *Journal of Agricultural Science*, 7(6): 93-109

Pleva.cz (2019). *Etapy v životě včely: život včelí dělnice* [online] [cit. 6. 2. 2021]. Dostupné z: <https://www.pleva.cz/news/etapy-v-zivote-vcely-od-vylihnuti-po-posledni-zamavani-kridly>

Procházková, M. et al. (2020). Virion structures and genome delivery of honeybee viruses. *Current opinion in virology*, 45: 17–24.

Přidal A. a Svoboda J. (2012). Tlumení varroózy s použitím dlouhodobého odpařování kyseliny mravenčí. In: Staroň M., Čermáková T. (eds.): *I. Seminár včelárskej praxe a vedeckej verejnosti*, Centrum výskumu živočíšnej výroby Nitra, Ústav včelárstva v Liptovskom Hrádku, pp 4-14.

Ptáček, V. (2007). Jak vzniká med? *Včelářství*. Praha: Český svaz včelařů, roč. 56 (137), 4; 5; 6;, s. 73; 97; 125.

Pucca, B. M., et al. (2019). Bee Updated: Current Knowledge on Bee Venom and Bee Environmental Therapy, *Frontiers in Immunology*, 10: 2090

Richard, F. et. al. (2008). Modulation of social interactions by immune stimulation in honey bee, *Apis mellifera*, workers, *BMC Biology*, 6: 50

Rosypal, S. (1994). *Bakteriologie a virologie*. Scientia, Praha. ISBN 80-85827-16-6.

Shimadzu.eu (2020). BioSpec-nano [online] [cit. 3. 2. 2021] Dostupné z: <https://www.shimadzu.eu/biospec-nano>

Schittny D. et al. (2020). Honeybee Virus Transmission via Hive Products, *Veterinary science* 7: 96

Schläppi, D. et al. (2020). Foodborne Transmission and Clinical Symptoms of Honey Bee Viruses in Ants *Lasius* spp. *Viruses*, 12(3): 321.

- 
- Smrčka, R. (2020). *Nemoci u včel*. [online] iVčelařství.cz [cit. 3. 2. 2021].  
Dostupné z: <https://www.ivcelarstvi.cz/nemoci-a-choroby-vcel/>
- The Power of Honey (2006). Japanese Honeybees. *Nature Wonder Land*. 13. series
- Titěra, D. (2017). *Včely zdravé a nemocné*. Brázda, Praha. ISBN 978-80-209-0420-1.
- Valtera, J. (2018). *Historie včelařství na Jaroměřsku, Českoskalicku a Novoměstsku na pozadí obecného vývoje oboru*. Diplomová práce, Univerzita Pardubice, Fakulta filozofická, Ústav historických věd.
- Vcelarstviprokop.cz (2013). *Včela medonosná: Taxonomické zařazení* [online] [cit. 8. 2. 2021]. Dostupné z: <https://www.vcelarstviprokop.cz/>
- Vceliobchod.cz (2021). *Včelí potřeby – formidol* [online] [cit. 3. 2. 2021]  
Dostupné z: <https://www.vceliobchod.cz/kyselina-mravenci-formidol>
- Wang, J. L. (2019). The Phylogeny and Pathogenesis of Sacbrood Virus (SBV) Infection in European Honey Bees, *Apis mellifera*. *Viruses*, 11(1): 61.
- Williams, D. B. (2019) *The Anatomy of the Honey Bee*, Amazon Digital Services LLC – KDP Print US, USA. ISBN: 9781094631684
- Winston, M. (1987). *The Biology of the Honey Bee*. Harvard University Press Cambridge, Massachusetts, London. ISBN 0-674-07409-2.
- Yue, C. et. al. (2007). Vertical-transmission routes for deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera*) *J Gen Virol*, 88: 2329–36.

---

## Seznam obrázků

Obrázek 1.1 Mapa rozšíření Včely medonosné (zdroj: zoonchleby.cz) .....	11
Obrázek 1.2 Stavba těla včely medonosné (zdroj: iVčelařství.cz) .....	12
Obrázek 1.3 Vývoj včely medonosné (zdroj: iVčelařství.cz) .....	14
Obrázek 1.4 Matka mezi dělnicemi (zdroj: vlastní).....	15
Obrázek 1.5 1. Varroa destruktora na včele; 2. Kleštiny včelí v plástvi (zdroj: news.utexas.edu; blog-veto-pharma.com) .....	22
Obrázek 1.6 ABPV symptomy (zdroj: windowbee.com) .....	25
Obrázek 1.7 Gondolovitý tvar larvy (zdroj: University of Georgia).....	27
Obrázek 1.8 Deska formidolu (zdroj: vceliobchod.cz).....	29
Obrázek 3.1 Rozdrcení včel (zdroj: vlastní) .....	32
Obrázek 3.2 Izolace (zdroj: vlastní).....	33
Obrázek 3.3 Schéma PCR reakce (zdroj: vlastní).....	36
Obrázek 3.4 Termocycler T3000 (zdroj: vlastní).....	36
Obrázek 3.5 Elektroforéza - Gradient .....	40
Obrázek 3.6 Elektroforéza (zdroj: vlastní).....	41
Obrázek 3.7 Vyříznutý gel v mikroskopu (zdroj: vlastní).....	42
Obrázek 4.1 Elektroforeogram PCR vyšetření vzorků č. 1 – 28 na přítomnost viru ABPV .....	47
Obrázek 4.2 Elektroforeogram PCR vyšetření vzorků č. 29 – 50 na přítomnost viru ABPV.....	48
Obrázek 4.3 Výsledná sekvence ABPV vz. č. 41 .....	49
Obrázek 4.4 Analýza sekvence vzorku č. 41 .....	49
Obrázek 4.5 Elektroforeogram PCR vyšetření vzorků č. 1 – 28 a 29 – 50 na přítomnost viru SBPV .....	50
Obrázek 4.6 Elektroforeogram PCR vyšetření vzorků č. 1 – 28 na přítomnost viru SBV).....	51
Obrázek 4.7 Elektroforeogram PCR vyšetření vzorků č. 29 – 50 na přítomnost viru SBV .....	52
Obrázek 4.8 Analýza sekvence vzorku č. 24 .....	53
Obrázek 4.9 Výsledná sekvence vzorku č. 24 .....	53
Obrázek 4.10 Výsledná sekvence vzorku č. 29 .....	53
Obrázek 4.11 Analýza sekvence vzorku č. 29 .....	53



---

## Seznam tabulek

Tabulka 1.1 Taxonomie včely medonosné (zdroj: Prokop, 2013).....	11
Tabulka 1.2 Vývojové fáze dělnice (zdroj: ivcelarstvi.cz) .....	16
Tabulka 1.3 Hlavní složky medu (zdroj: pharmanews.cz).....	19
Tabulka 3.1 Použité primery (Tentcheva et al. 2004; Miranda et al. 2010) .....	37
Tabulka 3.2 PCR ABPV .....	38
Tabulka 3.3 PCR SBPV .....	38
Tabulka 3.4 PCR SBV .....	39
Tabulka 3.5 Nastavené teploty gradientu (zdroj: vlastní).....	40
Tabulka 4.1 Naměřená koncentrace RNA .....	46
Tabulka 4.2 Shrnutí výsledků Tabulka 1 .....	54
Tabulka 4.3 Shrnutí výsledků Tabulka 2 .....	55
Tabulka 5.1 Testování SBPV v EU (zdroj: Miranda et al., 2010).....	58

---

## Seznam zkratek

ABPV	Virus akutní paralýzy včel
BLAST	Internetový program
BQCV	Virus černání matečníku
CBPV	Chronická paralýza včel
cDNA	Komplementární DNA
ddNTP	Dideoxynukleotid
DEPC	Voda bez nukleáz, sterilně filtrovaná s přídavkem <i>DEPC</i> (diethyl pyrokarbonát)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dNTP	Deoxynukleotid
DWV	Virus deformovaných křídel
FASTA	Fast alignment
H <sub>2</sub> O	Voda
IAA	Kyselina indol-3-octová
IRES	Vnitřní místo pro vstup ribozomu
KBV	Kašmírový virus
NCBI	Internetová doména
ORF	Čtecí rámec
PCR	Polymerázová řetězová reakce
RNA	Ribonukleová kyselina
RT	Reverse transkript
SBPV	Virus pomalé paralýzy včel
SBV	<i>Sacbrood virus</i>
ssRNA	Jednovláknová RNA
UV	Ultrafialová lampa
VP1	Virový protein 1
VP2	Virový protein 2
VP3	Virový protein 3