

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

katedra parazitologie

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Kamila Pařízková

Trypanosomatida včel a jejich interakce s polutanty
Bee trypanosomatids and their interactions with pollutants

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: doc. RNDr. Jan Votýpka, Ph.D.
Konzultant: RNDr. Mgr. Tomáš Erban, Ph.D.

Praha 2023

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 27.04.2023

Podpis:

Poděkování:

Největší díky patří především vedoucímu mé diplomové práce doc. RNDr. Janu Votýpkovi, Ph.D. za pomoc, rady, čas a vstřícný přístup nejen při psaní práce, ale po celou dobu mého studia. Velké díky patří též RNDr. Mgr. Tomáši Erbanovi, Ph.D. za pomoc s odbornou stránkou práce a s realizací experimentální části, za což děkuji i celému týmu z VÚRV. Dále děkuji za poskytnutí vzorků Mgr. Jakubu Strakovi, Ph.D. a MVDr. Martinu Kamlerovi z VÚVč, kterému děkuji i za asistenci při mých prvotních experimentech. Za podporu děkuji také celé své rodině a přátelům.

Abstrakt

Včely medonosné (*Apis mellifera*) jsou celosvětově vysoce ceněné díky svým produktům, ale také jako opylovači hospodářských plodin a planě rostoucích rostlin. Vzhledem k těsné blízkosti včel a jejich sociálnímu uspořádání se jak uvnitř včelstva, tak i mezi včelstvy šíří velké množství patogenů způsobující následně oslabení včelstva. V posledních desetiletích byly zaznamenány vysoké meziroční ztráty včel, které nemají doposud jednoznačné vysvětlení. Příčina náhlých ztrát včel (označováno jako syndrom zhroucení včelstev) bude pravděpodobně ve vzájemném působení více faktorů najednou. Velký podíl je přisuzován virovým onemocněním i některým parazitickým organismům; nejistou úlohu pak hrají paraziti ze skupiny Trypanosomatida. Zástupce této skupiny, *Crithidia bombi*, je považován za problematického obyvatele trávicího traktu čmeláků, kterým může působit vážné komplikace. Blízce příbuzné druhy, *C. mellifica* a *Lotmaria passim*, jsou pak parazity zejména včel medonosných a někdy bývají spojováni s jejich vyšší úmrtností. Do popředí při hodnocení ztrát včel se dostávají také pesticidy, jejichž účinky mohou být velmi toxické a většina pesticidů byla proto v EU zakázána. Tato diplomová práce je zaměřena na zkoumání prevalence, rozvoje infekce a hostitelské specifity včelích jednohostitelských trypanosomatid a jejich interakce s pesticidy. Celkem bylo na přítomnost trypanosomatid testováno 26 druhů blanokřídlého hmyzu. Infekce *C. bombi* byla zjištěna pouze u čmeláků (*Bombus terrestris*; čmelák zemní) s prevalencí 32 %. *L. passim* byla detekována pouze u včel medonosných s prevalencí 43 %, avšak s velmi vysokým zatížením parazita dosahující až 9,5 mil buněk na včelu. Různá morfologická stádia tohoto parazita byla pozorována především v rektu s občasným výskytem v ileu. Pomocí experimentálních infekcí včel a čmeláků byla zkoumána hostitelská specifita *L. passim* a *C. bombi*, rovněž byla sledována vzájemná interakce parazitů ve směsných infekcích. Zkřížené infekce proběhly úspěšně u obou druhů opylovačů, a navíc byl pozorován synergický vztah mezi parazity při směsných infekcích včel i čmeláků, kdy infekce jedním parazitem zvyšovala úspěšnost nákazy parazitem druhým. Studium působení pesticidů (imidakloprid) u včel experimentálně infikovaných *L. passim* přineslo překvapivé poznatky, kdy u včel exponovaných pesticidům došlo ke zvýšení abundance parazitů, a to patrně v důsledku změny exprese proteinu transferrin 1.

Klíčová slova: včela medonosná, trypanosomatida, *Lotmaria*, *Crithidia*, čmelák zemní, pesticidy, imidakloprid, prevalence, interakce parazitů

Abstract

Honeybees (*Apis mellifera*) are highly valued worldwide for their products, but also as pollinators of crops and wild plants. Due to the close proximity of bees in the beehive and their foraging habits, a large number of pathogens that weaken the bee colonies are spread both inside and between colonies. In recent decades, high annual losses of bees have been recorded, which still do not have a clear explanation. The sudden loss of bees (known as colony collapse disorder) is likely due to the interaction of multiple factors at once. A large part of the problem is attributed to viral diseases and some parasitic organisms; parasites of the Trypanosomatida group play an uncertain role. A member of this group, *Crithidia bombi*, is considered a problematic inhabitant of the digestive tract of bumblebees, which can cause serious complications. Close relatives, *C. mellificae* and *Lotmaria passim*, parasites of honeybees, are sometimes associated with their higher mortality. Pesticides, whose effects can be very toxic, have also come to the forefront in assessing bee losses, and most pesticides have therefore been banned in the EU. This thesis examines the prevalence, infection development, and host specificity of monoxenous trypanosomatids in bees and their pesticide interactions. A total of 26 species of Hymenoptera were tested for trypanosomatids. *C. bombi* infection was detected only in bumblebees (*Bombus terrestris*) with a prevalence of 32 %. *L. passim* was detected only in honeybees with a prevalence of 43 %, but a very high parasite load of up to 9.5 million cells per bee. Different morphological stages of this parasite were observed mainly in the rectum, with occasional occurrence in the ileum. Host specificity of *L. passim* and *C. bombi* was examined through experimental infections of bees and bumblebees, and parasite interactions in mixed infections were also monitored. Cross infections were successfully carried out in both pollinator species. A synergistic relationship between parasites was observed in mixed infections of both bees and bumblebees, where infection with one parasite increased the success rate of infection with the other parasite. The study of the effects of pesticides (imidacloprid) on honeybees experimentally infected with *L. passim* yielded surprising results. Exposure to pesticides increased parasite abundance, possibly due to a change in the expression of the transferrin 1 protein.

Keywords: honeybee, trypanosomatids, *Lotmaria*, *Crithidia*, bumblebees, pesticides, imidacloprid, prevalence, parasite interactions

Obsah

1	Úvod a cíle práce.....	9
2	Literární přehled.....	10
2.1	Monoxenní Trypanosomatida u hmyzu.....	10
2.1.1	Rozšíření a diverzita.....	10
2.1.2	Taxonomie a fylogeneze	10
2.1.3	Morfologická stádia.....	11
2.1.4	Hostitelé a hostitelská specifita	12
2.1.5	Způsoby přenosu	13
2.2	Monoxenní Trypanosomatida u včel (Apoidea).....	14
2.2.1	Včely jako hostitelé.....	14
2.2.2	Paraziti včely medonosné, <i>Lotmaria passim</i> a <i>Crithidia mellificae</i>	18
2.2.3	Parazit čmeláka zemního, <i>Crithidia bombi</i>	23
2.3	Vliv patogenů, polutantů a dalších faktorů na včely (a jejich trypanosomatida)	26
2.3.1	Parazitární a virové interakce v souvislosti se syndromem zhroucení včel	26
2.3.2	Vliv potravy na kondici včel/čmeláků a jejich trypanosomatida	27
2.3.3	Vliv pesticidů na zdraví včel/čmeláků a interakce parazitů s pesticidy.....	28
3	Materiál a metodika	30
3.1	Detekce trypanosomatid u volně žijících včel a čmeláků.....	30
3.1.1	Sběr a původ vzorků.....	30
3.1.2	Zpracování vzorků a extrakce DNA.....	31
3.1.3	Nested PCR	32
3.1.4	Vizualizace PCR produktů pomocí agarózového gelu.....	33
3.1.5	Příprava na sekvenaci a následná analýza.....	33
3.2	Experimentální infekce včel trypanosomatidy	34
3.2.1	Test přítomnosti trypanosomatid u líhnoucích se včel.....	34
3.2.2	Kultivace trypanosomatid	35
3.2.3	Klonování	35
3.3	Experimentální infekce <i>Lotmaria passim</i> u včely medonosné.....	36

3.3.1	Příprava pokusných nádob	36
3.3.2	Časové schéma experimentu	37
3.3.3	Odběr a uchování včel.....	37
3.3.4	Příprava potravy a infekce.....	37
3.3.5	Odběr a zpracování vzorků	38
3.4	Experimentální infekce <i>L. passim</i> , <i>C. bombi</i> a cross-infekce u včely medonosné a čmeláka zemního	39
3.4.1	Příprava pokusných nádob	39
3.4.2	Časové schéma experimentu	39
3.4.3	Odběr a uchování včel a čmeláků	40
3.4.4	Příprava potravy a infekce.....	41
3.4.5	Odběr a zpracování vzorků	42
3.4.6	qPCR	42
3.5	Experimentální infekce <i>L. passim</i> a imidaklopridem u dělnic včely medonosné a <i>L. passim</i> u trubců včely medonosné	44
3.5.1	Příprava pokusných nádob	44
3.5.2	Časové schéma experimentu	46
3.5.3	Odběr a uchování včel.....	46
3.5.4	Příprava potravy a infekce.....	47
3.5.5	Odběr a zpracování vzorků	48
3.5.6	qPCR	48
3.5.7	Příprava na proteomickou analýzu	49
4	Výsledky	50
4.1	Detekce parazitů u volně žijících a úlových včel pomocí nested PCR.....	50
4.2	Experimenty.....	52
4.2.1	Test přítomnosti trypanosomatid u líhnoucích se včel (nested PCR, qPCR).....	52
4.2.2	Mikroskopická diagnostika experimentálních infekcí dělnic včely medonosné	53
4.2.3	Kvantitativní PCR analýza <i>L. passim</i> a <i>C. bombi</i> u experimentálně infikovaných včel a čmeláků.....	56
4.2.4	Kvantitativní PCR analýza <i>L. passim</i> u včely medonosné v interakci s imidaklopridem	62

4.2.5	<i>Kvantitativní PCR analýza L. passim u trubců včely medonosné</i>	67
5	Diskuse.....	68
5.1	Detekce trypanosomatid u sociálních a volně žijících včel.....	68
5.2	Experimentální infekce s <i>L. passim</i> a <i>C. bombi</i>	70
6	Závěr	78
7	Seznam použité literatury.....	79

Seznam použitých zkratek

CCD – syndrom zhroucení včel

DNA – deoxyribonukleová kyselina

kDNA – kinetoplast deoxyribonukleová kyselina

RNA – ribonukleová kyselina

rRNA – ribozomální ribonukleová kyselina

SSU – malá ribozomální podjednotka

Cytb – cytochrom b

PCR – polymerázová řetězová reakce

qPCR – kvantitativní polymerázová řetězová reakce

VÚRV – Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i.

VÚVč – Výzkumný ústav včelařský, s.r.o.

PřF UK – Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy

LOT – *Lotmaria passim*

CRI – *Crithidia bombi*

IMI – imidaklopid

DPI – dny po infekci

DWV – virus deformovaných křídel

BQCV – virus černání matečníků

LSV – virus jezera Sinai

1 Úvod a cíle práce

Včela medonosná (*Apis mellifera*) má pro lidskou společnost obrovský ekonomický a kulturní význam a její role opylovače hospodářských plodin je nepostradatelná pro dostatečnou produkci potravin po celém světě. Obhospodařovaná včelstva stále častěji čelí řadě problémů. Jedním z nich je jejich potenciální náchylnost k široké škále patogenů patřících hned do několika skupin – členovci, houby, prvoci, bakterie a viry.

Ač jsou prvoci spíše opomíjenou skupinou, současný zvýšený zájem o jejich parazitické zástupce je spojen s častým hynutím včelstev, mj. v důsledku tzv. syndromu zhroucení včelstev vyznačující se zmizením (úhynu) většiny dělnic a v úle tak zůstává opuštěná matka s plodem. Na ztrátách včelstev se podílí více faktorů, a to jak samostatně, tak se vzájemným spolupůsobením. Hlavní příčina je často spojována s parazitickým roztočem *Varroa destructor* a jím přenášeným virem deformovaných křídel (DWW). Nepochybně velký podíl na vymírání včel mají virová a bakteriální onemocnění, nicméně hojně zmiňována mezi potenciálními původci obtíží včelstev je i mikrosporidie *Nosema ceranae*. V neposlední řadě je velká část výzkumů věnována parazitickým trypanosomatidům, kteří byli donedávna vnímáni jako neškodní komenzálové. Se vzrůstajícím zájmem vědců o tuto skupinu parazitů se odhaluje i řada negativních účinků, ať už na zdraví včel či celých kolonií. Zejména parazitický prvek *Crithidia bombi* může způsobovat vážné zdravotní komplikace u čmeláků, kdy infikované matky nejsou tak úspěšné při zakládání nových kolonií, které jsou menší a mají zpomalený růst. Zdánlivě neškodlivý včelí parazit *Crithidia mellificae* byl nedávno označen za organismus ovlivňující zvýšenou úmrtnost včel. S rozvojem molekulárně-genetických metod byla přehodnocena taxonomie druhů trypanosomatid a byl odlišen nový druh a rod *Lotmaria passim*. Později bylo zjištěno, že dřívější nálezy *C. mellificae* často náleží právě nově popsanému druhu *L. passim*, který je celosvětově mnohem běžnější.

Velký problém pro včely představují také pesticidy, se kterými se včely dostávají do styku při opylování chemicky ošetřených plodin a rostlin. Zvýšené meziroční ztráty včel jsou tak připisovány i variabilitě v odolnosti včelstev vůči různým pesticidům. Především díky intenzifikaci zemědělství a pokroku ve vývoji chemických látek se od minulého století velmi zvýšila spotřeba pesticidů. Pozornost je věnována hlavně neonikotinoidům (imidaklopid, thiamethoxam, klothianidin, thiaklopid), které jsou pro hmyz obzvláště nebezpečné a včely exponované těmito pesticidy slábnou.

Eusociální včely jsou seskupeny ve včelím společenství o velmi vysokých hustotách, které podporují přenos pesticidů získaných z chemicky ošetřených rostlin, ale také umožňují snazší předávání parazitů uvnitř včelstva, ze kterého se mohou infekce šířit i na další hostitelé – nejen další včelstva, ale i na čmeláky či volně žijící včely.

Cílem této diplomové práce je shrnout dosavadní informace a přinést nové poznatky o nejdiskutovanějších včelích parazitech ze skupiny Trypanosomatida se zaměřením na jejich prevalenci, hostitelskou specifitu, rozvoj infekce, ale také na interakce mezi blízce příbuznými druhy parazitů či interakce parazitů s pesticidem.

2 Literární přehled

2.1 Monoxenní Trypanosomatida u hmyzu

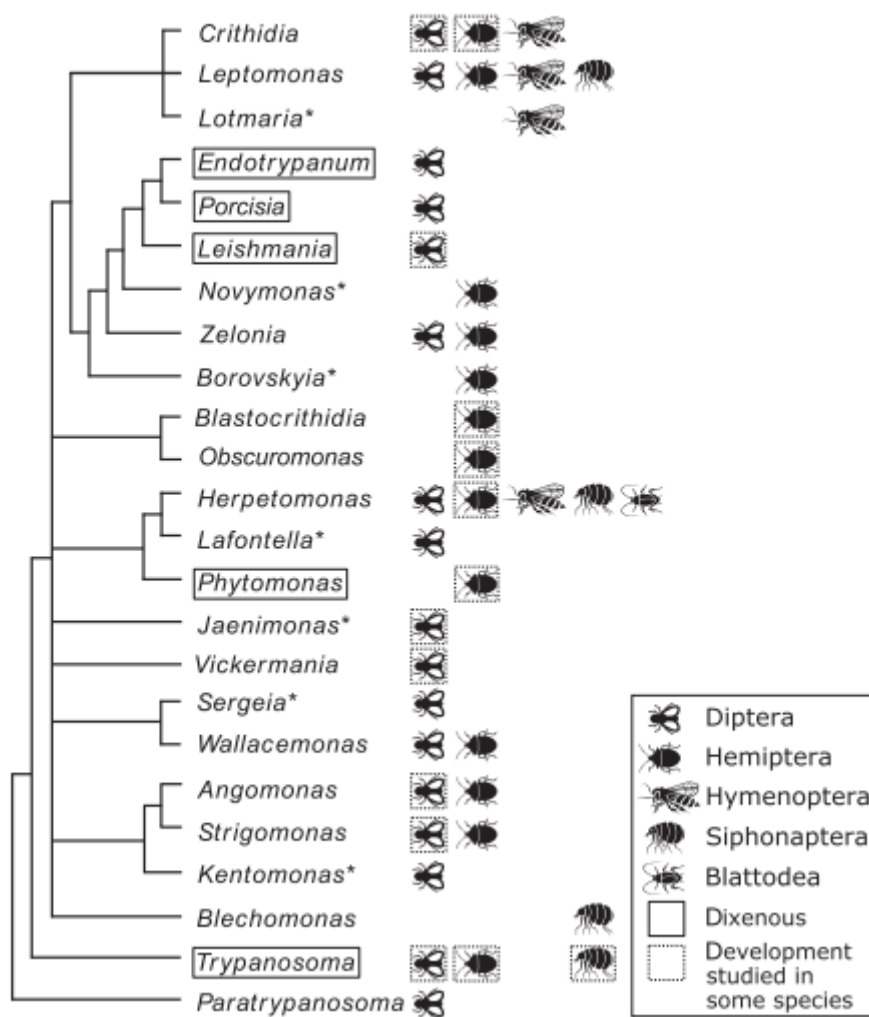
2.1.1 Rozšíření a diverzita

Monoxenní trypanosomatida jsou jednobuněčné parazitické organismy s kosmopolitním výskytem zahrnující i extrémní biotopy (pouště či pohoří o nadmořské výšce 3500 m). Hranice rozšíření sahají až k severnímu pólu, kde byly objeveny organismy patřící k evolučně mladé postglaciální fauně (Podlipaev, 2001). Výskyt byl zaznamenán téměř na všech kontinentech, avšak v mnoha rozsáhlých oblastech, jako je například jihovýchodní Asie, Austrálie a Japonsko, je výskyt monoxenních hmyzích trypanosomatid velmi málo prozkoumán, a tak není zatím známo o jejich rozšíření na těchto územích (Podlipaev, 2001). První zmínky o jednohostitelských trypanosomatidech u hmyzu byly zdokumentovány v roce 1851 (Burnett, 1851) a později v roce 1880 byly popsány jako rody *Leptomonas* a *Herpetomonas* (Kent, 1880). V letech 1902 – 1904 se Léger zabýval popisem trypanosomatid u dvoukřídlého hmyzu a navrhnul rodové jméno *Crithidia* (Léger & Dubosq, 1902; Podlipaev, 2000).

Počet druhů jednohostitelských hmyzích trypanosomatid byl koncem 90. let odhadován na relativně nízký, konkrétně s počtem přibližně 350 druhů. Příčinou tak nízkého počtu může být jejich dlouholeté opomíjení, kdy byly považovány za nedůležité organismy a nebyly proto předmětem zájmu výzkumů (Wallace et al., 1983). Ačkoliv je hmyz nejpočetnější třída živočichů, očekávala by se i nejvyšší rozmanitost těchto parazitů. Nicméně ne všichni hmyzí hostitelé jsou vhodní pro kolonizaci (Podlipaev, 2001) a v porovnání s počtem popsaných hmyzích trypanosomatid je počet vhodných hostitelů velmi nízký. Řád dvoukřídlí je stále zcela neprozkoumaný a každý nově objevený druh by mohl představovat dalšího potencionálního hostitele pro jednoho či více parazitů a přispět tak k větší rozmanitosti trypanosomatid (Maslov et al., 2013).

2.1.2 Taxonomie a fylogeneze

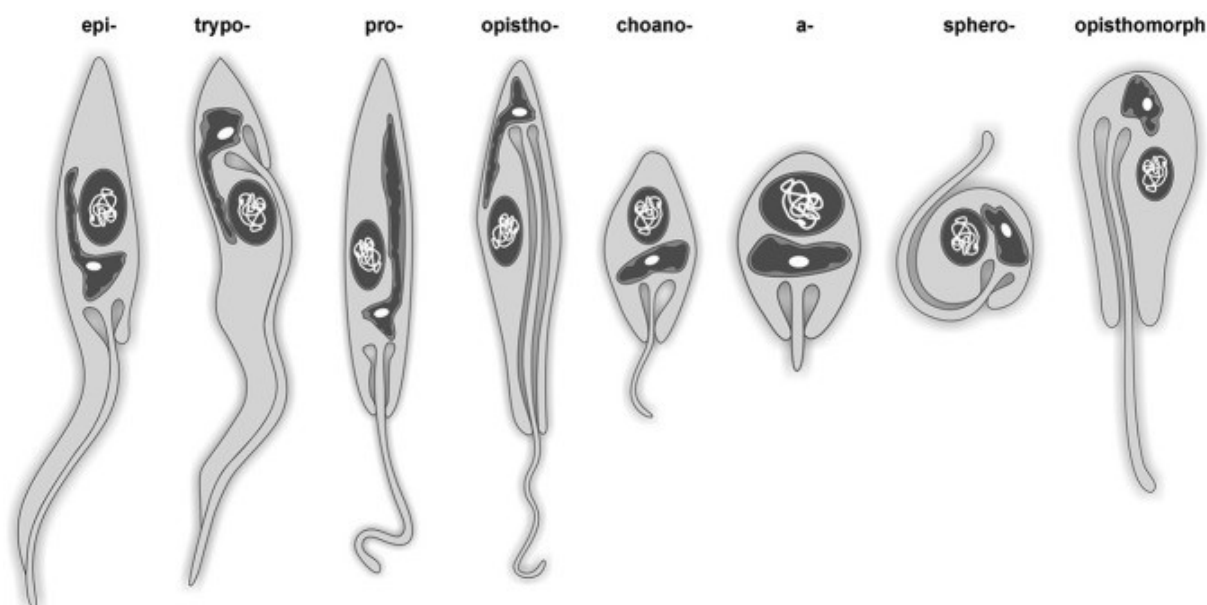
Na základě morfologických odlišností buněk pozorovaných ve světelném mikroskopu byly původně vytvořeny čtyři rody monoxenních hmyzích bičíkovců: *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Herpetomonas* a *Leptomonas* a byly zařazeny do čeledi Trypanosomatidae (Maslov et al., 2001). Klíčové znaky pro původní definici rodů spočívaly v rozdílnosti tvaru, velikosti a šířky buňky a pozici kinetoplastu vůči jádru (Hoare & Wallace, 1966; Wallace, 1966). Díky pozdějším popisům ultrastruktury byly tyto organismy definovány jako endoparazitické buňky s jedním bičíkem příbuzné volně žijícím endo/ektoparazitům se 2 bičíky – bodonida, s nimiž náleží do taxonu Kinetoplastea obsahující jedinou mitochondrii s kinetoplastem (Lukeš et al., 2002) a do vyššího taxonu Euglenozoa na základě přítomnosti paraxonemální tyče (Simpson, 1997). Pozdější fylogenetické analýzy byly zpočátku založené na genech malé ribozomální podjednotky RNA (SSU rRNA) (Hollar et al., 1998; Lukeš et al., 1997; Maslov et al., 1996; Merzlyak et al., 2001) a později i na dalších genech např. pro glykosomální glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázu (Hamilton et al., 2004; Yurchenko et al., 2000), kinetoplastid-specific spliced leader (SL) RNA (Fernandes et al., 1994; Murthy et al., 1992; Ramos et al., 1996) či internal transcribed spacer (ITS) (Dollet et al., 2012; M. M. G. Teixeira et al., 2011), neboť konzervativní malá ribozomální podjednotka představuje problém při rozlišení mezi blízkými (pod)druhy (Croan et al., 1997; Noyes et al., 2002; Yurchenko et al., 2006). V současné době je rozeznáváno na 19 rodů jednohostitelských trypanosomatid (Frolov et al., 2021; Kostygov et al., 2021).



Obrázek 1: Schéma fylogenetického stromu Trypanosomatidae na základě sekvencí 18S rRNA. U každého rodu je uveden hostitel vysvětlený v tabulce vpravo; dvouhostitelské rody jsou zvýrazněny rámečkem; rody s jedním popsáním druhem jsou označeny hvězdičkou (Frolov et al., 2021).

2.1.3 Morfologická stádia

Obvyklý pozorovaný tvar buňky je protáhlý a štíhlý se zaobleným či zašpičatělým koncem. Počet bičíků i jádra je konstantní, které jsou přítomny pouze v jedné kopii. Bičík může ale v určitých fázích životního cyklu chybět – například *Blastocrithidia* a *Obscuromonas* (Lukeš et al., 2021) a nebyl pozorován i u některých zástupců – *Herpetomonas roubaudi*, *Leptomonas arctocorixae* či *L. craggi* (Wallace, 1966). Jádro je nejčastěji umístěno centrálně v 1/3 délky. Celková délka u některých bičíkoveců může dosáhnout až 38,5 μm (Wallace, 1966). Morfologie trypanosomatid je definována tvarem buňky a vzájemnou polohou kinetoplastu s bičíkem. Díky těmto rozdílným pozorovaným znakům bylo vytvořeno celkem 8 morfotypů, které jsou zobrazeny na obrázku 2 (Maslov et al., 2013).



Obrázek 2: Schematické znázornění hlavních morfologických forem přítomných u trypanosomatid. Zastoupeny jsou hlavní typické pozorované morfotypy; pomlčka zastupuje slovo „mastigot“ (d'Avila-Levy et al., 2015).

Epimastigot má kinetoplast umístěn mezi jádrem a anteriorním koncem buňky, kde leží bičík vytvářející krátkou undulující membránu. Tato forma je typická pro rod *Trypanosoma*, ale může se vyskytnout i u dalších rodů (například *Blastocrithidia*). Podlouhlí **trypomastigoti** definující rod *Trypanosoma* se vyznačují postnukleární kDNA a bičíkem vycházející z laterálně-posteriorní kapsy tvořící dlouhou undulující membránu. Undulující membrána však nebyla pozorována u všech zástupců, například u monoxenního rodu *Rhynchoidomonas*. Naopak u protáhlého **promastigotního stádia** nalezneme bičík v anteriorní části bičíkovce, kde se nachází i kinetoplast umístěn před jádrem. S promastigotem se setkáme například u rodu *Leishmania*, *Leptomonas*, *Lotmaria*, *Herpetomonas* či zřídka i u *Trypanosoma*. Pro rod *Herpetomonas* je charakteristický **opisthomastigot**, u kterého je kinetoplast lokalizován posteriorně za jádrem. Bičík vychází z dlouhé flagelární kapsy táhnoucí se skrz celé tělo až na anteriorní část buňky. **Choanomastigot** s anteriorně umístěným kinetoplastem je dominantní pro rod *Crithidia* a *Herperomonas*. Poznává se podle přítomnosti širokého límečku, ze kterého vybíhá bičík. U hmyzích monoxenních parazitů mají zastoupení ve vývojovém cyklu také **amastigoti** (označováno též jako **endomastigoti**) (*Leptomonas*, *Blastocrithidia*, *Herpetomonas*). Amastigot/endomastigot se vyznačuje svým kulovitým tvarem a velmi krátkým bičíkem zanořeným ve flagelární kapse, díky čemuž působí jako stádium nebičíkaté. U novějších klasifikovaných rodů *Angomonas* a *Strigomonas* byl rozpoznán **opisthomorfní** typ s apikálním bičíkem a postnukleárním kinetoplastem (Kostygov et al., 2021).

2.1.4 Hostitelé a hostitelská specifita

Z celkového počtu milionů hmyzích druhů bylo na monoxenní trypanosomatidy zkoumáno pouze 2 500 druhů, z nichž více než 20 % bylo pozitivní na některého parazita z této skupiny. To znamená, že trypanosomatidy tvoří velmi malé procentuální zastoupení (0,05) u známých druhů hmyzu (Podlpaev, 2001; Wallace et al., 1983). Bylo však také zaznamenáno, že distribuce hostitelů není jednotná a dva

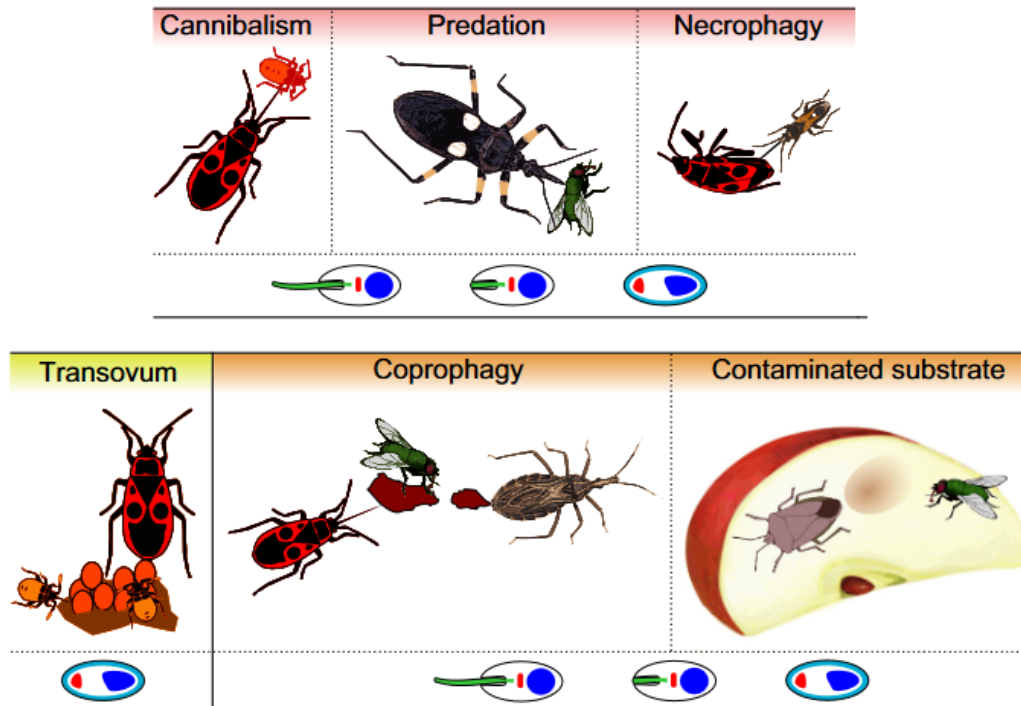
řády hmyzu (Heteroptera a Diptera) představovaly více než 70 % zdokumentovaných případů. Příčinou mohou být snadné cesty přenosu v rámci skupiny (shlukování dvoukřídlého hmyzu na zdroji potravy, vytváření hustých populací ploštic a jejich predací, koprofágní či nekrofágní způsob života). Nicméně se zdá, že prevalence trypanosomatid v populacích hmyzu bude vyšší než 5 % (Lukeš et al., 2018; Maslov et al., 2013). Častým hostitelem jsou taktéž zástupci ze skupiny Siphonaptera (Votýpka et al., 2013). Trypanosomatida osídlují i další řády hmyzu, avšak s méně častým výskytem. Konkrétně se jedná o tyto řády Anoplura, Blattodea, Coleoptera, Homoptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Mecoptera, Orthoptera a Trichoptera (Podlipaev, 1990).

Hostitelská specifita trypanosomatid není zcela prozkoumána. Dříve byl zvažován koncept jeden hostitel – jeden parazit. Tato hypotéza však byla zamítnuta, když byla objevena přítomnost více druhů parazitů v rámci jednoho hostitele či přítomnost téhož parazita u širšího spektra hmyzu (Podlipaev, 1990; Wallace, 1966). Vzhledem k rozdílnému společenskému uspořádání hmyzu je plošný výskyt trypanosomatid u hmyzích hostitelů nepravděpodobný a specifita hostitele se tak odlišuje mezi jednotlivými druhy (Maslov et al., 2013).

Určitou tkáňovou specifitu můžeme však pozorovat uvnitř infikovaného hostitele, ve kterém se paraziti nacházejí především v zažívací soustavě, v mezenteronu a proktodeu. V proktodeu jsou přichycené svými bičíky a vytvářejí kompaktní vrstvu buněk lemující střevní stěnu. Např. druh *Herpetomonas muscarum* se u svých hostitelů nachází pouze v mezenteronu, proto je jejich přítomnost v hostiteli omezena pouze na podobu volných bičíkoců. Rod *Blastocrithidia* také preferuje střední část střeva, naopak u rodu *Crithidia* se častěji setkáme s výskytem v zadním střevě a rektu (Wallace, 1966).

2.1.5 Způsoby přenosu

Hlavní úlohu v přenosu hmyzích trypanosomatid plní střevní stádia (endomastigoti, nebičíkatí amastigoti či nespecializovaná stádia), která jsou infekční pro dalšího hostitele (Frolov et al., 2021). U hmyzích opylovačů (například rod *Bombus* a *Apis*) slouží jako zdroj infekce rostlinné květy a plody, které jsou infikovány od předešlých strážníků a k nové nákaze dojde pozřením infekčních stádií (Vickerman, 1994). Probádaná cesta infekce je například i u ploštic, u kterých nákazu usnadňuje jejich životní strategie, která spočívá v kanibalismu (Schaub et al., 1989). Přenos infekce usnadňují i další životní strategie – predace, nekrofágie, koprofágie, shlukování hmyzu při přijímání potravy, život v populaci nebo předávání potravy mezi jedinci téhož druhu (Arismendi, Castro, et al., 2020; Frolov et al., 2021).



Obrázek 3: Cesty přenosu monoxenních trypanosomatid. Na obrázku jsou zvýrazněna infekční stádia včetně „pseudocyst“ s barevně vyznačeným jádrem, kinetoplastem a bičíkem (Frolov et al., 2021).

2.2 Monoxenní Trypanosomatida u včel (Apoidea)

2.2.1 Včely jako hostitelé

Zástupci ze skupiny blanokřídlých se mezi sebou liší chováním a životními strategiemi. Podle úrovně sociality rozlišujeme včely eusociální až solitérní. U některých druhů lze pozorovat přechody mezi sociální a samotářskou specializací, čímž se vytvářejí další stupně socializace – semisociální či subsociální. Eusociální včely žijí ve velkém pospolitém společenství, ve kterém jsou rozděleny podle stáří do různých kast odlišných v pracovních činnostech (Michener, 1974; Weislo & Danforth, 1997). Samotářské včely nevytváří rozsáhlá včelstva, ale hnízdí např. v půdě, písku či v dutinách rostlin, nejsou rozdělené na kasty a každé hnízdo je obsazeno pouze jednou samicí, která tak zastává roli královny a dělnice zároveň. Zvláštnosti jsou pak tzv. kukaččí včely (hnízdni parazité), které si nestaví vlastní hnízda a k odchovu mláďat využívají hnízda cizí (Danforth, 2019).

Včela medonosná (*Apis mellifera*) je známá svým eusociálním způsobem života v rozsáhlém společenství (včelstvo) rozděleném na kasty trubců, dělnic a královny (matka), které jediná je schopna klást vajíčka. Z vajíček oplozených trubcem (který po oplození hyne) se líhne samice (dělnice, případně nová královna) a z neoplozených vajíček se líhnou trubci. Dělnice zastupují ve včelstvu většinu rolí, které se mění spolu s jejich stářím. Mladé dělnice (mladušky) zastupují v úle tyto role: čištění plástve, péče o potomstvo (královnu), starost o úl a jeho obranu. Starší dělnice (létavky) vyhledávají nektar a pyl mimo úl a přinášejí je společně s vodou zpět do včelí kolonie (Michener, 1974). Do eusociálních včel spadají všechny druhy včel ze skupin Apini a Meliponini a vosy a sršně z podčeledi Vespinae (Danforth, 2019).

Čmeláci (rod *Bombus*) zakládají primitivnější eusociální kolonie než včely. Rozdíl spočívá již u samotné královny, která při zakládání kolonie zpočátku shání potravu, aby nakrmila larvy, dokud se nevylihne první generace dělnic, která tuto roli poté přebírá. Trubci kolonii opouštějí a živí se květinovým nektarem a mohou se opakovaně pářit. Primitivní eusociální hmyz dále představují vosíci (Polistinae) (Danforth, 2019).

Většina druhů včel je však samotářských, kde všechny role plní samostatná samice včetně produkce potomstva. Kromě kladení vajíček zajišťuje potravu a staví a chrání své vlastní hnízdo. Samci velkou část života věnují hledání partnerek, ale mohou se uplatnit i při opylování květů. Mezi nejrozšířenější solitérní včely patří například zástupci z čeledi Andrenidae, Halictidae, Megachilidae či Colletidae. Tzv. samotářky nalezneme i ve skupině Apidae (Danforth, 2019).

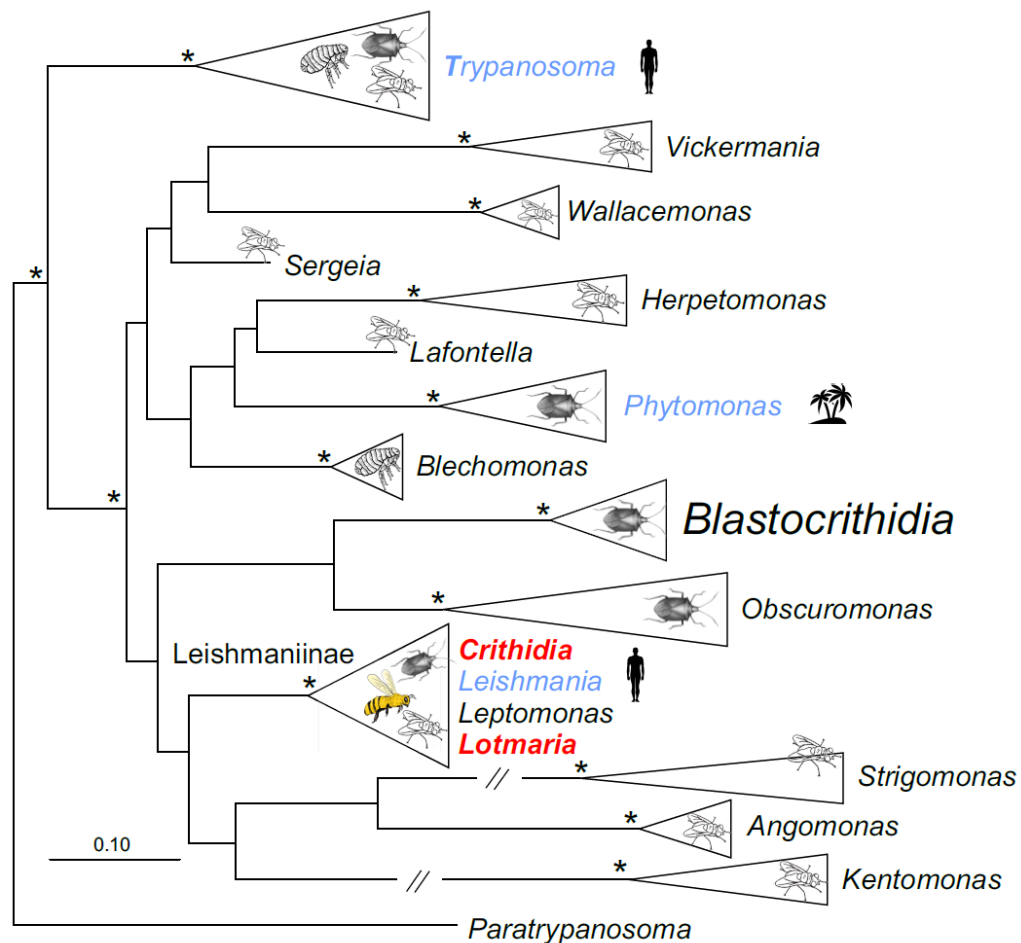
Právě rozdílné chování včel či rozdíly v jejich metabolismu by mohly představovat určité bariéry, které řídí specifčnost hostitele pro trypanosomatida. Jedinečné sociální chování včel, jako je poskytování mateří kašičky larvám a sdílení potravy mezi dospělými včelami (trofalaxe), usnadňuje nákazu a zároveň i zvyšuje její šíření (McGhee & Cosgrove, 1980).

Trypanosomatida byla pozorována u včel již v roce 1912 (Fanthan & Porter, 1912) a následně byl tento výskyt potvrzen až na globální distribuci s rozšířením v Evropě, Africe, Austrálii, Severní Americe, Jižní Americe a Asii (Yang et al., 2013; Cox-Foster et al., 2007; Fanthan & Porter 1912; Fyg, 1954; Langridge, 1966, Langridge & McGheee, 1967; Lotmar, 1946; Orantes-Bermejo, 1999; Ravoet et al., 2013; Runckel et al., 2011; Teixeira et al., 2008; vanEngelsdorp et al., 2009).

Pro včelí trypanosomatida jsou díky novým studiím nalézáni další vhodní hostitelé, čímž se jejich původní výskyt ze včely medonosné (či čmeláka zemního) rozrostl až na 29 možných hostitelů náležících do 5 rodů – *Apis*, *Bombus*, *Osmia*, *Psithyrus* a *Vespula*. Všechny trypanosomatida vyskytující se u blanokřídlého hmyzu spadají do podčeledi Leishmaniinae (viz obrázek 4).

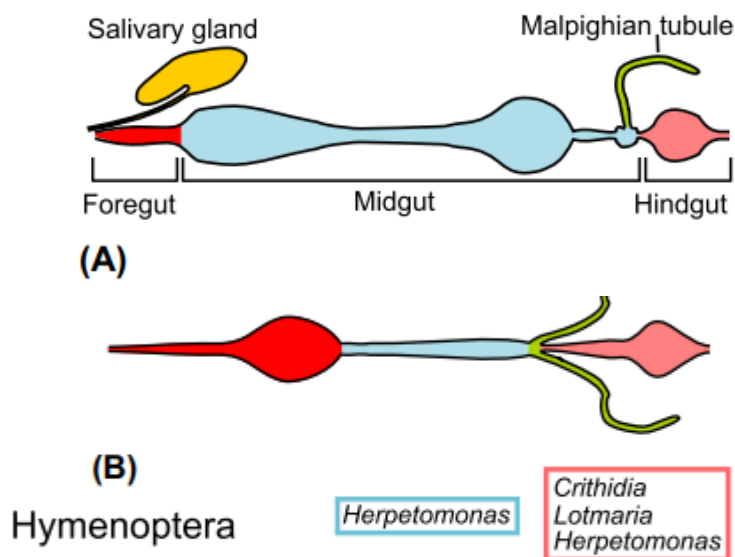
Tabulka 1: Shrnuté poznatky o výskytu trypanosomatid u včelích hostitelů Apidae. Reference jsou v tabulce uvedeny číselně (1. Arismendi et al., 2021; 2. Bartolomé et al., 2018; 3. Brown et al., 2003; 4. Gallot-Lavallée et al., 2016; 5. Michalczyk & Sokół, 2022; 6. Ravoet et al., 2015; 7. Ravoet et al., 2013; 8. Ruiz-González & Brown, 2006b; 9. R. Schmid-Hempel & Tognazzo, 2010; 10. Schwarz et al., 2015; 11. Stevanovic et al., 2016; 12. Tripodi et al., 2018; 13. Yang et al., 2013).

Druh včely	<i>L. passim</i>	<i>C. melliferae</i>	<i>C. bombi</i>	<i>C. expoeki</i>	<i>C. mexicana</i>
<i>Andrena vaga</i>			+ (6)		
<i>Apis cerana</i>	+ (1,7,10, 11, 13)				
<i>A. mellifera</i>	+ (10,11)	+ (10)			
<i>Bombus barbutellus</i>			+ (9)		
<i>B. centralis</i>	+ (12)				
<i>B. dahlbomii</i>	+ (1)		+ (1)		
<i>B. diligens</i>					+ (4)
<i>B. ephippiatus</i>				+ (4)	+ (4)
<i>B. flavifrons</i>				+ (9)	
<i>B. hortorum</i>			+ (9)		
<i>B. huntii</i>				+ (4)	+ (4)
<i>B. impatiens</i>		+ (7,10,12)			
<i>B. insularis</i>			+ (9)		
<i>B. lapidarius</i>			+ (9)	+ (9)	
<i>B. lucorum</i>			+ (9)	+ (9)	
<i>B. macgregori</i>					+ (4)
<i>B. pascuorum</i>	+ (5)		+ (9)		
<i>B. pratorum</i>			+ (9)	+ (9)	
<i>B. ruderatus</i>	+ (1)		+ (1)		
<i>B. rupestris</i>			+ (9)		
<i>B. steindachneri</i>					+ (4)
<i>B. terrestris</i>	+ (2)	+ (2)	+ (9)	+ (9)	
<i>B. terricola</i>				+ (9)	
<i>B. trinominatus</i>				+ (4)	+ (4)
<i>B. weisi</i>					+ (4)
<i>B. wilmattae</i>					+ (4)
<i>Osmia bicornis</i>		+ (7,10,12)			
<i>O. cornuta</i>		+ (7,10,12)			
<i>Vespula squamosa</i>		+ (7,10,12)			



Obrázek 4: Fylogenetické postavení včelích zástupců ze skupiny Leishmaniinae (Crithidia a Lotmaria); modře dvouhostitelské rody (orig. J. Votýpka).

Preferovanou lokalizací pro včelí trypanosomatida je zadní část střeva (ileum či rektum) (Schwarz et al., 2015). Je zajímavé, že jejich výskyt není vázán na oblast středního střeva s mnohem dostupnějšími živinami. Pravděpodobně je tento nedostatek živin korelován průchodem nízkomolekulárních látek (cukrů, aminokyselin) skrz malphigické trubice do střeva, kde jsou absorbovány rektum (Ramsay, 1958), což poskytuje ideální prostředí pro prosperitu těchto parazitů (Brooker, 1971). Dalším vysvětlením by mohlo být také to, že se v mezenteronu nemohou přichytit svými bičíky, kdežto v zadním střevě se ukotví na epitel a dojde k rozvinutí infekce (Schwarz et al., 2015). Toto umístění by zároveň mohlo chránit trypanosomatida před expozicí antimikrobiálních fytochemikálií, které jsou průchodem střední části střeva absorbovány nebo degradovány hostitelem či přidruženými střevními mikroorganismy před prostoupením do zadního střeva (Koch et al., 2019).



Obrázek 5: Lokalizace trypanosomatid u skupiny Hymenoptera. Obecné schéma trávicího systému hmyzu (A) a schéma s lokalizací vybraných zástupců (B) (Frolov et al., 2021).

2.2.2 Paraziti včely medonosné, *Lotmaria passim* a *Crithidia mellifica*

První popisy včelího parazita *Crithidia mellifica* jsou k dispozici již od roku 1967 (Langridge & McGhee, 1967). Střevní jednohostitelský parazit *Lotmaria passim* byl u včely medonosné identifikován teprve nedávno a na základě fylogenetické analýzy zařazen do podčeledi Leishmaniinae společně s rody *Crithidia* a *Leptomonas*. Tento organismus byl však pozorován již dříve, nicméně po dlouhou dobu byl zaměňován právě za druh *Crithidia mellifica*. K odlišení těchto rodů pomohla molekulární studie (gGAPDH, SSU, Cytb), a tak se dnes *L. passim* a *C. mellifica* řadí do různých rodů. Zdá se, že v celosvětovém měřítku (Asie, Evropa, Jižní a Severní Amerika) *Lotmaria* převládá a je u včel hojněji zastoupena. Na rozdíl od druhu *C. mellifica*, který se zdá být u včel vzácný a většina dříve popsaných případů tak pravděpodobně připadá druhu *L. passim*. Proto je zapotřebí přehodnotit předchozí zprávy o *C. mellifica* (Arismendi, Castro et al., 2020; Castelli et al., 2019; Schwarz et al., 2015; Vargas et al., 2017).

2.2.2.1 Hostitelé

Preferovaným hostitelem *L. passim* je *Apis mellifera*, ale výskyt byl potvrzen i u další včely – *Apis cerana* (Arismendi et al., 2016; Ravoet et al., 2015; Schwarz et al., 2015; Stevanovic et al., 2016; Yang et al., 2013). Nedávno byla identifikována i u čmeláků, a to v *Bombus centralis* (Tripodi et al., 2018), *Bombus terrestris* (Bartolomé et al., 2018), *Bombus ruderatus*, *Bombus dahlbomii* (Arismendi et al., 2021) a *Bombus pascuorum* (Michalczyk & Sokół, 2022). *C. mellifica* využívá širokou škálu hostitelů blanokřídlého hmyzu, ale byla nalezena i u afrických ovádů (Votýpka et al., 2019) a netopýrů a dalších savců v Jižní Americe (Dario et al., 2021). Kromě typického hostitele *A. mellifera* byla také molekulárně potvrzena u *Vespa squamosa*, *Osmia bicornis*, *Osmia cornuta*, *Bombus impatiens* (Ravoet et al., 2015; Schwarz et al., 2015; Tripodi et al., 2018) a *Bombus terrestris* (Bartolomé et al., 2018). Nález u širšího spektra hostitelů tak vypovídají o nízké hostitelské specifitě *C. mellifica* (Bartolomé et al., 2018).

Náchylnost k infekci je podmíněna pohlavím. Včelí trypanosomatida infikují pouze dělnice sociálních včel. Výjimku však tvoří samotářská včela *Osmia cornuta*, kde jsou k infekci náchylnější samci (Strobl et al., 2019).

2.2.2.2 Morfologie a lokalizace

Pro druh *Lotmaria passim* je typické pohyblivé stádium promastigot s kopinatým až kapkovitým tvarem těla a jediným bičíkem postrádajícím membránu, který je připojen k širokému zaoblenému přednímu okraji buňky. Na laterální straně je přítomna široká hluboká rýha. Promastigoti dosahují v průměru délky 7,4 μm a šíře v nejširší části těla 3,2 μm . Kromě bičíkatého stádia se v životním cyklu vyskytují nebičíkaté adherentní kulovité buňky (sféroidi o velikosti 3-4 μm). Tyto kulovité buňky byly pozorovány pouze v zadním střevě, v rektu a příležitostně v ileu, kde v těchto místech pokrývají lumenální povrch a vytváří husté agregáty (Schwarz et al., 2015). Mezi těmito stádii jsou distribuováni i promastigoti, avšak v menší četnosti. Stejně jako sféroidní buňky jsou lokalizovány v ileu a rektu, můžou se však vyskytovat i v mezenteronu či proktodeu. Lze pozorovat i polymorfni formy, které se pohybují mezi těmito dvěma popsány stádii (Schwarz et al., 2015). Nově byly ve studii Buendía-Abad et al. (2021) v zadním střevě (především v rektu) popsány nepohyblivá bičíkatá stádia haptomonády, která jsou vysoce adhezivní díky morfologicky přizpůsobenému bičíku sloužící pro přichycení k epitelu, kde jsou uspořádané do jedné buněčné vrstvy. Modifikovaný bičík má deskovitý tvar a s hostitelskou buňkou je spojen pomocí vazebných komplexů podobným hemidesmozomům (Buendía-Abad, García-Palencia, et al., 2021).

Crithidia mellifica se u svých hostitelů vyskytuje ve 3-4 morfologicky rozdílných formách. Příležitostně se objevují mírně prodloužené promastigoti, ale primárně se vyskytují ve formě choanomastigotů se zkráceným předním koncem, zaobleným posteriorním koncem buňky a s hlubokými úzkými bočními rýhami. Choanomastigoti mají jeden bičík vložený do úzké periflagelární kapsy, která sahá přibližně do poloviny délky těla. Průměrná velikost těla dosahuje v nejširší části buňky 3,3 μm a délky 6,6 μm . Ve střevě hostitele kolonizuje především rektum, které osídluje ve velkém množství prostřednictvím sféroidů připojených k epitelu, kde tak vytváří kompaktní vrstvu pokrývající hostitelské buňky (Schwarz et al., 2015). Stejně jako u *L. passim*, byla i u *C. mellifica* popsána stádia haptomonádového typu s modifikovaným bičíkem, které se ale na rozdíl od *L. passim* vyskytují ve vícevrstevných shlukách lemující epitel především v ileu. Hustý povrch buněk v těsném kontaktu s epitelem nutí haptomonády přizpůsobit svůj tvar dostupnému prostoru. Tento úzký kontakt s hostitelským epitelem nebo s buněčnými shluky naznačuje interakce mezi hostitelem a parazitem a mezi parazity samými (Buendía-Abad, García-Palencia, et al., 2021).



Obrázek 6: Promastigoti *L. passim* (A) a choanomastigoti *C. mellificae* (B) ze skenovacího elektronového mikroskopu (Schwarz et al., 2015).

2.2.2.3 Vývojový cyklus a způsoby přenosu

Životní cyklus těchto dvou druhů (*L. passim*, *C. mellificae*) není zcela objasněn. K infekci by mohly sloužit choanomastigoti/promastigoti, ale i haptomonádové formy vyskytující se hlavně v zadním střevě, které mohou po vyloučení z těla hostitele spolu s trusem sloužit k šíření infekce. V každém případě by epiteliální připojení haptomonád mohlo hrát klíčovou roli v zabránění předčasnému vyloučení neinfekčních stádií z hostitele či by mohlo toto připojení sloužit k upevnění k substrátu (Buendía-Abad, García-Palencia, et al., 2021).

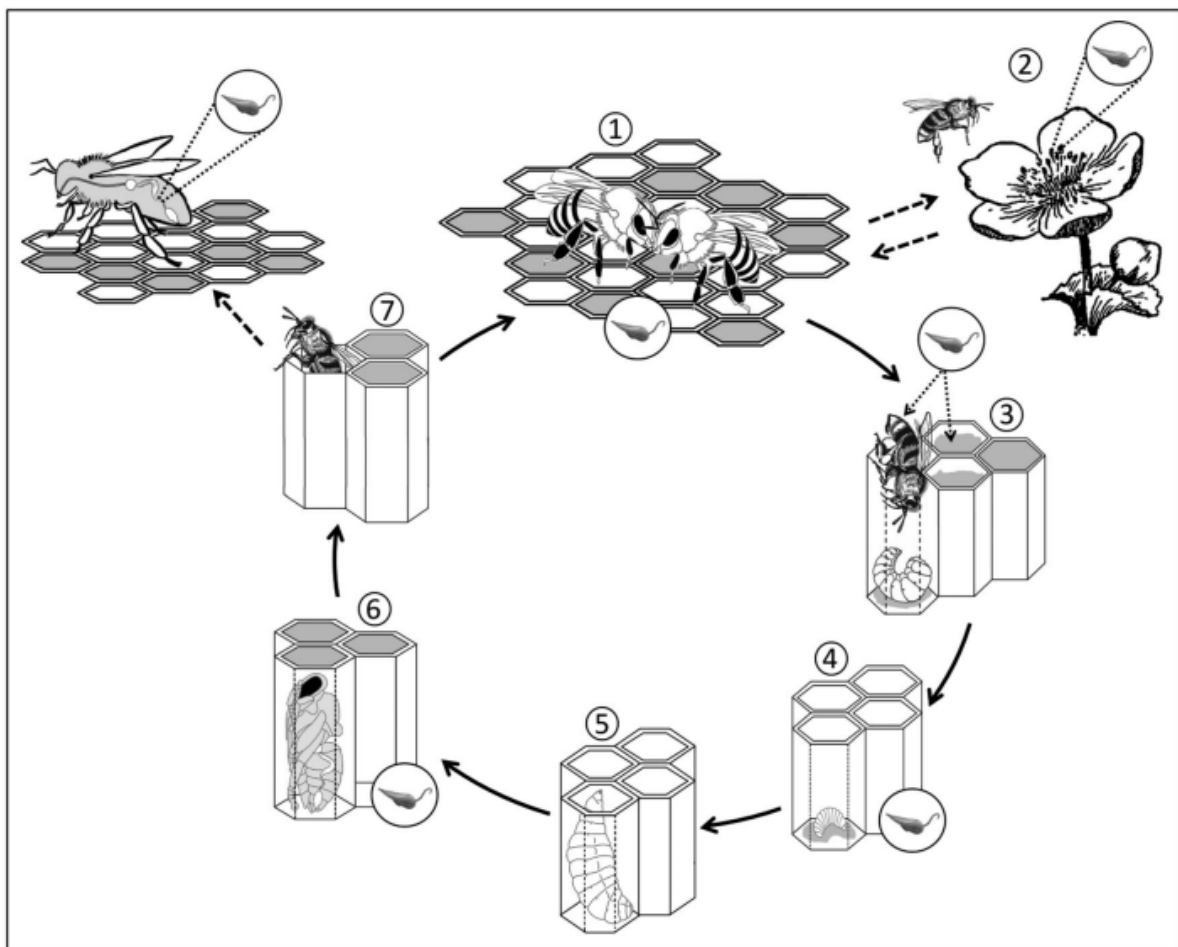
Včely medonosné jsou eusociálním hmyzem, pro který je charakteristický častý kontakt jedinců, vysoká populační hustota a nízká genetická diverzita mezi členy. Těmito vlastnostmi včely splňují ideální podmínky pro přenos parazitů (Schmid-Hempel, 1995; van Baalen & Beekman, 2006). Infekce je poměrně častá na jaře a v létě. V zimě je prevalence nízká (Fyg, 1954; Orantes-Bermejo, 1999), ačkoliv intenzita infekce u nakažených jedinců je vysoká (Arismendi, Caro, et al., 2020; Runckel et al., 2011).

K přenosu mezi jednotlivými jedinci dochází horizontální cestou v rámci kolonie, ale také mezi jednotlivými včelstvy (Cremer et al., 2018). Infekce včely spočívá v pozření infekčních stádií. Přenos v souvislosti s cestami mimo úl jsou spojené s hledáním potravy, která může být kontaminována výkaly s aktivními infekčními buňkami a ty následně mohou být pozřeny novým hostitelem. Dělnice sbírající nektar či pyl na infikovaných květinách pak slouží jako vektor pro celé včelstvo (Alger et al., 2019; Durrer & Schmid-Hempel, 1994; Graystock et al., 2015).

Dělba práce včel s sebou nese rizika přenosu patogenů. Riziko disperze infekce může představovat například čištění plodových buněk včelou čistíčkou, kdy během čištění může včela roznášet patogeny mezi jednotlivými buňkami či nedojde k úplnému vyčištění buněk, kde by se mohla skrývat trypanosomatida. Takto nevyčištěné buňky by mohly představovat zdroj infekce pro budoucí larvy. U dělnic probíhá krmění prostřednictvím trofalaxe (výměna potravy mezi jedinci), což představuje cestu přímé infekce (Arismendi, Castro, et al., 2020) Vzájemný fyzický kontakt, ošetřování a další role ve včelstvu poskytují četné a rozmanité příležitosti pro přenos jakýchkoliv parazitů mezi členy v rámci včelí kolonie (Fries & Camazine, 2001).

Zajímavý přenos by mohl představovat i lesknáček úlový *Aethina tumida*, ve kterém byly identifikovány *L. passim*, *C. mellificae* i *C. bombi*. Pravděpodobně tyto parazité kolonizují střevo larev brouků živících se medem a larvami včel. K horizontálnímu přenosu mezi včelou a broukem může docházet obousměrně, jelikož se parazitický brouk živí včelími produkty, infikovanými výkaly a kanibalizuje jejich mrtvá těla. Zároveň se tento brouk v úle vyprazdňuje, čímž může podpořit roznos infekce v úlu (de Landa et al., 2021; Nanetti et al., 2021).

Výsledky studie Arismendi et al. (2020) přinesly nový pohled na životní cyklus parazita spjatý s vývojem včel a otevřel tak nové cesty přenosu uvnitř kolonie, neboť doposud byly popsány pouze infekce dospělých jedinců a nebyly zaznamenány žádné infekce u různých vývojových stádií. Na základě tohoto předpokladu bylo vytvořeno schéma možných cest přenosů znázorněné na následujícím obrázku 7.



Obrázek 7: Představa přenosu *Lotmaria passim* při vývoji včely. Paraziti se přenáší požitím infikovaných buněk, a to prostřednictvím kontaminované potravy či kontaminované plástve, fyzickým kontaktem mezi včelami či trofalaxí (1). Po průchodu střevem jsou infikované buňky vyloučeny společně s výkaly mimo úl nebo i výjimečně v rámci úlu (2). Buňky *Lotmaria passim* se tak mohou dostat zpět do kolonie společně s infikovanou potravou (1,2). V úlu může dojít buď k nové infekci nebo k reinfekci *L. passim* prostřednictvím kontaminované potravy uložené v plodových buňkách sloužící k infekci larev, kde roli mechanického vektoru zastupuje včela kojička (3). Larvy poté zůstávají infikovány po celý svůj vývoj (4,5), dokonce i po přeměně do kukly (6) až do dospělosti (7), kde jsou lokalizovány v zadním střevě, kde se rozmnožují (Arismendi, Castro, et al., 2020).

Transovariální přenos (uvnitř vajíčka) u hmyzích trypanosomatid nebyl zatím zjištěn (Schmid-Hempel et al., 2019). U včel tuto hypotézu potvrzuje studie od Arismendi (Arismendi, Castro, et al., 2020), kde byly provedeny odběry a následné analýzy vajíček a dalších vývojových stádií z *Lotmaria*-pozitivní kolonie včel. Z tohoto včelstva byl odebrán plást s nakladenými vajíčky, plodem různého stáří, kukly a zavíčkovanými buňky. Odebírané vzorky byly očištěny (všechna stádia včetně vajíček) a následně zpracovány real-time PCR analýzou. Ve vajíčkách nebyla zjištěna žádná přítomnost *Lotmaria*, nicméně u dalších vývojových stádií přítomna byla. U kukel, kojiček a dospělých vykazovala prevalence více než 92 %. U larev a nově se líhnoucích včel byla prevalence významně nižší s procentuálním zastoupením pod 71 %. Přenos infekce z matky na potomstvo však nelze úplně vyloučit vzhledem k vysoké infekci v následujících vývojových stádiích včel (Arismendi, Castro, et al., 2020). Nicméně určitý přenos skrz vajíčka probíhá a jde o tzv. transovum, kdy je parazit místo ve vajíčku uchycen na jeho povrchu, kam se dostal s výkaly matky a následně může být pozřen novými vylíhlými nymfami (Frolov et al., 2021).

2.2.2.4 Patogeneze a vliv na kondici včel

Trypanosomy u blanokřídlých, zejména u včel, pravděpodobně nepředstavují závažný problém z hlediska akutního působení na zdraví včel, nicméně negativně ovlivňují délku života, chování, fyziologii a imunitní systém (Arismendi et al., 2020; Gómez-Moracho et al., 2020; Runckel et al., 2011; Schwarz & Evans, 2013; Strobl et al., 2019). V laboratorním podmínkách při zkoumání účinků parazitů na včelu však představují problém stresové podmínky (špatná strava, asociální kontext či nedostatečná expozice střeva mikrobiálními organismy), které mohou mít vliv na zvýšenou náchylnost k infekci trypanosomatid, která také může vést ke změnám v chování a ve vývoji (Schwarz et al., 2016; Strobl et al., 2019).

U včel infikovaných pouze těmito parazity (*Lotmaria* či *Crithidia*) nebyl zaznamenán výrazný patologický účinek. Je pozorované nevýznamné snížení přežití u experimentálně infikovaných včel medonosných (Arismendi, Caro, et al., 2020; Buendía-Abad, Higes, et al., 2021; Higes et al., 2016; Strobl et al., 2019) a samotářských trubců *Osmia cornuta* (Strobl et al., 2019). Trypanosomatida vytvářející hustý povrch stěny zadního střeva by mohla ohrozit absorpci metabolitů (Molyneux & Ashford, 1975; Schaub, 1994) a dokonce i tento proces blokovat (Brooker, 1971). *Lotmaria* se zdá být pro včely více patogenní, což může být ovlivněno i jejím častějším výskytem. Přestože infekce probíhají ve střevě, nebyla dosud pozorována žádná poškození střevního epitelu (Gómez-Moracho et al., 2020).

Patogenita je tedy nejasná, přestože byla pozorovaná vysoké množství těchto parazitů v trávicím traktu včel, a to v závislosti na stádiu včely. U mladých larev (1-2 dny) byla naměřena koncentrace *Lotmaria* v rozmezí $1,91 \times 10^1 - 1,13 \times 10^3$ a u starších larev (5-6 dní) $6,62 \times 10^1 - 1,24 \times 10^3$. U Kukel byly naměřené hodnoty od $1,42 \times 10^2$ do $5,14 \times 10^4$ buněk a u včel kojiček, které jsou staré pouze <10 dnů, měly koncentraci $1,12 \times 10^2 - 1,58 \times 10^4$. Dospělé včely (>20 dní) vykazovaly zatížení $1,72 \times 10^2 - 7,39 \times 10^5$ buněk. Dalo by se očekávat, že s rostoucím časem roste i množení a zastoupení parazita. Když se podíváme na nově se líhnoucí včely ($2,80 \times 10^1 - 9,27 \times 10^4$), pozorujeme hodnoty blízké se hodnotám naměřené u dospělých včel. Kolísání množství parazitů by mohlo vypovídat o reinfekci z plodových buněk, kam se musela infekční stádia dostat před jejím zavíčkováním (Arismendi, Castro, et al., 2020).

2.2.3 Parazit čmeláka zemního, *Crithidia bombi*

2.2.3.1 *Hostitelé*

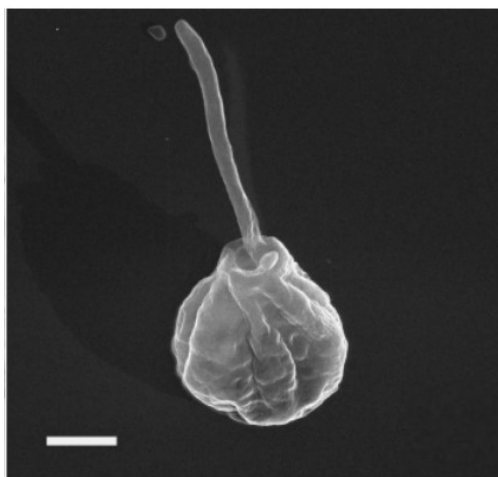
Crithidia bombi byla poprvé u čmeláků identifikována v letech 1987-1988 ve studiích Gorbunov (1987) a Lipa & Triggiani (1988) (Schmid-Hempel & Tognazzo, 2010). U svých hostitelů vykazuje sezónní nárůst v období opylování a shánění potravy s prevalencí dosahující až 80 % (Shykoff & Schmid-Hempel, 1991, Imhoof & Schmid-Hempel, 1999). *C. bombi* je nejrozšířenějším parazitem čmeláků vyskytující se v širokém spektru hostitelů rodu *Bombus* (Brown et al., 2003); konkrétně byla detekována u *B. hortorum*, *B. lapidarius*, *B. lucorum*, *B. pascuorum*, *B. pratorum*, *B. terrestris*, (R. Schmid-Hempel & Tognazzo, 2010), *B. dahlbomii* a *B. ruderatus* (Arismendi et al., 2021). Dále také u pačmeláků *Bombus* (dříve *Psithyrus*): *B. barbutellus*, *B. insularis* a *B. rupestris* (R. Schmid-Hempel & Tognazzo, 2010).

Infekce trypanosomatidy u čmeláků nejsou omezena pouze na druh *Crithidia bombi*, ale můžeme se u nich setkat i s blízkce příbuznými druhy *Crithidia expoeki* (R. Schmid-Hempel & Tognazzo, 2010) či *Crithidia mexicana* (Gallot-Lavallée et al., 2016), které jsou u čmeláků uváděny mnohem méně často. Infekce rodu *Crithidia* u čmeláků jsou rozšířené u samic, ale i mezi samci (Ruiz-González & Brown, 2006a).

Crithidia bombi není pouze rodově specifická, ale dokáže infikovat i včely. Dalšího hostitele tak představuje eusociální druh *Apis mellifera* (Graystock et al., 2015; Ruiz-González & Brown, 2006a). *Crithidia* spp. byla identifikována i u dvou samotářských druhů včel – *Osmia bicornis* a *Andrena vaga* (Ravoet et al., 2015).

2.2.3.2 *Morfologie a lokalizace*

Nejčastějším morfotypem u *C. bombi* je choanomastigot hruškovitého tvaru dorůstající do průměrné délky 6,03 μm a průměrné šířky 2,31 μm . Dalšími morfotypy pozorované v životním cyklu jsou rychle se pohybující velcí promastigoti s dlouhým bičíkem přiloženým k jedné straně a amastigoti, kulaté buňky s extrémně redukováným bičíkem. Které z těchto stádií je ovšem zodpovědné za infekci není známo (Logan et al., 2005). Z výsledků studie Logan et al. (2005) by za přenos infekce uvnitř kolonie mohli být zodpovědní promastigoti, jejichž velký povrch těla není přizpůsoben pro přenos ve vnějším prostředí, jelikož velký povrch s sebou nese riziko rychlého vysychání. Mimo toho se zdá, že se v zadním střevě čmeláků vyskytují dříve než choanomastigoti a amastigoti, kteří se díky malému povrchu těla stávají odolnějšími vůči vysychání, což by jim umožnilo úspěšnější přenos mezi koloniemi, kde musí parazité odolávat více faktorům (například UV záření). Jak dlouho zůstávají tyto stadia životaschopná a infekční je zatím těž nejasné (Logan et al., 2005; Schmid-Hempel et al., 1999).



Obrázek 8: Snímek *C. bombi* ze skenovacího elektronového mikroskopu (R. Schmid-Hempel & Tognazzo, 2010).

2.2.3.3 Způsoby přenosu a vývojový cyklus

Čmeláci jsou primitivním eusociálním hmyzem, kde královny na jaře zakládají kolonie, které se následně rozrůstají v podobě dělnic a trubců (Goulson, 2003). Pouze však spářená královna může přes zimu hibernovat a přenášet tak infekce do dalšího roku či vertikálně do další generace. Horizontálně se *C. bombi* přenáší v rámci jednoho společenstva ale i mezi různými koloniemi prostřednictvím infikovaných květů (Durrer & Schmid-Hempel, 1994).

K pochopení přenosu v rámci kolonie může posloužit studie Folly et al. (2017), kde prováděli experimentální infekce larev, které by mohly představovat zdroj infekce pro dospělé neinfikované dělnice. K přenosu parazita z infikovaných larev na dělnice došlo však pouze prostřednictvím uchycení parazita na povrchu larev. Ve střevě larvy se parazit nedokázal uchytit pravděpodobně z důvodu vysokého osmotického potenciálu s vysokým obsahem cukru, který je pro vývoj parazitů inhibující (Cisarovsky & Schmid-Hempel, 2014; Pereboom, 2000). Larvy čmeláků se na rozdíl od ostatních členů kolonie nevyprazdňují a nedochází tak k fekálně-orálnímu přenosu, který je pro tyto parazity klíčový (Folly et al., 2017; P. Schmid-Hempel & R. Schmid-Hempel, 1993).

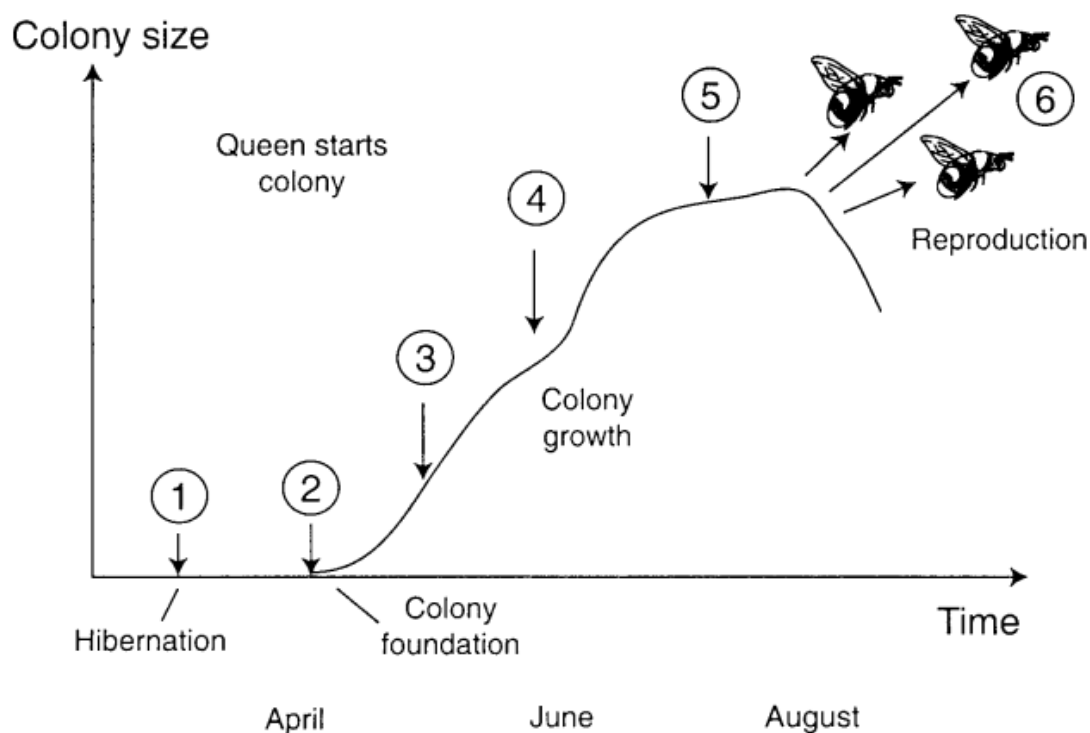
K přenosu infekce mezi dospělou populací dělnic, trubců a královny dochází perorální cestou, kdy se po požití dostávají infikované buňky do zadního střeva, kde se uchycují svými bičíky k epitelu ilea a následně se množí. Bičíkatá stádia jsou přítomna i v rektu, kde se volně pohybují. Po několika dnech jsou při defekaci vyloučeny infekční stádia, která se uchytí na květině či jiném povrchu a slouží jako zdroj infekce pro nového hostitele (Koch et al., 2019; P. Schmid-Hempel & R. Schmid-Hempel, 1993). Protože čmeláci nepoužívají k výživě larev trofalaxii, patogeny nelze přenášet přímo, ale jsou předávány přes kontaminované povrchy hnízda či infikované květiny. Tento přenos probíhá až ve 40 % případů (Schmid-Hempel, 2001). Šíření infekce mezi jednotlivými čmelstvy je obtížnější. Mimo květy je druhým možným způsobem zatoulání infikované dělnice do jiných hnízd, do kterých vstoupí omylem a zdejší společenstvo ji přijme za svou, čímž dojde k disperzi infekce (Schmid-Hempel, 2001). K urychlení šíření mezi koloniemi napomáhají i změny v chování čmeláků (zejména delší trávení času na květinách a střídání více květů bez hledání nektaru), které jsou způsobeny přítomností tohoto patogenu (Otterstatter et al., 2005).

2.2.3.4 Patogenita

Crithidia bombi je vysoce virulentní parazit, především pro matky. Infikované královny na jaře ztrácejí kondici a mají problémy se zakládáním nových kolonií, proto produkují kolonie s menším počtem dělnic (Brown et al., 2003). Pozorovaná byla i rozdílná alokace zdrojů, kdy byla infekce spojená s vyšší investicí zdrojů do svých tukových zásob než do reprodukčního systému. U dělnic se zdá být parazit avirulentní, avšak při stresových podmínkách se úmrtnost u infikovaných dělnic zvyšuje až o 50 % (Brown et al., 2000). Dále infekce *Crithidia* postihuje i nepřímo trubce, jelikož je hlášena snížená produkce samců v souvislosti s tímto parazitem (Brown et al., 2003).

Nákaza *C. bombi* je spojená se zhoršenou schopností čmeláků vyhledávat zdroj potravy. Infekce působí na centrální nervovou soustavu čmeláka, konkrétně na rozpoznávací schopnosti opylovačů poznávat květy podle barvy a vůně. Vysoká intenzita infekce významně snižuje rychlost motorického učení a zručnost při manipulaci s novými květy, což vede ke zvýšenému počtu návštěv květu a zvýšenému času potřebnému pro naučení správné manipulace a požívání nektaru (Gegear et al., 2005; Otterstatter et al., 2005). Změna chování spočívá i v častějších pádech čmeláků, a to jak z květin, tak při vzletání nebo přistání (Otterstatter et al., 2005).

Infekce *C. bombi* ovlivňuje imunitní systém čmeláka. Parazit indukuje dvounásobně zvýšenou aktivitu imunitní odpovědi v hemolymfě, která působí jako první a hlavní obrana proti patogenům (Brown et al., 2003). Infekce u čmeláků stejně jako u včel ovlivňuje expresi antimikrobiálních peptidů, které se podílejí na obraně organismu proti různým infekcím (Barribeau & Schmid-Hempel, 2013).



Obrázek 9: Patogenní účinky *C. bombi* v závislosti na vývojovém cyklu *Bombus* spp.

(01) Přežití hibernující královny není ovlivněno; (2) Snížený úspěch založení nové kolonie; (3) Snížení raného růstu kolonie; (4) Zvýšená úmrtnost dělnic za nepříznivých podmínek prostředí; (5) Zpožděná reprodukce; (6) Infekce mohou ovlivnit nahromadění tukové zásoby královny pro hibernaci (Schmid-Hempel, 2001).

2.3 Vliv patogenů, polutantů a dalších faktorů na včely (a jejich trypanosomatida)

2.3.1 Parazitární a virové interakce v souvislosti se syndromem zhroucení včel

Včelstva jsou v přírodě vystavena působením velkým množstvím patogenů a polutantů, což má za následek určité ztráty včel. V posledních desetiletích však včelaři pozorují neobjasnitelné vyšší úhyny včel či celých kolonií. Tento jev byl zaregistrován již v roce 2006 v USA a dostal označení CCD (colony collapse disorder, česky syndrom zhroucení včelstev). CCD se vyznačuje náhlou ztrátou dospělé populace dělnic. Pro tento úhyn je specifický způsob uhynutí, kdy uhynulá těla nejsou k nalezení uvnitř úlu a ani v jeho blízkosti. Při úbytku celé kolonie včel zůstává v úle pouze matka s několika nově vylíhnutými včelami (Ratnieks & Carreck, 2010). Jedná se o ztráty ve výšce až 50-90 % kolonií, často v průběhu jen několika týdnů (Ellis, 2007). Nejvyšší prevalence dosahuje po zimě, kdy včelstvo s CCD vykazuje sníženou imunitní odpověď (Cornman et al., 2012).

Mnoho faktorů, včetně klasických parazitů, bakterií, virů, pesticidů, ale i environmentálních, ekonomických či klimatických faktorů, bylo spojeno s celosvětovým poklesem abundance opylovačů. Činitelů je nespočet a jejich podíl na úbytku včel může mít příčinu v samostatném působení či v působení více faktorů najednou (Ratnieks & Carreck, 2010). Hlavní příčina hromadného vymírání byla přisouzena především z velké části varroáze a virovým onemocněním. Velký podíl je připisován i pesticidům, zejména v kombinaci s dalšími faktory. Avšak faktorů, které by mohly mít na vymírání včel vliv, bylo nalezeno 61 (vanEngelsdorp et al., 2009).

Parazité jako kleštěk včelí (*Varroa destructor*), *Nosema ceranae/apis* a trypanosomatida představují hlavní parazitické zástupce, které mohou hrát roli při kolapsech včelstev. Roztoč *V. destructor* je celosvětově škodící ektoparazit včel, a tak je jeho role v syndromu zhroucení včel v silném podezření (Rosenkranz et al., 2010). Například v zimním období postačí ke ztrátám pouhá >2% infikovanost včelstva (Currie & Gatién, 2006). *N. ceranae* je označována za patogen, který negativně ovlivňuje zdraví včely medonosné na úrovni jednotlivce i včelstva (Higes et al., 2008, 2009) a za určitých podmínek způsobuje kolaps včelstva (Betti et al., 2014; Higes et al., 2013). Problém představuje i přenos tohoto patogenu na čmeláky, pro které je tento parazit smrtelný (Fürst et al., 2014; Graystock et al., 2013; Plischuk et al., 2009). Přítomnost trypanosomatid ve spojení s *N. ceranae* koreluje se ztrátami včelích kolonií v USA a Belgii (Arismendi, Castro, et al., 2020; Cornman et al., 2012; Ravoet et al., 2013; Runckel et al., 2011) a naznačuje, že koinfekce těmito parazity má negativní synergický dopad na dlouhověkost včelstva.

Takto rozmanitý výskyt parazitů u včel umožňuje pozorovat koinfekce a určité asociace mezi jednotlivými parazity. Ve studii od Castelli et al. (2019) byla zaznamenána vyšší parazitace roztočem *Varroa destructor* u vzorků pozitivních na *L. passim*. Některé studie (Gregory et al., 2005; Navajas et al., 2008; Yang & Cox-Foster, 2005) prokázaly, že přítomnost roztoče *Varroa* je schopna potlačit imunitní systém včel, čímž by mohla ovlivnit trypanosomatida a podpořit tak jejich množení (Castelli et al., 2019). S výskytem *L. passim* souvisí i zastoupení viru BQCV (virus černání matečnicků), kdy se tento vir vyskytoval častěji ve vzorkách s *Lotmaria* než bez ní (Buendía et al., 2018). Trypanosomatida byla zaznamenána i v jisté korelaci s dalším virem – LSV (virus jezera Sinai) (D'Alvise et al., 2019). Smíšené infekce *Crithidia mellificae* s *N. ceranae* mají úlohu ve změně antimikrobiálních peptidů a snižují tak buněčnou imunitu svých hostitelů. Mortalita včel infikovaných trypanosomatidy však nebyla v žádné z těchto studií zaznamenána. Ve spojení s *N. ceranae* je zajímavý také supresivní účinek

na parazity *L. passim*, přestože oba parazité obývají rozdílné niky v hostiteli. K supresi proto pravděpodobně dochází až při akumulaci spor *Nosema* v zadním střevě, kde ovlivní vývoj *Lotmaria* či dojde mezi parazity ke kompetici o prostor. Dále u této směsné infekce byla pozorována snížená exprese vitellogeninu, který je nezbytný při regulaci stárnutí. Vitellogenin u včel zabraňuje vzniku stresu a obrací proces úzce spojený se stárnutím. Jeho potlačená exprese tak vyvolává rychlé stárnutí buněk, což má za následek zkrácení délky života včely (Arismendi, Caro, et al., 2020).

2.3.2 Vliv potravy na kondici včel/čmeláků a jejich trypanosomatida

Rostlinné fytochemikálie získané z potravy opylovačů mohou působit jako tzv. přírodní léky proti parazitům. Ačkoliv se sloučeniny extrahované z rostlinné potravy velmi liší, sekundární rostlinné metabolity obsažené v medu, pylu a propolisu jsou důležité v obraně proti patogenům a parazitům. U čmeláků bylo prokázáno, že některé metabolity vykazující antimikrobiální aktivitu redukují infekci patogenů (Erler & Moritz, 2016). Ve studii Koch et al. (2019) byly zkoumány účinky metabolitů pocházejících z rostlin (jetel, vřesovec popelavý, vřes obecný, smetanka, brukev řepka, břechťan popínavý, ostružina černicová, hadinec obecný, planika obecná, lípa) na parazity *C. bombi*. Výsledky ukázaly, že in vitro dochází k inhibici parazitů vlivem působení sekundárního metabolitu callunene z nektaru vřesu (*Calluna vulgaris*). Krátkodobá expozice tímto metabolitem vyvolává u choanomastigotů ztrátu bičíku, který je potřebný pro rozvoj infekce. Zdá se, že rostlinné metabolity tak mohou znemožnit přichycení bičíku k epitelu či jeho motilitu, čímž ztrácí *Crithidia* svou infekčnost. Nepřítomnost metabolitů, a naopak přítomnost parazitů v zadním střevě však naznačuje, že jsou sloučeniny během průchodu trávicí soustavou metabolizovány a k ovlivnění parazita dochází pouze během prostupu mezenterem. Dále byla zjištěna kompletní inhibice růstu *Crithidia* u hadince obecného (*Echium vulgare*). Významné snížení růstu parazita bylo zaznamenáno i u sloučenin z lípy (*Tilia* sp.) a planiky (*Arbutus unedo*). Podle Michaud et al. (2019) krátkodobé vystavení aucubinem, metabolitem z nektaru, může též snížit životaschopnost buněk *C. bombi* u čmeláka *Bombus impatiens*. Stejně účinky měla i kyselina citronová. Dále byl zkoumán např. alkaloid gelsemin získaný z nektaru jasmínovce vždyzeleného (*Gelsemium sempervirens*), který vedl též ke snížení infekce *C. bombi* u čmeláků (Manson et al., 2010).

Pyl získaný opylovači obsahuje v průměru zhruba 35 % bílkovin včetně 50 % volných aminokyselin. Další složky pylu pak tvoří sacharidy, lipidy, vitamíny a minerály (Campos et al., 2008). Pylová strava je důležitá zejména pro vývoj larvy, kladení vajíček a důležitou roli hraje i v imunokompetenci. Omezení v diverzitě živin může vést k tomu, že včely nemohou vytvořit účinnou imunitní obranu, a proto se může zvyšovat riziko infekce (Alaux et al., 2011). O zhoršení imunitní odolnosti *B. terrestris* vůči infekci *C. bombi* způsobenou nedostatkem pylu vypovídá studie Carnell et al. (2020). Jedinci krmení pouze cukernou potravou vykazovali sníženou imunitní odpověď proti parazitům *C. bombi* (Carnell et al., 2020; Folly et al., 2017). Ukázalo se, že pyl může pravděpodobně ovlivňovat i vývojový cyklus parazita (Logan et al., 2005), kdy došlo k narušení pořadí vývojových stádií, ve kterém se paraziti *C. bombi* objevovali v závislosti na složce potravy. U čmeláků s přidaným pylem byl vidět rozdíl v zastoupení morfotypů – nejdříve se v hostiteli objevovali promastigoti, kteří byli poté zastoupeni choanomastigoty a amastigoty. Zároveň tato skupina vykazovala vyšší zatížení parazitem než skupina bez pylu. Opačných výsledků s pylem dosáhla studie Giacomini et al. (2018), ve které neznámá účinná látka z pylu slunečnice (*Helianthus annuus*) způsobovala silnou inhibici vývoje *C. bombi* u čmeláka *B. impatiens*.

2.3.3 Vliv pesticidů na zdraví včel/čmeláků a interakce parazitů s pesticidy

Pesticidy jsou vnímány jako jedna z hlavních příčin syndromu zhroucení včel (CCD) (vanEngelsdorp et al., 2009). Od 2. poloviny 20. století se zvýšila spotřeba pesticidů používaných v zemědělství pro lepší výnos plodin, což s sebou nese i negativní dopad na okolní prostředí (Carvalho, 2017). Jelikož je včela medonosná hlavním opylovačem plodin, je kontakt mezi včelami a pesticidy nevyhnutelný. Při opylování hospodářských plodin jsou včely vystaveny celé řadě pesticidů, jejichž působením se může zvyšovat náchylnost k patogenům. Nebezpečné jsou především pesticidy ze skupiny neonikotinoidů, jejichž účinek spočívá ve vazbě na nikotinový acetylcholinový receptor bezobratlých škůdců (Tomizawa & Casida, 2000). Konkrétně se jedná o imidakloprid, klothianidinu, thiamethoxam a thiakloprid, pro které je nařízený zákaz používání v EU (European Food Safety Authority (EFSA) et al., 2019; Evropská komise (EK), 2013). Avšak tento zákaz neplatí pro země, které nejsou součástí Evropské unie, proto je zde možné setkání s těmito u nás omezenými pesticidy. Povoleným neonikotinoidem v EU zůstává acetamiprid, který není pro včely vnímán jako rizikový (European Food Safety Authority (EFSA), 2016). Zakázané neonikotinoidy představují akutní toxicitu pro včely již ve velmi malých dávkách, řádově jednotky ng na včelu (Suchail et al., 2001). Větší riziko než je akutní toxicita však představuje subletální vliv neonikotinoidů spočívající v ovlivnění chování, reprodukce a orientace, což má za následek postupné skryté slábnutí včelstva (Hladik et al., 2018).

Zvláště rizikový je neonikotinoid imidakloprid, který je navíc spojován s negativním vlivem na učení a paměť včely (Decourtye et al., 2004; Tsvetkov et al., 2017). Ještě více toxický je zejména jeho metabolit imidakloprid-olefin. Při dlouhodobém vystavení tomuto pesticidu vzniká opožděně toxičtější metabolit, což bylo prokázáno u včely medonosné a čmeláků (Erban, Sopko, Talacko, et al., 2019; Suchail et al., 2004). Na čmeláčích koloniích bylo prokázáno, že se imidakloprid-olefin kumuluje a jeho zastoupení je tak ve čmeláčích až 3,4krát vyšší než mateřská látka imidakloprid (Erban, Sopko, Talacko, et al., 2019). Ačkoliv je imidakloprid v EU zakázanou látkou, spolu se svými metabolity může přetrvávat v životním prostředí ve významných množstvích po léta (Benton et al., 2015). Nebezpečí pro opylovače tak může představovat i v zemích, kde se tento pesticid již delší dobu nepoužívá, neboť může docházet k translokaci z půdy do rostlinných pletiv, pylu a nektaru (Bonmatin et al., 2003; Rortais et al., 2005; Seifrtova et al., 2017). U experimentálních čmeláků bylo zjištěno potlačení mevalonátové dráhy (syntéza hormonů) a syntéza mastných kyselin vlivem dlouhodobého působení imidaklopridu. Mechanismus účinku spočívá ve vazbě a v následné blokaci SCAP receptoru, čímž se inhibují nezbytné dráhy pro fungování organismu (Erban, Sopko, Talacko, et al., 2019). Obdobný efekt je pravděpodobný i pro včelu medonosnou. Dále byl zaznamenán negativní vliv na produkci plodu (Dively et al., 2015), kvalitu spermií trubce (Ciereszko et al., 2017), shánění potravy (Bortolotti et al., 2003), velikost hypofaryngeálních žláz (Smodiš Škerl & Gregorc, 2010), aktivitu a termoregulaci (Crall et al., 2018). Čmeláci postižení imidaklopridem vykazují snížený rozvoj a kondici kolonií (Whitehorn et al., 2012).

Závažný problém představuje také kombinace látek, kdy by mohly být samotné subletální dávky pesticidů ve spojení s jinou chemikálií pro včely ještě nebezpečnější. Plodiny mohou být ošetřeny až stovkami různými agrochemikáliemi (Johnson et al., 2010) s nejvyšším zastoupením kombinace insekticidů a fungicidů (Erban, Vaclavikova, et al., 2019). Herbicidy a fungicidy jsou široce používány po celém světě a bylo prokázáno, že mají negativní účinky na zdraví včel (Belsky & Joshi, 2020).

Kombinace pesticidů a parazitů u včel odhaluje jak antagonistické účinky (Bird et al., 2021), tak i předpokládané aditivní či multiplikativní účinky, ke kterým dospěla metaanalýza Siviter et al. (2021).

Většina studií včely medonosné se zaměřuje na *Nosema* spp., *Varroa destructor* a různé včelí viry (Annoscia et al., 2020; Aufauvre et al., 2012; Coulon et al., 2020; Di Prisco et al., 2013; Harwood & Dolezal, 2020; Odemer et al., 2018; Straub et al., 2019). Největší hrozbu pro zdraví včel z těchto zmíněných parazitů představuje ektoparazitický roztoč *V. destructor* (Neumann & Carreck, 2010; Rosenkranz et al., 2010). Negativní dopady parazitů jsou hlavně v důsledku imunitní kompetence hostitele (Di Prisco et al., 2013, 2016), které pak mohou být dále prohloubeny současnou expozicí pesticidy. Například bylo prokázáno, že expozice pesticidy u včel medonosných interferuje s imunitní reakcí tak, že narušuje imunitní signální dráhy a snižuje indukci antimikrobiálních peptidů, zpomaluje hojení ran a snižuje počet cirkulujících hemocytů (Brandt et al., 2017; Di Prisco et al., 2013; James & Xu, 2012), což podporuje šíření patogenů a parazitů (Annoscia et al., 2020; Di Prisco et al., 2013). Například v bakalářské práci (Bártová, 2020) vypracované ve VÚRV byl sledován účinek imidaklopridu na roztoče *V. destructor*, kdy u včel exponovaných tímto roztočem a pesticidem došlo k potlačení genové exprese pro hymenoptaecin, což je polypeptid s antimikrobiálními účinky.

Ve studii Fauser-Misslin et al. (2014) byl zkoumán účinek insekticidů (klothianidin a thiametoxam) na *C. bombi* u čmeláků. Při tomto experimentu byla odhalena významná interakce mezi expozicí neonikotionidů a infekcí *C. bombi* na přežití královny, kdy při kombinaci těchto 2 stresorů bylo přežívání matky nejnižší. Další účinek spočíval ve snížené produkci a délce života dělnic a snížení celkové reprodukční úspěšnosti včelstva. V dalším výzkumu se stejnými druhy pesticidů a parazitů bylo pozorováno u obou faktorů snížení úspěšnosti hibernace čmeláků, avšak jen při jednotlivé expozici. Nebyl zde zjištěn žádný aditivní nebo synergický účinek (Fauser et al., 2017). V jiné publikaci s thiametoxamem vedl pesticid ke snížení podílu matek schopné klást vajíčka (o 26 %), nicméně nebyly pozorovány žádné interaktivní účinky mezi pesticidem a *C. bombi* (Baron et al., 2017). Při expozici čmeláků glyfosátem nebyl zjištěn žádný subletální vliv, stejně jako nebyla nalezena žádná interakce mezi glyfosátem a *C. bombi* (Straw & Brown, 2021). Dalším pozorovaným insekticidem byl například lambda (λ)-cyhalothrin, který neměl žádný významný vliv na *Crithia* u čmeláků (Baron et al., 2014).

Výsledky z laboratorních studií však nejsou s největší pravděpodobností ideální pro předpovídání potenciálních účinků na divoké včely (Wood et al., 2020), a to zejména u samotářských druhů včel. Sociální včely by měly být schopny do určité míry tlumit negativní dopady na úrovni včelstva. Strategie k zabránění vstupu, usazování a šíření patogenů může být například prostřednictvím sociální imunity (tj. behaviorální, fyziologické a organizační adaptace na úrovni včelstva) (Cremer et al., 2007; Meunier, 2015; Wilson-Rich et al., 2008). U solitérních včel by nepříznivé účinky pesticidů, patogenů a jejich interakce měly mít výraznější dopady v důsledku absence sociálního chování (Sgolastra et al., 2019; Straub et al., 2015). Samotářské včely hnízdící v zemi jsou také vystavovány pesticidům, které se hromadí v půdách (Willis Chan et al., 2019). Kooperativní péče o mláďata v hustě osídlených včelstvech společenských včel usnadňuje šíření nemocí (Cremer et al., 2007; Graystock et al., 2015; Manley et al., 2015). Socialita je tedy dalším klíčovým faktorem ovlivňující expozici a přenos pesticidů a expozici, přenos a rezistenci patogenů (Cremer et al., 2007). Účinky pesticidů s největší pravděpodobností převažují nad účinky patogenů, pravděpodobně proto, že včely živící se nektarem z květin a stavějící si ochranná hnízda jsou méně přizpůsobené toxinům ve srovnání s jiným hmyzem (Tiedeken et al., 2016).

3 Materiál a metodika

3.1 Detekce trypanosomatid u volně žijících včel a čmeláků

3.1.1 Sběr a původ vzorků

Vzorky pro detekci včelích parazitů nám byly poskytnuty od Mgr. Jakuba Straky, Ph.D. (PřF UK). K odchytu včel byly použity žluté misky, které svou barvou připomínají květ a lákají tak opylovače. K získání hmyzu se běžně používají tyto misky naplněné jarovou vodou, která zajistí utopení a krátkodobou fixaci hmyzu. Pro naše účely jsme potřebovali zjistit, zda dochází k degradaci DNA parazita, která by mohla být ve včele přítomna. Proto musela být použitá metoda sběru otestována (na včelách medonosných, které se do žlutých misek rovněž chytají a které bývají často napadeny parazitem *Lotmaria passim*) a dle získaných výsledků nedošlo k žádnému významnějšímu poškození DNA. Vzorky byly následně převedeny do lihu a uchovány v -20 °C. Se vzorky včel nám byly současně poskytnuty i údaje o druhu, lokalitě a datu odchytu. Tyto informace jsou shrnuty v tabulce 2.

Tabulka 2: Informace o druhu, počtu a původu včel odchycených pomocí žlutých misek a poskytnuty Mgr. Jakubem Strakou, Ph.D.

Druh včely	Počet	Lokalita	Datum
<i>Andrena</i> spp. (3 druhy)	73	Praha – Dejvice, Lysolaje	04/2019
<i>Apis mellifera</i>	32	Praha – Dejvice, Lysolaje	07/2019
<i>Bombus lapidarius</i>	2	Praha – Lysolaje	04/2019
<i>Bombus pascuorum</i>	1	Praha – Dejvice	07/2019
<i>Bombus terrestris</i>	5	Praha – Lysolaje	04/2019
<i>Colletes cunicularius</i>	11	Praha – Dejvice, Lysolaje	04/2019
<i>Halictus simplex</i>	14	Praha – Dejvice	07/2019
<i>Helictus scabiosae</i>	4	Praha – Lysolaje	04/2019
<i>Lasioglossum</i> spp. (10 druhů)	147	Praha – Dejvice, Lysolaje	04/2019
<i>Megachile pilidens</i>	3	Praha – Dejvice	07/2019
<i>Nomada bifasciata</i>	4	Praha – Dejvice	04/2019
<i>Osmia bicolor</i>	7	Praha – Dejvice	04/2019
<i>Polistes dominula</i>	25	Praha – Dejvice	07/2019
<i>Seladonia tumulorum</i>	2	Praha – Dejvice	07/2019
<i>Sphecodes geoffrellus</i>	1	Praha – Lysolaje	04/2019

Další vzorky byly k dispozici díky spolupráci s Výzkumným ústavem včelařským, s. r. o. v Dole a Výzkumným ústavem rostlinné výroby, v. v. i. v Praze. Včely medonosné byly sklepany z plodového pláště do plastového pytle a ihned umístěny do polyesterového boxu se suchým ledem. Vzorky byly poté skladovány v -20 °C. Přehled počtu vzorků je uveden v tabulce 3.

Tabulka 3: Informace o počtu a původu vzorků včel medonosných z úlů; vzorky jsou seřazeny dle data sběru.

Druh včely	Včelstvo	Počet	Lokalita	Datum
<i>Apis mellifera</i>	6	84	Dol	08/2020
<i>Apis mellifera</i>	4.1	90	Praha – Ruzyně	07/2021
<i>Apis mellifera</i>	4.8	90	Praha – Ruzyně	07/2022
<i>Apis mellifera</i>	4.10	90	Praha – Ruzyně	07/2022

K odchytu čmeláků (v rámci udělených výjimek a povolení) byla použita entomologická síťka (na lokalitě Petřín, Praha) a následně byli uchováni naživu až do okamžiku pitvy před níž byli usmrceni pomocí etanolu nebo byla k odchytu použita Malaiseho past (lokalita Ruda, Veselí n.L.) s lihovou odchytnou nádobou. Údaje o vzorcích viz tabulka 4.

Tabulka 4: Informace o druhu, počtu a původu vzorků; vzorky jsou seřazeny dle data sběru.

Druh čmeláka	Počet	Lokalita	Datum
<i>Bombus terrestris</i>	14	Praha – Petřín	05/2020
<i>Bombus terrestris</i>	9	Veselí n.L. – Ruda	06/2020

3.1.2 Zpracování vzorků a extrakce DNA

3.1.2.1 *Pitva hmyzu*

Před zpracováním vzorků byli jedinci, kteří se uchovávali v lihu, opláchnuti sterilním fyziologickým roztokem. K extrakci DNA byly použity pouze zadečky, ze kterých se vypitvalo střevo. Během pitvy byly vzorky uchovány na ledu. Pitva probíhala pomocí stereomikroskopu (Zeiss, Stemi 305) a sterilních pinzet, které se po každé pitvě střeva vyžihaly nad lihovým kahanem. Na každý vzorek bylo rovněž použito nové čisté podložní sklíčko. Střevo se uchovávalo v 1,5 ml mikrozkuhavce s kapkou fyziologického roztoku opět na ledu. U živých zástupců byly vzorky ještě prohlíženy pod světelným mikroskopem na přítomnost parazitů a ta byla následně ověřena PCR analýzou, kterou podstoupily i vzorky mikroskopicky negativní.

3.1.2.2 *Homogenizace vzorků a extrakce DNA*

Po vypitvání bylo potřeba vzorky homogenizovat sterilními plastovými písty. Homogenizace probíhala již s prvním krokem izolačního protokolu DNA izolačního kitu (Roche), podle kterého se postupovalo. Následující reakce zahrnuje lýzi buněk, navázání DNA na membránu kolonky, promývání navázané DNA, vysušení membrány a eluce navázané DNA.

1. Do 1,5ml mikrozkuhavky přidat tkáň, 200 μ l Tissue lysis buffer, 20 μ l proteinázy K, promíchat a inkubovat při 55 °C, dokud nebude tkáň kompletně zlyzována (15 min).
2. Přidat 200 μ l Binding buffer, promíchat a inkubovat 10 min při 70 °C.
3. Přidat 100 μ l isopropanolu a promíchat.
4. Vložit kolonku do sběrné zkuhavky. Přepipetovat vzorek do kolonky a centrifugovat 1 min 8000 x g.

5. Vyjmout sběrnou zkumavku s tekutinou a vyhodit. Vložit kolonku do nové sběrné zkumavky. Přidat 500 µl Inhibitor removal buffer. Centrifugovat 1 min 8000 x g.
6. Vyjmout sběrnou zkumavku s tekutinou a vyhodit. Vložit kolonku do nové sběrné zkumavky. Přidat 500 µl Wash buffer. Centrifugovat 1 min 8000 x g.
7. Opakovat 6. krok.
8. Po odstranění tekutiny centrifugovat 10 s na nejvyšší rychlost. Vyhodit sběrnou zkumavku.
9. Vložit kolonku do čisté, sterilní 1,5ml mikrozukavky. Přidat 200 µl přehřáté (70 °C) Elution buffer. Centrifugovat 1 min 8000 x g.
10. Uložit mikrozukavky s DNA do -20 °C.

3.1.3 Nested PCR

Pro důkaz přítomnosti DNA trypanosomatid byla provedena specifická amplifikace genu pro 18S rRNA (SSU rRNA) pomocí dvoukrokové polymerázové řetězcové reakce. Pro každý krok reakce byl použit jiný UV box. Pro zabránění další případné kontaminace se používaly špičky s filtry a sterilní stripy.

1. První krok reakce

Reakční směs jednoho vzorku o objemu 10 µl sestávala z 5 µl Master mix Emerald green (Takara Bio), 4 µl H₂O bez nukleáz (Takara Bio), 0,5 µl primerů (Reverse + Forward) a 0,5 µl DNA (koncentrace DNA nebyla zjišťována). Každý PCR běh byl analyzován s pozitivní a negativní kontrolou. Jako pozitivní kontrolu u včel jsme použili DNA z námi vyzolovaných izolátů *Lotmaria passim* ze včely medonosné a *Crithidia bombi* ze čmeláka zemního (postup kultivace a klonování popsán v kapitole 3.2.2 a 3.2.3). Jako negativní kontrola sloužila reakční směs s vodou bez nukleáz.

K detekci včelích trypanosomatid (*Lotmaria passim*, *Crithidia bombi* a dalších jednohostitelských včelích trypanosomatid) byly použity primery pro amplifikaci části genu kódujícího SSU rRNA. Sekvence primerů jsou uvedeny v tabulce 5. Amplifikace probíhala v termocykleru za podmínek sepsaných v tabulce 6.

Tabulka 5: Přehled použitých primerů pro detekci včelích trypanosomatid – první krok nested PCR.

Primer	Sekvence	Úsek	Velikost
S762	GACTTTTGCTTCCTCTADTG	SSU rRNA	cca 2,2 kb
S763	CATATGCTTGTTTCAAGGAC	SSU rRNA	

Tabulka 6: Amplifikační podmínky pro první krok nested PCR.

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
	95 °C	180 s	
Denaturace	95 °C	30 s	32
Annealing	55 °C	30 s	
Elongace	72 °C	90 s	
	72 °C	180 s	

2. Druhý krok reakce

Pro druhý krok nested PCR byl použit dvojnásobný objem reakční směsi. Jeden vzorek o objemu 20 µl obsahoval 10 µl Master mix Emerald green, 8,5 µl H₂O bez nukleáz, 1 µl primerů (Reverse + Forward) a 0,5 µl předchozího PCR produktu. Zde byla jako negativní kontrola použit jednak produkt negativní kontroly z prvního kroku reakce, tak nová negativní kontrola – opět voda bez nukleáz, aby se případně zjistilo, v jakém kroku ke kontaminaci došlo.

Sekvence primerů použity pro druhý krok nested PCR jsou znázorněny v tabulce 7. Teploty a časy jednotlivých kroků amplifikace jsou sepsány v tabulce 8.

Tabulka 7: Přehled použitých primerů pro detekci včelích trypanosomatid – druhý krok nested PCR.

Primer	Sekvence	Úsek	Velikost
TRnSSU-F2	GARTCTGCGCATGGCTCATTACATCAGA	SSU rRNA	cca 2,1 kb
TRnSSU-R2	CRCAGTTTGATGAGCTGCGCCT	SSU rRNA	

Tabulka 8: Amplifikační podmínky pro druhý krok nested PCR.

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
	95 °C	180 s	
Denaturace	95 °C	30 s	30
Annealing	63 °C	30 s	
Elongace	72 °C	80 s	
	72 °C	300 s	

3.1.4 Vizualizace PCR produktů pomocí agarózového gelu

Přítomnost amplifikované DNA byla ověřena a vizualizována pomocí elektroforézy. Na přípravu gelu byla použita agaróza (Invitrogen Ltd.) a TAE pufr (AppliChem GmbH, BioChemica) o výsledné koncentraci 1 %. Aby mohla proběhnout vizualizace pod UV světlem, bylo při přípravě gelu přidáno barvivo Sybr Safe (Invitrogen Ltd.). Směs byla nalita do elektroforetické vany s potřebnými hřebeny. Po ztuhnutí gelu byly hřebeny vyjmuty a do vytvořených jamek napipetováno příslušné množství DNA a do jedné jamky GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas life science) pro určení velikosti PCR produktu. Následně byla spuštěna elektroforéza při napětí 120 V. Po 40 minutách byl odečten výsledek na základě UV transiluminátoru.

3.1.5 Příprava na sekvenaci a následná analýza

Vzorky, které byly pozitivní na agarózovém gelu, byly připraveny na sekvenaci a následně odeslány na do sekvenační laboratoře (BIOCEV, PřF UK). Příprava proběhla následujícím způsobem: k 5 µl PCR produktu byl přidán 1 µl enzymu ExoSAP (práce probíhala na ledu) a reakční směs byla vložena do termocykleru (37 °C 8 min, 80 °C 2 min, 4 °C). Následně byl do 1,5 µl produktu přidán 1,5 µl Reverse primer 1000 R (viz tabulka 9) a objem byl doplněn vodou bez nukleáz do 8 µl. Pro případnou sekvenaci celého úseku malé ribozomální podjednotky (SSU rRNA) byly použity další primery (1000 F, 577 F, 577 R, 1510 F, 1510 R – viz tabulka 9).

Hotové sekvence z laboratoře byly zanalyzovány pomocí programu BLAST, díky kterému byly jednotlivé sekvence přiřazeny k odpovídajícímu rodu/druhu organismu.

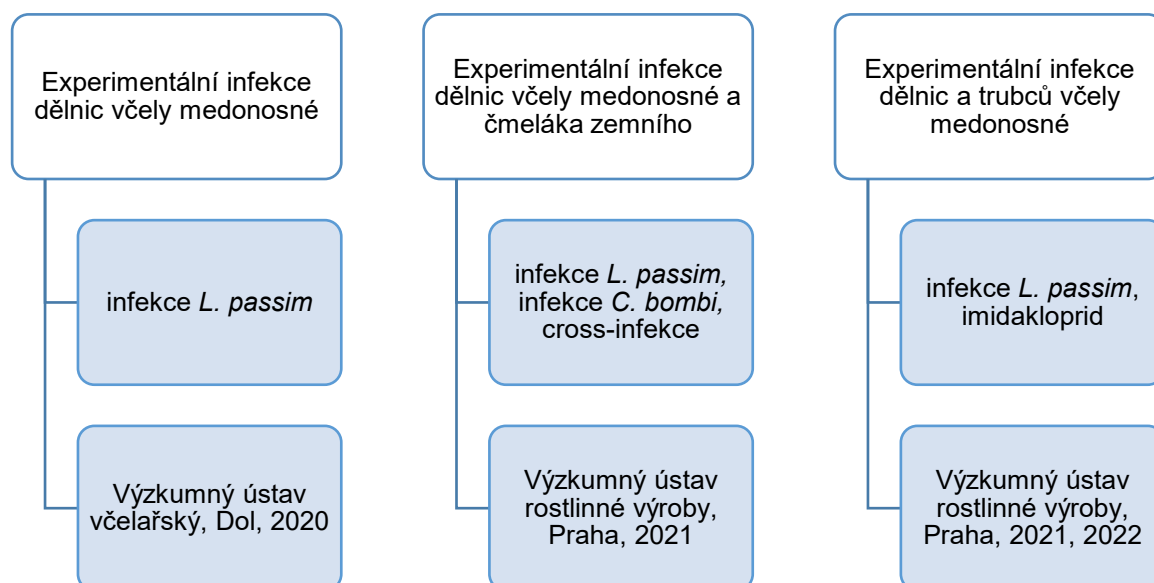
Tabulka 9: Přehled použitých primerů pro sekvenaci SSU rRNA.

Primer	Sekvence
1000 F	AGACGAACTACAGCGAAGGCAT
1000 R	ATGCCTTCGCTGTAGTTCGTCT
577 F	GCCAGCACCCGCGGT
577 R	ACCGCGGGTGCTGGC
1510 F	CAGGTCTGTGAYGCTG
1510 R	CAGCRTCACAGACCTG

3.2 Experimentální infekce včel trypanosomatidy

Pro pokusy s experimentálními infekcemi byly navrženy 3 metodické postupy, a to z důvodu 3 různě prováděných variant pokusů. Všechny varianty/experimenty jsou pro lepší přehlednost a orientaci shrnuty na schématu 1.

Schéma 1: Přehled všech prováděných experimentů.



Následující kapitoly (3.2.1, 3.2.2, 3.2.3) jsou společné všem uvedeným experimentům.

3.2.1 Test přítomnosti trypanosomatid u líhnoucích se včel

Před plánováním a zahájením jakékoliv infekce bylo potřeba otestovat líhnoucí se včely na přítomnost parazitů. Odběr probíhal pomocí pinzety, kdy včely byly vyndány za křídla přímo z buňky, aby nedošlo k žádné kontaminaci, ať už s plodovým pláštěm či s jinými včelami. Vzorky byly zamrazeny na suchém ledu v 1,5 mL mikrozkuřkách. Včely byly odebrány ze dvou lokalit: v Dole – Měslovice

a v Praze – Ruzyni (přehled uveden v tabulce 10). Vzorby byly zpracovány podle izolačního protokolu v kapitole č. 3.1.2 a testovány metodou PCR dle postupu uvedeného v kapitole č. 3.1.3.

Tabulka 10: Přehled odběru líhnoucích se včel, vzorky jsou seřazeny dle data sběru.

Druh včely	Včelstvo	Počet včel	Lokalita	Datum
<i>Apis mellifera</i>	75	20	Dol	08/2020
<i>Apis mellifera</i>	77	20	Dol	08/2020
<i>Apis mellifera</i>	88	20	Dol	08/2020
<i>Apis mellifera</i>	4.1	20	Praha – Ruzyně	06/2021
<i>Apis mellifera</i>	4.8	20	Praha – Ruzyně	07/2022
<i>Apis mellifera</i>	4.10	20	Praha – Ruzyně	07/2022

Pomocí molekulárních metod bylo také testováno 30 čmeláků zemních (získány z certifikovaného chovu z Belgie a chovány ve VÚRV) na přítomnost/nepřítomnost parazitů *Crithidia bombi* z důvodu plánovaného experimentu se čmeláky.

3.2.2 Kultivace trypanosomatid

Pro experimentální infekce bylo nutné mít kultury *Lotmaria passim* a *Crithidia bombi*, na jejichž získání byly použity mikroskopicky pozitivní včely a čmeláci. Jako kultivační médium bylo použito tekuté BHI médium (Bacto™ Brain Heart Infusion) o složení:

- 37 g práškového BHI na 1 litr
- HEMIN: 10mg/ml (in 0.1M NaOH) – v ředění 1:1000
- 10% heat-inactivated fetal bovine calf serum (FBS)
- 250-500 µg/mL amikacin

Buňky v plochých kultivačních zkumavkách (Nunc) byly následně uloženy v horizontální poloze v inkubátoru při teplotě 23 °C a cca každé 2 týdny přeočkovány ve flowboxu do nových zkumavek.

3.2.2.1 Barvení sklíček dle Giemsa-Romanowski

Vzorby, u kterých byli včelí paraziti detekováni pod mikroskopem, byly využity i na přípravu trvalých barvených preparátů. Na barvení bylo použito barvivo Giemsa-Romanowski. Podložní sklíčko s parazity bylo fixováno methyalkoholem 3-5 minut. Suchý preparát byl barven zředěným roztokem Giemsy-Romanowského (1:20 destilovaná voda) 20 min. Preparát byl opláchnut pod tekoucí vodou, následně destilovanou vodou a ponechán uschnout ve svislé poloze.

3.2.3 Klonování

Z buněčné axenické kultury obou druhů (*Lotmaria passim* a *Crithidia bombi*) byl získán klon, který byl poté v termostatu namnožen a použit jako zdroj nákazy pro včely či čmeláky.

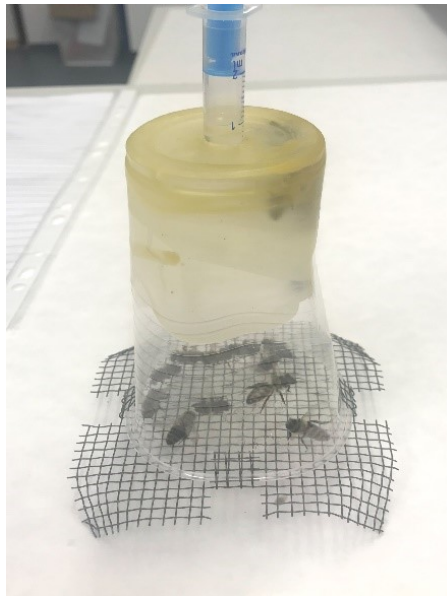
K získání klonu byla nejprve použita metoda izolace klonu výsevem na čokoládové agarové plotny pomocí bakteriologické kličky. Avšak tato izolace klonu (kultivace) byla neúspěšná a nedošlo k žádnému nárůstu kolonií na povrchu agarové plotny. Klonování dále probíhalo metodou limitačního ředění na mikrotitračních destičkách. Inokulum s parazity bylo ředěno kultivačním médiem za předpokladu, že v 96 jamkové destičce budou buňky přítomné jen v několika málo jamkách (2-5), zatímco zbylá většina jamek bude naplněna čistým médiem. Kultura s buňkami byla nejprve spočítána

v Bürkerově komůrce a zředěna médiem na koncentraci 5×10^4 buněk/ml. Poté byla vytvořena ředící řada až na konečnou koncentraci 5 buněk/ml. Poslední ředící suspenze byla pomocí pipety přenesena do 50 mL zkumavky s 24 ml BHI média a promíchána. Pomocí osmikanálové pipety byla touto ředěnou suspenzí naplněna mikrotritační destička (1 jamka o objemu 250 μ l). Destička byla uzavřena a kultivována několik dní při 23 °C. Následně byla destička prohlédnuta pod mikroskopem a z pozitivních jamek byly vyočkovány klonové kultury do kultivačního média.

3.3 Experimentální infekce *Lotmaria passim* u včely medonosné

3.3.1 Příprava pokusných nádob

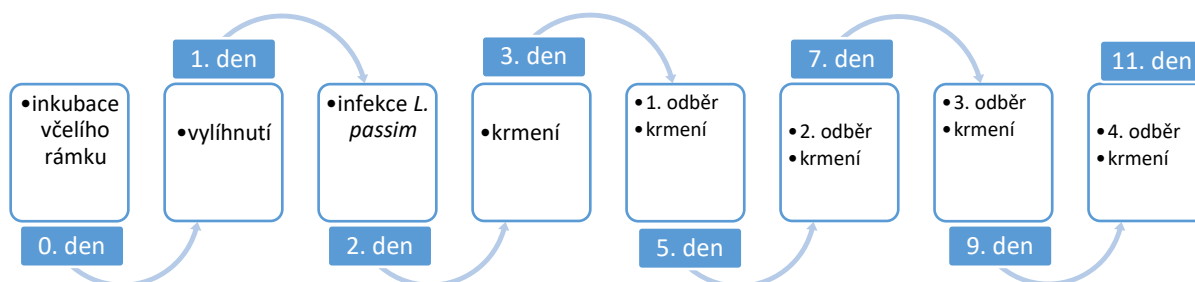
Na přípravu prvních klíček, ve kterých byl proveden pokus na 30 včelách, byl použit plastový kelímek s hliníkovou sítovinou, jak je vidět na fotografii č.1. Vnitřek kelímku byl povoskován a do horní části byla vpravena 2ml injekční stříkačka pro potravu a parazity.



Fotografie č.1: Pokusná nádoba pro 30 včel

3.3.2 Časové schéma experimentu

Schéma 2: Časový plán pokusu s dělnicemi včely medonosné.



3.3.3 Odběr a uchování včel

Do termostatu byly vloženy dva rámků se včelím plodem na vylíhnutí (48 h), ve kterém byly i včely následně uchovány v kelímkách po dobu probíhajícího pokusu (11 dnů). Teplota byla nastavena na 31 °C. Na pokus bylo pomocí pinzety z vylíhnutého plodového plástve odebráno celkem 270 včel (1 kelímek po 30 včelách).

Tabulka 11: Přehled skupin a počet odebraných včel.

Skupina	Včelstvo	Počet včel	Lokalita	Datum
1. Kontrola	75	30	Dol	09/2020
2. Kontrola	75	30	Dol	09/2020
3. Kontrola	75	30	Dol	09/2020
4. <i>L. passim</i>	75	30	Dol	09/2020
5. <i>L. passim</i>	75	30	Dol	09/2020
6. <i>L. passim</i>	75	30	Dol	09/2020
7. <i>L. passim</i>	75	30	Dol	09/2020
8. <i>L. passim</i>	75	30	Dol	09/2020
9. <i>L. passim</i>	75	30	Dol	09/2020

3.3.4 Příprava potravy a infekce

Včely byly po odběru krmeny 50% cukerným roztokem (1 litr vařící vody na 1 kg cukru) krmítkem o objemu 1,5 ml.

3.3.4.1 Infekční dávka parazitů

Infekční dávka parazitů je převzata z Schwarz & Evans (2013), kdy 1 včela vypije průměrně 10 μ l potravy s 10 000 buňkami parazitů. Dávka parazitů byla včelám podána pouze jednou (48 hodin po líhnutí).

Buňky *Lotmaria passim* byly nejprve spočítány v Bürkerově komůrce. Pasáž použita pro tuto infekci byla pasáž číslo 6. Z buněčné kultury bylo odebráno 100 μ l do mikrozkušavky a přidáno 900 μ l fyziologického roztoku s formalínem (10%). Zkušavka byla promíchána a touto suspenzí naplněna komůrka. Následně bylo spočítáno množství buněk v 1 ml kultury. Pro tento experiment byla koncentrace v 1 ml buněčné kultury $1,116 \times 10^7$.

Výpočet infekční dávky parazitů v cukerném roztoku

Aby bylo zajištěno přežívání parazitů v cukerném roztoku, byl cukerný roztok ředěn buněčnou kulturou s parazity do různých koncentrací a po dobu několika hodin sledován pohyb bičíkoveců. Cukr byl rozpuštěn ve vodě v poměru 2:1 (67% roztok). Byly sledovány tyto poměry cukru a média s parazity: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4. U první koncentrace parazité umírali už po 3 hodinách. U druhé koncentrace parazité vydrželi 24 hodin, nicméně již po několika málo hodinách byla nápadná snížená pohybová aktivita. U následujících poměrů přežívali více než 24 hodin bez změněné aktivity (vůči kontrole), což bylo pro naše experimenty klíčové, jelikož parazité byli včelám podávány po dobu 24 hodin. Abychom zajistili co nejsladší potravu, aby byla pro včely co nejvíce atraktivní, vybrali jsme koncentraci mezi 2. (1:2) a 3. (1:3) ředěním. Výsledný poměr cukerného roztoku a parazita v médiu doplněný o převařenou vodu byl 1:2,3, což odpovídá 20% cukernému roztoku. I zde bylo zaznamenáváno přežívání, které bylo sledováno po dobu 24 hodin bez známek snížení pohyblivosti buněk.

Výsledek infekční dávky parazitů v cukerném roztoku

- 1 ml potravy = 100 μ l 10^7 buněk/ml kultury + 600 μ l převařené vody + 300 μ l 67% cukerného roztoku
 - ✓ Splněna infekční dávka pro 1 včelu = 10^4 buněk v 10 μ l
 - ✓ Splněná koncentrace cukerného roztoku = 20 %

3.3.5 Odběr a zpracování vzorků

Včely byly odebírány každý druhý den (2 jedinci z každé skupinky). První odběr byl 72 hodin po podání *L. passim* a probíhal až do vymření včel (11 dnů).

Odběr vzorků probíhal pomocí pinzety a včely byly usmrceny v ethanolu a následně vypitvány. Střeva byla prohlížena pod světelným mikroskopem s cílem zjistit případnou probíhající infekci, její lokalizaci a intenzitu. Kontrolní skupiny včel byly zpracovány na nested PCR analýzu dle protokolů v kapitolách 3.1.2, 3.1.3.

3.4 Experimentální infekce *L. passim*, *C. bombi* a cross-infekce u včely medonosné a čmeláka zemního

3.4.1 Příprava pokusných nádob

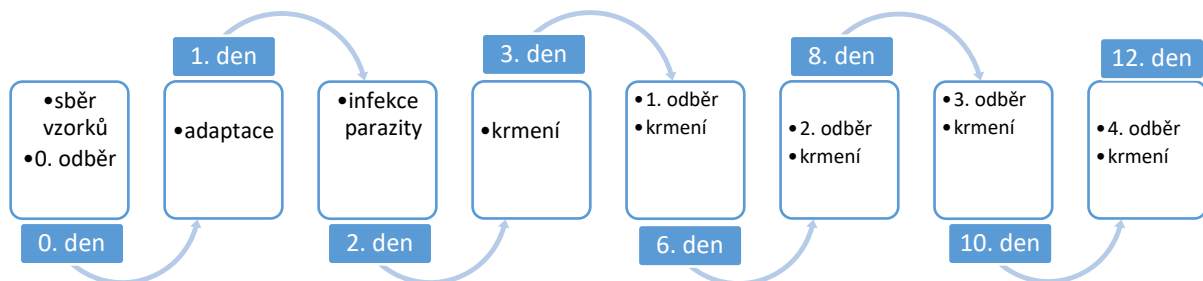
Pro pokus se čmeláky a včelami byly klíčky zhotoveny z plastových krabiček (fotografie č. 2). Aby měl hmyz dostatek kyslíku, místo klasického víčka byly použity 2 víčka, mezi která byla vložena síť a upevněna pomocí kancelářské sešívačky. Pro krmivo sloužily 2 injekční stříkačky o objemu 2 ml. Pro infekční dávku zde byla navíc 1ml injekční stříkačka, která byla po infekci vyjmuta.



Fotografie č.2: Pokusná nádoba pro 4 včely/čmeláky

3.4.2 Časové schéma experimentu

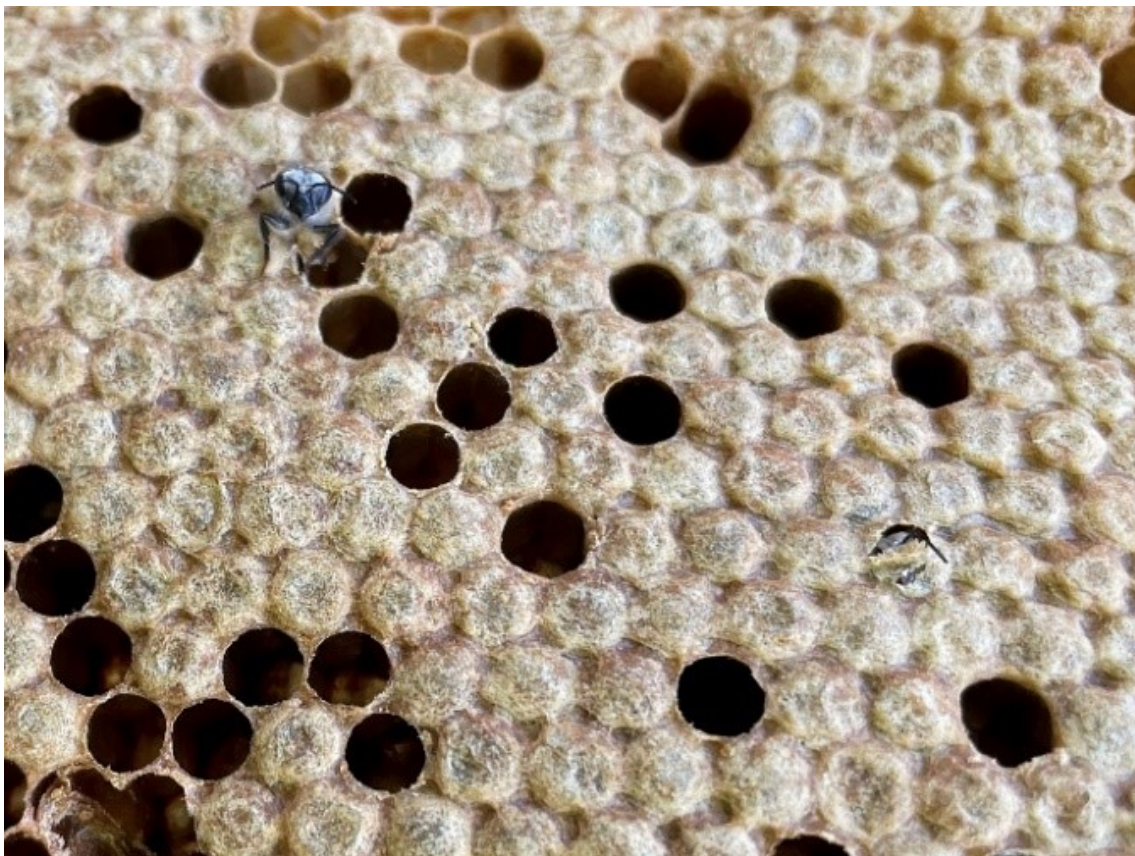
Schéma 3: Časový plán pokusu s dělnicemi včely medonosné a čmeláka zemního.



3.4.3 Odběr a uchování včel a čmeláků

Čmeláci použité na experimenty pocházely z certifikovaného belgického chovu a ve VÚRVu chovány v plastových boxech v temné místnosti a krmeni 50% cukerným roztokem s pylem. Odběr probíhal ve tmě za červeného světla. Čmeláci byli pomocí oxidu uhličitého uspáni. Odebráno bylo 64 ks pomocí pinzety do plastových krabiček. Ty se poté uchovávaly v termostatu ve 35 °C.

Pro sběr líhnoucích se včel byly důležité příznivé podnební podmínky, které mají vliv na chování včelstva. Z tohoto důvodu pokusy probíhaly v létě za vysokých teplot, kdy včely začínají více plodovat. Pro všechny další experimenty byly vzorky sbírány následujícím způsobem. Ze včelí plástve byly odebírány čerstvě se líhnoucí včely, aby bylo zabráněno kontaktu se včelím plástem, kde by se mohla vyskytovat případná kontaminace či aby bylo zabráněno kontaktu s dalšími včelami, od kterých by se mohly nakazit. Na fotografii č. 3 je znázorněno prokousávání včel z buňky. Každá včela byla zkontrolována na základě svého chování, zda je zdravá, a hlavně bez roztočů (*Varroa destructor*). Během pokusů jsme používali pouze včely neobsahující roztoče, aby nedošlo k ovlivnění výsledků jejich přítomností. Včelstva použitá pro experimenty neměla žádné roztoče. Takto odebráno bylo 64 včel na “krabičkový” pokus (viz tabulka 12) a umístěno do termostatu (35 °C). Protože jsme prováděli cross-infekce, jednalo se celkem o 4 varianty (*L. passim*, *C. bombi*, *L. passim* + *C. bombi*, kontrola), kdy včely byly uchovány v krabičkách po 4. Každá varianta byla takto provedena 4× (4 opakování po 4 včelách = 4×4).



Fotografie č.3: Líhnoucí se včely prokousávají se zavíčkovanou buňkou

Tabulka 12: Přehled skupin a počet odebraných včel a čmeláků.

Skupina	Včelstvo	Počet	Lokalita	Datum
1. Kontrola	čmeláci 1	4×4	Praha – Ruzyně	06/2021
2. <i>C. bombi</i>	čmeláci 1	4×4	Praha – Ruzyně	06/2021
3. <i>L. passim</i>	čmeláci 1	4×4	Praha – Ruzyně	06/2021
4. <i>C. bombi</i> + <i>L. passim</i>	čmeláci 1	4×4	Praha – Ruzyně	06/2021
5. Kontrola	včely 4.1	4×4	Praha – Ruzyně	06/2021
6. <i>L. passim</i>	včely 4.1	4×4	Praha – Ruzyně	06/2021
7. <i>C. bombi</i>	včely 4.1	4×4	Praha – Ruzyně	06/2021
8. <i>C. bombi</i> + <i>L. passim</i>	včely 4.1	4×4	Praha – Ruzyně	06/2021

3.4.4 Příprava potravy a infekce

Čmeláci i včely dostávali také 50% cukerný roztok, ale současně s rozpuštěným pylem. Používán byl 100% včelí pyl rouskovaný (Naturalis). Nejdříve bylo potřeba pyl lyofilizovat, aby neobsahoval žádné množství pesticidu. Před lyofilizací byl pyl přesypán do zkumavek s děrovaným víčkem překryté filtračním papírem. Sušení mrazem proběhlo v lyofilizátoru přes noc. Poté byla děrovaná víčka vyměněná za klasické víčko a zkumavky byly takto uskladněny v -60 °C. Pyl byl včelám podáván v koncentraci 5 g pylu na 1 kg potravy. Pro krmení s pylem byly proto vytvořeny zásobní roztoky pylu (kapitola č. 3.4.4.1). Pyl byl nejprve rozemlet v kávovém mlýnku a rozpuštěn v daném množství převařené vody. Aby se pyl lépe rozpustil a neobsahoval větší kousky, byl použit ultrazvukový homogenizátor (Bandelin) s nastavenými hodnoty: čas 2 min, puls 10 s. Následovala sterilizace v autoklávu a poté skladování v +5 °C.



Fotografie č.4: Postup přípravy pylu



Fotografie č.5: Ultrazvuková sonikace

3.4.4.1 Příprava zásobního roztoku pylu

Výpočet zásobního roztoku pylu

- Potřebná koncentrace: 5 g pylu v 1 kg potravy = 0,5 g pylu ve 100 g potravy
- Zásobní roztok: 1 g pylu rozpuštěný ve 20 g převařené vody

- Do 100 g potravy bylo přidáno 10,5 g zásobního roztoku pylu

Výsledný cukerný roztok s pylem

- Cukerný roztok byl připraven z 1 kg g cukru + 895 g převařené vody + 105 g zásobního roztoku pylu (50% cukerný roztok)
 - Roztok byl uchováván při +5 °C a obden obměňován

3.4.4.2 Infekční dávka parazitů

Parazité byli též obsaženi v cukerném roztoku, jak je uvedeno v kapitole č. 3.3.4.1. Dávka parazitů byla podána včelám a čmelákům po 24hodinové adaptaci v termostatu, a to opět pouze jednorázově po dobu 24 hodin. Infekce proběhly v následujícím složení: čmeláci nakaženi (i) *Crithidia bombi*, (ii) *Lotmaria passim* a (iii) současně *Crithidia bombi* + *Lotmaria passim*; stejně tak včely nakaženy (i) *Lotmaria passim*, (ii) *Crithidia bombi* a (iii) současně *Crithidia bombi* + *Lotmaria passim*. Infekční dávka pro 1 včelu byla spočítána na $2,7 \times 10^4$ buněk v 10 μ l potravy a pro 1 čmeláka $1,6 \times 10^4$ buněk v 10 μ l potravy (předpokladem je, že čmelák přijme cca dvojnásobek potravy než včela) a byla spočítána dle kapitoly č. 3.3.4.1. Pro infekce s oběma parazity naráz byly tyto kultury smíchány v poměru 1:1, kdy byla celková infekční dávka zachována, ale obsahovala poloviční dávku z každého trypanosomatida. Použitá pasáž byla č. 6 pro oba druhy cizopasníků.

3.4.5 Odběr a zpracování vzorků

Včely byly také odebrány každý druhý den (z každé skupiny 4 jedinci). První odběr byl uskutečněn až po čtyřech dnech (kvůli nízkému počtu nakažených jedinců) po podání dávky parazitů a probíhal až do vymření včel (12 dnů).

V následujících experimentech (i v tomto) nám nešlo o lokalizaci a detekci infekce, nýbrž o její kvantifikaci. Proto byly včely a čmeláci usmrceny na suchém ledu. Jedinci byli vyndáni z klíčky sterilní pinzetou a přeneseni do plastových krabiček v polystyrenovém boxu se suchým ledem. Po odběru ihned umístění do -60 °C. Následovalo zpracování vzorků na qPCR analýzu. Vzorky byly zpracovány jako je uvedeno v kapitolách č. 3.1.2 s tím rozdílem, že zde nebyly pitvány střeva, ale k extrakci DNA byly vzhledem k vybrané kvantitativní analýze použity celé zadečky. Ty se povrchově sterilizovaly 96% ethanolem a čistily sterilním fyziologickým roztokem za účelem odstranění povrchové mikroflóry včetně parazitů.

3.4.6 qPCR

Pro analýzu absolutní kvantifikace byla použita polymerázová řetězová reakce v reálném čase, a to konkrétně pro *L. passim* multiplex (simplex) PCR s fluorescenčně značenými sondami Taqmanovského typu (HEX) a pro *C. bombi* SYBR Green PCR. Pro čmeláčí *Crithidia* byla navrhnutá i Taqman sonda s barvivem FAM a primery pomocí databází Uniprot, NCBI a programu MEGA – alignment tool. Navrhnuté sondy a primery byly ověřeny v BLAST databázi. Avšak tento návrh nebyl účinný, qPCR nefungovala, a tak byla použita esej pro SYBR Green. Pro kontrolu správné funkce kvantitativní analýzy a předcházející izolace DNA jsme testovali všechny vzorky také na včelí referenční gen, který se u všech zástupců včel vyskytuje v totožném množství. U včel jsme analyzovali referenční gen pro skupinu Hymenoptera za použití simplex qPCR s barvivem CY5 a u čmeláků pro skupinu Apidae SYBR Green.

Celý proces přípravy na qPCR probíhal ve flowboxu na ledu. Reakční směs u obou obsahovala 5 μ l Master mix (Probe/ROX, SYBR Green), 1 μ l primerů (Reverse + Forward) a 2 μ l vody bez nukleáz. 8 μ l této směsi bylo napipetováno do 96jamkové PCR destičky a do každé jamky přidány 2 μ l DNA či negativní kontrola (voda bez nukleáz).

Aby mohlo být spočítáno množství DNA ve vzorku, byly vytvořeny standardy o známé koncentraci. Buňky byly spočítány v Bürkerově komůrce a následně ředěny desítkovou řadou. Mezi každým následujícím ředěním byla předchozí suspenze promíchána a stočena. Pro lepší a přesnější odhad koncentrace bylo vytvořeno i ředění 1:4 (tabulka 13), které se používalo místo standardů původních. Objem standardů byl zvolen stejný jako objem elučního roztoku při izolaci DNA ze včelích zadečků (200 µl), aby se koncentrace DNA ve vzorku 1 včely lépe počítala. Tato vytvořená ředící řada byla také přidána do destičky, zalepena krycí fólií a stočena na centrifuze po dobu 30 s při 3000×g. Jednotlivé kroky reakce jsou shrnuty v tabulkách 15 a 17 a použité primery (sondy) v tabulkách 14 a 16.

Tabulka 13: Přehled použitých standardů pro *L. passim* a *C. bombi*.

ředění	Počet buněk <i>L. passim</i> ve 100 µl vzorku	Počet buněk <i>C. bombi</i> ve 100 µl vzorku
0.	5 000 000	8 000 000
1.	1 000 000	1 600 000
2.	200 000	320 000
3.	40 000	64 000
4.	8 000	12 800
5.	1 600	2 560
6.	320	512

Tabulka 14: Přehled použitých primerů pro detekci *C. bombi* a *Apidae*, SYBR Green qPCR (Bartolomé et al., 2018).

Primer	Sekvence	Specifita	Úsek	Velikost
ApidaeF	AGATGGGGGCATTCGTATTG	Apidae	18S	130 bp
ApidaeR	ATCTGATCGCCTTCGAACCT	Apidae	18S	130 bp
CbTOP-F1	CGAGGTGCGGCTCAACA	<i>Crithidia bombi</i>	TOPII	133 bp
CbTOP-R1	GATGCAGCCATTCGGGCT	<i>Crithidia bombi</i>	TOPII	133 bp

Tabulka 15: Amplifikační podmínky pro SYBR Green qPCR.

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
Preinkubace	95 °C	10 s	1
Amplifikace	95 °C	10 s	40
	60 °C	10 s	
	72 °C	10 s	
	95 °C	5 s	
Teplota tání	65 °C	60 s	1
	95 °C		
	40 °C		
Chlazení	40 °C	30 s	1

Tabulka 16: Přehled použitých primerů pro detekci *L. passim* a Hymenoptera, Simplex qPCR (Xu et al., 2018).

Primer/sonda	Sekvence	Specifita	Úsek	Velikost
Hym18S_F	TAACTGGCATTATGTGGTACGTC	Hymenoptera	18S	100 bp
Hym18S_R	CCTCGACACTCAGTGAAGAGC	Hymenoptera		
Hym_prb Cy5	AGCTCCTYGC GGGCGGTCCAA-BHQ1	Hymenoptera		200 bp
Lp_CB_F	CGAGCTCATAAAAATAATGTAAGCAAAAT AAG	<i>L. passim</i>	Cyt b	100 bp
Lp_CB_R	TTTTAGCAATATTTTAGCAACAGTACCA G	<i>L. passim</i>		
Lp_CB_Prb HEX	TTGGTGTTGGCTATGT-BHQ1-MGB	<i>L. passim</i>		300 bp

Tabulka 17: Amplifikační podmínky pro Simplex qPCR.

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95 °C	10 s	1
Cyklení	95 °C	15 s	40
	60 °C	60 s	
Chlazení	40 °C	60 s	1

3.5 Experimentální infekce *L. passim* a imidaklopridem u dělnic včely medonosné a *L. passim* u trubců včely medonosné

3.5.1 Příprava pokusných nádob

Pro větší pokusy a větší množství odebraných včel byly vyrobeny klícky z plastových boxů s víkem. Vnitřek boxu byl potřen voskem, který byl předem roztaven ve vodní lázni. Vosk sloužil pro přirozenější prostředí včel. Z důvodu přirozenějších podmínek byla i na dno boxu vložena oboustranná hygienická podložka z pařeného říčního písku, mletého vápence, drceného dřevěného uhlí a minerálních přísad (WIVRAL-HB, fotografie č. 9). Aby uvnitř nedocházelo k přílišné vlhkosti, byl do klícky umístěn sáček s hydrogelem (též fotografie č. 9). Ze stran byly vyvrtány díry, do kterých se upevnila napáječka o objemu 50 ml a 2ml injekční stříkačka. Napáječka byla upravena tak, aby nedocházelo k úniku včel skrz pítko a zároveň aby úprava nebránila průchodu parazitických prvoků. Otvor sloužící k případnému úniku byl zakryt pomocí sítky a připevněn plastovým drátkem, aby nedošlo ke korozi (fotografie č. 10). Do víčka bylo vyřezáno pár děr kvůli výměně kyslíku. Aby nedocházelo k cirkulaci kontaminace, byly díry zakryty filtračním papírem a přilepeny lepicí páskou (fotografie č. 6). Zhotovený box viz fotografie č. 6-11.



Fotografie č.6:
Pohled shora na víčko



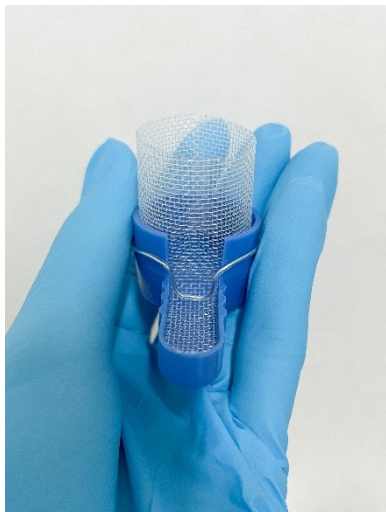
Fotografie č.7:
**Pohled ze strany
na napáječku**



Fotografie č.8:
**Pohled ze strany
na injekční stříkačku**



Fotografie č.9:
**Pohled dovnitř na podložku
a sáček s hydrogelem**



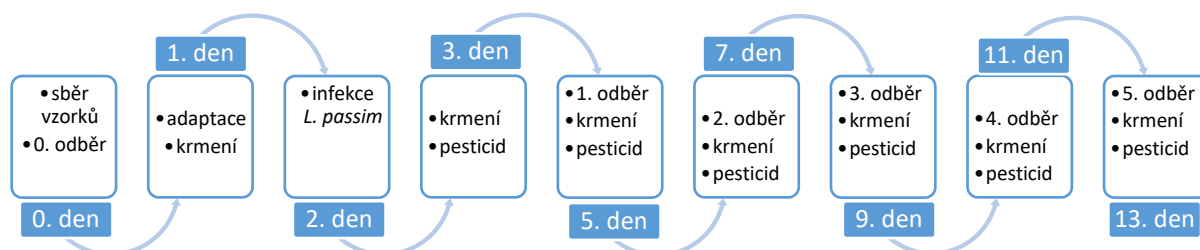
Fotografie č.10:
**Upravené pítko
se sítkou a drátkem**



Fotografie č.11:
**Naplnění injekční stříkačky
inokulem s parazity**

3.5.2 Časové schéma experimentu

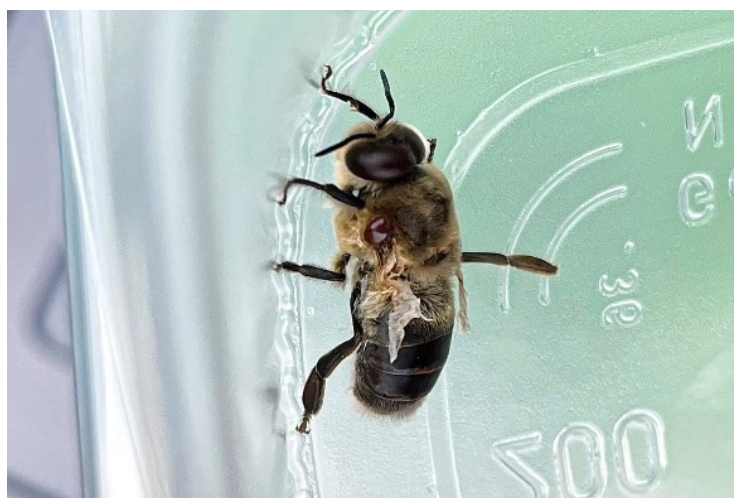
Schéma 4: Časový plán pokusu s dělnicemi a trubci včely medonosné.



3.5.3 Odběr a uchování včel

Včely byly odebírány a kontrolovány na roztoče stejným způsobem jako je popsáno v kapitole č. 3.4.3. Uchovány byly též v termostatu při 35 °C. Jednotlivé skupinky byly ještě umístěny do větších plastových uzavíratelných boxů, aby nedocházelo ke vzájemným kontaminacím. Na pokusy bylo odebráno 350 včel v roce 2021 a 305 včel v roce 2022. V roce 2022 nebyla použita skupina Kontrola, která pro naše pokusy není potřebná. Z předchozích roků z kontrolních skupin a zároveň z analýzy líhnoucích se včel totiž víme, že se *Lotmaria passim* u líhnoucích včel nevyskytuje a nelze ji získat jinak než skrz infikované výkaly, potravu či z plástových buněk. Dále nás zajímal hlavně rozdíl mezi včelami s *L. passim* a IMI a včelami s *L. passim* bez IMI, tzn. interakce IMI a trypanosomatid.

Ze zvědavosti jsme chtěli tentýž pokus provést i na líhnoucích se trubcích. Jelikož je ale trubec preferovaným hostitelem roztočů *Varroa destructor*, obávali jsme se, že na trubčím plodu bude přítomen, ačkoliv na dělnicích nebyl nalezen žádný. Obava se naplnila a zkomplikovala nám odběr trubců, kdy spousta jedinců měla zdeformovaná křídla (viz fotografie č. 12). Podařilo se nám odebrat pouze 5 trubců bez roztočů či bez viditelných známek přítomnosti viru přenášených tímto roztočem.



Fotografie č.12: Trubec s roztočem (*Varroa destructor*) a deformovanými křídly

Tabulka 18: Přehled skupin a počet odebraných včel.

Skupina	Včelstvo	Počet včel	Lokalita	Datum
1. Kontrola	Včely 4.1	50	Praha – Ruzyně	07/2021
2. <i>L. passim</i>	Včely 4.1	50	Praha – Ruzyně	07/2021
3. <i>L. passim</i>	Včely 4.1	50	Praha – Ruzyně	07/2021
4. <i>L. passim</i>	Včely 4.1	50	Praha – Ruzyně	07/2021
5. <i>L. passim</i> + IMI	Včely 4.1	50	Praha – Ruzyně	07/2021
6. <i>L. passim</i> + IMI	Včely 4.1	50	Praha – Ruzyně	07/2021
7. <i>L. passim</i> + IMI	Včely 4.1	50	Praha – Ruzyně	07/2021
8. <i>L. passim</i>	Včely 4.8	50	Praha – Ruzyně	06/2022
9. <i>L. passim</i>	Včely 4.8	50	Praha – Ruzyně	06/2022
10. <i>L. passim</i>	Včely 4.10	50	Praha – Ruzyně	06/2022
11. <i>L. passim</i> + IMI	Včely 4.8	50	Praha – Ruzyně	06/2022
12. <i>L. passim</i> + IMI	Včely 4.10	50	Praha – Ruzyně	06/2022
13. <i>L. passim</i> + IMI	Včely 4.10	50	Praha – Ruzyně	06/2022
14. <i>L. passim</i>	Včely 4.10	5	Praha – Ruzyně	06/2022

3.5.4 Příprava potravy a infekce

3.5.4.1 Sirupová dieta

Potrava pro včely byla vylepšena, a kromě pylu (kapitola č. 3.4.4.1) byla připravena ze sirupu místo klasického cukru. Sirup (Apisyrup 71/73 Natural Protect) je dodáván v jednotkách °Bx, která uvádí počet cukru rozpuštěného ve vodném roztoku. Jeden stupeň Brix odpovídá 1 g cukru ve 100 g roztoku. Sirup byl přepočítán a naředěn převařenou vodou a zásobním roztokem pylu do potřebné 50% koncentrace. Výsledný výpočet pro 100 g potravy se sirupem: 68,7 g sirupu + 20,8 g převařené vody + 10,5 g zásobního roztoku pylu.

Tabulka 19: Parametry sirupu, LOQ = mez stanovitelnosti.

Parametr	Naměřená hodnota	Jednotka
Brix	72,8	°Bx
pH	4,2	
Fruktóza	42	%
Glukóza	32	%
Sacharóza	26	%
Ostatní cukry	pod LOQ	%
Hydroxymethylfurfural	29	ppm

3.5.4.2 Infekční dávka parazitů

Dávka *L. passim* potřebná k infekci byla spočítána a upravena podle výpočtů z kapitoly č. 3.3.4.1. Nákaza trvala 24 hodin u adaptovaných včel (též 24 h). Infekce se opět přimíchávala do cukerného

roztoku, nikoliv do sirupu. Sirup byl pro bičíkovce příliš hustý i v nízkých koncentracích. Pohyb bičíků nebyl patrný ani v 15% sirupu, proto byli podáváni v 20% cukerném roztoku jako u všech ostatních nákaz. V roce 2021 počet buněk pro 1 včelu odpovídal $1,561 \times 10^4$ a byl připraven z pasáže číslo 8, pro rok 2022 to bylo $1,2 \times 10^4$ buněk/10 μ l z pasáže číslo 11.

3.5.4.3 Imidaklopid

U vybraných včelstev byl do potravy přimíchán imidaklopid o koncentraci 2,5 μ g v 1 l potravy. Imidaklopid je dodáván v sušině a je ho potřeba do žádané koncentrace naředit.

Výpočet pro ředění imidaklopidu

- Potřebná koncentrace IMI: 2,5 μ g v 1 l potravy
- 1 000 μ g IMI rozpuštěn v 1 000 ml vody = 2,5 μ g IMI ve 2,5 ml vody
- 1 000 ml potravy: 2,5 ml zásobního roztoku IMI
- 100 ml potravy: 0,25 ml zásobního roztoku IMI

IMI byl přidán do převařené vody a přes noc ponechán na míchače do úplného rozpuštění. Vytvořené zásobní roztoky byly uchovány v -20 °C. IMI byl podáván včelám společně se sirupovou dietou a pylem dle předchozí kapitoly č. 3.5.4.1.

3.5.5 Odběr a zpracování vzorků

Odběr a zpracování vzorků dělnic i trubců probíhal identickým způsobem, jak je již popsáno v předchozím experimentu se včely v kapitole č. 3.4.5. Z každé skupiny bylo obden odebráno 6 jedinců. První odběr dle výše shrnutého časového plánu (schéma 4) byl 72 hodin po nákaze.

3.5.6 qPCR

Kvantitativní PCR, reakční směs a standarty byly stejné jako v předchozím experimentu v kapitole č. 3.4.6. Pro detekci *L. passim* a hostitelské DNA byla použita pouze qPCR s přidávanými barevně značenými sondami HEX a CY5, jelikož byla více citlivá než qPCR bez sond.

Tabulka 20: Přehled použitých primerů pro detekci *L. passim* a hostitelské DNA (*Hymenoptera*), Simplex Qpcr (Xu et al., 2018).

Primer/sonda	Sekvence	Specifita	Úsek	Velikost
Hym18S_F	TAACTGGCATTATGTGGTACGTC	Hymenoptera	18S	100 pb
Hym18S_R	CCTCGACACTCAGTGAAGAGC	Hymenoptera		
Hym_prb Cy5	AGCTCCTYGC GGGCGGTCCAA-BHQ1	Hymenoptera		200 pb
Lp_CB_F	CGAGCTCATAAAATAATGTAAGCAAAT AAG	<i>L. passim</i>	Cyt b	100 pb
Lp_CB_R	TTTTAGCAATATTTTAGCAACAGTACCA G	<i>L. passim</i>		
Lp_CB_Prb HEX	TTGGTGTGGCTATGT-BHQ1-MGB	<i>L. passim</i>		300 pb

Tabulka 21: Amplifikační podmínky pro Simplex qPCR.

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95 °C	10 s	1
Cyklení	95 °C	15 s	40
	60 °C	60 s	
Chlazení	40 °C	60 s	1

3.5.7 Příprava na proteomickou analýzu

Vybrané hlavy včel (od každé skupiny 5) byly analyzovány zavedeným vysokokapacitním proteomickým přístupem obdobným jako ve studii Erban et al. (2019). Byly však provedeny jisté modifikace v analytickém postupu, zejména se jednalo o rozdíl v modifikaci Carbamidomethyl (C) namísto MethylThio. Podmínkou pro vybrané vzorky bylo zachovat stejný čas odběru (DPI), aby byla u všech hlav zajištěna přítomnost stejných proteinů. U pozitivních vzorků se vybíraly vzorky s nejvyšším počtem parazitů. Hlavy byly nejprve odděleny od zbytku těla a tykadel pomocí skalpelu na suchém ledu, aby nedošlo k rozmražení materiálu. Hlavy včel byly zváženy a následně homogenizovány v Potter-Elvehjem skleněných homogenizérech s teflonovým pístem. Včely byly homogenizovány ve 100 mM triethylammonium bikarbonátovém pufru s 2% (w/v) obsahem deoxycholátu sodného. Homogenizace suspenze byla provedena 3× u každého vzorku (vždy po 10 minutách). Hrubý homogenát byl přelit do 15ml zkumavek a byl odeslán ke zpracování. Připravené trypsinové štěpy byly analyzovány na přístrojovém vybavení nanoLC-MS/MS (Thermo Dionex Ultimate 3000; Orbitrap Fusion – Thermo, Waltham, MA, USA). Získaná hrubá data z hmotnostního spektrometru (tzv. RAW data) byla vyhodnocovaná v softwaru MaxQuant (Cox et al., 2014) a poté Perseus (Tyanova et al., 2016). Výsledky byly prohledávány v neredundantní databázi proteinů z NCBI pro „*Apis mellifera*“. Při vyhodnocení byly použity následující modifikace: pevná modifikace: Carbamidomethyl (C); Variabilní modifikace: acetylace na N-konci, oxidace methioninu na N-konci.

Tabulka 22: Přehled vzorků na proteomickou analýzu.

Vzorky z posledního 13. dne (11 DPI)	Infekce	Hmotnost hlavy (g)
Vzorek G3	<i>L. passim</i>	0,009
Vzorek G7	<i>L. passim</i>	0,010
Vzorek G9	<i>L. passim</i>	0,008
Vzorek G10	<i>L. passim</i>	0,010
Vzorek G11	<i>L. passim</i>	0,011
Vzorek A5	<i>L. passim</i> + IMI	0,011
Vzorek A6	<i>L. passim</i> + IMI	0,011
Vzorek A7	<i>L. passim</i> + IMI	0,011
Vzorek A9	<i>L. passim</i> + IMI	0,011
Vzorek A11	<i>L. passim</i> + IMI	0,012
Vzorek A12	Kontrola – bez infekce	0,010
Vzorek B2	Kontrola – bez infekce	0,009
Vzorek B3	Kontrola – bez infekce	0,009
Vzorek B4	Kontrola – bez infekce	0,009
Vzorek B5	Kontrola – bez infekce	0,010

4 Výsledky

4.1 Detekce parazitů u volně žijících a úlových včel pomocí nested PCR

Ze včel odebraných pomocí žlutých misek bylo testováno celkem 331 jedinců pocházejících z okolí Prahy (viz. tabulka č.1, kapitola 3.1.1). Druhová specifita testovaných včel byla poměrně vysoká, kdy se podařilo odebrat včely náležící do 13 rodů, některé rody jsou zastoupeny více druhy – *Lasioglossum* (*barvulum*, *calceatum*, *laevigatum*, *laticeps*, *minutulum*, *morio*, *pallens*, *paucillum*, *politum*, *punctatissimus*), *Andrena* (*flavipes*, *flavius*, *gravida*, *minutula*) a *Bombus* (*terrestris*, *pascuorum*). Rodové a druhové určení jsem neprováděla sama, ale jak již bylo zmíněno, vzorky s údaji nám byly poskytnuty od entomologa Mgr. Jakuba Straky, Ph.D. (PřF UK). Jednotlivé rody/druhy včetně počtu odebraných a pozitivních vzorků s příslušným druhem parazita jsou v tabulce 23.

Kvantita (degradace) odebraných vzorků byla značně rozdílná, což se může odrážet i na výsledcích. Ze všech 13 rodů včel byl pouze druh *Apis mellifera* (včela medonosná) pozitivní na našeho klíčového parazita *Lotmaria passim* a to u 10 jedinců z 32, což odpovídá 31 %. U *Bombus terrestris* (čmelák zemní) byl přítomen pouze parazit *Crithidia bombi* s prevalencí 60 %.

Rod *Crithidia* se nám podařilo nalézt i u dalších zástupců včel, konkrétně u rodu *Andrena* s prevalencí 2,7 % (2 ze 73) a jednalo se o druh blízký druhu *Crithidia brevicula*. U jednoho z pozitivních vzorků této samotářské včely byla zjištěna směsná infekce s blíže nespecifikovaným druhem rodu *Herpetomonas*.

Velké zastoupení u testovaných včel měl druh *Leptomonas seymouri*, který byl zjištěn u 4 rodů včel s následující prevalencí: *Lasioglossum* 6,1 %, *Halictus simplex* 21,4 %, *Andrena* spp. 20,6 % a *Colletes cunicularius* 27,3 %.

U třech jedinců (*Lasioglossum laticeps*, *Halictus simplex* a *Colletes cunicularius*) byli identifikováni různí zástupci skupiny Bodonida.

Tabulka 23: Výsledky z testování volně žijících včel na přítomnost včelích parazitů.

Druh včely	Počet včel	PCR+ (prevalence)	Druh parazita
<i>Lasioglossum</i> spp. (10 druhů)	147	9 (6,12 %) 1 (0,68 %)	<i>Leptomonas seymouri</i> Bodonida
<i>Andrena</i> spp. (4 druhy)	73	2 (2,74 %) 15 (20,55 %) 1 (1,37 %)	<i>Crithidia</i> aff. <i>brevicula</i> <i>Leptomonas seymouri</i> <i>Herpetomonas</i> sp.
<i>Apis mellifera</i>	32	10 (31,25 %)	<i>Lotmaria passim</i>
<i>Polistes dominula</i>	25	0	
<i>Halictus simplex</i>	14	3 (21,43 %) 1 (7,14 %)	<i>Leptomonas seymouri</i> Bodonida
<i>Colletes cunicularius</i>	11	3 (27,27 %) 1 (9,09 %)	<i>Leptomonas seymouri</i> Bodonida
<i>Osmia bicolor</i>	7	0	
<i>Bombus terrestris</i>	5	3 (60 %)	<i>Crithidia bombi</i>
<i>Helictus scabiosae</i>	4	0	
<i>Nomada bifasciata</i>	4	0	
<i>Megachile pilidens</i>	3	0	
<i>Bombus lapidarius</i>	2	0	
<i>Seladonia tumulorum</i>	2	0	
<i>Bombus pascuorum</i>	1	0	
<i>Sphecodes Geoffrellus</i>	1	0	

Pro testování přítomnosti parazitů byly vybrány i včely úlové, u kterých se zjišťovala prevalence *Lotmaria passim*. Testováno bylo celkem 354 včel medonosných pocházejících ze 4 úlů – 1 úl v Dole ve Výzkumném ústavu včelařském a 3 úly v Praze ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby. V Dole počet pozitivních včel přesáhl ½, kdy se u 43 vzorků z 84 vyskytovala *Lotmaria passim*. Počet pozitivních vzorků a údaje o úlech jsou v následující tabulce 24.

Tabulka 24: Výsledky z testování úlových včel na přítomnost *Lotmaria passim*.

Druh včely	Včelstvo	Počet včel	PCR+ (prevalence)	Druh parazita
<i>Apis mellifera</i> Dol	6	84	43 (51 %)	<i>L. passim</i>
<i>Apis mellifera</i> Ruzyně	4.1	90	57 (63 %)	<i>L. passim</i>
<i>Apis mellifera</i> Ruzyně	4.8	90	40 (44 %)	<i>L. passim</i>
<i>Apis mellifera</i> Ruzyně	4.10	90	15 (17 %)	<i>L. passim</i>

U včel pocházejících z úlů Výzkumného ústavu rostlinné výroby byla prevalence zjištěna pomocí qPCR, takže kromě počtu pozitivních včel můžeme sledovat i kvantitu parazita. Průměrná koncentrace v úlu č. 4.1 dosahovala $1,56 \times 10^6$ s nejmenší hodnotou $1,27 \times 10^3$ a s nejvyšší hodnotou $9,32 \times 10^6$. V úle číslo 4.8 se pohybovala koncentrace v rozmezí od $1,08 \times 10^3$ do $9,5 \times 10^6$ s naměřenou průměrnou

hodnotou $4,9 \times 10^5$. Úl číslo 4.10 s nejnižším naměřeným průměrem $7,1 \times 10^3$ se pohyboval mezi hodnotami $1,05 \times 10^3 - 2,04 \times 10^4$. Naměřené koncentrace buněk parazita v testovaných včelách viz tabulka 25.

Tabulka 25: Výsledky z kvantitativního testování úlových včel na *Lotmaria passim*.

Druh včely	Včelstvo	Průměrná koncentrace (počet buněk/včela)	Nejnižší hodnota	Nejvyšší hodnota
<i>Apis mellifera</i>	4.1	1 559 311	1 268	9 320 000
<i>Apis mellifera</i>	4.8	491 238	1 076	9 500 000
<i>Apis mellifera</i>	4.10	7 103	1 048	20 400

Dále jsme testovali i čmeláky zemní, u kterých se nám podařilo diagnostikovat typického čmeláčího parazita *Crithidia bombi*. Ze vzorků, které jsme odchytli na Petříně, bylo 43 % pozitivních. Vzorky čmeláků sebrané na Rudě byly všechny negativní.

Tabulka 26: Výsledky z testování volně žijících čmeláků na přítomnost *Crithidia bombi*.

Druh čmeláka	Počet čmeláků	PCR+ (prevalence)	Druh parazita
<i>Bombus terrestris</i> Petřín	14	6 (43 %)	<i>C. bombi</i>
<i>Bombus terrestris</i> Ruda	9	0	

4.2 Experimenty

4.2.1 Test přítomnosti trypanosomatid u líhnoucích se včel (nested PCR, qPCR)

Tyto výsledky byly pro naše pokusy klíčové. Před experimenty jsme potřebovali otestovat včely hned po vylíhnutí, zda v sobě mají včelí trypanosomatida. Na tyto testy bylo použito 120 líhnoucích se včel z různých úlů, u kterých jsme později zjistili, že se v jejich úlech *Lotmaria* vyskytuje. V tabulce 27 jsou shrnuty i předchozí výsledky z kapitoly č. 4.1 z důvodu nápadného rozdílu v prevalenci parazitů u úlových včel s prevalencí parazitů u líhnoucích se včel pocházejících ze stejných úlů a odebíraných ve stejném čase. Žádná líhnoucí se včela nebyla infikována parazitem, a proto byly v našich experimentech líhnoucí se včely považovány za negativní a neschopné získat infekci v zavíčkované buňce či vertikálním přenosem. Stejně negativní výsledky byly zjištěny i u čmeláků zemních pocházejících z certifikovaného chovu, kdy ve 30 analyzovaných vzorcích nebyl ani 1 infikován *C. bombi*.

Tabulka 27: Rozdíl v přítomnosti *L. passim* u líhnoucích se včel a u včel úlových.

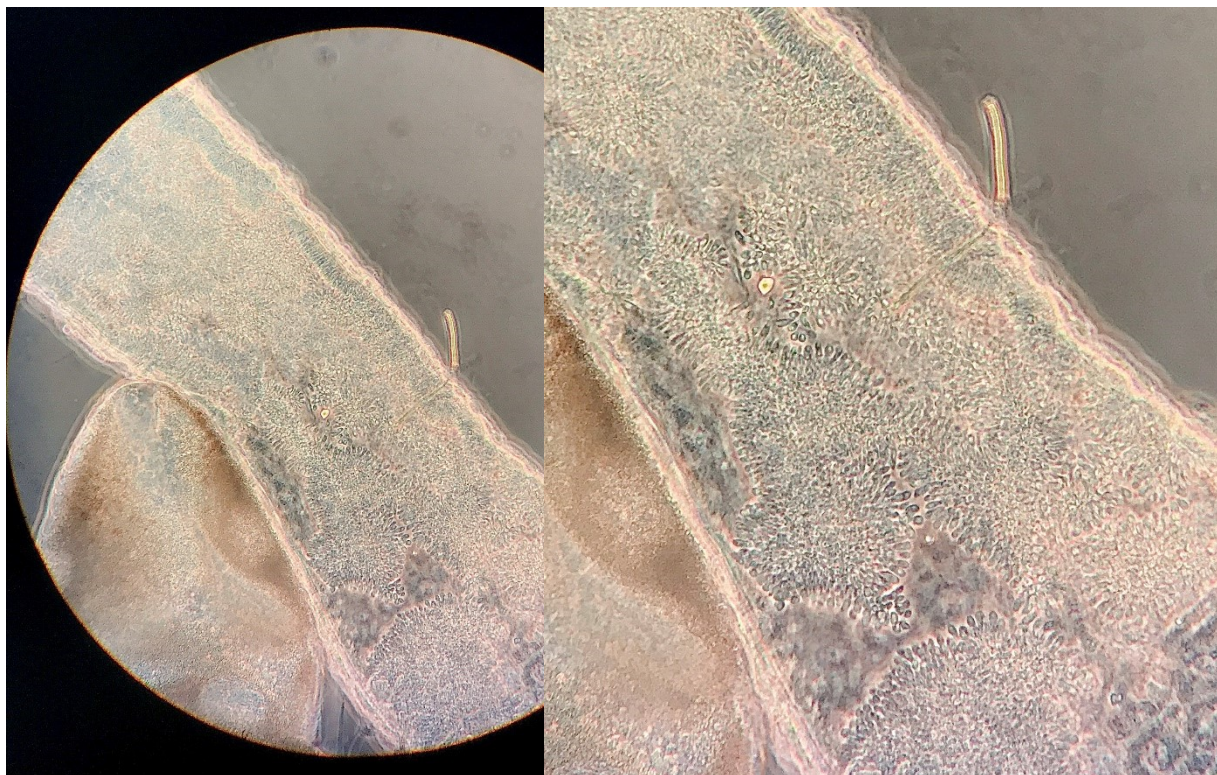
Druh včely	Včelstvo	Prevalence <i>L. passim</i> úlových včel	Prevalence <i>L. passim</i> líhnoucích se včel
<i>Apis mellifera</i> Dol	6	43 z 84 (51 %)	0 z 60
<i>Apis mellifera</i> Ruzyně	4.1	57 ze 90 (63 %)	0 z 20
<i>Apis mellifera</i> Ruzyně	4.8	40 ze 90 (44 %)	0 z 20
<i>Apis mellifera</i> Ruzyně	4.10	15 ze 90 (17 %)	0 z 20

4.2.2 Mikroskopická diagnostika experimentálních infekcí dělnic včely medonosné

Při prvních experimentálních infekcích jsme chtěli především ověřit, zda se nákaza podařila a lze nalézt včelí trypanosomatida v zadní části trávicího traktu (přirozené místo výskytu). Proto jsme jako diagnostickou metodu využili světelný mikroskop. Byla zaznamenána síla infekce i vyskytující se morfologické formy. Kontroloval se i výkalový vak, zda už proběhlo první vyprazdňování.

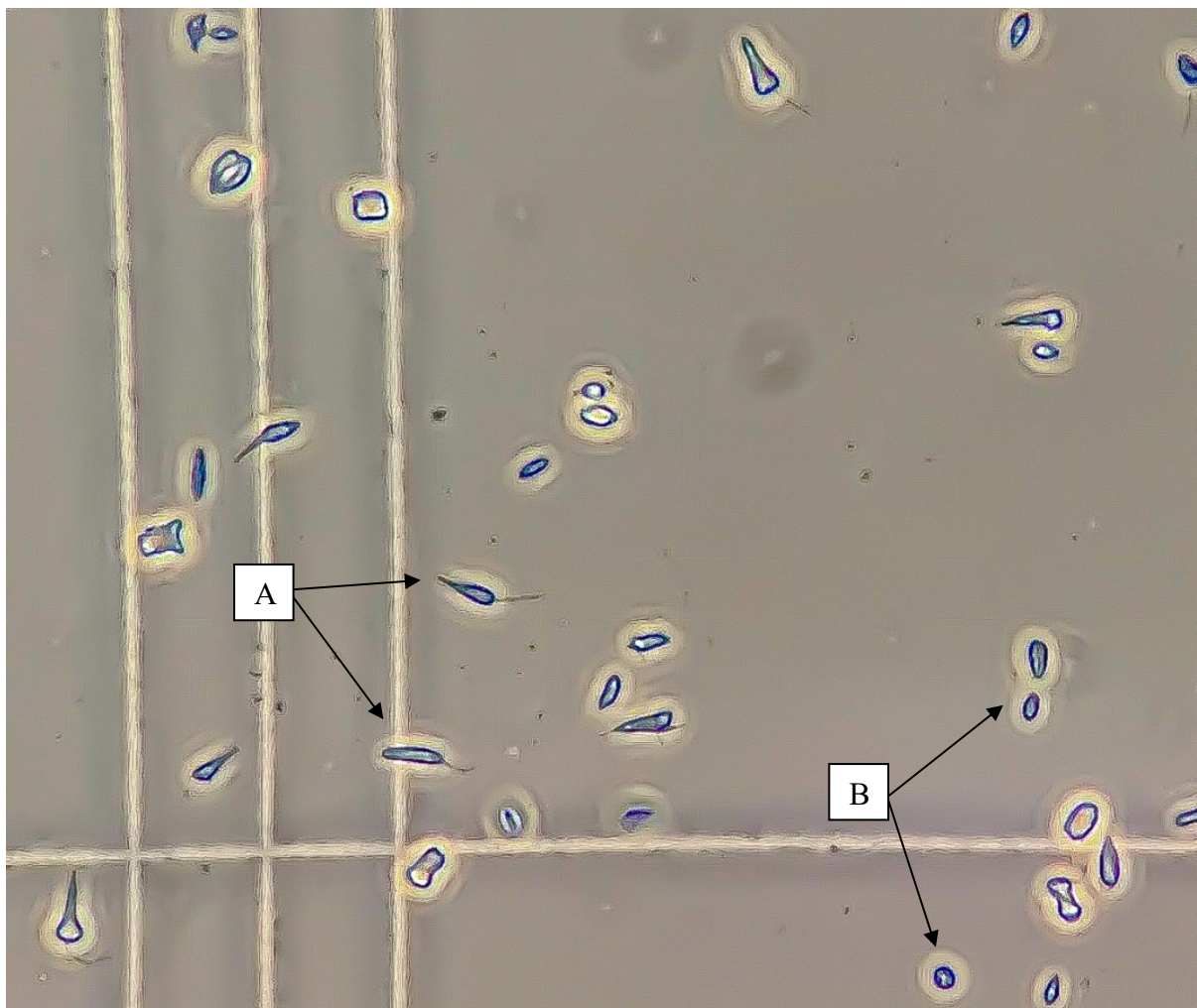
První pitva proběhla 3 dny po infekci a nákaza se rozvinula u poloviny testovaných včel. Počet infikovaných jedinců, stejně tak jako intenzita infekce, rostl s časem. Včely byly pozorovány až do 11. dne (vymření) a na konci pokusu byla infikována většina včel. Intenzita u některých jedinců byla velmi silná.

Lokalizace parazitů byla u všech pozitivních včel stejná – rektum či u některých jedinců byli paraziti pozorováni i v zadní části ilea před následným přechodem do rekta. Na fotografii č. 13 je vidět lokalizace cizopasníků jak ve výkalovém vaku, tak i v tenkém střevě, kde jsou patrné shluky trypanosomatid.



Fotografie č.13: Lokalizace *L. passim* v rektu a ileu včely medonosné

V průběhu infekce byly zaznamenány změny v zastoupení i v četnosti jednotlivých morfotypů. Byla pozorovaná bičíkatá stádia (morfotyp promastigot) vyznačující se štíhlejším tělem a volným bičíkem. Před nástupem bičíkatých stádií (zhruba od šestého dne po infekci), byla pozorována malá kulovitá až elipsoidní stádia označovaná někdy za sféroidy. Jejich počet se v průběhu infekce snižoval a byl postupně nahrazen promastigoty. Je ale možné, že po celý cyklus byly přítomny obě morfologické formy, jen díky velkým bičíkovicům byly malé kulovité buňky přehlédnuty/zastíněny. Obě stádia viz fotografie č. 14. Morfotypy pozorované ve střevě včel při pitvě byly shodné se stádii pozorovanými v kultivačním médiu či v infekční dávce.



Fotografie č.14: Promastigoti (A) a sféroidní buňky (B) *L. passim* ze včely medonosné

Tabulka 28: Přehled výsledků experimentální infekce včel, označení + znázorňuje plný vak, označení – prázdný vak, subjektivní intenzita infekce od nejnižší 1 po nejvyšší 5; DPI – dnů po infekci.

DPI / Skupina včel	Počet včel	Výkalový vak	L. passim +	Lokalizace	Intenzita infekce	Morfologické formy	
3	L1	2	- / +	1	rektum	1	sféroid
	L2	2	+ / +	1	rektum	1	sféroid
	L3	2	+ / +	0			
	L4	2	+ / -	1	rektum	1	sféroid
	L5	2	+ / +	1	rektum	1	sféroid
	L6	2	+ / +	2	rektum	1 / 2	sféroid
6	L1	2	- / +	2	rektum / ileum	2 / 2	sféroid / promastigot
	L2	2	- / +	1	rektum	1	sféroid
	L3	2	+ / -	1	rektum	1	promastigot
	L4	2	+ / +	1	rektum, ileum	3	promastigot
	L5	2	+ / +	2	rektum	2 / 1	promastigot / sféroid
	L6	2	+ / +	1	rektum	1	sféroid
8	L1	2	+ / +	1	rektum	2	promastigot
	L2	2	+ / +	0			
	L3	2	+ / +	1	rektum	1	promastigot
	L4	2	+ / +	0			
	L5	2	+ / +	2	rektum	2 / 1	promastigot
	L6	2	+ / +	1	rektum	4	promastigot
10	L1	2	+ / +	2	rektum	4 / 4	promastigot
	L2	2	+ / +	0			
	L3	2	+ / +	2	rektum	1 / 2	promastigot
	L4	2	+ / +	1	rektum	2	promastigot
	L5	2	+ / +	1	rektum, ileum	5	promastigot
	L6	2	+ / +	2	rektum	3 / 2	promastigot

Kontrolní skupiny včel nebyly pozorovány pod mikroskopem, ale byly zpracovány molekulárními metodami (nested PCR). Výsledky ukázaly, že žádná z kontrol nebyla infikována.

Tabulka 29: Test přítomnosti *L. passim* v kontrolních včelstvech, označení + znázorňuje plný vak, označení – prázdný vak.

DPI	Skupina včel	Počet testovaných včel	Výkalový vak	PCR +
3	K1	2	+ / +	0
	K2	2	+ / -	0
	K3	2	+ / -	0
6	K1	2	+ / +	0
	K2	2	- / -	0
	K3	2	+ / +	0
8	K1	2	+ / +	0
	K2	2	+ / +	0
	K3	2	+ / +	0
10	K1	2	+ / +	0
	K2	2	+ / +	0
	K3	2	+ / +	0

4.2.3 Kvantitativní PCR analýza *L. passim* a *C. bombi* u experimentálně infikovaných včel a čmeláků

Pro experimenty s *L. passim* byla použita infekční dávka o koncentraci $2,7 \times 10^4$ buněk v 10 μ l potravy na 1 včelu. Potrava byla podána v injekční stříkačce. Již po chvíli bylo možné pozorovat, jak se někteří jedinci krmí a předávají si potravu mezi sebou, čímž zvyšují i úspěšnost přenosu infekce. Celkem byly takto infikovány 4 skupiny po 4 jedincích. Každý druhý den byl odebrán na analýzu 1 jedinec z 1 včelstva (celkem 4 včely za odběrový den). K úspěšné nákaze došlo ve všech. Včely byly udržovány po dobu 12 dnů, kdy jejich intenzita infekce dosáhla nejvyšších hodnot. Podle průměrných hodnot z tabulky 30 je patrné, že od prvního odběru (4 dny po infekci) do posledního odběru (10 dnů infekce) vzrostl počet buněk parazita zhruba na 40násobnou hodnotu.

Tabulka 30: Intenzita infekce *L. passim* sledovaná v průběhu experimentu.

<i>Lotmaria passim</i>	4 DPI (4 včely)	6 DPI (4 včely)	8 DPI (4 včely)	10 DPI (4 včely)
Skupina včel	Koncentrace parazita (počet buněk/včela)			
LOT1	0	0	4 260	2 700 000
LOT2	102 600	0	0	5 740 000
LOT3	0	388 000	2 580 000	0
LOT4	0	0	5 520	0
Průměr	102 600	388 000	863 260	4 220 000
Medián	102 600	388 000	5 520	4 220 000

Stejný experiment byl proveden i s parazity *Crithidia bombi*, jejichž přirozeným hostitelem je čmelák zemní. K přirozené nákaze včel medonosných tímto bičíkovcem v přírodě nedochází, proto byl sestaven experimentální model přenosu. V injekční stříkačce byl čmelákům podán cukerný roztok, kdy na 1 čmeláka připadlo 10 µl s 1,6 x10⁴ buněk. U 3 jedinců se uchycení parazitů podařilo. Infekce se objevily až po 8 dnech a průměrná intenzita byla pouze v řádu jednotek tisíců.

Tabulka 31: Intenzita infekce *C. bombi* sledovaná v průběhu experimentu.

<i>Crithidia bombi</i>	4 DPI (4 včely)	6 DPI (4 včely)	8 DPI (4 včely)	10 DPI (4 včely)
Skupina včel	Koncentrace parazita (počet buněk/včela)			
CRI1	0	0	2 200	2 340
CRI2	0	0	0	0
CRI3	0	0	0	12 540
CRI4	0	0	0	0
Průměr			2 200	7 440
Medián			2 200	7 440

Se stejným postupem byl navržen i pokus s oběma parazity současně. Do injekční stříkačky s potravou byla namíchána kultura *L. passim* s kulturou *C. bombi* v poměru 1:1. Nákaza *C. bombi* byla v uchycení se ve včelím hostiteli překvapivě více úspěšná než její přirozený parazit *L. passim*. Zajímavostí však je, že u všech tří včel s infekcí *Lotmaria* byla současně přítomna i *Crithidia*.

Tabulka 32: Intenzita infekce *L. passim* a *C. bombi* sledovaná v průběhu experimentu, LOT=Lotmaria, CRI=Crithidia, tučné písmo=nákaza oběma druhy parazitů.

<i>L. passim</i> + <i>C. bombi</i>	4 DPI (4 včely)	6 DPI (4 včely)	8 DPI (4 včely)	10 DPI (4 včely)
Skupina včel	Koncentrace parazita (počet buněk/včela)			
MIX1	0	0	0	4 580 CRI
MIX2	0	0	3 680 LOT 4 580 CRI	6 440 LOT 6 560 CRI
MIX3	0	0	10 040 CRI	23 200 LOT 17 060 CRI
MIX4	0	0	0	6 740 CRI
Průměr LOT			3 680	14 820
Medián LOT			3 680	14 820
Průměr CRI			7 310	8 735
Medián CRI			7 310	6 650

Čmelák zemní

Obdobné experimenty se prováděly i na čmelácích zemních, a to za použití stejných kultur. Výsledky z tabulky 33 ukazují, že čmelák zemní je opravdu preferovaným hostitelem. Ze 16 jedinců bylo pozitivních 8, z toho 2 už při prvním odběru (4 dny po infekci).

Tabulka 33: Intenzita infekce *C. bombi* sledovaná v průběhu experimentu.

<i>Crithidia bombi</i>	4 DPI (4 čmeláci)	6 DPI (4 čmeláci)	8 DPI (4 čmeláci)	10 DPI (4 čmeláci)
Skupina čmeláků	Koncentrace parazita (počet buněk/včela)			
CRI1	2 620	0	0	4 440
CRI2	164 800	448 000	630 000	2 400 000
CRI3	0	0	0	18 300
CRI4	0	0	0	5 740
Průměr	83 710	448 000	630 000	607 120
Medián	83 710	448 000	630 000	18 300

Dále byli čmelákům podáváni paraziti *L. passim*. 16 jedinců bylo infikováno *Lotmaria*, ale pouze u 1 z nich se infekce zdařila. Naměřená hodnota byla hraniční pouze s 2 080 buňkami/čmelák.

Tabulka 34: Intenzita infekce *L. passim* sledovaná v průběhu experimentu.

<i>Lotmaria passim</i>	4 DPI (4 čmeláci)	6 DPI (4 čmeláci)	8 DPI (4 čmeláci)	10 DPI (4 čmeláci)
Skupina čmeláků	Koncentrace parazita (počet buněk/včela)			
LOT1	0	0	0	0
LOT2	0	0	0	0
LOT3	0	0	0	0
LOT4	0	0	2 080	0
Průměr			2 080	
Medián			2 080	

Rozvoj směsných infekcí u čmeláků viz tabulka 35 (11 vzorků ze 16). Výsledky z cross-infekcí u čmeláků vykazují stejný trend jako u první vzájemné infekce oběma druhy parazitů u včel. Opět byl úspěšnější čmeláčí parazit, který byl analyzován u všech 11 pozitivních vzorků; v 1 případě tvořil směsnou infekci s *Lotmaria* a v této směsné infekci dosahovala *Crithidia* nejvyšší koncentrace (14 620 000 buněk/čmelák).

Tabulka 35: Intenzita infekce *L. passim* a *C. bombi* sledovaná v průběhu experimentu, LOT=*Lotmaria*, CRI=*Crithidia*, tučné písmo=nákaza oběma druhy parazitů.

<i>L. passim</i> + <i>C. bombi</i>	4 DPI (4 čmeláci)	6 DPI (4 čmeláci)	8 DPI (4 čmeláci)	10 DPI (4 čmeláci)
Skupina čmeláků	Koncentrace parazita (počet buněk/včela)			
MIX1	0	1 070 CRI	0	922 000 CRI
MIX2	0	220 000 CRI	13 900 CRI	3 700 000 CRI
MIX3	0	268 000 CRI	1 628 000 CRI	14 620 000 CRI 3 900 LOT
MIX4	0	1 506 000 CRI	14 380 000 CRI	4 180 000 CRI
Průměr LOT				3 900 CRI
Medián LOT				3 900 CRI
Průměr CRI		498 768	5 340 633	5 855 500
Medián CRI		244 000	1 628 000	3 940 000

Všechny kontrolní skupiny (16 jedinců čmeláků + 16 jedinců včel) byly vyhodnoceny pomocí qPCR jako negativní.

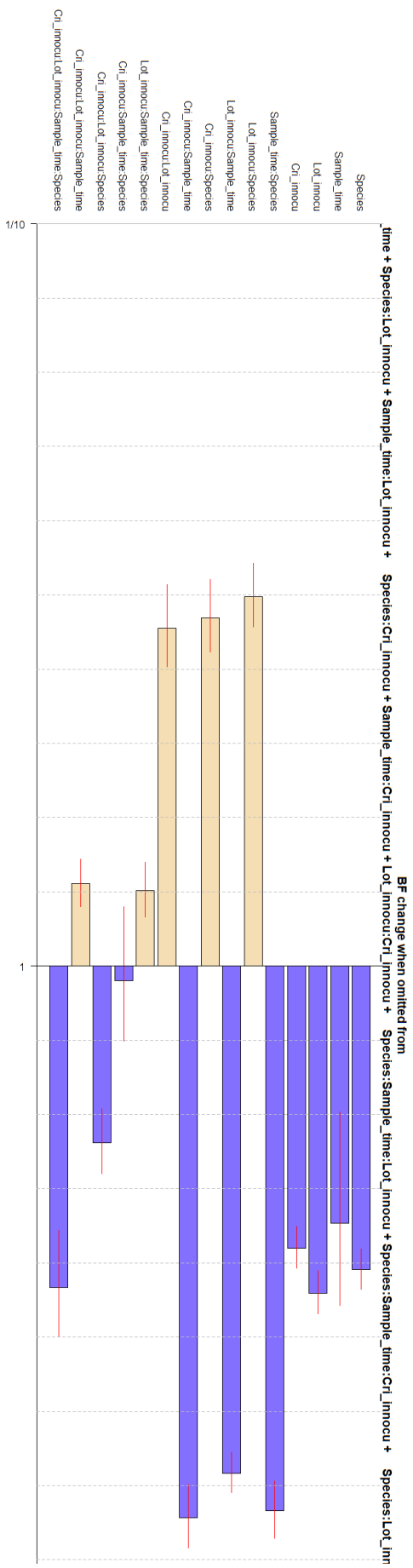
4.2.3.1 Statistické zpracování qPCR výsledků

Výsledná data z obou pokusů se čmeláky a včelami byly zpracovány pomocí multifaktorové variační analýzy (ANOVA) (tabulka 36) a Bayesovské variační analýzy (grafy 1.1 a 1.2) v programu R, verze 4.2.2 (D. Morey & N. Rouder, 2022; Etz, 2015; R Core Team, 2022). Obě metody potvrdily jako signifikantní faktor mající vliv na abundanci parazitů interakci inokula a druhu, tedy co je čím inokulováno, ale také interakci mezi oběma parazity (*Lotmaria* a *Crithidia*). Dalším výrazným faktorem byl čas odběru včel a čmeláků (DPI), který měl významný vliv na rozvoj infekce *Lotmaria* i *Crithidia*.

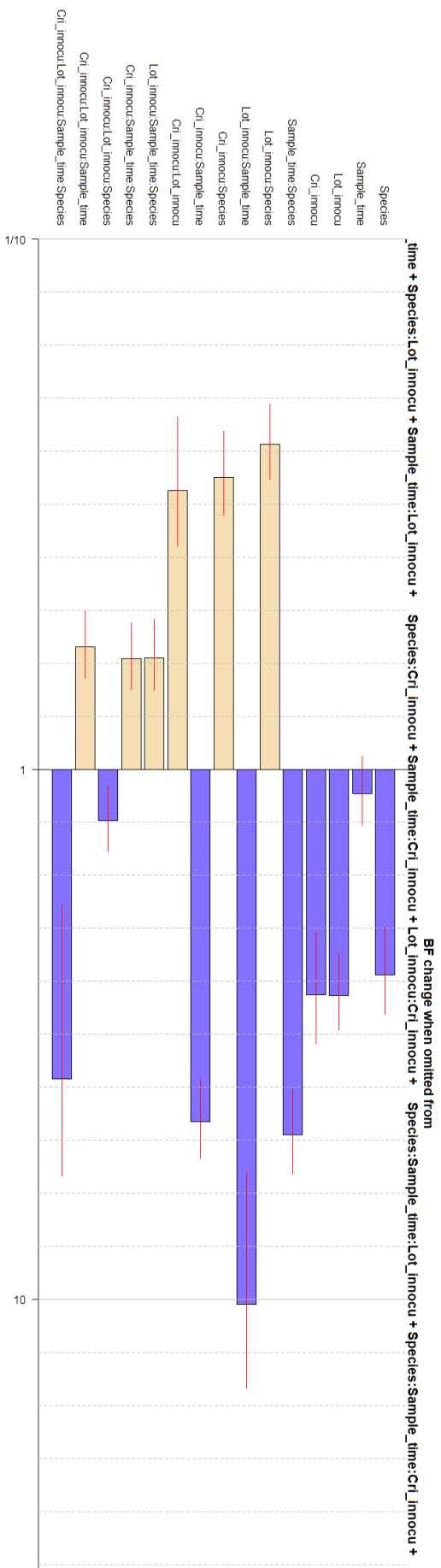
Tabulka 36: Přímý výstup statistického vyhodnocení vlivů jednotlivých faktorů na množství detekovaných parazitů. Byla použita multifaktorová variační analýza (multiway ANOVA). Signifikance je vyznačena pomocí kódů: 0,01 (*); 0,05 (.). Byl použit program R, verze 4.2.2.

Sledovaný faktor u včel	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)
Druh hmyzu (včela/čmelák)	1	4.844e+11	4.844e+11	1.440	0.2331
Čas odběru (DPI)	3	2.250e+12	7.502e+11	2.231	0.0896 .
Inokulace <i>L. passim</i>	1	4.858e+11	4.858e+11	1.445	0.2323
Inokulace <i>C. bombi</i>	1	4.767e+11	4.767e+11	1.417	0.2368
Druh : DPI	3	7.751e+11	2.584e+11	0.768	0.5145
Druh : <i>L. passim</i>	1	1.810e+12	1.810e+12	5.383	0.0225 *
DPI : <i>L. passim</i>	3	7.771e+11	2.590e+11	0.770	0.5134
Druh : <i>C. bombi</i>	1	1.796e+12	1.796e+12	5.341	0.0230 *
DPI : <i>C. bombi</i>	3	7.601e+11	2.534e+11	0.753	0.5230
<i>L. passim</i> : <i>C. bombi</i>	1	1.795e+12	1.795e+12	5.338	0.0230 *
Druh : DPI : <i>L. passim</i>	3	2.247e+12	7.490e+11	2.227	0.0899
Druh : DPI : <i>C. bombi</i>	3	2.225e+12	7.416e+11	2.205	0.0925 .
Druh : <i>L. passim</i> : <i>C. bombi</i>	1	4.771e+11	4.771e+11	1.419	0.2365
DPI : <i>L. passim</i> : <i>C. bombi</i>	3	2.221e+12	7.404e+11	2.202	0.0929 .
Druh : DPI : <i>L. passim</i> : <i>C. bombi</i>	3	7.621e+11	2.540e+11	0.755	0.5219
Sledovaný faktor u čmeláků	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)
Druh hmyzu (včela/čmelák)	1	1.337e+13	1.337e+13	5.012	0.0275 *
Čas odběru (DPI)	3	1.181e+13	3.938e+12	1.476	0.2260
Inokulace <i>L. passim</i>	1	1.344e+13	1.344e+13	5.036	0.0271 *
Inokulace <i>C. bombi</i>	1	1.346e+13	1.346e+13	5.045	0.0270 *
Druh : DPI	3	1.172e+13	3.907e+13	1.464	0.2291
Druh : <i>L. passim</i>	1	1.339e+13	1.339e+13	5.021	0.0274 *
DPI : <i>L. passim</i>	3	1.179e+13	3.929e+12	1.473	0.2268
Druh : <i>C. bombi</i>	1	1.337e+13	1.337e+13	5.012	0.0275 *
DPI : <i>C. bombi</i>	3	1.181e+13	3.938e+12	1.476	0.2260
<i>L. passim</i> : <i>C. bombi</i>	1	1.344e+13	1.344e+13	5.036	0.0271 *
Druh : DPI : <i>L. passim</i>	3	1.175e+13	3.915e+12	1.468	0.2283
Druh : DPI : <i>C. bombi</i>	3	1.172e+13	3.907e+12	1.464	0.2291
Druh : <i>L. passim</i> : <i>C. bombi</i>	1	1.339e+13	1.339e+13	5.021	0.0274 *
DPI : <i>L. passim</i> : <i>C. bombi</i>	3	1.179e+13	3.929e+12	1.473	0.2268
Druh : DPI : <i>L. passim</i> : <i>C. bombi</i>	3	1.175e+13	3.915e+12	1.468	0.2283

Grafy 1.1 a 1.2: Grafické znázornění vlivu jednotlivých faktorů na výsledek. Faktory jsou postupně vypouštěny z výsledného modelu. Pokud se po vypuštění faktoru model zhorší (oranžový sloupec směřující doleva), je výsledný model horší než původní, tzn. faktor má vliv na výsledek a velikost vlivu je zobrazena délkou sloupce. Modrý sloupec směřující doprava značí, že výsledný model je bez daného faktoru lepší než původní, tzn. faktor nemá vliv na výsledek. V grafu 1.1 byly pozorované faktory u včel, v grafu 1.2 u čmeláků. Sledované faktory: druh experimentálního organismu, čas odběru vzorku (DPI), inokulace *L. passim*, inokulace *C. bombi* a interakce těchto faktorů. Graf byl vyhodnocen Bayesovskou analýzou v programu R, verze 4.2.2 a rozšiřujícího balíčku BayesFaktor, verze 0.9.12-4.4.



Graf 1.1: Včely – infekce *L. passim*; *C. bombi*; *L. passim* + *C. bombi*)



Graf 1.2: Čmeláci – infekce *C. bombi*; *L. passim*; *C. bombi* + *L. passim*)

4.2.4 Kvantitativní PCR analýza *L. passim* u včely medonosné v interakci s imidaklopridem

Tento experiment byl zrealizován 2× – jednou v roce 2021 a jednou 2022. První pokus byl proveden na 350 včelách. Následně bylo molekulárně zpracováno 210 reprezentativních vzorků, jelikož během pokusu průběžně docházelo ke ztrátám včel. Nejvýraznější ztráty byly sledovány 13. den, proto se již po tomto dni neodebírali a neanalyzovali žádné vzorky.

Šesti skupinám po 50 včelách byla po adaptaci podána dávka *Lotmaria* o koncentraci $1,56 \times 10^4$ v 10 μ l (přepočteno na 1 včelu). Z těchto skupin byla vybrána polovina, které se při prvním a posléze při každém dalším krmení zamíchaly do potravy pesticid imidakloprid. U skupiny s přidavkem pesticidu byla zjištěna vyšší prevalence i intenzita infekce, které byly patrné již při analýzách prvního odběru vzorků, ale i větší úmrtnost na konci sledovaného pokusu. U skupin bez pesticidu bylo z 90 včel vyhodnoceno 15 pozitivních s celkovou průměrnou intenzitou infekce 149 030 buněk. V případě expozice imidaklopridem bylo zjištěno téměř 50 % (43 z 90) vzorků pozitivních na *Lotmaria*. Abundance parazitů byla rovněž vyšší se zjištěnou průměrnou hodnotou 229 528 buněk.

Tabulka 37: Intenzita infekce *L. passim* sledovaná v průběhu experimentu.

<i>Lotmaria passim</i>	3 DPI (18 včel)	5 DPI (18 včel)	7 DPI (18 včel)	9 DPI (18 včel)	11 DPI (18 včel)
Skupina včel	Koncentrace parazitů (buněk/včela)				
1	0	11 400	33 400	4 500	51 200
	0	0	0	17 400	104 400
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
2	0	52 200	58 600	0	601 000
	0	24 000	23 000	0	638 000
	0	0	0	0	508 000
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
4	0	16 960	91 400	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
Počet pozitivních včel	0 z 18	4 z 18	4 z 18	2 z 18	5 z 18
Průměrná koncentrace		26 140	51 600	10 950	380 520
Medián		20 480	46 000	10 950	508 000

Tabulka 38: Intenzita infekce *L. passim* sledovaná v průběhu experimentu s pesticidem.

<i>L. passim</i> + IMI	3 DPI (18 včel)	5 DPI (18 včel)	7 DPI (18 včel)	9 DPI (18 včel)	11 DPI (18 včel)
Skupina včel	Koncentrace parazitů (buněk/včela)				
3	0	32 000	0	56 000	1 260
	0	0	0	0	110 200
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
5	0	39 600	74 000	224 000	145 000
	0	21 800	81 400	2 600 000	142 600
	0	13 120	0	14 980	962 000
	0	0	0	9 200	0
	0	0	0	12 620	0
	0	0	0	6 080	0
6	22000	18 6200	86 600	270 000	336 000
	358 000	26 600	326 000	16 780	202 000
	39 000	16 500	19 780	182 200	140 800
	0	344 000	18 980	430 000	1 106 000
	0	28 000	13 280	81 800	54 400
	0	0	380 000	0	964 000
Počet pozitivních včel	3 z 18	9 z 18	8 z 18	12 z 18	11 z 18
Průměrná koncentrace	139 667	78 647	125 005	325 305	378 569
Medián	39 000	28 000	77 700	68 900	145 000

Pro kontrolu správné manipulace se včelami i s parazity byla vytvořena kontrolní skupina 50 včel, s nimiž se zacházelo jako se skupinami experimentálními. Včely vykazovaly podobné chování a přirozenou úmrtnost srovnatelnou se včelstvy s *Lotmaria* (tedy nižší než u včelstev s přidáním neonicotinoidem). Všechny kontrolní vzorky vyšly negativně za použití metody qPCR.

Opakovaný pokus v roce 2022 měl totožné podmínky. Jedinou výjimkou byla kontrolní skupina (tj. bez parazitů i bez pesticidů), která v tomto roce nebyla zahrnuta do experimentu, protože bylo námi prokázáno, že líhnoucí se včely nemají *L. passim*. Na základě výsledků z roku 2021 byla sledována pouze interakce mezi parazitem a pesticidem (tedy jako vztažná skupina sloužila experimentální skupina s *Lotmaria*).

Pro rok 2022 byla infekční dávka pro 1 včelu spočítána pomocí Bürkerovy komůrky o výsledné koncentraci $1,2 \times 10^4$ buněk/10 μ l. Při počítání tak vysoké koncentrace je však obtížné dosáhnout totožné infekční dávky jako v předchozích experimentech. Proto byla vybrána taková koncentrace, aby byla zachována řádově stejná dávka potřebná k infekci a rozdíl mezi jednotlivými dávkami nebyl vyšší než hodnota potřebná k rozvoji infekce. Infekce byly zaznamenány už při prvních odběrech v obou skupinách: bez pesticidu 8 pozitivních vzorků z 18, s pesticidem dokonce 14 vzorků z 18 odebraných.

Intenzita infekce dosahovala u všech vzorků vyšších hodnot než v roce 2021 a to i přes to, že byla infekční dávka nepatrně nižší než v předešlém experimentu. U vzorků s pesticidem vyšplhala v posledním odběrovém dnu až na 7 260 000 parazitů na včelu a průměrná (ze všech pozitivních vzorků) koncentrace buněk *Lotmaria* v jedné včele byla 758 546. U včel bez pesticidu byla naměřena méně než poloviční průměrná koncentrace (359 918).

Tabulka 39: Intenzita infekce *L. passim* sledovaná v průběhu experimentu.

<i>Lotmaria passim</i>	3 DPI (18 včel)	5 DPI (18 včel)	7 DPI (18 včel)	9 DPI (18 včel)	11 DPI (18 včel)
Skupina včel	Koncentrace parazita (počet buněk/včela)				
2	91 400	406 000	26 400	133 400	3 660 000
	14 520	99 600	1 888 000	76 600	1 098 000
	4 060	744 000	1 090 000	532 000	0
	165 600	48 200	0	0	0
	0	996 000	0	0	0
	0	0	0	0	0
3	0	0	0	7 100	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
4	12 340	38 000	139 400	63 800	238 000
	8 720	126 000	0	5 340	13 620
	7 040	18 160	0	0	28 600
	10 120	4 080	0	0	83 200
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
Počet pozitivních včel	8 z 18	9 z 18	4 z 18	6 z 18	6 z 18
Průměrná koncentrace	39 225	275 560	785 950	136 373	853 570
Medián	11 230	99 600	614 700	70 200	160 600

Tabulka 40: Intenzita infekce *L. passim* sledovaná v průběhu experimentu s pesticidem.

<i>L. passim</i> + IMD	3 DPI (18 včel)	5 DPI (18 včel)	7 DPI (18 včel)	9 DPI (18 včel)	11 DPI (18 včel)
Skupina včel	Koncentrace parazita (počet buněk/včela)				
1	14 560	7 860	1 014 000	2 400 000	4 700 000
	3 420	672 000	93 000	5 300 000	8 200
	51 800	198 400	21 800	266 000	638 000
	4 440	67 000	89 600	250 000	314 000
	9 220	224 000	562 000	2 560 000	330 000
	12 780	60 000	398 000	0	0
5	5 960	118 600	508 000	3 200 000	5 920 000
	81 600	115 600	1 144 000	1 082 000	142 400
	113 600	254 000	2 300 000	428 000	7 260 000
	53 600	444 000	256 000	2 520	0
	13 740	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
6	5 260	296 000	57 400	206 000	1 294 000
	8 020	486 000	64 800	73 600	3 120
	8 800	103 000	17 840	1 490 000	23 400
	0	230 000	2 980 000	2 380 000	1 566 000
	0	316 000	6 540	4 320	2 920
	0	0	35 800	1 156	0
Počet pozitivních včel	14 z 18	15 z 18	16 z 18	15 z 18	13 z 18
Průměrná koncentrace	27 629	239 497	596 799	1 309 573	1 707 849
Medián	11 000	224 000	174 500	428 000	330 000

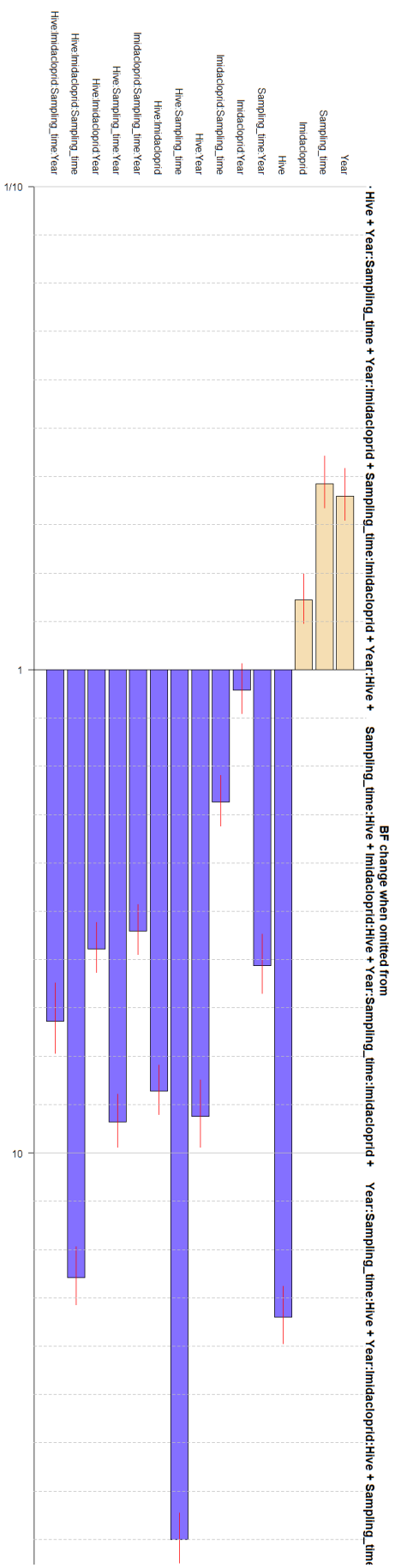
4.2.4.1 Statistické zpracování qPCR výsledků

Výsledky byly též vyhodnoceny pomocí multifaktorové variační analýzy (ANOVA) (tabulka 41) a Bayesovské variační analýzy (grafy 2.1 a 2.2) v programu R, verze 4.2.2 (D. Morey & N. Rouder, 2022; Etz, 2015; R Core Team, 2022). Obě analýzy ukázaly signifikantní rozdíly ovlivňující abundanci parazita mezi jednotlivými roky, časem odběru (DPI) a přítomností imidaklopridu. Největší vliv na uchycení parazita měl rok, ve kterém byl experiment proveden. Při testu ANOVA (kromě samotného faktoru roku) se ukázala i důležitá interakce mezi rokem a imidaklopridem, což vypovídá o rozdílné reakci parazita na pesticid sledovaného v různých letech. Nepatrné signifikantní změny byly pozorované u interakce imidaklopridu s DPI, tudíž při ovlivnění parazitů pesticidem bude hrát roli i samotný rozvoj infekce (počet dnů od infekce). Původ včel (úl) neměl na změny v početnosti parazitů žádný vliv.

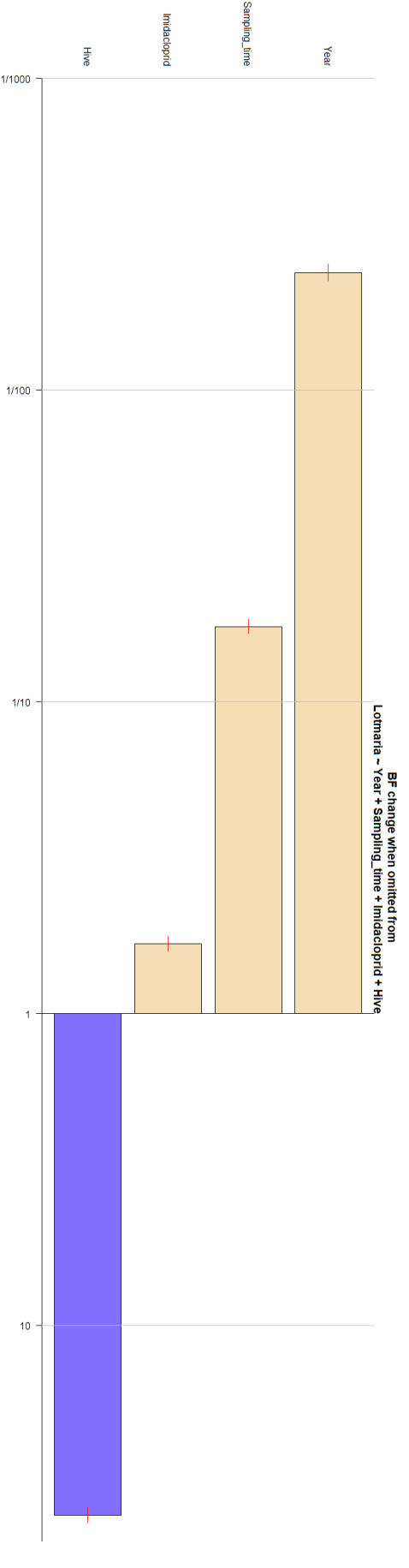
Tabulka 41: Přímý výstup statistického vyhodnocení vlivů jednotlivých faktorů na množství detekovaných parazitů. Byla použita multifaktorová variační analýza (multiway ANOVA). Signifikance je vyznačena pomocí kódů: 0 (***) ; 0,001 (**); 0,01 (*); 0,05 (.). Byl použit program R, verze 4.2.2.

Sledovaný faktor u včel	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)
Rok experimentu	1	7.513e+12	7.513e+12	16.578	5.87e-05 ***
Čas odběru (DPI)	5	1.123e+13	2.246e+12	4.956	0.000218 ***
Imidaklopid	1	7.355e+12	7.355e+12	16.228	6.99e-05 ***
Včelí úl	6	1.871e+12	3.119e+11	0.688	0.659376
Rok : DPI	5	4.778e+12	9.556e+11	2.109	0.064093 .
Rok : Imidaklopid	1	3.508e+12	3.508e+12	7.740	0.005714 **
DPI : Imidaklopid	4	5.767e+12	1.442e+12	3.181	0.013874 *
Rok : Úl	6	3.244e+12	5.407e+11	1.193	0.309482
DPI : Úl : Imidaklopid	20	5.622e+12	2.811e+11	0.620	0.897445
Rok : DPI : Imidaklopid	4	3.086e+12	7.715e+11	1.702	0.149126
Rok : Imidaklopid : Úl	20	9.321e+12	4.660e+11	1.028	0.427805

Grafy 2.1 a 2.2 – Grafické znázornění vlivu jednotlivých faktorů na výsledek. Faktory jsou postupně vypouštěny z výsledného modelu. Pokud se po vypuštění faktoru model zhorší (oranžový sloupec směřující doleva), je výsledný model horší než původní, tzn. faktor má vliv na výsledek a velikost vlivu je zobrazena délkou sloupce. Modrý sloupec směřující doprava značí, že výsledný model je bez daného faktoru lepší než původní, tzn. faktor nemá vliv na výsledek. V grafu 2.1 byly pozorované jednotlivé faktory, v grafu 2.2 jednotlivé faktory + interakce těchto faktorů. Sledované faktory: rok experimentu, čas odběru vzorku (DPI), imidaklopid, včelí úl a interakce těchto faktorů. Graf byl vyhodnocen Bayesovskou analýzou v programu R, verze 4.2.2 a rozšiřujícího balíčku BayesFaktor, verze 0.9.12-4.4.



Graf 2.1: Včely – model s interakcemi (infekce L. passim; L. passim + imidakloprid)



Graf 2.2: Včely – zjednodušený model bez interakcí (infekce L. passim; L. passim + imidakloprid)

4.2.4.2 Proteomická analýza pozitivních (a kontrolních) vzorků

Proteomická analýza hlav včel umožnila identifikaci 2554 proteinů příslušejících k *Apis mellifera*. Výsledky proteomu jednotlivých vzorků byly velmi variabilní v rámci vzorků hlav. Proto bylo přistoupeno k vytvoření komplementu jako negativní kontroly pro vyhodnocení. Porovnání třech variant Spearmanovy pořadové korelace bylo provedeno za použití korekce typu FDR (false-discovery rate) 0,01 a 1 000 randomizacemi. Toto aplikované statistické vyhodnocení indikovalo 1 signifikantně rozdílný marker. Signifikantně rozdílným markerem (-Logp = 3,76; FDR = 0,01) byl transferrin 1 precursor (NCBI protein: NP_001011572.1).

Následný návrat do hrubých dat (tabulka 42) ukázal, že se jedná o intenzivní marker, který byl v analýze identifikován celkem 2513 MS/MS identifikacemi. V tomto ohledu se jednalo o 40. marker s nejvíce MS/MS identifikacemi z celkového počtu 2554 identifikovaných proteinů. Z rozdílů průměrů log₂ LFQ intenzit transferrinu 1 pro jednotlivé varianty pak vyplývá, že tento rozdíl (log₂-násobná změna) je **i)** mezi *Lotmaria passim* a kontrolou 1,3 a **ii)** mezi *Lotmaria passim* a *Lotmaria passim* + imidaklopid 1,5, **iii)** zatímco rozdíl mezi *Lotmaria passim* + imidaklopid a kontrolou je pouze -0,2. Rozdíly na log₂-násobnou změnu větší než 1 lze považovat za podstatné.

Tabulka 42: Naměřené hodnoty ve změně abundance pro protein transferrin 1.

Vzorek	Skupina	Hmotnost hlavy (g)	Transferrin 1 (log ₂ LFQ intenzita)	Průměrná hodnota (log ₂ násobná změna)
G3	<i>L. passim</i>	0,009	29,21	29,07
G7	<i>L. passim</i>	0,010	29,18	
G9	<i>L. passim</i>	0,008	28,47	
G10	<i>L. passim</i>	0,010	28,82	
G11	<i>L. passim</i>	0,011	29,70	
A5	<i>L. passim</i> + IMI	0,011	27,49	27,61
A6	<i>L. passim</i> + IMI	0,011	27,43	
A7	<i>L. passim</i> + IMI	0,011	27,53	
A9	<i>L. passim</i> + IMI	0,011	27,84	
A11	<i>L. passim</i> + IMI	0,012	27,78	
A12	Kontrola	0,010	28,15	27,77
B2	Kontrola	0,009	27,75	
B3	Kontrola	0,009	27,97	
B4	Kontrola	0,009	27,73	
B5	Kontrola	0,010	27,27	

4.2.5 Kvantitativní PCR analýza *L. passim* u trubců včely medonosné

Po 3 dnech experimentu došlo k uhynutí všech jedinců, a tak byly vzorky zamrazeny v -60 °C. Poté byly zpracovány dle izolačního protokolu a testovány metodou qPCR. V žádném vzorku nebyla detekována *Lotmaria*.

5 Diskuse

5.1 Detekce trypanosomatid u sociálních a volně žijících včel

Prvním cílem diplomové práce bylo zjistit **prevalenci vybraných patogenů u včel**, zejména u eusociálních (*Apis mellifera*, *Bombus terrestris*), ale do práce bylo zahrnuto i velké množství včel samotářských. Analyzování širokého spektra zástupců blanokřídlého hmyzu by mohlo odhalit možný přesun parazitů (*L. passim*, *C. bombi*) z přirozených hostitelů (včela medonosná, čmelák zemní) na další potencionální hostitele.

Na přítomnost trypanosomatid bylo celkem testováno 386 včel medonosných. Na vzorcích z lokality VÚVč Dol, Máslovice byla stanovena prevalence *L. passim* u úlových včel v srpnu v roce 2020 na 51 %. Následující dva roky (vždy v červenci) byly testovány včely pocházející ze včelnice VÚRV, v. v. i. v Praze Ruzyni. Ke stanovení prevalence byly vybrány 3 úly a z jednotlivých úlů se vzorky odebraly ve stejný čas. Výsledky ukázaly, že abundance *L. passim* byla velmi variabilní (63 %, 44 % a 17 %) v rámci 3 analyzovaných úlů, a to i přesto, že včely pocházely z jedné lokality (navíc se jednalo o stejnou genetiku – matky vznikly z jednoho včelstva) a úly byly dokonce umístěny blízko sebe. I tak ale mohou existovat nějaké odlišnosti v genetice, eusociální imunitě včel či mohla být rozdílnost prevalence mezi úly dána odlišným složením střevního mikrobiomu, který hraje velkou roli při rozvoji infekce. Variabilita prevalence byla podobná jako v předchozích studiích – například v devítileté studii v Srbsku se prevalence pohybovala v rozmezí 39–83 % (Stevanovic et al., 2016); v Chile dosáhla ještě vyšších hodnot pohybujících se od 44–92 % (Arismendi et al., 2016). Výsledky sledování početnosti parazitů v úlových včelách sbíraných z plodového plástu z let 2021–2022 (z VÚRV) ukázaly vysoké zatížení parazitem pohybující se v rozmezí od 1 048 do 9 500 000 buněk *Lotmaria* na včelu. Tyto naměřené koncentrace jsou obdobné hodnotám zjištěných v jiných studiích (Arismendi, Castro, et al., 2020; Xu et al., 2018). Nejvyšší naměřené koncentrace parazita v předchozích studiích byly však v řádu 10^6 , kdežto při našem pozorování se hodnoty přibližují k řádu 10^7 . Výsledky tedy ukazují, že maximální hodnoty parazita *L. passim* mohou být i o řád vyšší než v dosavadních studiích, kdežto pozorovaná prevalence byla naopak výrazně nižší v porovnání s ostatními výzkumy (Arismendi et al., 2016; Stevanovic et al., 2016). Vysoká koncentrace parazita mohla být ovlivněna sezónou, kdy největší početnosti nabývá parazit před a po přezimování, pravděpodobně z důvodu klidného chování včel v zimě (Higes et al., 2010, 2013). Vysoké zatížení parazitem v našem případě může být vysvětleno i věkem včel. Testovány byly totiž včely z plodového plástu před vzlétnutím (cca 10-15 denní včely), což je doba, kdy se za experimentálních podmínek parazit nejvíce rozmnožuje a dosahuje ve včele nejvyšších hodnot (Logan et al., 2005; Strobl et al., 2019). Prevalence *L. passim* byla testována také na několika vzorcích včel odchycených pomocí žlutých misek, ve kterých byla odhalena 31% prevalence. Průměrování výsledků z let 2020-2022 ukázalo cca 43 % prevalence *L. passim* u včel medonosných v Praze a jejím okolí v letním období. Vzhledem ke zjištěné prevalenci v jiných zemích (až 92 %) je výskyt *L. passim* u nás méně častý, avšak studie Hubert et al., (2017) zaznamenala infekci *L. passim* na našem území skoro ve všech analyzovaných úlech (90 %).

Dále byla diplomová práce zaměřena na výskyt trypanosomatid ve volně žijících včelách. Na přítomnost jednohostitelských trypanosomatid bylo testováno celkem 299 jedinců různých blanokřídlých zástupců z okolí Prahy. Důležité pro určení prevalence bylo i samotné zvolení vhodného způsobu odchytu hmyzu. Nejpoužívanější a zároveň nejjednodušší metodu odchytu florikolního hmyzu představují barevné miskové pasti. Nejčastěji mají žlutou barvu (tzv. Moerickeho pasti) připomínající

květ rostliny. Misky jsou naplněné konzervační tekutinou s kapkou detergentu, který snižuje povrchové napětí vody. Tato metoda odchyty se osvědčila, protože jsme získali vysoký počet vzorků. Problémy při použití této univerzální metody sběru se týkají fixace a uchování vzorku pro detekci parazitární DNA. Naše výsledky z analýz z odběrů v roce 2020 pomocí žlutých misek však vykazují celkem vysokou prevalenci *L. passim* u včel medonosných (31,25 %). Celosvětová prevalence *L. passim* u včel medonosných se pohybuje v rozmezí 15-75 % (Castelli et al., 2019; Cepero et al., 2014; Ravoet et al., 2013; Runckel et al., 2011; Stevanovic et al., 2016). Náš výsledek tak odpovídá zhruba průměrné zjištěné prevalenci, proto považujeme tuto metodu sběru hmyzu za vhodnou. Pomocí Moerickeho pastí se podařilo nasbírat i další druhy včel, *L. passim* však nebyla detekována v žádném z nich. Výsledky dokazující nepřítomnost *L. passim* u volně žijících včel/čmeláků poukazují na to, že na námi sledovaných lokalitách nedochází k přenosu parazitů mezi *A. mellifera* a dalšími potencionálními včelími hostiteli. Některé studie (Arismendi et al., 2016, 2021; Bartolomé et al., 2018) uvádí parazitaci *Lotmaria* i u dalších eusociálních včel – *Apis cerana* (asijská včela medonosná, ta se však na našem území nevyskytuje) a *Bombus* spp. Detekce u jiného druhu však nutně nemusí znamenat, že tento druh může skutečně sloužit jako nový hostitel. Jedinci jiných druhů mohou patogeny pouze pasivně přenášet, ale neumožňují jejich replikaci (Graystock et al., 2015; Ruiz-González & Brown, 2006b). Být novým hostitelem navíc nemusí nutně vést ke stejnému rozvoji infekce jako u původního hostitele a to z důvodu různé citlivosti vůči patogenům (Feng et al., 1990; Jensen et al., 2009).

V této práci bylo zjištěno u volně žijících včel relativně vysoké zastoupení *Leptomonas seymouri*, který byl potvrzen u 4 rodů včel (*Lasioglossum* spp. 6,1 %, *Halictus simplex* 21,4 %, *Andrena* spp. 20,6 % a *Colletes cunicularius* 27,3 %). Původním a zároveň nejběžnějším hostitelem *Leptomonas* je skupina Hemiptera (Votýpka et al., 2012; Wallace, 1977; Yurchenko et al., 2006). Infekce *L. seymouri* byla pozorována i u lidí, kam musela být pravděpodobně zanesena krevsajícím členovcem a adaptovat se na přežití v obratlovci (Kraeva et al., 2015). Výskyt u včel je tudíž také možný, nicméně vzhledem k vysoké citlivosti nested PCR se mohlo v některých případech jednat o kontaminaci, a tak prevalence nebude pravděpodobně tak vysoká. U dvou jedinců samotářské včely *Andrena flavius* byl identifikován druh *Crithidia brevicula* (2,7 %), která navíc u jednoho z těchto vzorků tvořila směsnou infekci s druhem *Herpetomonas* sp. U třech dalších jedinců včel byli detekováni různí volně žijící zástupci skupiny Bodonida (konkrétně u *Lasioglossum laticeps*, *Halictus simplex* a *Colletes cunicularius*). V tomto případě se pravděpodobně jednalo o s vodou náhodně nasáté bodonidy, které se podařilo detekovat díky vysoké citlivosti metody nested PCR.

Dále byli na trypanosomatida pomocí nested PCR testováni čmeláci – 28 *Bombus terrestris*, 2 *Bombus lapidarius* a 1 *Bombus pascuorum*. Pouze u 9 (32 %) vzorků *B. terrestris* byla zjištěna přítomnost *C. bombi*. Vzhledem k nízkému počtu odchycených čmeláků *B. lapidarius* a *B. pascuorum* je negativní výsledek předpokladatelný, u obou druhů je však výskyt *C. bombi* potvrzen (Michalczyk & Sokół, 2022; R. Schmid-Hempel & Tognazzo, 2010). Prevalence těchto parazitů u čmeláků zemních se postupem sezóny zvyšuje (Cameron et al., 2016; R. Schmid-Hempel et al., 2014) a sezonní nárůst mezi červencem a srpnem může dosahovat až 80 % (Shykoff & Schmid-Hempel, 1991). Ačkoliv může čmelák představovat hostitele pro více druhů včelích parazitů, například *C. expoeki* (R. Schmid-Hempel & Tognazzo, 2010) či dokonce včelí *Lotmaria* (Bartolomé et al., 2018), nám se podařilo detekovat pouze *C. bombi*. V žádném z 415 testovaných vzorků (32 včel medonosných odchycených pomocí žlutých misek, 84 úlových medonosných včel z Dolu, 299 ostatních druhů včel viz tabulka 2) nebyla

diagnostikována *Crithidia melliferae*, čímž se potvrzuje její vzácný výskyt (Schwarz et al., 2015; Stevanovic et al., 2016) oproti blízkce příbuznému druhu *L. passim*, který byl u včel hojně zastoupen. Po popisu *C. melliferae* trvalo zhruba čtyřicet let, než byla k dispozici molekulární data, která by sloužila k přesnější identifikaci a popisu nového druhu *L. passim* (Ravoet et al., 2015). Tento fakt je potřeba zvažovat pro starší publikace uvádějící výskyt *C. melliferae*.

5.2 Experimentální infekce s *L. passim* a *C. bombi*

Nejdůležitější fází před experimenty se včelami byla kontrola líhnoucích se včel na přítomnost (nepřítomnost) parazitů, aby mohly být zahájeny pokusy s naivními (*L. passim* negativními) včelami. Sběr líhnoucích včel musel být uskutečněn ze stejného úlu, nejlépe ze stejného plodového plástu, aby byli zajištěni geneticky stejní jedinci. Zároveň odběr líhnoucích se včel probíhal ve stejný čas, jelikož s časem (se stádiem a stářím včely) se mění chování včely či složení mikrobiomu, který by mohl ovlivnit náchylnost vůči parazitům. Tyto podmínky však některé studie nespĺňují a experimenty provádějí na včelách různého stáří (Buendía-Abad, García-Palencia, et al., 2021; Schwarz & Evans, 2013), kdy se včely před infekcí líhnou na rámečku v termostatu. Tímto způsobem líhnutí se kromě rozdílného věku pokusných včel umožnil i kontakt s vnější částí plástve či jinou včelou, což může vést ke kontaminaci vzorku (respektive k nakažení včely) a tedy i ke zkreslení výsledků. Obdobnou chybu jsme udělali v prvotním zkušebním experimentu (VÚVč Dol, 2020). Ve všech ostatních pokusech jsme již postupovali důsledně a byly odebírány pouze líhnoucí včely prokousávající se víčkem včelí buňky bez kontaktu s vnějším okolím, stejně jako bylo provedeno ve studiích Erban et al. (2016); Erban, Sopko, Kadlikova, et al. (2019). Navíc včelstvo v experimentech Schwarz & Evans (2013) bylo postižené roztočem *Varroa destructor*. Hubert et al. (2017) ve své studii popisují ovlivnění mikrobiomu včely medonosné napadené tímto roztočem, který přispívá ke změnám ve složení bakteriálního společenstva dospělých včel. Proto je otázkou, zda brát takové studie (s roztoči) za relevantní. Námí správně odebrané líhnoucí se včely, u nichž bylo zabráněno styku včel s vnější částí plástve, zásobami či dalšími včelami (navíc kontrola na nepřítomnost roztočů), jsme analyzovali pomocí qPCR. Analýza potvrdila, že líhnoucí se včely jsou negativní na přítomnost trypanosomatid, toto zjištění potvrzují i předešlé studie, ve kterých byli vždy jako hostitelé uváděni pouze dospělí jedinci (tedy jedinci, kteří se nakazí až po vylíhnutí z buňky).

Avšak výsledky studie Arismendi et al. (2020) přinesly nový pohled na životní cyklus parazita spjatý s vývojem včel a otevřely tak nové cesty přenosu uvnitř kolonie. Před touto studií byly popsány pouze infekce dospělých jedinců a nebyly zaznamenány žádné infekce u vývojových stádií včel; naopak Arismendi et al. (2020) zaznamenávají infekce u larev, kulek, a dokonce i u líhnoucích se včel. Další studie Taric et al. (2020) potvrzuje infekci mimo dospělé včely, přičemž autoři odhalují přítomnost *L. passim* u kulek včely medonosné, což by mohlo indikovat případnou přítomnost *L. passim* i u nově líhnoucích se včel. Ve výzkumu Michalczyk et al. (2022) identifikovali *Lotmaria* ve všech analyzovaných stádiích včel (larva, kukla, dospělec). Výše uvedené studie tedy dokládají přítomnost *Lotmaria* u různých vývojových stádií včetně larev či nově vylíhlých včel (v některých případech však již vylíhlých na plástu) a mohou tak zpochybňovat všechny předešlé nálezy. Tato skutečnost by značně zkomplikovala jakékoliv infekční experimenty se včelami, pokud by již líhnoucí se včely byly přirozeně infikované. Otázkou zůstává, jak by k případnému přenosu trypanosomatid na líhnoucí se včely docházelo. U včel nebyl zatím potvrzen přenos z matky na plod (tedy transovariálně), nicméně může teoreticky probíhat tzv. transovarum přenos, kdy nejsou paraziti přímo ve vajíčku, ale jsou uchyceni na

jeho povrchu (Frolov et al., 2021). Při experimentech s vajíčky je proto důležité se zbavit všech nečistot včetně povrchově přítomných patogenů (Arismendi, Castro, et al., 2020).

Vysvětlení infekce líhnoucích se včel může spočívat i v pouhé kontaminaci, kdy mohla být včelí plodová buňka zanesena patogeny před jejím zavíčkováním, jak zmiňuje Arismendi et al. (2020) či se mohly larvy nakazit od úlových včel při jejich krmení. K takovým přenosům infekce však může dojít spíše velmi vzácně či v ojedinělých případech a námi negativně analyzované líhnoucí včely (120 vzorků) a negativně analyzované kontrolní včely (90 vzorků) považujeme za opravdu nenakažené. Navíc líhnoucí se včely byly odebrány společně se včely úlovými, u kterých jsme později na základě qPCR zjistili vysokou prevalenci *L. passim*. Nově vylíhlé včely tedy pocházely z vysoce infikovaných úlů, a přesto u nich k žádné nákaze nedošlo. V současné době nedokážeme uspokojivě vysvětlit tento zjevný rozpor mezi nově publikovanými nálezy a našimi výsledky, i když by šlo spekulovat např. o odlišném chování různých kmenů a linií parazita apod. Za nejdůležitější však považujeme skutečnost, že na základě námi provedených experimentů byly kontrolní včely opravdu negativní na přítomnost *L. passim*, u nakažených včel se pak jednalo o experimentální nákazu laboratorním kmenem (klonem) parazita.

Na přítomnost trypanosomatid byli analyzováni i čmeláci zemní pocházející z certifikovaného (=neinfikovaného) chovu z Belgie. U žádného z nich nebyla detekována *C. bombi* (ani jiný trypanosomatid), proto jsme je mohli bez obav zahrnout do experimentů.

Při prvotní experimentální infekci včel byl sledován vývoj parazita *L. passim*. K rozvoji infekce došlo u 50 % pokusných včel. V mnoha případech byla pozorovaná vysoká intenzita infekce (rostoucí s časem), že je těžko představitelné, že by tento parazit mohl být jen pouhým víceméně komensálním (nepatogenním) organismem. Pod světelným mikroskopem byly pozorovány jak kulovité (sféroidní) buňky, tak bičíkaté. Které z těchto dvou stádií je zodpovědné za rozvoj infekce *L. passim* není zatím známo. Mohlo by se jednat o sféroidní buňky, které se vyskytovaly v trávicím traktu dříve než velcí bičíkovci a jsou hojně zastoupeny i v kultuře. Stejně pořadí nástupu jednotlivých morfotypů zaznamenal i výzkum se včely (Ruiz-González & Brown, 2006b), kde ale pozorovaným parazitem byla *C. bombi* u včel medonosných. Zaznamenání byli amastigoti u 5denních včel, které pak doplnili promastigoti a choanomastigoti 15. den infekce. Studie se čmeláky Logan et al. (2005) přišla s opačnými výsledky, kdy se jako první v trávicím traktu objevila bičíkatá stádia, která byla poté nahrazena amastigoty. Ve výzkumu včel medonosných byli promastigoti *L. passim* přítomni po celou dobu pozorování, avšak v menší četnosti než sféroidní buňky (Schwarz et al., 2015). Dosavadní studie jsou rozdílných názorů ohledně infekčnosti pozorovaných stádií. Například studie Higes et al. (2016) prováděli nákazu pomocí sféroidů, kdežto studie Buendía-Abad et al. (2021) pomocí promastigotů. (Možné hypotézy ohledně infekčních stádií trypanosomatid jsou uvedeny v kapitolách 2.2.2.3 a 2.2.3.2). Je tedy pravděpodobné, že obě stádia (sféroidi i promastigoti) jsou schopná v hostiteli rozvinout infekci. Pro přesný popis životního cyklu trypanosomatid bude zapotřebí dalších studií. V životním cyklu trypanosomatid je v rámci jednotlivých studií stabilní lokalizace parazitů – zadní střevo, ve kterém jsme pozorovali *Lotmaria* především v rektu s občasnými nálezy v ileu. Ke stejnému závěru došli i ve studii Buendía-Abad, García-Palencia, et al. (2021), ve které byla sledována kromě *L. passim* i *C. mellificae*, která vykazovala na rozdíl od *Lotmaria* větší tropismus pro ileum.

Další zaměření této práce bylo na **zkřížené infekce a interakci včelích parazitů**, a to pro experimentální infekce *L. passim* a *C. bombi* u včel a čmeláků. Čmeláci a včely medonosné jsou si fylogeneticky blízcí (Lockhart & Cameron, 2001), sdílejí podobnou ekologii a chování (hledání potravy, překrývání se v terénu, sdílení zdroje potravy). Kombinace jmenovaných faktorů tak může umožnit oběma druhům parazitů přežít nebo dokonce rozvinout infekci u nespecifického hostitele, což se za laboratorních podmínek zdárně daří (Ruiz-González & Brown, 2006b). U různých linií monoxenních trypanosomatid byla též prokázána genetická výměna, a tak může díky extrémní diverzitě genotypů každý hostitel nést svůj vlastní infekční koktejl složený z téměř jedinečných kmenů (Schmid-Hempel & Reber Funk, 2004; R. Schmid-Hempel et al., 2011).

Ačkoliv není včela medonosná přirozeným hostitelem *C. bombi*, u 19 % vzorků se nám v manipulativním experimentu podařilo navodit infekci tímto parazitem. Ve výzkumu Ruiz-González & Brown (2006b) se povedla nákaza dokonce u 27 % včel, což je vskutku zajímavé. V případě směsných infekcí se u včel překvapivě uchytila více *C. bombi* než včelí parazit *Lotmaria*. Každopádně se jedná pouze o malý počet opakování, a tak úspěšnější nákaza *C. bombi* mohla být pouhou náhodou. Nelze také přehlédnout vzájemný synergistický vztah mezi oběma parazity, kdy v případě podařených infekcí *L. passim* byl tentýž vzorek nakažen i *C. bombi*.

Při experimentu se čmeláky se infekce *Crithidia* uchytila u 50 % jedinců, kdežto *Lotmaria* pouze u 1 čmeláka. Není proto překvapivé, že výsledek korelace mezi druhem hmyzu a druhem parazita vyšel signifikantní. Ve studii Ruiz-González & Brown (2006b) byla také zkoušena infekce *C. mellificae* u čmeláků, která se ale nezdařila. U námi provedených směsných infekcí čmeláků byla nákaza *Lotmaria* úspěšná též u 1 jedince, u kterého se zároveň ujmula i *C. bombi*, a to až v neuvěřitelně vysoké koncentraci (u jednoho jedince až 14 620 000 buněk). Je důležité zmínit, že vyšší koncentrace parazitů může být důsledkem přijímání většího množství potravy čmelákem než včelou a také jeho větší velikostí. Pokud by čmelák požil 2x více potravy než včela, mohlo by dojít i k 2x vyšší intenzitě infekce, i když tento poznatek byl korelován infekční dávkou, která byla u čmeláků nižší. Vzhledem k úspěšným směsným infekcím v tomto i v předešlém případě (*C. bombi* + *L. passim* u včel) je tedy možné, že jeden parazit zvyšuje úspěšnost nákazy parazita druhého a dochází tak ke vzájemnému prosperujícímu či synergickému vztahu mezi nimi. Toto zjištění potvrzují i statistické výsledky, kdy u obou experimentů vyšel jako signifikantní faktor interakce mezi oběma parazity. U obou experimentů byl patrný i trend ohledně počtu infikovaných jedinců rostoucích s časem. Stejně tak i množství parazitů nabývalo vyšších hodnot se vzrůstajícími DPI.

Dalším cílem práce bylo **u experimentálně infikovaných včel sledovat působení pesticidu na parazity**. Infekce *L. passim* se neuchytila u všech 360 inokulovaných včel, ale pouze u 46 % (z toho 71 % tvořily vzorky s expozicí pesticidu), ačkoliv všechny včely měly stejný přístup k potravě s infekční dávkou. Také z důvodu probíhající výměny potravy mezi jedinci by bylo možné očekávat vyšší prevalence. K infekci došlo již po 3 dnech od podání inokula a v následujících dnech bylo pozorováno u infikovaných včel rapidní množení (především u včel krmených pesticidem). Vrchol infekce nastává během 9. až 11. DPI, kdy se může vyskytovat až 7 260 000 *L. passim* ve střevě včely. Studie Strobl et al. (2019) zabývající se kvantifikací včelích trypanosomatid u experimentálně infikovaných včel popisuje největší nárůst poslední den experimentu (19 DPI; první pozorování zahájeno až 6 DPI s pozitivním nálezem), v našem případě byla též nejvyšší zátěž sledována poslední den experimentu

(11 DPI; první pozorování zahájeno 3 DPI s pozitivním nálezem). V 15denním experimentu Logan et al. (2005) bylo sledováno největší zastoupení parazita 13. den od infekce s uchycením parazita již v prvním dni. Některé včely v našem experimentu vykazovaly vysoké infekce v řádech milionů již 7 DPI. Vysoké hodnoty přetrvávaly až do konce experimentu, nebyl pozorován žádný výrazný pokles. Naše poznatky korelují s výsledky ze studie Strobl et al. (2019), u nichž byl pozorován taktéž nárůst infekce *L. passim* u líhnoucích včel bez poklesu infekce ke konci experimentu, ačkoliv v této studii se mezi prvním a posledním pozorovaným dnem zvýšila infekce pouze 6,6krát, u nás v některých případech došlo až ke stonásobnému nárůstu původních hodnot. Vysoký rozdíl v abundanci parazita by mohl být způsobený absencí pylu v potravě v experimentu Strobl et al. (2019), kdy by účinek pylu mohl působit inhibičně na růst parazita, jak je popsáno u Logan et al. (2005). Hlavní roli při tak vysokých hodnotách parazita naměřených v našich experimentech však bude hrát ve většině případech přidání pesticidu do potravy.

Naše výsledky především naznačují, že k vysoké infekci dochází tedy především u včel ovlivněných (=krmených) modelovým pesticidem imidaklopridem. Toto pozorování bylo potvrzeno i u opakovaného pokusu a vypovídají tak o jisté interakci mezi parazity ze skupiny Trypanosomatida a pesticidy z řad neonikotinoidů. *Lotmaria* se uchytla rychleji, ve větším počtu jedinců a dosahovala většího počtu buněk na včelu za přítomnosti pesticidu. Statistické analýzy potvrdily, že imidakloprid je signifikantní faktor zvyšující infekci včel *Lotmaria*. V opakovaném pokusu se podařilo navodit infekci u většího počtu jedinců a zároveň dosáhnout i vyšší koncentrace parazita. Infekční dávka byla mezi oběma roky nepatrně rozdílná ($1,56 \times 10^4$ oproti $1,2 \times 10^4$), avšak pro rozvoj infekce je potřeba minimální koncentrace 5 000 – 25 000 buněk (Brown et al., 2003; Logan et al., 2005), proto tento rozdíl (3 400 buněk) můžeme považovat za nevýznamný a nezdá se být důvodem vyššího uchycení parazita v druhém opakování pokusu, ve kterém navíc byla použita nižší koncentrace ($1,2 \times 10^4$). Důvodem rozdílného uchycení parazita v různých letech tak může být i samotné rozdílné chování včel. Výsledek korelace mezi rokem a imidaklopridem vyšel signifikantně, tudíž každý rok včely reagují na pesticid jinak, avšak stále je zachován stejný trend – zvýšení infekce *L. passim* způsobená imidaklopridem. Použitá dávka pesticidu byla v obou pokusech o koncentraci 2,5 μg na 1 l potravy. Realistický obsah neonikotinoidů v nektaru a pylu dosahuje řádově několika jednotek μg (až dokonce 10 μg) na 1 kg pylu nebo nektaru (Erban, Sopko, Talacko, et al., 2019; Rortais et al., 2005; Wood et al., 2018). Naše výsledky tak vypovídají o významném vlivu imidaklopridu na *L. passim* i v takto nízkých expozicích (2,5 $\mu\text{g/L}$), avšak toto zjištění bude muset být do budoucna potvrzeno, neboť zatím žádné studie nezkoumaly vliv imidaklopridu na infekci *L. passim*.

Ovlivnění parazitů (zejména trypanosamid) ve včelách se věnoval pouze omezený počet studií. Často nejsou pozorovány žádné významné interakce, avšak některé publikace uvádí účinky v rozsahu od antagonismu po synergismus. Náchylnost vůči patogenu v důsledku vystavení včel pesticidům byla prokázána například u *N. ceranae* (Rouzé et al., 2019) či byl ve spojení s pesticidem thiamethoxam pozorován nárůst viru chronické paralýzy včel (Coulon et al., 2019). V bakalářské práci (Bártová, 2020) vypracované v laboratoři ve VÚRV byly zjištěny synergické účinky pesticidu ve spojení s přítomným ektoparazitem, kdy 72hodinová expozice imidaklopridem o koncentraci 2,5 $\mu\text{g/L}$ způsobila vyšší replikaci viru přenášeného roztočem *Varroa* (shodné účinky pesticidu jako v našem pozorování s *L. passim*). U trypanosomatid nebyl zatím pozorován žádný významný účinek či interakce s pesticidem. Ve studii Fauser-Misslin et al. (2014) se čmeláky infikovanými *C. bombi* byl zjištěn vliv

insekticidů na parazity a byla odhalena významná interakce neonikotionidů (klothianidin a thiametoxam) a *C. bombi*, kdy kombinace těchto 2 faktorů negativně ovlivňovala přežívání královny.

Vliv pesticidů nemusí být pouze přímý, ale i nepřímý skrze ovlivnění organismů asociovaných se včelami včetně patogenů a symbiotických bakterií přítomné v mikrobiomu (Goulson et al., 2015; Pettis et al., 2013). Zvýšení náchylnosti vůči patogenům bylo pozorováno například u glyfosátu, a to v souvislosti právě se změnou mikrobiomu včel (Motta et al., 2018). U experimentálních infekcí *L. passim* byly pozorovány taktéž změny ve složení střevního mikrobiomu, a to konkrétně nárůst celkové biomasy mikrobioty (Schwarz et al., 2016). Ve vysvětlení nárůstu mikrobiotických organismů by mohl hrát roli obranný mechanismus hostitele či se může jednat o pouhé využívání hostitele ve svůj prospěch, kdy *L. passim* nějakým způsobem využívá mikroorganismy svého hostitele. Je možné, že inokulum parazitem interaguje s mikrobiomem včely tak, že naruší střevní homeostázu, nebo umožní komenzálním střevním bakteriím proniknout střevní bariérou, což vede k antibakteriální reakci hostitele (Barribeau & Schmid-Hempel, 2013). Mikrobiotické bakterie ovlivňují imunitní a jiné signální dráhy, proto může změna v mikrobiomu vést k provázanému ovlivnění výživy, fyziologie a infekčních chorob (Harris et al., 2019; Tauber et al., 2019). Vystavení včel tak vysokému spektru patogenů a pesticidů může mít za následek snížení imunokompetence až kolaps včelstva (Grassl et al., 2018). Pro objasnění mechanismu interakce bude zapotřebí provést komplexní studie, které budou zahrnovat kromě interakce patogenů mezi sebou a interakci patogenů s pesticidy i jejich interakci se symbiotickými organismy.

Proběhlé experimenty se včelami (čmeláky) byly velmi rozsáhlé, složité a prováděné opakovaně, proto bylo vhodné vytvořit dostatečně robustní protokol. Hlavním omezením při sestavování vhodného protokolu a metodologických postupů se týkají raných fází zpracování vzorku a extrakce nukleových kyselin. Zejména to platí pro homogenizaci a inkubaci vzorku, které ovlivňují nejen účinnost extrakce nukleové kyseliny, ale také její celistvost a složení. Na detekci i kvantifikaci parazitů byl použit zadeček včel, kde se množí téměř všechny včelí patogeny a probíhá odtud i vylučování infekčních stádií do prostředí. Na exoskeletu tak mohou zůstat zachycené tyto infekční částice či je může včela získat pasivně z infikovaného prostředí. Proto před izolací byl abdomen včely zbaven všech nečistot pomocí absolutního lihu a sterilního fyziologického roztoku, které kontaminanty z povrchu odstraní.

Následné zpracování vzorků probíhalo pomocí qPCR. K získání standardní křivky byl použit PCR produkt o známé koncentraci parazitů, ze kterého jsme desítkovým ředěním vytvořili vlastní standardy. Po otestování jsme ale zjistili, že toto ředění není vhodné a kvantifikační systém zaznamenává pouze infekce o řádu 1 000 a výš. Proto byl vytvořen nový standard s ředěním 1:4, který zajistí rozsáhlejší interval pro amplifikované DNA a možnost detekce i slabších infekcí. Při použití těchto standardů byl detekován i vzorek o nižší koncentraci (avšak stále 10^3), který ale při opakovaném použití selhával (z důvodu degradace DNA). Proto se vytvořily zásobní alikvoty, které se vždy používaly jen na několik málo měření. Naše výsledky jsou tedy řádově omezené pouze na tisíce a výše. Pro zaznamenání nízkých infekcí by bylo možná vhodnější zvolit zakoupené syntetické standardy než výroba vlastních z purifikovaného PCR produktu. Za úvahu stojí i zvolení jiného způsobu izolace, u kterého by byla výtěžnost DNA vyšší. Koncentrace nukleových kyselin u standardů byla naměřena pouze 24 ng/μl. Jelikož byly všechny vzorky izolované stejným izolačním kitem bez následného měření extrahované DNA, postup izolace u standardů se neměnil. Toto zkrácení bylo vyloučeno díky zahrnutí referenčních genů pro Hymenoptera (či Apidae) do analýz. U všech vzorků byl tento referenční gen přítomen ve

stejném zastoupení, tudíž izolace proběhla správně. Další kontrola spočívala v odstranění falešně pozitivních a negativních výsledků, proto byly vzorky v triplikátech.

Nedílnou součástí experimentů se včelami je i samotný výběr vhodných podmínek pro chování včel se zahrnutím experimentálních infekcí. Tato fáze byla však dost stěžejní, jelikož se mezi studiemi vyskytlo několik odchylek. Prvním důležitým aspektem byla potrava včel, kterou jsme chtěli zajistit co nejpřirozenější skládající se z proteinů a cukrů získaných z květního nektaru a pylu. Navození této přirozené cesty se však ostatní studie neřídily a jejich potrava pro včely byla založena pouze na cukerném roztoku (Buendía-Abad, García-Palencia, et al., 2021; Buendía-Abad, Higes, et al., 2021; Higes et al., 2016; Schwarz & Evans, 2013; Strobl et al., 2019). Je známo, že pyl zvyšuje přežití včely medonosné, ale také zvyšuje například intenzitu infekce mikrosporidii *N. ceranae*, která je pro včely patogenní (Jack et al., 2016). Nedostatečná výživa hostitele může vést ke snížení populace parazitů, jako například ve studii se čmeláky infikovaných *C. bombi* (Logan et al., 2005). První příčinou snížení populace parazitů mohlo být prosté snížení dostupnosti zdrojů. Druhým vysvětlením mohlo být, že nepřítomnost pylu mění střevní prostředí tak, že je nevhodné pro růst parazitů. Pokud mají včely či čmeláci příležitost, budou konzumovat pyl po celou dobu svého života (Smeets & Duchateau, 2003). V důsledku toho by v podmínkách vhodné dostupnosti zdrojů měly být populace parazitů v hostitelích vysoké. Naproti tomu, když jsou kolonie potravně stresované, jako tomu je při laboratorních podmínkách, populace parazitů by měly klesat. Proto by se při experimentech měl zvažovat tento aspekt a do potravy včel/čmeláků zahrnout i pyl, jako tomu je v přirozených podmínkách hostitele. Je tedy diskutabilní uváděné vysoké přežívání experimentálních jedinců, kterým byl odebrán zásadní zdroj bílkovin a esenciálních aminokyselin. V přirozených podmínkách je životnost dělnice včely medonosné 20-40 dnů (Winston, 1991). V porovnání s předešlými studiemi, kde je někde uváděna životnost včel za laboratorních podmínek až 30 dní (Higes et al., 2016), bylo přežívání včel v našich experimentech velmi nízké, neboť k vymření došlo již po 13. dnech, a to i přes to, že jsme se snažili navodit včelám maximálně přirozené prostředí, a to i v podobě povoskování pokusných nádob s větším počtem jedinců, což v žádné z předešlých studií neproběhlo. Když vezmeme v úvahu tyto předchozí studie s absencí pylu v potravě, tak je nepravděpodobné, že by snížení přežití dělnic bylo způsobeno nedostatkem bílkovin. Proč došlo v našich experimentech k tak brzkému úhynu včel vzhledem k ostatním výzkumům nedokážeme bohužel uspokojivě vysvětlit.

Další problém v experimentálně navozených infekcích představují i samotné druhy rostlin, které jsou včelám v přírodě dostupné k opylení. Některé sekundární metabolity získané z rostlin mohou totiž představovat profylaxi před parazity opylovačů. Nicméně je nutné prozkoumat způsob, jakým jsou fytochemikálie zpracovávány ve včelím střevě a do jaké míry parazity ovlivňují. Závěr je zatím takový, že alespoň některé metabolity získané opylovačem z rostlin vedou k částečné inhibici vývoje včelích trypanosomatid (Koch et al., 2019; Manson et al., 2010; Michaud et al., 2019).

Ve studiích se však objevily i další faktory jako je teplota, věk včel v době podání infekce, způsob podávání inokula a výše infekční dávky, které by mohly mít vliv na rozdílné výsledky mezi jednotlivými studiemi (včetně té naší). Včely byly ve většině studií (Buendía-Abad, García-Palencia, et al., 2021; Buendía-Abad, Higes, et al., 2021; Higes et al., 2016) chovány při teplotě 27 °C, což je teplota optimální pro růst včelích parazitů (Langridge & McGhee, 1967), avšak nikoliv pro včely. Optimální teplota v plodišti včel je 35 °C, kterou jsme po celou dobu experimentů udržovali. Některé studie použili

obdobnou teplotu, a to 30 °C (Logan et al., 2005) či 33 °C (Schwarz & Evans, 2013). Teplota, při které jsou včely udržovány mohla způsobit určité rozdíly ve výsledcích, zejména proto, že tento aspekt byl považován za klíčový faktor v morfologických změnách jiných druhů trypanosomatid – *Leishmania* (Darling & Blum, 1987; Stinson et al., 1989). Pro všechny pokusy jsme používali naivní líhnoucí se včely bez parazitů, avšak mnoho studií infikovalo včely různého stáří (Gómez-Moracho et al., 2020; Higes et al., 2016; Liu et al., 2020; Ruiz-González & Brown, 2006b).

Rozdíl byl i ve způsobu podávání parazitů, ať už se jednalo o podání individuálně či kolektivně. My jsme, stejně jako Buendía-Abad, García-Palencia, et al. (2021), vybrali pro infekci klonální linii parazitů, a to i přesto, že většina autorů k infekci používá infekční stádia získaná z výkalů nakažených včel. Tato varianta se zdá být možná lepší z hlediska navození přirozeného přenosu patogenů, nicméně tento způsob je velmi náročný a musela by se udržovat populace včel sloužící pouze k nákaze, což je nepředstavitelné z hlediska životnosti včel za laboratorních podmínek a zajištění tak vysoké infekce dosahující dávku parazitů potřebnou k infekci, která by se také hůře počítala (= byla by obtížněji reprodukovatelná). Navíc použití klonální linie parazitů zajišťuje 100% reprodukovatelnost mezi jednotlivými opakováními experimentu, což je při použití „směsných“ infekcí z trusu včel nemožné.

Infekční dávka trypanosomatid se ve studiích pohybuje od 5 000 – 25 000 připadající na jednu včelu (Brown et al., 2003; Logan et al., 2005). Pro naše pokusy byla vybrána vyšší varianta z důvodu snadnějšího navození infekce. Rozdílné bylo též načasování infekce po uložení včel do termostatu, které se pohybuje v řádu hodin. Po uložení včel do termostatu jsme zahájili fázi adaptace (24 h) kvůli stresu způsobeným sběrem, proto jsme nechtěli včelám přitěžovat ještě parazity či dokonce pesticidy, které byly podány až 24 hodin po infekci.

U některých faktorů (věk a způsob infekce) bylo zvažováno, že mají signifikantní vliv na infekci střevní mikrosporidie *N. ceranae* (Urbieta-Magro et al., 2019), proto je možné předpokládat vliv těchto faktorů i na infekci trypanosomatid. Dalším významným faktorem bude zajisté i variace infekční dávky parazita, která je u zmiňovaných studií značně rozdílná, a tak by mohla přispět k různým získaným výsledkům (Gómez-Moracho et al., 2020). Při interpretaci výsledků je proto důležité upozornit na tyto faktory, které by mohly ovlivnit virulenci parazita či úmrtnost včel. Odchylek ve studiích bylo nalezeno nespočet, proto by bylo potřeba zavést všeobecně akceptovaný protokol pro experimentální infekce včel trypanosomatidy, díky kterému by byly výsledky mezi jednotlivými studii lépe porovnatelné.

Problematikou vzájemného vlivu včelích parazitů a pesticidů se doposud zabývá velmi nízký počet studií. Proteomická analýza umožnila nahlédnout na interakci z pohledu zastoupení proteinů ve včelích hlavách infikovaných *L. passim* a ovlivněných imidaklopidem a včel sice infikovaných *L. passim* ale bez vlivu imidaklopidu. Statistické vyhodnocení identifikovalo pouze jeden signifikantní proteinový marker, kterým byl transferrin 1 precursor [*Apis mellifera*] (NCBI protein: NP_001011572.1), a to na základě 5 opakováních. U všech dalších sledovaných markerů nebyla pozorována žádná nenáhodná odchylka. Tento receptorový protein, plnící funkci v přenosu železa, vykazoval obdobné hodnoty u včel kontrolních (tj. nenakažených) a infikovaných včel s přidaným pesticidem, zatímco u včel s *Lotmaria* bez imidaklopidu došlo k signifikantnímu zvýšení jeho exprese.

Jak tedy může imidaklopid ovlivňovat úspěšnost uchycení parazita a jeho početnost v souvislosti s transferinem? Je možné, že *Lotmaria* způsobí zvýšení exprese tohoto proteinu ve včele, naopak imidaklopid tento efekt vyruší, čímž dojde ke snížení hladiny transferrinu 1 na původní hodnotu. Železo

je základním regulačním signálem pro faktory virulence u mnoha patogenů a je nezbytné pro jejich vývoj. Snížená exprese transferrinu pravděpodobně vede k tomu, že *Lotmaria* začne více vychytávat železo receptorem zprostředkovanou endocytózou hostitelského transferinu vázaného na své transferrinové receptory, a proto se v hostiteli začne více množit a uchytí se ve větším množství. Vyčerpání zásob intracelulárního železa by vedlo k inhibici růstu parazitů, jako je popsáno u jiných druhů trypanosom (Van Luenen et al., 2005), kde nedostatek železa stimuluje nadprodukcí transferrinového receptoru potřebného pro navázání transferinu (Fast et al., 1999; Gilabert Carbajo et al., 2021; Mussmann et al., 2004). Pro potvrzení hypotézy o interakci mezi *Lotmaria* a imidaklopridem musí být však provedena další studie na větším množství vzorků a s větším počtem opakování.

Experimenty s trubci včely medonosné se bohužel nezdařily a v experimentu došlo k jejich uhynutí již po 3 dnech od zavedení pokusu s *L. passim*. Navíc se nám podařilo získat pouze 5 líhnoucích se trubic, neboť v odebíraném včelstvu byla většina postižena *V. destructor* (trubec je preferovaným hostitelem roztoče). Všechny analyzované vzorky byly bez nálezu *L. passim*. Výsledky jsou však nejisté vzhledem k tak malému počtu odebraných vzorků a k tak rychlému vymření bez možnosti rozvoje infekce. Důvodem nezachycení *Lotmaria* ve střevě po tak krátké expozici by mohlo být kompletní vyprázdnění výkalového vaku trubic. Tyto negativní výsledky by však mohly potvrdit hostitelskou pohlavní specifitu parazita omezující se pouze na dělnice; u matek (stejně jako u trubic) nebyla infekce zatím detekována. Rozdíl v predispozici pohlaví je v některých studiích vysvětlen genetickou heterozygotností hostitele, která může zvyšovat odolnost vůči patogenu (Penn et al., 2002). U blanokřídlého hmyzu pocházejí haploidní samci z neoplozených vajíček a postrádají heterozygotnost v imunitních lokusech (Gerber & Klostermeyer, 1970; O'Donnell & Beshers, 2004). Pokud by platila hypotéza o haploidní náchylnosti, měli by být naopak samci více náchylní k infekcím než diploidní dělnice.

6 Závěr

Výskyt trypanosomatid byl testován celkem u 26 druhů blanokřídlého hmyzu. U 42,8 % včel medonosných (*Apis mellifera*) byla detekována *Lotmaria passim*. Zatížení tímto parazitem bylo sledováno u úlových včel s průměrnou hodnotou 686 tis. buněk na včelu. V žádném vzorku nebyla diagnostikována vzácně se vyskytující *Crithidia melliferae*. U čmeláků zemních (*Bombus terrestris*) byla u 32 % vzorků zjištěna přítomnost *Crithidia bombi*. Všechny testované samotářské včely (291 jedinců) byly negativní na cílová trypanosomatida *L. passim* a *C. bombi*, nicméně byla odhalena přítomnost druhu *Leptomonas seymouri* (*Lasioglossum* spp. – 6,1 %, *Halictus simplex* – 21,4 %, *Andrena* spp. – 20,6 % a *Colletes cunicularius* – 27,3 %), *Crithidia brevicula* (*Andrena flavius* – 2,7 %) a *Herpetomonas* sp. (*Andrena flavius* – 1,4 %).

Na přítomnost trypanosomatid byly pomocí qPCR testovány čerstvě líhnoucí se včely medonosné. Ze 120 testovaných nově vylíhlých včel nebyla žádná pozitivní na *L. passim*; rovněž tak kontrolní skupiny líhnoucích se včel zůstaly negativní po celou dobu experimentu, proto čerstvě líhnoucí se včely považujeme za neinfikované. Negativita pomocí qPCR (na *C. bombi*) byla prokázána v chovech certifikovaných (=neinfikovaných) čmeláků zemních.

U experimentálních infekcí včel medonosných byl sledován vývoj parazita *L. passim* mikroskopickým pozorováním vypitvaných střev. Infekce byla zaznamenána již po 4 dnech od nákazy a k rozvoji infekce došlo u poloviny nakažených jedinců, přičemž intenzita infekce byla v některých případech velmi vysoká. Patrný byl také postupný nárůst početnosti zvyšující se s DPI. V prvních dnech infekce (do 6 DPI) byli pozorováni parazité ve formě tzv. sféroidních buněk, které poté doplnili/nahradili pohybliví promastigoti. Obě stádia se vyskytovala v zadním střevě (dominantně v rektu, méně častěji v ileu).

Zabývala jsem se také hostitelskou specifitou druhů *L. passim* a *C. bombi*. Pravděpodobně díky schopnosti *C. bombi* infikovat různé druhy čmeláků a fylogenetické a ekologické podobnosti čmeláků a včel, se podařilo prokázat zkříženou infekci u *C. bombi* u 3 včel z 16 (ale také *L. passim* u 1 čmeláka z 16), což ukazuje na potenciál *C. bombi* i *L. passim* infikovat i nespécifické hostitele. Pomocí experimentálních infekcí včel a čmeláků byla sledována také vzájemná interakce obou parazitů ve smíšených infekcích. U včel se smíšená infekce uchytila u 18,8 %, v případě čmeláků u 6,3 %, navíc byl pozorován určitý synergistický vztah mezi oběma parazity, kdy se jeden druh snáze uchytí za přítomnosti druhého.

Zjistili jsme pozitivní vliv pesticidu imidaklopridu na rozvoj infekce *L. passim*. Experimentálně infikované včely vystavené působení pesticidu měly signifikantně vyšší prevalenci infekce (64 % vs 27 %) i vyšší průměrnou intenzitu nákazy (389 tis. vs 284 tis. parazitů/včela). Postupem času se u včel vystavených imidaklopridu množství parazitů zvyšovalo na extrémní hodnoty 7,3 mil (11 DPI).

Na základě proteomické analýzy včelích hlav byl odhalen protein, který je pravděpodobně zodpovědný za zvýšení početnosti *L. passim* v imidaklopridem ovlivněných včelách. Jedná se o transferrin 1, který hraje roli v přenosu železa a je mj. důležitý pro růst parazitů. Domníváme se, že *Lotmaria* zvyšuje expresi tohoto proteinu ve včele. Po přidání imidaklopridu naopak dojde ke snížení hladiny transferrinu, na což *Lotmaria* reaguje zvýšeným vychytáváním železa pomocí transferrinu vázaného na své transferrinové receptory.

7 Seznam použité literatury

- Alaux, C., Dantec, C., Parrinello, H., & Le Conte, Y. (2011). Nutrigenomics in honey bees: Digital gene expression analysis of pollen's nutritive effects on healthy and *varroa*-parasitized bees. *BMC Genomics*, *12*(1), 496. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-496>
- Alger, S. A., Burnham, P. A., & Brody, A. K. (2019). Flowers as viral hot spots: Honey bees (*Apis mellifera*) unevenly deposit viruses across plant species. *PLOS ONE*, *14*(9), e0221800. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221800>
- Annoscia, D., Di Prisco, G., Becchimanzi, A., Caprio, E., Frizzera, D., Linguadoca, A., Nazzi, F., & Pennacchio, F. (2020). Neonicotinoid clothianidin reduces honey bee immune response and contributes to *Varroa* mite proliferation. *Nature Communications*, *11*(1), 5887. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19715-8>
- Arismendi, N., Bruna, A., Zapata, N., & Vargas, M. (2016). PCR-specific detection of recently described *Lotmaria passim* (Trypanosomatidae) in Chilean apiaries. *Journal of Invertebrate Pathology*, *134*, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.12.008>
- Arismendi, N., Caro, S., Castro, M. P., Vargas, M., Riveros, G., & Venegas, T. (2020). Impact of mixed infections of gut parasites *Lotmaria passim* and *Nosema ceranae* on the lifespan and immune-related biomarkers in *Apis mellifera*. *Insects*, *11*(7), 420. <https://doi.org/10.3390/insects11070420>
- Arismendi, N., Castro, M. P., Vargas, M., Zapata, C., & Riveros, G. (2020). The trypanosome *Lotmaria passim* prevails in honey bees of different ages and stages of development. *Journal of Apicultural Research*, *61*(1), 63–69. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1828239>
- Arismendi, N., Riveros, G., Zapata, N., Smaghe, G., González, C., & Vargas, M. (2021). Occurrence of bee viruses and pathogens associated with emerging infectious diseases in native and non-native bumble bees in southern Chile. *Biological Invasions*, *23*(4), 1175–1189. <https://doi.org/10.1007/s10530-020-02428-w>
- Aufauvre, J., Biron, D. G., Vidau, C., Fontbonne, R., Roudel, M., Diogon, M., Viguès, B., Belzunces, L. P., Delbac, F., & Blot, N. (2012). Parasite-insecticide interactions: A case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. *Scientific Reports*, *2*(1), 326. <https://doi.org/10.1038/srep00326>
- Baron, G. L., Jansen, V. A. A., Brown, M. J. F., & Raine, N. E. (2017). Pesticide reduces bumblebee colony initiation and increases probability of population extinction. *Nature Ecology & Evolution*, *1*(9), 1308–1316. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0260-1>
- Baron, G. L., Raine, N. E., & Brown, M. J. F. (2014). Impact of chronic exposure to a pyrethroid pesticide on bumblebees and interactions with a trypanosome parasite. *Journal of Applied Ecology*, *51*(2), 460–469. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12205>
- Barribeau, S. M., & Schmid-Hempel, P. (2013). Qualitatively different immune response of the bumblebee host, *Bombus terrestris*, to infection by different genotypes of the trypanosome gut parasite, *Crithidia bombi*. *Infection, Genetics and Evolution*, *20*, 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.09.014>
- Bartolomé, C., Buendía, M., Benito, M., De la Rúa, P., Ormosa, C., Martín-Hernández, R., Higes, M., & Maside, X. (2018). A new multiplex PCR protocol to detect mixed trypanosomatid infections in species of *Apis* and *Bombus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *154*, 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.03.015>
- Bártová, K. (2020). Vliv pesticidů na včely se zaměřením na jejich endokrinně disruptivní účinek. *Bakalářská Práce, PřF UK*. <http://hdl.handle.net/20.500.11956/119486>

- Belsky, J., & Joshi, N. K. (2020). Effects of fungicide and herbicide chemical exposure on *Apis* and non-*Apis* bees in agricultural landscape. *Frontiers in Environmental Science*, 8, 81. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.00081>
- Benton, E. P., Grant, J. F., Webster, R. J., Nichols, R. J., Cowles, R. S., Lagalante, A. F., & Coots, C. I. (2015). Assessment of imidacloprid and its metabolites in foliage of eastern hemlock multiple years following treatment for hemlock woolly adelgid, *Adelges tsugae* (Hemiptera: Adelgidae), in forested conditions. *Journal of Economic Entomology*, 108(6), 2672–2682. <https://doi.org/10.1093/jee/tov241>
- Betti, M. I., Wahl, L. M., & Zamir, M. (2014). Effects of infection on honey bee population dynamics: A model. *PLoS ONE*, 9(10), e110237. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110237>
- Bird, G., Wilson, A. E., Williams, G. R., & Hardy, N. B. (2021). Parasites and pesticides act antagonistically on honey bee health. *Journal of Applied Ecology*, 58(5), 997–1005. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13811>
- Bonmatin, J. M., Moineau, I., Charvet, R., Fleche, C., Colin, M. E., & Bengsch, E. R. (2003). A LC/APCI-MS/MS Method for analysis of imidacloprid in soils, in plants, and in pollens. *Analytical Chemistry*, 75(9), 2027–2033. <https://doi.org/10.1021/ac020600b>
- Bortolotti, L., Montanari, R., Marcelino, J., Medrzycki, P., Maini, S., & Porrini, C. (2003). Effects of sub-lethal imidacloprid doses on the homing rate and foraging activity of honey bees. *Bulletin of Insectology*, 56, 63–67.
- Brandt, A., Grikscheit, K., Siede, R., Grosse, R., Meixner, M. D., & Böhler, R. (2017). Immunosuppression in honeybee queens by the neonicotinoids thiacloprid and clothianidin. *Scientific Reports*, 7(1), 4673. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04734-1>
- Brooker, B. E. (1971). Flagellar attachment and detachment of *Crithidia fasciculata* to the gut wall of *Anopheles gambiae*. *Protoplasma*, 73(2), 191–202. <https://doi.org/10.1007/BF01275594>
- Brown, M. J. F., Loosli, R., & Schmid-Hempel, P. (2000). Condition-dependent expression of virulence in a trypanosome infecting bumblebees. *Oikos*, 91(3), 421–427. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2000.910302.x>
- Brown, M. J. F., Schmid-Hempel, R., & Schmid-Hempel, P. (2003). Strong context-dependent virulence in a host-parasite system: Reconciling genetic evidence with theory. *Journal of Animal Ecology*, 72(6), 994–1002. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2656.2003.00770.x>
- Buendía, M., Martín-Hernández, R., Ornos, C., Barrios, L., Bartolomé, C., & Higes, M. (2018). Epidemiological study of honeybee pathogens in Europe: The results of Castilla-La Mancha (Spain). *Spanish Journal of Agricultural Research*, 16(2), e0502. <https://doi.org/10.5424/sjar/2018162-11474>
- Buendía-Abad, M., García-Palencia, P., de Pablos-Torró, L. M., María Alunda, J., Osuna, A., Martín-Hernández, R., & Higes, M. (2021). First description of *Lotmaria passim* and *Crithidia mellificae* haptomonad stage in the honeybee hindgut [Preprint]. *Pathology*. <https://doi.org/10.1101/2021.04.12.439428>
- Buendía-Abad, M., Higes, M., Martín-Hernández, R., Barrios, L., Meana, A., Fernández Fernández, A., Osuna, A., & De Pablos, L. M. (2021). Workflow of *Lotmaria passim* isolation: Experimental infection with a low-passage strain causes higher honeybee mortality rates than the PRA-403 reference strain. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 14, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2020.12.003>

- Burnett, W. J. (1851). The organic relations of some of the Infusoria, including investigations concerning the structure and nature of the genus Bodo. *Proceedings of the Boston Society of Natural History*, 4, 124–125.
- Cameron, S. A., Lim, H. C., Lozier, J. D., Duennes, M. A., & Thorp, R. (2016). Test of the invasive pathogen hypothesis of bumble bee decline in North America. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(16), 4386–4391. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525266113>
- Campos, M. G. R., Bogdanov, S., de Almeida-Muradian, L. B., Szczesna, T., Mancebo, Y., Frigerio, C., & Ferreira, F. (2008). Pollen composition and standardisation of analytical methods. *Journal of Apicultural Research*, 47(2), 154–161. <https://doi.org/10.1080/00218839.2008.11101443>
- Carnell, J. D., Hulse, R. A., & Hughes, W. O. H. (2020). A review of nutrition in bumblebees: The effect of caste, life-stage and life history traits. In *Advances in Insect Physiology* (Vol. 59, pp. 71–129). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.aiip.2020.09.003>
- Carvalho, F. P. (2017). Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security*, 6(2), 48–60. <https://doi.org/10.1002/fes3.108>
- Castelli, L., Branchiccela, B., Invernizzi, C., Tomasco, I., Basualdo, M., Rodriguez, M., Zunino, P., & Antúnez, K. (2019). Detection of *Lotmaria passim* in Africanized and European honey bees from Uruguay, Argentina and Chile. *Journal of Invertebrate Pathology*, 160, 95–97. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.11.004>
- Cepero, A., Ravoet, J., Gómez-Moracho, T., Bernal, J. L., Del Nozal, M. J., Bartolomé, C., Maside, X., Meana, A., González-Porto, A. V., de Graaf, D. C., Martín-Hernández, R., & Higes, M. (2014). Holistic screening of collapsing honey bee colonies in Spain: A case study. *BMC Research Notes*, 7(1), 649. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-649>
- Ciereszko, A., Wilde, J., Dietrich, G. J., Siuda, M., Bąk, B., Judycka, S., & Karol, H. (2017). Sperm parameters of honeybee drones exposed to imidacloprid. *Apidologie*, 48(2), 211–222. <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0466-2>
- Cisarovsky, G., & Schmid-Hempel, P. (2014). Combining laboratory and field approaches to investigate the importance of flower nectar in the horizontal transmission of a bumblebee parasite. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 152(3), 209–215. <https://doi.org/10.1111/eea.12218>
- Cornman, R. S., Tarry, D. R., Chen, Y., Jeffreys, L., Lopez, D., Pettis, J. S., vanEngelsdorp, D., & Evans, J. D. (2012). Pathogen webs in collapsing honey bee colonies. *PLoS ONE*, 7(8), e43562. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043562>
- Coulon, M., Dalmon, A., Di Prisco, G., Prado, A., Arban, F., Dubois, E., Ribière-Chabert, M., Alaux, C., Thiéry, R., & Le Conte, Y. (2020). Interactions between thiamethoxam and deformed wing virus can drastically impair flight behavior of honey bees. *Frontiers in Microbiology*, 11, 766. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00766>
- Coulon, M., Schurr, F., Martel, A.-C., Cougoule, N., Bégaud, A., Mangoni, P., Di Prisco, G., Dalmon, A., Alaux, C., Ribière-Chabert, M., Le Conte, Y., Thiéry, R., & Dubois, E. (2019). Influence of chronic exposure to thiamethoxam and chronic bee paralysis virus on winter honey bees. *PLoS ONE*, 14(8), e0220703. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220703>

- Cox, J., Hein, M. Y., Lubner, C. A., Paron, I., Nagaraj, N., & Mann, M. (2014). Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Molecular & Cellular Proteomics*, *13*(9), 2513–2526. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.031591>
- Crall, J. D., Switzer, C. M., Oppenheimer, R. L., Ford Versypt, A. N., Dey, B., Brown, A., Eyster, M., Guérin, C., Pierce, N. E., Combes, S. A., & de Bivort, B. L. (2018). Neonicotinoid exposure disrupts bumblebee nest behavior, social networks, and thermoregulation. *Science*, *362*(6415), 683–686. <https://doi.org/10.1126/science.aat1598>
- Cremer, S., Armitage, S. A. O., & Schmid-Hempel, P. (2007). Social immunity. *Current Biology*, *17*(16), R693–R702. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.06.008>
- Cremer, S., Pull, C. D., & Fürst, M. A. (2018). Social Immunity: Emergence and evolution of colony-level disease protection. *Annual Review of Entomology*, *63*(1), 105–123. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043110>
- Croan, D. G., Morrison, D. A., & Ellis, J. T. (1997). Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *89*(2), 149–159. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(97\)00111-4](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(97)00111-4)
- Currie, R. W., & Gatién, P. (2006). Timing acaricide treatments to prevent *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) from causing economic damage to honey bee colonies. *The Canadian Entomologist*, *138*(2), 238–252. <https://doi.org/10.4039/n05-024>
- D. Morey, R., & N. Rouder, J. (2022). *BayesFactor: Computation of Bayes factors for common designs*. <https://CRAN.R-project.org/package=BayesFactor>
- D’Alvise, P., Seeburger, V., Gihring, K., Kieboom, M., & Hasselmann, M. (2019). Seasonal dynamics and co-occurrence patterns of honey bee pathogens revealed by high-throughput RT-qPCR analysis. *Ecology and Evolution*, *9*(18), 10241–10252. <https://doi.org/10.1002/ece3.5544>
- Danforth, B. N. (2019). *The solitary bees: Biology, evolution, conservation* (1st edition). Princeton University Press.
- Dario, M. A., Lisboa, C. V., Silva, M. V., Herrera, H. M., Rocha, F. L., Furtado, M. C., Moratelli, R., Rodrigues Roque, A. L., & Jansen, A. M. (2021). *Crithidia mellificae* infection in different mammalian species in Brazil. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, *15*, 58–69. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2021.04.003>
- Darling, T. N., & Blum, J. J. (1987). In vitro reversible transformation of *Leishmania braziliensis panamensis* between promastigote and ellipsoidal forms I. *The Journal of Protozoology*, *34*(2), 166–168. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1987.tb03154.x>
- d’Avila-Levy, C. M., Boucinha, C., Kostygov, A., Santos, H. L. C., Morelli, K. A., Grybchuk-Ieremenko, A., Duval, L., Votýpka, J., Yurchenko, V., Grellier, P., & Lukeš, J. (2015). Exploring the environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high-throughput DNA sequencing era. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *110*(8), 956–965. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150253>
- de Landa, G. F., Porrini, M. P., Revainera, P., Porrini, D. P., Farina, J., Correa-Benítez, A., Maggi, M. D., Eguaras, M. J., & Quintana, S. (2021). Pathogens detection in the small hive beetle *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae). *Neotropical Entomology*, *50*(2), 312–316. <https://doi.org/10.1007/s13744-020-00812-8>

- Decourtye, A., Armengaud, C., Renou, M., Devillers, J., Cluzeau, S., Gauthier, M., & Pham-Delègue, M.-H. (2004). Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 78(2), 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2003.10.001>
- Di Prisco, G., Annoscia, D., Margiotta, M., Ferrara, R., Varricchio, P., Zanni, V., Caprio, E., Nazzi, F., & Pennacchio, F. (2016). A mutualistic symbiosis between a parasitic mite and a pathogenic virus undermines honey bee immunity and health. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(12), 3203–3208. <https://doi.org/10.1073/pnas.1523515113>
- Di Prisco, G., Cavaliere, V., Annoscia, D., Varricchio, P., Caprio, E., Nazzi, F., Gargiulo, G., & Pennacchio, F. (2013). Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(46), 18466–18471. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314923110>
- Dively, G. P., Embrey, M. S., Kamel, A., Hawthorne, D. J., & Pettis, J. S. (2015). Assessment of chronic sublethal effects of imidacloprid on honey bee colony health. *PLOS ONE*, 10(3), e0118748. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118748>
- Dollet, M., Sturm, N. R., & Campbell, D. A. (2012). The internal transcribed spacer of ribosomal RNA genes in plant trypanosomes (*Phytomonas* spp.) resolves 10 groups. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 299–308. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.11.010>
- Durrer, S., & Schmid-Hempel, P. (1994). Shared use of flowers leads to horizontal pathogen transmission. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 258(1353), 299–302. <https://doi.org/10.1098/rspb.1994.0176>
- Ellis, J. (2007). Colony collapse disorder (CCD) in honey bees. *EDIS*, 2007(15). <https://doi.org/10.32473/edis-in720-2007>
- Erban, T., Harant, K., Kamler, M., Markovic, M., & Titera, D. (2016). Detailed proteome mapping of newly emerged honeybee worker hemolymph and comparison with the red-eye pupal stage. *Apidologie*, 47(6), 805–817. <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0437-7>
- Erban, T., Sopko, B., Kadlikova, K., Talacko, P., & Harant, K. (2019). *Varroa destructor* parasitism has a greater effect on proteome changes than the deformed wing virus and activates TGF- β signaling pathways. *Scientific Reports*, 9(1), 9400. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45764-1>
- Erban, T., Sopko, B., Talacko, P., Harant, K., Kadlikova, K., Halesova, T., Riddellova, K., & Pekas, A. (2019). Chronic exposure of bumblebees to neonicotinoid imidacloprid suppresses the entire mevalonate pathway and fatty acid synthesis. *Journal of Proteomics*, 196, 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.12.022>
- Erban, T., Vaclavikova, M., Tomesova, D., Halesova, T., & Hubert, J. (2019). *Tau*-fluvalinate and other pesticide residues in honey bees before overwintering. *Pest Management Science*, 75(12), 3245–3251. <https://doi.org/10.1002/ps.5446>
- Erler, S., & Moritz, R. F. A. (2016). Pharmacophagy and pharmacophory: Mechanisms of self-medication and disease prevention in the honeybee colony (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 47(3), 389–411. <https://doi.org/10.1007/s13592-015-0400-z>

- Etz, A. (2015). Using Bayes factors to get the most out of linear regression: A practical guide using R. *Winnower*. <https://thewinnower.com/papers/using-bayes-factors-to-get-the-most-out-of-linear-regression-a-practical-guide-using-r>
- European Food Safety Authority (EFSA). (2016). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance acetamiprid. *EFSA Journal*, 14(11). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4610>
- European Food Safety Authority (EFSA), Abdourahime, H., Anastassiadou, M., Arena, M., Auteri, D., Barmaz, S., Brancato, A., Brocca, D., Bura, L., Carrasco Cabrera, L., Chiusolo, A., Civitella, C., Court Marques, D., Crivellente, F., Ctverackova, L., De Lentdecker, C., Egsmose, M., Fait, G., Ferreira, L., ... Villamar-Bouza, L. (2019). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance thiacloprid. *EFSA Journal*, 17(3). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5595>
- Evropská komise (EK). (2013). *Prováděcí nařízení Komise (EU) č. 485/2013 ze dne 24. května 2013, kterým se mění prováděcí nařízení (EU) č. 540/2011, pokud jde o podmínky schválení účinných látek klothianidin, thiamethoxam a imidakloprid, a kterým se zakazuje použití a prodej osiva ošetřeného přípravky na ochranu rostlin obsahujícími uvedené účinné látky*. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX:32013R0485&qid=1579281424646>
- Fanthan, H., & Porter, A. (1912). Note on certain protozoa found in bees. *Supplement to the Journal of the Board of Agriculture*, 19, 138.
- Fast, B., Kremp, K., Boshart, M., & Steverding, D. (1999). Iron-dependent regulation of transferrin receptor expression in *Trypanosoma brucei*. *The Biochemical Journal*, 342 Pt 3(Pt 3), 691–696.
- Fausser, A., Sandrock, C., Neumann, P., & Sadd, B. M. (2017). Neonicotinoids override a parasite exposure impact on hibernation success of a key bumblebee pollinator: Pesticides, parasites and bumblebee hibernation. *Ecological Entomology*, 42(3), 306–314. <https://doi.org/10.1111/een.12385>
- Fausser-Misslin, A., Sadd, B. M., Neumann, P., & Sandrock, C. (2014). Influence of combined pesticide and parasite exposure on bumblebee colony traits in the laboratory. *Journal of Applied Ecology*, 51(2), 450–459. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12188>
- Feng, M.-G., Johnson, J. B., & Kish, L. P. (1990). Virulence of *Verticillium lecanii* and an aphid-derived isolate of *Beauveria bassiana* (Fungi: Hyphomycetes) for Six Species of Cereal-Infesting Aphids (Homoptera: Aphididae). *Environmental Entomology*, 19(3), 815–820. <https://doi.org/10.1093/ee/19.3.815>
- Fernandes, O., Murthy, V. K., Kurath, U., Degraeve, W. M., & Campbell, D. A. (1994). Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 66(2), 261–271. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(94\)90153-8](https://doi.org/10.1016/0166-6851(94)90153-8)
- Folly, A. J., Koch, H., Stevenson, P. C., & Brown, M. J. F. (2017). Larvae act as a transient transmission hub for the prevalent bumblebee parasite *Crithidia bombi*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 148, 81–85. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.06.001>
- Fries, I., & Camazine, S. (2001). Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology. *Apidologie*, 32(3), 199–214. <https://doi.org/10.1051/apido:2001122>
- Frolov, A. O., Kostygov, A. Y., & Yurchenko, V. (2021). Development of monoxenous trypanosomatids and phytomonads in insects. *Trends in Parasitology*, 37(6), 538–551. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.02.004>

- Fürst, M. A., McMahon, D. P., Osborne, J. L., Paxton, R. J., & Brown, M. J. F. (2014). Disease associations between honeybees and bumblebees as a threat to wild pollinators. *Nature*, *506*(7488), 364–366. <https://doi.org/10.1038/nature12977>
- Fyg, W. (1954). Über das vorkommen von flagellaten im rectum der honigbiene (*Apis mellifica* L.). *Mitteilungen Der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft*, *27*, 423–428.
- Gallot-Lavallée, M., Schmid-Hempel, R., Vandame, R., Vergara, C. H., & Schmid-Hempel, P. (2016). Large scale patterns of abundance and distribution of parasites in Mexican bumblebees. *Journal of Invertebrate Pathology*, *133*, 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.12.004>
- Gegear, R. J., Otterstatter, M. C., & Thomson, J. D. (2005). Does parasitic infection impair the ability of bumblebees to learn flower-handling techniques. *Animal Behaviour*, *70*(1), 209–215. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2004.09.025>
- Gerber, H. S., & Klostermeyer, E. C. (1970). Sex Control by Bees: A voluntary act of Egg fertilization during oviposition. *Science*, *167*(3914), 82–84. <https://doi.org/10.1126/science.167.3914.82>
- Giacomini, J. J., Leslie, J., Tarpy, D. R., Palmer-Young, E. C., Irwin, R. E., & Adler, L. S. (2018). Medicinal value of sunflower pollen against bee pathogens. *Scientific Reports*, *8*(1), 14394. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32681-y>
- Gilabert Carbajo, C., Cornell, L. J., Madbouly, Y., Lai, Z., Yates, P. A., Tinti, M., & Tiengwe, C. (2021). Novel aspects of iron homeostasis in pathogenic bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *PLOS Pathogens*, *17*(6), e1009696. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009696>
- Gómez-Moracho, T., Buendía-Abad, M., Benito, M., García-Palencia, P., Barrios, L., Bartolomé, C., Maside, X., Meana, A., Jiménez-Antón, M. D., Olías-Molero, A. I., Alunda, J. M., Martín-Hernández, R., & Higes, M. (2020). Experimental evidence of harmful effects of *Crithidia mellifica* and *Lotmaria passim* on honey bees. *International Journal for Parasitology*, *50*(13), 1117–1124. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.06.009>
- Goulson, D. (2003). *Bumblebees: Their behaviour and ecology* (Repr). Oxford Univ. Press.
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., & Rotheray, E. L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, *347*(6229), 1255957. <https://doi.org/10.1126/science.1255957>
- Grassl, J., Holt, S., Cremen, N., Peso, M., Hahne, D., & Baer, B. (2018). Synergistic effects of pathogen and pesticide exposure on honey bee (*Apis mellifera*) survival and immunity. *Journal of Invertebrate Pathology*, *159*, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.10.005>
- Graystock, P., Goulson, D., & Hughes, W. O. H. (2015). Parasites in bloom: Flowers aid dispersal and transmission of pollinator parasites within and between bee species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *282*(1813), 20151371. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.1371>
- Graystock, P., Yates, K., Evison, S. E. F., Darvill, B., Goulson, D., & Hughes, W. O. H. (2013). The T rojan hives: Pollinator pathogens, imported and distributed in bumblebee colonies. *Journal of Applied Ecology*, *50*(5), 1207–1215. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12134>
- Gregory, P. G., Evans, J. D., Rinderer, T., & de Guzman, L. (2005). Conditional immune-gene suppression of honeybees parasitized by *Varroa* mites. *Journal of Insect Science*, *5*(1). <https://doi.org/10.1093/jis/5.1.7>

- Hamilton, P. B., Stevens, J. R., Gaunt, M. W., Gidley, J., & Gibson, W. C. (2004). Trypanosomes are monophyletic: Evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. *International Journal for Parasitology*, *34*(12), 1393–1404. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.08.011>
- Harris, E. V., de Roode, J. C., & Gerardo, N. M. (2019). Diet–microbiome–disease: Investigating diet’s influence on infectious disease resistance through alteration of the gut microbiome. *PLOS Pathogens*, *15*(10), e1007891. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007891>
- Harwood, G. P., & Dolezal, A. G. (2020). Pesticide–virus interactions in honey bees: challenges and opportunities for understanding drivers of bee declines. *Viruses*, *12*(5), 566. <https://doi.org/10.3390/v12050566>
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailón, E. G., González-Porto, A. V., Barrios, L., del Nozal, M. J., Bernal, J. L., Jiménez, J. J., Palencia, P. G., & Meana, A. (2008). How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse: Natural *Nosema ceranae* infection. *Environmental Microbiology*, *10*(10), 2659–2669. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01687.x>
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A. V., García-Palencia, P., Meana, A., del Nozal, M. J., Mayo, R., & Bernal, J. L. (2009). Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environmental Microbiology Reports*, *1*(2), 110–113. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00014.x>
- Higes, M., Martín-Hernández, R., & Meana, A. (2010). *Nosema ceranae* in Europe: An emergent type *C. nosemosis*. *Apidologie*, *41*(3), 375–392. <https://doi.org/10.1051/apido/2010019>
- Higes, M., Meana, A., Bartolomé, C., Botías, C., & Martín-Hernández, R. (2013). *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen: *N. ceranae* an emergent pathogen for beekeeping. *Environmental Microbiology Reports*, *5*(1), 17–29. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12024>
- Higes, M., Rodríguez-García, C., Gómez-Moracho, T., Meana, A., Bartolomé, C., Maside, X., Barrios, L., & Martín-Hernández, R. (2016). Short communication: Survival of honey bees (*Apis mellifera*) infected with *Crithidia mellificae* (Langridge and McGhee: ATCC® 30254™) in the presence of *Nosema ceranae*. *Spanish Journal of Agricultural Research*, *14*(3), e05SC02. <https://doi.org/10.5424/sjar/2016143-8722>
- Hladik, M. L., Main, A. R., & Goulson, D. (2018). Environmental risks and challenges associated with neonicotinoid insecticides. *Environmental Science & Technology*, *52*(6), 3329–3335. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b06388>
- Hoare, C. A., & Wallace, F. G. (1966). Developmental stages of trypanosomatid flagellates: A new terminology. *Nature*, *212*(5068), 1385–1386. <https://doi.org/10.1038/2121385a0>
- Hollar, L., Lukeš, J., & Maslov, D. A. (1998). Monophyly of endosymbiont containing trypanosomatids: phylogeny versus taxonomy. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, *45*(3), 293–297. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1998.tb04539.x>
- Hubert, J., Bicianova, M., Ledvinka, O., Kamler, M., Lester, P. J., Nesvorna, M., Kopecky, J., & Erban, T. (2017). Changes in the bacteriome of honey bees associated with the parasite *Varroa destructor*, and

- pathogens *Nosema* and *Lotmaria passim*. *Microbial Ecology*, 73(3), 685–698.
<https://doi.org/10.1007/s00248-016-0869-7>
- Jack, C. J., Uppala, S. S., Lucas, H. M., & Sagili, R. R. (2016). Effects of pollen dilution on infection of *Nosema ceranae* in honey bees. *Journal of Insect Physiology*, 87, 12–19.
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.01.004>
- James, R. R., & Xu, J. (2012). Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109(2), 175–182. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.12.005>
- Jensen, A. B., Pedersen, B. V., & Eilenberg, J. (2009). Differential susceptibility across honey bee colonies in larval chalkbrood resistance. *Apidologie*, 40(5), 524–534. <https://doi.org/10.1051/apido/2009029>
- Johnson, R. M., Ellis, M. D., Mullin, C. A., & Frazier, M. (2010). Pesticides and honey bee toxicity – USA. *Apidologie*, 41(3), 312–331. <https://doi.org/10.1051/apido/2010018>
- Koch, H., Woodward, J., Langat, M. K., Brown, M. J. F., & Stevenson, P. C. (2019). Flagellum removal by a nectar metabolite inhibits infectivity of a bumblebee parasite. *Current Biology*, 29(20), 3494–3500.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.08.037>
- Kostygov, A. Y., Karnkowska, A., Votýpka, J., Tashyreva, D., Maciszewski, K., Yurchenko, V., & Lukeš, J. (2021). Euglenozoa: Taxonomy, diversity and ecology, symbioses and viruses. *Open Biology*, 11(3), 200407. <https://doi.org/10.1098/rsob.200407>
- Kraeva, N., Butenko, A., Hlaváčová, J., Kostygov, A., Myšková, J., Grybchuk, D., Leštinová, T., Votýpka, J., Volf, P., Opperdoes, F., Flegontov, P., Lukeš, J., & Yurchenko, V. (2015). *Leptomonas seymouri*: adaptations to the dixenous life cycle analyzed by genome sequencing, transcriptome profiling and co-infection with *Leishmania donovani*. *PLOS Pathogens*, 11(8), e1005127.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005127>
- Langridge, D. F. (1966). Flagellated protozoa (Trypanosomidae) in the honey bee, *Apis mellifera*, in Australia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 8(1), 124–125. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(66\)90112-1](https://doi.org/10.1016/0022-2011(66)90112-1)
- Langridge, D. F., & McGhee, R. B. (1967). *Crithidia mellificae* n. sp. an acidophilic trypanosomatid of the honey bee *Apis mellifera*. *The Journal of Protozoology*, 14(3), 485–487. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1967.tb02033.x>
- Léger, L., & Dubosq, O. (1902). Sur les larves d'Anopheles et leurs parasites en corse. *Comptes Rendus de l'Association Française Par l'avancement Des Sciences*, 703–704.
- Liu, Q., Lei, J., Darby, A. C., & Kadowaki, T. (2020). Trypanosomatid parasite dynamically changes the transcriptome during infection and modifies honey bee physiology. *Communications Biology*, 3(1), 51. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0775-x>
- Lockhart, P. J., & Cameron, S. A. (2001). Trees for bees. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(2), 84–88. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)02054-1](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)02054-1)
- Logan, A., Ruiz-González, M. X., & Brown, M. J. F. (2005). The impact of host starvation on parasite development and population dynamics in an intestinal trypanosome parasite of bumble bees. *Parasitology*, 130(6), 637–642. <https://doi.org/10.1017/S0031182005007304>
- Lotmar, R. (1946). Ueber die flagellaten und bakterien im dünndarm der honigbiene (*Apis mellifica*). *Beiheft Schweizerische Bienenzeitung*, 2, 49–76.

- Lukeš, J., Butenko, A., Hashimi, H., Maslov, D. A., Votýpka, J., & Yurchenko, V. (2018). Trypanosomatids are much more than just trypanosomes: Clues from the expanded family tree. *Trends in Parasitology*, *34*(6), 466–480. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.03.002>
- Lukeš, J., Jirků, M., Doležel, D., Kral'ová, I., Hollar, L., & Maslov, D. A. (1997). Analysis of ribosomal RNA genes suggests that trypanosomes are monophyletic. *Journal of Molecular Evolution*, *44*(5), 521–527. <https://doi.org/10.1007/PL00006176>
- Lukeš, J., Lys Guilbride, D., Votýpka, J., Zíková, A., Benne, R., & Englund, P. T. (2002). Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. *Eukaryotic Cell*, *1*(4), 495–502. <https://doi.org/10.1128/EC.1.4.495-502.2002>
- Lukeš, J., Tesařová, M., Yurchenko, V., & Votýpka, J. (2021). Characterization of a new cosmopolitan genus of trypanosomatid parasites, *Obscuromonas* gen. Nov. (Blastocrithidiinae subfam. Nov.). *European Journal of Protistology*, *79*, 125778. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2021.125778>
- Manley, R., Boots, M., & Wilfert, L. (2015). REVIEW: Emerging viral disease risk to pollinating insects: ecological, evolutionary and anthropogenic factors. *Journal of Applied Ecology*, *52*(2), 331–340. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12385>
- Manson, J. S., Otterstatter, M. C., & Thomson, J. D. (2010). Consumption of a nectar alkaloid reduces pathogen load in bumble bees. *Oecologia*, *162*(1), 81–89. <https://doi.org/10.1007/s00442-009-1431-9>
- Maslov, D. A., Lukeš, J., Jirku, M., & Simpson, L. (1996). Phylogeny of trypanosomes as inferred from the small and large subunit rRNAs: Implications for the evolution of parasitism in the trypanosomatid protozoa. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *75*(2), 197–205. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(95\)02526-X](https://doi.org/10.1016/0166-6851(95)02526-X)
- Maslov, D. A., Podlipaev, S. A., & Lukes, J. (2001). Phylogeny of the kinetoplastida: Taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *96*(3), 397–402. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762001000300021>
- Maslov, D. A., Votýpka, J., Yurchenko, V., & Lukeš, J. (2013). Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: All that is hidden shall be revealed. *Trends in Parasitology*, *29*(1), 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.11.001>
- McGhee, R. B., & Cosgrove, W. B. (1980). Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae. *Microbiological Reviews*, *44*(1), 140–173. <https://doi.org/10.1128/mr.44.1.140-173.1980>
- Merzlyak, E., Yurchenko, V., Kolesnikov, A. A., Alexandrov, K., Podlipaev, S. A., & Maslov, D. A. (2001). Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: Polyphyly of *Leptomonas* and *Blastocrithidia*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, *48*(2), 161–169. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2001.tb00298.x>
- Meunier, J. (2015). Social immunity and the evolution of group living in insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *370*(1669), 20140102. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0102>
- Michalczyk, M., & Sokół, R. (2022). Detection of *Lotmaria passim* and *Crithidia mellificae* in selected bumblebee species. *Pathogens*, *11*(9), 1053. <https://doi.org/10.3390/pathogens11091053>
- Michalczyk, M., Sokół, R., & Bancercz-Kisiel, A. (2022). Presence of *Lotmaria passim*, *Crithidia mellificae* and *Nosema* spp. in differently aged *Apis mellifera* brood. *Journal of Apicultural Research*, 1–10. <https://doi.org/10.1080/00218839.2022.2055265>

- Michaud, K. M., Irwin, R. E., Barber, N. A., & Adler, L. S. (2019). Preinfection effects of nectar secondary compounds on a bumble bee gut pathogen. *Environmental Entomology*, *48*(3), 685–690. <https://doi.org/10.1093/ee/nvz018>
- Molyneux, D. H., & Ashford, R. W. (1975). Observations on a trypanosomatid flagellate in a flea, *Peromyscopsylla silvatica spectabilis*. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, *50*(3), 265–274. <https://doi.org/10.1051/parasite/1975503265>
- Morimoto, T., Kojima, Y., Yoshiyama, M., Kimura, K., Yang, B., Peng, G., & Kadowaki, T. (2013). Molecular detection of protozoan parasites infecting *Apis mellifera* colonies in Japan: Protozoan parasites of honey bees in Japan. *Environmental Microbiology Reports*, *5*(1), 74–77. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2012.00385.x>
- Motta, E. V. S., Raymann, K., & Moran, N. A. (2018). Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(41), 10305–10310. <https://doi.org/10.1073/pnas.1803880115>
- Murthy, V. K., Dibbern, K. M., & Campbell, D. A. (1992). PCR amplification of mini-exon genes differentiates *Trypanosoma cruzi* from *Trypanosoma rangeli*. *Molecular and Cellular Probes*, *6*(3), 237–243. [https://doi.org/10.1016/0890-8508\(92\)90022-P](https://doi.org/10.1016/0890-8508(92)90022-P)
- Mussmann, R., Engstler, M., Gerrits, H., Kieft, R., Toaldo, C. B., Onderwater, J., Koerten, H., van Luenen, H. G. A. M., & Borst, P. (2004). Factors affecting the level and localization of the transferrin receptor in *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(39), 40690–40698. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404697200>
- Nanetti, A., Ellis, J. D., Cardaio, I., & Cilia, G. (2021). Detection of *Lotmaria passim*, *Crithidia mellificae* and replicative forms of deformed wing virus and kashmir bee virus in the small hive beetle (*Aethina tumida*). *Pathogens*, *10*(3), 372. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030372>
- Navajas, M., Migeon, A., Alaux, C., Martin-Magniette, M., Robinson, G., Evans, J., Cros-Arteil, S., Crauser, D., & Le Conte, Y. (2008). Differential gene expression of the honey bee *Apis mellifera* associated with *Varroa destructor* infection. *BMC Genomics*, *9*(1), 301. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-301>
- Neumann, P., & Carreck, N. L. (2010). Honey bee colony losses. *Journal of Apicultural Research*, *49*(1), 1–6. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.01>
- Noyes, H., Pratlong, F., Chance, M., Ellis, J., Lanotte, G., & Dedet, J.-P. (2002). A previously unclassified trypanosomatid responsible for human cutaneous lesions in Martinique (French West Indies) is the most divergent member of the genus *Leishmania* ss. *Parasitology*, *124*(1), 17–24. <https://doi.org/10.1017/S0031182001008927>
- Odemer, R., Nilles, L., Linder, N., & Rosenkranz, P. (2018). Sublethal effects of clothianidin and *Nosema* spp. On the longevity and foraging activity of free flying honey bees. *Ecotoxicology*, *27*(5), 527–538. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1925-5>
- O'Donnell, S., & Beshers, S. N. (2004). The role of male disease susceptibility in the evolution of haplodiploid insect societies. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *271*(1542), 979–983. <https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2685>
- Orantes-Bermejo, F. J. (1999). A scientific note on the prevalence of trypanosomatid parasites of honey bees (*Apis mellifera* L.) in southern Spain. *Apidologie*, *30*(1), 77–78. <https://doi.org/10.1051/apido:19990110>

- Otterstatter, M. C., Gegeer, R. J., Colla, S. R., & Thomson, J. D. (2005). Effects of parasitic mites and protozoa on the flower constancy and foraging rate of bumble bees. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *58*(4), 383–389. <https://doi.org/10.1007/s00265-005-0945-3>
- Penn, D. J., Damjanovich, K., & Potts, W. K. (2002). MHC heterozygosity confers a selective advantage against multiple-strain infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(17), 11260–11264. <https://doi.org/10.1073/pnas.162006499>
- Pereboom, J. J. M. (2000). The composition of larval food and the significance of exocrine secretions in the bumblebee *Bombus terrestris*. *Insectes Sociaux*, *47*(1), 11–20. <https://doi.org/10.1007/s000400050003>
- Pettis, J. S., Lichtenberg, E. M., Andree, M., Stitzinger, J., Rose, R., & vanEngelsdorp, D. (2013). Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. *PLoS ONE*, *8*(7), e70182. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070182>
- Plischuk, S., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Lucía, M., Botías, C., Meana, A., Abrahamovich, A. H., Lange, C., & Higes, M. (2009). South American native bumblebees (Hymenoptera: Apidae) infected by *Nosema ceranae* (Microsporidia), an emerging pathogen of honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology Reports*, *1*(2), 131–135. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00018.x>
- Podlipaev, S. (1990). Catalogue of world fauna of Trypanosomatidae (Protozoa). *Proceedings of the Zoological Institute*, *144*, 1–178.
- Podlipaev, S. (2001). The more insect trypanosomatids under study-the more diverse Trypanosomatidae appears. *International Journal for Parasitology*, *31*(5–6), 648–652. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00139-4](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00139-4)
- Podlipaev, S. A. (2000). Insect trypanosomatids: The need to know more. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *95*(4), 517–522. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762000000400013>
- R Core Team. (2022). R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*. <http://www.R-project.org>
- Ramos, A., Maslov, D. A., Fernandes, O., Campbell, D. A., & Simpson, L. (1996). Detection and identification of human pathogenic *Leishmania* and *Trypanosoma* species by hybridization of PCR-amplified mini-exon repeats. *Experimental Parasitology*, *82*(3), 242–250. <https://doi.org/10.1006/expr.1996.0031>
- Ramsay, J. A. (1958). Excretion by the malpighian tubules of the stick insect, *Dixippus Morosus* (Orthoptera, Phasmidae): amino acids, sugars and urea. *Journal of Experimental Biology*, *35*(4), 871–891. <https://doi.org/10.1242/jeb.35.4.871>
- Ratnieks, F. L. W., & Carreck, N. L. (2010). Clarity on honey bee collapse. *Science*, *327*(5962), 152–153. <https://doi.org/10.1126/science.1185563>
- Ravoet, J., Maharramov, J., Meeus, I., De Smet, L., Wenseleers, T., Smagghe, G., & de Graaf, D. C. (2013). Comprehensive bee pathogen screening in Belgium reveals *Crithidia mellifica* as a new contributory factor to winter mortality. *PLoS ONE*, *8*(8), e72443. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072443>
- Ravoet, J., Schwarz, R. S., Descamps, T., Yañez, O., Tozkar, C. O., Martín-Hernández, R., Bartolomé, C., De Smet, L., Higes, M., Wenseleers, T., Schmid-Hempel, R., Neumann, P., Kadowaki, T., Evans, J. D., & de Graaf, D. C. (2015). Differential diagnosis of the honey bee trypanosomatids *Crithidia mellifica* and *Lotmaria passim*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *130*, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.06.007>

- Rortais, A., Arnold, G., Halm, M.-P., & Touffet-Briens, F. (2005). Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: Estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie*, *36*(1), 71–83. <https://doi.org/10.1051/apido:2004071>
- Rosenkranz, P., Aumeier, P., & Ziegelmann, B. (2010). Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *103*, S96–S119. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.016>
- Rouzé, R., Moné, A., Delbac, F., Belzunces, L., & Blot, N. (2019). The honeybee gut microbiota is altered after chronic exposure to different families of insecticides and infection by *Nosema ceranae*. *Microbes and Environments*, *34*(3), 226–233. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME18169>
- Ruiz-González, M. X., & Brown, M. J. F. (2006a). Males vs workers: Testing the assumptions of the haploid susceptibility hypothesis in bumblebees. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *60*(4), 501–509. <https://doi.org/10.1007/s00265-006-0192-2>
- Ruiz-González, M. X., & Brown, M. J. F. (2006b). Honey bee and bumblebee trypanosomatids: Specificity and potential for transmission. *Ecological Entomology*, *31*(6), 616–622. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2006.00823.x>
- Runckel, C., Flenniken, M. L., Engel, J. C., Ruby, J. G., Ganem, D., Andino, R., & DeRisi, J. L. (2011). Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema*, and *Crithidia*. *PLoS ONE*, *6*(6), e20656. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020656>
- Saville-Kent, W. (1880). *A manual of the Infusoria: Including a description of all known flagellate, ciliate, and tentaculiferous protozoa, British and foreign, and an account of the organization and the affinities of the sponges / by W. Saville Kent*. D. Bogue., <https://doi.org/10.5962/bhl.title.10143>
- Schaub, G. A. (1994). Pathogenicity of trypanosomatids on insects. *Parasitology Today*, *10*(12), 463–468. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(94\)90155-4](https://doi.org/10.1016/0169-4758(94)90155-4)
- Schaub, G. A., Böker, C. A., Jensen, C., & Reduth, D. (1989). Cannibalism and coprophagy are modes of transmission of *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) between triatomines. *The Journal of Protozoology*, *36*(2), 171–175. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1989.tb01067.x>
- Schmid-Hempel, P. (1995). Parasites and social insects. *Apidologie*, *26*(3), 255–271. <https://doi.org/10.1051/apido:19950307>
- Schmid-Hempel, P. (2001). On the evolutionary ecology of host–parasite interactions: Addressing the question with regard to bumblebees and their parasites. *Naturwissenschaften*, *88*(4), 147–158. <https://doi.org/10.1007/s001140100222>
- Schmid-Hempel, P., Pühr, K., Krüger, N., Reber, C., & Schmid-Hempel, R. (1999). Dynamic and genetic consequences of variation in horizontal transmission for a microparasitic infection. *Evolution*, *53*(2), 426–434. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1999.tb03778.x>
- Schmid-Hempel, P., & Reber Funk, C. (2004). The distribution of genotypes of the trypanosome parasite, *Crithidia bombi*, in populations of its host, *Bombus terrestris*. *Parasitology*, *129*(2), 147–158. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005542>
- Schmid-Hempel, P., & Schmid-Hempel, R. (1993). Transmission of a pathogen in *Bombus terrestris*, with a note on division of labour in social insects. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *33*(5). <https://doi.org/10.1007/BF00172930>

- Schmid-Hempel, P., Wilfert, L., & Schmid-Hempel, R. (2019). Pollinator diseases: The *Bombus–Crithidia* system. In K. Wilson, A. Fenton, & D. Tompkins (Eds.), *Wildlife Disease Ecology* (1st ed., pp. 3–31). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/9781316479964.001>
- Schmid-Hempel, R., Eckhardt, M., Goulson, D., Heinzmann, D., Lange, C., Plischuk, S., Escudero, L. R., Salathé, R., Scriven, J. J., & Schmid-Hempel, P. (2014). The invasion of southern South America by imported bumblebees and associated parasites. *Journal of Animal Ecology*, 83(4), 823–837. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12185>
- Schmid-Hempel, R., Salathé, R., Tognazzo, M., & Schmid-Hempel, P. (2011). Genetic exchange and emergence of novel strains in directly transmitted trypanosomatids. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(3), 564–571. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.01.002>
- Schmid-Hempel, R., & Tognazzo, M. (2010). Molecular divergence defines two distinct lineages of *Crithidia bombi* (Trypanosomatidae), parasites of bumblebees: *Crithidia bombi* lineages. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 57(4), 337–345. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2010.00480.x>
- Schwarz, R. S., Bauchan, G. R., Murphy, C. A., Ravoet, J., de Graaf, D. C., & Evans, J. D. (2015). Characterization of two species of trypanosomatidae from the honey bee *Apis mellifera*: *Crithidia mellificae* Langridge and McGhee, and *Lotmaria passim* n. gen., n. sp. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62(5), 567–583. <https://doi.org/10.1111/jeu.12209>
- Schwarz, R. S., & Evans, J. D. (2013). Single and mixed-species trypanosome and microsporidia infections elicit distinct, ephemeral cellular and humoral immune responses in honey bees. *Developmental & Comparative Immunology*, 40(3–4), 300–310. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.03.010>
- Schwarz, R. S., Moran, N. A., & Evans, J. D. (2016). Early gut colonizers shape parasite susceptibility and microbiota composition in honey bee workers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(33), 9345–9350. <https://doi.org/10.1073/pnas.1606631113>
- Seifrtova, M., Halesova, T., Sulcova, K., Riddellova, K., & Erban, T. (2017). Distributions of imidacloprid, imidacloprid-olefin and imidacloprid-urea in green plant tissues and roots of rapeseed (*Brassica napus*) from artificially contaminated potting soil: Key imidacloprid metabolites in rapeseed from soil contamination. *Pest Management Science*, 73(5), 1010–1016. <https://doi.org/10.1002/ps.4418>
- Sgolastra, F., Hinarejos, S., Pitts-Singer, T. L., Boyle, N. K., Joseph, T., Lückmann, J., Raine, N. E., Singh, R., Williams, N. M., & Bosch, J. (2019). Pesticide exposure assessment paradigm for solitary bees. *Environmental Entomology*, 48(1), 22–35. <https://doi.org/10.1093/ee/nvy105>
- Shykoff, J. A., & Schmid-Hempel, P. (1991). Incidence and effects of four parasites in natural populations of bumble bees in Switzerland. *Apidologie*, 22(2), 117–125. <https://doi.org/10.1051/apido:19910204>
- Simpson, A. G. B. (1997). The identity and composition of the Euglenozoa. *Archiv Für Protistenkunde*, 148(3), 318–328. [https://doi.org/10.1016/S0003-9365\(97\)80012-7](https://doi.org/10.1016/S0003-9365(97)80012-7)
- Siviter, H., Bailes, E. J., Martin, C. D., Oliver, T. R., Koricheva, J., Leadbeater, E., & Brown, M. J. F. (2021). Agrochemicals interact synergistically to increase bee mortality. *Nature*, 596(7872), 389–392. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03787-7>
- Smeets, P., & Duchateau, M. J. (2003). Longevity of *Bombus terrestris* workers (Hymenoptera: Apidae) in relation to pollen availability, in the absence of foraging. *Apidologie*, 34(4), 333–337. <https://doi.org/10.1051/apido:2003026>

- Smodiš Škerl, M. I., & Gregorc, A. (2010). Heat shock proteins and cell death in situ localisation in hypopharyngeal glands of honeybee (*Apis mellifera carnica*) workers after imidacloprid or coumaphos treatment. *Apidologie*, *41*(1), 73–86. <https://doi.org/10.1051/apido/2009051>
- Stevanovic, J., Schwarz, R. S., Vojnovic, B., Evans, J. D., Irwin, R. E., Glavinic, U., & Stanimirovic, Z. (2016). Species-specific diagnostics of *Apis mellifera* trypanosomatids: A nine-year survey (2007–2015) for trypanosomatids and microsporidians in Serbian honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, *139*, 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.07.001>
- Stinson, S., Sommer, J. R., & Blum, J. J. (1989). Morphology of *Leishmania braziliensis*: Changes during reversible heat-induced transformation from promastigote to an ellipsoidal form. *The Journal of Parasitology*, *75*(3), 431. <https://doi.org/10.2307/3282602>
- Straub, L., Williams, G. R., Pettis, J., Fries, I., & Neumann, P. (2015). Superorganism resilience: Eusociality and susceptibility of ecosystem service providing insects to stressors. *Current Opinion in Insect Science*, *12*, 109–112. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.10.010>
- Straub, L., Williams, G. R., Vidondo, B., Khongphinitbunjong, K., Retschnig, G., Schneeberger, A., Chantawannakul, P., Dietemann, V., & Neumann, P. (2019). Neonicotinoids and ectoparasitic mites synergistically impact honeybees. *Scientific Reports*, *9*(1), 8159. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44207-1>
- Straw, E. A., & Brown, M. J. F. (2021). No evidence of effects or interaction between the widely used herbicide, glyphosate, and a common parasite in bumble bees. *PeerJ*, *9*, e12486. <https://doi.org/10.7717/peerj.12486>
- Strobl, V., Yañez, O., Straub, L., Albrecht, M., & Neumann, P. (2019). Trypanosomatid parasites infecting managed honeybees and wild solitary bees. *International Journal for Parasitology*, *49*(8), 605–613. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2019.03.006>
- Suchail, S., Debrauwer, L., & Belzunces, L. P. (2004). Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. *Pest Management Science*, *60*(3), 291–296. <https://doi.org/10.1002/ps.772>
- Suchail, S., Guez, D., & Belzunces, L. P. (2001). Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *20*(11), 2482. [https://doi.org/10.1897/1551-5028\(2001\)020<2482:DBAACT>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1897/1551-5028(2001)020<2482:DBAACT>2.0.CO;2)
- Tauber, J. P., Nguyen, V., Lopez, D., & Evans, J. D. (2019). Effects of a resident yeast from the honeybee gut on immunity, microbiota, and *nosema* disease. *Insects*, *10*(9), 296. <https://doi.org/10.3390/insects10090296>
- Teixeira, E. W., Message, D., Chen, Y., Pettis, J., & Evans, J. D. (2008). First metagenomic analysis of microorganisms in honey bees from Brazil. *Boletim de Indústria Animal*, *65*, 355–361.
- Teixeira, M. M. G., Borghesan, T. C., Ferreira, R. C., Santos, M. A., Takata, C. S. A., Campaner, M., Nunes, V. L. B., Milder, R. V., de Souza, W., & Camargo, E. P. (2011). Phylogenetic validation of the genera *Angomonas* and *Strigomonas* of trypanosomatids harboring bacterial endosymbionts with the description of new species of trypanosomatids and of proteobacterial symbionts. *Protist*, *162*(3), 503–524. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2011.01.001>
- Tiedeken, E. J., Egan, P. A., Stevenson, P. C., Wright, G. A., Brown, M. J. F., Power, E. F., Farrell, I., Matthews, S. M., & Stout, J. C. (2016). Nectar chemistry modulates the impact of an invasive plant on native pollinators. *Functional Ecology*, *30*(6), 885–893. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12588>

- Tomizawa, M., & Casida, J. E. (2000). Imidacloprid, thiacloprid, and their imine derivatives up-regulate the $\alpha\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor in M10 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *169*(1), 114–120. <https://doi.org/10.1006/taap.2000.9057>
- Tripodi, A. D., Szalanski, A. L., & Strange, J. P. (2018). Novel multiplex PCR reveals multiple trypanosomatid species infecting North American bumble bees (Hymenoptera: Apidae: *Bombus*). *Journal of Invertebrate Pathology*, *153*, 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.03.009>
- Tsvetkov, N., Samson-Robert, O., Sood, K., Patel, H. S., Malena, D. A., Gajiwala, P. H., Maciukiewicz, P., Fournier, V., & Zayed, A. (2017). Chronic exposure to neonicotinoids reduces honey bee health near corn crops. *Science*, *356*(6345), 1395–1397. <https://doi.org/10.1126/science.aam7470>
- Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M. Y., Geiger, T., Mann, M., & Cox, J. (2016). The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nature Methods*, *13*(9), 731–740. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3901>
- Urbietta-Magro, A., Higes, M., Meana, A., Barrios, L., & Martín-Hernández, R. (2019). Age and method of inoculation influence the infection of worker honey bees (*Apis mellifera*) by *Nosema ceranae*. *Insects*, *10*(12), 417. <https://doi.org/10.3390/insects10120417>
- van Baalen, M., & Beekman, M. (2006). The costs and benefits of genetic heterogeneity in resistance against parasites in social insects. *The American Naturalist*, *167*(4), 568–577. <https://doi.org/10.1086/501169>
- Van Luenen, H. G. A. M., Kieft, R., Mußmann, R., Engstler, M., Ter Riet, B., & Borst, P. (2005). Trypanosomes change their transferrin receptor expression to allow effective uptake of host transferrin: Transferrin uptake in *Trypanosoma brucei*. *Molecular Microbiology*, *58*(1), 151–165. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04831.x>
- vanEngelsdorp, D., Evans, J. D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B. K., Frazier, M., Frazier, J., Cox-Foster, D., Chen, Y., Underwood, R., Tarpay, D. R., & Pettis, J. S. (2009). Colony collapse disorder: A descriptive study. *PLoS ONE*, *4*(8), e6481. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006481>
- Vargas, M., Arismendi, N., Riveros, G., Zapata, N., Bruna, A., Vidal, M., Rodríguez, M., & Gerding, M. (2017). Viral and intestinal diseases detected in *Apis mellifera* in Central and Southern Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research*, *77*(3), 243–249. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392017000300243>
- Vickerman, K. (1994). The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *International Journal for Parasitology*, *24*(8), 1317–1331. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(94\)90198-8](https://doi.org/10.1016/0020-7519(94)90198-8)
- Votýpka, J., Brzoňová, J., Ježek, J., & Modrý, D. (2019). Horse flies (Diptera: Tabanidae) of three West African countries: A faunistic update, barcoding analysis and trypanosome occurrence. *Acta Tropica*, *197*, 105069. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105069>
- Votýpka, J., Klepetková, H., Yurchenko, V. Y., Horák, A., Lukeš, J., & Maslov, D. A. (2012). Cosmopolitan distribution of a trypanosomatid *Leptomonas pyrrocoris*. *Protist*, *163*(4), 616–631. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2011.12.004>
- Votýpka, J., Suková, E., Kraeva, N., Ishemgulova, A., Duží, I., Lukeš, J., & Yurchenko, V. (2013). Diversity of trypanosomatids (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) parasitizing fleas (Insecta: Siphonaptera) and Description of a New Genus *Blechomonas* gen. n. *Protist*, *164*(6), 763–781. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2013.08.002>

- Wallace, F. G. (1966). The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. *Experimental Parasitology*, 18(1), 124–193. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(66\)90015-4](https://doi.org/10.1016/0014-4894(66)90015-4)
- Wallace, F. G. (1977). *Leptomonas seymouri* sp. n. from the cotton stainer *Dysdercus suturellus**. *The Journal of Protozoology*, 24(4), 483–484. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1977.tb00996.x>
- Wallace, F. G., Camargo, E. P., McGHEE, R. B., & Roitman, I. (1983). Guidelines for the description of new species of lower trypanosomatids1. *The Journal of Protozoology*, 30(2), 308–313. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1983.tb02921.x>
- Wcislo, W. T., & Danforth, B. N. (1997). Secondly solitary: The evolutionary loss of social behavior. *Trends in Ecology & Evolution*, 12(12), 468–474. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(97\)01198-1](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(97)01198-1)
- Whitehorn, P. R., O'Connor, S., Wackers, F. L., & Goulson, D. (2012). Neonicotinoid pesticide reduces Bumble bee colony growth and queen production. *Science*, 336(6079), 351–352. <https://doi.org/10.1126/science.1215025>
- Willis Chan, D. S., Prosser, R. S., Rodríguez-Gil, J. L., & Raine, N. E. (2019). Assessment of risk to hoary squash bees (*Peponapis pruinosa*) and other ground-nesting bees from systemic insecticides in agricultural soil. *Scientific Reports*, 9(1), 11870. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47805-1>
- Wilson-Rich, N., Dres, S. T., & Starks, P. T. (2008). The ontogeny of immunity: Development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*, 54(10–11), 1392–1399. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.07.016>
- Winston, M. L. (1991). *The biology of the honey bee* (1. Harvard Univ. Press paperback ed). Harvard Univ. Press.
- Wood, S. C., Kozii, I. V., Koziy, R. V., Epp, T., & Simko, E. (2018). Comparative chronic toxicity of three neonicotinoids on New Zealand packaged honey bees. *PLOS ONE*, 13(1), e0190517. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190517>
- Wood, T. J., Michez, D., Paxton, R. J., Drossart, M., Neumann, P., Gérard, M., Vanderplanck, M., Barraud, A., Martinet, B., Leclercq, N., & Vereecken, N. J. (2020). Managed honey bees as a radar for wild bee decline? *Apidologie*, 51(6), 1100–1116. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00788-9>
- Xu, G., Palmer-Young, E., Skyrn, K., Daly, T., Sylvania, M., Averill, A., & Rich, S. (2018). Triplex real-time PCR for detection of *Crithidia mellificae* and *Lotmaria passim* in honey bees. *Parasitology Research*, 117(2), 623–628. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5733-2>
- Yang, B., Peng, G., Li, T., & Kadowaki, T. (2013). Molecular and phylogenetic characterization of honey bee viruses, *Nosema* microsporidia, protozoan parasites, and parasitic mites in China. *Ecology and Evolution*, 3(2), 298–311. <https://doi.org/10.1002/ece3.464>
- Yang, X., & Cox-Foster, D. L. (2005). Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: Evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(21), 7470–7475. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501860102>
- Yurchenko, V., Kolesnikov, A. A., & Lukeš, J. (2000). Phylogenetic analysis of Trypanosomatina (Protozoa: Kinetoplastida) based on minicircle conserved regions. *Folia Parasitologica*, 47(1), 1–5. <https://doi.org/10.14411/fp.2000.001>
- Yurchenko, V. Y., Lukeš, J., Jirku, M., Zeledón, R., & Maslov, D. A. (2006). *Leptomonas costaricensis* sp. n. (Kinetoplastea: Trypanosomatidae), a member of the novel phylogenetic group of insect trypanosomatids closely related to the genus *Leishmania*. *Parasitology*, 133(05), 537. <https://doi.org/10.1017/S0031182006000746>