

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: B4131 Zemědělství

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie - Rostlinné

Katedra: Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Molekulární charakteristika mikrosporidií způsobujících
nosematózu u včel

Autor práce: Adéla Hanušová

Vedoucí práce: Ing. Irena Hoštičková Ph.D.

České Budějovice, 2020

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské 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, 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

.....

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat své vedoucí bakalářské práce Ing. Ireně Hoštičkové Ph.D. za cenné rady a odbornou pomoc. Svým blízkým jsem vděčná za ohleduplnost, podporu a potřebné rozptýlení.

Abstrakt

Mikrosporídie rodu *Nosema apis* a *Nosema ceranae* způsobují střevní onemocnění včel, které je hojně rozšířeno po světě včetně České republiky.

Cílem mé bakalářské práce bylo vyhodnotit výskyt *Nosema* na různých místech České republiky. Literatura obsahuje jen omezenou míru informací o nosematóze, kterou obě mikrosporídie způsobují.

Celkem bylo odebráno přes 135 vzorků z 27 stanovišť. Vzorky byly odebírány od listopadu 2019 do ledna 2020. Odběry probíhaly v okolí velkých měst, v jejich okolí, kde byla zemědělsky obdělávána krajina a na zemědělsky málo ovlivněných místech.

Po rozboru získaných vzorků pomocí PCR byla v drtivé většině přítomna mikrosporídie *Nosema ceranae* zatímco *Nosema apis* nebyla nikde.

Klíčová slova

Nosema apis, *Nosema ceranae*, nosematóza, včela medonosná

Abstract

Microsporidia of the genera *Nosema apis* and *Nosema ceranae* cause bee intestinal disease, which is widespread throughout the world, including the Czech Republic.

The aim of my bachelor thesis was to evaluate the occurrence of *Nosema* in various places in the Czech Republic. The literature contains only a limited amount of information about nosematosis caused by both microsporidia.

In total, over 135 samples were taken from 27 sites. Samples were taken from November 2019 to January 2020. Sampling took place in the vicinity of large cities, in their vicinity, where the landscape was cultivated and in places with little agricultural impact.

After analysis of the obtained samples by PCR, the vast majority of microsporidia of *Nosema ceranae* was present, while *Nosema apis* was nowhere.

Key words

Nosema apis, *Nosema ceranae*, nosematosis, honeybee

Obsah

Úvod.....	8
1 Teoretická část	9
1.1 Historie nosematózy	9
1.2 Biologie mikrosporidií rodu <i>Nosema</i>	9
1.3 Projevy nosematózy	10
1.4 Šíření nosematózy	10
1.5 Prevence vzniku nákazy	11
1.6 Léčba nosematózy	11
1.7 Porovnání <i>Nosema apis</i> x <i>Nosema ceranae</i>	13
1.8 Vliv nosematózy.....	14
1.8.1 Trubci	14
1.8.2 Dělnice	14
1.8.3 Matka.....	14
1.9 Včela medonosná (<i>Apis mellifera</i>)	15
1.9.1 Význam	15
1.9.2 Struktura těla	15
1.9.3 Zdravotní stav.....	17
1.9.4 Syndrom zhroucení včelstev	17
2 Metody použité k detekci	18
2.1 Izolace DNA pomocí CTAB	18
2.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	18
3 Cíl práce	20
4 Metodika	21
4.1 Odběr včel	21
4.2 Příprava vzorků	22
4.3 Izolace DNA.....	22

4.3.1	Izolace pomocí TriReagent	22
4.3.2	Izolace pomocí CTAB.....	23
4.4	Sekvence primerů pro PCR	23
4.5	PCR	24
4.6	Gelová elektroforéza	24
5	Výsledky	25
6	Diskuze.....	29
7	Závěr	31
8	Seznam použité literatury.....	32

Úvod

Význam včely medonosné spočívá v produkci medu, vosku a mateří kašičky, a především opylování rostlin. Značná část rostlin je odkázána hlavně na přenos pylu hmyzem. Proto je včela nepostradatelná v udržení rázu krajiny a přirozeného ekosystému. Včelí onemocnění způsobené infekcí vyvolává stresové faktory, které ovlivňují jejich chování, opylovací schopnosti a délku života.

Onemocnění nosematóza je způsobeno mikrosporídiemi rodu *Nosema*. Tato nemoc nemá včasné viditelné projevy, a přesto včelstvo oslabuje. Napadá střevní ústrojí včely. Hlavním nebezpečím nosematózy spočívá ve velmi rychlém šíření a masovém namnožení, které způsobuje zpomalení rozvoje včelstva, následně nižší výnosy medu, což může vést až k úplnému úhynu včelstva. Úpadek včelstev by vedl k značně ekonomickým, ale i ekologickým problémům, které by se negativně mohly projevit na zdravotním stavu lidské populace.

V předcházení nemoci je nejdůležitější prevence a správná dezinfekce. Bohužel i přes dodržování se nemoc může ve včelstvu objevit. U nosematózy lze aplikovat přípravek Fumagilin, který se aplikuje postříkem ve směsi s medocukrovým těstem nebo v roztoku při doplňování zimních zásob.

1 Teoretická část

1.1 Historie nosematózy

První zmínky o onemocnění nosematóza zaznamenal Dönhoffem v roce 1857 ve včelích výkalech. Zařazena byla mezi houby (Veselý, 2003). Zander roku 1909 označil za původce nosematózy mikrosporidii *Nosema apis*. Do roku 1996 byla považována za jediného původce nosematózy u Evropské včely medonosné (*Apis mellifera*). U včel asijských (*Apis cerana*) byl roku 1996 popsán nový parazitický patogen. Byl pojmenován *Nosema ceranae* (Fries, 1996) a jeho první výskyt v Evropě byl detekován ve Španělsku v roce 2004 (Higes, 2006).

1.2 Biologie mikrosporidií rodu *Nosema*

Mikrosporidie rodu *Nosema* jsou spongiformní houbové patogeny vyvíjející se jako intracelulární organismy, které infikují celou škálu hostitelů od hmyzu po savce. Tyto patogeny nemají mitochondrie, přebírají ATP z jejich okolí a velmi rychle se množí v hostitelské buňce. Tyto parazitické mikrosporidie mají na své hostitele velmi silný tlak (Martín-Hernández, 2012).

Vnitřními patogeny jsou mikrosporidie, které mají velmi širokou škálu hostitelů. Často jsou rezistentní vůči imunitní odpovědi svých hostitelů (Higes, 2006). Pro šíření a vývoj potřebuje *Nosema apis* správnou teplotu. Optimální teplotou je 30–35 °C, při změně optimální teploty se vývoj značně omezí. Dlouhodobým působením teplot nad 35 °C dochází k usmrcení spor (Malone, 2001).

Nosema tvoří dva typy spor. Primární a zralé spory 48 až 96 hodin po infekci (Higes, 2007). Rozdíl mezi primární a zralou sporou spočívá ve vývoji a morfologii, kde je silný obal spory a delší polární vlákno. Primární spora zůstává v žaludku, kde infikuje jiné buňky a zralá spora prochází přes konečník do stolice, kde slouží jako inokulum pro další včely.

U dospělých včel medonosných *Nosema* dokončuje svůj životní cyklus uvnitř střevního ústrojí což vede k narušení epiteliální vrstvy žaludku a střev, které následně vede k zažívacím potížím a zkracuje život s následným poklesem populace včelstev, především v zimních měsících (Higes, 2006).

1.3 Projevy nosematózy

Začátek nemoci je nenápadný. V zimě při plném propuknutí choroby je možné pozorovat neklidné sezení včelstva a zvýšený počet mrtvol na dně úlu. Čelní stěna úlu společně s plásty jsou silně pokáleny žlutavými výkaly s nepříznivým zápachem. Včelstvo, které je silně nosematické, padne ještě v zimním období. Propukne-li nákaza v jarním období (duben, květen), lze zde pozorovat kolísání počtu jedinců a postupné slábnutí až v úlu zůstane hrstka včel kolem královny. Nakažené včely mají nateklé zadečky. Při preparaci trávicího ústrojí je patrná bělavá barva žaludku a žaludeční stěna se snadno trhá. Zdravá včela má žltorůžový žaludek s pevnou stěnou (Veselý, 2003).

Při infekci sporymi *Nosema* připraví včelu o dostupné zdroje živin. Hostitel sám bude trpět velmi silným energetickým stresem. Paraziti nejenže vezmou živiny a energii z hostitelů, ale také snižují míru dostupnosti energie pro hostitele, aby vykonával životně důležité funkce (Martín-Hernández, 2012).

Nosema cizopasí v trávicím traktu včel, kde narušuje stěnu žaludku a následně stěnu střev, což vede k průjmu a následnému úhynu včel (Holubec, 2006).

1.4 Šíření nosematózy

Včely se do kontaktu se sporymi dostanou při čistění úlového prostředí nebo přímo při přijímání potravy. Hlavním nebezpečím je požívání výkalů nebo – li koprofágie. U včel se jedná o čistící instinkt. U nakažených včel jsou výkaly sladké, tudíž je koprofágie větším rizikem. Sladkost výkalů je zapříčiněna tím, že byly špatně strávené, díky narušené výstelce žaludku včel nakažených nosematózou (Rejnič, 1987).

Nemoc se může také přenést za pomoci zbloudilých včel z jiných úlů. Další možnou cestou, jak se k nosematóze dostat je přes trávicí trakt mezihostitele (čmelák, vos, mravenec, zavíječ), kde jsou spory bez ztráty životnosti, přičemž se parazit nerozmnožuje a tím se mezihostitel stává pasivním přenašečem (Kubišová, 1992).

Dále nákazu může šířit samotný včelař výměnou královny, napajedly nebo krmivem. Krmivo se musí vyrábět hlavně z medu, který byl odebrán pouze u zdravých včelstev. Nosematózu lze přenést při převěšování plástů z nemocných včelstev do zdravých. Riziko expozice sporám v úlu nabírá hodnot, když nepříznivé počasí zabraňuje infikovaným včelám vylétnout z úlu (Retschnig, 2017).

1.5 Prevence vzniku nákazy

Důležitým aspektem v boji proti nosematóze je chov mladých a vitálních matek, úlová hygiena a celkově zdravá a silná včelstva. Dalším faktorem je příprava na zimu, kdy je důležité zajištění nerušeného zimování (Hanousek, 1991). Pro zdraví včel je důležité pravidelné čištění a dezinfekce úlů, aby se minimalizovalo množství infekčních onemocnění. Nedávné studie prokázaly, že zvýšená údržba a celkově čištění úlu pomohlo snížit množství nemocí, které měli během zimy (Copley, 2012). Důležitou roli také hraje výměna plástů v prevenci proti nosematóze a to především na začátku jara kdy se odebírají kontaminované plásty, aby nově vylíhlé včely se nenakazily při čištění. Spory v kontaminovaných plástech udržují životaschopnost až po dobu dvou let (Kubišová, 1998).

Předejít nákaze lze tím, že se zamezí podávání pylu a pylové náhražky, které jsou obsažené v medocukrovém těstě. Staré včely, které jsou na okraji chumáče, jsou hlavním konzumentem tohoto těsta. Díky vysokému obsahu bílkovin v medocukrovém těstě vznikají vhodné podmínky pro intenzivní rozvoj nosematózy (Veselý, 2013). Při propuknutí nákazy je velmi nutné a důležité co nejrychleji zlikvidovat všechny spory, které se nachází na plástech, stěnách úlu a medových zásobách (Rejnič, 1987).

1.6 Léčba nosematózy

Onemocnění nelze vyléčit úplně. Včelstvo se nikdy nedokáže zbavit všech spor tohoto parazita. Dá se jen utlumit různými dezinfekcemi včelařského vybavení. Důležité je dezinfikovat prázdné úly, plásty, medomet a veškeré náčiní, které přichází do styku se včelami (Holubec, 2006).

Na některých místech Evropské unie je k léčbě nosematózy povolen přípravek Fumagilin. Jedná se o antibiotikum. Aplikuje se postřikem ve směsi s medocukrovým

těstem nebo v roztoku při doplňování zimních zásob. Tento krok se používá jen z důvodu potřeby účinné látky proti nosematóze. Může se objevit v medu (Veselý, 2013).

Dalším dezinfekčním přípravkem jsou výpary kyseliny octové v minimální koncentraci 60 %. Toto zničí většinu spor během několika hodin. Stejného účinku lze také dosáhnout se zvýšenou koncentrací do několika minut (BAILEY, 1955). Před dalším použitím úlu je nutné nechat všechno dezinfikované vybavení minimálně 14 dní vyvětrat.

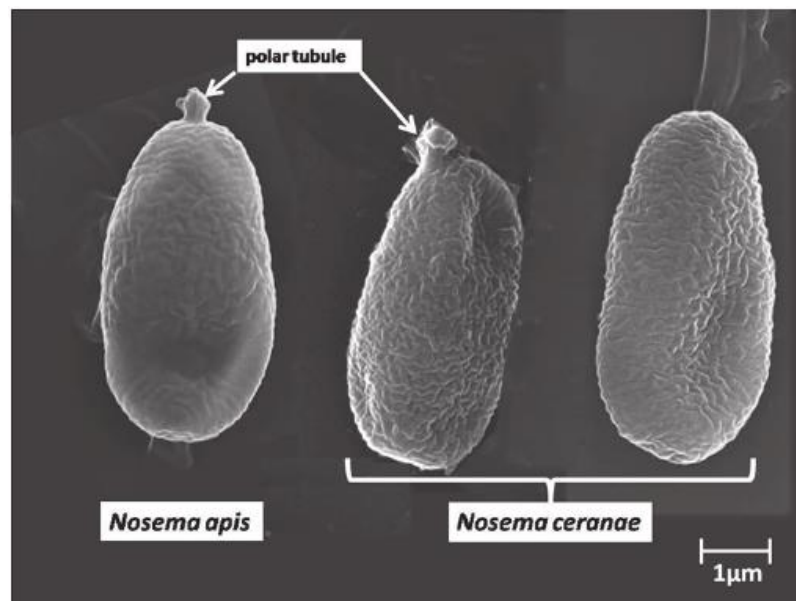
V experimentální fázi se nachází metoda, kde se včelám přidává do cukerného roztoku sloučenina Porfirin. Bez vedlejšího účinku zde došlo k snížení počtu mikrosporidií. Poruchám integrity membrány a buněčné stěny, kterou způsobují porfyriny, se spojuje s anti – mikrosporidní aktivitou nonmeralloporfyrinů. Ty zodpovídají za inhibici syntézy makromolekulárních sloučenin a za smrt mikrosporidií vystavených porfyrinů (Ptaszyńska, 2018).

V České republice nejsou povolené léčebné prostředky jako je Fumagilin ani jiné. Proto je zvládnutí nemoci závislé hlavně na způsobu ošetřování a dezinfikování včelstva včelařem. Těmito metodami se vzhledem k vysokému výskytu nosematózy ve všech včelstev se nedají ničít spory, ale spíše jen tlumit, aby se neprojevíly jejich klinické příznaky (Holubec, 2006).

1.7 Porovnání *Nosema apis* x *Nosema ceranae*

Mikrosporidie *Nosema ceranae* je ve srovnání s *Nosema apis* mnohem virulentnější nejen na úrovni jednotlivce, ale i na úrovni celé kolonie. Za zvýšenou virulenci je zodpovědné relativně krátké období, během kterého se vyvinul vztah parazit – hostitel. Proto *Nosema ceranae* oslabuje svého hostitele více. V průběhu onemocnění včelstvo spotřebuje o 30 % energie více na krmení, při snížené energetické dostupnosti jednotlivců ve spojení se změnami rychlosti metabolismu. Proto *Nosema* může silně ovlivnit energetickou bilanci včelstev, což má za následek zdraví celého včelstva (Martín-Hernández, 2012).

Patrný rozdíl je ve velikosti spor. *Nosema apis* má průměrnou velikost 5,8 x 3,3 μm a má oválný tvar, zatímco *Nosema ceranae* je menší o velikosti 4,6 x 2,5 μm a má cylindrický tvar (Kamler, 2011).



Obrázek 1 Porovnání spor *Nosema apis* a *Nosema ceranae* (Ptaszyńska, 2012)

1.8 Vliv nosematózy

1.8.1 Trubci

Při identifikaci dopadu infekčních onemocnění může být vliv trubců při formování přehlédnut. Trubčí plod a jeho dospělci jsou náchylní k přírodní infekci *N. ceranae* (Traver, 2011). Důkazy naznačují, že infekce *N. ceranae* má větší negativní dopad na tělesnou hmotnost a přežití trubce než u dělnic (Retschnig, 2014).

Mužský společenský hmyz udržuje vysoký reprodukční potenciál tím, že investuje do produkce kvalitního spermatu. S touto investicí dochází ke snížení imunitního systému (Baer, 2006).

1.8.2 Dělnice

Nosematóza má specifické účinky na včely. Starší včely po nakažení umírají velmi rychle zatímco mladé včely se snaží udržet příjem pylu a nektaru tak přebírají úlohu starších včel ve včelstvu. Nižší počet včel v úle nedokáže udržet optimální teplotu pro správné fungování včelstva. Jestliže došlo u včely k infekci během prvního týdne života, tak není schopna správně trávit potravu a tím pádem produkovat dostatek kašičky pro plod. Tímto dochází k přeskočení chovné fáze rovnou na fázi létavky (Mulholland, 2012).

1.8.3 Matka

Včelí královna se nakazí stejně jako ostatní při konzumaci potravy obsahující *Nosema*. Po nakažení dojde ke snížení počtu kladených vajíček a může vést až k přerušení kladení vajíček. Rozdíl byl zjištěn ve velikosti vaječnicků a některé byly i svraštělé. Při kladení zvládne matka denně naklást až 2000 vajíček, z tohoto množství nakaženou matkou nebyla značná část infikována (Amiri, 2017).

1.9 Včela medonosná (*Apis mellifera*)

Apis mellifera jinak řečeno včela medonosná patří do třídy hmyzu (*Insecta*) a do řádu blanokřídlých (*Hymenoptera*). Jedná se o jednoho z nejznámějších zástupců společenského hmyzu, kam mimo jiné patří i mravenci, čmeláci a vosy.

Včela se vyvíjí proměnou dokonalou, to znamená, že nejdříve je vajíčko, pak se líhne larva, která se zakuklí, a nakonec vznikne dospělec (Rejníč, 1987).

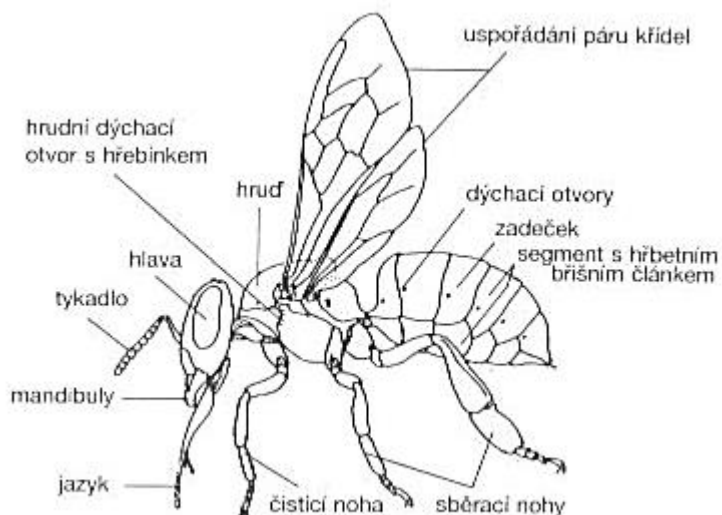
Původní rozšíření včely bylo hlavně okolí Středozevního moře. V dnešní době se vyskytuje po celém světě, protože je člověkem dobře ovladatelná. Počet druhů včel je něco kolem 30 tisíc a z toho byla polovina zaznamenána entomology a zařazena do sedmi čeledí. Více než deset druhů zahrnují včely medonosné z rodu *Apis* z čeledě *Apidae*. Jen některé jsou vhodné pro chov v úlech. V celosvětovém chovu jsou využívány především evropská plemena druhu *Apis mellifera*. V Asii je dosud také využíván druh *Apis cerana* (Bradbear, 2009; Thompson, 2014).

1.9.1 Význam

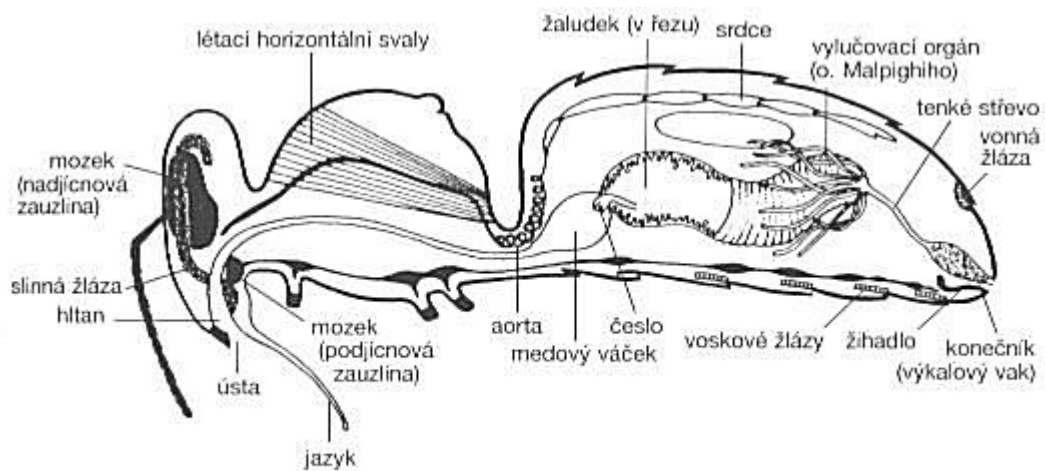
Díky chovu včel máme mnoho plnohodnotných a užitečných produktů (včelí med, vosk, propolis, včelí jed, mateří kašičku), které jsou svými vlastnostmi zastoupeny v lidském jídelníčku. Dále také v přírodní medicíně, kosmetice a dalších odvětvích. Nejdůležitější u včel je ovšem opylovací funkce. Při opylení se přenáší pyl cizosprašných rostlin. V ekosystému mají důležitou roli opylovači, kteří opylují planě rostoucí rostliny, na jejichž produkci jsou závislé další organismy. Tím zachovávají biodiverzitu zemědělské krajiny. Ve světě je celá řada opylovačů, nejvýznamnější je ovšem včela medonosná (Ravoet, 2013; Runckel, 2014).

1.9.2 Struktura těla

Tělo se skládá z tří hlavních částí (hlava, hrud' a zadeček). Celé je pokryto chitínovým krunýřem jinak řečeno vnitřní kostrou. Vnější kostru těla tvoří pokožka, která má hlavní funkci ochrany vnitřních orgánů. Skládá se ze tří vrstev (kutikula, epidermis a podstavná blána). Vnější kostra je také složena z chitinu, ale ještě z glycidů, vosků a živice (Veselý, 2013).



Obrázek 2 Vnější řez tělem včely medonosné (Veselý, 2013)



Nejdůležitější orgány v těle včely (podélný řez).

Obrázek 3 Vnitřní řez tělem včely medonosné (Veselý, 2013)

1.9.3 Zdravotní stav

Včela medonosná je člověkem chovaná už několik tisíc let a oproti jiným hospodářským zvířatům není ovlivněna natolik, aby byla považována za domestikovaného živočicha. V minulých dobách se předpokládalo, že včelstva od včelařů by byla schopna přežívat dobře i bez jeho zásahů ve volné přírodě. V posledním desetiletí včelaři zaznamenali globálně zvýšené úhyny včelstev, které jsou spojovány s výskytem parazitů a patogenů, kterým včelstva většinou nejsou schopna sama čelit (Bradbear, 2009).

1.9.4 Syndrom zhroucení včelstev

Včelstva jsou vystavena velkému množství parazitů a patogenů, které mohou za určité ztráty. Někteří včelaři se potýkají s neobvyklým jevem, který se nazývá „syndrom zhroucení včelstev“ (anglicky Colony Collapse Disorder). Jev byl poprvé pozorován v roce 2006 v USA. Projevuje se náhlou ztrátou dospělé populace dělnic, aniž by zůstala v okolí úlu nebo uvnitř uhynulá těla, se zavíčkovaným plodem a zásobami. K značným negativním dopadům, které mohou takové ztráty včelstev přinášet, je tato problematika zájmem včelařů, veřejnosti i vědců (Ratnieks, 2010).

Syndrom zhroucení včelstev má různá vysvětlení. Mohou to být nemoci a škůdci včel, pesticidy používané v zemědělství, ekonomické a enviromentální faktory nebo klimatické podmínky. Podle některých vědců mohou mít vliv také kontroverzní geneticky modifikované plodiny. Příčiny tohoto syndromu stále nejsou zcela pochopeny, patrné ale je, že zásadním problémem pro včelstvo (i pro včelaře) je působení patogenů a škůdců (Ratnieks, 2010).

Mezi potenciální původce syndromu zhroucení včelstev je často řazena i mikrosporidie *N. ceranae*, která parazituje u asijské včely východní. V současné době převládá ve včelstvech více než *N. apis*. Žádná konkrétní kompetitivní výhoda ovšem zjištěna nebyla. Přestože druh *N. ceranae* byl objeven na včelstvu s příznaky tohoto syndromu, tak molekulární studie ukázaly, že tato mikrosporidie se vyskytuje i v prosperujících včelstvech již po desetiletí, dlouho předtím, než byl syndrom zhroucení včelstev vůbec objeven (Tritschler, 2017).

2 Metody použité k detekci

2.1 Izolace DNA pomocí CTAB

Tato metoda slouží k extrakci většího množství poměrně čisté DNA pro účely standardizace metod a pro účely PCR analýzy a sekvenování. Přidáním polyvinylpyrrolididu odstraňuje kontaminanty a umožňuje získání čisté a kvalitnější DNA.

Cetyltrimethylamoniumbromid (CTAB) metoda je založena na schopnosti vytvářet komplex s nukleovými kyselinami, který je při vysoké koncentraci solí rozpustný, ale při snížené koncentraci solí vytváří sraženinu (Murray, 1980). CTAB zároveň působí jako detergenční činidlo, které uvolňuje DNA z komplexu membrán a proteinů. Na základě rozdílné rozpustnosti CTAB v porovnání s DNA je lze oddělit a získat dostatečně čistou DNA.

2.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Metoda slouží k selektivní amplifikaci vybraných oblastí molekuly DNA v *in vitro* podmínkách. K PCR metodě se používá DNA vyizolovaná z různých zdrojů, jejíž amplifikaci se dají získat miliony stejných kopií vybrané oblasti DNA.

Je to metoda rychlého namnožení určitého úseku DNA, ve kterém probíhá replikace nukleových kyselin. Pokud známe okrajové sekvence daného úseku, můžeme k amplifikaci vybrat libovolný úsek z libovolné molekuly DNA (rostlinné nebo živočišné tkáně, ale i komplementární DNA) (Brown, 2007; Ishmael a Stellato, 2008). Reakce proběhne jedině při hybridizaci dvou krátkých oligonukleotidů s molekulou DNA. Zde jsou přítomny 4 základní nukleotidy (adenin, cytosin, guanin a thymin), enzym DNA polymeráza, která prodlužuje namnožený úsek (Ishmael a Stellato, 2008), Mg^{2+} (sloužící ke zpevnění vazby DNA – polymeráza) a voda.

Základní kroky v PCR:

(1) Počáteční denaturace

- Rozrušení vodíkových můstků spojující k sobě vlákna DNA

(2) Denaturace

- dsDNA je denaturovaná na jednotlivá vlákna

(3) Annealing

- V tomto kroku dochází k nasedání krátkých oligonukleotidů neboli primerů na specifická místa ssDNA dle komplementarity bází
- Teplota a doba nasedání primerů závisí na délce a složení jednotlivých primerů

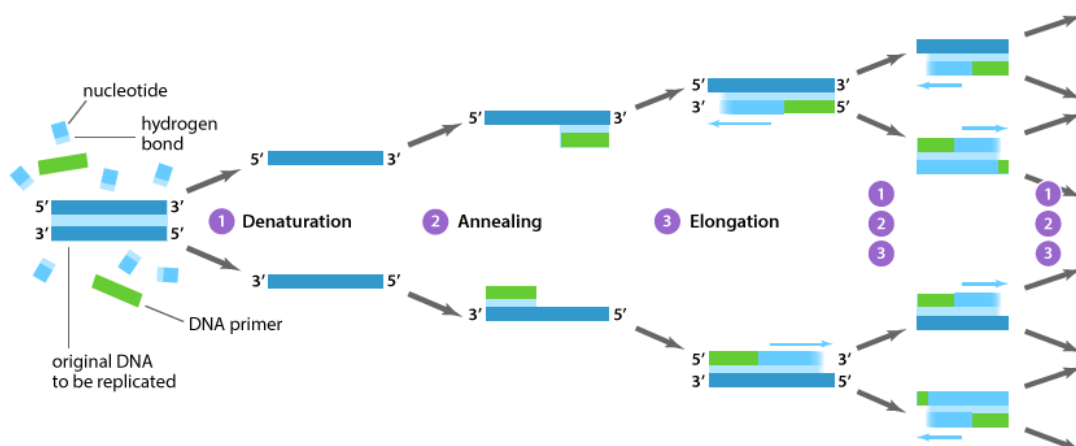
(4) Elongace

- Dochází k aktivaci enzymu *Taq* DNA polymerázy, které se připojuje k primerům, které jsou jejich startovací místa a od nichž dochází k syntéze nového vlákna komplementárního k templátovým molekulám DNA
- Syntéza probíhá ve směru 5' → 3'

(5) Závěrečná elongace

- Dochází ke komplementaci všech amplifikovaných úseků DNA

Kroky 2, 3 a 4 se cyklicky opakují 25 – 40x. Což má za následek geometrické navýšení amplikonů po každém cyklu. Lze to také vyjádřit jako 2^n , kde n je počet cyklů (Ishmael, 2008).



Obrázek 4 Průběh PCR reakce

(https://old.abmgood.com/marketing/knowledge_base/polymerase_chain_reaction_introduction.php)

3 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce bylo odlišit na molekulární úrovni druhy *Nosema apis* a *Nosema ceranae*, které způsobují nosematózu u včel. Z jednotlivých stanovišť byly odebrány vzorky včel, ze kterých se izolovaly jednotlivé druhy mikrosporidií a za pomoci molekulárních technik byly rozlišeny na druhové úrovni. Výsledky byly zpracovány příslušnými bioinformativními metodami, společně s literární rešerší na téma nosematózy včel.

4 Metodika

4.1 Odběr včel

Odebrány byly dlouhověké zimní včely v období na přelomu měsíce října a listopadu ze zásobního plástu z okraje zimního sezení včelstva. Usmrcení včel bylo provedeno přímo na stanovišti zamražením na suchém ledu. Všechny vzorky byly uchovávány v -80 °C. Izolace DNA ze včel byla provedena pro každý úl zvlášť. Pro PCR vyhodnocení byl použit směsný vzorek z celého stanoviště.

Vzorky byly odebrány z různých stanovišť z České republiky. Z oblastí pro srovnání výskytu včelích onemocnění ve velkých městech, v zemědělsky obdělávané krajině poblíž těchto měst a v zemědělsky málo ovlivněných míst jako je Šumava.

Tabulka 1 Seznam vzorků

Číslo vzorku	Stanoviště	Číslo vzorku	Stanoviště
1.	Drslavice 1	15.	Maňovice 1
2.	Boršov n. Vltavou 1	16.	Nekvas 1
3.	Brno 1	17.	Nekvas 2
4.	Brno 2	18.	Nekvas 3
5.	Brno 3	19.	Ostrava 1
6.	Brno 4	20.	Ostrava 2
7.	Bruntál 1	21.	Poluška 1
8.	Buk 1	22.	Poluška 2
9.	Bystřice 1	23.	Praha 1
10.	Bystřice 2	24.	Praha 2
11.	Havířov 1	25.	Praha 3
12.	Háj ve Slezsku 1	26.	Praha 4
13.	Kvilda 1	27.	Uhlířské Janovice 1
14.	Malonty 1		

4.2 Příprava vzorků

Jednotlivé odběry včel byly rozdrčeny v předem vyklávanou keramickou třecí misce za pomoci kapalného dusíku, aby jednotlivé vzorky byly stále zmražené. Poté následovala samotná izolace DNA.

4.3 Izolace DNA

Byly testovány dvě metody izolace DNA – izolace DNA pomocí TriReagent a izolace DNA pomocí CTAB.

4.3.1 Izolace pomocí TriReagent

Vzorek byl homogenizován v roztoku TriReagent 120 mg (1 včela) s 500 μ l pufru. Po následné centrifugaci 5 000 rpm/ 1 minutu při 4 °C byl supernatant přemístěn do nové mikrozkušavky. Do které bylo přidáno opět 500 μ l TriReagentu a několikrát bylo promícháno. Dále bylo přidáno 200 μ l chloroformu, řádně promícháno po dobu minimálně 15 sekund a inkubováno při pokojové teplotě 3 minuty. Následnou centrifugací 14 000 rpm/ 15 minut při 4 °C došlo k rozdělení suspenze na tři fáze. Horní bezbarvá vodní fáze byla odebrána do nové mikrozkušavky a použita k izolaci RNA, zbytek obsahu staré mikrozkušavky byl použit pro izolaci DNA.

Z mikrozkušavky pro izolaci DNA byla odebrána zbylá vodná fáze, která zbyla po odebrání pro izolaci RNA. Ke vzorku bylo přidáno 300 μ l 100 % etanolu, řádně promícháno a inkubováno 3 minuty při pokojové teplotě. Následovala centrifugace 3 000 rpm/ 5 minut při 4 °C. Vzniklý supernatant byl odstraněn a do mikrozkušavky bylo přidáno 1 ml 1 molárního citrátu trisodného, který byl v 10 % etanolu. Inkubováno 30 minut při pokojové teplotě za občasného promíchání. Následovala centrifugace 3 000 rpm/ 5 minut při 4 °C. Supernatant byl odstraněn a vzniklý pelet DNA byl rozpuštěn v 1,5 ml 75 % etanolu. Následovala inkubace 15 minut při pokojové teplotě. Po finální centrifugaci 3 000rpm/ 5 minut při 4 °C byl pelet vysušen a následně rozpuštěn ve 100 μ l TE pufru a skladován při -20 °C.

4.3.2 Izolace pomocí CTAB

Extrakční pufr byl přehřátý na 65 °C (495 µl extrakčního CTAB pufru a 5 µl beta-mercaptoethanolu na jeden vzorek). Do mikrokumavek byl dán vzorek nadrcených včel (2 kopistkové lžičky) a přehřátý pufr. Vzorek byl 2–3krát lehce promíchán. Inkubováno po dobu 5 minut při 65 °C. Poté bylo přidáno 500 µl chloroformu – IAA a 5 minut protřepáváno. Centrifugováno 14 000rpm/ 5 minut při pokojové teplotě. Vzniklá vodná fáze byla přepipetována do nových mikrokumavek (cca 300 µl) a přimícháno 1/3 izopropanolu, párkrát lehce promícháno a vloženo do mrazáku (-20 °C), kde bylo inkubováno po dobu 30 minut. Po centrifugaci 14 000rpm/ 5 minut při 4 °C došlo k oddělení jednotlivých složek a supernatant byl odstraněn. Byl přidán 1 ml ledového 70 % etanolu a následovala centrifugace 14 000rpm/ 5 minut při 4 °C. Supernatant byl odstraněn a vzniklý pelet usušen při 37 °C. Následný usušený pelet byl rozpuštěn v 150 µl TE pufru a výsledný vzorek byl uložen v mrazáku při -20 °C.

4.4 Sekvence primerů pro PCR

Oligonukleotidové primery byly převzaty z vědeckého článku (Ryba, 2012). Pro *N. apis* primery ohraničují úsek DNA dlouhý 218 bp a pro *N. ceranae* úsek 321 bp (Tabulka 2).

Tabulka 2 Sekvence primerů (Ryba, 2012)

Název	Typ primeru	Sekvence	Délka fragmentu
<i>Nosema apis</i>	Forward	GGGGGCATGTCTTTGACGTA CTATGTA	218 bp
	Reverse	GGGGGGCGTTTAAAATGTGAAACA ACTATG	
<i>Nosema ceranae</i>	Forward	CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTAA	321 bp
	Reverse	CCCGGTCATTCTCAAACAAAAA ACCG	

4.5 PCR

Amplifikace probíhala v konvenčním termocykleru T3000 (Biometra, Německo).

Tabulka 3 Složení PCR reakce

Složky	Objem (μ l)
Master mix	5
Forward primer	0.25
Reverse primer	0.25
Extrahovaná DNA	1
PCR H ₂ O (Top – bio s.r.o., ČR)	3,5

PCR probíhala v objemu 10 μ l. Složky PCR byly uchovávány v lednici poté následně promíchány a smíchány v řádném poměru (Tabulka 3). Průběh PCR reakce je v Tabulce 4.

Tabulka 4 Průběh PCR reakce

Krok	Teplota ($^{\circ}$ C)	Čas
Denaturace a aktivace	95	1 min
Denaturace	94	30 s
Annealing	72	1 min
Elongace	72	1 min
Opakování kroku (2–4)		35x
Závěrečná elongace	72	8 min
Chlazení	4	∞

4.6 Gelová elektroforéza

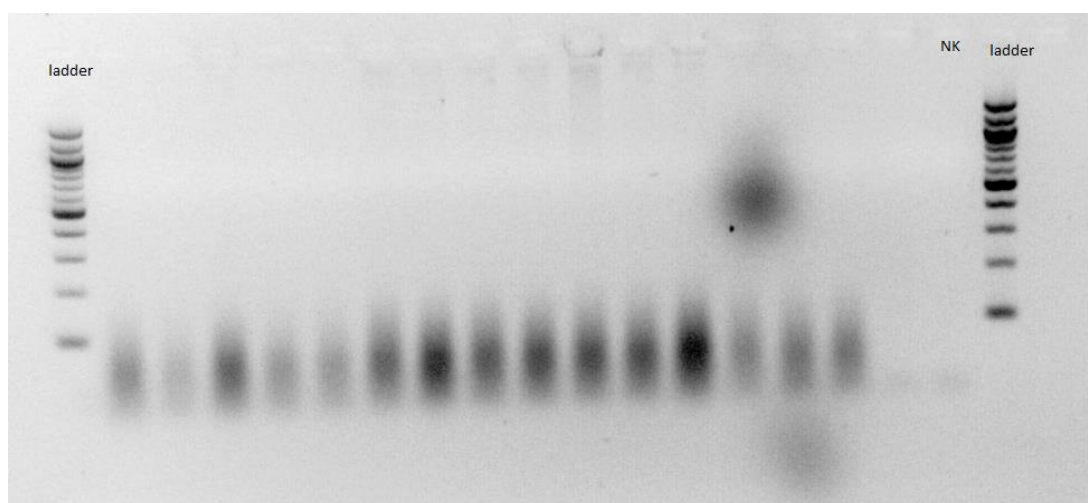
Produkty PCR byly přeneseny do 2 % agarosového gelu v 1x TBE pufru (Trizma base, kyselina boritá, 0,5 M EDTA). DNA fragmenty byly obarveny s pomocí ethidium bromidu a společně se 100bp DNA ladderem, velikostním markerem, separovány v gelu při 120 V přibližně 40 minut. Vyhodnocení proběhlo za pomoci UV transluminátoru s UV světlem o vlnové délce 312 nm, snímacího kamerového systému a vyhodnocovacího softwaru.

5 Výsledky

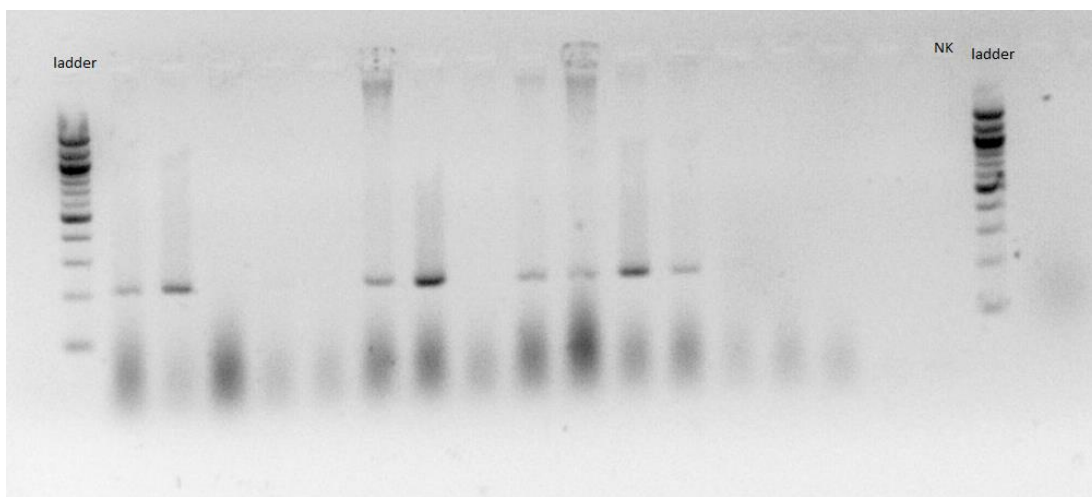
Pro účely této práce jsem analyzovala 135 vzorků, které byly odebrány z 27 stanovišť. Stanoviště se nacházela ve velkých městech České republiky, v zemědělsky obdělávané krajině poblíž velkých měst, a nakonec v zemědělsky málo ovlivněných místech jako je například Šumava.

U všech analyzovaných vzorků byla provedena PCR z důvodu amplifikace produktu o očekávané délce 218 bp (*N. apis*) a 321 bp (*N. ceranae*) a posléze elektroforéza k vizualizaci amplikonů.

Na následujících dvou elektroforeogramech je vidět ladder, 16 vzorků (Brno 1, Brno 2, Brno 3, Bruntál 1, Drslavice 1, Havířov 1, Praha 1, Nekvas 1, Uhlířské Janovice 1, Praha 2, Praha 3, Praha 4, Ostrava 1, Nekvas 2, Brno 4, Nekvas 3) a negativní kontrola (NK). Obrázek 5 se vztahuje na kontrolu *N. apis* a Obrázek 6 na *N. ceranae*.

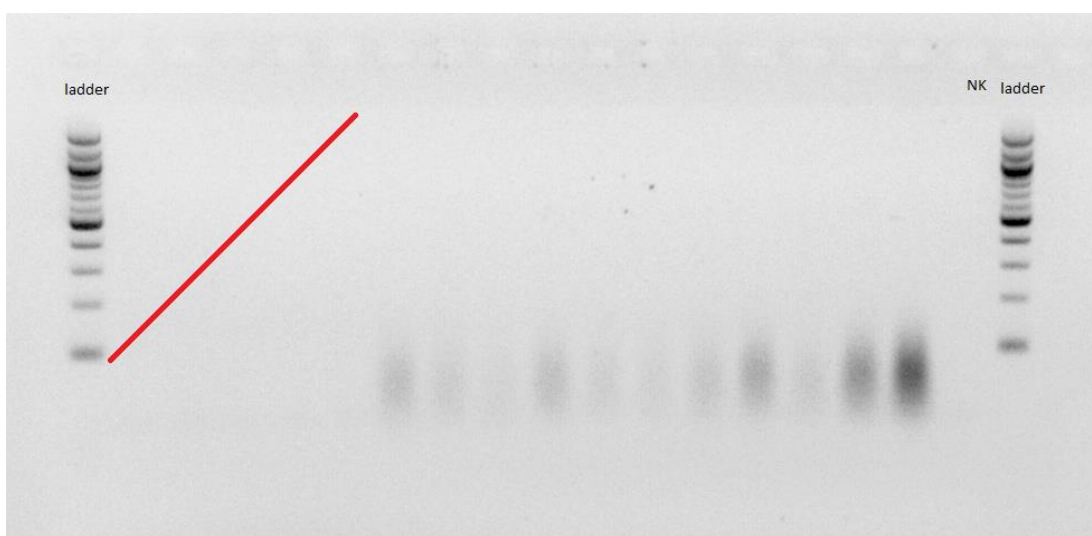


Obrázek 5 Elektroforeogram vzorků analyzovaných na přítomnost *N. apis*; Pořadí vzorků: 1. velikostní marker; 2. Brno 1; 3. Brno 2; 4. Brno 3; 5. Bruntál 1; 6. Drslavice 1; 7. Havířov 1; 8. Praha 1; 9. Nekvas 1; 10. Uhlířské Janovice 1; 11. Praha 2; 12. Praha 3; 13. Praha 4; 14. Ostrava 1; 15. Nekvas 2; 16. Brno 4; 17. Nekvas 3; 18. NK – negativní kontrola; 19. velikostní marker

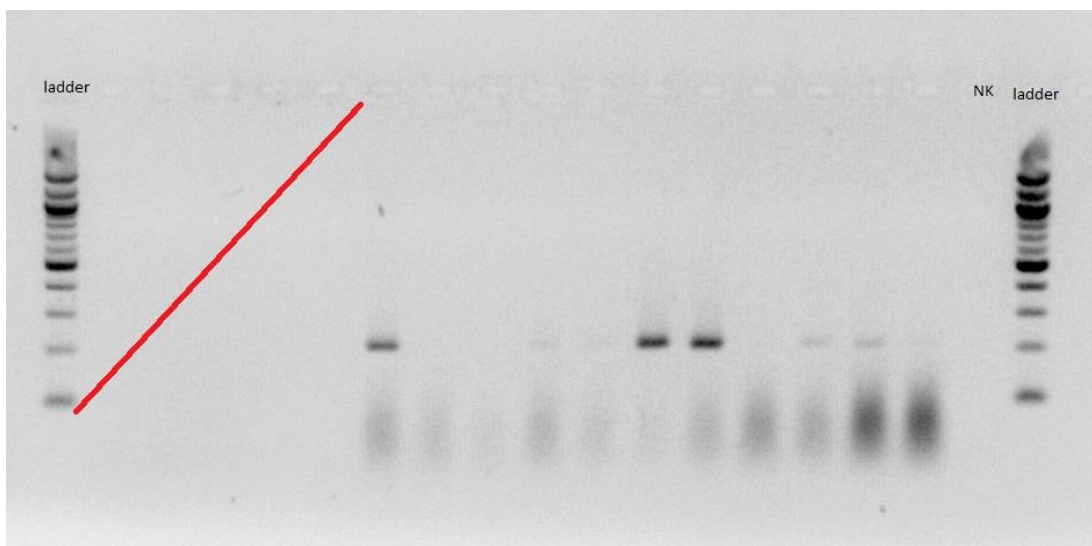


Obrázek 6 Elektroforeogram vzorků analyzovaných na přítomnost *N. cerenae*; Pořadí vzorků: 1. velikostní marker; 2. Brno 1; 3. Brno 2; 4. Brno 3; 5. Bruntál 1; 6. Drslavice 1; 7. Havířov 1; 8. Praha 1; 9. Nekvas 1; 10. Uhlířské Janovice 1; 11. Praha 2; 12. Praha 3; 13. Praha 4; 14. Ostrava 1; 15. Nekvas 2; 16. Brno 4; 17. Nekvas 3; 18. NK – negativní kontrola; 19. velikostní marker

Na následujících dvou elektroforeogramech je také vidět ladder, 11 vzorků (Bystřice 1, Kvilda 1, Poluška 1, Maňovice 1, Boršov nad Vltavou 1, Poluška 2, Bystřice 2, Háj ve Slezsku 1, Ostrava 2, Malonty 1, Buk 1) a negativní kontrola (NK). Obrázek 7 se vztahuje na kontrolu *N. apis* a Obrázek 8 na *N. cerenae*.



Obrázek 7 Elektroforeogram vzorků analyzovaných na přítomnost *N. apis*; Pořadí vzorků: 1. velikostní marker; 7. Bystřice 1; 8. Kvilda 1; 9. Poluška 1; 10. Maňovice 1; 11. Boršov nad Vltavou 1; 12. Poluška 2; 13. Bystřice 2; 14. Háj ve Slezsku 1; 15. Ostrava 2; 16. Malonty 1; 17. Buk 1; 18. NK – negativní kontrola; 19. velikostní marker



Obrázek 8 Elektroforeogram vzorků analyzovaných na přítomnost *N. ceranae*; Pořadí vzorků: 1. velikostní marker; 7. Bystřice 1; 8. Kvilda 1; 9. Poluška 1; 10. Maňovice 1; 11. Boršov nad Vltavou 1; 12. Poluška 2; 13. Bystřice 2; 14. Háj ve Slezsku 1; 15. Ostrava 2; 16. Malonty 1; 17. Buk 1; 18. NK – negativní kontrola; 19. velikostní marker

Z celkového množství testovaných stanovišť byla ve většině pozitivních vzorků prokázána přítomnost druhu *N. ceranae* naopak *N. apis* se nevyskytovala na žádném testovaném stanovišti. Souhrn výsledků detekce *N. apis* a *N. ceranae* u jednotlivých vzorků je v Tabulce 5.

Tabulka 5 Přehled testovaných vzorků a výsledků PCR detekce *N. apis* a *N. ceranae*; „+“ – pozitivní výsledek; „-“ – negativní výsledek

Vzorek	<i>N. apis</i>	<i>N. ceranae</i>
Drslavice 1	-	-
Boršov n. Vltavou 1	-	+
Brno 1	-	+
Brno 2	-	+
Brno 3	-	-
Brno 4	-	-
Bruntál 1	-	-
Buk 1	-	+
Bystřice 1	-	+
Bystřice 2	-	+
Havířov 1	-	+
Háj ve Slezsku 1	-	-
Kvilda 1	-	-
Malonty 1	-	+
Maňovice 1	-	+
Nekvas 1	-	-
Nekvas 2	-	-
Nekvas 3	-	-
Ostrava 1	-	-
Ostrava 2	-	+
Poluška 1	-	-
Poluška 2	-	+
Praha 1	-	+
Praha 2	-	+
Praha 3	-	+
Praha 4	-	+
Uhlířské Janovice 1	-	+

6 Diskuze

Mikrosporidie rodu *Nosema* je původce onemocnění nosematóza, které napadá střevní ústrojí včely medonosné (Higes, 2006). V poslední době dochází k častým úhynům včelstev, a proto je důležité zaměřit se na vyšetřování jejich zdravotnímu stavu a případné zlepšení preventivních opatření. V této práci jsem se proto zaměřila na detekci mikrosporidií rodu *Nosema* ve včelstvech na území ČR.

Prvním krokem byl výběr a případná optimalizace metody izolace DNA ze včel. Zkusila jsem dvě metody izolace DNA – pomocí TriReagent a CTAB. Izolace pomocí roztoku TriReagent® je založena na použití směsi guanidin thiokyanatanu a fenolu v monofázovém roztoku, který se používá k izolaci DNA, RNA a bílkovin z jakýchkoliv biologických materiálů (TRI Reagent® (Guanidine Thiocyanate & Phenol) Protocol, 2016). Při použití tohoto extrakčního roztoku by podle výrobce mělo být možné postupně z jednoho vzorku vyextrahovat DNA, RNA i proteiny. Vzhledem k tomu, že pro analýzu celkového zdravotního stavu včel je potřeba izolovat DNA i RNA (např. pro analýzu RNA virů), jevila se tato metoda jako vhodná. Pomocí této metody se mi bohužel nepodařilo vyizolovat dostatečné množství DNA ze vzorků, proto jsem zkoušela metodu izolace pomocí roztoku CTAB. Metoda CTAB je založena na polyvinylpyrrolidonu, který odstraňuje kontaminanty a umožňuje získání čisté a kvalitnější DNA jinak řečeno má schopnost vytvářet komplex s nukleovými kyselinami, který je při vysoké koncentraci solí rozpustný, ale při snížené koncentraci solí vytváří sraženinu (Murray, 1980). Tato metoda už proběhla úspěšně. Pro izolaci celého souboru vzorků jsem proto vybrala metodu izolace pomocí roztoku CTAB.

Vlastní PCR analýzy ukázaly, že původce nosematózy se vyskytuje velmi často, což odpovídá tvrzení (Lampeitl, 1996). Uvádí se, že v roce 2011 se na území České republiky vyskytovala nosematóza z 4010 vyšetřovaných vzorků u 2167 vzorků. Z toho 678 vzorků bylo pozitivních na *N. apis*, 1134 na *N. ceranae* a u 356 se vyskytovala smíšená infekce *N. apis* a *N. ceranae* (Kamler, 2011). Výsledky z roku 2011 se neshodují s výsledky, které byly získány v rámci mé bakalářské práce v poměru zastoupených mikrosporidií. Při mé analýze bylo zjištěno, že v testovaných vzorkách se vyskytovala převážně *N. ceranae*, zatímco *N. apis* se nevyskytovala nikde. Od roku 2011 se nákazová situace velice změnila přičemž *N. ceranae* úplně vytlačila *N. apis* z její ekologické niky.

Epidemiologické důkazy naznačují, že *N. ceranae* může globálně nahrazovat *N. apis*. Smíšená infekce oběma druhy se ve včelstvech vyskytuje málo. To má za příčinu, že *N. ceranae* se stala dominantní ve většině zeměpisných oblastí (Milbrath, 2015). To potvrzují i výsledky mých analýz, jelikož se v žádném včelstvu na vyšetřovaných stanovištích nevyskytovaly obě mikrosporidie.

Nákaza *N. ceranae* se vyznačuje sníženým počtem včel ve včelstvu. To je zapříčiněno zkrácením délky včelího života a omezením schopnosti přijímat z přijaté potravy živiny. Může to vést až k úplnému kolapsu včelstva (Cox-Foster, 2007). *N. 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 *N. ceranae* (Ratnieks, 2010). Vzhledem k tomu, že moje šetření v rámci této práce probíhalo pouze jednu sezonu, nemohu posoudit vliv spor *N. ceranae* na CCD. Tato problematika však bude předmětem mého dalšího, dlouhodobějšího výzkumu.

7 Závěr

V poslední době dochází během zimy k nárůstu počtu kolonií včel, které uhynuly v důsledku infekce způsobené mikrosporídiemi r. *Nosema*. Vzhledem k rozdílné bionomii a infekčnosti jednotlivých druhů rodu *Nosema* je důležité znát a identifikovat přesně jednotlivé původce úhynu včelstva tak, aby bylo možné efektivně vypracovat plán ochrany před infekcí. Molekulární techniky detekce jsou jedním ze způsobů, jak spolehlivě identifikovat různé organizmy.

V rámci této bakalářské práce jsem testovala přítomnost mikrosporídií *N. apis* a *N. ceranae*. Ze včelstev z celkem 27 stanovišť bylo vyizolováno 135 vzorků DNA pomocí roztoku CTAB. Z následné PCR analýzy plyne, že ve všech pozitivních vzorcích se vyskytuje nepůvodní mikrosporídie *Nosema ceranae*, zatímco *Nosema apis* se nepodařilo detekovat v žádném z testovaných včelstev.

8 Seznam použité literatury

AMIRI, Esmaeil, Micheline STRAND, Olav RUEPPELL a David TARPY, 2017. Queen Quality and the Impact of Honey Bee Diseases on Queen Health: Potential for Interactions between Two Major Threats to Colony Health. *Insects*. vol. 8. **8**(2), 1-18. DOI: 10.3390/insects8020048. ISSN 2075-4450.

BAER, Boris, Sophie A. O. ARMITAGE a Jacobus J. BOOMSMA, 2006. Sperm storage induces an immunity cost in ants. *Nature*. vol. 441. **441**(7095), 872-875. DOI: 10.1038/nature04698. ISSN 0028-0836.

BAILEY, L., 1955. THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF NOSEMA DISEASE OF THE HONEY-BEE. *Annals of Applied Biology*. vol. 43. **43**(3), 379-389. DOI: 10.1111/j.1744-7348.1955.tb02488.x. ISSN 0003-4746.

BRADBPEAR, Nicola, 2009. *Bees and their role in forest livelihoods*. Rome: Food and agriculture organization of the united nations. ISBN 978-92-5-106181-7.

BRADBPEAR, Nicola, 2009. *Bees and their role in forest livelihoods: A guide to the services provided by bees and the sustainable harvesting, processing and marketing of their products*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. ISBN 978-92-5-106276-0.

COPLEY, Tanya R., Pierre GIOVENAZZO a Suha H. JABAJI, 2012. Detection of *Nosema apis* and *N. ceranae* in honeybee bottom scraps and frass in naturally infected hives. *Apidologie*. vol. 43. **43**(6), 753-760. DOI: 10.1007/s13592-012-0147-8. ISSN 0044-8435.

COX-FOSTER, D. L., S. CONLAN, E. C. HOLMES et al., 2007. A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony Collapse Disorder. *Science*. vol. 318. **318**(5848), 283-287. DOI: 10.1126/science.1146498. ISSN 0036-8075.

FRIES, Ingemar, Feng FENG, Alexandre DA SILVA, Susan SLEMENDA a Norman PIENIAZEK, 1996. *Nosema ceranae* n.sp. (Microspora, Nosematidae), Morphological and Molecular Characterization of a Microsporidian Parasite of the Asian Honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology*. 1996. **1996**(32), 356-365.

HANOUSEK, Libor, 1991. *Začínáme včelařit*. Praha: Brázda. ISBN 80-209-0194-9.

HIGES, Mariano, Pilar GARCÍA-PALENCIA, Raquel MARTÍN-HERNÁNDEZ a Aránzazu MEANA, 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of Invertebrate Pathology*. vol. 94. **94**(3), 211-217. DOI: 10.1016/j.jip.2006.11.001. ISSN 00222011.

HIGES, Mariano, Raquel MARTÍN a Aránzazu MEANA, 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe: Lecture Notes from the 2nd ERCOFTAC Summerschool held in Stockholm, 10-16 June, 1998. *Journal of Invertebrate Pathology*. vol. 92. **92**(2), 93-95. DOI: 10.1016/j.jip.2006.02.005. ISSN 00222011.

HOLUBEC, Miloslav, 2006. Nosematóza (nosemoza) a způsoby jejího tlumení. *Včelařské novinky* [online]. [cit. 2020-03-17].

ISHMAEL, Faoud T. a Cristiana STELLATO, 2008. *Principles and applications of polymerase chain reaction: basic science for the practicing physician*. vol. 101. **101**(4), 437-443. DOI: 10.1016/S1081-1206(10)60323-7. ISSN 10811206.

KAMLER, František, 2011. Rozšíření, patogeneze a návrh opatření v chovech včel ohrožených mikrosporidií *Nosema ceranae*. *Eagri* [online]. Libčice nad Vltavou: Výzkumný ústav včelařský, s.r.o., Dol [cit. 2020-03-17].

KUBIŠOVÁ, Sylvie a Hana HÁSLBACHOVÁ, 1992. *Včelařství*. 1.vyd. Brno: VŠZ. ISBN 80-7157-024-9.

KUBIŠOVÁ, Sylvie a Hana HÁSLBACHOVÁ, 1998. *Včelařství*. 2. nezm. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. ISBN 80-715-7294-2.

LAMPEITL, Franz, 1996. *Chováme včely: úvod do včelaření*. [4. rozš. a aktualiz. vyd.]. Ostrava: Blesk. ISBN 80-856-0696-8.

MALONE, Louise, Heather GATEHOUSE a Emma TREGIDGA, 2001. Effects of Time, Temperature, and Honey on *Nosema apis* (Microsporidia: Nosematidae), a Parasite of the Honeybee, *Apis mellifera* (Hymenoptera). *Journal of Invertebrate Pathology*. vol. 77. **77**(4), 258-268. DOI: 10.1006/jipa.2001.5028. ISSN 00222011.

MARTÍN-HERNÁNDEZ, Raquel, Cristina BOTÍAS, Encarna BAILÓN, Amparo MARTÍNEZ-SALVADOR, Lourdes PRIETO, Aránzazu MEANA a Mariano HIGES, 2012. Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema*

ceranae replacing *Nosema apis*?. *Environmental Microbiology*. vol. 14. **14**(8), 2127-2138. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2011.02645.x. ISSN 14622912.

MILBRATH, Meghan O., Toan VAN TRAN, Wei-Fong HUANG, Leellen F. SOLTER, David R. TARPY, Frank LAWRENCE a Zachary Y. HUANG, 2015. Comparative virulence and competition between *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*. vol. 125. **125**, 9-15. DOI: 10.1016/j.jip.2014.12.006. ISSN 00222011.

MULHOLLAND, Grace, Brenna TRAVER, Nels JOHNSON a Richard FELL, 2012. Individual Variability of *Nosema ceranae* Infections in *Apis mellifera* Colonies. *Insects*. vol. 3. **3**(4), 1143-1155. DOI: 10.3390/insects3041143. ISSN 2075-4450.

MURRAY, M.G. a W.F. THOMPSON, 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*. vol. 8. **8**(19), 4321-4326. DOI: 10.1093/nar/8.19.4321. ISSN 0305-1048.

PTASZYŃSKA, Aneta A., Mariusz TRYTEK, Grzegorz BORSUK, Katarzyna BUCZEK, Katarzyna RYBICKA-JASIŃSKA a Dorota GRYKO, 2018. Porphyrins inactivate *Nosema* spp. microsporidia. *Scientific Reports*. vol. 8. **8**(1). DOI: 10.1038/s41598-018-23678-8. ISSN 2045-2322.

PTASZYŃSKA, Aneta, Borsuk GRZEGORZ, Wiesław MUIENKO a Krzysztof OLSZEWSKI, 2012. Monitoring of nosemosis in the Lublin region and preliminary morphometric studies of *Nosema* spp. spores. *Praca oryginalna*. 68. **68**(10), 622-625.

RATNIEKS, Francis L. W. a Norman L. CARRECK, 2010. Clarity on Honey Bee Collapse?. *Science*. vol. 327. **327**(5962), 152-153. DOI: 10.1126/science.1185563. ISSN 0036-8075.

RAVOET, Jorgen, Jafar MAHARRAMOV, Ivan MEEUS, Lina DE SMET, Tom WENSELEERS, Guy SMAGGHE, Dirk C. DE GRAAF a Yi LI, 2013. Comprehensive Bee Pathogen Screening in Belgium Reveals *Crithidia mellificae* as a New Contributory Factor to Winter Mortality. *PLoS ONE*. vol. 8. **8**(8). DOI: 10.1371/journal.pone.0072443. ISSN 1932-6203.

REJNIČ, Jozef, Oldřich HARAGSIM a Jozef REKOŠ, 1987. *Včelařství*. První. Praha: Institut výchovy a vzdělávání MZVŽ ČSR.

RETSCHNIG, Gina, Geoffrey R. WILLIAMS, Marion M. MEHMANN, Orlando YAÑEZ, Joachim R. DE MIRANDA, Peter NEUMANN a Wulfila GRONENBERG, 2014. Sex-Specific Differences in Pathogen Susceptibility in Honey Bees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE*. vol. 9. **9**(1). DOI: 10.1371/journal.pone.0085261. ISSN 1932-6203.

RETSCHNIG, Gina, Geoffrey WILLIAMS, Annette SCHNEEBERGER a Peter NEUMANN, 2017. Cold Ambient Temperature Promotes *Nosema* spp. Intensity in Honey Bees (*Apis mellifera*). *Insects*. vol. 8. **8**(1). DOI: 10.3390/insects8010020. ISSN 2075-4450.

RUNCKEL, Charles, Joseph DERISI, Michelle L. FLENNIKEN a Mauricio Martins RODRIGUES, 2014. A Draft Genome of the Honey Bee Trypanosomatid Parasite *Crithidia mellificae*. *PLoS ONE*. vol. 9. **9**(4). DOI: 10.1371/journal.pone.0095057. ISSN 1932-6203.

RYBA, Stepan, Dalibor TITERA, Iva SCHODELBAUEROVA-TRAXMANDLOVA a Pavel KINDLMANN, 2012. Prevalence of honeybee viruses in the Czech Republic and coinfections with other honeybee disease. *Biologia*. vol. 67. **67**(3), 590-595. DOI: 10.2478/s11756-012-0038-5. ISSN 1336-9563.

THOMPSON, Catherine E., Jacobus C. BIESMEIJER, Theodore R. ALLNUTT, Stéphane PIETRAVALLE, Giles E. BUDGE a Guy SMAGGHE, 2014. Parasite Pressures on Feral Honey Bees (*Apis mellifera* sp.). *PLoS ONE*. vol. 9. **9**(8). DOI: 10.1371/journal.pone.0105164. ISSN 1932-6203.

TRAVER, Brenna E. a Richard D. FELL, 2011. *Nosema ceranae* in drone honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*. vol. 107. **107**(3), 234-236. DOI: 10.1016/j.jip.2011.05.016. ISSN 00222011.

TRI Reagent® (Guanidine Thiocyanate & Phenol) Protocol, 2016. *Merck* [online]. Germany: Merck [cit. 2020-06-18].

TRITSCHLER, Manuel, Gina RETSCHNIG, Orlando YAÑEZ, Geoffrey R. WILLIAMS a Peter NEUMANN, 2017. Host sharing by the honey bee parasites *Lotmaria passim* and *Nosema ceranae*. *Ecology and Evolution*. vol. 7. **7**(6), 1850-1857. DOI: 10.1002/ece3.2796. ISSN 20457758.

VESELÝ, Vladimír, 2003. *Včelařství*. Druhé. Praha: Brázda. ISBN 80-209-0320-8.

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