

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N4103 Zootechnika

Studijní obor: Zootechnika

Katedra: Katedra rostlinné výroby a agroekologie

Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

### **Výskyt virových onemocnění včel v souvislosti s úrovní zamoření roztočem *Varroa destructor* v oblasti Prachaticka**

Autor diplomové práce: Bc. Jana Bláhová

Vedoucí diplomové práce: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: Ing. Irena Jelínková

České Budějovice, 2017

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta zemědělská

Akademický rok: 2015/2016

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jana BLÁHOVÁ**  
Osobní číslo: **Z15403**  
Studijní program: **N4103 Zootechnika**  
Studijní obor: **Zootechnika**  
Název tématu: **Výskyt virových onemocnění včel v souvislosti s úrovní zamoření roztočem Varroa destructor v oblasti Prachaticka**  
Zadávací katedra: **Katedra speciální produkce rostlinné**

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

Cílem diplomové práce je vypracování literární rešerše na téma vlivu roztoče Varroa destructor na zdravotní stav včelstev a na výskyt virových onemocnění včel. Pozornost bude věnována i aktuální situaci zdravotního stavu včelstev v ČR a způsobům prevence a léčení. Experimentální část práce bude zaměřena na provedení monitoringu výskytu roztoče Varroa destructor na Prachaticku a na detekci virů ve vybraných včelstvech.

Úvod: význam včel a závažnost varroázy v chovu včel.

Literární přehled: vlivu roztoče Varroa destructor na zdravotní stav včelstev a na výskyt virových onemocnění včel, aktuální situace zdravotního stavu včelstev v ČR, způsoby prevence a léčení.

Materiál a metody: popis a charakteristika studovaných včelstev, lokalit, metodika odběru vzorků, kvantifikace roztoče Varroa destructor ve vzorku a stanovení virů ve vybraných včelstvech.

Výsledky: výsledky rozborů, vyhodnocení získaných dat, uspořádání do tabulek, grafů, vyhodnocení a statistické zpracování výsledků.

Diskuze: porovnání vlastních výsledků s literárními zdroji, posouzení možnosti praktického uplatnění dosažených výsledků, poznatků a doporučení.

Závěr: přehledné shrnutí nejdůležitějších poznatků, naplnění cílů práce, doporučení vyplývajících z řešené problematiky.

Seznam použité literatury: V abecedním pořadí dle platné citační normy ČSN ISO 690 (01 0197).

Obsah: Uvedení stran jednotlivých kapitol práce.

Rozsah grafických prací: 10 - 15 stran

Rozsah pracovní zprávy: 40 - 50 stran

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

CLERMONT, et al., 2015. Virus Status, Varroa Levels, and Survival of 20 Managed Honey Bee Colonies Monitored in Luxembourg Between the Summer of 2011 and the Spring of 2013. *Journal of Apicultural Science* [online]. 1.1., roč. 59, č. 1 [vid. 20. leden 2016]. ISSN 2299-4831. Dostupné z:

doi:10.1515/jas-2015-0005

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]. 9., roč. 69, č. 9, s. 1527-1541. ISSN 0340-5443, 1432-0762. Dostupné z:

doi:10.1007/s00265-015-1965-2

EMSEN, et al., 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]. 27.2., roč. 10, č. 2, s. e0118885. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0118885

RYBA, et al., 2012. Prevalence of honeybee viruses in the Czech Republic and coinfections with other honeybee disease. *Biologia* [online]. roč. 67, č. 3, s. 590-595. ISSN 1336-9563. Dostupné z: doi:10.2478/s11756-012-0038-5

VESELÝ, V., et al. *Včelařství*. 3rd ed. Praha: Brázda, 2013

Kol. autorů PSNV, *Včelařství*. 2016. ISBN978-80-260-9090-8

*Časopisy Včelařství, Moderní včelař a Odborné včelařské překlady*

Vedoucí diplomové práce: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.


Katedra speciální produkce rostlinné

Konzultant diplomové práce: Ing. Irena Jelínková


Katedra speciální produkce rostlinné

Datum zadání diplomové práce: 29. března 2016

Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2017

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

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚLŠKÁ FAKULTA  
studijní oddělení  
Studentůvák 1988, 370 05 České Budějovice

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

V Českých Budějovicích dne 29. března 2016

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

V Českých Budějovicích dne 21. 4. 2017

.....

Bc. Jana Bláhová

## Poděkování

Ráda bych poděkovala Ing. Ireně Jelínkové a prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D. za odborné vedení a pomoc při zpracování mé diplomové práce. Dále děkuji Mgr. Tomášovi Tonkovi Ph.D. za rady a odbornou pomoc při práci v laboratoři. V neposlední řadě děkuji své rodině za jejich podporu při studiu.

## Abstrakt

Cílem této diplomové práce bylo zhodnotit vliv roztoče *Varroa destructor* na zdravotní stav včelstev a na výskyt virových onemocnění u jím napadených včel. Zkoumána byla i přítomnost mikrosporidií rodu *Nosema*. Metodou RT-PCR byl v některých včelstvech detekován výskyt viru deformovaných křídel a viru akutní paralýzy včel. Koprologické vyšetření prokázalo výskyt spor *Nosema* spp.

Klíčová slova: včela medonosná, včelí viry, *Varroa destructor*, *Nosema* spp., varroatolerance

## Abstract

The aim of the thesis was to evaluate the influence of mite *Varroa destructor* on the health of honeybees and the occurrence of viral diseases of bees. The presence of *Nosema* was also explored. The occurrence of deformed wing virus and acute bee paralysis virus was detected by RT-PCR method. Coprological examination proved the incidence of spore *Nosema* spp.

Key words: honeybee, bee viruses, *Varroa destructor*, *Nosema* spp., varroatolerance

## Obsah

1. Úvod.....	9
2. Literární přehled.....	10
2.1 Včela medonosná .....	10
2.2 <i>Varroa destructor</i> .....	11
2.2.1 Vliv roztoče <i>Varroa destructor</i> na zdravotní stav včelstev.....	12
2.3 Diagnostika varroázy.....	18
2.4 Možnosti tlumení varroázy.....	20
2.4.1 Použití syntetických přípravků.....	20
2.4.2 Použití přípravků na bázi přírodních látek.....	21
2.4.3 Zootechnická opatření.....	23
2.4.4 Přírozená odolnost včel vůči varroáze .....	26
2.5 Nosematóza.....	27
2.5.1 Původce a vývoj nosematózy.....	27
2.5.2 Klinické příznaky a diagnostika.....	28
2.5.3 Prevence a léčení.....	28
2.6 Aktuální situace zdravotního stavu včelstev v ČR.....	28
3. Cíl práce.....	30
4. Materiál a metody.....	31
4.1 Charakteristika stanoviště a včelstev.....	31
4.2 Odběr vzorků a varroamonitoring.....	32
4.3 Příprava vzorků pro detekci virových onemocnění.....	33
4.4 Příprava vzorků pro detekci spor <i>Nosema spp</i> .....	37
5. Výsledky.....	38
6. Diskuze.....	44
7. Závěr.....	47
8. Seznam použité literatury.....	48



## 1. Úvod

Přínos včelařství pro společnost můžeme rozdělit do dvou základních oblastí. Včela zajišťuje opylení polních plodin a volně rostoucích rostlin v přírodě, ve středoevropských podmínkách tato činnost tvoří 90% užitku včel a jen 10% užitku je ve formě včelích produktů. Za mimořádný význam včel lze považovat jejich opylovací činnost na květech rostlinných druhů ohrožených vyhynutím. Snížení rozmanitosti naší přírody by mělo velmi závažné důsledky na kvalitu životního prostředí. Včely mají pro společnost i kulturní význam. Mnoho mladých lidí nachází ve včelařství koníček na celý život.

Kondici a zdravotní stav včelstev ohrožuje mnoho environmentálních vlivů (snůška, mikroklima stanoviště), původních či zavlečených infekčních nemocí (mor včelího plodu, varroáza, nosematóza a virózy) a řada lidských aktivit, zejména používání pesticidů a insekticidů v zemědělství.

Správná a včasná diagnostika chorob může významně napomoci udržet zdraví včelstev v dobré kondici díky snižování infekčního tlaku patogenů. Poznatky základního výzkumu zdraví včelstev se mohou uplatnit při selekci odolných včelstev. Použití kombinace zvládnutí včelích chorob, racionálního používání léčebných postupů a správných zootechnických přístupů představuje základní předpoklad pro dlouhodobé udržení zdravých a vitálních včelstev.

## 2. Literární přehled

### 2.1 Včela medonosná

Včelařství je jedním z nejstarších oborů lidské činnosti. Člověku nejdříve přinášelo včelí produkty, jakými byly med a vosk. Později se začalo využívat i příznivých účinků mateří kašičky, včelího jedu a pylu. Pro své antibakteriální vlastnosti našel uplatnění i propolis (Veselý a kol., 2013).

Včela medonosná (*Apis mellifera*) se vyskytuje na Zemi již 80 miliónů let (Pohl, 2012). V České republice je zařazena mezi hospodářská zvířata (Bienefeld, 2010). Zatímco mnohá domestikovaná hospodářská zvířata by již bez člověka nepřežila, včelstvo si zachovalo svou přirozenost a divokost. Pokud z úlu vyletí roj a ve volné přírodě nalezne vhodnou dutinu, usadí se v ní. Najde-li vhodné zdroje pylu, nektaru nebo medovice, může roj přežívat i několik let a dále se množit (Čermák a kol., 2016).

V současné době žije na Zemi 6 druhů společenských včel. V Evropě se vyskytuje pouze včela medonosná. Podle exteriéru a některých vlastností se rozlišují plemena včel. Ve střední Evropě se nejvíce chová včela kraňská, včela tmavá, včela vlašská a hybridní včela Buckfastská. Nekontrolovatelné vzájemné křížení těchto plemen může vést až k agresivitě včel (Šefčík, 2014).

Přidal a Čermák (2005) řadí včelu medonosnou do kmene *Arthropoda* (členovci), třídy *Isecta* (hmyz), řádu *Hymenoptera* (blanokřídílí), podřádu *Apocrita* (štíhlhopasí), v tomto podřádu existuje několik morfologických skupin, přičemž včela patří do skupiny *Aculeata* (žahadloví), čeledi *Apoidea* (včelovití) a rodu *Apiformes* (včely).

Tělo včely se skládá ze tří částí: z hlavy, hrudi a zadečku. Celé tělo je kryto pevným chitinovým krunýřem (Sammataro, Avitabile, 2011). Hlava je zploštělá ve směru podélné osy těla. S hrudí je spojena tenkým zúžením umožňujícím pohyb (Veselý a kol., 2013). Po boku temene hlavy má včela dvě složené oči a na vrcholu přední části hlavy tři jednoduché oči rozmístěné do trojúhelníku, jehož vrchol směřuje dolů. Na čele jsou jamky, do kterých jsou vkloubena článkovitá tykadla. Pomocí tykadel dokáže včela vnímat čichová a hmatová podráždění (Šefčík, 2014).

Hrud' včely je složena ze tří původních hrudních článků (předohrudi, středohrudi a zadohrudi) a prvního článku zadečkového (bedra), který se při přestavbě orgánů ve stadiu kukly připevnil k hrudi a vytvořil její zadní část (Veselý a kol., 2013). Včela má tři páry nohou, které jí slouží k pohybu, ukládání voskových šupinek, sběru a ukládání pylu. Včela si ještě za letu z pylu a medu z medného váčku vytvoří pylové rousky, které přináší do úlu, ukládá do buněk plástů a konzervuje. Konzervovaný pyl slouží k výživě mladušek. Včela má dva páry blanitých křídel, které využívá nejen k létání, ale i k odvětrávání tepla a vydýchaného vzduchu z úlu. V zadečku včely jsou uloženy zaživací orgány, vyměšovací, cévní a nervové ústrojí, dále medný váček, jedová žláza, vzdušné vaky a žihadlo. Na žihadle se nachází zpětné háčky, které znemožňují jeho vytažení z rány. Včela si žihadlo po bodnutí vytrhne a umírá. Roztažitelnost zadečku zabezpečuje dostatečný prostor pro naplnění medného váčku při snůšce, ale i výkalového vaku během dlouhé zimy bez možnosti proletu (Šefčík, 2014).

## **2.2 *Varroa destructor***

Roztoč *Varroa destructor* (kleštík včelí) byl do Evropy zavlečen v polovině sedmdesátých let z Asie, kde žije na včele indické (*Apis cerana*) v naprosté rovnováze. Včela medonosná se nedokáže dostatečně roztoči bránit (Bienefeld, 2010).

První zmínky o výskytu roztoče *Varroa destructor* na našem území byly již v roce 1978, kdy se roztoč rozšířil převozem nakažených včelstev z pohraničních oblastí. I přesto, že v ohniscích nákazy a ochranném pásmu byla včelstva utracena, dalšímu šíření roztoče se nezabránilo. Bylo zavedeno vyšetření měli v zimním období. V případě pozitivního nálezu na stanovišti se všechna včelstva utrácela (Čermák a kol., 2016).

Samičky roztoče jsou viditelné pouhým okem. Jejich tělo je dlouhé 1,1 – 1,5 mm a široké 1,5 – 1,9 mm. Mají červenohnědé až hnědé lesklé zbarvení. Na hřbetě je tvrdý štít kryjící celé tělo se čtyřmi páry končetin a ústním ústrojím. Povrch těla roztoče výborně splývá s povrchem těla včel (Čermák a kol., 2016). Samečci roztoče mají tělo o průměru 0,8 mm a jsou šedobílí s měkkou pokožkou (Veselý a kol., 2013).

Vývojový cyklus roztoče probíhá na včelím plodu, kdy těsně před zavíčováním pronikne oplozená samička roztoče do buňky, nechá se zavíčkovat a s odstupem několika dnů naklade 5 – 6 vajíček. Z prvního se vylíhne sameček, z dalších samičky, které sameček oplodní. Samečci po spáření ještě v buňce hynou a samičky se přichytávají na dospělce a s ním opouštějí buňku. Z jedné samičky v zavíčkované buňce se vylíhne 4 – 5 roztočů, kteří se nechají po vyběhnutí včely zavíčkovat v dalších plodových buňkách (Kamler, 2015). Při zavíčkování dvou a více samiček v jedné buňce dochází ke křížení, a tím zvýšení životaschopnosti populace roztočů v úlovém prostoru (Dynes a kol., 2017).

Ve včelstvu jsou nejvíce napadeni roztočem trubci. K přenosu roztoče dochází při zalétávání trubců do cizích včelstev. Dělnice přenášejí roztoče do včelstev při zalétávání, loupežích a rojením. Největší podíl na šíření má však přemísťování nemocných včelstev. K šíření varroázy dochází i při zasilání včelích matek. Matky jsou sice napadány nejméně, ale přenos nemoci způsobují doprovodné včely (Veselý a kol., 2013).

### 2.2.1 Vliv roztoče *Varroa destructor* na zdravotní stav včelstev

Veselý a kol. (2013) uvádí, že se samička i vývojová stádia roztoče živí hemolymfou včel a včelího plodu, a tím nejen ochuzují včely o živiny, ale způsobují i ztráty hemolymfy četnými poraněními.

Sání na larvách a kuklách včel se projeví různým stupněm poškození líhnoucích se včel. V důsledku přiživování roztočů se včelám neuloží zásoby bílkovin a dalších látek potřebných pro dlouhověké zimní včely. Na první pohled se líhne zdravá včela, ale je krátkověká. Po zpracování dodaných zimních zásob, a když přijde její čas, vyletí z úlu uhynout v průběhu podzimu a zimy (Kamler, 2015). Pokud je teplý podzim s četnými prolety, odchází významná část zimujícího včelstva při těchto proletech a hodně včel umírá mimo úl. Taková včelstva jsou již koncem podzimu a na začátku zimy prázdná. Trvá-li letová aktivita, jsou oslabená včelstva terčem loupeží a dochází tak k dalšímu přenosu roztočů do okolních včelstev. V případě, že je masivní odchod včel až v zimních měsících, je možné nalézt na dně úlu velké množství mrtvých dělnic (Čermák a kol., 2016).

Větším problémem než samotná přítomnost samiček roztoče ve včelstvech jsou virová onemocnění, která roztoč na včely přenáší. Roztoč usnadňuje virům proniknutí do organismu porušením nebo obejitím ochranných bariér. Není-li u včelstva zaznamenáno virové onemocnění, odolá poměrně velkému počtu roztočů, jejichž množství je ve vhodnou dobu sníženo použitým léčivem (Čermák a kol., 2016). Stav, kdy včelstvo silně zamořené roztočem *Varroa destructor* kolabuje na oportunní virové nákazy, se nazývá parazitární syndrom – PMS (Tew, 2015).

Viry jsou nejmenší organismy, jejich velikost se udává v miliontinách milimetru (nm). Nejsou schopny samostatného života, nýbrž parazitují v buňkách živočichů, rostlin nebo bakterií. Viry jsou původci některých nemocí včelího plodu a dospělých včel. Rozmnožují se v buňkách určitých tkání, působí jejich rozpad a nakonec smrt infikovaného jedince (Veselý a kol., 2013).

Bylo objeveno několik virů, které napadají pouze roztoče *Varroa destructor*. Dalším zkoumáním těchto virů, lze zjistit jejich patogenitu k roztoči a následně je použít jako prostředek ke snížení populace roztočů ve včelstvu (Levin a kol., 2016).

U včel bylo doposud izolováno 20 různých virů. Většina těchto virů nevyvolává u včel žádné viditelné příznaky, nýbrž jsou znatelné až při úhynu včelstev (Pohl, 2008). Při diagnostice viróz včel se vychází z anamnestických údajů, klinických příznaků onemocnění a patologických změn na včelách, případně včelím plodu. Laboratorní diagnostika využívá např. elektronovou mikroskopii. Použití sérologických metod (imunodifuze, ELISA) vyžaduje přípravu specifických protilátek. Používají se také molekulární metody, např. RT-PCR (Čermák a kol., 2016). Včely jsou často infikovány dvěma a více viry, někdy také v kombinaci s výskytem hmyzomorky včelí a roztoče *Varroa destructor* (Ryba a kol., 2012). Dalmon a kol. (2017) spojují přítomnost roztoče *Varroa destructor* s osmi včelími viry.

### **Virus deformovaných křídel (DWV – Deformed wings virus)**

Virus deformovaných křídel byl poprvé identifikován v roce 1991. Je rozšířen na celém světě (Sammataro, Avitabile, 2011). Tento virus je u našich včel velmi rozšířen a je přenášen jak potravní šťávou, tak i infikovanými vajíčky a spermatem. Takto přenesená infekce však nepředstavuje pro včely nebezpečí. Jinak je tomu při

přenosu z roztoče *Varroa destructor* na kuklu včely, kdy se virus dostane přímo do hemolymfy a může docházet k vývojovým poruchám v kukle. Vylíhnuté včely mají zdeformovaná křídla a nohy nebo zkrácený a zduřelý zadeček. Pohybují se za značného vrávorání a přežívají jen několik hodin nebo dní (Pohl, 2008). Vysoká úroveň napadení včelstva roztočem *Varroa destructor* koreluje s nárůstem počtu včel s klinickými příznaky viru deformovaných křídel (Daníhlík, 2016).

Virus DWV napadá nejen včely a čmeláky, ale i druhy hmyzu, které žijí v úlech včely medonosné, a dokonce i volně žijící dravé druhy hmyzu, které zřejmě včely loví, a hmyz konzumující tělíčka uhynulých včel (Petr, 2016a).

Bylo zjištěno, že koncentrace viru DWV v nově vylíhlých včelách při nižší teplotě (30 °C) plodového plástu je několikanásobně vyšší než ve včelách vyvíjejících se při vyšší teplotě (33 °C). Znamená to, že slabší včelstva jsou v nevýhodě ve srovnání se silnými kromě jiného i proto, že v chladnějších fázích sezóny obtížně udržují teplo v plodových plástech. Důsledkem je vyšší napadení včelstev virem deformovaných křídel, zkracování jejich věku a následné zaostávání v růstu a jejich celkové kondici (Čermák, 2016).

### **Virus zčernání matečnicků (BQCV – Black queen cell virus)**

Virus BQCV byl poprvé izolován v roce 1977 a je spojován s výskytem hmyzomorky včelí (Sammataro, Avitabile, 2011). Vyvolává zčernání matečnicků a úhyn mateřích larev a kulek (Čermák a kol., 2016). Ačkoliv klinicky postihuje vývojová stadia matky, je častěji detekován u dospělých včel (Tantillo a kol., 2015).

### **Virus akutní paralýzy včel (ABPV – Acute bee paralysis virus)**

Virus ABPV byl poprvé identifikován v roce 1963 (Sammataro, Avitabile, 2011). Původcem je kulovitý virus o průměru 30 nm. Byl nalezen v Evropě a v Austrálii. Není infekční pro larvy (Veselý a kol.). Vyvolává úhyny na konci zimy a časně zjara. Jeho patogenita souvisí s napadením včelstva roztočem *Varroa destructor*, který se uplatňuje v šíření choroby a obejití bariéry včelího organismu. Důležitou úlohu v šíření tohoto onemocnění může hrát i roztočík včelí *Acarapis woodi* (Čermák a kol., 2016).

### **Virus chronické paralýzy včel (CBPV – Chronic bee paralysis virus)**

Virus CBPV byl poprvé izolován v roce 1963 serologickými metodami z mrtvých dospělých včel ze všech kontinentů, s výjimkou Jižní Ameriky, kde byl virus detekován za pomoci molekulární techniky (Tantillo a kol., 2015). Nákaza ve včelstvu probíhá často asymptomaticky. Klinické projevy onemocnění mohou být dvojího typu. První typ je charakterizován paralýzou, včely nemohou létat, třesou se, lezou mimo česno, mají vyvrácená křídla. Druhý typ se projevuje černáním včel a ztrátou ochlupení. Tento typ se označuje jako „černá nemoc“. Postižené včely se po několika dnech začnou třást, přestanou létat a hynou. Uvedené projevy se spojují se smíšenými bakteriálními infekcemi a také medovicovou snůškou. V souvislosti s varroázou včel byl CBPV zjištěn pouze u včelstev slabě nebo středně napadených roztočem *Varroa destructor* (Čermák a kol., 2016).

### **Virus pomalé paralýzy včel (SBPV – Slow bee paralysis virus)**

Virus SBPV byl poprvé izolován z dospělé včely v Británii (Fauquet a kol., 2005). Tvoří dlouhá vlákna, proto byl pojmenován Filamentous virus (virus F). Hemolymfa se po napadení tímto virem mléčně zakalí, podobně jako při rickettsióze. Působí zkrácení života včel. Uměle infikované včely hynou za 12 dnů (Veselý a kol., 2013). Podle Čermáka a kol. (2016) vyvolává velké ztráty společně s nosematózou, kdy infekci dochází poškozeným trávicím traktem.

### **Včelí virus Y (Bee virus Y)**

Podobně jako virus pomalé paralýzy včel zesiluje průběh nosematózy (Čermák a kol., 2016). Poprvé byl izolován v Británii. Přenos probíhá mezi dospělými včelami ústním ústrojím. Je rozšířenější než virus X (Fauquet a kol., 2005).

### **Včelí virus X (Bee virus X)**

Virus byl poprvé popsán v Británii. Přenos probíhá přes ústní ústrojí (Fauquet a kol., 2005). Vyskytuje se v Evropě, Austrálii a USA. Je spojován s výskytem měňavkovité nákazy (Čermák a kol., 2016). Nachází se na konci zimy v zadečku

včel. Virus se množí pomalu, vyhovuje mu nízká teplota v zimním chomáči včel. Zkracuje délku života včel (Veselý a kol., 2013).

### **Arkansaský včelí virus**

Původně byl detekován v USA, později byl zjištěn také v Anglii, někdy se vyskytuje společně s virem akutní a chronické paralýzy včel. Působí také na zkrácení života včel (Veselý a kol., 2013). První izolace viru byla z pylu získaného od včely medonosné (Fauquet a kol., 2005).

### **Berkeley bee virus (BBV)**

Virus byl poprvé izolován v Kalifornii během studia Arkansaského včelího viru (Fauquet a kol., 2005).

### **Kašmírský včelí virus (KBV – Kashmir bee virus)**

Poprvé byl izolován z *Apis cerana* v roce 1977, později byl nalezen v Austrálii, na Novém Zélandě a v Severní Americe. Kašmírský virus napadá všechna stádia včely bez jasných symptomů (Sammataro, Avitabile, 2011). V současnosti je kašmírský virus zjištěn i u *Apis mellifera* v USA a Evropě. Zkracuje délku života včel. Do jaké míry ovlivňuje průběh varroázy, není ještě zcela známo (Čermák a kol., 2016). Nicméně je spojován s několika virem, které úzce souvisí s kolapsem včelstva v důsledku napadení roztočem *Varroa destructor* (Tantillo a kol., 2015). Pomocí sekvenční analýzy byla zjištěna podobnost kašmírského viru a viru akutní paralýzy včel (Fauquet a kol., 2005).

### **Virus zakalených křídel (CWV – Cloudy wing virus)**

Virus byl izolován ze včel během studia ostatních včelích virů (Fauquet a kol., 2005). Je běžně rozšířen. Šíří se pravděpodobně vzduchem. U postižených včel vyvolává zakalení křídel a zkracuje život včel (Čermák a kol., 2016). Pohl (2008) dodává, že v souvislosti s roztočem *Varroa destructor* dochází k úhynu včel.



### **Izraelský virus akutní paralýzy (IAPV – Israel acute paralysis virus)**

Virus byl objeven v roce 2004 a v roce 2007 byl spojován s propuknutím syndromu zhroucení včelstev (CCD). Způsobuje ochrnutí včel, které pak umírají mimo úl. Přenos probíhá přes roztoče *Varroa destructor* (Sammataro, Avitabile, 2011). Při zkoumání vztahů mezi viry *in vitro* bylo zjištěno, že kašmírský včelí virus potlačuje nárůst izraelského viru akutní paralýzy (Carrillo-Tripp a kol., 2016).

### **Virová nákaza včelího plodu, váčková choroba (SBV – Sacbrood virus)**

Virová nákaza včelího plodu je globálně rozšířena. Poprvé byla identifikována v roce 1913 v USA (Tantillo a kol., 2015). V České republice se vyskytuje ojediněle. Většinou nezpůsobuje velké škody, jenom přechodná oslabení včelstev. Někdy je spojována s výskytem hniloby a zvápenatění včelího plodu. Virová nákaza je nejčastěji objevována na jaře, v létě spontánně mizí (Veselý a kol., 2013).

Původce nákazy je virus *Morator aetatulae*. Je kulovitého tvaru o průměru 30 nm. Má vysokou citlivost na vyschnutí a zvýšenou teplotu. Při 58 °C ztrácí schopnost vyvolat nemoc za 10 minut, při 80 °C ihned (Čermák a kol., 2016).

Virus se množí v hltanových žlázách a vylučuje v sekretu přidávaném včelami do pylových zásob (Sammataro, Avitabile, 2011). Podle Veselého a kol. (2013) bylo prokázáno, že v zásobách virus vydrží do příští sezóny, nýbrž v uhynulé vyschlé larvě virus nepřežívá. Veselý a kol. (2013) dále uvádí, že nákaza je přenosná hlavně v období, kdy je obsah larvy tekutý. Virus se může šířit potravou, ale i přes vajíčka matky. K rozšíření viru dopomáhá i roztoč *Varroa destructor*.

Nákaza se klinicky projeví až po zavíčkování, než se larva zakuklí. Poslední larvální pokožka se oddělí od nové pokožky kukly, ale nesvlékne se. Exuviální tekutina se nevstřebává, ale hromadí pod starou a novou pokožkou. Larva vyjmutá z buňky připomíná váček naplněný tekutinou. Zbarvení nemocné larvy se mění z perlově bílého na bledě žluté. Larvy hynou před zakuklením. Nakonec larva vysychá v černohnědou slupku (Veselý a kol., 2013).

## **Moku virus**

Virus moku byl nově identifikován na Havaji u invazní vosy *Vespula pensylvanica*, která se stala významným škůdcem napadajícím pestré druhové spektrum členovců včetně včely medonosné. S včelami sdílí tato vosa i pastvu na květech, kde si nektarem doplňuje svou potravu predátora. Útoky na včely a sdílení nektaru na květech jsou jednou z cest možného přenosu viru z vosy do havajských chovů včely medonosné. Mezi další možnosti přenosu se řadí i roztoč *Varroa destructor*. Moku virus byl identifikován na roztoči parazitujícím na nakažených včelách. Dosud nebyly popsány příznaky choroby, která by se u včel infikovaných moku virem projevovala. Jelikož virus moku napadá široké spektrum hostitelů a snadno přeskakuje na zcela nové hostitelské druhy, má dobré předpoklady pro globální rozšíření (Petr, 2016b).

Petr (2016b) dále popisuje souvislost viru moku s virem deformovaných křídel, kdy u jedinců s nízkým výskytem virových částic v těle byl zjištěn vysoký obsah viru deformovaných křídel a naopak.

## **Kakugo virus (KV)**

V roce 2004 byl poprvé popsán v Japonsku Kakugo virus z rodu *Iflavirus*. Izolován byl z mozku agresivních včelích dělnic (Fujiyuki a kol., 2005). RNA kakugo viru je velmi podobná RNA viru deformovaných křídel (Terio a kol., 2008).

## **Egyptský virus (EBV – Egypt bee virus)**

Egyptský virus byl izolován ze včely medonosné v Egyptě na jaře roku 1977. Virus je odlišný od většiny virů domestikovaných včel. Vykazuje určitou spojitost s virem deformovaných křídel (Fauquet a kol., 2005).

## **2.3 Diagnostika varroózy**

Včasná diagnostika varroózy je důležitá pro zamezení zvyšování počtu roztočů ve včelstvu. Je známo několik způsobů monitoringu varroózy, které se od

sebe odlišují pracností, potřebou technického vybavení a vypovídací schopností (Čermák a kol., 2016).

### **Průkaz samiček roztočů v měli**

K vyšetření se používá zimní měl, ve které lze prokázat roztoče, kteří uhynuli (Veselý a kol., 2013). Efektivnější je sledování přirozeného denního spadu roztočů v měsících červen až září. Ke sledování spadu slouží zdvojená síťová podložka vložená na dno úlu nebo lépe celozasíťovaná dna – tzv. varroadna, která umožňují snadné a rychlé spočítání roztočů bez kontaktu se včelami. Pro správný odečet roztočů je nutné zamezit přístupu do úlu mravencům, kteří mohou spadlé roztoče vynášet (Čermák a kol., 2016). Denní nález jednoho roztoče na podložce znamená, že ve včelstvu je 200 až 300 roztočů (Gritsch, 2010). Kamler (2015) uvádí při spadu roztočů jako kritické hodnoty 2 – 5 samiček roztoče.

### **Vyšetření trubčího plodu**

Roztoč *Varroa destructor* napadá až 10x více trubčí plod než plod dělničí. Pro vyšetření je doporučen 1 dm<sup>2</sup> zavíčkovaného trubčího plodu (asi 200 buněk). Při vyšetřování se trubčí buňky odvíčkují a z buněk se vyjmou kukly. Lze tak diagnostikovat dospělé samičky i jednotlivá vývojová stadia (Čermák a kol., 2016).

### **Vyšetření dospělých včel**

Diagnostikovat varroázu z dospělých včel lze jen ve včelstvu, které je roztočem silně napadeno. K vyšetření se odebírá 300 včel (Veselý a kol., 2013). Včely lze posléze ošetřit termoterapií při 46 - 49 °C nebo použít tzv. smyv roztočů pomocí benzínu, lihu či teplé vody s přidáním detergentu. Možné je i použití velmi jemného práškového cukru, který má však menší záchytnost samiček ve vzorku. Ze skutečného množství odebraných včel se vypočte procento samiček roztočů. Kritická hodnota je 10 % v červnu a 20 % na konci července (Čermák a kol., 2016).

## 2.4 Možnosti tlumení varroázy

Metody pro tlumení varroázy se vyvíjely v závislosti na účinnosti syntetických látek pro snížení výskytu roztočů, tzv. akaricidů. Pokud nebyl problém s jejich účinností, bylo jejich nasazení často jediné opatření proti roztočům. S pozdějšími problémy s jejich nedostatečnou účinností získaly na významu alternativní způsoby tlumení varroázy a zootechnická opatření (Čermák a kol., 2016). Snížení počtu roztočů lze dosáhnout chovu včel varroatolerantních (Plettner a kol., 2017). Cílem je vytvořit zdravé zimní včelstvo a při zimním ošetření pokud možno zbavit včelstvo roztočů důkladně, aby novou sezónu začínalo s nejmenším možným počtem roztočů (Pohl, 2012).

### 2.4.1 Použití syntetických přípravků

Syntetické akaricidy jsou pro potlačování varroázy používány od 80. let 20. století. Avšak poměrně brzy se začaly objevovat první náznaky vzniku rezistentních populací roztočů na tyto přípravky. V některých zemích již dosáhla úroveň rezistence roztočů vůči těmto přípravkům takové intenzity, že je jejich použití neefektivní (Čermák a kol., 2016). Používání syntetických akaricidů je na ústupu i z důvodu dlouhodobé kontaminace včelích produktů (Bienefeld, 2010).

Základem léčby je ošetření včelstev v zimě v období bez plodu. Účinné látky jsou do včelstva vpravovány fumigací nebo aerosolem (Veselý a kol., 2013). Fumigace je ošetření včel pomocí fumigačního pásku s nakapáním účinné látky (amitraz) u přípravku Varidol 125 nebo s použitím přípravku MP – 10 FUM (účinná látka tau-fluvalinát). Při ošetření musí být teplota alespoň 10 °C. Pod tuto teplotu je kvůli utváření zimního chomáče ošetření méně účinné. Při aerosolovém ošetření účinná látka přípravku M-1-AER (tau-fluvalinát) nebo Varidol 125 (amitraz) je aplikována formou aerosolu pomocí speciálního zařízení. Za použití lékařského acetonu je možno ošetření provést i při teplotách pod 10 °C. Je to velkou výhodou pro možnost pozdního ošetření v zimě, když jsou včelstva bez plodu (Čermák a kol., 2016).

Jarní ošetření je podmíněno intenzitou varroázy u jednotlivých chovatelů a vychází se z vyšetření zimní měli a stanovení limitu počtu samiček. Léčení musí být spojeno s fumigačním ošetřením a provedeno nejpozději do 15. dubna. K jarnímu

léčení se používá přípravek M-1-AER s účinnou látkou tau-fluvalinát, kterým se potírají zavíčkované buňky plodového plástu (Čermák a kol., 2016).

V letním období se léčí v případě, že přirozený spad je vyšší než 5 samiček roztoče na včelstvo nebo tam, kde při vyšetření zimní měli bylo více než 30 % stanovišť daného katastru s průměrným spadem vyšším než tři roztoči na včelstvo. Používá se chemické ošetření v podobě dlouhodobých nosičů – Gabon PF 90 s účinnou látkou tau-fluvalinát a Gabon PA 92 s účinnou látkou acrinathrin (Čermák a kol., 2016). Gabony jsou pásy, které se vkládají do uliček mezi plodové plásty na 3 – 4 týdny (Veselý a kol., 2013).

#### 2.4.2 Použití přípravků na bázi přírodních látek

Látky přírodního původu používané pro tlumení varroázy mají oproti syntetickým přípravkům řadu výhod. Hlavní předností je absence škodlivých reziduálních látek ve včelích produktech, především ve vosku (Čermák a kol., 2016). Kyselina mravenčí a šťavelová jsou silně hydrofilní, proto se nerozpouští v tuku, resp. ve vosku (Daníhlík, 2008). Přírodní látky se velmi snadno rozkládají. Na straně nevýhod je však nutné upozornit na daleko vyšší pracnost u některých ošetření, nutnost znalosti a zkušenosti včelaře s aplikací těchto látek (Čermák a kol., 2016). Přípravky na bázi přírodních látek k ošetření proti roztočům obsahují organické kyseliny nebo tymol. Z organických kyselin sem patří kyselina mravenčí, mléčná a šťavelová (Pohl, 2012).

#### **Kyselina mravenčí**

Kyselina mravenčí byla jednou z prvních látek zkoušených pro tlumení varroázy. Hlavním obdobím pro její používání u produkčních včelstev je letní ošetření (Pohl, 2008). K použití kyseliny mravenčí není nutný v České republice veterinární předpis (Daníhlík, 2008). Výpary kyseliny mravenčí usmrcují roztoče na včelách i v zavíčkovaných plodových buňkách, aniž by nějak poškodily včelstvo (Bienefeld, 2010). Optimální teploty pro účinný odpar bez většího rizika poškození včelstev jsou mezi 15 až 25 °C. Při vyšších teplotách dochází k rychlému odpařování a vysoké koncentraci par v úlu, může tedy dojít k poškození samotných včel nebo plodu. V jarním období se musí aplikace kyseliny ukončit před začátkem významnější jarní snůšky kvůli riziku senzorickeho ovlivnění medu (Čermák a kol.,

2016). K neklidu ve včelstvu či poškození plodu může dojít při použití kyseliny mravenčí jak v nevhodnou dobu, tak i při špatném dávkování (Bienefeld, 2010). Kyselina mravenčí souběžně s roztoči ničí i spóry noseimové nákazy na plástech. Vliv má také na zvápenatění plodu, kdy včely po aplikaci kyseliny mravenčí začnou intenzivně odstraňovat plod napadený zvápenatěním (Anonym 1). Existují krátkodobé odpařovací systémy a dlouhodobé odpařovací systémy (Čermák a kol., 2016).

Krátkodobé odpařovače účinkují 2 – 4 dny. Opakovaná aplikace se provádí, pokud je ve včelstvu přítomen zavíčkovaný plod. Využívají se odpařovače s 85 % nebo 65 % kyselinou mravenčí. Výhodou je často jejich nízká cena, u některých i variabilita velikosti dávky individuálně pro každé včelstvo. Za nevýhodu lze pokládat vyšší pracnost (Čermák a kol., 2016).

Dlouhodobé odpařovače mají za cíl zahubit jedním ošetřením co největší počet samic roztočů ve včelstvu za přítomnosti zavíčkovaného plodu. Účinkují alespoň 10 dní. Existují i odpařovače, které se odpařují 2 – 3 týdny. V České republice jsou nejvíce používány odpařovače Nassenheider, Yannick, MiteGone a Liebigův odpařovač (Čermák a kol., 2016).

### **Kyselina mléčná**

Pro ošetření kyselinou mléčnou se využívá její 15 % roztok, který se přímo na včely aplikuje ve formě aerosolu. Kyselina nepůsobí na zavíčkovaný plod (Pohl, 2008). Kyselina mléčná poleptá sací ústrojí roztoče, takže hyne hladem. Při odborném použití včely kyselinu snášejí velmi dobře a neškodná je i pro včelaře. Při jednorázovém postřiku kyseliny mléčné je dosaženo 80 % účinku, při dvojitým postřiku až 90 %. Při aplikaci by teplota neměla klesnout pod 5°C (Bienefeld, 2010).

Nevýhodou aplikace kyseliny mléčné je nutnost rozebrání celého včelstva a ošetření včel na plástech rámeč po rámeč. Pro přílišnou náročnost se nehodí pro produkční včelstva, ale je využívána při ošetření oddělků. Jednak je pro tato méně početná včelstva vhodnějším ošetřením než kyselina mravenčí a časová náročnost u pětirámečového oddělku je přijatelná (Čermák a kol., 2016).

## **Kyselina šťavelová**

Kyselina šťavelová může být použita v zimním období ve včelstvech bez plodu. V průběhu včelařské sezóny se využívá k ošetření oddělků bez plodu, rojů a smetenců (Pohl, 2008). Mezi formy ošetření patří sublimace a pokapání včel cukerným roztokem kyseliny šťavelové. Sublimační metoda vyžaduje přístroj, který zahřeje krystalickou kyselinu, čímž dojde k její sublimaci. Nejčastěji se využívá 3,5 % až 4,5 % roztok aplikovaný v cukerném sirupu pokapáním včel přímo do uliček. Pro schopnost vyvazovat vápník z organismu a tvořit nerozpustné šťavelany se doporučuje, aby se včely setkaly s kyselinou šťavelovou pouze jednou za život (Čermák a kol., 2016).

## **Thymol**

Další možností využití látek přírodního původu je uvolňování thymolové silice v prostředí úlu. Koncentrace, kterých se při použití thymolu dosahuje, jsou pro samičky roztoče toxické. Nevýhodou thymolové silice je její pronikavá vůně, která s sebou nese jisté riziko vzniku loupeží. Proto se doporučuje ošetření všech včelstev na stanovišti (Čermák a kol., 2016). Za další nevýhodu lze považovat nutnost stálé vysoké teploty během ošetření po dobu 3 – 6 týdnů. Přípravek nepůsobí na roztoče v zavíčkovaném plodu (Pohl, 2012). V České republice jsou registrovány dva přípravky. Přípravek Thymovar se aplikuje formou proužků z organického materiálu napuštěného thymolem položením na horní loučky rámků. Přípravek Apiguard se aplikuje ve formě gelu v mističce, ze které se thymol uvolňuje. Oba přípravky jsou určeny primárně pro letní použití pro ochranu zimní generace včel (Čermák a kol., 2016).

### 2.4.3 Zootechnická opatření

Metodik, jak pomocí zootechnických zásahů lze velmi výrazně ovlivnit úroveň napadení včelstev, je celá řada. Všechny metody využívají poznatků, že roztoči se rozmnožují na včelím plodu. Nezavíčkovaný plod může posloužit jako past k odstranění roztočů ze včelstva. Je-li včelstvo bez plodu, přidá se mu plást s otevřeným plodem, roztoči se na plodu soustředí. Po zavíčkování se napadený plod odstraní. Účinnost tohoto opatření se odhaduje na 90 %, po zákroku tedy zbude ve včelstvu 10 % z původní populace roztočů. Mezi nejčastější metody patří tvorba

oddělků, dělení včelstev, odběr zavíčkovaného dělničího a trubčího plodu, přemetení na mezistěny, klíčkování matek a chov včel na přirozeném díle (Čermák a kol., 2016).

### **Odstranění trubčího plodu**

Roztoč preferuje trubčí plod z důvodu delšího vývoje trubce, který trvá 24 dní, zatímco u dělnice jen 21 dní. Roztoč se naláká na trubčí plod, tím se sníží napadení plodu dělničího. Zavíčkovaný trubčí plod se z úlu vyjme a zmrazí. Zahubí se tím nejen roztoči, ale i trubci. Během teplých měsíců se doporučuje opakovat tento proces každých 18 – 20 dní. Trubčí plásty lze takto do včelstva vkládat a odebírat několikrát (Tew, 2015). Vhodnější využití zmrazeného trubčího plodu je podle Pohla (2008) rozpuštění pomocí parního tavidla za rychlého zisku vosku. Odstranění zavíčkovaného trubčího plodu je jednoduchá a rychlá metoda redukce populace roztoče. Je méně účinná, ale je vhodná ke zpomalení nárůstu populace roztočů během sezóny (Čermák a kol., 2016). Bienefeld (2010) doporučuje vyřezat i stavební rámky, které jsou zavíčkované jen částečně, protože na starších nezavíčkovaných trubčích larvách se již nalézají velké množství roztočů.

### **Odstranění veškerého plodu**

Bylo zjištěno, že v našich podmínkách je 30 – 40 % roztočů na včelách a 60 – 70 % roztočů na plodu, a to převážně pod víčky. Na základě znalosti vývoje roztoče *Varroa destructor* lze ozdravit včelstvo několika metodami. Nejradikálnější metodou je přemetení včelstva na mezistěny. Nejčastěji se využívá ke komplexnímu ozdravení včelstva. Mezi méně radikální metody patří odebrání veškerých plodových plástů. Tímto zásahem se včelstvo jednorázově zbaví 60 – 70 % populace roztočů (Holub, 2017). Büchler a kol. (2010) doporučuje kompletní odstranění plodu jednou za sezónu. Šetrnější může být vyřezání pouze veškerého zavíčkovaného plodu. S minimalizací negativního dopadu na populaci včel přichází varianta postupného odběru plodu. Ze skupiny třech až pěti včelstev se plod ukládá do sběrného úlu, kde se ošetří proti roztočům. Po dekontaminační lhůtě mohou být včely vráceny do původního včelstva nebo využity pro posílení oddělků (Holub, 2017).



## **Přeleták s lapačem na roztoče**

Další možností snížení počtu samiček roztočů během sezóny bez použití léčiv je tvorba přeletáku se starou matkou. V rodičovském včelstvu se zatím vyvine nová matka a naláhne všechn plod. V tu chvíli je optimální doba pro vložení lapače na roztoče v podobě otevřených plodových plástů (Čermák a kol., 2016).

## **Izolační plást**

Do izolátoru s mřížkou se vloží celý plást společně s matkou. Po deseti dnech je matka izolována na novém prázdném plástu a nakladený plodový plást se až do zavíčkování ponechá ve včelstvu. Tímto způsobem je matka každých deset dní přesouvána na nový plást. Zavíčkovaný plodový plást je odebrán a ošetřen buď kyselinou mravenčí, nebo v horším případě zničen. Jelikož je tento postup opakován třikrát, dochází tím k redukci populace roztoče (Pohl, 2008). Metoda izolování matky je relativně časově náročná a hodí se pro zkušené včelaře s méně včelstvy a do bioprovozů (Čermák a kol., 2016).

## **Oddělky**

K tvorbě oddělků je zapotřebí plod a dělnice ze včelstva. Po přidání matky nebo jejím odchovem včelami z otevřeného plodu se utvoří nové včelí společenství. Vytvořením oddělku se tedy sníží počet roztočů ve včelstvu (Čermák a kol., 2016).

## **Hypertermie**

Hypertermie je metoda zahřátí plodu na kritickou teplotu, při které larvy a kukly přežijí, zatímco stádia roztoče zahynou. Ze včelstva se vyjmou plodové plásty a podobu dvou hodin jsou vystavovány určité teplotě v termostatu. Po uplynutí potřebné doby jsou plásty vráceny do včelstva. Následujících 10 – 12 dní je možné sledovat zvýšený spád roztočů daný tím, jak se postupně líhnou včely a mladušky čistí vyběhlé buňky. Ošetření se provádí na jaře, když jsou první plodové plásty zavíčkované. Jako podporující opatření se může v červnu provést vyřezání trubčiny (Jörger, 2014).

#### 2.4.4 Přirozená odolnost včel vůči varroáze

Některá včelstva mají varroatolerantní znaky, které snižují reprodukční schopnosti roztoče až o 30 % (Locke a kol., 2012). Mezi varroatolerantní znaky patří Varroa senzitivní hygiena (VHS). VHS se projevuje častějším uklízením nemocných a mrtvých včel či odstraněním napadeného zavičkovaného plodu. Dochází k efektivnímu zpomalení růstu populace roztočů. VHS je dědičné, využívá se tedy při selekci včelstev (Tsuruda a kol., 2012). Včely s VHS mají několik odlišných genů ovládajících nervovou vzrušivost. Tyto geny umožňují včelám lépe najít roztočem napadený plod, zvyšují totiž jejich čichovou citlivost a schopnost reagovat na roztoče (Navajas, 2008). Ukazuje se, že vyšlechtěné populace s varroatolerantními znaky nemusí vykazovat stejné vlastnosti při změně prostředí, případně při setkání s jinou populací roztočů (Čermák a kol., 2016).

Selekci genů VHS lze usnadnit metodou inseminace jedním trubcem. Inseminace spermatem jednoho trubce umožňuje rozpoznat, jak se dědí jednotlivé znaky nebo vlastnosti. Sperma trubce lze rozdělit na více dávek a inseminovat několik matek identickým spermatem. Rozdíly mezi jejich potomky jsou dány variabilitou z mateřské strany. Vlastnost včel VHS je řízena pouze čtyřmi alelami s aditivním účinkem. Pro plnou varroatoleranci stačí, aby včely měly alespoň tři alely ze čtyř možných (Prýmas, 2017).

Pro testování hygienického chování za standardizovaných podmínek byly vyvinuty různé metody. Mezi dvě náročnější metody se řadí pozorování odpovědi včel na zamoření plodu roztočem a metoda zmrazeného plodu (Büchler a kol., 2010). Pro metodu zmrazeného plodu se odebírá ze včelstva část zavičkovaného plodu, zamrazí se a vrátí zpět do včelstva. Za 24 hodin se prohlédne, kolik mrtvého plodu včelstvo odstranilo. Procento odstraněného plodu ukazuje, jaké je hygienické chování včelstva. Pro urychlení usmrcení plodu lze použít tekutý dusík (Frost, 2016). Přednost je však dávana díky jednoduššímu provedení metodě špendlíkem zabitého plodu. U této metody je obvykle 50 buněk obsahujících mladé larvy propíchnuto jemným špendlíkem na hmyz. Sleduje se odstranění poškozených nebo mrtvých larev v závislosti na čase (Büchler a kol., 2010). Frost (2016) nedoporučuje testovat hygienické chování včel v době vysoké snůšky, období extrémně vysokých nebo nízkých teplot nebo delšího sucha.

## 2.5 Nosematóza

Nosematóza je nakažlivé onemocnění dospělých včel známé již v druhé polovině 19. století. Vyskytuje se v chovech včel na celém světě, je jednou z nejrozšířenějších chorob. V České republice se objevuje často. Může výrazně ovlivnit zdravotní stav včelstev (Čermák a kol., 2016).

### 2.5.1 Původce a vývoj nosematózy

Původci onemocnění jsou dva druhy mykotických organismů – hmyzomorka včelí *Nosema apis* a *Nosema ceranae*. Oba druhy vytváří oválné až mírně hruštičkovité spory o velikosti 4 – 7 x 2 – 4 µm. *Nosema apis* má větší spory než *Nosema ceranae*. K odlišení druhů se využívá počítačové analýzy obrazu z mikroskopu. Přesnější rozlišovací metodou je však použití metody PCR (Čermák a kol., 2016).

Včela se nakazí alimentárně pozřením infekční spory spolu s potravou. Uvnitř spory se nachází pólové vlákno, kterým se spora po nabobtnání uchytí na stěně žaludku včely (Daníhlík, 2010a). Pólové vlákno může dosahovat délky až 400 µm. V epiteliálních buňkách žaludku včely pak probíhá merogonie. Vytvoří se se kulaté meronty mající 1 až 5 jader. Meronty se rozpadnou na jednojaderné merozoity. Merogonie se může několikrát opakovat. Následuje sporogonie. Merozoity dozrávají ve sporonty, které se jednou dělí a vznikají z nich sporoblasty, které vyzrávají ve spory (Čermák a kol., 2016).

Vývoj *Nosema* spp. u matky je velmi rychlý. Třetí den po nakažení již matka vylučuje společně s výkaly nové spory *Nosema* spp. V případě včely dělnice trvá celý vývojový cyklus týden (Peroutka, 2017).

V důsledku intracelulárního vývoje *Nosema* spp. v epiteliálních buňkách žaludku dochází k destrukci žaludeční sliznice, poruchám trávení bílkovin i glycidů, porušení ochranné bariéry trávicího traktu, hromadění nestrávených zbytků potravy ve výkalovém vaku a kálení. U kojiček způsobuje porucha vstřebávání bílkovin atrofii hltanových žláz. Postižené včely nemohou krmit plod a matku (Čermák a kol., 2016).

### 2.5.2 Klinické příznaky a diagnostika

Zpočátku probíhá onemocnění u většiny matek bez příznaků. Pouze některé mívají zvětšený zadeček. Příčinou je zvětšený žaludek, jehož stěna je stejně jako u dělnic bělavá a křehká. Za dva až tři dny od nakažení jsou matky méně pohyblivé, přestávají klást a hynou (Veselý a kol., 2013). Postižené včely kálí na česně nebo i na stěnách úlu (Čermák a kol., 2016). Peroutek (2017) uvádí, že hlavní příčinou výměny již přijatých matek je právě nosematóza.

K diagnostice se využívá koprologická metoda. Izolovaná matka se nechá vykálet na podložní sklíčko. Vzorek výkalů se bez jakékoli úpravy vyšetří pomocí mikroskopu. Výkaly nemocné matky jsou plné spor *Nosema* spp. (Peroutka, 2017).

### 2.5.3 Prevence a léčení

Největší význam při tlumení nosematózy má správné ošetřování včelstev. Silná včelstva, která bez námahy udržují potřebný tepelný režim, jsou vůči nosematóze méně náchylná (Veselý a kol., 2013). Při prevenci onemocnění je důležitá důkladná dezinfekce veškerého vybavení (Peroutka, 2017).

Jako podpurný prostředek k tlumení nosematózy lze může použít odparný systém s kyselinou mravenčí. Páry kyseliny mravenčí vyvolávají částečně devitalizaci spor. Důležitější je prevence, správná celoroční péče o včelstva, včasné doplňování zimních zásob, hygienické krmení a napájení, pravidelná dezinfekce úlů a častá obměna díla (Čermák a kol., 2016).

## **2.6 Aktuální situace zdravotního stavu včelstev v ČR**

Pro plošné sledování intenzity varroázy je od roku 1982 v České republice povinné vyšetření zimní měli. Každý chovatel včel má povinnost zaslat do 15. února daného roku směsný vzorek měli od svých včelstev (Čermák a kol., 2016).

Zdravotní stav tuzemských včelstev je z pohledu nákazy varroázou v roce 2016 výrazně lepší než v předešlém roce. Z výsledků vyšetření (tabulka 1) je patrné, že počet včelstev s vysokým obsahem roztočů se meziročně snížil z téměř 20 % v roce 2015 na 7 %. Naopak na více jak dvojnásobek vzrostl podíl vzorků zcela bez roztočů. Z každoročních vyšetření vzorků vyplývá, že rok 2015 byl z hlediska

výskytu roztočů nejhorší v historii. Intenzitu onemocnění může ovlivnit také počasí, především velmi časný nástup jara s teplými dny, což se negativně projevilo i začátkem roku 2014 a následně ovlivnilo výsledky vzorků odebraných v roce 2015 (Pejchal, 2016).

Tabulka 1: Množství roztočů *Varroa destructor* v odebraných vzorcích (Pejchal, 2016)

	2015	2016	2015 (v %)	2016 (v %)
Vzorky s více než 3 roztoči	10 870	3 747	19	7
Vzorky se 3 a méně roztoči	33 344	24 307	59	43
Vzorky bez roztočů	12 463	28 539	22	50
Vzorky celkem	56 677	56 593	100	100

### **3. Cíl práce**

Cílem diplomové práce bylo zhodnotit vliv roztoče *Varroa destructor* na zdravotní stav včelstev a na výskyt virových onemocnění včel. Zkoumána byla i přítomnost parazitických hub rodu *Nosema*.

## 4. Materiál a metody

### 4.1 Charakteristika stanoviště a včelstev

Stanoviště včelstev se nachází ve Svojnících na Prachaticku v nadmořské výšce 488 m nad mořem. Průměrné zimní teploty činí od -5 do -9 °C, průměrné letní teploty se pohybují od 13 do 17 °C. Převládající směry větrů: západní a jihozápadní. Na stanovišti se nachází 60 včelstev. Všechna včelstva jsou na stanovišti po celý rok. Úly jsou nástavkové, desetirámkové a převážně vyrobené ze dřeva. Je používáno zasíťované varroadno (obrázek 1).



Obrázek 1: Zasíťované varroadno s otvorem pro vkládání diagnostické podložky.

Zdroj: vlastní foto.

Pro experiment byla vybrána 4 průměrná včelstva. Včelstva číslo 4 a 8 jsou umístěna ve včelíně, který je částečně zastíněný ovocnými stromy (obrázek 2) a včelstva číslo 12 a 13 se nachází na stojanech u včelína.



**Obrázek 2: Včelín.**

Zdroj: vlastní foto.

## **4.2 Odběr vzorků a varroamonitoring**

První odběr vzorků pro detekci virových onemocnění včel a spor *Nosema* spp. proběhl po vytočení veškerého medu 9. 9. 2016. Mrtvé včely byly sbírány ze dna úlu a dávány do sterilních uzavíratelných plastových nádobek. Počet posbíraných včel se pohyboval od 5 do 10 kusů z jednoho včelstva. Vzorky včel byly dále uchovávány při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Následně bylo provedeno léčení včelstev Formidolem 81 s účinnou látkou kyselinou mravenčí. Poté byly do včel vloženy podložky pro spočítání roztočů *Varroa destructor*. Poprvé byla podložka vyndána a roztoči spočítáni druhý den po léčení (obrázek 3). Zjištěný počet roztočů *Varroa destructor* pro každé datum byl vydělen počtem dní, jak dlouho byla podložka v úlu, aby se stanovil denní spád roztoče. Očištěná podložky byla vrácena do včelstev a ponechána v nich následující 3 dny. Čtvrtý den ráno proběhlo spočítání roztočů. Tento postup byl opakován až do 7. 10., kdy proběhlo poslední spočítání roztočů. Druhý odběr vzorků pro detekci virových onemocnění včel byl proveden po léčení včelstev 13.9.





**Obrázek 3: Diagnostická podložka s mělí a roztoči.**

Zdroj: Miroslav Janeček.

### **4.3 Příprava vzorků pro detekci virových onemocnění**

Pro detekci virových onemocnění byly použity vzorky před léčením včelstev a po léčení. Zkoumán byl výskyt viru deformovaných křídel (DWV), virové nákazy včelího plodu (SBV), viru akutní paralýzy včel (ABPV) a viru zčernání matečnicků (BQCV).

Pro přípravu vzorků bylo nutné umýt třecí misky a tloučky, vložit je do autoklávu k důkladné sterilizaci a následně je uložit do  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Vzorky včel byly postupně rozdrceny v tekutém dusíku a připraveny na izolaci virové RNA.

#### **Izolace RNA**

Pro izolaci virové RNA byly použity dvě metody – pomocí TRI-reagentu a kitem Qiagen.

Izolace virové RNA pomocí TRI-reagentu byla provedena dle následujícího postupu (De Miranda a kol., 2013):

- 1) Nachladit centrifugu na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- 2) Homogenizace včel při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  v trizolu.
- 3) Přidání 0,5 ml chloroformu.

- 4) Vortexovat 1 minutu.
- 5) Centrifugace 8 000 g 15 minut, 4 °C.
- 6) Odebrat vrchní vodnou fázi.
- 7) Přidat stejné množství isopropanolu, promíchat a nechat srážet při -20 °C 15 minut.
- 8) Centrifugace 8 000 g 15 minut, 4 °C.
- 9) Vylít isopropanol, vysušit pelet.
- 10) Rozpustit pelet v 10 µl RNase-free vodě.

Izolace virové RNA kitem Qiagen dle protokolu:

- 1) Připravit eppendorfky s 450 µl pufru RLT s β-Mercaptoethanolem (10 µl na 1 ml pufru).
- 2) Navážit množství izolovaného vzorku – nesmí přesáhnout 100 mg.
- 3) Homogenizovaný vzorek včel přemístit do RLT pufru a inkubovat 1 – 3 minuty v 56 °C.
- 4) Přemístit lyzát (sestříhnout špičku v případě nutnosti) do QIAshredder spin kolonky (fialová) umístěné v 2 ml sběrné zkumavce a centrifugovat 2 minuty na nejvyšší rychlost. Opatrně přemístit supernatant do nové mikrocentrifugační zkumavky (bez peletu).
- 5) Přidat polovinu množství 96 % (100 %) etanolu a promíchat pipetou.
- 6) Přemístit vzorek na RNeasy spin kolonku (růžová) umístěnou v 2 ml sběrné zkumavce. Opatrně zavřít víčko a centrifugovat 15 s na 10 000 rpm. Vylít co proteklo.
- 7) Přidat 700 µl pufru RW1 na kolonku. Zavřít a centrifugovat 15 s při 10 000 rpm. Vylít co proteklo.
- 8) Přidat 500 µl pufru RPE na kolonku. Zavřít a centrifugovat 15 s při 10 000 rpm. Vylít co proteklo.
- 9) Přidat 500 µl pufru RPE na kolonku. Zavřít a centrifugovat 2 minuty při 10 000 rpm.

10) Vložit RNeasy spin kolonku do nové 2 ml sběrné zkumavky. Zavřít a centrifugovat na nejvyšší rychlost 1 minutu.

11) Umístit kolonku do nové 1,5 ml zkumavky, přidat na střed kolonky 40  $\mu$ l RNase-free vody- Zavřít a centrifugovat 1 minutu na 10 000 rpm. Dále uchovávat v -80 °C nebo po dobu nezbytně nutnou na ledu.

### **Syntéza cDNA**

Před vlastní syntézou cDNA bylo nutné provést přečištění RNA od DNA dle následujícího postupu:

- 1) Do eppendorfky dát 1  $\mu$ l rDNase I a  $1/10$  objemu 10xDNase I buffer.
- 2) Vložit do termostatu na 20 minut při 37 °C.
- 3) Přidat  $1/10$  objemu DNase inactivation reagent.
- 4) Nechat 2 minuty při pokojové teplotě.
- 5) Centrifugace 1,5 minuty při 10 000 rpm.
- 6) Přenést do čisté eppendorfky – bez peletu.

### **Vlastní syntéza cDNA (reverzní transkripce):**

- 1) Do eppendorfky dát 3  $\mu$ l přečištěné RNA, 1  $\mu$ l oligo (dT) 15 primer a 1  $\mu$ l nuklease free vody.
- 2) Zahřát na 70 °C po dobu 5 minut.
- 3) Přidat Master mix: 6,6  $\mu$ l nuclease free vody, 1  $\mu$ l d NTP, 4  $\mu$ l 5xRxN Buffer, 2,4  $\mu$ l chloridu hořečnatého a 1  $\mu$ l enzymu reverzní transkriptázy.
- 4) Vložit do termostatu na 5 minut při teplotě 25 °C.
- 5) Teplotu zvýšit na 42 °C po dobu jedné hodiny.

## Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Metoda PCR je velmi citlivá a umožňuje amplifikaci vybrané sekvence DNA z velmi malého množství templátové DNA (Anklam et al., 2002). Jako komponenty PCR do celkového množství 10 µl byly použity:

PPP Master Mix (Top Bio)	5 µl
Primer Forward	0,5 µl
Primer Reverse	0,5 µl
Nuclease-free voda	3 µl
cDNA	1 µl

Připravené vzorky byly vloženy to termocycleru a byl nastaven následující amplifikační program: 95 °C po dobu 1 minuty, denaturace při 94 °C 30 sekund, annealing (tabulka 2), elongace při 72 °C po dobu 1 minuty. Dokončení PCR reakce probíhalo při 72 °C po dobu 8 minut a následného zchlazení na 4 °C. Od denaturace až po elongaci se cyklus 35x opakuje.

Tabulka 2: Sekvence primerů a teplota annealingu.

Virus	Forward primer (5' - 3')	Reverse primer (5' - 3')	T <sub>a</sub> (°C)	Zdroj
DWV	TTTGCAAGATGCTGTATGTGG	GTCGTGCAGCTCGATAGGAT	55	Chen a kol. (2002)
SBV	GGATGAAAGGAAATTACCAG	CCACTAGGTGATCCACACT	48	Ryba a kol.(2012)
ABPV	TGAGAACACCTGTAATGTGG	ACCAGAGGGTTGACTGTGTG	48	Ryba a kol.(2012)
BQCV	GGACGAAAGGAAGCCTAAAC	ACTAGGAAGAGACTTGCACC	48	Ryba a kol.(2012)

*Vysvětlivky: DWV – virus deformovaných křídel, SBV – virová nákaza včelího plodu, ABPV – virus akutní paralýzy včel, BQCV – virus zčernání matečnicků.*

## **Gelová elektroforéza**

Pomocí gelové elektroforézy byla zjišťována velikost PCR fragmentů. Na 1,5 % agarózovém gelu s přídavkem ethidium-bromidu byl detekován výsledný produkt PCR a následně vizualizován pomocí UV transiluminátoru.

### Postup pro gelovou elektroforézu:

- 1) Smíchat agarózu s 1× TBE pufrem (pro 200 ml 1,5 % gelu smíchat 3 g agarózy s 200 ml TBE pufrem).
- 2) Nechat agarózu rozpustit v mikrovlnné troubě a zchladit pod tekoucí vodou přibližně na teplotu 60 °C.
- 3) Přidat 8 µl ethidium-bromidu a promíchat.
- 4) Do předem připravené formy nalít gel, vložit hřebeny a nechat ztuhnout.
- 5) Gel vložit do elektroforetické vany naplněné 1× TBE pufrem.
- 6) Do krajních jamek nanést ladder a do ostatních od každého vzorku 10 µl PCR produktů.
- 7) Z počátku nastavit napětí na 30 V, po pěti minutách zvýšit na 120 V a nechat po dobu 90 minut.
- 8) Pomocí UV transiluminátoru vizualizovat fragmenty DNA

## **4.4 Příprava vzorků pro detekci spor *Nosema* spp.**

Pro detekci spor *Nosema* spp. (obrázek 4) byly použity vzorky homogenizovaných včel v tekutém dusíku. Malé množství vzorku včel bylo přeneseno na sklíčko pro mikroskopování. Do vzorku byla přidána kapka vody, pomocí které se vzorek rozprostřel po sklíčku. Následně proběhlo mikroskopování.



**Obrázek 4: Shluk spor *Nosema apis*. Zvětšení 200x**

Zdroj: Danihlík, 2010a.

## 5. Výsledky

### Varroamonitoring

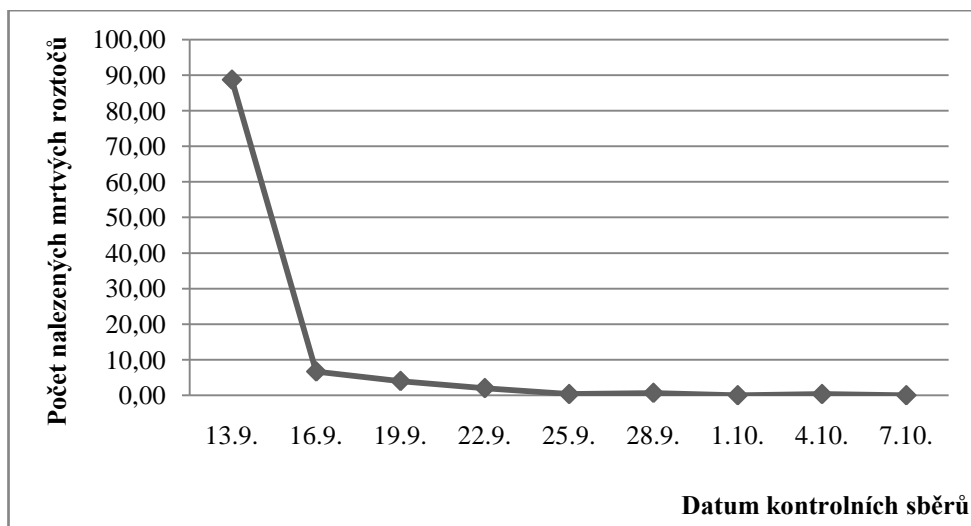
U všech sledovaných včelstev byl proveden monitoring spadů roztoče *Varroa destructor*. Výsledky jsou znázorněny v následujících tabulkách a grafech.

#### Včelstvo č. 4

Tabulka 3: Výpočet denního spadů roztoče *Varroa destructor* pro včelstvo č. 4.

Datum	13.9.	16.9.	19.9.	22.9.	25.9.	28.9.	1.10.	4.10.	7.10.
Spad	266	20	12	6	1	2	0	1	0
Denní spad	88,67	6,67	4,00	2,00	0,33	0,67	0,00	0,33	0,00

Včelstvo č. 4 bylo silně zamořeno roztočem *Varroa destructor*. Průměrný denní spad roztoče byl 11,41. Ze všech sledovaných včelstev byl průměrný denní spad u tohoto včelstva nejvyšší.



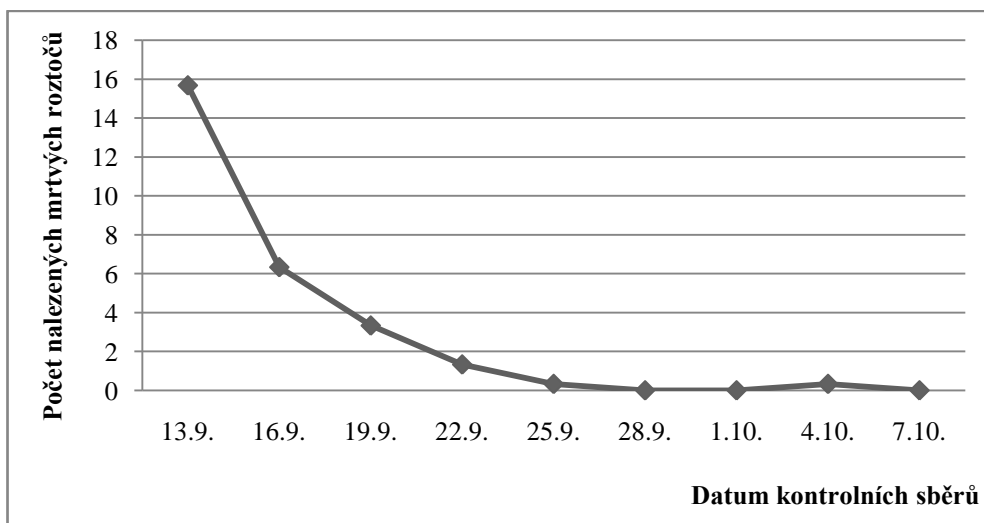
Obrázek 5: Denní spad roztoče *Varroa destructor* ve včelstvu č. 4.

### Včelstvo č. 8

Tabulka 4: Výpočet denního spadu roztoče *Varroa destructor* pro včelstvo č. 8.

Datum	13.9.	16.9.	19.9.	22.9.	25.9.	28.9.	1.10.	4.10.	7.10.
Spad	47	19	10	4	1	0	0	1	0
Denní spad	15,67	6,33	3,33	1,33	0,33	0	0	0,33	0

Včelstvo č. 8 mělo nejnižší denní spad, bylo tedy nejméně napadené roztočem *Varroa destructor*. Průměrný denní spad roztoče byl 3,04.



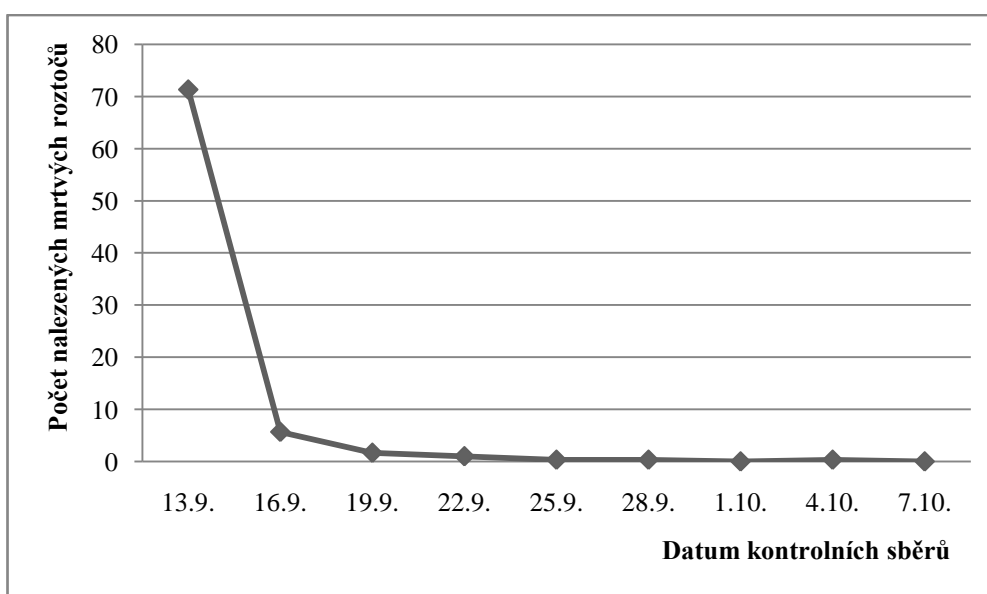
Obrázek 6: Denní spad roztoče *Varroa destructor* ve včelstvu č. 8.

## Včelstvo č. 12

Tabulka 5: Výpočet denního spadů roztoče *Varroa destructor* pro včelstvo č. 12.

Datum	13.9.	16.9.	19.9.	22.9.	25.9.	28.9.	1.10.	4.10.	7.10.
Spad	214	17	5	3	1	1	0	1	0
Denní spad	71,3	5,67	1,67	1	0,33	0,33	0	0,33	0

Včelstvo č. 12 mělo hodnotu průměrného denního spadů roztoče 8,96. Zamoření roztočem v tomto včelstvu bylo vysoké.



Obrázek 7: Denní spad roztoče *Varroa destructor* ve včelstvu č. 12.

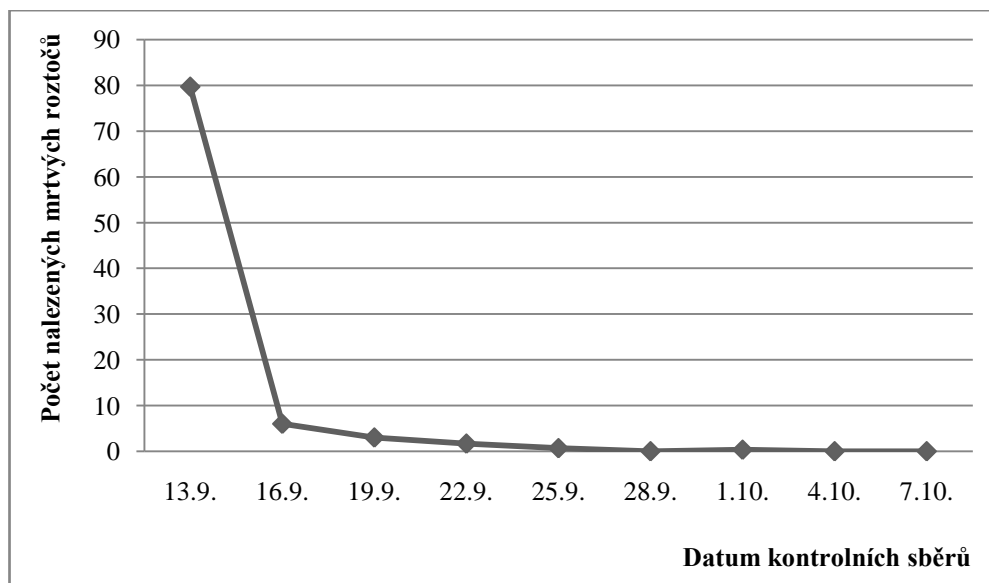
## Včelstvo č. 13

Tabulka 6: Výpočet denního spadů roztoče *Varroa destructor* pro včelstvo č. 13.

Datum	13.9.	16.9.	19.9.	22.9.	25.9.	28.9.	1.10.	4.10.	7.10.
Spad	239	18	9	5	2	0	1	0	0
Denní spad	79,67	6	3	1,67	0,67	0	0,33	0	0

Včelstvo č. 13 bylo také silně zamořeno roztočem *Varroa destructor*. Průměrný denní spad roztoče byl 10,15. Ze všech sledovaných včelstev se jedná o druhý nejvyšší spad.





Obrázek 8: Denní spad roztoče *Varroa destructor* ve včelstvu č. 13.

### Virová onemocnění

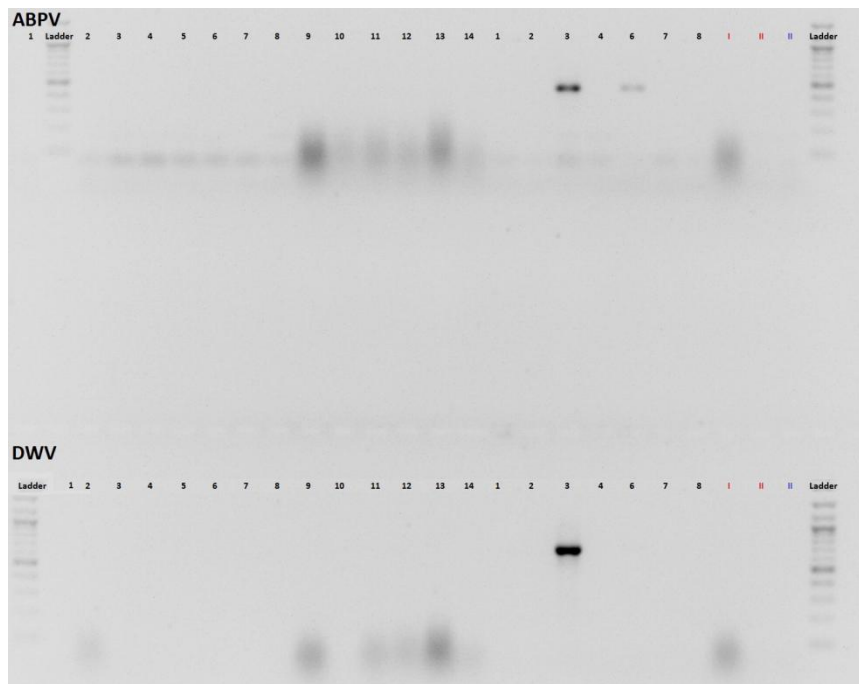
Výsledky z gelové elektroforézy (obrázky 9 a 10) prokázaly výskyt viru deformovaných křídel ve vzorcích před i po léčení ve včelstvu číslo 4, přičemž před léčením byl ve stejném včelstvu detekován i virus akutní paralýzy včel (tabulky 7 a 8).

Tabulka 7: Výskyt virů u vzorků včel před léčením.

Včelstvo	DWV	SBV	ABPV	BQCV
4	pozitivní	negativní	pozitivní	negativní
8	negativní	negativní	negativní	negativní
12	negativní	negativní	negativní	negativní
13	negativní	negativní	negativní	negativní

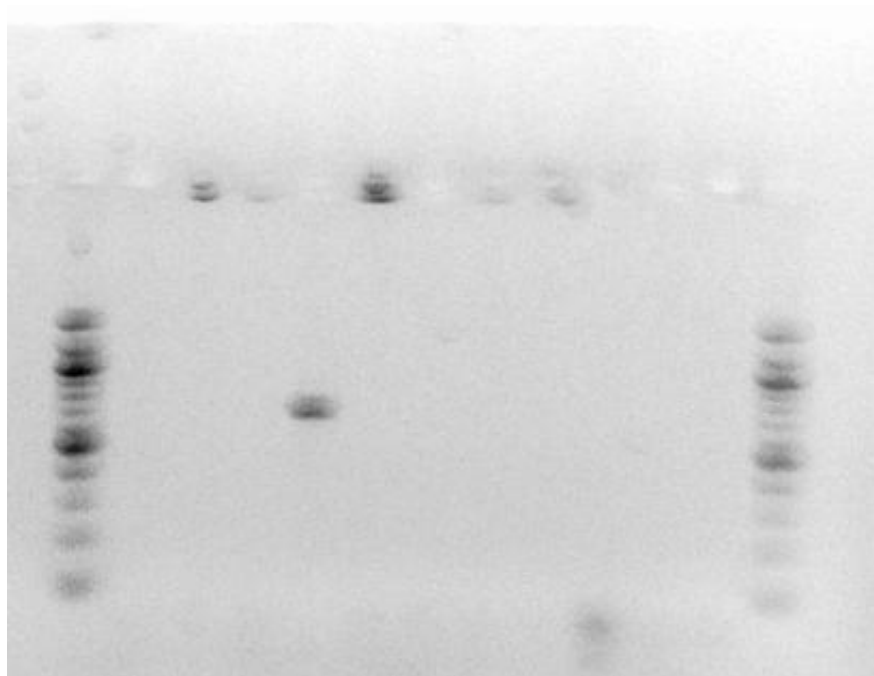
Tabulka 8: Výskyt virů u vzorků včel po léčení.

Včelstvo	DWV	SBV	ABPV	BQCV
4	pozitivní	negativní	negativní	negativní
8	negativní	negativní	negativní	negativní
12	negativní	negativní	negativní	negativní
13	negativní	negativní	negativní	negativní



**Obrázek 9: Virus deformovaných křídel a virus akutní paralýzy včel ve vzorku ze včelstva číslo 4 před léčením (zde označen číslem 3). Virus akutní paralýzy byl pozitivní i u vzorku číslo 6.**

Zdroj: vlastní foto.



**Obrázek 10: Virus deformovaných křídel ve vzorku včel ze včelstva 4 po léčení.**

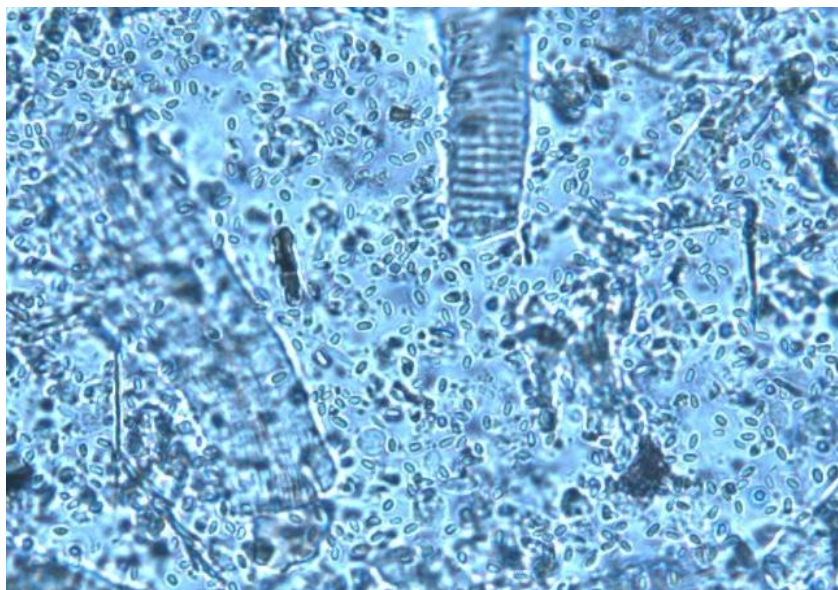
Zdroj: vlastní foto.

## Nosematóza

Výskyt spor *Nosema* spp. (obrázek 11) byl zjištěn u včelstev číslo 4 a 12, přičemž u včelstev číslo 4 byly spory detekovány jak ve vzorku včel před aplikací kyseliny mravenčí, tak i po aplikaci. Ve vzorku ze včelstva číslo 12 byl výskyt spor *Nosema* spp. pouze před aplikací kyseliny mravenčí (tabulka 9).

Tabulka 9: Výskyt spor *Nosema* spp. před a po léčení včelstev.

Včelstvo	Před léčením	Po léčení
4	<b>Pozitivní</b>	<b>Pozitivní</b>
8	Negativní	Negativní
12	<b>Pozitivní</b>	Negativní
13	Negativní	Negativní



Obrázek 11: Oválné spory *Nosema* spp. zachycené v mikroskopu. Zvětšení 200x.

Zdroj: vlastní foto.

## 6. Diskuze

U včelstva č. 4 ve vzorku včel před léčením byly nalezeny dva viry, jednalo se o virus deformovaných křídel a virus akutní paralýzy včel. Podle Čermáka a kol. (2016) patogenita obou virů souvisí s napadením včelstva roztočem *Varroa destructor*, který se uplatňuje v šíření chorob a obejití obranné bariéry včelího organismu. Častou kombinací těchto virů potvrzuje i Ryba a kol. (2012). Naproti tomu ve vzorku včel po léčení byl nalezen pouze virus deformovaných křídel. Danihlík (2010b) uvádí případy, kdy včelstvo odstraní virózu samo. Dále popisuje, že onemocnění včelstva může být pouze dočasné, způsobené například špatnou výživou. I přesto, že včelstvo č. 4 dokázalo zničit virus akutní paralýzy včel, uhynulo přes zimu, zřejmě následkem silného napadení roztočem *Varroa destructor* v kombinaci s virem deformovaných křídel a oslabením nosematózou.

Výskyt nosematózy byl prokázán u včelstva č. 4 a to, jak ve vzorku včel před léčením, tak i po léčení, dále u včelstva č. 12, u kterého se vyskytovaly spory *Nosema* spp. pouze před léčením. Podle Čermáka a kol. (2016) lze využít jako podpůrný prostředek k léčení nosematózy kyselinu mravenčí, proto je možné, že u včelstva č. 12 se již nosematóza ve vzorku po léčení nevyskytovala. Veselý a kol. (2013) uvádí, že včelstva silně napadená nosematózou kálí na přední stěnu úlu, na leták, popřípadě i na dno úlu, rámký či přímo na plásty. Dále dodává, že u některých včel může nosematóza způsobovat zvětšení zadečku. U včelstev sledovaných v rámci této práce nebyly tyto příznaky nosematózy viditelné. Průběh nosematózy bez viditelných projevů je dle Čermáka a kol. (2016) možný, ale přesto dochází k oslabení včelstva krátkověkostí dělnic. Ryba a kol. (2012) uvádí spojitost mezi výskytem nosematózy a virem akutní paralýzy včel. Toto tvrzení souhlasí s nálezem u včelstva č. 4. Podle Danihlíka (2010a) jsou k nosematóze nejnáchylnější slabá a stresovaná včelstva, což potvrzují včelstva č. 4 a 12, která byla oslabena roztočem *Varroa destructor*, přičemž včelstvo č. 4 mělo sníženou imunitu i z důvodu napadení virovým onemocněním.

Tabulka 10: Souhrnná tabulka s výsledky vzorků včel před léčením.

Včelstvo	DWV	SBV	ABPV	BQCV	<i>Nosema</i> spp.
4	<b>pozitivní</b>	negativní	<b>pozitivní</b>	negativní	<b>ano</b>
8	negativní	negativní	negativní	negativní	ne
12	negativní	negativní	negativní	negativní	<b>ano</b>
13	negativní	negativní	negativní	negativní	ne

Tabulka 11: Souhrnná tabulka s výsledky vzorků včel po léčení.

Včelstvo	DWV	SBV	ABPV	BQCV	<i>Nosema</i> spp.	Průměrný denní spad roztoče	Stav včelstva na jaře
4	<b>pozitivní</b>	negativní	negativní	negativní	<b>ano</b>	11,41	<b>úhyn</b>
8	negativní	negativní	negativní	negativní	ne	3,04	v plné síle
12	negativní	negativní	negativní	negativní	ne	8,96	<b>úhyn</b>
13	negativní	negativní	negativní	negativní	ne	10,15	v plné síle

Z tabulek výše uvedených lze vyčíst, že dvě včelstva ze čtyř sledovaných přes zimu uhynula. Včelstva byla silně zamořena roztočem *Varroa destructor*, oslabena nosematózou a včelstvo č. 4 bylo napadeno i viry. Včelstva č. 8 a 13 přezimovala, i přesto, že včelstvo č. 13 bylo silně napadeno roztočem *Varroa destructor*. U těchto včelstev nedošlo k oslabení nosematózou ani viry. Schopnost včelstva bez virových infekcí odolat velkému množství roztočů potvrzuje Čermák a kol. (2016).

Včelstva č. 4 a 8 byla umístěna ve včelínu ve stínu stromů, mohla mít pomalejší jarní rozvoj, což také mohlo ovlivnit jejich celkovou kondici. Proto se včelstvo č. 4 hůře vyrovnávalo s napadením roztočem *Varroa destructor* a bylo náchylnější k virovým infekcím. Včelstvo č. 8 nebylo tak silně zamořeno roztočem a mohlo se tedy lépe vyrovnávat s méně příznivými podmínkami pro jarní rozvoj včelstev. Včelstvo č. 8 bylo méně napadeno roztočem, protože z něho byly dělány oddělky, které podle Čermáka a kol. (2016) snižují počet roztočů ve včelstvu.

Včelstva č. 12 a 13 byla umístěna na venkovních stojanech, měla tedy v létě lepší podmínky, a proto se lépe vyrovnávala s napadením roztočem *Varroa*

*destructor* a nepropukla u nich virová infekce. Včelstvo č. 12 bylo oslabeno nosematózou, která sice po aplikaci kyseliny mravenčí byla zničena, nicméně toto oslabení již mohlo mít vliv na pozdější zdolávání horších povětrnostních podmínek, a proto zřejmě došlo v zimě k jejich úhynu.

Ze zjištěných výsledků je patrné, že větší vliv na kondici včelstva má nosematóza než varroáza, neboť včelstva oslabená nosematózou uhynula a jiná včelstva silně zamořená roztočem *Varroa destructor* přežila.

## 7. Závěr

V rámci své diplomové práce jsem hodnotila nálezovou situaci u 4 včelstev, ze kterých dvě byla pozitivní na spory *Nosema* spp. a jedno z nich ještě na kombinaci včelích virů, přičemž obě včelstva přes zimu uhynula. Ze získaných výsledků vyplývá, že všechny choroby oslabují včelstvo a snižují tím jeho schopnost přezimovat.

Mezi základní preventivní opatření patří pravidelné sledování přirozeného spadu roztoče *Varroa destructor*, při zvýšeném počtu roztočů je nutné jejich populaci snížit vybranou zootechnickou metodou či použitím vhodného prostředku. Snižování populace roztočů ve včelstvu a zvyšování odolnosti včelstva vůči dalším chorobám, lze i šlechtěním včel na varroatoleranci. Varroatolerantní včely mají zvýšený hygienický pud, díky kterému svým chováním dokážou odstranit napadený plod, nemocné včely či přímo roztoče. Účinnou prevencí proti nosematóze je dezinfekce chovatelského vybavení, hygienické napájení a krmení, častá obměna díla a vyšetřování matek na přítomnost spor *Nosema* spp. V případě, že se u matky spory *Nosema* spp. objeví, je nutné ji ve včelstvu nahradit jinou matkou.

## 8. Seznam použité literatury

ANKLAM E., GADANI F., HEINZE P., PIJNENBURG H., VAN DEN EEDE G. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. *European Food Research and Technology*, 2002, vol. 214, no. 1, p. 3-26

Anonym 1. Jak na to celý rok? *Výzkumný ústav včelařský v Dole* [online]. [cit. 2017-02-27]. Dostupné z: <http://www.beedol.cz/varroaza/>

BIENEFELD, K. *Včelařství krok za krokem*. 2. vyd. Líbeznice: Víkend, 2010. ISBN 978-80-7433-023-0.

BÜCHLER, R., BERG, S., LE CONTE, Y. Breeding for resistance to Varroa destructor in Europe. *Apidologie*. 2010, no. 41, p. 393-408

CARRILLO-TRIPP, J., DOLEZAL, A. G., GOBLIRSCH, M. J., MILLER, W. A., TOTH, A. L. a BONNING, B. C. In vivo and in vitro infection dynamics of honey bee viruses. *Nature*, 2016, vol. 539, no 7630.

ČERMÁK, K. a kol. *Včelařství*. České Budějovice: PSNV, 2016. ISBN 978-80-260-9090-8.

ČERMÁK, K. Teplota v hníždě včelstva ovlivňuje vývoj nákaz. *Moderní včelař*, 2016, no. 2, p. 30 – 31

DALMON, A., DESBIEZ, C., COULON, M., THOMASSON, M., CONTE, L. Y., ALAUX, C., VALLON, J. A MOURY, B. Evidence for positive selection and recombination hotspots in Deformed wing virus (DWV). *Nature*, 2016, vol. 534, no. 7606.

DANIHLÍK, J. Aktuální vědecké poznatky o imunitě a zdraví včel. *Moderní včelař*, 2016, no. 3, p. 18-23

DANIHLÍK, J. Kyselina mravenčí a šťavelová v chovu včel. *Moderní včelař*, 2008, no. 6, p. 27-28

DANIHLÍK, J. Nosematóza včel. *Moje včely*. 2010a, [online]. [cit. 2017-03-25]. Dostupné z: <http://www.mojevcely.eu/news/nosemoza-vcel/>

DANIHLÍK, J. Virové choroby včel – SBV. *Moje včely*. 2010b, [online]. [cit. 2017-04-16]. Dostupné z: <http://www.mojevcely.eu/news/nosemoza-vcel/>



DE MIRANDA, J.R., BAILEY, L., BALL, B.V., BLANCHARD, P., BUDGE, G.E., CHEJANOVSKY, N., CHEN, Y.-P., GAUTHIER, L., GENERSCH, E., DE GRAAF, D.C., et al. (2013). Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. *J. Apic. Res.* 52, UNSP 52.4.22

DYNES, T. L., DE ROODE, J. C., LYONS, J. I., BERRY, J. A., DELAPLANE K. S. a BROSI, B. J. Fine scale population genetic structure of *Varroa destructor*, an ectoparasitic mite of the honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 2017, vol. 48, no. 1, p. 93-101

FAUQUET, C. M., et al. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses : eighth report of the international committee on taxonomy of viruses*. Amsterdam: Elsevier, 2005. ISBN 0-12-249951-4.

FROST, E. Mít hygienické včely znamená mít silné včely. *Odborné včelařské překlady*. 2016, no. 1, p. 129 – 132. ISSN 0322-8851

FUJIYUKI, T., TAKEUCHI, H., ONO, M., OHKA, S., SASAKI, T., NOMOTO, A. a KUBO, T. Kakugo Virus from Brains of Aggressive Worker Honeybees. *Advances in Virus Research*, 2005, vol. 65, p. 1-27

GRITSCH, H. *Silná včelstva po celý rok*. Praha: Brázda, 2010. ISBN 978-80-209-0381-5.

HOLUB, P. Bez syntetických akaricidů – bez organických kyselin. Jak tedy? *Moderní včelař*, 2017, no. 2, p. 16 – 19

CHEN, Y.P., HIGGINS, J.A., AND FELDLAUFER, M.F. (2005). Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of deformed wing virus infection in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 436–441.

JÖRGER, B. Hyperthermie – erster Behandlungszeitpunkt oder der Varroa einen Schritt voraus. *Schweizerische Bienen – Zeitung*. 2014, no. 4, p. 15 – 16. ISSN 0036 – 7540

KAMLER, F. Celý rok proti varroáze. *Včelařství*, 2015, vol. 68, no. 7, p. 232-233

LEVIN, S., SELA N. a CHEJANOVSKY N. Two novel viruses associated with the *Apis mellifera* pathogenic mite *Varroa destructor*. *Nature*, 2016, vol. 535, no 7612.

- LOCKE, B., LE CONTE, Y., CRAUSER, D., FRIES, I. Host adaptations reduce the reproductive success of *Varroa destructor* in two distinct European honey bee populations. *Ecology and Evolution*, 2012, vol. 2, no. 6, p. 1144–1150
- NAVAJAS, M., MIGEON, A., ALAUX, C. et al. Differential gene expression of the honey bee *Apis mellifera* associated with *Varroa destructor* infection. *BMC Genomics*, 2008, vol. 9, no. 1, p. 301
- PEJCHAL, P. Státní veterinární správa potvrzuje méně varroázy. *Moderní včelař*, 2016, no. 3, p. 17
- PEROUTKA, M. Co je příčinou výměny mladých matek? *Včelařství*. 2017, vol. 70, no. 4, p. 117
- PETR, J. Moku virus jako globální hrozba pro hmyzí opylovatele. *Moderní včelař*, 2016b, no. 6, p. 21
- PETR, J. Virus deformovaných křídel. *Moderní včelař*, 2016a, no. 2, p. 32 – 33
- PLETTNER, E., ELIASH, N., SINGH, N. K., PINNELLI, G. R. a SOROKER, V. The chemical ecology of host - parasite interaction as a target of *Varroa destructor* control agents. *Apidologie*, 2017, vol. 48, no. 1, p. 78-92. ISSN 0044-8435.
- POHL, F. *Varroáza: jak ji poznat a úspěšně potírat*. Líbeznice: Víkend, 2008. ISBN 978-80-86891-90-3.
- POHL, F. *Úspěšné včelaření*. Líbeznice: Víkend, 2012. ISBN 978-80-7433-049-0.
- PRÝMAS, J. Šlechtění na varroatoleranci v Německu. *Moderní včelař*, 2017, no. 3, p. 26-27
- PŘIDAL, A., ČERMÁK, K. *Včelařství*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2005. ISBN 80-7157-850-9
- RYBA, S., TITERA, D., SCHODELBAUEROVA-TRAXMANDLOVA, I. a KINDLMANN, P. Prevalence of honeybee viruses in the Czech Republic and coinfections with other honeybee disease. *Biologia*, 2012, **67**(3). ISSN 1336-9563.
- SAMMATARO, D., AVITABILE, A. *The beekeeper's handbook*. 4th ed. Ithaca: Comstock Pub. Associates, 2011. ISBN 9780801476945.
- ŠEFČÍK, J. *Začínáme včelařit*. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-4857-3.

TANTILLO, G., BOTTARO, M., DI PINTO, A., MARTELLA, V., DI PINTO, P. a TERIO, V. Virus infections of honeybees *Apis Mellifera*. *Italian Journal of Food Safety*. 2015, 4(3). ISSN 2239-7132.

TERIO, V., MARTELLA, V., CAMERO, M., DECARO, N., TESTINI, G., BONERBA, E., TANTILLO, G., BUONAVOGLIA, C. Detection of a honeybee iflavivirus with intermediate characteristics between kakugo virus and deformed wing virus. *New Microbiologica*, 2008, vol. 31, no. 4, p. 439 – 444

TEW, J. E. *Nepostradatelný rádce včelaře*. Čestlice: Rebo International CZ, 2015. ISBN 978-80-255-0905-0.

TSURUDA, J. M., HARRIS, J. W., BOURGEOIS, L., DANKA, R. G., HUNT, G. J. High-Resolution Linkage Analyses to Identify Genes That Influence Varroa Sensitive Hygiene Behavior in Honey Bees. *Plos one*, 2012, no. 2

VESELÝ, V., et al. *Včelařství*. Vyd. 3. Praha: Brázda, 2013. ISBN 978-80-209-0399-0.