

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2024

Tereza Šinkmajerová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Variabilita mikrosatelitů kleštíka včelího
(*Varroa destructor*)

Bakalářská práce

Tereza Šinkmajerová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2024

Vedoucí práce: RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Tereza ŠINKMAJEROVÁ
Osobní číslo: R20727
Studijní program: B1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Variabilita mikrosatelitů kleštíka včelího (*Varroa destructor*)
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

1. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce: biologická a genetická charakteristika kleštíka včelího; patologické působení kleštíka včelího na včelu medonosnou; genetická variabilita kleštíka včelího s důrazem na její studium pomocí mikrosatelitů.
2. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
3. Optimalizovat PCR amplifikaci známých mikrosatelitů u kleštíka včelího a zjistit jejich variabilitu na DNA kleštíků z České republiky.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

- 1) Evans, J.D. (2000): Microsatellite loci in the honey bee parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Molecular Ecology*, 9: 1436–1438.
- 2) Solignac, M., Vautrin, D., Pizzo, A., Navajas, M., Le Conte, Y., Cornuet, J.-M. (2003): Characterization of microsatellite markers for the apicultural pest *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and its relatives. *Molecular Ecology Notes*, 3: 556–559.
- 3) Cornman, R.S., Schatz M.C., Johnston, J.S., Chen, Y.-P., Pettis, J., Hunt, G., Bourgeois, L., Elsik, C., Anderson, D., Grozinger, C.M., Evans, J.D. (2010): Genomic survey of the ectoparasitic mite *Varroa destructor*, a major pest of the honey bee *Apis mellifera*. *BMC Genomics*, 11: 602.
- 4) Dynes, T.L., De Roode, J.C., Lyons, J.I., Berry, J.A., Delaplane, K.S., Brosi, B.J. (2016): Fine scale population genetic structure of *Varroa destructor*, an ectoparasitic mite of the honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 50: 49–54.
- 5) Duan, X.-L., Zhao, B.-A., Liu, Y., Xiong, M.-Q., He, N., Huang, S.-K., Huang, W.-F., Li, J.-H. (2020): Development and characterization of six novel microsatellite markers for honey bee parasitic mite *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae). *Systematic & Applied Acarology*, 25: 1733–1744.

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.

Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání bakalářské práce: 10. října 2022
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. května 2024

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 25. října 2022

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora:	Tereza Šinkmajerová
Název práce:	Variabilita mikrosatelitů kleštíka včelího (<i>Varroa destructor</i>)
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra buněčné biologie a genetiky, PŘF UP v Olomouci
Vedoucí práce:	RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2024

Souhrn:

Tato bakalářská práce se zabývá optimalizací PCR amplifikace známých mikrosatelitových lokusů kleštíka včelího (*Varroa destructor*) s cílem zjištění jejich variability v rámci České republiky.

Teoretická část pojednává o biologické charakteristice kleštíka včelího včetně jeho zařazení do systému, historii rozšíření, morfologii a životním cyklu. Dále se věnuje patologickému působení tohoto parazita ve vztahu ke včele medonosné (*Apis mellifera*), jeho monitoringu, metodám léčby a genetické charakteristice s důrazem na studium genetické variability pomocí mikrosatelitových markerů.

Experimentální část je zaměřena na optimalizaci PCR amplifikace provedenou se 33 páry primerů pro polymorfní mikrosatelitové lokusy kleštíka včelího a hledání lokusů, které vykazují polymorfismus v rámci České republiky. Lokus vj296 neposkytl žádný produkt, zbylých 32 lokusů poskytujících produkt bylo na základě testů rozděleno do tří skupin. První skupina zahrnuje 25 monomorfních lokusů, druhá obsahuje lokus vj275, jehož produkt byl polymorfní ale naprosto nehodnotitelný a zbylých 6 lokusů bylo polymorfních hodnotitelných se 2–3 alelami. Polymorfní a hodnotitelné mikrosatelity byly analyzovány populačně genetickými programy.

Klíčová slova:	Kleštík včelí, <i>Varroa destructor</i> , mikrosatelity, genetická variabilita
Počet stran:	63
Počet příloh:	2
Jazyk:	Český

Bibliographical identification

Author's name and surname:	Tereza Šinkmajerová
Title:	Microsatellite variability in mite <i>Varroa destructor</i>
Type of thesis:	Bachelor
Department:	Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc
Supervisor:	RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.
The year of presentation:	2024

Summary:

This bachelor thesis focuses on the optimization of PCR amplification of known microsatellite loci of the mite *Varroa destructor* in order to determine their variability in populations of these mites in the Czech Republic.

The theoretical part deals with the biological characteristics of *Varroa destructor*, including its system classification, history of distribution, morphology and life cycle. It also discusses the pathological effects of this parasite in relation to the honey bee (*Apis mellifera*), its monitoring, treatment methods and genetic characterisation with emphasis on the study of genetic variability using microsatellite markers.

The experimental part is focused on the optimization of PCR amplification performed with 33 primer pairs for polymorphic microsatellite loci of *Varroa destructor* and searching for loci that show polymorphism within the Czech Republic. The locus vj296 did not amplify any product. Based on the tests the remaining 32 product-amplifying loci were divided into three groups. The first group includes 25 monomorphic loci, the second group contains locus vj275 whose product was polymorphic but not evaluable and the remaining 6 loci were polymorphic and evaluable with 2–3 alleles. Polymorphic and evaluable microsatellites were analyzed by population genetic softwares.

Keywords:	Mite, <i>Varroa destructor</i> , microsatellites, genetic variability
Number of pages:	63
Number of appendices:	2
Language:	Czech

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně s použitím citovaných literárních zdrojů pod vedením RNDr. Petra Nádvorníka, Ph.D.

V Olomouci dne 3. 5. 2024

.....

Tímto bych chtěla poděkovat RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D., vedoucímu mé bakalářské práce, za ochotu, vstřícnost, věnovaný čas, za odborné vedení a cenné rady, které mi poskytl během zpracování teoretické i experimentální části této práce. Dále bych ráda poděkovala kolegyním a kolegovi z Laboratoře populační genetiky za příjemnou atmosféru. Velké díky patří také mé rodině, která při mně stála po celou dobu studia.

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíle práce.....	2
3	Literární přehled	3
3.1	Biologická charakteristika kleštíka včelího	3
3.1.1	Taxonomie	3
3.1.2	Hostitelé kleštíka včelího a historie rozšíření	3
3.1.3	Morfologie	4
3.1.4	Životní cyklus	5
3.2	Patologické působení kleštíka včelího na včelu medonosnou	7
3.2.1	Důsledky úbytku tělních tekutin a vliv na imunitu včel	8
3.2.2	Kleštík včelí jako virový vektor	8
3.3	Monitoring varroózy	9
3.4	Opatření proti varroóze	11
3.5	Genetická charakteristika kleštíka včelího.....	13
3.5.1	Jaderný genom.....	13
3.5.2	Mitochondriální genom	13
3.5.3	Studium genetické variability kleštíka včelího pomocí mikrosatelitových markerů	15
4	Materiál a metody	18
4.1	Biologický materiál.....	18
4.2	Použité chemikálie	19
4.3	Použité roztoky a jejich příprava	20
4.4	Použité laboratorní přístroje.....	23
4.5	Izolace genomické DNA kleštíka včelího.....	24
4.6	PCR amplifikace DNA kleštíka včelího.....	25
4.7	Amplifikované mikrosatelitové lokusy kleštíka včelího.....	26
4.8	Elektroforetická separace PCR produktů.....	26
4.9	Statistické vyhodnocení získaných dat	28
5	Výsledky	29
6	Diskuze	34
7	Závěr.....	38
8	Použitá literatura.....	39
9	Přílohy	49

Seznam symbolů a zkratek

ABPV	virus akutní paralýzy včel
ARMS	amplifikační refrakční mutační systém
<i>Atp6</i>	gen pro mitochondriálně kódovanou membránovou podjednotku ATP syntázy 6
<i>Cox1</i>	gen pro cytochrom oxidázovou podjednotku 1
<i>Cox3</i>	gen pro cytochrom oxidázovou podjednotku 3
<i>CytB</i>	gen pro cytochrom B
DWV	virus deformovaných křídel
IAPV	izraelský virus akutní paralýzy
KBV	kašmírský včelí virus
LINEs	dlouhé rozptýlené jaderné elementy
LTR	dlouhé terminální repetice
PCR-RFLP	PCR amplifikace ve spojení s polymorfismem délky restričních fragmentů
SBV	virus pytlíčkovitého plodu

Seznam obrázků

Obrázek 1: Anatomie kleštíka včelího.....	5
Obrázek 2: Životní cyklus kleštíka včelího.....	7
Obrázek 3: Příznaky viru deformovaných křídel.....	9
Obrázek 4: Přibližné geografické umístění lokalit odběru vzorků v rámci České a Slovenské republiky s čísly odpovídajícími vzorkům na nich odebraným.....	19
Obrázek 5: Elektroforeticky separované PCR produkty mikrosatelitového lokusu vj294 testovaného na 17 jedincích kleštíka včelího.....	33
Obrázek 6: Elektroforeticky separované PCR produkty mikrosatelitového lokusu VD307 testovaného na 17 jedincích kleštíka včelího.....	33

Seznam tabulek

Tabulka 1: Seznam lokalit odebraných vzorků včelí měli.	18
Tabulka 2: Složení PCR mixu pro 6 a pro 17 vzorků.	25
Tabulka 3: Seznam testovaných mikrosatelitových lokusů kleštíka včelího.	26
Tabulka 4: Přehled hodnotitelných polymorfních mikrosatelitových lokusů pro kleštíka včelího s podmínkami PCR amplifikace a elektroforetické separace.	30
Tabulka 5: Přehled genotypů 6 polymorfních mikrosatelitů u 17 jedinců kleštíka včelího....	32
Tabulka 6: Genetická charakteristika variabilních mikrosatelitů.....	32

1 Úvod

Včela medonosná (*Apis mellifera*) má ekologický i ekonomický význam. Její důležitou činností v rámci ekosystému je opylování planých, ale i zemědělsky významných rostlin, čímž přispívá k zachování biologické rozmanitosti a zvýšení výnosů a kvality plodin. Kromě toho je včela medonosná producentem medu, vosku, propolisu a dalších produktů, které mají potravinářské, medicínské i komerční využití. Včela medonosná však musí čelit mnoha stresovým faktorům. Jedním z nich je ektoparazit kleštík včelí (*Varroa destructor*), jenž svým působením páchá škody po celém světě a snahou včelařů je potlačovat a redukovat jeho výskyt ve včelstvech. Škála účinných látek je však omezená, s čímž se pojí vznik rezistence v důsledku častého léčení a to následně komplikuje účinnost léčby. Proto je důležité věnovat se studiu biologie a genetiky kleštíka včelího. Jedním z přístupů, který přináší cenné informace o jeho genetické variabilitě, jež by mohly být využitelné při studiu rezistence, migrace a evolučních procesů tohoto parazita, je studium mikrosatelitových markerů.

Tato práce se zaměřuje na testování mikrosatelitových markerů popsaných u kleštíka včelího, které v zahraničních studiích vykazovaly polymorfismus. Cílem je optimalizovat PCR amplifikaci těchto lokusů a zjistit, zdali jsou v populaci kleštíků v České republice také polymorfní.

2 Cíle práce

1. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce: biologická a genetická charakteristika kleštíka včelího; patologické působení kleštíka včelího na včelu medonosnou; genetická variabilita kleštíka včelího s důrazem na její studium pomocí mikrosatelitů.
2. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
3. Optimalizování PCR amplifikace známých mikrosatelitů u kleštíka včelího a zjištění jejich variability na DNA kleštíků z České republiky.

3 Literární přehled

3.1 Biologická charakteristika kleštíka včelího

Kleštík včelí (*Varroa destructor*) je ektoparazit napadající dospělé včely i včelí plod. Infestace kleštíkem včelím působí ve včelstvech velké škody, které nakonec vedou k jejich úhynu. Kvůli těmto ničivým dopadům momentálně patří mezi hlavní hrozby v oblasti včelařství.

3.1.1 Taxonomie

Kleštík včelího lze zařadit do třídy pavoukovci (Arachnida), řádu čmelíkovci (Mesostigmata), čeledi kleštíkovití (Varroidae) a rodu kleštík (*Varroa*). První zástupce rodu *Varroa* byl popsán roku 1904 holandským zoologem A. C. Oudemansem jako ektoparazit včely východní (*Apis cerana*). Popsaný exemplář byl odebrán Edwardem Jacobsonem na Jávě ve městě Semarang (Oudemans, 1904). Anderson *et* Trueman (2000) na základě další genotypové, fenotypové a reprodukční analýzy zjistili, že *V. jacobsoni* je komplex nejméně dvou různých druhů, proto byl popsán samostatný druh kleštíka včelí (*Varroa destructor*). Z tohoto důvodu je v článcích publikovaných před rokem 2000 referováno na *V. jacobsoni*, ačkoli byl téměř ve všech případech předmětem výzkumu *V. destructor* (Rosenkranz *et al.*, 2010).

3.1.2 Hostitelé kleštíka včelího a historie rozšíření

Přirozeným hostitelem kleštíka včelího je včela východní na území Asie, která si díky dlouhé době koevoluce vytvořila obranné strategie a jeho přítomnost pro ni není kriticky nebezpečná. Mezi tyto strategie patří schopnost zbavit ze roztoče z vlastního těla samočištěním (*grooming*) a čistící pud dělnic, které dokážou rozpoznat přítomnost parazita v zavíčkovaném plodu a odstranit ho. V případě přemnožení parazita může včelstvo opustit svůj úl (Rath, 1999).

Během první poloviny 20. století bylo zjištěno, že se kleštíkovi včelímu podařilo adaptovat na nového hostitele, a to na včelu medonosnou (*Apis mellifera*) (Rosenkranz *et al.*, 2010). Jedna z prvních zmínek o výskytu kleštíka včelího na včele medonosné pochází přibližně z roku 1950 z oblasti Ruska. Ačkoliv není zcela jasné, kdy a jak přesně došlo ke změně hostitele, příčinou bylo převezení nepůvodního druhu včely medonosné do oblastí obývaných původním druhem včelou východní. Konkrétně v tomto případě transportem včelstev po Transsibiřské magistrále mezi západním a východním Ruskem (Peck, 2021). Kvůli mezinárodnímu obchodu se včelami došlo k rychlému šíření tohoto parazita do Pákistánu (1955), Japonska (1958), Číny (1959), Bulharska (1967), Jižní Ameriky (1971), Německa (1977) a brzy se z infestace včely

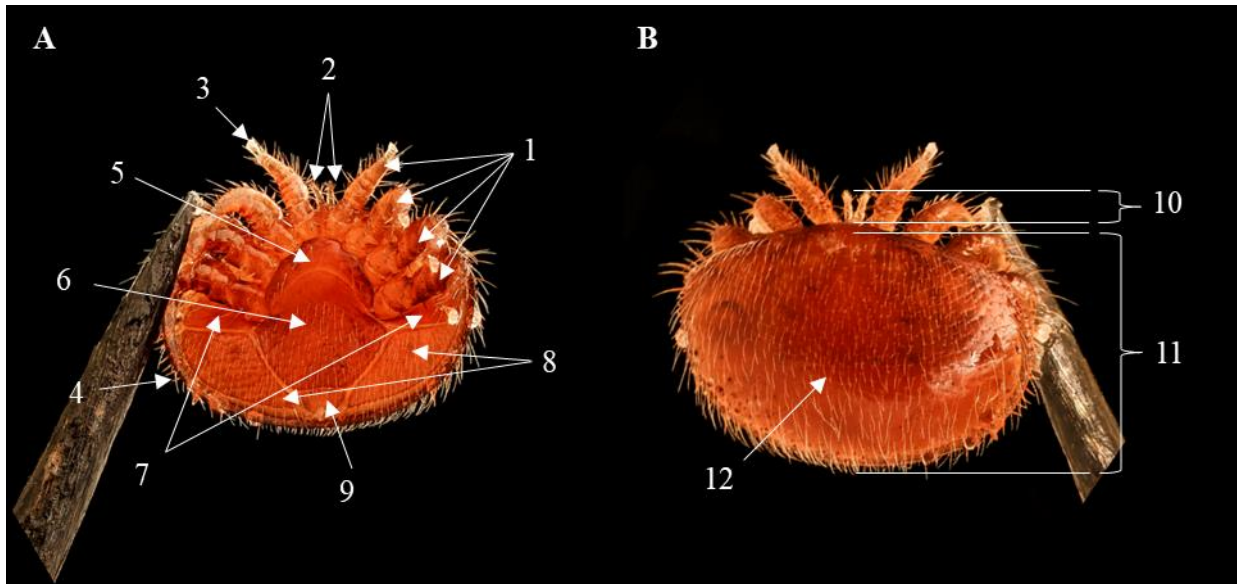
medonosné kleštíkem včelím stal světový problém (Rosenkranz *et al.*, 2010). První výskyt roztoče byl na území tehdejšího Československa zaznamenán začátkem roku 1978 pracovníkem VF VŠP v Košicích, učitelem předmětu Chov a choroby včel doc. MVDr. J. Hankem, CSc. při systematické kontrole měli. Výskyt byl v terénu potvrzen nálezem pozitivních včelstevch v pohraničních obcích Vyšné Nemecké a Ruský Hrabovec. Nakažená včelstva se na východ Slovenska údajně dostala ze zakarpatské oblasti Sovětského svazu. Šíření kleštíka rychle postupovalo a již v srpnu roku 1978 bylo v okrese Humenné známo dalších 15 ohnisek. Na jaře roku 1981 došlo z pohraničních oblastí východního Slovenska k rozšíření do okresu Ústí nad Orlicí. V ohniscích nákazy a ochranném pásmu byla včelstva vypalován. I přes přísná opatření se nakonec kleštík včelí rozšířil po celém území republiky. Přítomnost nákazy byla monitorována vyšetřením zimní měli a později se od eradikace nakažených včelstev přešlo k jejich léčení (Čermák *et al.*, 2016).

3.1.3 Morfologie

Tělo kleštíka včelího je členěno na dvě části, na idiosomu a gnatosomu. Idiosoma se skládá z jednoho dorzálního a sedmi ventrálních štítů (hrudní, genitální, dva endopodální štíty, dva metapodální štíty a anální štít) (Rosenkranz *et al.*, 2010). Gnatosoma je tvořena dvěma pedipalpami se senzoricou funkcí a dvěma chelicerami. Stejně jako ostatní zástupci třídy pavoukoců má kleštík 4 páry nohou.

Mezi samcem a samicí lze pozorovat značný sexuální dimorfismus (Ifantidis, 1983). Celé tělo samic je pokryto malými štětkami, jež jim pomáhají udržet se na hostiteli (Kirrane *et al.*, 2012). Idiosoma samic je zploštělá, elipsoidní a protáhlá do šířky, u samců je tvar spíše hruškovitý. Zatímco samičí dorsální štít a ventrální štíty jsou vysoce sklerotizované, samčí tělo vykazuje pouze slabou sklerotizaci, a to převážně v oblasti dorzálního štítu a nohou (Rosenkranz *et al.*, 2010). Nohy samic jsou krátké a silné se specializovanými útvary zvanými apotely, které umožňují přichycení na hostitele (De Ruijter *et Kaas*, 1983). Samci jsou mnohem menší (šířka 0,7 mm; délka 0,715 mm) než samice (šířka ~1,7 mm; délka ~1,1 mm). Dospělí samci jsou světle zbarvení a vzhledem se podobají mladším vývojovým stádiím protonymfy a deutonymfy samic, samice v dospělosti vykazují červenohnědé zbarvení. Poslední článek chelicer je u samic pohyblivý a má dva malé zoubky. U samců je poslední článek chelicer přeměněn na spermatodaktyl umožňující přenos spermatu do samičího pohlavního ústrojí. Samičí pohlavní orgány jsou rozděleny na dvě soustavy. První se skládá z vaječníku, dělohy a pochvy vedoucí k pohlavnímu otvoru umístěnému mezi druhým párem nohou. Druhá soustava je tvořena dvojicí porů (solenostomů) otevírajících se do trubic, které se dále větví.

Větvení přechází do spermatického kanálku vedoucího do spermatéky, ta slouží jako zásobárna spermií až dokud nejsou vajíčka oplozena. Samčí pohlavní systém je tvořen jedním varletem umístěným v zadní části těla. Z varlete vedou dva chámovody spojující se do nepárového ejakulačního kanálku, který ústí mezi druhým párem nohou (Rosenkranz *et al.*, 2010). Morfologii kleštíka lze vidět na Obrázku 1.



Obrázek 1: Anatomie kleštíka včelího (popsáno podle Thalpa *et al.*, 2015; Gardi, 2020 a Coons *et Rothschild*, 2004; foto USGS Bee Inventory and Monitoring Lab Beltsville, Maryland, USA, dostupné v galerii Flickr <https://flickr.com/photos/54563451@N08/48697155713>; navštíveno 17. 4. 2024).

A. ventrální pohled: 1 - nohy, 2 - pedipalpy, 3 - apotely, 4 - štětinky, 5 - hrudní štít, 6 - genitální štít, 7 - endopodální štíty, 8 - metapodální štíty, 9 - anální štít.

B. dorzální pohled: 10 - gnatosoma, 11 - idiosoma, 12 - dorzální štít.

3.1.4 Životní cyklus

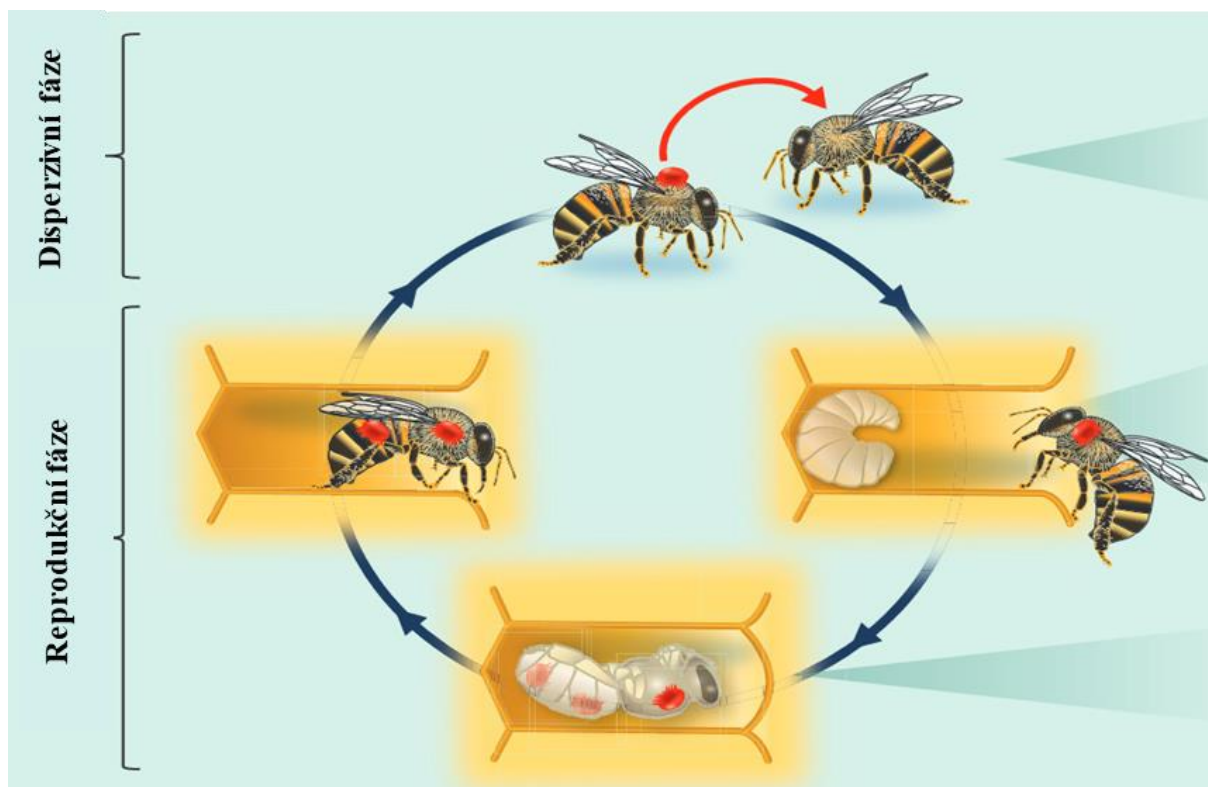
Životní cyklus kleštíka včelího je úzce spjat s jeho hostitelem, neexistují tedy žádná volně žijící a na včelách nezávislá stádia. Životní cyklus samic kleštíka lze rozdělit na dvě fáze, na fázi disperzivní (foretickou) a fázi reprodukční.

Disperzivní fáze probíhá na dospělých včelách. Během této fáze jsou samice skryté mezi abdominálními sternity včel v místech, jež jsou pro ostatní včely těžko přístupná a je pro ně obtížné je odstranit (Nazzi *et Le Conte*, 2016). Dospělé včely slouží jako prostředek pro přenos parazita v rámci včelstva v jednom úlu i mezi různými včelstvy navzájem. Samice během této fáze upřednostňují včely kojičky, jimiž jsou transportovány k nezavíčkováným buňkám obsahujícím včelí larvu ve stádiu 5. instaru (Rosenkranz *et al.*, 2010).

Reprodukční fáze probíhá uvnitř plástových buněk včelího plodu. Fuchs (1990, 1992) uvádí, že samice kleštika vykazují přibližně osmkrát vyšší preferenci pro trubčí plod, kde mají vyšší reprodukční potenciál. Počátek reprodukční fáze nastává přibližně 15–20 hodin (v případě dělničího plodu) nebo 40–50 hodin (v případě trubčího plodu) před tím, než je buňka obsahující včelí larvu zavíčkována (Boot *et al.*, 1992). Samice kleštika je skryta na dně buňky v potravě včelí larvy, díky čemuž je schopná uniknout pozornosti dospělých včel a nedojde k jejímu odstranění. Oogeneze samice roztoče je v počátku aktivována polární frakcí kutikulárních těkavých látek larev včel v 5. instaru. Experiment potvrdil, že u samic zbavených potravy se spustí previtelogeneze oocytů, avšak pro zahájení vitelogeneze je nutný příjem potravy ve formě tělních tekutin včelí larvy. Ze získaných informací vyplývá, že oogeneze samic kleštika není regulována pouze jedním faktorem, ale jedná se o kaskádu různých stimulů (Rosenkranz *et Garrido*, 2004).

Několik hodin po zavíčkování je potrava včelí předkuklou spotřebována, a tak dochází k osvobození samice kleštika. Během tohoto stádia samice kleštika vytváří v kutikule včelí předkukly otvor, který slouží jako místo pro příjem potravy samice i jejích budoucích potomků (Traynor *et al.*, 2020). Přibližně po 60 hodinách samice klade první vajíčko (Ifantidis, 1983). Vajíčka jsou kladena po jednom přibližně v třicetihodinových intervalech (Traynor *et al.*, 2020). Pohlaví u kleštika včelího je určeno haplodiploidíí, konkrétně se jedná o arrhenotokní partenogenezi (Häußermann *et al.*, 2020). První vajíčko je neoplozené (haploidní), tudíž se z něj líhne samec. Dalších 7–9 vajíček je již oplozených (diploidních) a líhnou se z nich samice.

Roztoč prochází několika vývojovými stádii, jimiž jsou stádium vajíčka, larvy, protonymfy, deutonymfy a stádium dospělce. Samec dosahuje pohlavní dospělosti jako první a postupně se páří se svými dospívajícími sestrami. Páření je vyvoláno pohlavním feromonem mladých samic obsahujícím převážně kyselinu olejovou, stearovou, palmitovou a jejich etylestery (Ziegelmann *et al.*, 2013). Tento feromon je vnímán smyslovým orgánem umístěným na předních nohách samce (Häußermann *et al.*, 2015). Mladá včela dokončuje svůj vývoj a opouští spolu s dospělými spárenými samicemi kleštika, včetně samice zakladatelky, plástovou buňku. Tyto samice přecházejí do disperzivní fáze. Nevyvinuté samice, nespárené samice a samec v plástové buňce hynou. Zjednodušený životní cyklus kleštika včelího lze vidět na Obrázku 2.



Obrázek 2: Životní cyklus kleštíka včelího (upraveno podle Nazzi *et* Le Conte, 2016).

3.2 Patologické působení kleštíka včelího na včelu medonosnou

Jak již bylo zmíněno, infestace kleštíkem včelím představuje pro včelu medonosnou velkou hrozbu. Dospělá samice kleštíka je schopná svými pohyblivými chelicerami se zoubky perforovat kutikulu dospělých včel i včelích larev za účelem vytvoření otvoru pro sání jejich tělních tekutin (Li *et al.*, 2019). Kanbar *et* Engels (2004) ve své práci uvádějí, že na zkoumaných předkuklách trubců a dělnic byly tyto ranky lokalizované na břišních sternitech 2–9, většinou na levé ventrální straně. V případě trubčích kukel byly ranky detekovány výhradně na předních břišních sternitech, především uprostřed druhého segmentu a pouze na larvách dělnic byly některé perforace pozorované také na hrudníku. Po vylíhnutí kukel má otvor průměr přibližně 50–60 μm , ale vzhledem k tomu, že jej kleštík využívá opakovaně, dochází k poškozování okolních epidermálních buněk a u hnědě pigmentovaných kukel může mít průměr 80–100 μm , výjimečně i více než 300 μm . Průměr ranky má tendenci se zvětšovat s mírou napadení v rámci plástové buňky (Kanbar *et* Engels, 2004, 2005). Když dojde u včel k poškození kutikuly a epidermis, aktivují se imunitní reakce a nastává proces hojení (Theopold *et al.*, 2002), avšak v případě poranění způsobeného kleštíkem zůstává rána otevřená i několik dní (Kanbar *et* Engels, 2003, 2005), což naznačuje, že kleštík využívá k potlačení přirozených hojivých procesů antikoagulační proteiny obsažené v jeho slinách (Richards *et al.*, 2011). Dlouho se mělo

za to, že kleštík vysává ze včely pouze hemolymfu (De Jong *et al.*, 1982; Donzé *et Guerin* 1994; Genersch, 2010), avšak Ramsey *et al.* (2019) ve své práci prokázali, že primárním zdrojem potravy kleštíka je tukové těleso včel. Pojem označující nemoc způsobenou kleštíkem včelím nemá v českém jazyce přesně určenou podobu, běžně se i v odborné literatuře používají termíny varroóza, varroza, dokonce i varroáza. Uvedené termíny se v populárnějších textech objevují i pouze s jedním r.

3.2.1 Důsledky úbytku tělních tekutin a vliv na imunitu včel

Sání tělních tekutin během vývoje včely v plástových buňkách vede k výraznému poklesu počtu hemocytů (Salem *et al.*, 2006), snížení hmotnosti a také k redukci velikosti dospělé včely (Duay *et al.*, 2003). Důsledky poklesu hmotnosti byly u včel létavek pozorovány jako narušená schopnost orientace při létání z úlu a zpět a u trubců byla prokázána snížená reprodukční fitness a výkonnost letu (Duay *et al.*, 2002). U napadených včel byla detekována snížená exprese genu kódujícího fenol oxidázu a genů kódujících antimikrobiální peptidy, což nakonec může vést k oslabení včelí buněčné i humorální imunity a včelstva mohou být náchylnější k různým včelím patogenům jako jsou bakterie a viry (Yang *et Cox-Foster*, 2005).

3.2.2 Kleštík včelí jako virový vektor

Kleštík je také účinným vektorem a aktivátorem virů včely medonosné. Příklady virů, které přenáší, jsou virus deformovaných křídel (DWV), virus akutní paralýzy včel (ABPV), kašmírský včelí virus (KBV), izraelský virus akutní paralýzy (IAPV) nebo virus pytlíčkovitého plodu (SBV) (Bowen-Walker *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2005a, 2005b; Di Prisco *et al.*, 2011).

Nejlépe prozkoumaným virem přenášeným kleštíkem včelím je DWV, (+) ssRNA virus z čeledi Iflaviridae. DWV je přenášen horizontálně i vertikálně, proto je možné jej detekovat ve všech životních stádiích včel (Chen *et al.*, 2005). Ve včelstvu, které není napadeno tímto parazitem, je virus přítomen ve formě asymptomatické infekce a jeho hladina je nízká, což značí, že je pravděpodobně udržován imunitou hostitele pod kontrolou. Je-li však virus vpraven do hemocelu včel během krmení parazita, dochází k jeho aktivaci a projevu virulence, která vede k akutním a letálním infekcím (Bowen-Walker *et al.*, 1999; Shen *et al.*, 2005b; de Miranda *et Genersch*, 2010). Pokud jsou včely infikovány již ve stádiu larvy, objevují se u nich klinické symptomy jako smrt nakažených larev a u dospělých včel snížená životnost, zmenšený abdomen a deformace křídel (Obrázek 3). Jsou-li včely infikovány až ve stádiu dospělce, tyto příznaky nevykazují, avšak slouží jako rezervoár DWV infekce (Martin *et al.*, 2013).



Obrázek 3: Příznaky viru deformovaných křídel (Foto dostupné v galerii Flickr <https://www.flickr.com/photos/klaasdegelder/5137849412/>, navštíveno 7. 4. 2024).

3.3 Monitoring varroózy

Monitoring varroózy je důležitým předpokladem pro úspěšné včelaření. Poskytuje informace o stupni napadení ve včelstvu v průběhu roku a pomáhá ke zvolení vhodných opatření týkajících se případné léčby a následného vyhodnocení její efektivity. Včelaři v rámci České republiky jsou dle veterinárního zákona povinni sledovat zdravotní stav svých včelstev a řídit se nařízeními Státní veterinární správy, která se týká preventivních a diagnostických úkonů a předcházení, vzniku a šíření nálezů (Anonymous). Jako příklady metod sloužících ke sledování výskytu kleštíka lze uvést monitoring přirozeného spadu, monitoring metodou smyvu moučkovým cukrem, alkoholem nebo CO₂ a vyšetření trubčího plodu.

Monitoring přirozeného spadu

Jedná se o metodu, která má minimální časovou náročnost a nízké investiční náklady, avšak získaná data jsou velmi orientační (Daníhlík, 2021). Přirozeně uhynulí kleštíci nebo kleštíci uhynulí po aplikaci léčiv padají na speciální monitorovací podložku umístěnou na dně úlu. Na podložce je položena hrubá (umělohmotná) síťovina a pod ní ještě jedna včelotěsná síťovina, ty zabraňují včelám v odstranění spadené měli z podložky. Všechny tři vrstvy jsou sepnuté pomocí plechové lišty nebo kancelářskými svorkami. Moderní úly mají takzvaná varroadna. Jedná se o vytahovací šuplík nad nímž je včelotěsné síto propustné pro kleštíka, v šuplíku může být navíc umístěna monitorovací podložka (Texl *et* Přidal, 2008). Spadlí kleštíci

mohou být odnášeni mravenci, což může zkreslovat výsledná data, proto se doporučuje použití lepidlových podložek, které jsou dostupné komerčně nebo je možné podložku natřít tenkou vrstvou potravinářského řepkového, olivového nebo lněného oleje. Vhodné je spad vyhodnocovat každý den po dobu 5–10 dnů, v praxi se ale často vyhodnocuje až po 5–7 dnech. Ze získaných dat je následně spočítán průměrný denní spad roztočů (van der Steen *et Vejsnæs*, 2021). Obecně je za rizikovou hranici považován spad tří roztočů za den.

Metoda smyvu moučkovým cukrem

Tato metoda je jednoduchá, rychlá, nedestruktivní a nebyl u ní pozorován žádný negativní efekt na dýchací soustavu včel (Fakhimzadeh, 2001). Během vývoje této metody byly testovány inertní prášky jako mastek, pšeničná mouka, jedlá soda nebo kukuřičný škrob, avšak největší přesnosti při detekci roztočů bylo dosaženo při použití moučkového cukru (Macedo *et al.*, 2002). Metoda spočívá v promíchání odebraných živých včel s extra jemným moučkovým cukrem v uzavíratelné nádobě. Moučkový cukr způsobí, že roztoč přítomný na těle včely ztratí přilnavost a odpadne z ní. Přes víčko se sítkou jsou spadení roztoči přesypáni na podložku a z jejich počtu je proveden výpočet procentuálního napadení u dospělých včel (Gregorc *et al.*, 2017).

Metoda smyvu pomocí CO₂

Do uzavíratelné nádoby s testovanými včelami je po dobu 4 s aplikován CO₂. Včely i roztoči na nich přítomní upadnou vlivem CO₂ do bezvědomí. Po 20 s je nádobka protřepána a spadlí roztoči jsou přes víčko se sítkou vytřepáni a spočítáni. Včely po chvilce opět nabydou vědomí a je možné je vrátit zpět do včelstva (Droz *et al.*, 2017).

Metoda smyvu alkoholem

K monitoringu roztoče touhou metodou je vybráno přibližně 300 včel, které v důsledku alkoholu hynou, ale včelstvo jako celek negativně ovlivněno není (Gregorc *et Sampson*, 2019). Včely jsou umístěny do nádoby a zality denaturovaným lihem. Po protřepání je obsah vylit na dvojité včelařské síto na med, na vrchním sítu jsou zachyceny včely a na spodním sítu roztoči. Tato metoda, stejně jako předchozí dvě metody smyvu, je přesná a spolehlivá (Daníhlík, 2021).

Monitoring ze zavíčkovaného trubčího plodu

Jak již bylo zmíněno dříve, samice parazita preferují trubčí plod, toho lze využít při varroamonitoringu. Trubčí kukly jsou vytaženy pomocí odvíčkovací vidličky a je pozorována přítomnost roztočů a jejich množství. Kontrolu je nutné v úlu provádět na více místech

(Daníhlík, 2021). Tato metoda slouží pouze k orientaci a prokázání přítomnosti parazita na včelím plodu, avšak neposkytuje informaci o míře infestace v rámci celého včelstva (Roth *et al.*, 2020).

3.4 Opatření proti varroóze

Mezi včelaři existují různé přístupy, co se týče léčby napadených včelstev. Zvolení vhodné léčby se také může v různých zemích lišit v závislosti na legislativě upravující její aplikaci. Způsoby, jimiž lze bojovat s varroózou, mohou být rozděleny na metody chemické, fyzikální, biologické a zootechnologické.

Chemické metody

V současné době jsou v boji proti varroóze pro svou jednoduchost aplikace, nízké náklady a vysokou efektivitu hojně využívány syntetické akaricidy nazývané také jako „těžká chemie“, avšak jejich časté používání a relativně nízký počet účinných a schválených látek s sebou nese rizika. Ta spočívají ve vzniku rezistence roztočů vůči daným látkám (Martin, 2004; Rodríguez-Dehaibes *et al.*, 2005; Kanga *et al.*, 2016) a také v akumulaci zbytků lipofilních léčiv ve včelích produktech (med, vosk) v koncentracích, které mohou být toxické i pro včely (Premrov Bajuk *et al.*, 2017; Ostiguy *et al.*, 2019). Užívanými syntetickými akaricidy jsou pyretroidy flumetrin, akrinatriin a tau-fluvalinát, formamidin amitraz a v ČR nepovolený organofosfát kumafos. Pyretroidy zpomalují kinetiku sodíkových kanálů v membráně axonu, což vede k prodloužení doby jejich otevření, paralýze a následné smrti roztoče (Narahashi, 2000). Formamidiny jsou inhibitory enzymu monoaminoxidázy a organofosfáty inhibují enzym acetylcholinesterázu, v obou případech dojde k narušení normální funkce centrálního nervového systému (Atkinson *et al.*, 1974; Hart, 1986; Sparks *et Nauen* 2015).

Dalšími možnostmi chemické léčby jsou organické kyseliny (mravenčí, šťavelová a mléčná) a esenciální látky terpenické povahy (tymol, eukalyptol, mentol a kafr), takzvaná „lehká chemie“. Tyto akaricidy jsou většinou méně účinné než syntetické, ale přesto se jedná o efektivní metodu (Pietropaoli *et Formato*, 2019). Výhodami organických kyselin a esenciálních látek jsou nízká pravděpodobnost vzniku rezistence roztočů a nízké riziko akumulace ve včelích produktech (Bogdanov, 2006). Kyselina mravenčí jako jediná usmrcuje i roztoče zavíčkované v plodových buňkách (Fries, 1991). Pokud jsou organické kyseliny aplikovány ve vhodnou dobu a vhodné koncentraci, nepředstavují hrozbu pro včelí královnu, dospělé včely ani plod (Akyol *et Yeninar*, 2009).

Fyzikální metody

Příkladem využívané fyzikální metody je hypertermie, která je smrtelná pro roztoče a při správném použití neškodná pro včely. Dnes jsou využívána zařízení upravující teplotu v plodišti elektronicky (Thermovar, Varroa Terminator a Vatorex). Goras *et al.* (2018) aplikovali ve včelstvech s přítomností včelího plodu a dospělých včel teplý vzduch o teplotě 42 °C. Po 60 min z dospělých včel odpadalo více než 50 % roztočů a přibližně 76 % po 480 min. Kablau *et al.* (2020) sledovali vliv použité teploty na usmrcení nedospělých i dospělých stádií kleštika včelího a na fertilitu trubců. Stejně jako Goras *et al.* (2018) zjistili, že teplota nad 42 °C spolehlivě usmrtí nedospělá i dospělá stádia kleštika, avšak spolu s nimi i trubčí plod. Jako efektivní se ukázalo použití teploty 41 °C po dobu 2 h, která neměla vliv na vitalitu a fertilitu trubců. Zajímavým vynálezem, který je možné využít pro účely hypertermie je termosolární úl. Jedná se o speciálně upravený chovný úl s prosklenými plochami, při jejichž odkrytí dojde vlivem dopadajícího slunce ke zvýšení teploty v úlu (Linhart, 2018).

Biologické metody

Jako účinné byly prokázány mikrobiální biopesticidy obsahující spory entomopatogenních hub. Jejich výhodou je, že jsou netoxické pro člověka, mohou být kultivovány masově a v prostředí se přirozeně vyskytují. Kanga *et al.* (2003) testovali prášek a pásy obsahující konidie *Metarhizium anisopliae*. Ukázalo se, že tyto přípravky jsou stejně účinné jako přípravky na bázi tau-fluvalinátu a jsou pro dospělé včely i včelí plod neškodné. Spory byly při testování detekovány i v okolních úlech, což lze vysvětlit zalétáváním dělnic a trubců. Tento jev ukazuje, jak jednoduše jsou spory šířeny, to může být při této léčbě výhodou. Dalšími houbami účinnými pro potlačování varroózy jsou *Beauveria bassiana*, *Hirsutella thompsonii* a *Verticillium lecanii* (Shaw *et al.*, 2002).

Velký potenciál má také bakterie *Bacillus thuringiensis*. Alquisira-Ramírez *et al.* (2014) v laboratorní studii *in vitro* prokázali, že několik kmenů této bakterie zahubilo více než 80 % roztočů během 48 h a v navazující studii potvrdili, že dva z účinných kmenů této bakterie jsou neškodné pro včelí plod i dospělé včely (Alquisira-Ramírez *et al.*, 2017), avšak testování v terénu zatím neproběhlo. Dalšími testovanými byly *Serratia marcescens* a bakterie z čeledi Micrococcaceae a Bacillaceae (Tsagou *et al.*, 2004; Tu *et al.*, 2010). Využití těchto bakterií jako efektivní biologické léčby nicméně vyžaduje další výzkum.

Zootechnické metody

Tyto přístupy jsou podle Rosenkranz *et al.* (2010) zásadní jako dlouhodobé udržitelné řešení tlumení varroózy, ačkoliv jejich samostatné použití není většinou dostačující.

Jednou ze zootechnických metod potlačování varroózy je odstraňování trubčího plodu, který je napadán ve větší míře, než dělníci plod. Odstranění trubčiny může být provedeno několika způsoby. Buď může včelař vyříznout zavíčkované trubčí buňky nebo do úlu umístit trubčí rámeček. Dělnice na tomto rámečku postaví trubčí buňky, do kterých královna naklade neoplozená vajíčka. Po zavíčkování je rámeček vyjmut, zmražen, čímž jsou usmrceni trubci i roztoči na nich přítomní. Do včelstva je umístěn nový trubčí rámeček a proces je opakován. Nevýhodou této metody je náročnost a nutnost obětování velkého množství trubců (Jack *et al.*, 2021). Dalšími zootechnickými metodami používanými ke snížení počtu kleštíků je tvorba oddělků, klíckování matek a další zootechnické zásahy a jejich kombinace

3.5 Genetická charakteristika kleštíka včelího

Studium genetiky kleštíka včelího může pomoci porozumět jeho biologii, evoluci, vztahu k jeho hostiteli, ale také poskytnout cenné informace pro vývoj nových strategií boje s tímto roztočem. Předmětem studia je jaderný i mitochondriální genom.

3.5.1 Jaderný genom

Samice kleštíka jsou diploidní se 14 chromozomy a samci haploidní se 7 chromozomy (Traynor *et al.*, 2020). Velikost haploidního genomu kleštíka včelího byla Cornmanem *et al.* (2010) odhadnuta pomocí průtokové cytometrie jader přibližně na 565 ± 3 Mbp, standardem byla jádra buněk *Drosophila virilis*. Dále za použití programu RepeatMasker, charakterizovali rozložení protein kódujících transpozibilních elementů v rámci jaderného genomu kleštíka. Nejhojněji zastoupenými byly DNA transpozony třídy II, ze superrodiny *Tc1-Mariner*. Časté byly také retrotranspozony typu *Gypsy* s dlouhými terminálními repeticemi (LTR), dlouhé rozptýlené jaderné elementy (LINEs) a helitrony.

3.5.2 Mitochondriální genom

Evans *et al.* (2002) sekvenovali mitochondriální genom kleštíka včelího a studovali jeho organizaci. Pro testování byla použita DNA kleštíků ze včelnice spravované výzkumnou laboratoří zaměřující se na včelu medonosnou v Beltsville (Maryland, USA). Zjistili, že pořadí protein kódujících genů v mitochondriálním genomu kleštíka včelího je stejné jako u většiny členovců. Deset z 22 genů kódujících tRNA je umístěno na jiných pozicích než

v mitochondriálním genomu zástupců řádu klíšťatovců (Ixodida). V sekvenci pro 12S ribozomální podjednotku je inverze a od sekvence pro 16S rRNA je oddělena novou nekódující oblastí, což u jiných členovců nebylo zatím pozorováno. Velikost kruhové molekuly mitochondriální DNA byla podle autorů 15 218 bp (GeneBank *Acc. No.* AY163547).

Navajas *et al.* (2002) se také zabývali studiem mitochondriálního genomu kleštíka včelího. Celková genomická DNA byla izolována ze samice kleštíka pocházejícího ze včelstva spravovaného zoologickou stanicí INRA v Avignonu ve Francii. Velikost získaného mitochondriálního genomu byla 16 477 bp (GeneBank *Acc. No.* NC_004454).

Harada *et al.* (2020) pomocí sekvenování nové generace analyzovali mitochondriální genom kleštíka včelího pocházejícího z Japonska. Výsledkem analýzy byla 16 476 bp dlouhá kruhová molekula obsahující 13 protein kódujících genů, 22 tRNA genů, dva rRNA geny a jednu kontrolní oblast bohatou na AT (GeneBank *Acc. No.* AP019523).

Na základě odlišností v mitochondriální DNA v 458 bp dlouhém úseku genu pro cytochrom oxidázovou podjednotku 1 (*Cox1*) bylo detekováno 6 haplotypů, avšak bylo zjištěno, že pouze kleštíci s korejským (K1) a japonským (J1) haplotypem jsou schopni reprodukce na včele medonosné (Anderson *et* Trueman, 2000). Zatímco japonský haplotyp je přítomný pouze v Japonsku, Thajsku a Americe, korejský haplotyp je rozšířen celosvětově. Analýzou dalších mitochondriálních sekvencí byly detekovány nové haplotypy a subhaplotypy.

Navajas *et al.* (2010) na základě variability v *Cox1*, genu pro cytochrom oxidázovou podjednotku 3 (*Cox3*), mitochondriálně kódovanou membránovou podjednotku ATP syntázy 6 (*Atp6*) a v genu pro cytochrom B (*CytB*) objevili v Rusku, Koreji, Číně a Vietnamu tři varianty korejského haplotypu (K1-1, K1-2 a K1-4). Na Taiwanu, v Thajsku a v Japonsku objevili tři varianty japonského haplotypu (J1-1, J1-5 a J1-6). Všechny tyto varianty byly identifikovány u kleštíků včely medonosné.

Gajić *et al.* (2013, 2016) amplifikovali úseky *Cox1*, *Cox3*, *Atp6* a *CytB*. Vzorke DNA pocházely z lokalit v Srbsku (Bělehrad, Boljevac, Bor, Palić, Suvi Do, Šaprance, Vrbica, Zajecar a Zlatibor). V pozici 1932 sekvence *Cox1* byla detekována variabilita, tento haplotyp byl popsán jako srbský (S1). Na základě variability v pozici 10 133 sekvence *CytB* byl popsán pešterský haplotyp (P1). Mimo to také pomocí metody amplifikačního refrakčního mutačního systému (ARMS) a PCR amplifikace ve spojení s polymorfismem délky restričních fragmentů (PCR-RFLP) detekovali jedince s heteroplazmií korejského a srbského haplotypu a korejského a pešterského haplotypu. Tato varianta mitochondriální DNA byla označena jako haplotyp KS1 a KP1.

Lin *et al.* (2021) amplifikovali úsek *Cox1* (821 bp) a úsek sekvence *CytB* (985 bp) mitochondriální DNA získané z jedinců původem z východní Číny. U včely medonosné identifikovali dvě varianty kleštíků korejského haplotypu (K1-1/2 a K1-5).

3.5.3 Studium genetické variability kleštíka včelího pomocí mikrosatelitových markerů

Testování mikrosatelitových markerů je účinná metoda pro analýzu genetické variability uvnitř populací i mezi populacemi navzájem. Mikrosatelity jsou typem tandemových repetice skládajících se z 1–10 nukleotidů. Díky své nestabilitě a rychlosti mutace (10^{-3} – 10^{-6} mutací na generaci buněk) mají velký význam pro evoluci. Polymorfismus na témže mikrosatelitovém lokusu vzniká nejčastěji sklouznutím během replikaci DNA tzv. DNA *slippage*, při kterém dochází k chybnému párování mezi templátovým a vznikajícím vláknem. Výsledkem této události je inserce nebo delece tandemových repetice (Gemayel *et al.*, 2012).

Evans (2000) navrhl primery pro mikrosatelitové lokusy vjL3B2 (AF229974), vj221 (AF229977), vj272 (AF229979), vj275 (AF229980), vj282 (AF229981), vj292 (AF229982), vj294 (AF229983) a vj295 (AF229984), optimalizoval podmínky amplifikace a odhadl potenciální alelickou diverzitu pro tyto lokusy. Testovaná DNA pocházela z kleštíků z USA (Maryland), Jižní Afriky (Západní Kapsko, Curtis a provincie Kwazulu Natal) a Ruska (Moskevská oblast). Dvounukleotidové mikrosatelity vj221, vj272, vj275 a vj296 se ukázaly jako slibné markery pro hodnocení genetické struktury uvnitř populací.

Solignac *et al.* (2003) navrhli primery pro dalších 16 mikrosatelitových lokusů. Jedná se o lokusy VD001 (AJ558164), VD015 (AJ558165), VD016 (AJ558166), VD109 (AJ558167), VD112 (AJ558168), VD114 (AJ558169), VD115 (AJ558170), VD119 (AJ558171), VD121 (AJ558172), VD126 (AJ558173), VD134 (AJ558174), VD146 (AJ558176), VD151 (AJ558177), VD152 (AJ558175), VD154 (AJ558178) a VD163 (AJ558179). Tyto primery byly testovány na DNA kleštíků z Francie (Bures-sur-Yvette). Výsledkem studie bylo 6 monomorfních mikrosatelitů (VD015, VD109, VD115, VD121, VD134 a VD151), 10 mikrosatelitů (VD001, VD016, VD112, VD114, VD119, VD126, VD146, VD152, VD154 a VD163) bylo polymorfních mezi jedinci náležícím ke korejskému a japonskému haplotypu.

Solignac *et al.* (2005) pro analýzu 565 vzorků samic korejského a japonského haplotypu pocházejících ze 17 různých zemí použili 4 mikrosatelity z publikace Evans (2000) a 16 z publikace Solignac *et al.* (2003). Dvacet zkoumaných mikrosatelitních lokusů vykazovalo velmi nízkou variabilitu. Mikrosatelit vj275 byl obtížně hodnotitelný, lokusy VD109, VD115, VD134 a VD151 byly monomorfní u prvních 400 genotypovaných jedinců a lokusy VD015

a VD121 byly také monomorfní a vykazovaly jedinou fixní variantu ve vzorku z Kathmandu. Pro detailnější analýzu bylo tedy vybráno pouze 13 mikrosatelitů (VD001, VD016, VD112, VD114, VD119, VD126, VD146, VD152, VD154, VD163, vj292, vj294 a vj295), z nichž 11 bylo diagnostických pro korejský a japonský haplotyp.

Beaurepaire *et al.* (2017) navrhli další 4 polymorfní mikrosatelitové markery Vdes-01, Vdes-02, Vdes-03 a Vdes-04. Pro genotypování byla použita DNA kleštíků ze včelstev včely medonosné ze včelnice spravované zoologickou skupinou na univerzitě Martina Luthera v Halle nad Sálou v Německu. Kromě zmíněných markerů byly pro analýzu použity také mikrosatelity vj292 a vj294 (Evans, 2000) a VD305 (Broeckx *et al.*, 2019). Mezi těmito 7 markery nebyla zjištěna žádná významná vazebná nerovnováha. U všech markerů byly pozorovány výrazné odchylky od Hardy-Weibergovy rovnováhy, což není vzhledem k příbuzenskému páření mezi jedinci kleštíka překvapivý výsledek. Ačkoliv se tato studie zabývala nárůstem homozygotnosti v inbrední linii roztočů a nezahrnovala tok nových alel ve včelstvu v důsledku migrace a napadení jedné plástové buňky více samicemi roztoče, nižší odhady koeficientu inbreedingu v pozdější části sezóny odrážejí vznik nových genotypů jako výsledek těchto událostí.

Rasolofoarivao *et al.* (2017) použili pro testování genetické diverzity kleštíků z Madagaskaru mikrosatelity vj292 a vj295 (Evans, 2000) a dále VD001, VD016, VD112, VD114, VD119, VD126, VD146, VD152, VD154 a VD163 (Solignac *et al.*, 2003). Polymorfními lokusy byly VD112, VD001 a vj295. Mezi žádnou dvojicí mikrosatelitů nebyla vazba.

Dynes *et al.* (2017) zkoumali rozdělení genetické variability v rámci chovaných včelstev a mezi nimi, proměnlivost této variability v čase a souvislost s geografickou prostorovou strukturou. Dále posuzovali schopnost současných mikrosatelitových markerů informovat o přenosu roztočů mezi včelstvy, včetně rozlišení mezi horizontálním a vertikálním přenosem. Mikrosatelitové genotypy byly analyzovány během tří časových období (duben, červenec a září) ve vzorcích roztočů pocházejících ze včelnic spravovaných laboratoří věnující se včele medonosné na Georgia State University (Athény, Georgia, USA). Pro analýzu byly využity mikrosatelitové markery vj272, vj292, vj294 a vj295 (Evans, 2000) a VD001, VD112, VD114, VD119, VD126 a VD163 (Solignac *et al.*, 2003). Zjištěná heterozygotnost populace ve všech lokusech byla 0,09 a lokusy VD126, VD112, vj295, vj294, vj292, VD001 a vj272 vykazovaly známky nadbytku homozygotů, což odpovídá příbuzenskému křížení mezi jedinci tohoto roztoče, mohlo by to ale také naznačovat přítomnost nulových alel.

Duan *et al.* (2020) analyzovali transkriptom *V. destructor* s cílem najít nové polymorfní mikrosatelitové lokusy. Autoři našli 27 775 potenciálních mikrosatelitů, mezi nimiž byly nejhojněji zastoupené mononukleotidové a dinukleotidové opakující se motivy. Pro ověření těchto mikrosatelitů bylo 60 náhodně vybraných amplifikováno s DNA kleštíků pocházejících ze včelnic v Číně (Fuzhou, Zhangzhou, Putian, Quanzhou a Longyan v provincii Fujian). Sedmnáct z nich bylo úspěšně amplifikováno s očekávanou velikostí ampliconu. Po analýze genetické diverzity mezi těmito 17 mikrosatelity se pouze 6 z nich ukázalo být polymorfních v uvedených lokalitách. Polymorfními mikrosatelity byly VD7200 (MT396439), VD7118 (MT396440), VD638 (MT396441), VD5291 (MT396442), VD4502 (MT396443) a VD298 (MT396444).

Lin *et al.* (2021) na kleštících pocházejících z východní Číny, u nichž nejprve bylo genetickou analýzou určeno, k jakému haplotypu náleží, testovali mikrosatelity vj275, vj292, vj294 a vjL3B2 (Evans, 2000) a VDK3348 a VDK1767 (Cornman *et al.*, 2010). Mikrosatelitový lokus vjL3B2 byl monomorfní a lokus vj275 byl vysoce variabilní a obtížně hodnotitelný. Pro další analýzu byly použity zbylé čtyři mikrosatelity, které vykazovaly polymorfismus v rámci dvou korejských subhaplotypů.

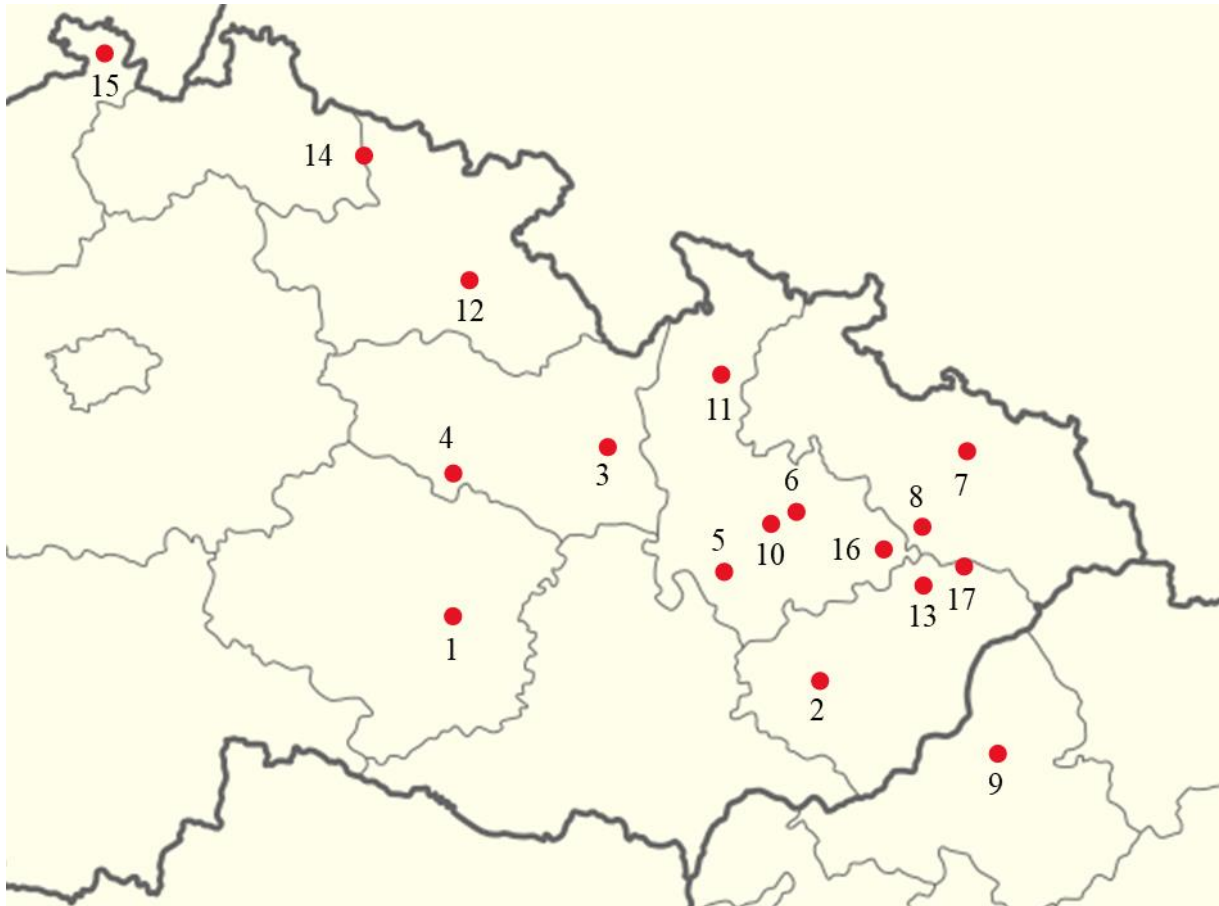
4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Jako biologický materiál sloužila včelí měl obsahující mrtvé samice kleštíka včelího. Materiál byl poskytnut včelaři z 16 lokalit na území České republiky a z 1 lokality na území Slovenské republiky. Seznam lokalit je uveden v Tabulce 1, pro lepší orientaci uvádím mapu, kde jsou dané lokality vyznačené (Obrázek 4). Samice kleštíka včelího byly z mčeli separovány flotační metodou. Vzorek mčeli z příslušné lokality byl vždy rozmíchán pomocí skleněné tyčinky v kádince s 96% ethanolem. Samice roztoče, které vyplavaly k hladině, byly odebrány do 1,5ml zkumavek a uchovány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do samotné izolace genomické DNA.

Tabulka 1: Seznam lokalit odebraných vzorků včelí mčeli.

Číslo vzorku	Lokalita	Okres	Kraj
1	Pavlínov	Žďár nad Sázavou	Vysočina
2	Bělov	Zlín	Zlínský
3	Žichlínek	Ústí nad Orlicí	Pardubický
4	Pláňavy	Chrudim	Pardubický
5	Lípy	Olomouc	Olomoucký
6	Pohořany	Olomouc	Olomoucký
7	Dolní Lhota	Ostrava	Moravskoslezský
8	Jeseník nad Odrou	Nový Jičín	Moravskoslezský
9	Ilava	Ilava	Trenčínský
10	Bohuňovice	Olomouc	Olomoucký
11	Velké Losiny	Šumperk	Olomoucký
12	Josefov	Náchod	Královéhradecký
13	Poličná	Vsetín	Zlínský
14	Vrchlabí	Trutnov	Královéhradecký
15	Panský	Děčín	Ústecký
16	Hranice na Moravě	Přerov	Olomoucký
17	Zubří	Vsetín	Zlínský



Obrázek 4: Přibližné geografické umístění lokalit odběru vzorků v rámci České a Slovenské republiky s čísly odpovídajícími vzorkům na nich odebraným (obrázek upraven podle NordNordWest, licence: <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/de/legalcode>).

4.2 Použité chemikálie

- Akrylamid (Sigma)
- *aTaq* DNA polymeráza ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$), M1241 (Promega)
- Bromfenolová modř (Serva)
- Deoxyribonukleosid trifosfáty (dNTPs) ($100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, $400 \mu\text{l}$ každého), U1240 (Promega)
- Deionizovaná voda
- Dusičnan stříbrný (Sigma)
- Etanol, 96% roztok (Lihovar Vrbátky)
- Etylendiaminotetraoctan sodný (Lachner)
- Fenol (Sigma)
- Formaldehyd (Lachner)
- Formamid (Lachner)

- Hydroxid sodný (Lachner)
- Chlorid draselný (Lachema)
- Chlorid sodný (Lachema)
- Chloroform (Lachner)
- Izopropanol (Lachner)
- Kyselina boritá (Lachema)
- Kyselina dusičná, 65% roztok (Lachner)
- Kyselina octová, 99% roztok (Lachner)
- Laurylsíran sodný (SDS) (Lachema)
- 3-metakryloxypropyltrimetoxysilan (Serva)
- Močovina (Lachner)
- N, N'-metylenbisakrylamid (Serva)
- N, N, N', N'-tetrametyletylendiamin (AppliChem)
- n-lauroylsarkosin (Sigma)
- Octan sodný (Lachema)
- Peroxodisíran amonný (Lachner)
- Proteináza K (10 mg·ml⁻¹) (Promega)
- Tekuté stěrače Rain Off (Sheron)
- Tiosíran sodný (Lachema)
- Trishydroxymethylaminometan (AppliChem)
- Triton X-100 (Amresco)
- Uhličitan sodný (Lachner)
- Xylenová modř (Xylencyanol FF) (AppliChem)

4.3 Použité roztoky a jejich příprava

Akrylamid, 6% zásobní roztok

- 420 g močoviny
- 484 ml deionizované vody
- 50 ml 50× TBE
- 150 ml 40% zásobního roztoku akrylamidu : N, N'-metylenbisakrylamidu v poměru 19 : 1
- Po rozpuštění všech složek zfiltrovat a uchovávat v temné lahvi ve 4 °C.

Dusičnan stříbrný, 0,1% roztok

- 0,8 g dusičnanu stříbrného
- 800 ml deionizované vody
- Roztok uchovávat v chladničce. Před použitím přidat k roztoku 1,2 ml formaldehydu.

Fix/stop roztok

- 80 ml ledové kyseliny octové
- 800 ml deionizované vody

Hydroxid sodný, roztok 1 mol·l⁻¹

- 40 g hydroxidu sodného
- 1 l deionizované vody

Kyselina dusičná, 1% roztok

- 12 ml 65% kyseliny dusičné
- 800 ml deionizované vody

MgCl₂, 25 mmol·l⁻¹ pro aTaq DNA polymerázu

- 90 ml deionizované vody
- 0,508 g MgCl₂·6H₂O
- Po rozpuštění doplnit na objem 100 ml.

Nanášecí pufr pro elektroforézu v polyakrylamidovém gelu

- 125 mg bromfenolové modři
- 125 mg xylenové modři
- 25 ml deionizované vody
- 100 ml formamidu
- Pufr uchovávat v ledničce.

Octan sodný, roztok 3 mol·l⁻¹

- 81,65 g octanu sodného
- Rozpusťit ve 200 ml deionizované vody.
- Hodnotu pH upravit pomocí ledové kyseliny octové na 5,2.

Peroxodisíran amonný, 10% roztok

- 1 g peroxodisíranu amonného
- 10 ml deionizované vody
- Roztok uchovávat v chladničce.

Queen's pufr

- 10 ml zásobního roztoku trishydroxymetylaminometanu ($1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, pH 8,0)
- 2 ml zásobního roztoku chloridu sodného ($5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)
- 2,92 g kyseliny etylendiaminotetraoctové
- 10 g n-lauroylsarkosinu
- Rozpustit v 900 ml deionizované vody.
- pH upravit na hodnotu 7,5.
- Deionizovanou vodou doplnit na objem 1000 ml.

Polyakrylamidový gel, 6% roztok

- 60 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu
- 400 μl 10% roztoku peroxodisíranu amonného
- 40 μl N, N, N', N'-tetrametyletylendiaminu

Reakční pufr pro PCR 10 \times

- 80 ml deionizované vody
- 1,211 g trishydroxymetylaminometanu
- pH upravit pomocí kyseliny chlorovodíkové na hodnotu 9.
- 3,73 g chloridu draselného
- 1 ml Triton X-100
- Po rozpuštění doplnit na objem 100 ml.

Roztok 3-metakryloxypropyltrimetoxysilanu

- 1 ml 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu
- 3 μl 3-metakryloxypropyltrimetoxysilanu

TBE, zásobní roztok 10 \times

- 108 g trishydroxymetylaminometanu
- 55 g kyseliny borité
- 40 ml roztoku etylendiaminotetraoctanu sodného ($0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, pH 0,8)
- Deionizovanou vodou doplnit na objem 1 l.

Vývojka

- 24 g uhličitanu sodného
- 800 ml deionizované vody
- Roztok vychladit v chladničce a těsně před použitím přidat 1200 μ l formaldehydu a 160 μ l 1% tiosíranu sodného.

4.4 Použité laboratorní přístroje

- Elektroforetický zdroj EV232 (Consort)
- Hybridizační pec OV3 (Biometra)
- Chladnička kombinovaná (Whirlpool)
- Chlazená centrifuga Centrifuge 5810 R (Eppendorf)
- Laboratorní váhy Mark S622 (BEL Engineering)
- Magnetická míchačka MR Hei-Combi (Heidolph)
- Mikropipeta Finnpipette 0,5–10 μ l - osmikanálová (Thermo Labsystems)
- Mikropipety Finnpipette 0,3–1 ml (Thermo Labsystems)
- Mikropipety Nichipet EX 0,5–1 ml (Nichiryo)
- Minicentrifuga Prism mini (Labnet International)
- Negatoskop NEGA 1 (Maneko)
- Sekvenační elektroforetická komora S2 (Whatman Biometra)
- Spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)
- Sušárna CAT 8050 (Contherm)
- Termoblok AccuBlockTM Digital Dry Bath (Labnet)
- Termocykler GenePro (BIOER Technology)
- Termocykler PTC 100-96 VHB (MJ Research)
- Termocykler XP Thermal Cyclor (BIOER Technology)
- Třepačka Orbit 1 900 (Labnet International)
- Ultracentrifuga Biofuge pico (Heraeus)
- Vortex mixer (Labnet International)
- Vortex MS2 (Ika)
- Výrobník deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)
- Výrobník ledu Ice Flanker (Brema Ice Makers)

4.5 Izolace genomické DNA kleštíka včelího

Pro izolaci genomické DNA kleštíka včelího byla zvolena fenol-chloroformové extrakce.

Postup fenol-chloroformové extrakce:

1. Do 1,5ml zkumavek dát po jednom kleštíkovi, zhomogenizovat mikrohomogenizátorem, přidat 200 μ l Queen's pufru a v roztoku znovu zhomogenizovat mikrohomogenizátorem.
2. K homogenátu přidat 40 μ l 10% SDS, 40 μ l proteinázy K (10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) a překlápěním obsah zkumavek promíchat.
3. Inkubovat v termostatu vyhřátém na 40 °C a třepat do dalšího dne.
4. Do každé mikrozkuhavky přidat 200 μ l chloroformu a 200 μ l fenolu. Zkumavky zvortexovat a následně zcentrifugovat (2 min, 2000 g).
5. Vrchní fázi odebrat odstříženou špičkou do nových zkumavek tak, aby nedošlo k nasátí organické fáze.
6. K odebranému vzorku přidat 400 μ l chloroformu, zvortexovat a zcentrifugovat (2 min, 2000 g).
7. Vrchní fázi odebrat ustříženou špičkou do nových zkumavek tak, aby nedošlo k nasátí bílého zákalu proteinů z mezifáze.
8. Kroky 6 a 7 opakovat ještě jednou.
9. K odebranému vzorku přidat 100 μ l octanu sodného (3 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a 1 ml izopropanolu.
10. Stojánek se zkumavkami přikrýt víčkem a dobře promíchat překlápěním.
11. Vzorky uložit na 2 h do mrazničky (-20 °C).
12. Vzorky zcentrifugovat v chlazené centrifuze (1 h, 13000 g).
13. Izopropanol slít a zkumavky osušit.
14. Přidat 1 ml vychlazeného 70% etanolu a zcentrifugovat v chlazené centrifuze (10 min, 13000 g).
15. Etanol slít a zkumavky osušit.
16. Zkumavky s DNA osušit v termobloku (2 h, 55 °C).
17. K vysušené DNA přidat 80 μ l deionizované vody, 2 \times zvortexovat a rozpouštět v termobloku (2 h, 55 °C).
18. Spektrofotometricky stanovit koncentraci vyizolované DNA.
19. Roztok DNA skladovat při -20 °C.

4.6 PCR amplifikace DNA kleštíka včelího

Teploty *annealingu* byly pro jednotlivé páry primerů optimalizovány nejprve na genomické DNA 6 nepříbuzných jedinců kleštíka včelího. Teprve poté byla danými páry primerů amplifikována genomická DNA 17 jedinců pocházejících z lokalit uvedených v Tabulce 1. Každá PCR reakce obsahovala genomickou DNA kleštíka včelího z jedné lokality a PCR mix s jedním párem primerů.

1. Všechny složky PCR reakce rozmrazit při laboratorní teplotě, zvortexovat a zcentrifugovat.
2. Do označených PCR mikrozkušavek napipetovat osmikanálovou pipetou 1 μ l roztoku genomické DNA.
3. Podle Tabulky 2 připravit do 1,5ml zkumavek PCR mix a ten zvortexovat a zcentrifugovat.
4. Do PCR mikrozkušavek přidat 1 μ l roztoku DNA a 9 μ l PCR mixu.

Tabulka 2: Složení PCR mixu pro 6 a pro 17 vzorků. Do celkového objemu PCR mixu byly započítány i ztráty při pipetování.

Složka PCR mixu	Koncentrace zásobního roztoku	Objem - 6 vzorků [μ l]	Objem - 17 vzorků [μ l]
Deionizovaná voda	–	44,4	125,0
Reakční pufr	10x	6,7	18,8
Roztok $MgCl_2$	25 mmol/l	4,0	11,2
Roztok dNTPs	20 mmol/l	0,7	2,0
Primer F	10 mmol/l	3,3	9,2
Primer R	10 mmol/l	3,3	9,2
<i>aTaq</i> DNA polymeráza	5 U/ μ l	1,0	3,0

5. PCR mikrozkušavky důkladně uzavřít, vložit do termocykleru a nastavit teplotní a časový profil dle následujícího schématu:

- 1) 94 °C: 5 min
 - 2) 94 °C: 30 s
 - 55 °C*: 30 s
 - 72 °C: 30 s
- } 35 cyklů
- 3) 72 °C: 7 min

*Tato teplota *annealingu* byla zvolena pro první testování všech párů primerů. V průběhu testování byla teplota *annealingu* podle potřeby upravována.

4.7 Amplifikované mikrosatelitové lokusy kleštíka včelího

Variabilita mikrosatelitových lokusů kleštíka včelího byla testována pomocí PCR amplifikace genomické DNA se 33 páry primerů. Testované mikrosatelity jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3: Seznam testovaných mikrosatelitových lokusů kleštíka včelího.

Mikrosatelitový lokus	Literární zdroj
VD7200, VD7118, VD638, VD5291, VD4502, VD298	Duan <i>et al.</i> , 2020
vjL3B2, vj221, vj272, vj275, vj282, vj292, vj294, vj295, vj296	Evans, 2000
VD001, VD016, VD112, VD114, VD119, VD126, VD146, VD152, VD154, VD163, VD015	Solignac <i>et al.</i> , 2003
VD305, VD306, VD307	Broeckx <i>et al.</i> , 2019
Vdes-01, Vdes-02, Vdes-03, Vdes-04	Beaurepaire <i>et al.</i> , 2017

4.8 Elektroforetická separace PCR produktů

Elektroforetická separace PCR produktů byla provedena za denaturujících podmínek v 6% polyakrylamidové gelu s tloušťkou 0,4 mm, který byl nalitý mezi dvě skla o rozměrech 330 × 390 mm a 330 × 420 mm. Separace probíhala ve vyhřívané sekvenační elektroforetické komoře. Produkty v gelu separované elektroforézou byly vizualizovány dusičnanem stříbrným.

1. Plochu velkého i malého skla 2× umýt deionizovanou vodou, osušit papírovou utěrkou, 2× umýt 96% ethanolem a opět osušit.
2. Na velké sklo nanést přípravek na odpuzování vody (RainOff), rozetřít proužkem papírové utěrky po celé ploše skla a nechat přibližně 5 minut zaschnout. Po zaschnutí plochu 2× umýt deionizovanou vodou a osušit.
3. Malé sklo přemístit do digestoře na polystyrenovou podložku, nanést roztok obsahující 1 ml 0,5% kyseliny octové rozpuštěné v 96% etanolu a 3 μl 3-metakryl-oxypropyl-trimetoxyasilanu a ten rozetřít po celé ploše skla pomocí proužku papírové utěrky. Po zaschnutí plochu umýt 4× etanolem a osušit.
4. Velké sklo přemístit do digestoře ošetřenou plochou nahoru, umístit na něj spacers, tak, aby byly zarovnané s horní kratší stranou a s delšími stranami skla. Na velké sklo umístit ošetřenou plochou dolů malé sklo a po obou stranách skla v oblasti spacerů sepnout dvěma malými klipsy.
5. V kádince připravit gel smícháním 60 ml zásobního roztoku 6% akrylamidu, 400 μl 10% roztoku peroxidisíranu amonného a 40 μl N, N, N', N'-tetrametyletyldiaminu. Vzniklý roztok promíchat a pomalu nalévat mezi skla. Vzniku bublin v gelu lze předejít poklepáváním na sklo.

6. Po vyplnění skel roztokem vsunout do místa nalévání hřebínek jeho rovnou stranou přibližně 0,5 cm hluboko a sepnout čtyřmi většími klipsy. Polymerizace gelu trvá přibližně 1 hodinu.
7. Po ztuhnutí gelu odstranit klipsy, sklo omýt obyčejnou vodou a kartáčkem odstranit zbytky polyakrylamidu, zvláště v oblasti hřebínku. Skla opláchnout deionizovanou vodou a pomocí stěrky malé sklo osušit. Skla přenést do elektroforetické sekvenční komory, umístit tak, aby se plocha malého skla dotýkala hliníkové plochy komory a upevnit čtyřmi šrouby.
8. Prostor záporné i kladné elektrody zalít $0,5 \times$ TBE pufrem.
9. Opatrně vyjmout hřebínek, ze vzniklého prostoru odstranit proudem pufru z injekční stříkačky zbytky gelu a bubliny. Hřebínek je třeba očistit od zbytků gelu.
10. Prostor záporné i kladné elektrody zavřít, vodiči připojit ke zdroji stejnosměrného napětí, nastavit hodnotu napětí na 3000 V, proudu na 150 mA, výkonu na 90 W a nechat gel 30 minut nahřívat.
11. Během nahřívání přidat ke vzorkům 5 μ l nanášecího pufru. Několik minut před koncem nahřívání vzorky vložit do termocykleru a 3 minuty denaturovat. Po uplynutí doby denaturace vzorky ihned vložit do ledové tříště, čímž se zamezí renaturaci vláken DNA.
12. Po 30 minutách nahřívání vypnout zdroj elektrického napětí, odpojit zápornou elektrodu, prostor pro nanášení vzorků znovu promýt proudem pufru a vsunou do něj zoubky hřebínku asi 1 mm hluboko.
13. Mezi zoubky hřebínku pomalu nanášet osmikanálovou pipetou po 2 μ l připravených vzorků.
14. Po nanesení všech vzorků prostor záporné elektrody zavřít a opět připojit ke zdroji stejnosměrného napětí. Elektroforetická separace probíhá při napětí 3000 V, proudu 150 mA a výkonu 70 W po dobu 1,5–4 hodiny.
15. Během elektroforetické separace připravit roztoky pro vyvolání gelu (fix/stop roztok, 1% roztok HNO_3 a vývojku).
16. Po skončení elektroforetické separace vypnout zdroj proudu, odpojit zápornou i kladnou elektrodu, povolit šroub pro odtok pufru z prostoru záporné elektrody a šrouby upevňující skla v komoře.
17. Gel přenést na vodorovnou podložku malým sklem nahoru, vytáhnout spacersy, hřebínek a skla od sebe opatrně odpáčit čepelí nože. Malé sklo opatrně přemístit do fotomisky tak, aby nedošlo k poškození gelu.
18. Fotomisku s gelem umístit na třepačku, zalít fix/stop roztokem a nechat 20 min třepat.

19. Po 20 minutách slít fix/stop roztok zpět do nádoby a sklo s gelem ve fotomisce 3× promýt deionizovanou vodou.
20. Fotomisku umístit zpět na třepačku, zalít 1% roztokem kyseliny dusičné a nechat třepat 4 min. Roztok kyseliny dusičné slít do odpadu a sklo s gelem ve fotomisce 4× promýt deionizovanou vodou. Během promývání přidat k 0,1% roztoku dusičnanu stříbrného 1200 µl formaldehydu.
21. Sklo s gelem přemístit do druhé fotomisky, položit na třepačku, zalít roztokem 0,1% dusičnanu stříbrného a nechat působit 30 min.
22. Těsně před uplynutím 30 minut napustit do třetí fotomisky deionizovanou vodu a přidat k vývojce 1200 µl formaldehydu a 160 µl 1% roztoku tiosíranu sodného.
23. Po 30 minutách slít roztok dusičnanu stříbrného zpět do lahve, sklo s gelem ponořit na 5 sekund do fotomisky s deionizovanou vodou a následně přemístit do čtvrté fotomisky. Fotomisku umístit na třepačku a zalít vývojkou.
24. V gelu pozorovat vyvíjející se hnědočerné proužky PCR produktů. Když jsou PCR produkty již dobře viditelné, a dříve, než začne na gelu vystupovat tmavé pozadí, vyvíjení zastavit fix/stop roztokem a nechat přibližně dvě minuty působit.
25. Sklo s gelem ponořit do deionizované vody, vyndat, nechat odkapat, popsat a umístit do sušárny.
26. Po vyhodnocení gelu jej naskenovat a sklo s již vyhodnoceným a naskenovaným gelem ponořit do 1M roztoku NaOH, čímž dojde k odlepení gelu ze skla. Umyté sklo je připraveno pro další použití.

4.9 Statistické vyhodnocení získaných dat

Po provedení elektroforéz byly u polymorfních mikrosatelitů odečteny všechny genotypy. Získaná data byla použita k populačněgenetické analýze pomocí programů Cervus 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007) a Genepop 4.7.5 (Rousset, 2008). Díky této analýze byly získány informace o pozorované heterozygotnosti (H_{Obs}), očekávané heterozygotnosti (H_{Exp}), vypovídací hodnotě (PIC), zda jsou polymorfní mikrosatelity v Hardy-Weinbergově rovnováze (HW), o frekvenci nulových alel (F_{Null}) a zda existuje mezi dvojicemi mikrosatelitů vazba.

5 Výsledky

Experimentální část této bakalářské práce probíhala v Laboratoři populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a spočívala v optimalizaci PCR amplifikace polymorfních mikrosatelitů u kleštíka včelího a následném hledání variability na DNA kleštíků pocházejících především z České republiky.

Nejprve jsem pomocí fenol-chloroformové extrakce izolovala genomickou DNA kleštíka. Koncentrace roztoku genomické DNA byla stanovena spektrofotometricky a byla v rozmezí $2,0\text{--}11,9\text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

Pak jsem prováděla optimalizaci PCR amplifikace mikrosatelitových lokusů za použití 33 párů primerů, pro něž byla výchozí teplota *annealingu* $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ a doba elektroforetické separace 90 minut. Dále jsem pro jednotlivé mikrosatelity optimalizovala podmínky PCR amplifikace a elektroforetické separace. V případě, že byly PCR produkty na gelu příliš tmavé a nezaostřené, byla teplota *annealingu* postupně zvyšována až na finální teplotu $67\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pokud po vyvolání nebyl v gelu viditelný PCR produkt, nebo byl velmi slabý, byla teplota *annealingu* snižována až na $46\text{ }^{\circ}\text{C}$, mikrosatelitový lokus vj296 ani při této teplotě neposkytl žádný produkt a z dalšího testování byl vyřazen. K PCR produktům vzniklým amplifikací s danými páry primerů jsem standardně přidávala dle návodu $5\text{ }\mu\text{l}$ nanášecího pufu, k 8 PCR produktům bylo potřeba přidat větší objem ($10\text{ }\mu\text{l}$), aby došlo k naředění příliš koncentrovaných produktů a bylo možné separované produkty lépe vyhodnotit. U některých lokusů byla také prodloužena doba elektroforetické separace z původních 90 až na 240 minut.

Třicet dva mikrosatelitových lokusů poskytujících PCR produkt jsem dále testovala na skupině kleštíků ze 17 různých lokalit. Na základě výsledků byly mikrosatelitové lokusy rozděleny do tří skupin. Dvacet pět lokusů poskytlo monomorfní produkt, a proto jsem je vyřadila. Mikrosatelitový lokus vj275 byl polymorfní, ale naprosto nehodnotitelný. Mikrosatelity VD307, VD4502, VD7118, Vdes-01, Vdes-03 a vj294 poskytovaly polymorfní hodnotitelný produkt. K mikrosatelitu VD307 bylo přidáno $5\text{ }\mu\text{l}$ nanášecího pufu a ke zbylým 5 bylo pro správné vyhodnocení potřeba přidat $10\text{ }\mu\text{l}$ nanášecího pufu. Výsledných 6 polymorfních hodnotitelných mikrosatelitů je s podmínkami PCR amplifikace a elektroforetické separace uvedeno v Tabulce 4.

Tabulka 4: Přehled hodnotitelných polymorfních mikrosatelitových lokusů pro kleštíka včelího s podmínkami PCR amplifikace a elektroforetické separace. V tabulce je uvedeno označení mikrosatelitu a jeho přístupové číslo (*Acc. No.*) z databáze GeneBank, literární zdroj, sekvence primerů, jednotka repeticity, objem nanášecího pufru (V_{NP}), doba elektroforetické separace (T_s) a teplota *annealingu* (T_a).

Mikrosatelitový lokus (GenBank <i>Acc. No.</i>)	Literární zdroj	Sekvence primerů (5' → 3')	Jednotka repeticity	V_{NP} [μl]	T_s [min]	T_a [°C]
VD307 (neuvedeno)	Broeckx <i>et al.</i> , 2019	F: CTAATACCACCAAATGCTTCCG R: CACAACAACAACAACAACG	neuvedeno	5	90	65
VD4502 (MT396443)	Duan <i>et al.</i> , 2020	F: TCTACCAGCGATCCAAGGC R: GGTGGTATTCTAGTTTCCATCCC	AG	10	240	67
VD7118 (MT396440)		F: GCGGTTGAAGAGACGGAAC R: TCATGTTAGCGAAATTAATGCACG	GT	10	150	66
Vdes-01 (neuvedeno)	Beaurepaire <i>et al.</i> , 2017	F: CGATTTCTGCTCCGTCAGTC R: TGTCCTACCAATCATCACCGTA	TTA/AT	10	180	66
Vdes-03 (neuvedeno)		F: ATATACAGCGCATCGCCTAAA R: CGAATAACGCGACAGTTTTGTA	AT	10	150	66
vj294 (AF229983)	Evans, 2000	F: GCTTCGTTCCGGTCTTTTGTC R: GCCTGACAGAATAGGCAAGC	AG	10	120	67

U všech 17 jedinců jsem provedla genotypizaci. Lokus vj294 byl tříalelový a poskytoval 4 genotypy. Lokusy VD307, VD4502, VD7118, Vdes-01 a Vdes-03 byly dvoualelové a poskytovaly 2–3 genotypy. Kompletní genotypy všech jedinců jsou uvedeny v Tabulce 5.

Získaná data byla použita pro populačněgenetickou analýzu pomocí programu Cervus 3.0.7. V průměru bylo u 6 polymorfních mikrosatelitů nalezeno 2,17 alely. Průměrná pozorovaná heterozygotnost (H_{Obs}) byla 0,127, tedy výrazně nižší než očekávaná heterozygotnost (H_{Exp}), která byla 0,461. Průměrná vypovídací hodnota 6 polymorfních mikrosatelitů (PIC) činila 35,1 %. U mikrosatelitů VD307, VD4502 a vj294 byla studovaná populace v Hardy-Weinbergově rovnováze, u VD7118 se populace odchylovala na hladině významnosti 1 %, u Vdes-01 na hladině významnosti 0,1 % a u mikrosatelitu Vdes-03 algoritmus odchylku nedokázal vyhodnotit. Všechny lokusy vykazovaly vysokou pravděpodobnost výskytu nulových alel (F_{Null}) s průměrnou hodnotou 0,597. Dílčí výsledky genotypové analýzy z programu Cervus jsou uvedeny v Tabulce 6, rozšířený výstup je uveden v Příloze 1.

Dále byla provedena analýza populačněgenetickým programem Genepop 4.7.5. Existence vazby mezi dvěma lokusy je hodnocena na základě tzv. P-value. Pro dvojici lokusů ve vazbě je tato hodnota menší než 0,0002. Ze získaných výsledků vyplývá, že mezi žádnou dvojicí šesti polymorfních mikrosatelitů vazba není (Příloha 2).

Tabulka 5: Přehled genotypů 6 polymorfních mikrosatelitů u 17 jedinců kleštika včelího. V tabulce je uveden název mikrosatelitu a genotypy pro každého jedince.

Mikrosatelit	Číslo vzorku																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
VD307	1/1	2/2	2/2	2/2	1/2	1/2	1/1	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	1/2	2/2	2/2	1/1	1/1
VD4502	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	1/2	1/1	1/1	1/2	1/1	2/2	2/2	2/2	1/1	2/2	1/1	2/2
VD7118	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	2/2	2/2	1/1	2/2	2/2	1/1	2/2
Vdes-01	2/2	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	2/2	1/2	2/2
Vdes-03	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/2	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1
vj294	3/3	2/2	1/1	2/3	3/3	2/3	3/3	2/2	3/3	2/3	2/2	3/3	2/3	3/3	3/3	2/3	3/3

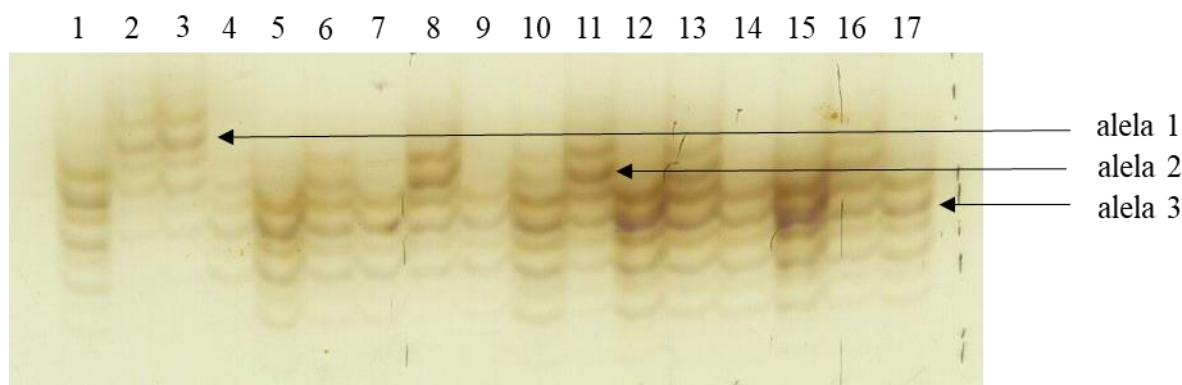
Tabulka 6: Genetická charakteristika variabilních mikrosatelitů. V tabulce je uveden název mikrosatelitového lokusu, počet alel (N_a), počet genotypů (N_g), pozorovaná heterozygotnost (H_{Obs}), očekávaná heterozygotnost (H_{Exp}), vypovídací hodnota polymorfního mikrosatelitu (PIC), odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy (HW) a odhadovaná frekvence nulových alel (F_{Null}).

Mikrosatelit	N_a	N_g	H_{Obs}	H_{Exp}	PIC	HW	F_{Null}
VD307	2	3	0,176	0,508	0,372	NS	0,4729
VD4502	2	3	0,176	0,487	0,361	NS	0,4560
VD7118	2	2	0,000	0,471	0,352	***	0,9988
Vdes-01	2	3	0,059	0,515	0,375	**	0,7894
Vdes-03	2	3	0,059	0,258	0,219	ND	0,6126
vj294	3	4	0,294	0,526	0,427	NS	0,2535
Průměrná/kombinovaná hodnota	2,167	3	0,127	0,461	0,351	–	0,597

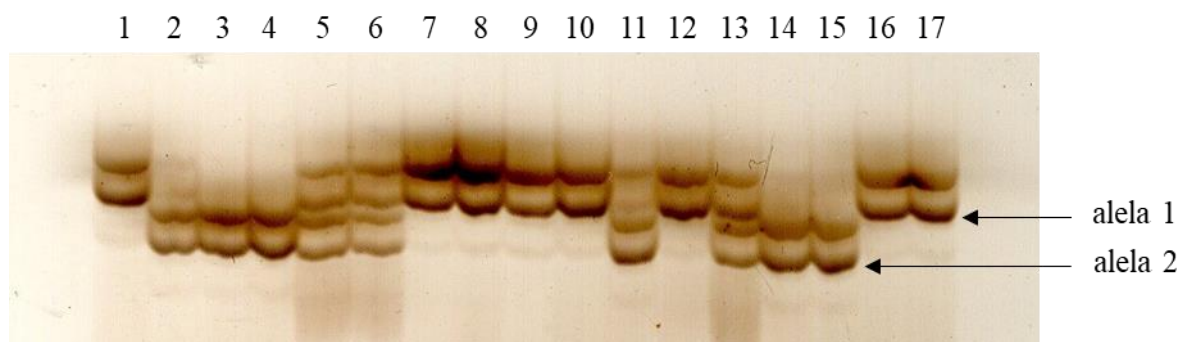
Legenda:

- NS lokus je v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou
- ND lokus nelze vyhodnotit, zda je v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou
- ** odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy na hladině významnosti 1 %
- *** odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy na hladině významnosti 0,1 %

Důležitým předpokladem pro správné vyhodnocení mikrosatelitových lokusů je správná optimalizace podmínek PCR amplifikace a elektroforetické separace. I po optimalizaci se však může stát, že se v gelu kromě požadovaných produktů objevují i nespecifické produkty, které hodnocení ztěžují. V případě lokusů vj221 a VD305 nebylo zcela zřetelné, zda se jedná o mikrosatelitový polymorfismus nebo pouze o vedlejší produkty. Některé lokusy, jako třeba lokus vj294, byly hůře hodnotitelné kvůli dalším produktům (Obrázek 5). Jako příklad dobře hodnotitelného lokusu uvádím VD307 (Obrázek 6).



Obrázek 6: Elektroforetický separované PCR produkty mikrosatelitového lokusu vj294 testovaného na 17 jedincích kleštíka včelího. Teplota *annealingu* 67 °C, 10 µl nanášecího pufru, čas elektroforetické separace 120 min. Čísla 1–17 označují jednotlivé jedince a šipky alely daného lokusu.



Obrázek 5: Elektroforetický separované PCR produkty mikrosatelitového lokusu VD307 testovaného na 17 jedincích kleštíka včelího. Teplota *annealingu* 65 °C, čas elektroforetické separace 90 min. Čísla 1–17 označují jednotlivé jedince a šipky alely daného lokusu.

6 Diskuze

V experimentální části této bakalářské práce jsem optimalizovala PCR amplifikaci polymorfních mikrosatelitových lokusů kleštíka včelího a následně jsem zjišťovala, zda jsou některé z nich polymorfní v rámci DNA kleštíků pocházejících převážně z České republiky.

Optimalizaci PCR amplifikace jsem prováděla na DNA 6 nepříbuzných jedinců kleštíka. Celkem jsem měla k dispozici 33 párů primerů. Mikrosatelitový lokus vj296 neposkytl žádný produkt ani při snížení teploty *annealingu* na 46 °C, proto byl z dalšího testování vyřazen. Evans (2000) mikrosatelit vj296 testoval při teplotě *annealingu* 64 °C. Šedesát jedna jedinců z USA poskytlo 6 alel, 15 jedinců z Ruska 2 alely a jižní Afriky byl lokus monomorfní.

Zbylých 32 párů primerů jsem následně otestovala s DNA kleštíků ze 17 lokalit. Většina mikrosatelitů byla monomorfních (25). Některé z nich, jako například vjL3B2, jsou monomorfní i v dalších publikacích, kdy se na kleštících z *A. mellifera* i *A. cerana* v Číně vyskytovala pouze alela o velikosti 189 bp (Lin, 2021). Zároveň byl monomorfní i v jižní Africe, Rusku a pouze ve vzorku z USA vykazoval 2 alely s velikostmi 189 a 191 bp (Evans, 2000). Lokus vj275 byl polymorfní, ale naprosto nehodnotitelný, což není překvapivé, protože Solignac *et al.* (2005) též uvádějí, že tento lokus nebylo možné vůbec genotypovat kvůli vznikajícím vedlejším produktům. Evans (2000) byl schopný pouze vyhodnotit počet alel nikoliv určit genotypy jedinců. Ve vzorcích z USA určil 11 alel, u vzorků z Ruska 6 alel a u vzorků z jižní Afriky 4 alely. Velikosti alel byly v rozmezí 203–217 bp. V mém případě byl výsledný produkt tak problematicky hodnotitelný, že jsem si počet alel netroufla odhadnout. Mikrosatelity VD307, VD4502, VD7118, Vdes-01, Vdes-03 a vj294 poskytovaly polymorfní hodnotitelný produkt.

Porovnání vlastních výsledků s výsledky z jiných publikací mohlo být pouze částečné, a to z hlediska polymorfismu a počtu alel na mikrosatelitovém lokusu. V některých případech nebylo možné srovnávat celkový počet nalezených alel, jejich velikosti a podmínky PCR amplifikace, jelikož autoři neuvádějí teplotu *annealingu*.

Mikrosatelit VD307

Mikrosatelit VD307 v mých výsledcích i v dalších srovnávaných publikacích obsahuje shodně pouze 2 alely. Já jsem tento mikrosatelit testovala při teplotě *annealingu* 65 °C. Beaurepaire *et al.* (2019b) testovali 432 kleštíků z ostrova Gotland (Švédsko) a ze včelnice Univerzity v Uppsale (Švédsko), teplotu *annealingu* autoři neuvádí. Dietemann *et al.* (2019) jej testovali na jedincích kleštíků pocházejících ze včelstev *A. mellifera* v Thajsku (Čiang Mai

a Bang Saen). V obou lokalitách lokus u *V. destructor* poskytoval po 2 alelách. Autoři celkem uvádějí 3 alely o velikostech 163, 165 a vzácně 175 bp. Tento lokus je polymorfní i u *Varroa jacobsoni*, kde bylo odhaleno 7 alel, 2 z nich (165 a 175 bp) se překrývají s alelami *V. destructor*. Conlon *et al.* (2020) analyzovali DNA kleštíků z Francie (Villemur-sur-Tarn, Haute-Garonne). Moro *et al.* (2021) testovali DNA 1 310 kleštíků z různých lokalit ve Francii, Nizozemsku, Norsku a Švédsku při teplotě *annealingu* 60 °C.

Mikrosatelit VD4502

Mikrosatelitový lokus VD4502 jsem analyzovala při teplotě 67 °C a poskytoval 2 alely. Duan *et al.* (2020) ve vzorcích z Číny (Fuzhou, Zhangzhou, Putian, Quanzhou a Longyan v provincii Fujian) při teplotě 59 °C detekovali 4 alely s velikostmi v rozmezí 260–290 bp.

Mikrosatelit VD7118

Lokus VD7118 jsem testovala při teplotě *annealingu* 66 °C a získala jsem polymorfní produkt se 2 alelami. Duan *et al.* (2020) při teplotě 59 °C detekovali v DNA kleštíků z Číny (Fuzhou, Zhangzhou, Putian, Quanzhou a Longyan v provincii Fujian) 9 alel s velikostmi v rozmezí 206–230 bp.

Mikrosatelit Vdes-01

U mikrosatelitu Vdes-01 jsem při teplotě 66 °C našla 2 alely. Beaurepaire *et al.* (2017) odebrali ze dvou včelstev v Německu (Halle nad Sálou) celkem 147 jedinců. Při teplotě *annealingu* 60 °C detekovali taktéž 2 alely. Beaurepaire *et al.* (2019a) testovali DNA 786 jedinců z pěti včelstev z USA (Gainesville, Florida) a detekovali produkt se 3 alelami. Beaurepaire *et al.* (2019b) u 432 kleštíků z ostrova Gotland (Švédsko) a včelnice Univerzity v Uppsale (Švédsko) detekovali shodně jako já 2 alely. Dietemann *et al.* (2019) testovali 53 jedinců kleštíka včelího ze včelstev *A. mellifera* v Thajsku (Čiang Mai a Bang Saen). Na obou lokalitách lokus u *V. destructor* poskytoval po 2 alelách. Celkem však našli 3 alely s velikostmi 400, vzácně 402 a 406 bp. Dvě alely pozorovali i u *V. jacobsoni*, ty se překrývají s alelami 400 a 402 bp u *V. destructor*. Moro *et al.* (2021) u 1310 jedinců z Francie, Nizozemska, Norska a Švédska při teplotě 60 °C detekovali dokonce 4 alely.

Mikrosatelit Vdes-03

U lokusu Vdes-03 jsem shodně s uvedenými autory našla 2 alely. Teplotu *annealingu* jsem použila 66 °C. Beaurepaire *et al.* (2017) testovali lokus při teplotě 60 °C u 147 jedinců

odebraných v Německu. Moro *et al.* (2021) lokus analyzovali také při teplotě 60 °C u 1310 jedinců z Francie, Nizozemska, Norska a Švédska.

Mikrosatelit vj294

U mikrosatelitu vj294 jsem při teplotě 67 °C našla 3 alely. Jedná se tedy o nejpolymorfnější lokus. Evans (2000) jej testoval při teplotě 58 °C. U 61 jedinců z USA a u 21 jedinců z jižní Afriky (Západní Kapsko, Curtis a provincie Kwazulu Natal) lokus poskytoval 2 alely o velikosti 169 a 174 bp, v Rusku byl monomorfní. Dietemann *et al.* (2019) detekovali u *V. destructor* ze včelstev *A. mellifera* z lokality v Thajčiang Mai produkt se 2 alelami o velikostech 174 a vzácně 178 bp, v lokalitě Bang Saen byl lokus monomorfní. Tento mikrosatelit je opět polymorfní i u *V. jacobsoni*, kde bylo nalezeno celkem 12 alel s velikostmi v rozmezí 150–192 bp, mezi nimiž byly i alely 174 a 178 bp vyskytující se u *V. destructor*. Conlon *et al.* (2020) zaznamenali v DNA kleštíků z Francie (Villemer-sur-Tarn, Haute-Garonne) 2 alely, velikost produktů ani teplota není uvedena. Větší variabilitu získali autoři Moro *et al.* (2021) u 1310 jedinců z Francie, Nizozemska, Norska a Švédska při teplotě 58 °C. Nálezem byly 4 alely. Otázkou však je, zda kleštíci pocházeli ze včelstev včely tmavé, která se v těchto oblastech přirozeně vyskytuje. Poslední roky se v této oblasti začíná prosazovat včela buckfastská, hybridní včela vyšlechtěná ve Velké Británii s geny několika evropských a afrických poddruhů, což by mohlo přispívat k této větší variabilitě (Nielsdatter *et al.*, 2021). Lin *et al.* (2021) testovali kleštíky pocházející ze včelstev *A. mellifera* z 11 lokalit v Číně a při teplotě 58 °C našli 2 alely s velikostmi 172 a 174 bp.

Ukázalo se, že polymorfní mikrosatelity využívané ve světě nemají pro studium geneticky omezené populace, která je ve střední Evropě, velký význam (Beaurepaire *et al.*, 2017; Conlon *et al.*, 2020; Moro *et al.*, 2021). Tomu odpovídají i mnou získané výsledky v České republice. Nízká genetická variabilita je zřejmě způsobena efektem zakladatele v rámci původního příchodu kleštíka včelího z Asie přes Rusko. Kvůli obchodům v Evropě a nákupu včel do Evropy je pravděpodobné, že efekt zakladatele nastal na evropském kontinentu několikrát až mnohokrát. Ne všechny dovozy jsou v rámci státu monitorovány a určitě se část těchto dovozů děje nelegálně bez vědomí příslušných státních veterinárních autorit. Dále na kleštíka včelího působí výrazné populační ztráty spojené se selekčním tlakem vlivem léčení. Dalším důvodem nízké variability je haplodiploidní způsob života a příbuzenské křížení (Relichová, 2009; Beaurepaire *et al.*, 2017; Dynes *et al.*, 2017). U všech mikrosatelitů byla pozorovaná heterozygotnost výrazně nižší než očekávaná, to je zapříčiněno výše uvedenými vlivy.

Naopak ke vzniku genetické variability kleštíků přispívá několik prvků. Prvním je genetická výměna mezi roztoči v rámci včelstva, ke které dochází většinou koncem léta, kdy včelí matka omezí počet snášených vajíček, a tedy je šance, že se dvě a více samic (matek) kleštíka potká v jedné plástové buňce a dojde k vzájemnému zkřížení jejich potomků (Beaurepaire *et al.*, 2017). Dalším prvkem je horizontální přenos roztočů mezi včelstvy. K tomu dochází zalétáváním mezi úly a vylupováním včelstev, kdy si loupící včely odnesou nejen zásoby loupeneho včelstva, ale také foretické kleštíky (Peck *et al.*, 2019). Svou roli v tomto procesu má i činnost člověka. K výměně roztočů může dojít při přesunu rámků se zavíčkovaným plodem nebo dospělých včel do jiných včelstev s úmyslem jejich posílení (Dynes *et al.* 2017). Dále k tomu vedou regionální přesuny včelstev a nákupy včelstev, kdy jsou včelstva a oddělky v ČR převáženy i stovky kilometrů.

Ačkoliv se jedná o 6 odlišných polymorfních lokusů, všechny mají vysokou pravděpodobnost frekvence nulových alel, to by mohl být problém v případě determinace přímého příbuzenství, avšak taková práce není vzhledem k bezprostřednímu úhynu samce po otevření plástové buňky pravděpodobná a v žádné literatuře jsem zmínku o výzkumu takového typu nenašla.

7 Závěr

V rámci této bakalářské práce jsem se věnovala mikrosatelitům známým u kleštíka včelího a jejich variabilitě s cílem využití těchto lokusů při studiu genetické rozmanitosti kleštíka včelího v České republice.

V teoretické části jsem se popsala zařazení kleštíka včelího do systému, historii jeho rozšíření, jeho morfologii a životní cyklus. Dále jsem se věnovala patologickému působení kleštíka na včelu medonosnou, metodám monitoringu a léčby. V poslední části jsem se zaměřila na genetickou charakteristiku kleštíka včelího a její studium s využitím mikrosatelitových markerů.

V praktické části jsem provedla optimalizaci PCR 33 párů primerů a genotypizaci polymorfních mikrosatelitů na 17 jedincích, 16 pocházelo z různých lokalit v ČR, jeden dokonce ze SR. Moje experimenty odhalily, že mikrosatelit vj296 neposkytuje žádný produkt ani při teplotě *annealingu* 46 °C. Dalších 32 mikrosatelitů jsem na základě výsledků PCR amplifikace rozdělila do tří skupin. Nejvíce mikrosatelitů bylo monomorfních (25), vj275 byl polymorfní, ale naprosto nehodnotitelný a zbylých 6 bylo polymorfních hodnotitelných. Až na jednu výjimku tříalelového lokusu, byly všechny dvoualelové. Mikrosatelity jsem charakterizovala pomocí populačněgenetických programů Cervus a Genepop a zjistila jsem, že mezi žádnou dvojicí není vazba. Dále jsem zjistila, že mikrosatelity VD307, VD4502 a vj294 jsou v Hardy-Weinbergově rovnováze, VD7118 odchyluje na hladině významnosti 1 %, Vdes-01 na hladině významnosti 0,1 % a soulad mikrosatelitu Vdes-03 s Hardy-Weinbergovou rovnováhou nelze určit.

Získané výsledky jsou prvním pokusem o popis genetické variability kleštíka včelího v České republice a prvním otestováním variability mikrosatelitů, které jsou vhodné a levné markery pro tento účel. Získané výsledky by mohly být užitečné pro další pochopení biologie tohoto parazita a užitečné při zdokonalování a vývoji nových metod boje proti němu.

8 Použitá literatura

- Akyol E., Yeninar H. (2009): Use of oxalic acid to control *Varroa destructor* in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 33: 285–288.
- Alquisira-Ramírez E., Paredes-Gonzalez J., Hernández-Velázquez V., Ramírez-Trujillo J., Peña-Chora G. (2014): *In vitro* susceptibility of *Varroa destructor* and *Apis mellifera* to native strains of *Bacillus thuringiensis*. Apidologie 45: 707–718.
- Alquisira-Ramírez E. V., Peña-Chora G., Hernández-Velázquez V. M., Alvear-García A., Arenas-Sosa I., Suarez-Rodríguez R. (2017): Effects of *Bacillus thuringiensis* strains virulent to *Varroa destructor* on larvae and adults of *Apis mellifera*. Ecotoxicology and Environmental Safety 142: 69–78.
- Anderson D. L., Trueman J. W. H. (2000): *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. Experimental and Applied Acarology 24: 165–189.
- Anonymous: Varroáza včel. Státní veterinární správa. Dostupné z: <https://www.svscr.cz/varroaza-vcel/>, navštíveno 29. 4. 2024.
- Atkinson P. W., Binnington K. C., Roulston W. J. (1974): High Monoamine Oxidase Activity in the Tick *Boophilus microplus*, and Inhibition by Chlordimeform and Related Pesticides. Australian Journal of Entomology 13: 207–210.
- Beaurepaire A. L., Krieger K. J., Moritz R. F. A. (2017): Seasonal cycle of inbreeding and recombination of the parasitic mite *Varroa destructor* in honeybee colonies and its implications for the selection of acaricide resistance. Infection, Genetics and Evolution 50: 49–54.
- Beaurepaire A. L., Ellis J. D., Krieger K. J., Moritz R. F. A. (2019a): Association of *Varroa destructor* females in multiply infested cells of the honeybee *Apis mellifera*. Insect Science 26: 128–134.
- Beaurepaire A. L., Moro A., Mondet F., Le Conte Y., Neumann P., Locke B. (2019b): Population genetics of ectoparasitic mites suggest arms race with honeybee hosts. Scientific Reports 9: 11355.
- Bogdanov S. (2006): Contaminants of bee products. Apidologie 37: 1–18.

- Boot, W. J., Calis, J. N. M., Beetsma, J. (1992): Differential periods of *Varroa* mite invasion into worker and drone cells of honey bees. *Experimental and Applied Acarology* 16: 295–301.
- Bowen-Walker P. L., Martin S. J., Gunn A. (1999): The Transmission of Deformed Wing Virus between Honeybees (*Apis mellifera* L.) by the Ectoparasitic Mite *Varroa jacobsoni* Oud. *Journal of Invertebrate Pathology* 73: 101–106.
- Broeckx B. J. G., De Smet L., Blacquière T., Maebe K., Khalenkow M., Van Poucke M., Dahle B., Neumann P., Bach Nguyen K., Smaghe G., Deforce D., Van Nieuwerburgh F., Peelman L., De Graaf D. C. (2019): Honey bee predisposition of resistance to ubiquitous mite infestations. *Scientific Reports* 9: 7794.
- Čermák K., Gruna B., Hajdušková J., Holub P., Klíma Z., Kovařík I., Navrátil S., Rytina L., Texl P., Texl F., Tůma Z. (2016): Včelařství, Svazek I., Zootechnika včelařství. Nemoci včel-prevence a terapie. Pracovní společnost nástavkových včelařů CZ, z.s., České Budějovice.
- Chen Y., Pettis J. S., Evans J. D., Kramer M., Feldlaufer M. F. (2004): Transmission of Kashmir bee virus by the ectoparasitic mite *Varroa destructor*. *Apidologie* 35: 441–448.
- Chen Y. P., Higgins J. A., Feldlaufer M. F. (2005): Quantitative Real-Time Reverse Transcription-PCR Analysis of Deformed Wing Virus Infection in the Honeybee (*Apis mellifera* L.). *Applied and Environmental Microbiology* 71: 436–441.
- Coon L. B., Rothschild M. (2004): Mites (8; Acari(9);. *Encyclopedia of Entomology*, 1425–1450, Springer, Dordrecht.
- Conlon B. H., Kastally C., Kardell M., Kefuss J., Moritz R. F. A., Routtu J. (2020): Selection for outbreeding in *Varroa* parasitising resistant honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Ecology and Evolution* 10: 7806–7811.
- Cornman R. S., Schatz M. C., Johnston J. S., Chen Y-P, Pettis J., Hunt G., Bourgeois L., Elsik C., Anderson D., Grozinger C. M., Evans J. D. (2010): Genomic survey of the ectoparasitic mite *Varroa destructor*, a major pest of the honey bee *Apis mellifera*. *BMC Genomics* 11: 602.
- Danihlík J. (2021): Prevence ztráty včelstev-monitoring úrovně varoózy. *Moderní včelař* 7: 18–20.

- De Jong D., Morse R., Eickwort G. (1982): Mite Pests of Honey Bees. *Annual Review of Entomology* 27: 229–252.
- de Miranda J. R., Genersch E. (2010): Deformed wing virus. *Journal of Invertebrate Pathology* 103: S48–S61.
- de Ruijter A., Kaas J. P. (1983): The anatomy of the *Varroa* mite. Cavallaro R. (Ed.), *Varroa jacobsoni* Oud. affecting honey bees: present status and needs, EC Experts' Group, Balkema Press, Rotterdam: 45–47.
- Di Prisco G., Pennacchio F., Caprio E., Boncristiani H. F., Evans J. D., Chen Y. (2011): *Varroa destructor* is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of General Virology* 92: 151–155.
- Dietemann V., Beaufrepaire A., Page P., Yañez O., Buawangpong N., Chantawannakul P., Neumann P. (2019): Population genetics of ectoparasitic mites *Varroa* spp. in Eastern and Western honey bees. *Parasitology* 146: 1429–1439.
- Donzé G., Guerin P. M. (1994): Behavioral attributes and parental care of *Varroa* mites parasitizing honeybee brood. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 34: 305–319.
- Droz B., Glanzmann J., Dietemann V., Charrière J-D (2017): Evaluation de l'infestation par varroa des colonies: Comparaison entre les méthodes au sucre glace et au CO₂ (Varroatester). *Revue Suisse d'apiculture* 1–2: 24–30.
- Duan X., Zhao B., Liu Y., Xiong M., He N., Huang S., Huang W., Li J. (2020): Development and characterization of six novel microsatellite markers for honey bee parasitic mite *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae). *Systematic and Applied Acarology* 25: 1733–1744.
- Duay P., De Jong D., Engels W. (2002): Decreased flight performance and sperm production in drones of the honey bee (*Apis mellifera*) slightly infested by *Varroa destructor* mites during pupal development. *Genetics and Molecular Research* 1: 227–232.
- Duay P., de Jong D., Engels W. (2003): Weight loss in drone pupae (*Apis mellifera*) multiply infested by *Varroa destructor* mites. *Apidologie* 34: 61–65.
- Dynes T. L., De Roode J. C., Lyons J. I., Berry J. A., Delaplane K. S., Brosi B. J. (2017): Fine scale population genetic structure of *Varroa destructor*, an ectoparasitic mite of the honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie* 48: 93–101.

- Evans J. D. (2000): Microsatellite loci in the honey bee parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Molecular Ecology* 9: 1436–1438.
- Evans J. D., Lopez D. L. (2002): Complete Mitochondrial DNA Sequence of the Important Honey Bee Pest, *Varroa Destructor* (Acari: Varroidae). *Experimental and Applied Acarology* 27: 69–78.
- Fakhimzadeh K. (2001): The effects of powdered sugar varroa control treatments on *Apis mellifera* colony development. *Journal of Apicultural Research* 40: 105–109.
- Fries I. (1991): Treatment of sealed honey bee brood with formic acid for control of *Varroa jacobsoni*. *American Bee Journal* 131: 313–314.
- Fuchs S. (1990): Preference for drone brood cells by *Varroa jacobsoni* Oud in colonies of *Apis mellifera carnica*. *Apidologie* 21: 193–199.
- Fuchs S. (1992): Choice in *Varroa jacobsoni* Oud. between Honey Bee Drone or Workerbrood Cells for Reproduction. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 31: 429–435.
- Gajic B., Radulovic Z., Stevanovic J., Kulisic Z., Vucicevic M., Simeunovic P., Stanimirovic Z. (2013): Variability of the honey bee mite *Varroa destructor* in Serbia, based on mtDNA analysis. *Experimental and Applied Acarology* 61: 97–105.
- Gajić B., Stevanović J., Radulović Ž., Kulišić Z., Vejnović B., Glavinić U., Stanimirović Z. (2016): Haplotype identification and detection of mitochondrial DNA heteroplasmy in *Varroa destructor* mites using ARMS and PCR–RFLP methods. *Experimental and Applied Acarology* 70: 287–297.
- Gardi T., Micheli M., Petrarchini M. (2020): *Ailanthus Altissima* (Mill.) and *Varroa Destructor* (Anderson & Trueman) - Two Alien and Invasive Species with Impact on the Environment and on the “Hive System”. *World Journal of Agriculture and Soil Science* 4: 1–9.
- Gemayel R., Cho J., Boeynaems S., Verstrepen K. J. (2012): Beyond Junk-Variable Tandem Repeats as Facilitators of Rapid Evolution of Regulatory and Coding Sequences. *Genes* 3: 461–480.
- Genersch E. (2010): Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87: 87–97.

- Goras G., Tananaki C. H., Gounari S., Dimou M., Lazaridou E., Karazafiris E., Kanelis D., Liolios V., F. El Taj H., Thrasyvoulou A. (2018): Hyperthermia - a non-chemical control strategy against varroa. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* 66: 249–256.
- Gregorc A., Sampson B. (2019): Diagnosis of Varroa Mite (*Varroa destructor*) and Sustainable Control in Honey Bee (*Apis mellifera*) Colonies—A Review. *Diversity* 11: 243.
- Gregorc A., Knight P., Adamczyk J. (2017): Powdered sugar shake to monitor and oxalic acid treatments to control varroa mites (*Varroa destructor* Anderson and Trueman) in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Journal of Apicultural Research* 56: 71–75.
- Harada R., Yoshioka M., Okuyama H., Kato M., Martin S. J., Takahashi J. (2020): Complete mitochondrial DNA sequence of the parasitic honey bee mite *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae). *Mitochondrial DNA Part B* 5: 635–636.
- Hart R. J. (1986): Mode of Action of Agents Used against Arthropod Parasites. *Chemotherapy of Parasitic Diseases*: 585–601.
- Häußermann C. K., Ziegelmann B., Bergmann P., Rosenkranz P. (2015): Male mites (*Varroa destructor*) perceive the female sex pheromone with the sensory pit organ on the front leg tarsi. *Apidologie* 46: 771–778.
- Häußermann C. K., Giacobino A., Munz R., Ziegelmann B., Palacio M. A., Rosenkranz P. (2020): Reproductive parameters of female *Varroa destructor* and the impact of mating in worker brood of *Apis mellifera*. *Apidologie* 51: 342–355.
- Ifantidis M. D. (1983): Ontogenesis of the Mite *Varroa Jacobsoni* in Worker and Drone Honeybee Brood Cells. *Journal of Apicultural Research* 22: 200–206.
- Jack C. J., Ellis J. D. (2021): Integrated Pest Management Control of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae), the Most Damaging Pest of (*Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae)) Colonies. *Journal of Insect Science* 21: 1–32.
- Kablau, A., Berg, S., Härtel, S., Scheiner R. (2020): Hyperthermia treatment can kill immature and adult *Varroa destructor* mites without reducing drone fertility. *Apidologie* 51: 307–315.
- Kalinowski S. T., Taper M. L., Marshall T. C. (2007): Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16: 1099–1106.

- Kanbar G., Engels W. (2003): Ultrastructure and bacterial infection of wounds in honey bee (*Apis mellifera*) pupae punctured by *Varroa* mites. *Parasitology Research* 90: 349–354.
- Kanbar G., Engels W. (2004): Number and position of wounds on honey bee (*Apis mellifera*) pupae infested with a single *Varroa* mite. *European Journal of Entomology* 101: 323–326.
- Kanbar G., Engels W. (2005): Communal use of integumental wounds in honey bee (*Apis mellifera*) pupae multiply infested by the ectoparasitic mite *Varroa destructor*. *Genetics and Molecular Research* 4: 465–472.
- Kanga L. H. B., Jones W. A., James R. R. (2003): Field Trials Using the Fungal Pathogen, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Hyphomycetes) to Control the Ectoparasitic Mite, *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in Honey Bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) Colonies. *Journal of Economic Entomology* 96: 1091–1099.
- Kanga L. H. B., Marshall K., Legaspi J. (2016): Mechanisms of Insecticide Resistance in Field Populations of the Varroa Mite (Acari: Mesostigmata: Varroidae) in Florida. *Florida Entomologist* 99: 324–326.
- Kirrane M. J., de Guzman L. I., Rinderer T. E., Frake A. M., Wagnitz J., Whelan P. M. (2012): Age and reproductive status of adult *Varroa* mites affect grooming success of honey bees. *Experimental and Applied Acarology* 58: 423–430.
- Li A. Y., Cook S. C., Sonenshine D. E., Posada-Florez F., Noble N. I. I., Mowery J., Gulbranson C. J., Bauchan G. R. (2019): Insights into the feeding behaviors and biomechanics of *Varroa destructor* mites on honey bee pupae using electropenetrography and histology. *Journal of Insect Physiology* 119: 103950.
- Lin Z., Wang S., Neumann P., Chen G., Page P., Li L., Hu F., Zheng H., Dietemann V. (2021): Population genetics and host specificity of *Varroa destructor* mites infesting eastern and western honeybees. *Journal of Pest Science* 94: 1487–1504.
- Linhart R. (2018): Myslet jako včela: včelaření bez rojů a varroázy. Mladá fronta, Praha.
- Macedo P., Wu J., Ellis M. (2002): Using inert dusts to detect and assess Varroa infestation in honey bee colonies. *Journal of Apicultural Research* 40: 3–7.
- Martin S., Ball B., Carreck N. (2013): The Role of Deformed Wing Virus in the Initial Collapse of Varroa Infested Honey Bee Colonies in the UK. *Journal of Apicultural Research* 52: 251–258.

- Martin S. J. (2004): Acaricide (pyrethroid) resistance in *Varroa destructor*. *Bee World* 85: 67–69.
- Moro A., Blacquièrè T., Dahle B., Dietemann V., Le Conte Y., Locke B., Neumann P., Beaurepaire A. (2021): Adaptive population structure shifts in invasive parasitic mites, *Varroa destructor*. *Ecology and Evolution* 11: 5937–5949.
- Narahashi T. (2000): Neuroreceptors and Ion Channels as the Basis for Drug Action: Past, Present, and Future. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 294: 1–26.
- Navajas M., Conte Y. L., Solignac M., Cros-Arteil S., Cornuet J.-M. (2002): The Complete Sequence of the Mitochondrial Genome of the Honeybee Ectoparasite Mite *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata). *Molecular Biology and Evolution* 19: 2313–2317.
- Navajas M., Anderson D. L., de Guzman L. I., Huang Z. Y., Clement J., Zhou T, Le Conte Y. (2010): New Asian types of *Varroa destructor*: a potential new threat for world apiculture. *Apidologie* 41: 181–193.
- Nazzi F., Le Conte Y. (2016): Ecology of *Varroa destructor*, the Major Ectoparasite of the Western Honey Bee, *Apis mellifera*. *Annual Review of Entomology* 61: 417–432
- Nielsdatter M. G., Larsen M., Nielsen L. G., Nielsen M. M, Rasmussen C. (2021): History of the Displacement of the European Dark Bee (*Apis mellifera mellifera*) in Denmark. *Journal of Apicultural Research* 60: 13–18.
- Ostiguy N., Drummond F. A., Aronstein K., Eitzer B., Ellis J. D., Spivak M., Sheppard W. S. (2019): Honey Bee Exposure to Pesticides: A Four-Year Nationwide Study. *Insects* 10: 13.
- Oudemans A. C. (1904): On a new genus and species of Parasitic Acari. *Notes from the Leyden Museum* 24: 216–222.
- Peck D. T., Seeley T. D. (2019): Mite bombs or robber lures? The roles of drifting and robbing in *Varroa destructor* transmission from collapsing honey bee colonies to their neighbors. *PLoS ONE* 14: e0218392.
- Peck D. T. (2021): The Parasitic Mite *Varroa destructor*. In: *Honey Bee Medicine for the Veterinary Practitioner*. John Wiley & Sons, Ltd, 235–251.

- Pietropaoli M., Formato G. (2019): Acaricide efficacy and honey bee toxicity of three new formic acid-based products to control *Varroa destructor*. *Journal of Apicultural Research* 58: 824–830.
- Premrov Bajuk B., Babnik K., Snoj T., Milčinski L., Pislak Očepek M., Škof M., Jenčič V., Filazi A., Štajnbaher D., Kobal S. (2017): Coumaphos residues in honey, bee brood, and beeswax after *Varroa* treatment. *Apidologie* 48: 588–598.
- Ramsey S. D., Ochoa R., Bauchan G., Gulbranson C., Mowery J. D., Cohen A., Lim D., Joklik J., Cicero J. M., Ellis J. D., Hawthorne D., vanEngelsdorp D. (2019): *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116: 1792–1801.
- Rasolofoarivao H., Clémencet J., Speck A., Raveloson-Ravaomanarivo L. H., Reynaud B., Delatte H. (2017): Genetic diversity of *Varroa destructor* parasitizing *Apis mellifera unicolor* in Madagascar. *Apidologie* 48: 648–656.
- Rath W. (1999): Co-adaptation of *Apis cerana* Fabr. and *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* 30: 97–110.
- Relichová J. (2009): Genetika populací, 1. vydání. Masarykova univerzita, Brno.
- Richards E. H., Jones B., Bowman A. (2011): Salivary secretions from the honeybee mite, *Varroa destructor*: effects on insect haemocytes and preliminary biochemical characterization. *Parasitology* 138: 602–608.
- Rodríguez-Dehaibes S. R., Otero-Colina G., Sedas V. P., Jiménez J. A. V. (2005) Resistance to amitraz and flumethrin in *Varroa destructor* populations from Veracruz, Mexico. *Journal of Apicultural Research* 44: 124–125.
- Rosenkranz P., Garrido C. (2004): Volatiles of the honey bee larva initiate oogenesis in the parasitic mite *Varroa destructor*. *Chemoecology* 14: 193–197.
- Rosenkranz P., Aumeier P., Ziegelmann B. (2010): Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology* 103: S96–S119.
- Roth M. A., Wilson J. M., Tignor K. R., Gross A. D. (2020): Biology and Management of *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) Colonies. Messenger M (Ed.). *Journal of Integrated Pest Management* 11: 1–8.

- Rousset F. (2008): GENEPOP '007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8: 103–106.
- Salem M. H., Abir A. G., Ramadan H. (2006): Effect of *Varroa destructor* on different haemocyte count, total haemolymph protein on larvae, pupae and adults of *Apis mellifera* drones. *Journal of the Egyptian Society of Toxicology* 35: 93–96.
- Shaw K. E., Davidson G., Clark S. J., Ball B. V., Pell J. K., Chandler D., Sunderland K. D. (2002): Laboratory bioassays to assess the pathogenicity of mitosporic fungi to *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata), an ectoparasitic mite of the honeybee, *Apis mellifera*. *Biological Control* 24: 266–276.
- Shen M., Cui L., Ostiguy N., Cox-Foster D. (2005a): Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (Kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic varroa mite. *Journal of General Virology* 86: 2281–2289.
- Shen M., Yang X., Cox-Foster D., Cui L. (2005b): The role of varroa mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWV) in honey bees. *Virology* 342: 141–149.
- Solignac M., Vautrin D., Pizzo A., Navajas M., Le Conte Y., Cornuet J.-M. (2003): Characterization of microsatellite markers for the apicultural pest *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and its relatives. *Molecular Ecology Notes* 3: 556–559.
- Solignac M., Cornuet J.-M., Vautrin D., Le Conte Y., Anderson D., Evans J., Cros-Arteil S., Navajas M. (2005): The invasive Korea and Japan types of *Varroa destructor*, ectoparasitic mites of the Western honeybee (*Apis mellifera*), are two partly isolated clones. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 272: 411–419.
- Sparks T. C., Nauen R. (2015): IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 121: 122–128.
- Textl P., Přidal A. (2008): Princip monitoringu spadu kleštika včelího (*Varroa destructor*). *Moderní včelař* 1: 15–16.
- Thalpa R., Wongsiri S., Lee M. L., Choi Y.-S., Ahn Y.-J., Kwon H. W. (2015): SEM Observations of Korean Halo-type *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) Collected from *Apis mellifera* Colonies. *Journal of Apiculture* 30: 143–153.

- Theopold U., Li D., Fabbri M., Scherfer C., Schmidt O. (2002): The coagulation of insect hemolymph. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59: 363–372.
- Traynor K. S., Mondet F., de Miranda J. R., Techer M., Kowallik V., Oddie M. A. Y., Chantawannakul P., McAfee A. (2020): *Varroa destructor*: A Complex Parasite, Crippling Honey Bees Worldwide. *Trends in Parasitology* 36: 592–606.
- Tsagou V., Lianou A., Lazarakis D., Emmanouel N., Aggelis G. (2004): Newly isolated bacterial strains belonging to Bacillaceae (*Bacillus* sp.) and Micrococcaceae accelerate death of the honey bee mite, *Varroa destructor* (*V. jacobsoni*), in laboratory assays. *Biotechnology Letters* 26: 529–532.
- Tu S., Qiu X., Cao L., Han R., Zhang Y., Liu X. (2010): Expression and characterization of the chitinases from *Serratia marcescens* GEI strain for the control of *Varroa destructor*, a honey bee parasite. *Journal of Invertebrate Pathology* 104: 75–82.
- van der Steen J., Vejsnæs F. (2021): Varroa Control: A Brief Overview of Available Methods. *Bee World* 98: 50–56.
- 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 of the United States of America* 102: 7470–7475.
- Ziegelmann B., Tolasch T., Steidle J. L. M., Rosenkranz P. (2013): The mating behavior of *Varroa destructor* is triggered by a female sex pheromone. Part 2: Identification and dose-dependent effects of components of the *Varroa* sex pheromone. *Apidologie* 44: 481–490.

9 Přílohy

Příloha 1: Charakteristika polymorfních mikrosatelitů kleštika včelího, výstup programu Cervus.

Locus	k	N	H _{Obs}	H _{Exp}	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI	HW	F(Null)
VD307	2	17	0,176	0,508	0,372	0,878	0,814	0,721	0,379	0,598	NS	0,4729
VD4502	2	17	0,176	0,487	0,361	0,888	0,820	0,728	0,390	0,611	NS	0,4560
VD7118	2	17	0,000	0,471	0,352	0,896	0,824	0,733	0,399	0,621	***	0,9988
Vdes-01	2	17	0,059	0,515	0,375	0,875	0,813	0,719	0,375	0,594	**	0,7894
Vdes-03	2	17	0,059	0,258	0,219	0,969	0,890	0,816	0,593	0,773	ND	0,6126
vj294	3	17	0,294	0,526	0,427	0,870	0,760	0,634	0,323	0,576	NS	0,2535

Legenda:

k počet nalezených alel na lokus

N počet testovaných jedinců

H_{Obs} pozorovaná heterozygotnost

H_{Exp} očekávaná heterozygotnost

PIC vypovídací hodnota lokusu

NE-1P pravděpodobnost chybného přiřazení prvního z rodičů k mláděti v případě, že není znám ani jeden z rodičů

NE-2P pravděpodobnost chybného přiřazení druhého z rodičů k mláděti v případě, že je znám první z rodičů

NE-PP pravděpodobnost chybného přiřazení rodičovského páru k mláděti

NE-I pravděpodobnost výskytu stejné alelové konstituce všech polymorfních lokusů u dvou náhodně vybraných nepříbuzných jedinců

Příloha 1: Pokračování

NE-SI pravděpodobnost výskytu stejné alelové konstituce všech polymorfních lokusů u dvou příbuzných mládřat

HW soulad/odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy

NS lokus je v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou

ND lokus nelze vyhodnotit, zda je v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou

** odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy na hladině významnosti 1 %

*** odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy na hladině významnosti 0,1 %

F (null) frekvence výskytu nulových alel

Number of individuals:	17
Number of loci:	6
Mean number of alleles per locus:	2,167
Mean proportion of loci typed:	1,0000
Mean expected heterozygosity:	0,4608
Mean polymorphic information content (PIC):	0,3510
Combined non-exclusion probability (first parent):	0,51525848
Combined non-exclusion probability (second parent):	0,30229960
Combined non-exclusion probability (parent pair):	0,14279153
Combined non-exclusion probability (identity):	0,00423237
Combined non-exclusion probability (sib identity):	0,06000625

Příloha 2: Charakteristika polymorfních mikrosatelitů kleštíka včelího, výstup programu Genepop.

Number of populations detected : 1

Number of loci detected : 6

Markov chain parameters

Dememorisation : 10000

Batches : 10000

Iterations per batch : 10000

Locus#1	Locus#2	P-Value	S.E.	Switches
VD307	VD4502	0,0937795	0,000089	42231154
VD307	VD7118	0,132396	0,000076	52716240
VD4502	VD7118	0,197589	0,000096	52151220
VD307	Vdes-01	0,079611	0,000095	32421565
VD4502	Vdes-01	0,689012	0,000142	31363699
VD7118	Vdes-01	1,000000	0,000000	43432712
VD307	Vdes-03	1,000000	0,000000	24733288
VD4502	Vdes-03	0,717549	0,000134	23773990
VD7118	Vdes-03	0,514580	0,000090	37013246
Vdes-01	Vdes-03	0,082324	0,000086	17778006
VD307	vj294	0,601129	0,000179	30564625
VD4502	vj294	0,953068	0,000058	29688341
VD7118	vj294	0,127371	0,000097	42120164
Vdes-01	vj294	0,009668	0,000041	23118365
Vdes-03	vj294	0,140466	0,000156	15125879