

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**  
**ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

**Studijní program:** N4101 Zemědělské inženýrství  
**Studijní obor:** Agropodnikání  
**Katedra:** Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné  
**Vedoucí katedry:** prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

**Diplomová práce**

**Vyšetření včelstev na nosematózu**

**Autor:** Bc. Jiří Brabenec  
**Vedoucí diplomové práce:** Mgr. Tonka Tomáš, Ph.D.  
**Konzultant diplomové práce:** Ing. Jelínková Irena

**České Budějovice 2018**

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta zemědělská  
Akademický rok: 2016/2017

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jiří BRABENEC**  
Osobní číslo: **Z16299**  
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**  
Studijní obor: **Agropodnikání**  
Název tématu: **Vyšetření včelstev na nosematózu**  
Zadávací katedra: **Katedra speciální produkce rostlinné**

### Zásady pro vypracování:

Jedním z aspektů chovu včel, který zásadně ovlivňuje produkční funkci včelstev, je jejich zdravotní stav. V poslední době dochází ke zvyšujícím se kolapsům včelstev, která hynou bez jakýchkoliv zjevných příčin.

Jedním z faktorů tzv. CCD je i přítomnost a promořenost oslabených včelstev mikrosporidiiem r. Nosema. Zjevnými příznaky infekce jsou pokálené úly, často ale může infekce přetrvávat v latentní nebo inaparentní formě a teprve vlivem vnějších faktorů dochází k infekci. V případě, že není možné určit stupeň infekce v jednotlivých včelstvech, je jedinou cestou odchyt včel a následná inspekce vnitřních orgánů na přítomnost spor parazita.

Úroveň promořenosti jednotlivých stanovišť se včelami je různá a monitoring promořenosti může přinést nové poznatky o průběhu a cirkulaci nákazy mezi včelstvy.

Cílem diplomové práce je analyzovat současný stav poznání onemocnění nosematózou u včelstev, vliv onemocnění na produkční a reprodukční aspekty chovu včel. Praktická část diplomové práce bude zaměřena na sběr a vyšetření vzorků včel ve vybraných včelstvech na přítomnost mikrosporidií r. Nosema. Bude provedeno vyšetření včelstev v oblasti ZO ČSV Bystřice ve Středočeském kraji. Autor ovzorkuje včelstva a následně určí stupeň nakažení jednotlivých včel mikrosporidiiem rodu Nosema. Výsledky budou zpracovány vhodnými metodami a bude určen stupeň promoření u jednotlivých včelstev.

Rozsah grafických prací: 10 - 15 stran

Rozsah pracovní zprávy: 40 - 50 stran

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

Copley T., Giovenazzo P., Jabaji S. Detection of *Nosema apis* and *N. ceranae* in honeybee bottom scraps and frass in naturally infected hives. *Apidologie*, Springer Verlag, 2012, 43 (6), pp.753-760. doi: 10.1007/s13592-012-0147-8

Hristov P, Radoslavov G (2016): Integration of Molecular and Genetic Methods in the Investigation of the Biodiversity of the Honey Bee (*Apis Mellifera* L., Hymenoptera: Apidae) and Diagnosis of Diseases of Economic Importance Affecting the Bees and their Brood in Bulgaria. *J Stem Cell Res Ther* 6:364. doi: 10.4172/2157-7633.1000364

Martín-Hernández, R., Botías, C., Barrios, L. et al.: Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). *Parasitol Res* (2011) 109: 605. doi:10.1007/s00436-011-2292-9

Pettis et al.: Crop Pollination Exposes Honey Bees to Pesticides Which Alters Their Susceptibility to the Gut Pathogen *Nosema ceranae*. *PLOS ONE*, 2013, 1 - 9, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0070182>

Rinderer T.E., Elliott K.D.: Worker Honey Bee Response to Infection with *Nosema apis*: Influence of Diet. *J Econ Entomol* 1977; 70 (4): 431-433. doi: 10.1093/jee/70.4.431

Veselý V. et al. *Včelařství*. Praha, Brázda, 2013

Webster T., Pomper K., Hunt G., Thacker E., Jones S. *Nosema apis* infection in worker and queen *Apis mellifera*. *Apidologie*, 2004, 35 (1), pp.49-54. doi: 10.1051/apido:2003063

Weiser J. *Nemoci hmyzu*. Academia, Praha 1966.

*Včelařství*, ISI Web of Knowledge, Scopus

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Tomáš Tonka, Ph.D.


Katedra speciální produkce rostlinné

Konzultant diplomové práce: Ing. Irena Jelínková

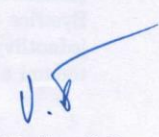
Katedra speciální produkce rostlinné

Datum zadání diplomové práce: 30. března 2017

Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2018

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

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

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

V Českých Budějovicích dne 30. března 2017

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. 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 JU) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne

.....

Bc. Jiří Brabenec

#### Poděkování:

Tímto bych chtěl poděkovat vedoucímu mé diplomové práce Mgr. Tomášovi Tonkovi Ph.D. a konzultantce Ing. Ireně Jelínkové za cenné rady a odbornou pomoc. Nemaľý dík patří také Ing. Petrovi Mrázovi za pomoc při PCR rozborech. Poděkování také patří mé rodině, která mi umožnila studium na vysoké škole a podporovala mě.

## **Abstrakt**

Nosematóza patří mezi střevní onemocnění včel, které je hojně rozšířené jak po světě, tak i v České republice. Způsobují ji spory *Nosema apis* a *Nosema ceranae*.

Cílem této diplomové práce bylo vyhodnotit výskyt spor *Nosema* na území ZO ČSV Bystřice, popsat druhovou variabilitu a posoudit vliv ročního období na výskyt spor *Nosema apis* a *Nosema ceranae*. Pro zjištění nakažení včelstev bylo pod mikroskopem vyšetřeno 5 včel z vybraných úlů. U pozitivních vzorků na nosematózu byl molekulárně zjišťován druh spor *Nosema*.

Celkem bylo vyšetřeno 93 vzorků od 15 chovatelů. Vzorky byly odebírány na jaře a v létě roku 2017. Odběry probíhaly jak u malochovatelů, tak i u farmářů s více jak 150 ti včelstvy. Při letním odběru bylo nalezeno více pozitivních včel než při jarních odběrech. Včelaři byli dále posuzováni podle počtu chovaných včelstev.

Po následném rozboru získaných vzorků pomocí metody PCR byla v drtivé většině včelstev přítomny spory *Nosema ceranae*.

### **Klíčová slova:**

včela medonosná; *Nosema* spp.; diagnostika; PCR, nosematóza

## **Abstract**

Nosematosis belongs to the intestinal disease of bees, which is widely spread both in the world and in the Czech Republic. It is caused by *Nosema apis* and *Nosema ceranae*.

The aim of this diploma thesis was to evaluate the occurrence of the *Nosema* dispute in the territory of ČSV Bystřice, to describe species variability and to assess the effect of the season on the occurrence of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. To detect infection of colonies, 5 bees from selected hives were examined under the microscope. In positive specimens on nosematosis, the species of *Nosema* spore was molecularly examined.

In total, 93 samples from 15 breeders were examined. Samples were taken in the spring and summer of 2017. The sampling took place both for malachists and for farmers with more than 150 bee colonies. During the summer sampling more positive

bees were found than in spring sampling. Beekeepers were further assessed by the number of hives.

Following the analysis of the samples obtained using the PCR method, *Nosema ceranae* disjuncts were present in the vast majority of colonies.

**Keywords:**

honeybee; *Nosema* spp .; diagnostics; PCR, nosematosis

## Obsah

1	ÚVOD .....	10
1	LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	12
1.1	Historie objevení nosematózy .....	12
1.2	Projevy nosematózy .....	12
1.3	Biologie nosematózy .....	12
1.4	Porovnání <i>Nosema apis</i> x <i>Nosema ceranae</i> .....	14
1.5	Šíření nosematózy .....	15
1.6	Vliv nosematózy na zdraví dělnic .....	16
1.7	Vliv nosematózy na zdraví matky .....	16
1.8	Vliv nosematózy na zdraví trubců .....	17
1.9	Prevence vzniku nákazy .....	18
1.10	Léčba nosematózy .....	18
2	CÍL PRÁCE .....	20
3	METODIKA .....	21
3.1	Umístění stanovišť .....	21
3.2	Přehled sledovaných chovů .....	21
3.3	Odběr vzorků .....	23
3.4	Příprava vzorků .....	23
3.5	Barvení podle Giemsy .....	24
3.6	Izolace DNA mikrosporidií ze střev pomocí CTAB .....	24
3.7	Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	25
3.7.1	Sekvence primerů .....	25
3.8	Gelová elektroforéza .....	27
3.9	Statistika .....	27
4	VÝSLEDKY .....	28
4.1	Porovnání výskytu mikrosporidií u jednotlivých chovatelů .....	29
4.2	Porovnání výskytu spor <i>Nosema</i> v závislosti na stanovišti .....	30



4.3	Porovnání výskytu spor <i>Nosema</i> v závislosti na velikosti chovu.....	32
4.4	Vliv ročního období na výskyt spor <i>Nosema</i> .....	33
4.5	Identifikace druhů mikrosporidií.....	34
5	DISKUZE .....	36
6	ZÁVĚRY .....	38
7	POUŽITÁ LITERATURA.....	39

# 1 ÚVOD

Hlavní význam včely medonosné nespočívá pouze v produkci medu, vosku a mateří kašičky, ale zejména v opylování rostlin. Velká část rostlin je totiž odkázána na přenos pylu hmyzem. Z tohoto důvodu je včela nepostradatelná v udržení rázu krajiny a přirozeného ekosystému. Infekce včel nemocí má za následek snížení opylovací schopnosti včelstev a stresové faktory ovlivňují chování včel a jejich délku života.

Včelaření je jedním z mála oborů lidské činnosti, která nijak nenarušuje životní prostředí a jedná se o zcela přirozenou a neodmyslitelnou součást přírody. Při opylování hmyzosubných rostlin mají včely zásluhu na navýšení výnosu až z 95 %. Zbýlých 5 % připadá na ostatní opylovače, jako jsou včely samotářky, čmeláci a ostatní příležitostně opylující hmyz.

Čím dál vyšší poptávka po medu a ostatních včelích produktech zvyšuje i zájem o včelařství. Mládež včelařením efektivně využívá svůj volný čas a starší včelaři hledají u včel klid v harmonii s přírodou. V současné době ve velké míře vznikají i včelí farmy zaměřené na produkci medu, oddělků a chov matek. Ty poskytují služby i pro jiné včelaře.

V České republice se včelařstvím zabývá bezmála 55 000 občanů a obhospodařují 600 000 včelstev. Je zde funkční spolek, který zaštiťuje většinu včelařů a pomáhá jim v začátcích včelaření a následně při léčení včelstev. Je zde snaha státu o udržení či zvýšení počtu chovaných včelstev a pro začínající včelaře jsou vypisovány dotační tituly.

Cílem každého včelaře je mít zdravá a silná včelstva, neboť jen ta mu zajistí vysoké výnosy medu a radost z dobře odvedené práce. Včelař proto musí dbát na správnou techniku chovu, na dobré zazimování, krmení a celkovou prevenci proti nemocem. V mnoha případech právě nemoc ukončí včelaření.

Nemoci včel se rozdělují na nakažlivé a nenakažlivé. Při nenakažlivém onemocnění včely hynou nejčastěji hladem, zimou, ale také v důsledku průjmu nebo zácpy. Infekční nemoci rozdělujeme na infekce způsobené houbami, bakteriemi, viry prvoky a roztoči.

Druhou nejrozšířenější nemocí včel po varroáze je nosematóza, na kterou se zaměřuji v této diplomové práci. Tato nemoc většinou nemá včasné viditelné projevy a přesto včelstvo oslabuje. Nebezpečí nosematózy spočívá v rychlém šíření a masovém namnožení, které dále způsobuje zpomalený rozvoj včelstva, následně nižší výnosy medu a může dojít až k úplnému úhynu včelstva.

Tato diplomová práce navazuje na bakalářskou práci, která se zabývala střevními onemocněními včel, mezi které řadíme i nosematózu.

# 1 LITERÁRNÍ PŘEHLED

## 1.1 Historie objevení nosematózy

Nosematoza byla poprvé objevena Dönhoffem v roce 1857 ve včelích výkalech a byla zařazena mezi houby (Veselý a kol., 2003). Za původce nosematózy u včel byla označena mikrosporidie *Nosema apis* roku 1909 Zanderem. Ta byla až do roku 1996 považována za jediného původce nosematózy u Evropské včely medonosné (*Apis mellifera*). Roku 1996 byl popsán nový parazitický patogen u včel asijských (*Apis cerana*). Ten byl pojmenován *Nosema ceranae* (Fries a kol., 1996). Ta byla prvně v Evropě detekována ve Španělsku (Higes a kol., 2006).

Do roku 2006 byla mikrosporidie *Nosema apis* řazena mezi prvoky. Na základě porovnání DNA byla roku 2006 mikrosporidie *Nosema apis* zařazena mezi houby (Hrabák, 2007). Do dnešní doby byly objeveny dva druhy mikrosporidií vyskytujících se u včel *Nosema apis* (Zander., 1909) a *Nosema ceranae*. Zatímco *N. apis* je původní parazit Evropské včely medonosné (*Apis mellifera*), nový invazní druh *N. ceranae* pochází od asijské včely medonosné (*Apis cerana*) (Fries a kol., 1996).

## 1.2 Projevy nosematózy

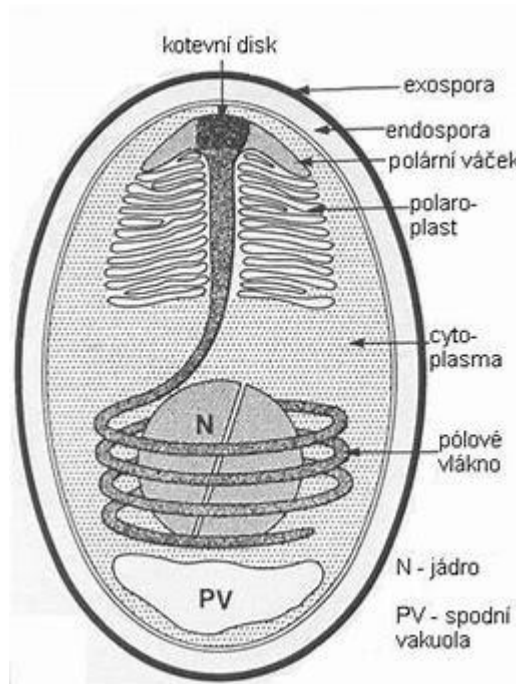
Pokud dojde k infekci včely sporymi *Nosema*, tento patogen připraví svého hostitele o dostupné zdroje živin, sám hostitel bude trpět silným energetickým stresem. Infikovaní hostitelé mohou vypadat, že kompenzují takovou situaci tím, že spotřebovávají více zásob, ačkoli jsou také méně efektivní při získávání energie než neinfikovaní hostitelé. Proto nejenže paraziti vezmou živiny a energii z hostitelů, ale také snižují míru, v níž je energie dostupná pro hostitele, aby vykonával životně důležité funkce. Změny v chování krmení po infekci jsou jen jedním příkladem mnoha potenciálních změn, které by mohly vzniknout kvůli potřebě asimilovat více živin a energetický stres typicky spočívá v mnoha fyziologických a behaviorálních změnách vyvolaných infekcí (Martín Hernández a kol., 2012)

## 1.3 Biologie nosematózy

Mikrosporidie jsou spongiformní houbové patogeny, které se vyvíjejí jako intracelulární organismy a infikují širokou škálu hostitelů, od hmyzu po savce. Vzhledem k tomu, že postrádají mitochondrie a rychle se množí v hostitelské buňce a

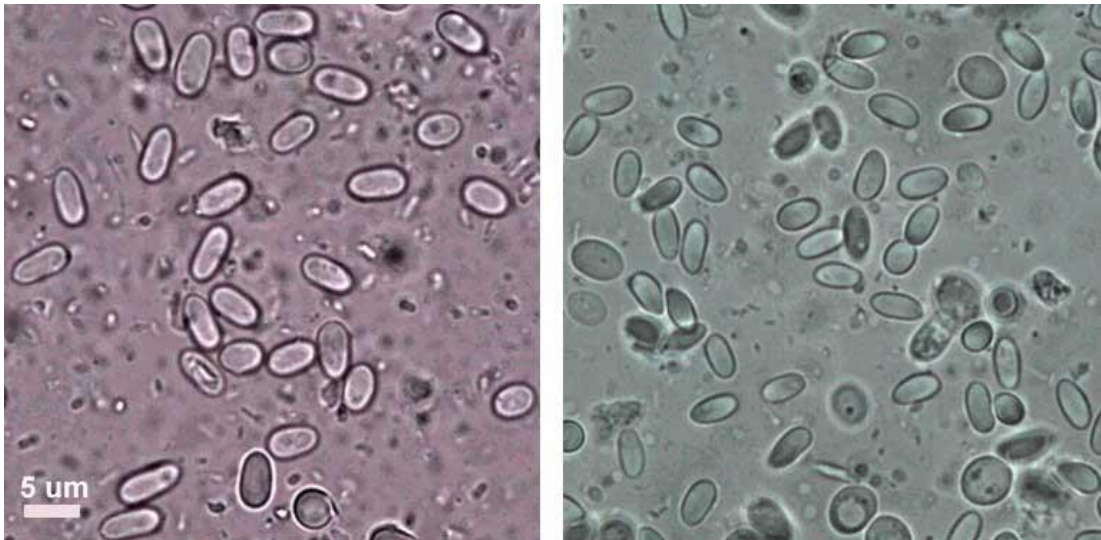
přebírají ATP z jejich okolí, parazitické mikrosporidie mají obzvlášť silný tlak na své hostitele (Martín Hernández a kol.,2012).

*Nosema apis* a *Nosema ceranae* jsou ničivé pro včely, protože dokončují svůj životní cyklus uvnitř střevního ústrojí včel, což vede k anatomickým a fyziologickým změnám, které vedou ke zhoršení zdraví včel a dokonce k úplnému zhroucení kolonie (Praszyńska, a kol. 2018).



Obr.č.1 Vnitřní uspořádání spory *Nosema* (Anonym., 1)

Při mikroskopickém rozlišení je patrný rozdíl ve velikosti spor mikrosporidií. Spora *Nosema apis* má průměrnou velikost 5,8 x 3,3 um a je oválného tvaru. Spora *Nosema ceranae* je menší velikosti 4,6 x 2,5 um a je spíše cylindrického tvaru (Kamler a kol., 2011).



Obr. č.2 : Spory *Nosema apis* (vlevo) a *Nosema ceranae* (vpravo) ve světelném mikroskopu (Kamler a kol., 2011).

Mikrosporidie jsou vnitřními patogeny se širokou škálou hostitelů. Všichni jsou vnitřními parazity a jsou často rezistentní vůči imunitní odpovědi jejich hostitelů (Higes., 2006). Pro svůj vývoj a šíření potřebuje spora *Nosema apis* správnou teplotu. Optimální je teplota v rozmezí 30–35 °C. Pokud se změní teplota od ideálních hodnot, vývoj se značně omezí. Při dlouhodobém působení teplot nad 35 °C dochází k usmrcení spor (Malone a kol., 2001).

Parazit se ve včelách vyskytuje po celý rok a téměř ve všech včelstvech. Výskyt se zvyšuje při oslabení včelstva, na jaře a na podzim kdy v chladnějším počasí kolísá množství plodu. V zimě jsou spory jen výjimečně nalezeny nebo se vyskytují u silně infikovaných včelstev (Anderlová., 2013)

#### 1.4 Porovnání *Nosema apis* x *Nosema ceranae*

Při porovnání nosematózy způsobené mikrosporidiiemi *Nosema apis* se zdá, že *Nosema ceranae* je virulentnější jak na úrovni jednotlivce, tak na úrovni celé kolonie. Tato zvýšená virulence může odrážet skutečnost, že vztah parazit-hostitel se *Nosema ceranae* vyvinul během relativně krátkého období, a proto připravuje svého hostitele o více energie. Důsledky energetického stresu na virulenci na úrovni kolonie je třeba vzít v úvahu, protože zvýšení potřeby krmiva může nést nepřiměřené zatížení včelstva. Při infekci je asi o 30 % více energie včelstva potřeba na krmení při snížení energetické dostupnosti jednotlivců ve spojení se změnami rychlosti metabolismu.

Proto infekce může silně ovlivnit energetickou bilanci na úrovni kolonií a následkem toho zdraví celého včelstva (Martín Hernández a kol., 2012).

Silný energetický stres způsobený spory *Nosema ceranae* ve srovnání s *Nosema apis* může souviset s potlačením imunitního systému u infikovaných včel. Existuje jasný kompromis mezi získáním energie a aktivací imunitního systému hmyzu v boji proti infekcím (Schmid a Hempel., 2005). Krátkodobý výpadek dostupnosti potravy v přírodě vede k snížené obranyschopnosti imunitního systému, což vede k menšímu odporu při napadení infekcí. Při optimálních snůškových podmínkách dochází k obnově imunitního systému, který splňuje energetické nároky spojené s udržením účinného imunitního systému. Na rozdíl od aktivace imunitního systému spory *Nosema apis*, spory *Nosema ceranae* způsobují potlačení imunitního systému (Antúnez a kol., 2009), podobně jako roztoč *Varroa destructor*, který vyvolává energetický stres a usnadňuje mnohonásobné koinfekce ve včelstvech (Gregory a kol., 2005).

## 1.5 Šíření nosematózy

Včely se nakazí spory při krmení. Zdroje spor v prostředí zahrnují potravu a vodu, která byla kontaminována výkaly. Spory *Nosema ceranae* byly nalezeny v pylu vrby jívy. Tento pyl může způsobit infekci (Higes a kol., 2008). Toto zjištění naznačuje, že květinové zdroje mohou být kontaminovány výkaly z infikované včely. Přítomnost spor na květech poukazuje na tyto sdílené zdroje jako významný zdroj rozšiřování patogenů (Graystock a kol., 2015). Takto donesené spory jsou ukládány do včelích plástů. Dělnice, které spotřebovávají pyl se nakazí. Tento přenos není možný na trubce a královnu, jelikož nevy létávají za potravou a nechávají se krmit od dělnic (Fries., 1993). *Nosema ceranae* může být přenášena horizontálně od infikovaných dělnic ke královně (Higes a kol., 2009).

Potenciální riziko expozice sporám v úlu se zvyšuje, když nepříznivé počasí zabraňuje vylétávání infikovaných včel (Retschnig a kol., 2017).

Nejvýznamnější přenos spor *Nosema* ve včelstvu je trofalaxií. U napadených včel dochází ke zhoršení trávení přijaté potravy vlivem poškození buněk žaludeční sliznice a po přeplnění výkalového vaku dochází ke kálení včel uvnitř úlu. Tyto výkaly jsou z důvodu nedokonalého trávení potravy sladké a včelami čističkami rychle

odklizeny. Při tom dochází k nakažení těchto včel. Nakažené včely létavky následně ve vnějším prostředí při kálení kontaminují zdroje potravy – vodu i pyl. To má za následek další šíření infekce související se zalétáváním včel do jiných úlů. Nedostatečná obměna díla, kontaminované rámkové i plásty jsou dalším zdrojem spor *Nosema*, stejně tak i loupež v silně infikovaných včelstvech na pokraji zhroucení zejména v podletí (Kamler a kol., 2011)

*Nosema apis* infikuje epiteliální vrstvu žaludku a střeva dospělých včel *Apis mellifera*, což způsobuje zažívací potíže a zkracuje život včel s následným poklesem populace včel, zejména v zimních měsících (Higes., 2006)

Spory *Nosema apis* a *Nosema ceranae* se přeměňují buď na primární spory nebo na zralé spory po 48 až 96 hodinách po infekci (Higes a kol., 2007). Primární spora je produkována štěpením sporontu za vzniku dvou sporoblastů, z nichž každý má tenkou sporu a krátké polární vlákno. Primární spora je schopna přenášet infekci do sousedních buněk autoinfekcí (Becnel a Andreadis., 1999). Hlavní rozdíly ve vývoji a morfologii mezi primární sporou a zralou sporou je silný obal spory a delší polární vlákno později. Nakonec se infikovaná buňka stává pevně vyplněná parazity, což vede k prasknutí a uvolnění spor do střevního lumenu. Zralé spory mohou projít přes konečník ve stolici, sloužící jako inokulum pro ostatní včely. Primární spora zůstává v žaludku a infikuje jiné buňky.

## **1.6 Vliv nosematózy na zdraví dělnic**

Nákaza má specifické účinky na včely. Starší včely po nakažení v krátké době umírají a mladé včely ve snaze udržet příjem pylu a nektaru přebírají jejich úlohu ve včelstvu. Snížený počet včel v úle nedokáže udržet optimální teplotu pro správné fungování včelstva. Pokud u včely došlo k infekci během prvního týdne života, není schopna správně trávit potravu a produkovat dostatek kašičky pro plod. Z tohoto důvodu má tendenci přeskočit chovnou fázi svého životního cyklu a rovnou se z ní stává létavka. Délka jejího života se může snížit až o 78 % (Munssen., 2011)

## **1.7 Vliv nosematózy na zdraví matky**

Infekce může vyvolat změny dalších faktorů souvisejících s reprodukčními problémy královny. Terminální oocyty královen infikovaných spory *Nosema apis* vykazují důkazy autolýzy a mitochondrie, endoplazmatické retikulum, ribosomy a žloutkové granule se zdají nerovnoměrně rozptýleny nebo se zhoršují (Liu., 1992).



Po nakažení sporamai *Nosema* prochází žloutkový materiál degenerací vaječníků, hladina prekurzorového proteinu žloutku a hladina vitellogeninu (Vg), se zvyšuje u infikovaných královen. Osm dnů po naočkování bylo zjištěno, že královny infikované sporamai *Nosema ceranae* mají téměř dvojnásobné množství Vg než kontrolní matky zdravé (Alaux a kol., 2011). Příčiny zvýšení Vg v hemolymfě královen jsou doposud nejasné. Vitellogenin je kontinuálně syntetizován v tukovém tělísku a sekretován do hemolymfy královen (Fluri a kol., 1981), přes kterou je veden do vaječníků pro zrání vajíček (Hagedorn a Kunkel., 1979). Zvýšené hladiny Vg v hemolymfě infikovaných královen mohou být dočasným stavem kvůli zhoršení specifických receptorů na vaječnicích, které usnadňují příjem.

Včelí královna se může nakazit stejně jako dělnice při konzumaci potravy obsahující spory *Nosema*. Po nakažení nejprve dojde ke snížení počtu kladených vajíček a může vést až k úplnému přerušení kladení královny. Byl zjištěn rozdíl ve velikosti vaječníků a některé byli dokonce svrastělé. Při kladení matka denně naklade až 2000 vajíček z tohoto množství nakladených vajíček nakaženou matkou nebyla značná část infikována (Hassanein., 1951)

## **1.8 Vliv nosematózy na zdraví trubců**

Vliv trubců při formování zdraví včelstev může být při identifikaci dopadu infekčních onemocnění přehlédnut. Trubčí plod a dospělci jsou náchylní k přírodní infekci *N. ceranae* (Traver a Fell., 2011). Zatímco zatížení spor nemusí dosáhnout úrovní pozorovaných u dělnic, důkazy naznačují, že infekce *N. ceranae* má větší negativní vliv na tělesnou hmotnost trubce a přežití než u dělnic. (Retschnig a kol., 2014).

Předpokládá se, že mužský společenský hmyz udržuje vysoký reprodukční potenciál tím, že investuje do produkce hojného a vysoce kvalitního spermatu (Boer a kol., 2010). Nicméně s touto investicí dochází ke snížení přidělených zdrojů pro nereprodukční procesy, jako je imunitní systém (Baer a kol., 2006).

Objevují se však důkazy, že trubci vyvinuli mechanismy na ochranu spermií před negativními účinky infekčních onemocnění, jako je například *Nosema spp.* Diagnostika spor pomocí PCR, a rozbor semenné tekutiny odhalil přítomnost proteinu a neproteinových faktorů, které mají vysokou účinnost proti sporám *Nosema apis*. Tyto faktory působí vyvolání klíčivosti extracelulárních spor (Peng a kol., 2016) a

jsou spojeny s humorální imunitní odpovědí a produkcí antimikrobiálních látek (Grassl a kol., 2017). Dodatečné studie by měly potvrdit, zda jsou antimikrobiální účinky semenné tekutiny také účinné proti *Nosema ceranae* (Goblirsch., 2018).

## **1.9 Prevence vzniku nákazy**

Hlavní význam v boji proti nosematóze je chov zdravých a silných včelstev, mladá vitální matka a úlová hygiena. Příprava včelstev na zimu a zajištění nerušeného zimování je dalším nedílným faktorem v boji proti onemocnění (Hanousek., 1991).

Výměna plástů za nové je důležitý prvek v prevenci. Především začátkem jara odebrání kontaminovaných plástů, aby se nově vylíhlé včely nenakazili při čištění. Pláсты kontaminované sporami udržují životaschopnost spor až po dobu dvou let (Kubišová a Halsbachová., 1998).

Úly mají být pravidelně čištěny, aby se minimalizovalo množství infekčních onemocnění přítomných v úlu. Při použití varroaden dochází ke snížení zdrojů infekce druhů *Nosema* tím, že sníží kontakt včel s úlomky úlu. Úlomky propadnou skrz dno na podložku a včely k nim nemají přístup. Dezinfekce úlů je důležitým faktorem v oblasti zdraví včelstev, neboť nedávné studie prokázaly, že zvýšená údržba a čištění úlu pomohou snížit množství zimních měli během zimy (Copley., 2012).

Způsobem, jak předcházet propuknutí nákazy je na jaře nepodávat včelám pyl ani pylové náhražky obsažené v medocukrovém těstě. Při podání medocukrového těsta dojde k donucení konzumace starými včelami, které jsou na okraji chumáče. Ty obsažené bílkoviny v krmivu pro svou výživu nevyžadují a při zvýšení obsahu bílkovin v trávicím traktu vznikají vhodné podmínky pro intenzivní rozvoj nosematózy (Veselý a kol., 2013). Dojde-li ve včelstvu k propuknutí nákazy je nutné ze včelstva zlikvidovat co nejdříve všechny spory, které jsou na plástech, stěnách úlu i medných zásobách (Rejnič a kol., 1987).

## **1.10 Léčba nosematózy**

Hlavní význam při léčbě nosematózy má dezinfekce včelařského vybavení. Je potřeba dezinfikovat prázdné úly, pláсты, medomet a veškeré včelařské náčiní, které přichází do styku se včelami (Sochlikov a Ignat'jev., 2008)

Pro ohniskovou desinfekci se používají výpary kyseliny octové o minimální koncentraci roztoku 60 %. Všechny spory se zničí během několika hodin. Při zvýšené

koncentraci lze dosáhnout stejného účinku do několika minut (Bailey., 1957). Po této dezinfekci je potřeba nechat veškeré dezinfikované vybavení minimálně 14 dní vyvětrat před dalším použitím v úle.

Pokud chceme zkontrolovat správnost provedení dezinfekce musíme provést biologickou zkoušku. Vzorek získáme smyvem vodou z dezinfikovaného vybavení. V zachycené tekutině se koncentrují spory, které se smíchané s cukerným roztokem podávají 2-3 mladuškám v odděleném termostatickém inkubátoru. Počkáme 7 dnů pro dokončení vývojového cyklu parazita a pod mikroskopem hodnotíme výskyt spor. Pokud v zorném poli mikroskopu najdeme maximálně tři spory, dezinfekci považujeme za úspěšnou (Sochlikov a Ignat'jev., 2008).

V části Evropské unie je povolen k léčbě přípravek Fumagilin. Ten je možné aplikovat postříkem, směsí s medocukrovým těstem nebo při doplňování zimních zásob v roztoku. K tomuto kroku se přistupuje jen z důvodu potřeby účinné látky proti nosematóze. Jedná se o antibiotikum, které se následně může objevit v medu (Veselý a kol., 2013).

Jelikož v České republice v současné době nemáme žádný povolený léčebný preparát jako je Fumagilin, je zvládnutí nemoci závislé pouze na způsobu ošetřování včelstva včelařem. Ten nedokáže spory ničit, jelikož se vyskytují ve všech včelstvech ale pouze tlumit, aby se neprojeví jejich klinické přípravky (Holubec., 2006).

Během studie byla včelám v cukerném roztoku do krmení přidávána sloučenina Porfírin. Po přidání došlo k výraznému snížení počtu mikrosporidií bez vedlejších účinků na zdraví včel. Anti-mikrosorpidní aktivita nonmetalloporfyrinů může být přičítána poruchám integrity membrány a buněčné stěny těmito porfyriny a je pravděpodobně zodpovědná za inhibici syntézy makromolekulárních sloučenin a za smrt mikrosporidií vystaveným porfyrinům (Praszyńska a kol., 2018). Tato metoda léčení nebyla dosud uvedena do praxe a nachází se ve fázi experimentů.

## 2 CÍL PRÁCE

Ze získaných dat o infekci nosematózou se vyhodnotí faktory, ovlivňující nákazu a tím i zdravotní stav včelstva. Cílem práce bylo vyhodnotit výskyt a procento infekce nosematózy u dělnic včely medonosné ve vybraných chovech na území ZO Bystřice. Dále se zjišťovalo, jestli je infekce nosematózou závislá na počtu chovaných včelstev včelařem a jestli infekci mikrosporidii r. *Nosema* ovlivňují sami chovatelé a zda se liší infekce mikrosporidii během roku.

### 3 METODIKA

#### 3.1 Umístění stanovišť

ZO ČSV Bystřice se nachází ve středočeském kraji nedaleko Benešova. Nadmořská výška stanovišť včelstev se zde pohybuje od 350 do 450 m.n.m.

První pylová snůška je zde tvořena vrbou jívou. Po ní následují v rozkvětu ovocné stromy. Tato snůška je využita pro jarní rozvoj včelstev. Následně rozkvétají v této lokalitě hojně pěstované ozimé řepky. Ty tvoří největší podíl přineseného nektaru.

Po odkvětu řepky plynule začíná snůška z maliníků, ostružiníků a lip. V roce sledování se v lokalitě Bystřicka vyskytla i medovicová snůška. Tyto medy byly ze včelstev opět vytočeny a následovalo krmení cukerným roztokem. Toto krmení probíhalo u většiny včelařů od 20.8.2017.

#### 3.2 Přehled sledovaných chovů

Na území Bystřické organizace byli osloveni chovatelé všech věkových skupin s rozdílným stářím včelařského vybavení. Celkem poskytlo vzorky 15 chovatelů z 21 stanovišť při jarním odběru a 12 chovatelů z 19 ti včelstev při letním odběru.

V době sledování nebyly u včelstev použity žádné léčebné přípravky. Ani jinými termo fyzikálními metodami nebylo bojováno proti nosematóze. Jediné opatření, které bylo prováděno je vyřezávání trubčiny na snížení invazního tlaku roztoče *Varroa destructor* na včelstva.

Vybraní chovatelé se včelstvy nekočují a početní stavy na stanovišti se měnily pouze z důvodu ztrát včelstev úhynem či vytvořením oddělků v rámci stanoviště. Všichni včelaři chovají včelu medonosnou kraňskou (*Apis mellifera carnica*), někteří chovatelé se zabývají produkcí oddělků a rozchovávají kmen Singer, Sklenar a Vigor. Všichni chovatelé zapojení do odběrů používali úly palubkové zateplené s plným podmetem.

Tab. č.1 Přehled stanovišť a počtu chovaných včelstev na stanovišti

Název stanoviště	Chovatel	Jaro	Léto
Splav	č.1	2	2
Hutě	č.2	28	28
Vokov	č.3	33	33
Skalka	č.3	55	55
Popovice	č.3	40	35
Bezejovice	č.3	30	-
Bakos	č.3	40	38
Miroslav	č.4	50	50
Kobylí	č.4	45	45
Vůz Ouběnice	č.5	7	7
Vůz Sysel	č.6	12	10
Oborák	č.7	20	18
Ouběnice	č.7	-	35
Vrbětín	č.8	14	15
Nesvačily	č.9	11	-
Nesvačily u kostela	č.10	19	19
Lhota	č.10	20	20
Konopiště	č.11	30	40
Zahořany	č.12	16	15
Líštěnec	č.13	12	12
Líšno	č.14	15	15
Líšno zastávka	č.15	30	-

U tří chovatelů jsou úly umístěny ve dřevěném včelíně. Dva chovatelé mají úly umístěny ve voze. Zbylí chovatelé mají úly rozmístěny na železných či dřevěných podstavcích volně v přírodě po 4–6 ti ve skupinách.

Většina chovatelů používá v Česku nejrozšířenější rámkovou míru 39x24. Zbylí chovatelé včelaři na rámkové míře 39x27,5 a 39x28. Úly jsou rozdílného stáří od jednoho roku do 40 let. Většina úlů je v rozmezí 2–10 ti let stáří. Dezinfekci včelařského vybavení pomocí plamene či dalších fyzikálních či chemických přípravků provádí pouze někteří chovatelé.

Pravidelnou obměnu díla provádí více jak 2/3 chovatelů. Za pravidelnou výměnu díla je považováno obměnění každý rok minimálně 1/3 všech úlových rámků.

### **3.3 Odběr vzorků**

Odběr vzorků probíhal v jarním období od 29.4 do 8.5.2017 a v letním od 10.8 do 15.8. 2017. Na stanovišti byly náhodně vybrány 2-3 úly dle velikosti stanoviště. Těmto úlům bylo přiděleno identifikační číslo, aby se mohl odběr dle potřeby opakovat. Z každého vybraného úlu bylo odchyceno v poledních hodinách 8–10 dělnic vylétajících z česna. Ty byly umístěny do nové transportní klícky na matky a popsány přiděleným identifikačním číslem. Po následném transportu a usmrcení chladovým šokem byly umístěny do mrazícího boxu o teplotě -18 °C. Zamražené vzorky byly uchovány až do vlastního vyšetření.

### **3.4 Příprava vzorků**

Po vyjmutí z mrazáku byly jednotlivé včely vypreparovány pod binolupou. Pro další rozbor byly použity pouze žaludky a střeva.



Obr.č.3 Střevo včely s výkalovým váčkem připravené k vyšetření

Získané žaludky a střeva se částečně rozetřely na podložním sklíčku a po přidání fyziologického roztoku jsem je prohlížel pod mikroskopem. Z každého vzorku bylo vyšetřeno 5 včel. Následně došlo k roztrídění na pozitivní včely se spory mikrosporidií a negativní. Získané pozitivní vzorky střev a žaludků vyšetřovaných včel jsem dále uchovával zmražené pro další rozbor.

### 3.5 Barvení podle Giemsy

Pozitivní střeva a žaludky na mikrosporidie jsem rozetřel na podložním sklíčku. Po dokonalém zaschnutí vzorku jsem provedl fixaci buněk na podložní sklíčko pomocí metanolu.

Následně jsem podložní sklíčko ponořil do 5 % čerstvého roztoku Giemsova činidla, které jsem si připravil smícháním Giemsova barviva s destilovanou vodou. Takto připravený vzorek jsem nechal 25 minut probarvit a následně na vzduchu vysušil.

Toto barvení zbarví buněčná jádra do červenofialové, plazmu epitelů a prvoků do světle modré, plazmu leukocytů do světle fialové, erytrocyty do růžové a bakterie modrofialové.

### 3.6 Izolace DNA mikrosporidií ze střev pomocí CTAB

Abych mohl určit, zda se jedná o mikrosporidie *Nosema apis* či *Nosema ceranae*, potřeboval jsem získat čistou DNA pro PCR amplifikaci. Izolace DNA probíhala přímo z žaludků a střev.



### Pracovní postup izolace DNA:

1. Předehřál jsem extrakční pufr na 65 °C (495ul extrakčního CTAB pufru a 5ul beta-mercaptoethanolu na jeden vzorek).
2. Do sterilních 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek jsem vložil střeva a žaludky včel a přidal předehřátý pufr. Celý obsah byl důkladně zhomogenizován.
3. Inkubace probíhala po dobu 5 minut při 65 °C a během procesu proběhlo 1x lehké protřepání.
4. Následovalo přidání 500 ul chloroformu – IAA a 5 minut protřepávání.
5. Po vložení do centrifugy na 5 minut při maximální rychlosti a pokojové teplotě došlo k oddělení vodné fáze.
6. Vzniklou vodnou fází přepipetuji do nových zkumavek (cca 300ul) přidám 200ul izopropanolu a 3x lehce promíchám.
7. Inkubace proběhla v mrazáku na -20 °C po dobu 10 ti minut.
8. Centrifugací 5 minut při 4 °C na maximální rychlost došlo k oddělení jednotlivých složek. Odstráním supernatant.
9. Po přidání 1ml ledového 70 % ethanolu, centrifuguji 5 minut na maximální rychlost při 4°C. Vzniklý supernatant opět odstráním a usuším pelety při 37°C.
10. Vzniklé pelety se rozpouští při 37°C ve 20- 200 ul TE pufru
11. DNA se skladuje při -20°C

Takto získaná DNA se dá skladovat pouze omezenou dobu. Pro účely další práce je ale plně dostačující.

### **3.7 Polymerázová řetězová reakce (PCR)**

Jedná se metodu pro rychlé namnožení požadovaného úseku DNA v termocykleru. Tento přístroj dokáže v krátkých intervalech rychle zvyšovat či snižovat teplotu. Díky tomu dochází k replikaci částí nukleových kyselin.

#### **3.7.1 Sekvence primerů**

Primery ohraničující potřebnou část DNA pro replikaci.

### 3.7.1.1 *Nosema ceranae*

Primer	<b>Forward</b> GGC GAC GAT GTG ATA TGA AAA T
Primer	<b>Reverse</b> CCC GGT CAT TCT CAA ACA AAA A

### 3.7.1.2 *Nosema apis*

Primer	<b>Forward</b> GGG GCA TGT CTT TGA CGT ACT A
Primer	<b>Reverse</b> GGG GGG CGT TTA AAA TGT GAA

Tab. č.2 Množství a látky potřebné pro přípravu reakce

Látka	Objem (ul)
H <sub>2</sub> O	7
Připravený mastermix	10
Forward	1
Reverse	1

Podle tabulky č.2 jsem si připravil master mix a po přidání 1ul DNA napipetoval do mikrozkušavek. Tyto zkumavky jsem vložil do termocyklu s následujícím amplifikačním programem.

Tab. č.3 Nastavení amplifikačního programu pro termocykler

Krok	Teplota	Čas
č.1 Počáteční denaturace	95 °C	2 min
č.2 Denaturace	95 °C	30 sec.
č.3 Nasedání primerů	62 °C	30 sec.
č.4 Dosyntetizování nového řetězce	72 °C	45 sec.
č.5 Finální extenze	72 °C	7 minut

Termocykler značky Bioer opakoval kroky 2-4 v 35 cyklech. Po vyjmutí z termocyklu jsem použil vzorky pro elektroforézu.

### **3.8 Gelová elektroforéza**

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

#### Pracovní postup:

1. Připravil jsem agarózu s 1× TAE pufrem (pro 1,5 % gel smíchat 1,5 g agarózy se 100 ml TAE pufrem).
2. Agaróza se rozpouští v mikrovlnné troubě a zchladí pod tekoucí vodou přibližně na teplotu 50 °C.
3. Následovalo přidání 3,5 µl ethidium-bromidu a promíchání.
4. Do předem připravené formy jsem nalil gel, vložil hřeben a nechal ztuhnout.
5. Gel jsem vložil do elektroforetické vany naplněné 1× TAE pufrem.
6. Do první a poslední jamky jsem nanesl 1× 5 µl ladderu a zbylé jamky naplnil 10 µl PCR produktů.
7. Separace fragmentů probíhá prvních deset minut při 30 V, pak dojde ke zvýšení na 90 V (přibližně 60 minut).
8. Výsledek jsem vyhodnotil pomocí UV transiluminátoru, který vizualizoval fragmenty DNA.

### **3.9 Statistika**

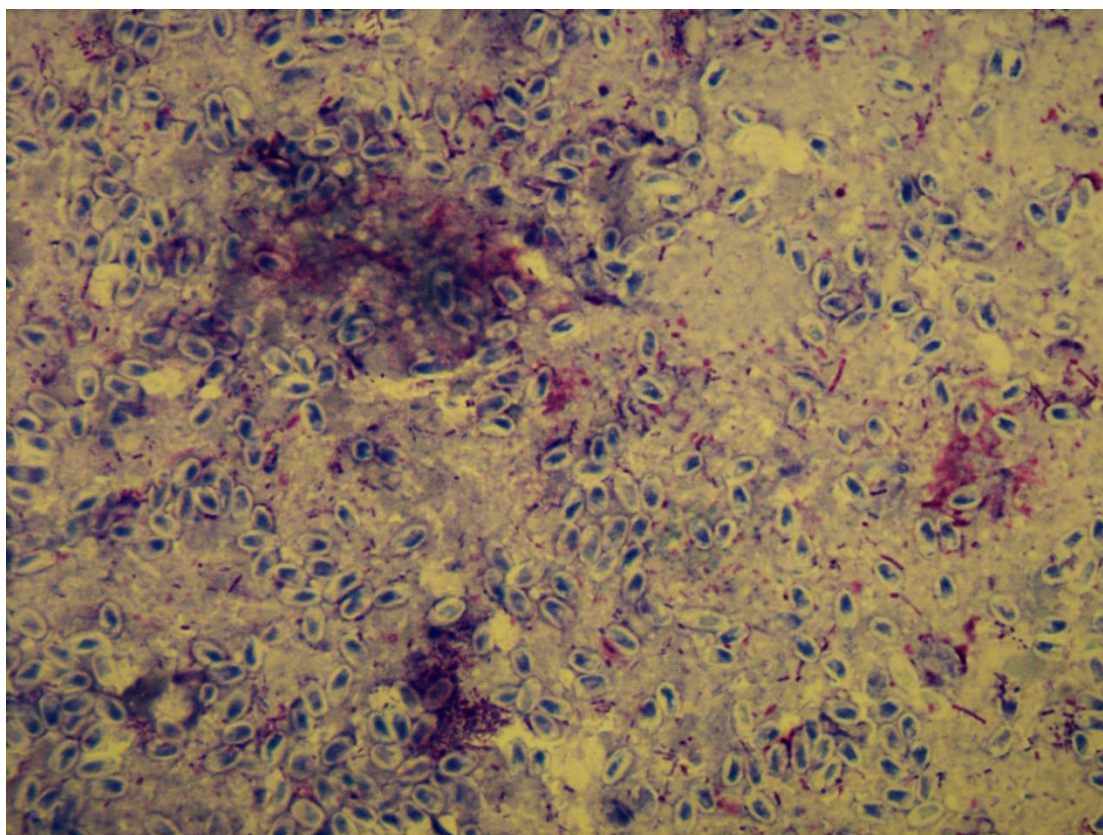
Data byla zpracována pomocí programů MS EXCEL a STATISTICA CZ 11.0., Stat Soft, Inc. Nejprve byla otestována homogenita variance Bartlettovým testem. Rozdíly mezi jednotlivými skupinami byly zjišťovány pomocí jednofaktorové analýzy variance (ANOVA). Pokud byl nalezen statisticky významný rozdíl mezi skupinami byl následně použit Tukeyho test mnohonásobného porovnávání pro zjištění statisticky významné odlišnosti mezi skupinami.

## 4 VÝSLEDKY

V roce 2017 jsem odebíral vzorky od 15 ti chovatelů na území Bystřické organizace, kteří obhospodařují kolem 700 včelstev. Byly odebrány a vyšetřeny vzorky z 93 včelstev. To představuje 465 odebraných a vyšetřených včel. Z těchto včel bylo 133 infikovaných mikrosporidii a 332 negativních.

Primární rozřídění vzorků probíhalo pod mikroskopem na pozitivní a negativní střeva a žaludky včel. Z pozitivních se dále izolovala DNA. Ta se pomocí PCR metody namnožila a za použití elektroforézy vyhodnocovala přítomnost jednotlivých druhů mikrosporidií. Z vyhodnocovaných vzorků se pouze u jednoho vyskytovali obě mikrosporidie *Nosema apis* a *Nosema ceranae* ve všech ostatních se vyskytovala pouze *Nosema ceranae*

Při Gimsově barvení se na jádra spor navázala modrá barva a došlo k jejich zvýraznění. Na obr. č.4 je viditelné silné napadení mikrosporidii nosematozy. Jedná se o mikrosporidii *Nosema ceranae*.



Obr. č.4 Mikrosporidie *Nosema ceranae* po Gimsově barvení

#### 4.1 Porovnání výskytu mikrosporidií u jednotlivých chovatelů

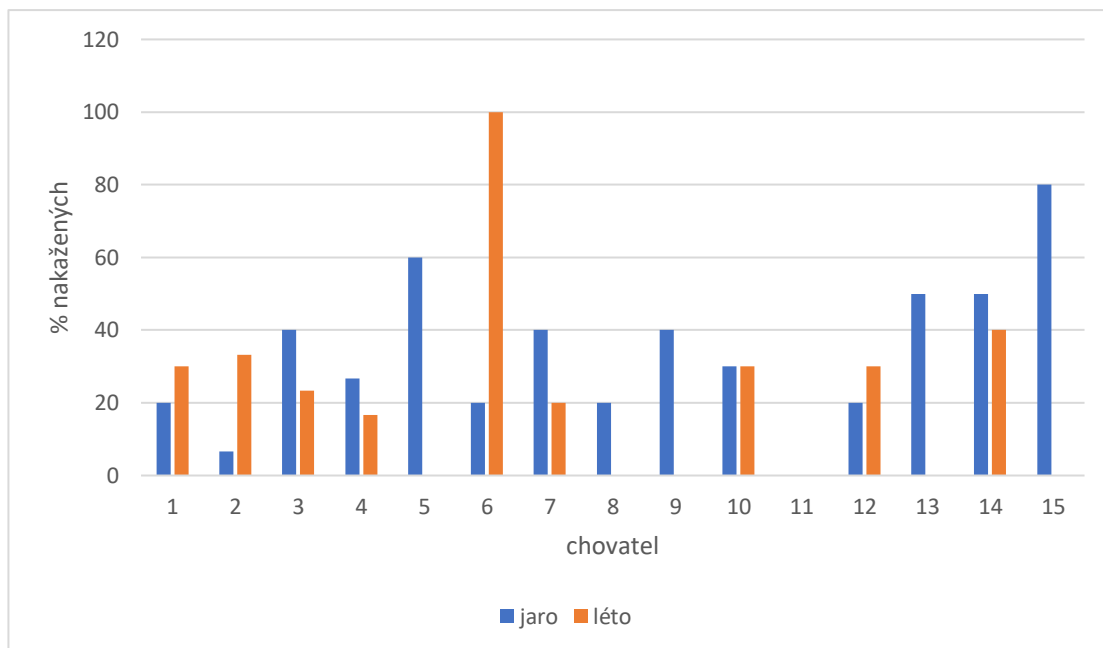
Jednotliví chovatelé se liší počtem obhospodařovaných včelstev a z tohoto důvodu jsem posuzoval výsledky rozborů dle jednotlivých chovatelů. Chovatelé na odebíraných stanovištích měli od 2 do 55 včelstev.

Tab. č.4 Procento nakažených včel mikrosporidiemi u jednotlivých chovatelů.

Chovatel č.	jaro	léto
1	20	30
2	6,7	33,3
3	40	23,3
4	26,7	16,7
5	60	0
6	20	100
7	40	20
8	20	0
9	40	0
10	30	30
11	0	0
12	20	30
13	50	0
14	50	40
15	80	

Při jarních odběrech měl pouze jeden chovatel 100 % včel negativních na mikrosporidie. Během letních odběrů nebyla zjištěna mikrosporidie u čtyř chovatelů.

U jednoho chovatele byly všechny vyšetřované včely napadené mikrosporidiemi. To ukazuje na silné napadení včel. I přes tuto skutečnost si včelstva s infekcí dokázala poradit a do zimy přežila.



Graf č.1 Procento nakažených včel mikrosporidiiemi podle chovatelů

Graf ukazuje velkou variabilitu hodnot mezi jednotlivými chovateli i termínem odběrů. Tato variabilita je z velké části zapříčiněna lokací jejich stanovišť a polohou snůšky v dané lokalitě. U chovatelů včelstev nelze zajistit striktní oddělení jednotlivých chovů a dochází k zalétávání včel a tím přenosu onemocnění mezi chovateli.

#### 4.2 Porovnání výskytu spor *Nosema* v závislosti na stanovišti

Stanoviště se liší svou orientací na světové strany a polohou umístění. Dvě stanoviště jsou v těsné blízkosti rybníka. Sedm stanovišť je umístěno na kraji lesa, aby les poskytoval v odpoledních hodinách stín na stanovišti. Jedno je umístěno na volném prostranství bez jakéhokoliv zastínění. Zbylá stanoviště včelstev jsou v lese s celodenním zastíněním vzrostlými stromy.

Při porovnání výskytu mikrosporidií *Nosema* v závislosti na umístění stanoviště nebyl pozorován statisticky průkazný rozdíl.

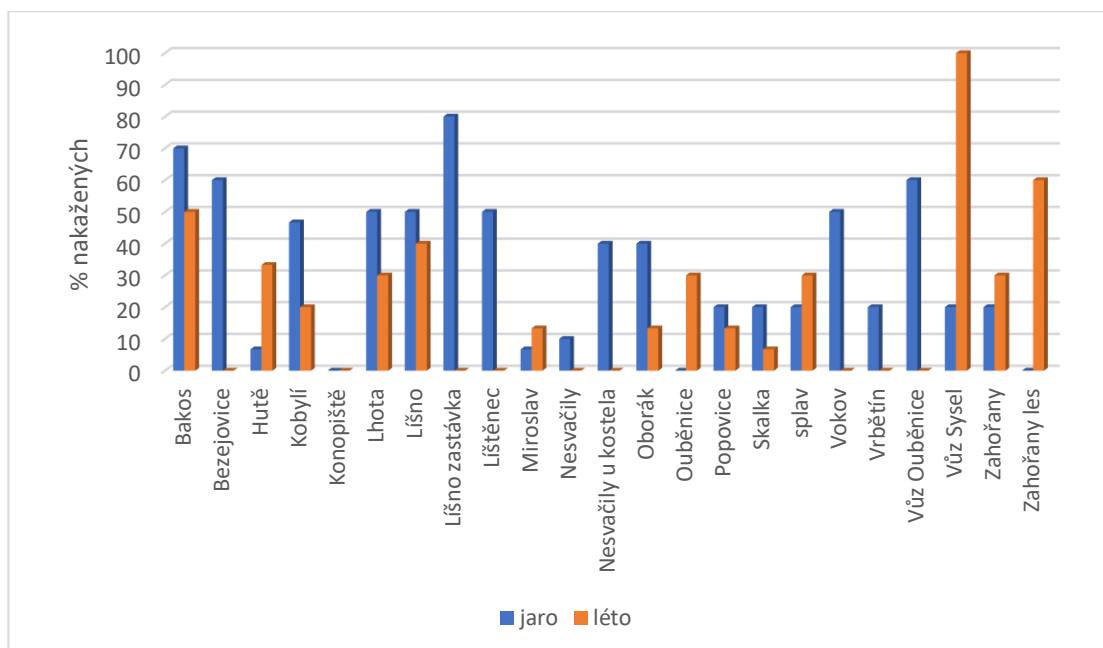
Při jarních odběrech bylo z 21 stanovišť negativní pouze jedno a při letním odběru bylo z 20 odebíraných stanovišť 14 pozitivních na spory *Nosema*.

Tab. č.5 Procento nakažených včelstev dle stanoviště

<b>Stanoviště</b>	<b>jaro</b>	<b>léto</b>
Bakos	70	50
Bezejovice	60	Neodebráno
Hutě	6,7	33,3
Kobylí	46,7	20
Konopiště	0	0
Lhota	50	30
Líšno	50	40
Líšno zastávka	80	Neodebráno
Líštěnec	50	0
Mirotslav	6,7	13,3
Nesvačily	10	Neodebráno
Nesvačily u kostela	40	0
Oborák	40	13,3
Ouběnice	Neodebráno	30
Popovice	20	13,3
Skalka	20	6,7
Splav	20	30
Vokov	50	0
Vrbětín	20	0
Vůz Ouběnice	60	0
Vůz Sysel	20	100
Zahořany	20	30
Zahořany les	Neodebráno	60

Stanoviště, které bylo negativní při obou odběrech bylo založeno v roce 2016. V tento rok bylo osazeno novými palubkovými zateplenými úly s oddělky. Při jarních

odběrech nebylo možné odebrat dvě stanoviště z důvodu znemožnění přístupu na tato místa. Při letních odběrech nebyly odebrány vzorky ze tří stanovišť. Zde odmítli chovatelé odběry.



Graf. č.2 Procento nakažených včel na stanovišti

Během letního odběru byla lepší zdravotní situace na většině stanovišť. Příčina tohoto zlepšení může být i kratší generační interval výměny včel ve včelstvu. Zatímco včely při jarním odběru mohli být i 8 měsíců staré v letních měsících se stáří včel pohybuje kolem 1 měsíce.

#### 4.3 Porovnání výskytu spor *Nosema* v závislosti na velikosti chovu

Pro posouzení vlivu výskytu spor *Nosema apis* a *Nosema ceranae* jsem si odebírané chovatele roztrídil do tří skupin, a to s celkovým počtem chovaných včelstev do 15 ti, další skupinu tvořili chovatelé s počtem včelstev 15-30 a poslední skupinou jsou chovatelé obhospodařující více než 30 včelstev.



Tab.č.6 Počet nakažených včel dle velikosti chovu

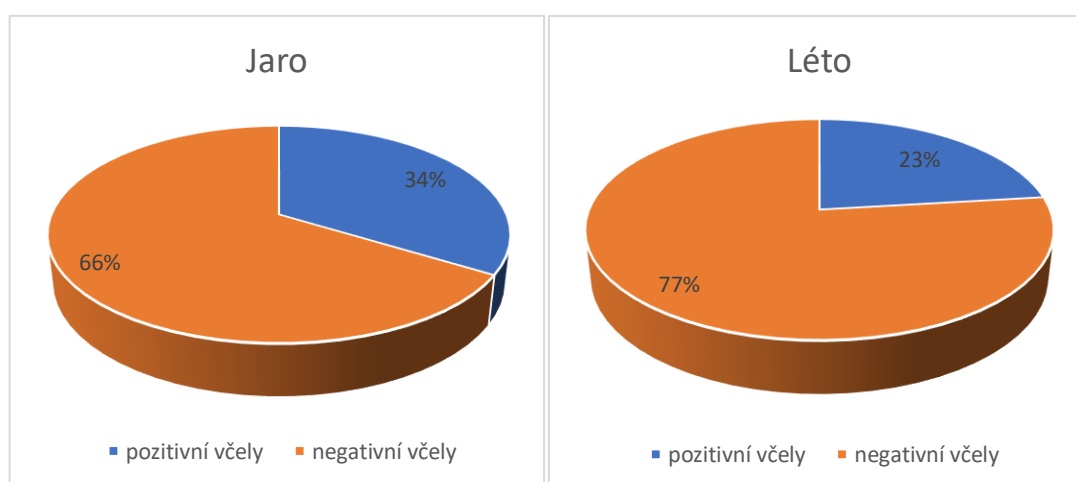
Jarní a letní odběry	0-15 včelstev	15-30 včelstev	<30včelstev
Celkový počet včelstev	149	278	642
Počet vyšetřovaných včelstev	28	28	37
Počet vyšetřovaných včel	140	140	185
Počet nenakažených	97	98	137
Počet nakažených	43	42	48

Nejvíce vyšetřovaných stanovišť bylo u chovatelů s počtem chovaných včelstev více než 30. Je to z důvodu, že na území Bystřické organizace působí dvě včelí farmy s průměrným počtem 40 včelstev na stanovišti. Zbylí chovatelé jsou hobby včelaři, kteří včelaří hlavně pro radost.

Při posouzení vlivu počtu chovaných včel včelařem a výskytu spor *Nosema* není statisticky průkazný rozdíl.

#### 4.4 Vliv ročního období na výskyt spor *Nosema*

Vlivem ročního období, teploty okolního prostředí a délce produktivního života včel, se liší i množství nakažených dělnic ve včelstvech. Změna je viditelná na následujících grafech



Graf č.3 Znárodněný vlivu ročního období na výskyt spor *Nosema*

Při letních odběrech bylo o 11 % pozitivních vzorků na spory *Nosema* méně než při jarních odběrech. Pokles může být zapříčiněn zvýšením počtu včel v úlu v závislosti na množství nakladených vajíček. Při jarním odběru mohla být ve včelstvu zastoupena zimní generace dlouhověkových včel.

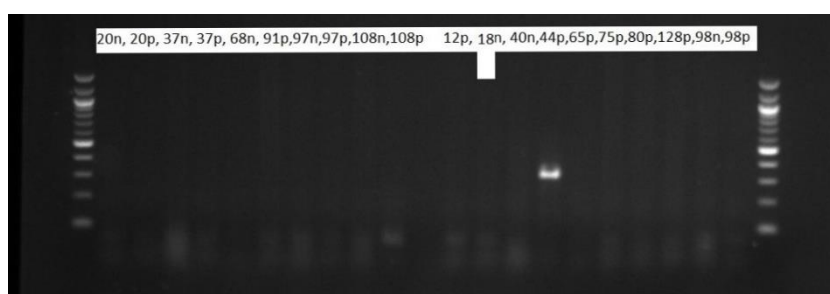
#### 4.5 Identifikace druhů mikrosporidií

Ze všech pozitivních i části negativních vzorků střev pitvaných včel byla izolována DNA, pomocí PCR amplifikována a po elektroforéze vyhodnocena.

Z 51 pozitivních vzorků byla ve všech nalezena DNA mikrosporidie *Nosema ceranae*. Pouze v jednom vzorku byla nalezena *Nosema ceranae* a *Nosema apis* společně. *Nosema apis* se v žádném vzorku nevyskytovala samostatně.

Při vyšetření 47 negativních vzorků se našla DNA mikrosporidie *Nosema ceranae* v 12 ti vzorcích. Zde je možná příčina výskytu kontaminace při pitvě včel. Mikrosporidie také mohli být ve vzorku přítomné jen ve velmi malém množství, kdy nebylo možné spory zjistit pod mikroskopem. Při prohlížení pod mikroskopem se nedá zjistit stádium infekce kdy jsou nakaženy pouze střevní či žaludeční buňky ale ještě nedochází k vytváření spor.

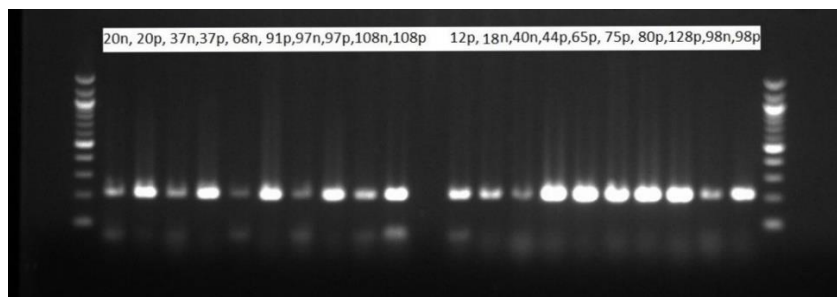
Světelná výraznost vzorku se odvíjí od množství DNA přítomné mikrosporidie. Množství DNA mikrosporidií se mění v závislosti na množství DNA zjišťované mikrosporidie ve vzorku střev a žaludků ze včel. Čistotě izolace a délce amplifikačního programu.



Obr. č.5 Vyhodnocení gelu po elektroforéza s primery *Nosema apis*

Na obrázku č. 5 je zaznamenán výsledek elektroforézy s primery *Nosema apis*. Celkem bylo na jednom agarozovém gelu vyšetřováno při jednom rozboru 20 vzorků. Vzorek s číslem 44p je jako jediný pozitivní na přítomnost DNA mikrosporidií *Nosema apis* a *Nosema ceranae*. Vzorek pocházel ze stanoviště Bezejovice. Na tomto stanovišti se v době odběru nacházelo 30 včelstev. Stanoviště je umístěno na kraji

lesa, kde les poskytuje zastínění úlů v dopoledních hodinách. Majitel stanoviště celkem včelaří se 198 včelstvy. Jednalo se o jarní odběr. Při letním odběru se ve včelstvu vyskytovaly pouze spory *Nosema ceranae*.



Obr.č.6 Vyhodnocení gelu po elektroforéze s primery *Nosema ceranae*

Přítomnost DNA mikrosporidií *Nosema ceranae* ve vzorcích je vidět na obrázku č.6. Z 20 ti vzorků byla mikrosporidie přítomná ve 12 ti vzorcích. První a poslední jamka naplněná ladderem slouží jako marker pro přehlednější odečítání a určení délky fragmentů. Vzorky byli náhodně vybrány jak z letního, tak jarního odběru.

## 5 DISKUZE

Výsledky pokusu diplomové práce ukázali, že původce nosematózy je přítomen téměř ve všech včelstvech (Lampeitl., 1996).

Uvádí se, že na území ČR se v roce 2011 vyskytovala nosematóza z 4010 vyšetřovaných vzorků u 2167. To představuje prevalenci 54 %. Z toho 678 vzorků bylo pozitivních na *Nosema apis*, 1134 na *Nosema ceranae* a u 356 se vyskytovala smíšená infekce *Nosema apis* a *Nosema ceranae* (Kamler a kol., 2011).

Dle výsledků mé diplomové práce se s tímto tvrzením shodují. Podle mých výsledků se nosematóza vyskytovala při jarních odběrech u 32 včelstev z 48 odebraných. To představuje prevalenci 66,7 %. Při letních odběrech, kdy bylo vyšetřováno 46 včelstev tak bylo pozitivních 22 včelstev. Zde je prevalence 47,8 %.

Výsledky se ale neshodují u poměru zastoupených mikrosporidií. Při mém rozboru bylo zjištěno, že se vyskytovala *Nosema ceranae* při jarním odběru v 31 pozitivních vzorcích a v 1 vzorku se vyskytovaly mikrosporidie *Nosema apis* i *Nosema ceranae*. Při letních odběrech se vyskytovala ve všech 22 vzorcích pouze *Nosema ceranae*.

Přímou souvislost mezi úmrtím včelstev a výskytem spor *Nosema* nelze v rámci mé práce prokázat.

Udává se, že včely infikované sporami *Nosema apis* se vyprazdňují uvnitř úlu, kde kontaminují plásty miliony infekčních spor. Dochází k poškození střevní tkáně a sekundární infekci, která by měla způsobovat úplavici. Ta se projevuje hnědými průjmovými skvrny na stěnách úlu a rámcích (Mussen., 2011). V odebíraných včelstvech se tento příznak silné nákazy nevyskytoval, a tudíž se tvrzení nepodařilo prokázat.

*Nosema ceranae* se vyznačuje zejména výrazným poklesem produkce medu a sníženým počtem včel ve včelstvu. To je zapříčiněno zkrácením délky života včely a omezením schopnosti přijímat z přijaté potravy živiny. Může to vést až k úplnému kolapsu včelstva (Cox-Foster a kol., 2007). Během sledované sezony dosáhla včelstva v dané lokalitě nad dlouholeté průměrné výnosy 35 kg ze včelstva, a proto nelze prokazatelně tvrdit, že se na výnosech projevila infekce sporami *Nosema ceranae*. Počet včel v úlu je dáno silou včelstva, intenzitou snůšky a vedlejšími vlivy jako je

velikost úlového prostoru, stáří matky a chemickými látkami používanými k ochraně porostů v okolí.

Epidemiologické důkazy naznačují, že *Nosema ceranae* může globálně nahrazovat *Nosema apis*. To naznačuje potenciální konkurenční výhodu. Smíšené infekce oběma druhy ve včelstvech se vyskytují jen málo. Toto má za příčinu, že se *Nosema ceranae* stala dominantní ve většině zeměpisných oblastí (Milbrath a kol., 2015). Toto tvrzení se mi podařilo prokázat, jelikož se v nakažených včelstvech vyskytovala až na jeden případ pouze *Nosema ceranae*.

Rozdíly ve výskytu infekce ve střevech nebyli významné v závislosti na termínu odběrů. Obecně se vyskytovaly vyšší úrovně infekce u obou druhů na jaře a na začátku léta, po nichž následně došlo k poklesu hladin na podzim (Copley., 2012).

Infekce sporami *Nosema ceranae* může být ve včelstvech nalezena ve všech ročních obdobích (Martín-Hernández a kol., 2007; Higes., 2008) zatímco infekce způsobená sporami *Nosema apis* se vyskytuje převážně na jaře a na podzim (World Organisation for Animal Health., 2008). Toto tvrzení nemohu prokazatelně tvrdit, jelikož se u mnou sledovaných včelstvech vyskytla nákaza *Nosema apis* pouze u jednoho včelstva při jarním odběru.

*Nosema ceranae* se dává často do souvislosti s CCD (syndrom zhroucení včelstev), kdy včelaři nacházejí pouze prázdné úly, což je s největší pravděpodobností způsobeno silným napadením *Nosema ceranae* a roztočem *Varroa destructor* (Staroň., 2010). Toto tvrzení se mi bohužel nepodařilo prokázat. Pro posouzení vlivu spor *Nosema ceranae* na CCD a s tím související úhyny by musel výzkum probíhat delší dobu. V roce 2017 nebyl zaznamenán silný varoázní rok.

Včely infikované sporami *Nosema apis* či *Nosema ceranae* mají vyšší spotřebu energie pro vlastní potřebu a během letu sesbírají menší množství pylu a sladiny. Podnikají kratší lety z důvodu nedostatku získané energie z potravy. Nemalý vliv má i stres spojený s onemocněním. To vede ke snížení opylovací funkce včelstva (Boothroyd., 2000)

## 6 ZÁVĚRY

- Mikrosporidie nosematózy byly přítomné u většiny chovatelů a téměř na všech stanovištích.
- Ve všech pozitivních vzorcích se vyskytovali spory *Nosema ceranae*. Pouze v jednom byli přítomny obě mikrosporidie jak *Nosema apis*, tak *Nosema ceranae*.
- Mezi jarním a letním odběrem vzorků byl pozorován pokles o 11 % ve výskytu mikrosporidií.
- Výsledky ukazují na převládnutí nepůvodní mikrosporidie *Nosema ceranae* nad mikrosporidií *Nosema apis*.
- Při jarních odběrech se nosematóza vyskytla u 32 včelstev z 48 odebraných. To představuje prevalenci 66,7 %. Při letních odběrech, kdy bylo vyšetřováno 46 včelstev, tak bylo pozitivních 22 včelstev. Zde je prevalence 47,8 %.
- Během sledování nebyl znám ve sledovaných chovech žádný úhyn související s touto nemocí.

## 7 POUŽITÁ LITERATURA

Alaux, C., Folschweiller, M., McDonnell, C., Beslay, D., Cousin, M., Dussaubat, C., Brunet, J.L., Le Conte, Y. (2011) Pathological effects of the microsporidium *Nosema ceranae* on honey bee queen physiology (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* 106:380–385

Anderlová J. 2013., Výskyt a prevalence *Nosema* spp. u včely medonosné (*Apis mellifera*)

Anonym., 1Projekt Mendelovy univerzity 291

Antúnez, K., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Meana, A., Zunino, P., Higes, M. (2009) Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environ. Microbiol.* 11 :2284–2290

Antúnez, K., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Meana, A., Zunino, P., Higes, M. (2009) Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environ. Microbiol.* 11 :2284–2290

BAER, Boris, Sophie A. O. ARMITAGE a Jacobus J. BOOMSMA. Sperm storage induces an immunity cost in ants. *Nature* [online]. 2006, **441**(7095), 872-875 [cit. 2018-04-16]. DOI: 10.1038/nature04698.

Becnel, J.J., Andreadis, T.G. (1999) BMicrosporidia in Insects<sup>^</sup>. In: *The Microsporidia and Microsporidiosis*. Ed. M. Wittner. ASM Press, Washington DC, pp447– 501

BOOTHROYD, Peter. a Xuân Nam. PHAM. *Socioeconomic renovation in Viet Nam: the origin, evolution, and impact of doi moi*. Singapore: Institute of Southeast Asian Studies, 2000.

Burges H. D., Canning E. U., Hulls J. K. 1974. Ultrastructure of *Nosema oryzaephili* and the taxonomic value of the polar filament. *J. Invert. Pathol.* 23:135-39.

Copley, T.R., Giovenazzo, P. & Jabaji, S.H. *Apidologie* Detection of *Nosema apis* and *N. ceranae* in honeybee bottom scraps and frass in naturally infected hives (2012) 43: 753.

COPLEY, Tanya R., Pierre GIOVENAZZO a Suha H. JABAJI. Detection of *Nosema apis* and *N. ceranae* in honeybee bottom scraps and frass in naturally infected

hives. *Apidologie* [online]. 2012, **43**(6), 753-760 [cit. 2018-04-16]. DOI: 10.1007/s13592-012-0147-8.

Cox-Foster D. L., Conlan S., Holmes E., Palacios G., Evans J. D., Moran N. A., Quan P. L., Briese T., Hornig M., Geiser D. M., Martinson V., van Engelsdorp D., Kalkseitn A. L., Drysdale A., Hui J., Zhai J., Cui L., Hutchinson S. K., Simons J. F., Egholm M., Pettis J. S., Lipkin W. I. 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*. 318:283-287.

COX-FOSTER, D. L., S. CONLAN, E. C. HOLMES, et al. A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony Collapse Disorder. *Science*[online]. 2007, **318**(5848), 283-287 [cit. 2018-04-16]. DOI: 10.1126/science.1146498.

Fenoy S., Rueda C., Higes M., Martín-Hernandez R., del Aquila C. 2009. Highlevel resistance of *Nosema ceranae*, a parasite of the honeybee, to temperature and desiccation. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:6886-6889.

Fluri, P., Sabatini, A.G., Vecchi, M.A., Wille, H. (1981) Bloodjuvenilehormone,proteinandvitellogenintitres in laying and non-laying queen honeybees. *J. Apic. Res.* 20:221–225

Fries I., Feng F., da Silva A., Slemenda S. B., Pieniasek J. 1996. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae). Morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *Eur. J. Protistol.* 32:356-365.

Fries, I. (1993) *Nosema apis*—a parasite in the honey bee colony. *Bee World.* 74:5–19

GOBLIRSCH, Mike. *Nosema ceranae* disease of the honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie* [online]. 2018, **49**(1), 131-150 [cit. 2018-04-04]. DOI: 10.1007/s13592-017-0535-1.

Grassl, J., Peng, Y., Baer-Imhoof, B., Welch, M., Millar, A.H., Baer, B. (2017) Infections with the sexually transmitted pathogen *Nosema apis* trigger an immune response in the seminal fluid of honey bees (*Apis mellifera*). *J. Proteome Res.* 16:319–334



- Graystock, P., Goulson, D., Hughes, W. O. (2015). Parasites in bloom: flowers aid dispersal and transmission of pollinator parasites within and between bee species. *Proc. Biol. Sci.* 282
- Hagedorn, H. H., Kunkel, J. G. (1979) Vitellogenin and vitellin in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 24:475–505
- Hanousek L. 1991. *Začínáme včelařit*, Praha, nakladatelství Brázda, s. 109.
- Hassanein M. H. 1951. Studies of the effect of infection with *Nosema apis* on the physiology of the queen honey-bee. *Q. J. Microsc. Sci.* 92:225-231.
- Higes M., Garcia-Palencia P., Martin-Hernandez R., Meana A. 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *J. Invert. Pathol.* 94:211-217.
- Higes M., Martin-Hernandez R., Botías C., Garrido-Bailon E., Gonzalez-Porto A. V., Barrios L., del Nozal M., Bernal J. L., Jiménez J. J., Palencia G. P., Meana A. 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ. Microbiol.* 10:2659-2669
- Higes M., Matin R., Meana A. 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honey bees in Europe. *J. Invert. Pathol.* 92:93-95.
- HIGES, Mariano, Raquel MARTÍN a Aránzazu MEANA. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology* [online]. 2006, **92**(2), 93-95 [cit. 2018-04-16]. DOI: 10.1016/j.jip.2006.02.005.
- HIGES, Mariano, Raquel MARTÍN-HERNÁNDEZ, Encarna GARRIDO-BAILÓN, Pilar GARCÍA-PALENCIA a Aránzazu MEANA. Detection of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores in corbicular pollen of forager honeybees. *Journal of Invertebrate Pathology* [online]. 2008, **97**(1), 76-78 [cit. 2018-04-16]. DOI: 10.1016/j.jip.2007.06.002.
- HOLUBEC., 2006, dostupné na <http://www.vcelarskenoviny.cz/nemociskudci/227-nosematoza-a-zpusoby-jejeho-tlumeni.html>, staženo dne 15. 4. 2018
- HRABÁK J.. *Nosema apis*, původce nose mózy, je nyní houbou. *Včelařství*, časopis ČSV. 2007, roč. 60, čís. 4, s. 100.

- Kamler et al. 2011. Rozšíření, patogeneze a návrh opatření v chovech včel ohrožených mikrosporidii *Nosema ceranae*
- Kubišová S., Hálsbachová H., 1998. Včelařství, Brno, Mendlova zemědělská a lesnická univerzita, s. 86.
- Liu, T.P. (1992) Oöcytes degeneration in the queen honey bee after infection by *Nosema apis*. *Tissue Cell*. 24:131–138
- Malone L. A., Gatehouse H. S., Tregidga E. L. 2001. Effects of time, temperature, and honey on *Nosema apis* (Microsporidia: Nosematidae), a parasite of the honeybee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *J. Invert. Pathol.* 77:258-268.
- Martín-Hernández R., Meana A., Prieto L., Salvador A. M., Garrido-Bailón E., Higes M. 2007. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:6331-6338.
- MARTIN-HERNANDEZ, R., A. MEANA, P. GARCIA-PALENCIA, P. MARIN, C. BOTIAS, E. GARRIDO-BAILON, L. BARRIOS a M. HIGES. Effect of Temperature on the Biotic Potential of Honeybee Microsporidia. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2009, **75**(8), 2554-2557 [cit. 2018-04-16]. DOI: 10.1128/AEM.02908-08.
- Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailón, E.G., MartínezSalvador, A., Prieto, L., Meana, A., Higes, M. (2012) Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*? *Environ. Microbiol.* 14:2127–38
- Mussen E. C. 2011. Diagnosing and Treating *Nosema* Disease
- Pamela G. Gregory, Jay D. Evans, Thomas Rinderer, Lilia de Guzman; Conditional immune-gene suppression of honeybees parasitized by *Varroa* mites, *Journal of Insect Science*, Volume 5, Issue 1, 1 January 2005, 7, <https://doi.org/10.1093/jis/5.1.7>
- Peng, Y., Grassl, J., Millar, A.H., Baer, B. (2016) Seminal fluid of honeybees contains multiple mechanisms to combat infection of the sexually transmitted pathogen *Nosema apis*. *Proc. Biol. Sci.* 283

PTASZYŃSKA, Aneta A., Mariusz TRYTEK, Grzegorz BORSUK, Katarzyna BUCZEK, Katarzyna RYBICKA-JASIŃSKA a Dorota GRYKO. Porphyrins inactivate *Nosema spp.* microsporidia. *Scientific Reports* [online]. 2018, **8**(1), - [cit. 2018-04-18]. DOI: 10.1038/s41598-018-23678-8.

Rejnič J., Haragsim O., Rekoš J. 1987. Včelařství. Institut výchovy a vzdělání MZVŽ ČSR – Praha, s. 143

Retschnig, G., Williams, G.R., Mehmman, M.M., Yañez, O., deMiranda, J.R., Neumann, P. (2014) Sex specific differences in pathogen susceptibility in honey bees (*Apis mellifera*). *PLoS One*. 9:e85261

RETSCHNIG, Gina, Geoffrey WILLIAMS, Annette SCHNEEBERGER a Peter NEUMANN. Cold Ambient Temperature Promotes *Nosema spp.* Intensity in Honey Bees (*Apis mellifera*). *Insects* [online]. 2017, **8**(1), 20- [cit. 2018-04-16]. DOI: 10.3390/insects8010020.

SCHMID-HEMPEL, Paul. EVOLUTIONARY ECOLOGY OF INSECT IMMUNE DEFENSES. *Annual Review of Entomology* [online]. 2005, **50**(1), 529-551 [cit. 2018-04-16]. DOI: 10.1146/annurev.ento.50.071803.130420. ISSN 0066-4170

Sochlikov A. B., Ignat'jev P. S. 2008. Laserová interferenční mikroskopie při nose móze. Odborné včelařské překlady 2008. In: Pčelovodstvo. 8:25-26.

Traver, B.E., Fell, R.D. (2011) *Nosema ceranae* in drone honey bees (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* 107:234–236

VESELÝ V. A KOL. (2003): Včelařství, Praha, Nakladatelství Brázda, ISBN: 80-209-0320-8

VESELÝ, V. Včelařství. Vyd. 3. Praha: Brázda, 2013, 270 s., [16] s. obr. příl. ISBN 978-80-209-0399-0

World Organisation for Animal Health 2008. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (terrestrial manual), 6th ed., p. 410-414, World Organisation for Animal Health.

Zander E. 1909. Tierische parasiten als krankheitserreger bei der biene. *Münchener Bienenzeitung*. 31:196-204.