

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2017**

**Kateřina Lahnerová**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Molekulární detekce bodových  
mutací v genu pro sodíkový kanál  
kleštíka včelího (*Varroa destructor*)**

**Bakalářská práce**

**Kateřina Lahnerová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2017**

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

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití uvedených literárních zdrojů pod vedením RNDr. Petra Nádvorníka, Ph.D.

V Olomouci dne 12. 5. 2017

Ráda bych poděkovala RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za cenné odborné rady, které mi poskytl během vypracování teoretické a experimentální části této bakalářské práce, a za čas a ochotu, se kterou se mi v průběhu vypracování věnoval.

## Souhrn

V této bakalářské práci jsem se zabývala kleštíkem včelím (*Varroa destructor*), významným parazitem včely medonosné (*Apis mellifera*). Konkrétně jsem se zaměřila na detekci bodových mutací v genu pro sodíkový kanál v souvislosti s rezistencí kleštíka k varroacidním přípravkům na bázi tau-fluvalinátu.

V teoretické části práce jsem se věnovala biologii včely medonosné, jejímu zařazení do systému a zmínila jsem některé aspekty chovu včel. Dále jsem se zaměřila na morfologii kleštíka včelího a na jeho zařazení do systému, rozmnožovací cyklus a zvýšení jeho nebezpečnosti ve spojitosti s virovými onemocněními včel, která přenáší. Následně jsem rozebírala diagnostiku varroózy – onemocnění způsobovaného kleštíkem, a také metody, kterými je možné proti tomuto roztoči aktivně bojovat. Nakonec jsem se zaměřila na charakterizaci genomu kleštíka a na výskyt bodových mutací v genu pro sodíkový kanál, které jsou spojovány se vznikem rezistence tohoto roztoče k varroacidním přípravkům určeným k jeho hubení.

V experimentální části práce jsem na základě známé sekvence genu pro sodíkový kanál kleštíka včelího navrhla diagnostické primery pro PCR detekci dvou bodových mutací. Navrhovala jsem je tak, aby svým 3'-koncem byly komplementární k nukleotidu v templátové DNA na pozici, kde se může vyskytnout bodová mutace. Jeden diagnostický primer byl navržen pro původní sekvenci, druhý pro sekvenci s mutovaným nukleotidem. Pouze v případě komplementarity nukleotidu na 3'-konci diagnostického primeru s jemu odpovídajícím nukleotidem v templátové DNA PCR amplifikace sekvence probíhá. Každý z diagnostických primerů má být schopen amplifikovat templátovou DNA v kombinaci s jedním z dvojice primerů, které byly použity k namnožení segmentu genu během sekvenační identifikace bodových mutací.

Cílem této práce bylo optimalizovat podmínky PCR amplifikační reakce tak, aby jí bylo možné stanovit přítomnost či absenci dvou bodových mutací v genu pro sodíkový kanál, vyskytujících se v souvislosti s rezistencí kleštíka včelího k tau-fluvalinátu, a to bez potřeby sekvenace části tohoto genu. Nově vytvořená metodika určování přítomnosti mutace měla být levnější, snadněji proveditelná, spolehlivá a rychlejší než sekvenace, čehož bylo zatím dosaženo pouze pro jednu nukleotidovou pozici (nukleotid na pozici 3004) s ne zcela spolehlivými výsledky. Proto bude vhodné na detekci bodových mutací PCR amplifikací dále pokračovat, například s nově navrženými primery.

## Summary

In this bachelor thesis I target on mite *Varroa destructor*, a significant ectoparasite of Honey Bee (*Apis mellifera*). I focused on detection of point mutations in sodium channel gene, which are associated with a resistance of *Varroa* mite to acaricide agents based on tau-fluvalinate.

In the theoretical part of the thesis I devote to biology of *Apis mellifera*, its taxonomic classification and some aspects of beekeeping. Then I focused on morphology of *Varroa destructor*, its taxonomic classification, reproduction cycle of this parasite and on its danger for bees which is growing with a transmission of viruses by this parasite. I analyzed diagnosis of varroosis – illness of bees which is caused by *Varroa* mite and also some methods of treatment. Finally I characterized genom of *Varroa destructor* and I discussed a presence of point mutations in sodium channel gene which are associated with resistance of this mite to acaricide agents.

In the experimental part I designed diagnostic primers for detection of two point mutations by PCR amplification. These primers were designed on a base of known sequence of *Varroa destructor* sodium channel gene. 3'-end of these primers is complementar to nucleotide in template DNA which is changing by one of point mutations. One primer was designed for wild sequence, next primer for mutant sequence. PCR amplification is proceeding when 3'-end of diagnostic primer is complementar with corresponding nucleotide in template DNA. Each of diagnostic primers is supposed to amplify template DNA in a pair with one of two primers, which were used in process of identification of this point mutations by sequencing.

The purpose of this thesis was to optimize conditions of PCR amplification reaction in order to be possible to determine presence or absence of two point mutations associated with resistance of *Varroa destructor* to tau-fluvalinate without sequencing of a part of this gene. This new methodology of detection of point mutations should be cheaper, easier to done, reliable and faster than sequencing. This was achieved just for one nucleotide position (nucleotide 3004) with not entirely reliable results. It is appropriate to continue on detection of point mutations by PCR amplification with new designed primers.

## Obsah

1	Úvod.....	7
2	Cíle práce .....	8
3	Literární přehled .....	9
3.1	Biologie včely medonosné a její zařazení do systému.....	9
3.1.1	Chov včely medonosné .....	11
3.2	Kleštík včelí .....	11
3.2.1	Morfologie kleštíka včelího .....	13
3.2.2	Vývojový cyklus a charakteristika rozmnožování kleštíka včelího.....	14
3.2.3	Virová onemocnění přenášená kleštíkem včelím .....	17
3.3	Diagnostika varroózy .....	21
3.4	Tlumení varroózy .....	22
3.4.1	Zootechnické metody boje proti varroóze .....	23
3.4.2	Chemické metody boje proti varroóze – „lehká chemie“ .....	26
3.4.3	Chemické metody boje proti varroóze – „těžká chemie“ .....	30
3.5	Genom kleštíka včelího .....	35
3.6	Vznik rezistence kleštíka včelího k tau-fluvalinátu v souvislosti s bodovými mutacemi v genu pro sodíkový kanál .....	36
4	Materiál a metody .....	39
4.1	Biologický materiál .....	39
4.2	Izolace genomické DNA kleštíka včelího.....	39
4.3	PCR amplifikace segmentů DNA kleštíka včelího .....	40
4.4	Zpracování PCR produktů pomocí elektroforetické separace .....	42
4.5	Software .....	42
4.6	Použité chemikálie .....	43
4.7	Použité roztoky.....	43
4.8	Použité laboratorní přístroje.....	44
5	Výsledky .....	45
6	Diskuze .....	59
7	Závěr .....	68
8	Seznam zkratk .....	69
9	Použitá literatura .....	70

# 1 Úvod

Inhibice funkce sodíkového kanálu je jedním z mechanismů, kterými na roztoče působí akaricidní přípravky používané k jejich hubení. Zablokováním tohoto iontového kanálu dochází ke ztrátě membránového potenciálu mezi oběma povrchy plazmatické membrány buněk, a následně k ochromení nervové soustavy škůdce. Pokud dojde k mutační změně v kódující oblasti genu pro sodíkový kanál, nejsou molekuly varroacidu schopné navázat se na proteinový produkt tohoto genu, a blokovat tak jeho funkci, roztoči po aplikaci varroacidu přežívají.

V této bakalářské práci se budu zabývat detekcí dvou bodových mutací v DNA v sekvenci genu pro sodíkový kanál, které se vyskytují v souvislosti se vznikem rezistence kleštíka včelího (*Varroa destructor*) k tau-fluvalinátu – látce přítomné v několika varroacidních přípravcích. Pro detekci bodových mutací, spojovaných s rezistencí kleštíka, použiji PCR amplifikaci segmentu genu pro sodíkový kanál pomocí specificky navržených diagnostických primerů. Cílem mé práce bude optimalizovat metodu tak, aby bylo možné za použití PCR amplifikace s reakční směsí obsahující tři primery potvrdit či vyvrátit přítomnost bodových mutací, detekovaných v segmentu sledovaného genu a spojovaných s rezistencí. Detekce bodových mutací pomocí PCR amplifikace by měla být jednodušší a časově, finančně i materiálně méně náročná, než kdyby byly tyto bodové mutace detekovány sekvenací příslušného segmentu genu.



## 2 Cíle práce

1. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce.
2. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
3. PCR amplifikace DNA kleštíka včelího (*Varroa destructor*) za účelem detekce bodových mutací v genu pro sodíkový kanál, objevených v souvislosti s rezistencí kleštíka k varroacidům na bázi tau-fluvalinátu. To zahrnuje:
  - a) Přípravu kleštíků včelích pro izolaci genomické DNA a její provedení.
  - b) Navržení diagnostických primerů pro detekci bodových mutací.
  - c) Optimalizaci podmínek a uspořádání PCR amplifikační reakce a detekci bodových mutací touto reakcí.

## 3 Literární přehled

### 3.1 Biologie včely medonosné a její zařazení do systému

Včela medonosná (*Apis mellifera*) se řadí do třídy hmyzu (Insecta), řádu blanokřídlí (Hymenoptera), podřádu štíhloпасí (Apocrita) a čeledi včelovití (Apidae) (Anonymous1, 2016).

Včelstvo, jakožto společenství skupiny geneticky příbuzných, spolužijících včel, sestává z včelí matky (královny), přibližně 10 000–50 000 dělnic, přibližně 2 000 trubců a včelího díla. Počet dělnic a trubců ve včelstvu je kromě ročního období závislý například také na síle včelstva, nadmořské výšce stanoviště, podnebí a zdravotním stavu včelstva (Pohl, 2015).

Úkolem matky je klást vajíčka do připravených plástových buněk. Do větších (průměr 6,9 mm) ukládá vajíčka neoplozená, z nichž se líhnou trubci. Do menších (průměr 5,3 mm) pak oplozená vajíčka samičí, z nichž se líhnou dělnice, případně se z nich líhne nová matka, pokud ji včelstvo náhle ztratí nebo se jí rozhodne vyměnit. Včelstvo odchovává matky ve zvlášť vystavěných matečnicích. Dospělé dělnice zajišťují veškeré činnosti, které je třeba v úlu i mimo něj vykonávat. Trubci se v úlu obvykle vyskytují pouze během jara a léta. Podílejí se na oplození mladé matky při takzvaném snubním letu. Během něj od několika trubců mladá matka získává sperma, které si ukládá do semenného váčku a používá jej k oplození dělničích vajíček a vajíček, ze kterých se líhnou matky (Veselý, 2003; Pohl, 2015).

Tělo včely je členěno na tři segmenty: hlavu, hrud' a zadeček. Hrud' nese tři páry segmentovaných nohou. Vnější podněty včela přijímá pomocí orgánů smyslové soustavy, dvou velkých složených očí a tří jednoduchých oček, tykadel s receptorovou funkcí a ústním ústrojím s trubičkovitým sosákem. Gangliová nervová soustava, vylučovací Malphigioho trubice, oběhová soustava a vzdušnicový dýchací systém jsou morfologicky podobné soustavám dalších zástupců třídy hmyz (Insecta). Trávicí soustava je doplněna medným váčkem, umožňujícím pomocí česla oddělení přijímané sladiny od obsahu žaludku. Tělo je kryto chitinózní kutikulou s obsahem bílkovin, tuků a katecholaminů (Veselý, 2003). Na spodní straně zadečku ústí vývody voskových žláz. Zadeček matky a dělnic je zakončený žihadlem se zpětnými háčky. Pohlavní ústrojí je

plně vyvinuto u matky a trubců, dělnice jej mají rudimentární (Veselý, 2003; Pohl, 2015).

Vývojová proměna včel je dokonalá, zahrnuje stádia: vajíčko, larva, kukla a dospělec (imago). Někteří autoři zařazují i stádium předkukla (Harris *et* Danka, 2008), kterým lze dobře definovat fázi, během níž jsou včelí larvy napadány samicemi kleštika včelího. Délka vývoje včelí matky po dosažení dospělosti je 16 dní, u dělnice 21 dní a u trubce 24 dní (Veselý, 2003; Pohl, 2015).

Po genetické stránce se matky od dělnic prakticky neliší. Odlišný vývoj je zajištěn rozdílnou velikostí buňky, ve které se matka vyvíjí (tzv. mateří buňka, později matečník), a celoživotním přijímáním mateří kašičky produkované dělnicemi. Dělničí a trubčí larvy se na rozdíl od budoucí matky po třech dnech vývoje začínají krmit medem (zdroj sacharidů) a fermentovaným pylem (zdroj proteinů).

Med vzniká zahuštěním nektaru či medovice dělnicemi, které zredukuje množství vody obsažené ve sladidě na 16–18 %. Výměšky slinných žláz do sladiny přidávají antimikrobiální látky a enzymy, umožňující její snadnější štěpení (Pohl, 2015; Čermák *et al.*, 2016). Medovici produkuje hmyz sající rostlinné šťávy (mšice a červci). Po průchodu tekutiny trávicím traktem sajícího hmyzu ulpívá kapka kondenzovaného cukerného roztoku na kaudální části jeho zadečku a je odtud včelami odebírána. Nektar i medovice jsou včelou během transportu do úlu přenášeny v medném váčku (Veselý, 2003). Po přiletu do úlu dochází k předání obsahu medného váčku dalším včelám, které jej zpracují a uskladní.

K zachycení pylu včele slouží kartáčovité útvary nacházející se na vnitřní straně pat každého páru nohou. Pyl je odtud včelou ukládán do košíčků, které se nacházejí na vnější straně holeně třetího páru nohou ve formě prohlubně. Prohlubeň je vybavena trnem, kolem něhož se pylová zrna nabalují (Veselý, 2003).

Synchronizace dění v úlu se z velké části uskutečňuje pomocí rozsáhlé škály feromonů. Matka jimi například brzdí rozvinutí vývoje rozmnožovací soustavy dělnic. Další komunikace mezi včelami je zajištěna také pomocí vysílání zvukových vln a vibrací nebo také organizovaným pohybem včel po plástech, který je známý pod termínem „včelí tanečky“ (Pohl, 2015).

### 3.1.1 Chov včely medonosné

V přirozeném prostředí včely sídlí nejčastěji v dutinách stromů. V nich ve svislé poloze stavějí voskové plásty složené z buněk. Tyto buňky slouží k odchovu potomstva a skladování medových a pylových zásob. Včely jsou nejčastěji chovány v úlech, ve kterých voskové plásty stavějí do několika až několika desítek svisle umístěných úlových rámků.

Před začátkem jara začíná matka klást do buněk plástů. V předjaří dochází k výměně staré zimní generace dlouhověkých včel za krátkověké letní. Z úlu vylétávající včely sbírají nektar a pyl, během jara a léta pokračují ve shromažďování cukerných zásob, které pokryjí potravní spotřebu zimních včel. Pokud dojde při medobraní k odebrání medných zásob, ztráta se kompenzuje dodáním cukerného roztoku včelstvu. Schopnost zimovat na náhradní potravě je jako další důležité vlastnosti podmíněna geneticky (Čermák *et al.*, 2016).

Šlechtění nových, odolnějších plemen včel není podporováno pouze kvůli snaze získat včely snadno zimující, neagresivní, výnosnější, ale především potřebou, aby byly přirozeně odolné vůči parazitům. V souvislosti s varroózou je sledováno, jak včelstva snášejí přítomnost parazita bez zásahů chovatele (Brown *et al.*, 2015). Ta, která se se situací vyrovnají nejlépe, jsou určena k další plemenitbě. Způsoby, kterými včelstva s roztočem přirozeně bojují, jsou známé pod označením hygienické chování a hygienická citlivost vůči roztočům rodu *Varroa*. Tato genetická predispozice k aktivnímu potlačování rozmnožování kleštíka ve včelstvu je u včel dědičná (Parker *et al.*, 2012).

### 3.2 Kleštík včelí

Kleštík včelí (*Varroa destructor*), označovaný také jako kleštík zhoubný, je ektoparazitický roztoč napadající včely a živící se jejich hemolymfou (obrázek 1). Buňky plástů s včelím plodem, ve kterých se vyvíjejí raná ontogenická stádia hostitele (larva a kukla), využívá za účelem vlastního rozmnožování. Způsobuje onemocnění známé jako varroóza (kleštíkovitost). Je možné se setkat i s pojmenováním varroáza, nicméně koncovka -áza je v českém jazyce používána především při pojmenovávání enzymů (Přidal, 2007; Čermák *et al.*, 2016). Kromě mechanického poškozování kutikuly včel je s varroózou spojován i přenos virových onemocnění (Genersch *et*

Aubert, 2010). Systematicky je kleštík včelí řazen do třídy pavoukovci (Arachnida), řádu roztoči (Acari) a skupiny parazitických roztočů v rámci čeledi kleštíkovití (Varroidae) (Anonymous2, 2016).

**Obrázek 1: Dospělá samice kleštíka včelího přichycená na včelí kukle.**



<http://www.scienceimage.csiro.au/image/7014>, navštíveno dne 25. 4. 2017

Kleštík včelí byl do konce 20. století znám jako *Varroa jacobsoni*. Název zavedl holandský zoolog Anthonie Cornelis Oudemans, když v roce 1904 popsal exemplář ektoparazitického roztoče zaslaného Edwardem Jacobsonem z Jávy, napadajícího včelu východoasijskou *Apis ceranae* (Čermák *et al.*, 2016). Tento roztoč byl také považován za ektoparazita a původce onemocnění včely medonosné *Apis mellifera*, vyskytující se na území Evropy. V roce 2000 byl však tento určen jako samostatný druh kleštíka a pojmenován *Varroa destructor* (Anderson *et* Trueman, 2000). V článcích publikovaných před rokem 2000 je tedy používáno označení *Varroa jacobsoni* místo dnes užívaného *Varroa destructor* (Anderson *et* Trueman, 2000).

Doposud byly popsány čtyři druhy roztočů rodu *Varroa*: *V. destructor*, *V. jacobsoni*, *V. rindereri* a *V. underwoodi* a rozlišeny další haplotypy: *V. sp.* 'Luzon 1', *V. sp.* 'Luzon 2' a *V. sp.* 'Mindanao' (Anonymous3, 2016).

Zatímco včela východní dokáže žít s kleštíky v rovnováze bez znatelných populačních ztrát, včelstvům včely medonosné napadeným kleštíkem hrozí po 2–3 letech po expanzi parazitů ve včelstvu kolaps, především v důsledku nedostatečně vyvinutých mechanismů potlačujících rozmnožování roztoče (Čermák *et al.*, 2016). K prvotnímu nakažení evropských včelstev došlo při jejich importu do oblastí Asie. Po

zpětném přesunu těchto včelstev se kleštík včelí v Evropě rychle rozšířil. Vůbec první včelstva jevící znaky varroózy byla pozorována v 60. letech 20. století v Číně a asijské části Ruska, následně v Evropě, Africe a Severní Americe (Čermák *et al.*, 2016). Na východě tehdejšího Československa byl zachycen v roce 1978, na toto území byl pravděpodobně zavlečen přes východní část Slovenska ze zakarpatské oblasti SSSR (oblast dnešní Ukrajiny). Napadená včelstva byla dle nařízení utracena, nicméně šíření varroózy tak zabráněno nebylo, proto se přikročilo k jejímu léčení. Horizontálnímu šíření varroózy mezi včelstvy napomáhají včely při rojení, zalétávání do sousedních úlů nebo loupeží (Pohl, 2008).

### 3.2.1 Morfologie kleštíka včelího

Tělo kleštíka má při pohledu shora příčně oválný tvar, je širší než delší a ploché. Tvarově se podobá krunýři želvy (obrázek 1 a 2). Hřbetní stranu pokrývá silný lesklý kutikulární štít chránící tělo se čtyřmi páry kráčivých končetin, zakončených drápkou a přísavkami, které parazitovi pomáhají udržet se na pohybující se včele (Pohl, 2008; Čermák *et al.*, 2016). Chelicery a pedipalpy v přední části těla slouží kleštíkovi jako čichový a hmatový orgán (Veselý, 2003). Někteří autoři uvádějí, že kleštík je schopen samostatného pohybu po plodových plástech úlu (Brown *et al.*, 2015). Obecně se předpokládá, že by takoví kleštíci byli ihned odklizeni čistícími včelami (Čermák *et al.*, 2016). K vytvoření otvoru v kutikule včely a následnému příjmu hemolymfy slouží samicím kleštíka bodavě sací ústní ústrojí.

**Obrázek 2:** Schematický pohled „skrz“ dorzální stranu samice (vlevo) a samce (vpravo) kleštíka včelího.



<http://www.padil.gov.au/thai-bio/pest/main/140447>, navštíveno dne 25. 4. 2017

Tělo samice je 1,5–1,9 mm široké a 1,1–1,5 mm dlouhé (obrázek 2, vlevo). Barva nedospělých jedinců je světlá, u dospělé přechází od červenohnědé po hnědou. Samci kleštíka včelího jsou v porovnání se samicemi menší, délka samčího jedince činí asi 0,8 mm, tělo mají kulatější, světle až bíle zbarvené (obrázek 2, vpravo).

### 3.2.2 Vývojový cyklus a charakteristika rozmnožování kleštíka včelího

Ontogenetický vývoj kleštíka včelího tvoří čtyři stádia: vajíčko, protonymfa, deuteronymfa a dospělec. U stádií protonymfy a deuteronymfy je dále rozlišována jejich mobilní a imobilní vývojová fáze (Harris *et* Danka, 2008).

K rozmnožování využívá kleščík plodové buňky včel, do kterých proniká krátce před jejich zavíčováním. Oplozená samice kleštíka se dostává do plodové buňky ze včely pečující o larvy. Na dospělých včelách roztoči setrvávají kromě přemísťování i v bezplodém období (Pohl, 2008), které v podmínkách mírného pásu během zimy trvá několik měsíců (Brown *et al.*, 2015). Dosud nebylo prokázáno, zda samice kleštíka rozeznávají včelí larvy stářím vhodné k napadení na základě typického pachu, teploty, pohybu larvy nebo podle ní vyvíjeného CO<sub>2</sub> (Pohl, 2008).

V buňce se samice kleštíka ukryje do krmné kašičky nacházející se na dně plodové buňky, dokud z ní není osvobozena spotřebováním potravy krmící se larvou. Během této doby dýchá samice vychlípeným respiratorním orgánem (*peritreme*), aby nedošlo k jejímu udušení (Harris *et* Danka, 2008). 4 hodiny po zavíčování se samice kleštíka přichycuje k včelí larvě a začíná sát její hemolymfu. 60 hodin po zavíčování se pouští nedospělé včely, která přechází do stádia předkukly, a klade první vajíčko na stěnu horní části buňky, blízko jejího vrcholu. Jako čas uplynulý od zavíčování po naklazení prvního vajíčka se uvádějí 2–3 dny (Anonymous4, 2008; Čermák *et al.*, 2016). Následuje naklazení dalších 4–5 vajíček (Brown *et al.*, 2015; Čermák *et al.*, 2016) v intervalu asi 30 hodin (Anonymous4, 2008). Pořadí vajíček kladených v závislosti na jejich pohlaví je přesně dané, je uvedeno v tabulce 1 a podrobněji popsáno dále v textu. Vylíhlé potomstvo začíná postupně sát hemolymfu z otvoru v kutikule včelí larvy, jehož průchodnost zajišťuje matka. Kleščíci ve stádiích protonymfy a deuteronymfy nemají ústní ústrojí dostatečně silné k porušení kutikuly včelí larvy. Dospělí kleščíci se v rámci buňky mezi sebou spáří, ovšem vyjma matky. Při líhnutí včely se z plodové buňky spolu s ní dostávají ven všechny dospělé dcery. Syn

a nedospělé dcery v buňce hynou. Jednotlivé fáze ontogenetického vývoje kleštíka včelího s příslušnými časovými intervaly jsou uvedeny v tabulce 1.

**Tabulka 1: Fáze ontogenetického vývoje kleštíka včelího v buňce plástu včely medonosné, rozdělené do časových intervalů. Označení matka odpovídá samici kleštíka proniklé do plodové buňky, syn a dcera jejím potomkům.**

Čas od proniknutí samice kleštíka včelího (matky) do plodové buňky [h]	Proces probíhající v plodové buňce a odpovídající fáze ontogenetického vývoje potomstva kleštíka včelího
0	Matka se dostává do buňky včelího plodu krátce před jejím zavíčováním.
60	Naklazení neoplozeného vajíčka blízko vrcholu buňky, z vajíčka se vyvine samec.
90	Samčí protonymfa je vyvinuta, matka klade první oplozené vajíčko, z vajíčka se vylíhne první dcera.
120	První dcera je ve stádiu protonymfy, matka klade druhé oplozené vajíčko.
150	Matka klade třetí oplozené vajíčko, syn a první dcera dosahují stádia deuteronymfy a druhá dcera stádia protonymfy.
180	Matka klade čtvrté oplozené vajíčko, třetí dcera se líhne a na stěně buňky se hromadí kupka výkalů.
220	Syn a první dcera dosahují dospělosti, shromažďují se u hromádky výkalů, druhá, třetí a čtvrtá dcera také dospívají a všechny samice se postupně páří se samcem.
300	Líhnoucí se včela opouští buňku spolu s matkou a několika spářenými dcerami, nedospělé dcery a syn hynou uvnitř prázdné buňky.

(Upraveno podle Martin, 1994)

Kleštíci včelí se rozmnožují specifickou rozmnožovací strategií s označením pseudo-arrhenotokie (De Jong *et al.*, 1981; Martin *et al.*, 1997). Samice se vyvíjejí z oplozených vajíček ( $2n = 14$ ), samci z neoplozených ( $n = 7$ ), ovšem i před kladením samčích haploidních vajíček musí být matky předem spárené (Steiner *et al.*, 1982; De Ruijter *et Pappas*, 1983; Martin *et al.*, 1997). Podobný typ rozmnožování se objevuje u blízce příbuzné čeledi Dermanyssidae (čmelíkovití). Samci se líhnou z oplozených vajíček, ve kterých dochází v raném embryonálním vývoji k eliminaci paternální sady chromozomů (Sabelis *et Nagelkerke*, 1992).

Vývoj kleštíka od nakladeného vajíčka po dosažení dospělosti trvá 6,2 dne u samice a 6,9 dne u samce. Cytologickým vyšetřením počtu chromozomů ve vzorcích



postupně kladených vajíček bylo určeno, že z prvního nakladeného vajíčka se líhne samec a z následujících samice (Rehm *et* Ritter, 1989). Do roku 1989 se předpokládalo, že z prvního nakladeného vajíčka se vyvíjí samice, z druhého samec a z následujících vajíček opět samice (De Ruijter *et* Pappas, 1983; Ifantidis, 1983, Rehm *et* Ritter, 1989).

Při výběru plodových buněk včel si samice kleštíka s o 10 % vyšší četností vybírají pro odchov potomstva plodové buňky trubčí. Vzhledem k delšímu vývoji trubčího plodu (24 dní trubčí plod, 21 dní dělničí plod) je v zavíčkované buňce možno odchovat více potomků (Martin *et* Cook, 1996).

Embryonální vývoj roztoče začíná ve vajíčku v těle matky před jeho nakladením (Ionescu-Varo *et* Suciú, 1979; Rehm *et* Ritter, 1989). Po nakladení vajíček jsou embrya multicelulární, v pokročilém stádiu diferenciaci (Rehm *et* Ritter, 1989).

Efektivita rozmnožování je zvýšena strategií vychýleného poměru pohlaví potomstva. Matka klade jedno vajíčko, ze kterého se vyvíjí syn, a 2–5 vajíček, ze kterých se vyvíjejí dcery. Tím dochází ke zvýšení možného počtu potomků v dalších generacích, které jsou schopny dcery vyprodukovat (Hamilton, 1967). K páření mezi sourozenci dochází v zavíčkované buňce ihned po dosažení jejich dospělosti. Probíhá v několika cyklech, aby došlo k nahromadění takového množství semene, které samicím vystačí k oplození všech vajíček kladených po zbytek jejich reprodukčně aktivní části života (Pohl, 2008). Pokud nedojde ke spáření v zavíčkované buňce, z důvodu nevylíhnutí nebo neplodnosti samce, zůstávají samice neoplozené a neschopné produkce vajíček (Hamilton, 1967).

Úhyn samců kleštíka v plodových buňkách včel je poměrně častý (Kustermann, 1990; Martin, 1994; Martin, 1995; Donzé *et al.*, 1996). Defekty v rozmnožování kleštíka mají pravděpodobně značný vliv na celkovou dynamiku soužití se včelami (Fuchs *et* Langenbach, 1989) a na schopnost včel tolerovat jeho přítomnost ve včelstvu (Anderson, 1994; Harbo *et* Hoopingarner, 1995). Pro defektní rozmnožování kleštíků byl zaveden název *non-reprodukce* (Martin *et al.*, 1997). Příčiny jejího vzniku nejsou stále objasněné, může mezi ně patřit například: únik neoplozených samic kleštíka z plodové buňky, reprodukce nespářených samic a stabilita reprodukční strategie roztočů rodu *Varroa* (Martin *et al.*, 1997). Nesprávný vývoj samců v plodové buňce může být způsoben poškozením samce kleštíka pohybující se včelí larvou, chybným

naklazením vajíčka matkou (Donzé *et* Guerin, 1994) nebo také výhodnou obranou roztočů proti šíření recesivních mutací v jejich populaci (Smith *et* Shaw, 1980).

### 3.2.3 Virová onemocnění přenášená kleštíkem včelím

Virová onemocnění se ve včelstvu častěji projevují jako následek oslabení varroózou (Bailey *et al.*, 1981). Nízké titry virových částic jsou v tělech včel a jejich příbuzných (*Apis ceranae*, *Vespula germanica*, *Bombus* spp.) přirozeně přítomny, nedochází však k jejich rozšíření do celého organismu (Genersch *et* Pohl, 2008). Bývají omezeny především na trávicí soustavu (Genersch *et* Aubert, 2010). Včely je mezi sebou šíří fekálně-orální cestou, infikovanými vajíčky, spermatem nebo přímo vzájemným kontaktem (Genersch *et* Aubert, 2010). Kleštík při porušení kutikuly a sání hemolymfy různých jedinců funguje jako účinný mechanický vektor. Především pro vyvíjející se včelí kukly bývají následky fatální, líhnoucí se včela bývá často postižena deformacemi (obrázek 3) (Pohl, 2008).

Nejznámější včelí viry, které mají prokazatelně nebezpečnější projev v souvislosti s varroózou, jsou uvedeny a popsány v tabulce 2. Výčet dalších doposud objevených včelích virů je uveden v tabulce 3.

**Obrázek 3: Včela s pokroucenými křídly napadená virem deformovaných křídel (DWW).**



<https://www.flickr.com/photos/klaasdegelder/5137849412>, navštíveno dne 28. 4. 2017

**Tabulka 2: Virová onemocnění včel označená používanou zkratkou, anglickým a českým názvem způsobovaného onemocnění, doplněná příznaky bez a v souvislosti s varroózou.**

Název viru		Rok objevení	Příznaky	
Anglický	Český		bez varroózy	s varroózou
Acute Bee Paralysis Virus	Virus akutní paralýzy včel	1963	slabě virulentní	úhyn v důsledku ochrnutí
Chronic Bee Paralysis Virus	Virus chronické paralýzy včel	1963	slabě virulentní	úhyn v důsledku ochrnutí po přenosu fekálně-orální cestou
Sackbrood Virus	Virová nákaza včelího plodu (pytlíčkovitost plodu)	1964	úhyn larev	rychlejší rozšíření v rámci včelstva
Kashmir Bee Virus	Kašmírský včelí virus	1974	slabě virulentní	úhyn
Slow Bee Paralysis Virus	Virus pomalé paralýzy včel	1974	slabě virulentní	úhyn v důsledku ochrnutí
Black Queen Cell Virus	Virus zčernání matečnicků	1977	černé zbarvení matečnicků	úhyn
Cloudy Wing Virus	Virus zakalených křídel	1980	neprůhledná kalná křídla	úhyn
Deformed Wing Virus	Virus deformovaných křídel	1980	slabě virulentní	krátkověkost zimní generace včel, znetvoření a úhyn při nakažení kukly
Israeli Acute Paralysis Virus	Izraelský virus akutní paralýzy včel	2002	slabě virulentní	úhyn

(Upraveno podle Pohl, 2008 a Münstedt *et al.*, 2014)

U čtyř výše zmíněných virů: viru akutní paralýzy včel (ABPV), kašmírského včelího viru (KBV), izraelského viru akutní paralýzy včel (IAPV) a viru deformovaných křídel (DWV), se podařilo prokázat přímou souvislost mezi intenzitou projevu virem způsobené infekce a fungováním kleštíka, jakožto vektora přenosu (Genersch *et al.*, 2010). V textu za tabulkou 3 následuje přehled základních informací týkajících se čtyř jmenovaných virů.

**Tabulka 3: Další viry způsobující onemocnění včel s uvedeným rokem objevu viru, cestou průniku infekce a příznaky onemocnění.**

Název viru	Rok objevení	Průnik infekce	Příznaky
Arkansas Bee Virus	1974	orální	bez viditelných příznaků
Berkeley Bee Picorna-like Virus	1974	orální	bez viditelných příznaků
Apis Iridescent Virus	1976	orální	bez viditelných příznaků
Filamentous Virus	1978	orální	bez viditelných příznaků, spojován s noseμόzou
Egyptský virus včel	1979	orální	bez viditelných příznaků
Včelí virus X	1980	orální	bez viditelných příznaků, spojován s noseμόzou a měňavkovou nákazou, končí úhynem
Včelí virus Y			
Aphid Lethal Paralysis Virus	1992	orální	bez viditelných příznaků
Big Sioux River Virus	1998	orální	bez viditelných příznaků
Virus roztoče <i>Varroa</i> 1	2004	orální, poškozená kutikula	malformace křídel, zvětšení zadečku, dezorientace, třes, ochrnutí
Virus Kukago	2004	orální	napadení nervové soustavy, zvýšení agresivity včel
Invertebrate Iridescent Virus Type 6	2010	orální	letargie, neschopnost létat, fialovo-modré zbarvení v oblasti vnitřních orgánů
<i>Varroa destructor</i> Macula-like Virus	2011	orální, poškozená kutikula	informace v literatuře nedostupné
Lake Sinai Virus 1	2011	orální	bez viditelných příznaků, spojován s včelími viry X a Y
Lake Sinai Virus 2			
Macula-like Virus	2011	orální	bez viditelných příznaků, spojován s varroózou
Aphid Lethal Paralysis Virus	2011	orální	bez viditelných příznaků
Virus kroužkovitosti tabáku	(1992)* 2014	orální, poškozená kutikula	zkrácení doby života, změny chování (neurotropní virus)

*Pozn.: Český název viru je uveden, pokud se v české literatuře aktivně používá.*

*\* Rok objevení viru, přičemž nebyl známý jeho patogenní vliv na včely.*

(Upraveno podle Sammataro *et* Yoder, 2011 a Münstedt *et al.*, 2014)

### **Virus akutní paralýzy včel (ABPV), kašmírský včelí virus (KBV) a izraelský virus akutní paralýzy včel (IAPV)**

Náleží mezi paralytické RNA viry patřící do čeledi Dicistroviridae. Bylo prokázáno zvýšení virulence při přenosu kleštíkem (Ball, 1985). Viriony se šíří nakaženou potravou, kapénkami nebo injekcí do hemolymfy. U larválních stádií včel je nakažení virem bezpříznakové, propuknutí infekce u dospělců je typické příznaky, jako je chvění jedince následované paralýzou křídel nebo těla, která končí úhynem (Genersch *et al.*, 2010). Ten u dospělců nastává za 1–2 dny (ABPV), respektive za 6 dní (KBV) od nakažení (Bailey *et al.*, 1963). IAPV je spojován s hromadnými úhyny včel, známými jako Syndrom zhroucení včelstev (CCD – Colony Collapse Disorder) (Čermák *et al.*, 2016).

### **Virus deformovaných křídel (DWV)**

Virus náleží do čeledi Iflaviridae. Líhnoucí se nakažené včely jsou deformované, mají zkrácený zadeček a zkroucená křídla (viz obrázek 3), ovšem pouze pokud byly virem nakaženy v raném embryonálním vývoji (Ball, 1989; Genersch *et al.*, 2010; Klíma, 2016). Včely, které se virem nakazí po vylíhnutí, jsou krátkověké a často hynou během podzimu nebo zimy. Před objevem viru se předpokládalo, že deformace vznikají z důvodu úbytku hemolymfy včelích kukel po sání kleštíka (De Jong *et al.*, 1982; Koch *et al.*, 1991). Virus je přenášen také čmelíkovitým roztočem *Tropilaelaps mercedesae* (Yue *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2007) a broukem lesknáčkem úlovým (*Aethina tumida*), který se živí zbytky látek organického původu nacházejícími se v úlu (Eyer *et al.*, 2007). Lesknáček virus přenáší pouze na dospělé včely (Eyer *et al.*, 2009).

Kleštík včelí a *Tropilaelaps mercedesae* při přenosu viru fungují jako biologičtí vektorové, v nichž dochází k aktivnímu pomnožování viru za současného nárůstu titru virových částic v jejich těle. Důkaz byl podán detekcí anti-sense RNA v tělech nakažených parazitů, která vzniká pouze při replikaci viru (Dainat *et al.*, 2009; Gisder *et al.*, 2009). Po dosažení vysokého titru virových částic v těle se včely stávají aktivními vektory přenosu, virus šíří na vyvíjející se larvy při jejich krmení, poté se z těchto nakažených larev líhnou včely s deformacemi.

### 3.3 Diagnostika varroózy

Kontroly včelstva na přítomnost a sílu varroózy se provádějí celoročně v pravidelných intervalech. Za klíčové období je pokládáno léto, během kterého dochází k nárůstu počtu kleštíků a současnému zpomalení plodování včel a snížení jejich počtu v úlu. Dále podletí, kdy je odchovávána zimní generace dlouhověkých včel (Pohl, 2008). Pro redukci populace kleštíků ve včelstvu je nutné provádět léčebná a ochranná opatření (Čermák *et al.*, 2016).

Základní diagnostickou metodou přítomnosti varroózy je sledování spadu roztočů na podložkách ve spodní části úlů. Některé úly mohou obsahovat speciálně upravená varroadna, opatřená podložkou a sítíkou s oky, která jsou dostatečně velká na propadnutí kleštíků na podložku, avšak včelám zabraňují odklidit roztoče z úlu ven (Pohl, 2008). Vypočítává se přirozený spad kleštíků za jeden den. Jako kritickou hranici uvádějí Čermák *et al.* (2016) hodnotu 6–8 spadlých samic kleštíka během jednoho dne při sledování spadu po polovině července. Při těchto spadových hodnotách je ohrožen odchov zdravé generace zimních včel.

Napadení dělnic kleštíkem je možné kontrolovat smyvem. 200–300 včel odebraných z medných nástavků se usmrtí zmrazením. Včelí mrtvolky s přísátými foretickými kleštíky se promíchají v nádobě obsahující vodu s detergentem, jehož působením se od sebe včely a kleštici oddělí. Následně se obsah nádoby promývá přes dvojité síto, na horním s většími oky se zachytí včely, na spodním s oky jemnějšími kleštici. Stanovuje se procentuální podíl napadení odebraných včel, přepočtený na celkový počet včel v úlu. Jako kritická hodnota je uváděno 10% napadení v červnu a 20% koncem července (Čermák *et al.*, 2016). Místo promíchání usmrcených včel ve vodě s detergentem je možné metodu modifikovat poprášením živých včel jemným práškovým cukrem s následným oklepáním foretických kleštíků na podložku a vypuštěním těchto včel (Čermák *et al.*, 2016).

Další využívanou metodou je diagnostika napadení trubčího plodu. Sleduje se při ní zamoření trubčích larev několik dní před jejich líhnutím. Trubčí larvy se odvíčkovací vidličkou odstraní z plodových buněk a hledají se na nich dospělé samice kleštíka, případně jeho další vývojová stádia. Poměrem počtu vyjmutých larev a napadených buněk se vypočítá procento napadení. Podélně rozlomený trubčí plod je také možné prohlédnout, aby se zjistilo, zda se v buňkách plodu nenacházejí výkaly

kleštíků. Ty jsou patrné jako shluk bílých částic na horní stěně buňky plástu, asi v jedné třetině její výšky ode dna (Čermák *et al.*, 2016). Výhodou metody je možnost prozkoumání většího počtu buněk v řadách, ze kterých se procento napadení stanovuje s vyšší referenční hodnotou (Pohl, 2008; Čermák *et al.*, 2016).

Kontrolu napadení včel kleštíky je možné dále provést prohlédnutím plástů obsednutých včelami. Za normálního stavu až do mírného stupně napadení nejsou na včelách patrní žární roztoči. Všechny včely by měly vykazovat přirozenou aktivitu, zřetelné proužkování ochlupeného zadečku a neměly by mít deformovaná křídla. Detekce roztočů na deformovaných včelách svědčí o silném napadení a nutnosti okamžitého zásahu, jinak dochází k úhynu včelstva (Pohl, 2008).

Ze zákona 166/1999 Sb. o veterinární péči a o změně souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů, mají v České republice chovatelé včel povinnost odevzdat nejpozději do 15. 2. vzorek směsné zimní měli ze stanovišť, přičemž se měl z podložek sbírá po dobu 4 týdnů. Jako zimní měl je chápán směsný odpad nalezený na podložce úlu po 31. 12., čistá podložka je vkládána nejpozději 6 dní po posledním léčení. Na základě výsledků rozborů prováděných akreditovanými laboratořemi pak vydá Státní veterinární správa před začátkem včelařské sezóny aktuální nápravná opatření formou místních vyhlášek (Anonymous5, 2008; Anonymous6, 2016).

Zimní měl podává informaci o situaci nastalé po podzimním léčení. Stav konkrétního včelstva není možné určit vzhledem k tomu, že všechna včelstva na stanovišti nebývají napadena stejnou měrou. Jedno nebo dvě vysoce zamořená včelstva mohou údaje zkreslovat (Čermák *et al.*, 2016).

Chovatelé včel se mohou také zapojit do programu sledování vývoje spadu roztoče kleštíka včelího na území České republiky (známý pod názvem Varroamonitoring systém) prostřednictvím internetové aplikace vyvinuté Pracovní společností nástavkových včelařů CZ. Ta má pomoci chovatelům a pracovníkům Státní veterinární správy při potlačování varroózy. Aplikace je dostupná na webovém odkazu [www.varroamonitoring.cz](http://www.varroamonitoring.cz) (Anonymous22, 2017).

### **3.4 Tlumení varroózy**

Opatření a zásady týkající se omezování populací kleštíka včelího jsou v rámci integrované ochrany včelstev rozděleny dle povahy použitých přípravků do tří základních skupin. V praxi se nejvíce kombinují zásahy zootechnické s použitím

chemických akaricidů (varroacidů), ať už jde o přípravky na bázi přírodní, nebo syntetické (Čermák *et al.*, 2016). Rozdělení zásahů je uvedeno v názvech následujících podkapitol.

Pro přehlednost je uvedena tabulka 4, která shrnuje jednotlivé zákroky omezující růst populace kleštíka a další léčebné kroky, spolu s časovým obdobím, ve kterém jsou prováděny. Termíny provádění opatření jsou orientační vzhledem k nadmořské výšce, síle včelstva a jiným faktorům ovlivňujícím konkrétní stanoviště (například k období snůšky a medobraní, k nálezové situaci v okolí, vývoji počasí v daném roce a dalším).

### **3.4.1 Zootechnické metody boje proti varroóze**

Při používání zootechnických (biotechnických) metod v boji proti kleštíkovci se lze úplně vyhnout používání chemických přípravků, případně mohou být tyto přípravky používány jen k doprovodné léčbě. Hlavní výhodou zootechnických metod je tedy čistota získaných včelích produktů bez rizika, že budou obsahovat chemická rezidua. Jsou tedy vhodné i pro biovčelařství. Nevýhodou je omezení doby provedení zákroku pouze na určité roční období ve vztahu k životu včelstva. Všechny zootechnické metody jsou založeny na základním předpokladu, že klešík využívá ke svému rozmnožování zavíčkovaný včelí plod. Pokud se podaří na něm parazita zachytit, například přidáním plástu s otevřeným plodem, na kterém je donucen se soustřeďovat, lze jej spolu s ním z úlu později efektivně odstranit. Úspěšnost těchto opatření je až 90 %, po zákroku zůstává ve včelstvu přibližně 10 % původní populace roztočů (Brown *et al.*, 2015). Mezi zootechnické metody patří například:

#### **1. Tvorba plodových oddělků**

Metodu lze využít na jaře a počátkem léta, kdy je většina roztočů v plodových buňkách. Na dospělých včelách se nenacházejí žádné nebo jen minimum kleštíků. Zavíčkovaný plod obsazený částí dospělých včel (přibližně jednou třetinou) se odebere a přemístí do prázdného úlu. Matka oddělku je vždy nová, buď přidaná, nebo odchovaná včelstvem v matečnicku. Během jara je tvorba oddělků vhodným protirojovým opatřením. Oddělky bez plodu je vhodné před plodováním ošetřit chemickými přípravky (Pohl, 2008).



**Tabulka č. 4: Výčet opatření prováděných za účelem omezení početnosti populace kleštíka včelího (*Varroa destructor*) ve včelstvech, s orientačními termíny aplikace těchto opatření během roku. Šedá = vhodná aplikace, světlemodrá = možná aplikace opatření.**

OPATŘENÍ		Leden	Únor	Březen	Duben	Květen	Červen	Červenec	Srpen	Září	Říjen	Listopad	Prosinec
Sledování spadu na podložce		šedá	šedá	šedá	šedá	šedá	šedá	šedá	šedá	šedá	šedá	šedá	šedá
Tvorba plodových oddělků a smetenců					světlemodrá	šedá	šedá	světlemodrá	světlemodrá				
Odstranění trubčího plodu						světlemodrá	šedá	šedá	šedá				
Věznění matky na plástu							šedá	šedá	šedá				
Klíčování matky		světlemodrá								světlemodrá	světlemodrá	světlemodrá	světlemodrá
Metoda sv. Anny								šedá					
Kyselina mravenčí a kyselina mléčná					světlemodrá	šedá	šedá	šedá	šedá	světlemodrá			
Kyselina šťavelová	sublimace	světlemodrá						světlemodrá	světlemodrá	světlemodrá	světlemodrá	šedá	šedá
	pokap	světlemodrá									světlemodrá	šedá	šedá
Thymol (Apiguard, Thymovar)								světlemodrá	šedá	šedá	šedá		
Prostředky těžké chemie (syntetické pyrethroidy, amitraz)		světlemodrá	světlemodrá	světlemodrá	světlemodrá	*			šedá	šedá	šedá	šedá	šedá

Pozn.: \* – předjarní preventivní ošetření včelího plodu nátěrem přípravku je možné provádět podle nařízení Státní veterinární správy do 15. 4. (Malena, 2015).

(Upraveno podle Brown *et al.*, 2015)

## 2. Tvorba smetenců

Provádí se na jaře, většina roztočů se nachází v buňkách plodu, dospělé včely na sobě nesou jen málo roztočů. Smetením dospělých včel z více úlů lze získat lehce napadená včelstva, která mohou být ještě dodatečně navíc ošetřena. Matka je vždy přidávána nová (Pohl, 2008).

## 3. Odstranění trubčího plodu

Nedosahuje tak vysoké efektivity jako jiná zootechnická opatření, nicméně je oblíbené díky poměrně malé časové náročnosti. Lze jím redukovat rychlost nárůstu populace kleštíků během letních měsíců. Často mu předchází vyšetření napadení trubčího plodu a podle intenzity je hodnoceno, zda má být odstraněn veškerý trubčí plod nebo jen jeho část (Čermák *et al.*, 2016).

## 4. Věznění matky na plástu s následným odstraněním plodu

Matka je spolu s nezakladenou souší vložena do speciálního izolátoru z mateří mřížky tak, aby jí bylo umožněno klást vajíčka. Ostatní včely k ní mají přístup přes oka mřížky, mohou se o ni starat a krmit ji. Vždy po devíti dnech se izolátor s matkou přemístí na novou, nezakladenou souš, a to do té doby, než jsou postupně zakladeny tři souše. Poté se matka vypustí. Vývoj včelího potomstva v každém zakladeném plástu je tedy o devět dní posunutý. Při vkládání třetí souše se z úlu odstraní první, zakladený plást (po 18 dnech, ještě před líhnutím zavíčkovaného včelího plodu). Za dalších 9 dní (celkem po 27 dnech) se odstraní druhý zakladený plást, v úlu v té době zůstává poslední zakladený plást. Samice kleštíka jsou tímto donuceny se soustředit pouze na jediném plodovém plástu. Pokud se z úlu po dalších 9 dnech odstraní, počet roztočů v úlu je výrazně zredukován. Doba aplikace metody trvá 36 dní, provedením se řadí k náročnějším (Čermák *et al.*, 2016).

## 5. Klíckování matky

Při klíckování je matka uzavřena v ploché klícce umístěné v centru plodiště, včely se přes oka klícky o matku starají. Matce tak není umožněno pohybovat se po plástu a klást vajíčka do jeho buněk. Získá se včelstvo bez plodu, v němž se nacházejí pouze foretičtí kleštíci, kterých je možné se zbavit přípravky „lehké“ nebo „těžké“ chemie. Opatření je prováděno během podzimu a zimy (Čermák *et al.*, 2016).

## 6. Metoda sv. Anny

Metoda je pojmenována podle období, ve kterém by měla být prováděna – kolem svátku sv. Anny (26. 7.). První variantou metody je odstranění všech plástů s plodem, do úlu jsou místo nich vloženy prázdné souše, do kterých matka může klást. Než se však ve včelstvu objeví nový plod, soustředí se všichni kleštici na dospělých včelách, ze kterých je možné je odstranit před zavíčkovaním plodu přeláčením pomocí přípravků „lehké“ nebo „těžké“ chemie. Při druhé variantě metody je možné v úlu ponechat jeden plást s otevřeným plodem, na tento plást se soustředí všichni kleštici v úlu. Po zavíčkování je plást s napadeným plodem z úlu odstraněn a zničen, vývoj včelstva je však po tomto zásahu o 1 až 2 týdny opožděn. Jako alternativní možnost může být včelstvo přemetené na mezistěny.

### 3.4.2 Chemické metody boje proti varroóze – „lehká chemie“

Látky řazené do kategorie „lehká chemie“ jsou přírodního původu. Jejich hlavní výhodou je, že při jejich správné aplikaci nehrozí nebezpečí vzniku škodlivých reziduí ve včelích produktech. Důležité je nepřekračovat používané množství účinné látky a dodržovat předepsaný způsob aplikace. V opačném případě může dojít ke znehodnocení medu, případně k poškození nebo otravě včel (Čermák *et al.*, 2016).

Mezi základní látky „lehké chemie“ patří některé organické kyseliny (mravenčí, mléčná a šřavelová) a thymol řadící se k monoterpenům (Čermák *et al.*, 2016).

#### 1. Kyselina mravenčí

Pro účel tlumení varroózy je ve světě pravděpodobně nejdéle používanou látkou. Aplikuje se ve formě odparných nosičů, které se umísťují do horních prostor úlu, uvolňované páry kyseliny jsou těžší než vzduch a klesají. Není vhodné dávat odparníky do přímého kontaktu s plodovými plásty, ideální vzdálenost jejich umístění je do 20 centimetrů nad plodem. Jako podložka odparníku se využívají horní loučky rámků (Čermák *et al.*, 2016).

Účinkuje na roztoče nacházející se jak na dospělých včelách, tak v plodu, zde je ovšem účinnost nižší. Pokud je v úlu zavíčkovaný plod, je třeba aplikaci kyseliny mravenčí provést i po jeho vylíhnutí. U dělničího plodu minimálně po 12 dnech, u trubčího po 14 dnech. Čermák *et al.* (2016) uvádí, že při použití kyseliny mravenčí na roztoče uzavřené v plodových buňkách se část samic kleštika líhla poškozená a neschopná rozmnožování, případně nebyly schopné se spářit se samcem.

Z hlediska délky působení se rozlišují odparné systémy krátkodobé (účinnost 2–4 dny) a dlouhodobé (2–3 týdny). U obou lze používat koncentrovanější kyselinu mravenčí (85%) nebo méně koncentrovanou (65%), která je z hlediska bezpečnosti včel preferovanější (Čermák *et al.*, 2016).

Odparné systémy je možné používat od jara do podzimu při teplotách od 15 do 25 °C. Při nižších teplotách dochází ke snížení účinnosti, včely se totiž shlukují a nejsou rovnoměrně rozprostřeny po plástech. Při vyšších teplotách se zvyšuje riziko poškození včel, protože i když je kyselina mravenčí látkou přírodní a pro včely přirozenou, ve vyšších koncentracích na ně může působit toxicky. Při výběru používané koncentrace kyseliny mravenčí je vždy nutné vzít v úvahu všechny okolnosti, ať už velikost úlu, včelstva, sílu napadení kleštíkem, nadmořskou výšku stanoviště, teplotu, vlhkost a celkový vývoj počasí, proto je její používání při léčení včelstev poměrně náročné. Při nesprávném použití hrozí ztráta včelstva (Čermák *et al.*, 2016).

Oficiálním systémem využívajícím působení kyseliny mravenčí je přípravek Formidol ve variantách **Formidol 41 g** a **Formidol 81 g proužky do úlu**. Odpařovací systém je tvořen celulózovou deskou napuštěnou 85% kyselinou mravenčí, s obalem umožňujícím regulaci dávkování. Celková doba ošetření činí 4 dny, systém je možné použít jednou nebo dvakrát za rok. Účinkuje také proti nosemoze (původcem onemocnění jsou hmyzomorka včelí *Nosema apis* a dosud česky nepojmenovaná hmyzomorka *Nosema ceranae*) a zvápenatění včelího plodu (původcem je houba *Ascospaera apis*), který je tak včelami intenzivněji odstraňován (Čermák *et al.*, 2016). Přípravky se nesmějí používat v období snůšky, kdy je v úlu med určený pro konzumování (obecně od 16. 4. do 30. 9.) (Kamler *et al.*, 2014). Z dlouhodobě působících odpařovacích systémů lze jmenovat odpařovače Nassenheider, Yannick, MiteGone a Liebigův odpařovač v různých úpravách, které však nejsou v České republice oficiálně povoleny (Čermák *et al.*, 2016). Liebigovy deskové odpařovače se skládají z plochého nosiče umístěného na rámcích a odpařované kyseliny (většinou 65%, nelze u nich regulovat rychlost odparu) (Kamler *et al.*, 2014; Čermák *et al.*, 2016).

V České republice je od února roku 2017 oficiálně povoleno používat při léčení včel proti varroóze nově schválený přípravek VarroMed, který sestává z kombinace působení kyseliny mravenčí a kyseliny šťavelové. Oficiálně je tento přípravek registrovaný pod názvy **VarroMed 5 mg/ml + 44 mg/ml** a **VarroMed 75 mg/ml +**

**660 mg/ml** (koncentrovanější varianta balení léčivého přípravku). Aplikuje se pokapem ve formě disperze na včely na obsazených místech v plodišti, přípravek by neměl být používán v období produkce medu (Anonymous15, 2017; Anonymous16, 2017). Po aplikaci přípravku byla v preklinických a klinických studiích velmi často pozorována zvýšená mortalita dělnic, která je spojována s působením kyseliny šťavelové obsažené v přípravku VarroMed po jeho opakovaném použití nebo nesprávném dávkování (Anonymous16, 2017).

## 2. Kyselina mléčná

Aplikuje se na dospělé včely ve formě aerosolu 15% roztoku L(+) formy kyseliny mléčné při teplotách do 25 °C. Na roztoče v zavíčkovaném plodu nepůsobí. Využívá se především na ošetření oddělků nebo smetenců, případně v produkčních včelstvech bez plodu v zimním období. Při postřikání je nutné odebrat postupně všechny rámy obsazené včelami a z obou stran je orosit, celkem dvakrát s odstupem několika dní, což může být u velkého produkčního včelstva nepraktické (Pohl, 2008). V České republice zatím není její používání při léčení včel oficiálně povoleno (Čermák *et al.*, 2016).

## 3. Kyselina šťavelová

Při léčení lze použít kyselinu šťavelovou ve formě jejího cukerného roztoku o 3,5 až 4,5% koncentraci nebo kyselinu v pevném stavu, která sublimuje za použití speciálního vyvíječe. Při vhánění sublimované formy do úlu není třeba používat velké množství kyseliny, účinnost aplikace je vysoká. V České republice je oficiálně od února 2017 povoleno používat přípravek VarroMed s jejím podílem, jmenovaný výše (Anonymous15, 2017; Anonymous16, 2017). Kyselina šťavelová je hlavní složkou přípravku **Oxovar 41 mg/ml**, jehož používání k léčení včelstev je povoleno od 2. 2. 2017 (Anonymous16, 2017). Přípravek je určený k ošetření včelstev bez plodu pokapem ve formě cukerného roztoku obsahujícího rozpuštěnou účinnou látku kyselinu šťavelovou nebo aerosolem vháněným do úlu pomocí speciálního vyvíječe (Anonymous17, 2017).

Používání kyseliny šťavelové v jiné formě, než jsou registrované přípravky VarroMed a Oxovar, není v České republice na rozdíl od jiných evropských zemí (například Rakouska, Německa nebo Velké Británie) oficiálně povoleno (Čermák *et al.*, 2016; Anonymous21, 2017). Pokud se kyselina šťavelová aplikuje na včelstvo vícekrát

za rok, je nutné, aby se v něm pokaždé nacházela nová generace včel. Jak zmiňují Čermák *et al.* (2016), její nevýhodou je omezení vstřebávání vápníku do těla včel. Gregorc *et al.* (2004) uvádějí, že není vhodné ji používat, pokud se ve včelstvu nachází plod z důvodu možného poškození buněk sliznice střeva několikadenních včelích larev. Dále ovšem píše, že většina poškozených buněk střevní sliznice je po poškození rychle nahrazena buňkami novými. Kyselina šťavelová je vhodná na ošetření rojů, smetenců nebo mladých včelstev bez zavíčkovaného plodu (Pohl, 2008) a jako ekvivalent fumigačního ošetření syntetickými varroacidy (Čermák *et al.*, 2016).

Ve spojitosti s kyselinou šťavelovou se spekuluje o možnosti jejího pronikání do včelích produktů, především do medu. I když je tato kyselina v malých množstvích v medu přirozeně přítomná, není žádoucí, aby se v něm vyskytovala ve větší koncentraci, což by mohlo negativně ovlivňovat především jeho chuť. Bylo potvrzeno, že kyselina šťavelová se do medu dostává přirozenou činností včel, nicméně není známo, zda se do něj dostává z nektaru, nebo pylu (Čermák *et al.*, 2016). Kyselinu šťavelovou je možno najít ve stopových množstvích přímo v některých tkáních včel (Nozal *et al.*, 2003). Obsah organických kyselin v medu silně kolísá, kyseliny šťavelové může být přítomno 8–300 mg/kg, pro srovnání kyseliny mravenčí 9–1 229 mg/kg (Daníhlík, 2008).

#### 4. Thymol

V koncentraci, ve které se thymol uvolňuje při léčení do úlu, je pro samice kleštíka včelího toxický. Dochází k usmrcení roztočů přichycených na včelách. Kromě thymolu jsou k léčení včelstev neoficiálně používány také další terpenické silice působící stejný účinek, jako je například menthol či limonen (Čermák *et al.*, 2016).

Přípravky s obsahem thymolu se aplikují na horní loučky plástů, nechávají se v úlu po dobu 6–8 týdnů, jsou jimi eliminováni i roztoči nacházející se na počátku aplikace v plodu. Prodlužování délky ponechání přípravku v úlu není vhodné, mohou se po něm objevovat nežádoucí rezidua látek v medu a vosku. Při ošetřování včelstev je vhodné umístit thymolové vyvíječe do všech úlů na stanovišti, thymolový zápach totiž vede k nerozpoznání loupících včel v úlu domovskými včelami (Čermák *et al.*, 2016).

Thymol je vhodnou alternativou místo použití kyseliny mravenčí. Jeho výhodou je možnost použití při vyšší vzdušné vlhkosti. Teplota vzduchu by neměla klesnout pod 15 °C (Pohl, 2008). V České republice jsou registrovány dva přípravky obsahující

thymol, určené primárně k ošetření zimní generace včel: **Thymovar, 15 g proužky do úlu pro včely** a **Apiguard 25% thymol**. Thymovar je aplikován formou proužků z materiálu na bázi celulózy, napuštěných účinnou látkou. V jednom proužku je 15 g thymolu. Apiguard se aplikuje ve formě gelu, v jedné dávce je 12,5 g thymolu (Pohl, 2008). Přípravky se nesmějí používat v období snůšky, kdy je v úlu med určený pro konzumování lidmi. Plásty v plodišti, které byly během léčby přípravkem přítomny v úlu, se nesmějí vytáčet v průběhu následujícího jara.

### 3.4.3 Chemické metody boje proti varroóze – „těžká chemie“

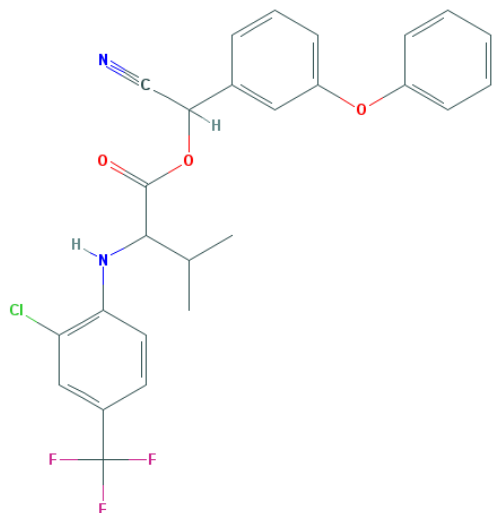
Pod pojmem „těžká chemie“ si je třeba ve spojitosti s přípravky pro boj proti kleštíkovi představit syntetické akaricidy. V zásadě obsahují dvě skupiny účinných látek. První z nich jsou syntetické pyrethroidy: tau-fluvalinát, flumethrin a acrinathrin, druhou zastupuje amitraz. Používány jsou od 80. let 20. století, všeobecně získaly oblibu uživatelů krátce po svém uvedení na trh. Hlavní výhodou je jejich snadná aplikace a vysoká účinnost. Ta ovšem začala postupem let klesat, i když se dávky používaného léčiva nezmenšovaly (Čermák *et al.*, 2016). Do popředí se začala dostávat myšlenka možného vzniku rezistence roztočů k akaricidům, která byla brzy poté potvrzena. První známka rezistence na účinnou látku tau-fluvalinát byla zaregistrována v severozápadní Itálii kolem roku 1991. Následně byli rezistentní roztoči nacházeni napříč celou kontinentální Evropou a rovněž ve Velké Británii (Martin, 2004). V některých zemích dosáhlo množství rezistentních populací kleštíků takových hodnot, že je v nich používání syntetických akaricidů naprosto bezúčelné. U skupiny pyrethroidních léčiv byla prokázána rezistence křížová – pokud vznikne rezistence na jednu účinnou látku v rámci této skupiny, jsou zároveň neúčinné i látky ostatní, kvůli podobné chemické struktuře a systému působení. Dalším negativem používání syntetických látek je vznik reziduí ve včelích produktech při jejich nesprávném dávkování, především ve vosku. Vosk je povahou hydrofobní a syntetické akaricidy jako látky v tomto smyslu stejné povahy se v něm snadno rozpouštějí.

V textu následuje výčet přípravků určených pro tlumení varroózy, obsahujících jako účinnou látku syntetické pyrethroidy (tau-fluvalinát, flumethrin a acrinathrin) nebo amitraz, používaných na území České republiky (Kamler *et al.*, 2014). Strukturální vzorce výše jmenovaných sloučenin jsou uvedeny na obrázcích 4a)–d). Aktuálnost uvedených

informací o léčivých přípravcích byla hodnocena porovnáním se seznamem Veterinárních léčivých přípravků schválených a registrovaných Ústavem pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv (Anonymous7, 2016).

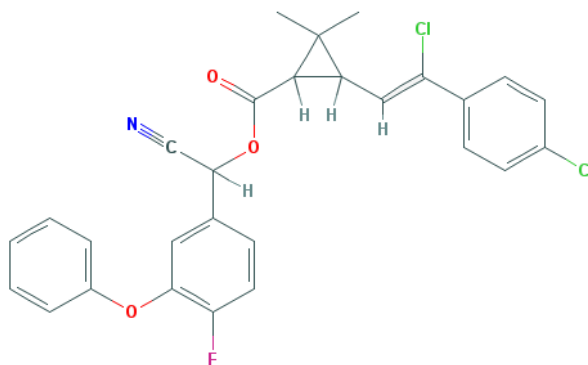
**Obrázek 4: Chemická struktura akaricidních sloučenin obsažených v syntetických varroacidech.**

**a) Tau-fluvalinát**



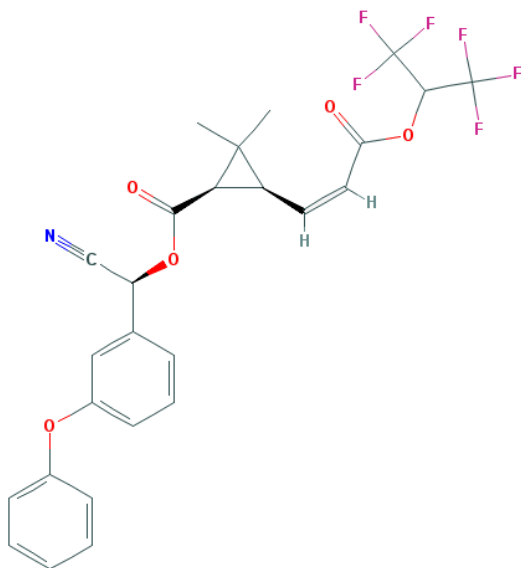
(Anonymous18, 2017)

**b) Flumethrin**



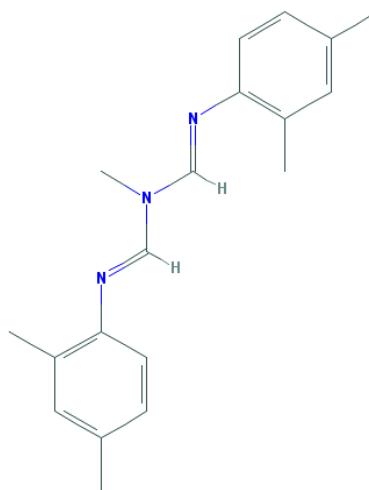
(Anonymous19, 2017)

**c) Acrinathrin**



(Anonymous20, 2017)

**d) Amitraz**



(Anonymous21, 2017)



## **Účinná látka tau-fluvalinát**

### **M-1 AER 240 mg/ml**

Přípravek lze aplikovat aerosolem, pokud se včely nacházejí v zimním hroznu, nebo nátěrem víček plodu vodní emulzí přípravku. Dávkuje se 5 kapek přípravku do 50 ml vody. Aerosolová forma nepůsobí na roztoče v plodu, nátěr víček plodových buněk na zavíčkované roztoče působí, neúčinkuje však na jejich vajíčka. Nelze používat, pokud je v úlu med určený pro konzumování lidmi. Vhodné období používání přípravku je přibližně od 1. 10. do 15. 4. Přípravek je dostupný na veterinární předpis. Je účinný také proti houbě patřící do třídy hmyzomorky (Microsporidia), hmyzomorce včelí *Nosema apis* a příbuznému druhu *Nosema ceranae* (Kamler *et al.*, 2014; Anonymous7, 2016).

### **MP 10 FUM 24 mg/ml**

Aplikuje se fumigací v množství 2 kapky přípravku na jeden obsednutý nástavek, neobsednuté nástavky se nepočítají. Princip fumigace spočívá v uvolňování účinné látky z doutnajících zapálených fumigačních proužků, které jsou tvořené přírodním materiálem (většinou celulósovým) a jsou impregnované směsí dusičnanů, umožňujících uvolňování navázané účinné látky nakapané na proužky. Fumigace se provádí při teplotách nad 10 °C, kdy včely nelétají. Přípravek je dostupný na veterinární předpis (Kamler *et al.*, 2014; Anonymous7, 2016).

### **Gabon PF 90 mg**

Aplikuje se pomocí pásků s dlouhodobým účinkem, jeden pásek obsahuje 90 mg tau-fluvalinátu. Jedná se o kontaktní antiparazitikum určené zejména k ochraně zimní generace včel v podletí a na podzim, ve včelstvu je v tuto dobu zavíčkovaný plod. Účinná látka je zabudovaná v polymerní směsi z termoplastického kaučuku, tvoří mikrovrstvu na povrchu proužku z gabonového dřeva. Po instalaci difunduje na povrch proužku, odkud se dostává na těla včel, které jsou s proužkem v kontaktu. Na ostatní včely se roznáší jejich vzájemným kontaktem. Roztoči jsou zasaženi při přímém kontaktu s účinnou látkou ulpělou na tělech včel.

Používají se 2 pásy na jeden a další 1 pásek na další plodový nástavek. Ponechávají se ve včelstvu po dobu odchovu dvou generací zavíčkovaného plodu (24–30 dní). Nepoužívají se, pokud je v úlu med určený pro konzumování lidmi. Přípravek je dostupný na veterinární předpis (Kamler *et al.*, 2014; Anonymous7, 2016).

### **Účinná látka flumethrin**

#### **Gabon Flum 4 mg proužky do úlu**

Přípravek je aplikovaný kontaktními pásky s dlouhodobým účinkem, které se svisle zavěšují mezi plodové pláсты. Pro léčbu středně silného včelstva se do úlu umísťují dva pásky napuštěné účinnou látkou. Ty se ve včelstvu ponechávají po dobu dvou period zavíčkovaného plodu, tedy 24 dní během léčby dělničího plodu a 30 dní, pokud je přítomen trubčí plod. V případě reinvaze roztoče je možné prodloužit expozici maximálně o jednu periodu zavíčkovaného dělničího plodu (o 12 dní) po poradě s odpovědnou osobou – přípravek se momentálně nachází v klinickém testování.

Gabon Flum 4 mg se používá převážně v podletí k ochraně zimní generace včel (Anonymous9, 2014).

### **Účinná látka acrinathrin**

#### **Gabon PA 1,5 mg proužky do úlu**

Dříve byl známý pod označením Gabon PA 92. Přípravek je aplikovaný kontaktními pásky s dlouhodobým účinkem jejich zavěšením mezi plodové pláсты. Středně silná včelstva jsou léčena dávkou obsaženou ve dvou páscích. Pásky se ve včelstvu ponechávají po dobu dvou period zavíčkovaného plodu, tedy 24 dní během léčby dělničího plodu a 30 dní, pokud je přítomen trubčí plod. V případě reinvaze roztoče je možné prodloužit expozici maximálně o jednu periodu zavíčkovaného dělničího plodu (o 12 dní) po poradě s odpovědnou osobou.

Gabon PA 1,5 mg se nachází v klinickém testování, protože acrinathrin jako léčivá látka není zatím v Evropské unii zavedena. Po změně legislativy týkající se veterinárních přípravků byl z této kategorie z nařízení Komise Evropské unie vyrazen a od roku 2010 musí být registrován jako lék. Používá se k ochraně zimujících včel. Působí také na včelomorku obecnou *Braula coeca* patřící do řádu dvoukřídlí (Diptera) (Anonymous8, 2003; Veselý, 2010).

### **Účinná látka amitraz**

#### **Varidol**

Aplikuje se fumigací nebo aerosolem. Aplikace aerosolem se provádí v zimě, když se včely nacházejí v zimním hroznu. Aerosol vháněný do úlu pomocí kompresoru a speciálního vyvíječe proniká mezi včely. Účinná látka, předem připravená jako vodní

emulze (při teplotách nad 10 °C) nebo acetonový roztok (při teplotách od -5 do 10 °C), se vthání česnem do úlu. Při použití acetonu je doba aplikace 30 sekund, při použití vody 2 minuty.

Amitraz působí na roztoče nacházející se na včelách, do zavíčkovaného plodu neproniká a není zde účinný. Varidol se nesmí používat v období snůšky, kdy je v úlu med určený pro konzumování lidmi (obecně od 16. 4. do 30. 9.). Přípravek je dostupný na veterinární předpis (Kamler *et al.*, 2014; Anonymous7, 2016).

#### **Apitraz 500 mg**

Přípravek je aplikován pomocí plastových proužků napuštěných účinnou látkou amitrazem v celkovém množství dvou proužků na jeden úl, které se zavěsí mezi dva rámy. Přípravek by se měl používat v době, kdy včelstvo nedosahuje své maximální velikosti, ale je stále aktivní (netvoří zimní hrozen). Po aplikaci není vhodné šest týdnů vytáčet med. Proužky je z úlu nutné odstranit po šesti týdnech léčby, není jej vhodné používat na léčení včelstev napadených roztoči, u kterých byla zaznamenána rezistence na amitraz (Anonymous7, 2016; Anonymous10, 2017).

### **3.4.3.1 Tau-fluvalinát a princip jeho účinnosti**

Tau-fluvalinát se řadí mezi syntetické pyrethroidy, deriváty přirozeně se vyskytujících insekticidních pyrethrinů získaných z chryzantémy (*Chrysanthemum* spp.), které ovlivňují funkci sodíkového kanálu živočichů (Narahashi, 1988). Struktura molekuly je vyobrazena na obrázku 4a). Základní molekula fluvalinátu obsahuje 4 cykly, molekula vlastního tau-fluvalinátu je složená pouze ze 2 diastereoizomerních cyklů, které jsou zodpovědné za insekticidní působení látek s jejich obsahem (Anonymous11, 2016). Sumární vzorec tau-fluvalinátu je  $C_{26}H_{22}ClF_3N_2O_3$ , dle IUPAC nomenklatury nese sloučenina název (RS)- $\alpha$ -kyano-3-fenoxybenzyl-*N*-(2-chloro- $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluoro-*p*-tolyl)-*D*-valinát (Anonymous12, 2016). V těle živočichů se rozpadá na metabolity – kyselinu anilinovou a haloanilin. Patří do pyrethroidů skupiny II, která se od pyrethroidů skupiny I liší přítomností funkční  $\alpha$ -kyano skupiny na fenoxybenzylalkoholu (Anonymous12, 2016).

Iontové kanály jsou bílkovinné struktury prostupující plazmatickou membránou buněk, podílejí se na transportu iontů mezi oběma stranami membrány, protože ta je za normálních okolností pro nabitě částice neprostupná. Sodíkový kanál transportuje ionty sodné, je složený z velké  $\alpha$ -podjednotky formující transmembránový pór a několika

malých auxilárních  $\beta$ -podjednotek (Dong, 2007). V reakci na změnu elektrického potenciálu na membráně buněk se sodíkový kanál otevírá, sodné ionty procházejí přes membránu buněk do vnitrobuněčného prostoru a membránu depolarizují. Uzavření sodíkového kanálu se děje v reakci na proudění draselných iontů přes plazmatickou membránu v opačném směru přes sousední draselné kanály. Tímto mechanismem dochází k šíření nervového vzruchu přes axony nervových buněk (Dong, 2007). Pyrethroidy skupiny II způsobují trvalé otevření sodíkového kanálu, depolarizaci membrány a supresi akčního potenciálu (Dong, 2007).

### 3.5 Genom kleštíka včelího

Velikost genomu kleštíka byla stanovena pomocí průtokové cytometrie na  $565 \pm 3$  Mbp (normalizováno podle DNA *Drosophila virilis*) (Cornman *et al.*, 2010). Je větší než genom zástupců třídy hmyzu, nicméně nedosahuje takové velikosti jako genomy příbuzných klíšťat a dalších roztočů (více než 2 000 Mbp). Genomy roztočů vykazují vysokou variabilitu obsahu DNA. Není jasné, zda ke zvětšení genomu kleštíka došlo vlivem nárůstu podílu nekódující DNA, nebo v důsledku polyploidizace (Cornman *et al.*, 2010). V genomu kleštíka byly detekovány rozsáhlé oblasti tvořené LTR transpozóny (*long-terminal repeats*), LINEs (*long interspersed nuclear elements*), spolu s otáčivě se replikujícími helitrony a aktivně se přemísťujícími elementy, které přispívají ke genomové evoluci (Cornman *et al.*, 2010).

Ve srovnání s klíštětem *Ixodes scapularis*, patřícím do blízce příbuzného řádu (Ixodida) odděleného před  $336 \pm 26$  miliony let (Jeyaparakash *et Hoy*, 2009), dochází u kleštíka k rychlejší aminokyselinové evoluci. I přes samčí haploiditu a páření, ke kterému dochází jen mezi sourozenci, není u kleštíka redukován genetický polymorfismus, ten v populacích zůstává poměrně vysoký. K jeho zachování přispívá mísení populací odlišných vývojových linií (Cornman *et al.*, 2010). Polymorfismus populací roztoče lze vyšetřovat například díky identifikaci polymorfních mikrosatelitních lokusů v genomické DNA (Solignac *et al.*, 2003; Beaurepaire *et al.*, 2015).

Známa je kompletní cDNA sekvence genu pro sodíkový kanál kleštíka včelího (označení para genu pro sodíkový kanál tohoto roztoče je *VmNa*) (GenBank AY259834), který je orthologem para genu pro sodíkový kanál, jehož sekvence byla jako první získána analýzou DNA octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*). Dále

jsou známy také nekompletní genomické DNA sekvence kleštíka včelího (GenBank ADDG00000000, FJ216961, FJ216962, FJ216963, KC152657, KC152655) nebo cDNA sekvence (GenBank AY144351) (Hubert *et al.*, 2013) a sekvence více než 17 dalších genů (Anonymous13, 2016).

### **3.6 Vznik rezistence kleštíka včelího k tau-fluvalinátu v souvislosti s bodovými mutacemi v genu pro sodíkový kanál**

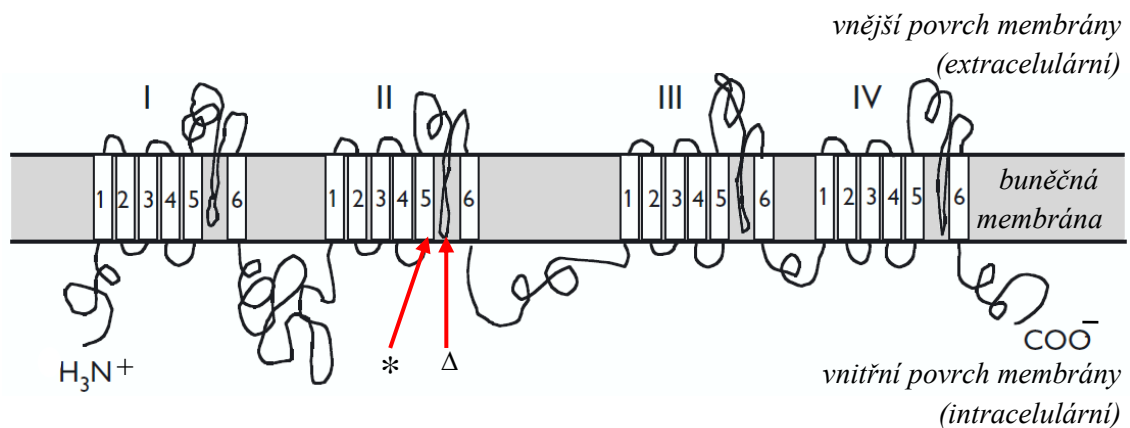
Snížení senzitivity sodíkového kanálu k pyrethroidům a DDT (dichlordifenyltrichlorethan), známé jako *knockdown resistance (kdr)*, vzniká v důsledku jedné nebo více bodových mutací v para genech roztočů nebo hmyzu (Hubert *et al.*, 2013). Na strukturní a funkční variabilitu produktů genu mají vliv dva mechanismy – alternativní sestřih a editace RNA (Wang *et al.*, 2003; Dong, 2007). Bylo objeveno více než 10 typů bodových mutací genu pro sodíkový kanál vyskytujících se u roztočů nebo hmyzu. Mutace objevující se u dalších taxonů se však ve většině nevyskytují u kleštíka (Wang *et al.*, 2002). Při porovnávání sekvencí genu pro sodíkový kanál populací kleštíků (*VmNa*) byly detekovány další bodové mutace, které nemají vliv na vznik rezistence, ale svědčí pouze o odlišném původu těchto populací kleštíků (Wang *et al.*, 2002).

Proteinový produkt *VmNa* genu je organizovaný do čtyř homologních domén, každá doména je tvořena šesti transmembránovými segmenty (obrázek 5). Místo vazby pyrethroidů na sodíkový kanál roztočů a hmyzu se nachází v hydrofobní dutině formované segmenty 4–5 (S4–S5) (helikální spojka) domény II (DII), helixy segmentů S5 domény DII a S6 domény DIII, a P-smyčkou domény DII (O'Reilly *et al.*, 2013). Schematické zobrazení produktu *VmNa* genu je viditelné na následujícím obrázku 5. Lipofilní pyrethroidy vykazují vysokou nespecifitu vazby na plazmatickou membránu buněk (Dong, 1993). Nejvíce *kdr* mutací je spojeno se segmentem S5 domény DII, segmentem S5 domény DIII a spojkou spojující oblasti segmentů S4 a S5 domény DII (Wang *et al.*, 2002; O'Reilly *et al.*, 2006).

Proteiny *VmNa* mají stejné aminokyselinové složení charakteristické pro všechny napětím řízené sodíkové kanály. Polarita aminokyselin dává kanálu potřebné fyzikálně-chemické vlastnosti. Například transmembránový segment S4 všech sodíkových kanálů, které jsou doposud známé, obsahuje 4–8 pozitivně nabitých

aminokyselin nacházejících se na každé třetí pozici. Slouží jako napěťový senzor, který iniciuje napětím řízenou aktivaci kanálu (Catterall, 2000). Intracelulární spojka domén DIII a DIV hraje roli v rychlé inaktivaci sodíkového kanálu (Catterall, 2000). Typický je dále motiv aminokyselin D, E, K a A (dle pořadí: asparagová kyselina, glutamová kyselina, lyzin a alanin) (pravděpodobně formující pór kanálu) ve spojnici segmentů S5 a S6 domén DI–IV, který je nezbytný pro selektivitu kanálu k sodnému iontu (Catterall, 2000).

**Obrázek 5: Předpokládaná organizace produktu *VmNa* genu pro sodíkový kanál kleštíka včelího, zobrazeny jsou čtyři homologní domény (I–IV), přičemž je každá rozdělená do šesti transmembránových segmentů (1–6).**



(Převzato a upraveno podle Wang *et al.*, 2002)

*Legenda:* \* ... místo mutace nukleotidu C(3004)→G v segmentu S5 domény DII

Δ ... místo mutace nukleotidu T(3154)→C v P-smyčce domény DII

Hubert *et al.* (2013) analyzovali nukleotidovou sekvenci fragmentu *VmNa* genu kleštíka včelího, obsahující pozice častého vzniku *kdr* mutací, za použití 11 různých primerů pokrývajících segmenty S4–S6 domény DII a 3'-koncovou oblast segmentu S4 domény DIII. Během analýzy fragmentů segmentů S4–S6 domény DII (zahrnuje nukleotidové pozice 2805–3337) a 3'-koncové oblasti segmentu S4 domény DIII (zahrnuje nukleotidové pozice 4737–6500) *VmNa* genu, u populací kleštíka rezistentních a vnímavých k tau-fluvalinátu, nebyly detekovány mutace vedoucí ke změně aminokyseliny zařazované při translaci ve fragmentu 3'-koncové oblasti segmentu S4 domény DIII. Tyto mutace však byly objeveny ve fragmentech segmentů S4–S6 domény DII na nukleotidových pozicích 3004 a 3154 (odpovídají jim

aminokyseliny na pozicích 1002 a 1052) u rezistentních populací kleštíka. Ve výsledku byly zaznamenány čtyři možné kombinace aminokyselin vyskytujících se na těchto dvou mutovaných pozicích: Leu(1002)–Phe(1052), Leu(1002)–Leu(1052), Val(1002)–Phe(1052) a Val(1002)–Leu(1052).

Jako klíčová pro aminokyselinovou substituci a vznik rezistence kleštíků k tau-fluvalinátu byla určena bodová mutace v DNA v segmentu S5 domény DII: C(3004)→G, která vedla k substituci Leu(1002)→Val (kodon CTG→GTG). Vyskytovala se u všech rezistentních populací kleštíka a v žádné populaci vnímavé. Druhá nalezená mutace v P–smyčce domény DII: T(3154)→C, po níž následovala substituce Phe(1052)→Leu (kodon TTC→CTC), nebyla s určitostí označena jako roli hrající ve vzniku rezistence, vyskytovala se ve struktuře sodíkového kanálu v populacích kleštíků rezistentních i vnímavých k tau-fluvalinátu. Lokalizace vzniku obou mutací je uvedena na obrázku 5 (označeno šipkami).

Hubert *et al.* (2013) ve své práci uvádějí, že se na nukleotidové pozici 3156 v blízkosti nukleotidu 3154 postihovaného mutací nachází cytosin (jedná se o C v kodonu TTC, který kóduje aminokyselinu Phe na pozici 1052 viz předchozí odstavec) (GenBank KC152655.2). Nicméně Wang *et al.* (2003), kteří jako první publikovali sekvenci genu pro sodíkový kanál (GenBank AY259834.1), uvádějí, že se na nukleotidové pozici 3156 nachází guanin (jedná se o G v kodonu TTG, který kóduje aminokyselinu Leu na pozici 1052).

Populace kleštíka včelího vnímavé k tau-fluvalinátu, odebrané v České republice, které analyzovali Hubert *et al.* (2013), se tedy liší nukleotidem nacházejícím se na pozici 3156 od populací kleštíků z Floridy a z areálu Michiganské státní univerzity analyzované Wangem *et al.* (2003), což vede v průběhu translace genetické informace přepsané do mRNA k zařazení odlišné aminokyseliny do vznikajícího polypeptidového řetězce (fenylalaninu místo leucinu).

Výskyt fenylalaninu na odpovídající aminokyselinové pozici 1052 genu pro sodíkový kanál kleštíka včelího byl zaznamenán kromě populací kleštíka z České republiky také v konzervované sekvenci sodíkového kanálu jedinců *Drosophila melanogaster* (označení sekvence: *Drosophila para*) a sekvenci s názvem Nav1.2 Rat brain II získané sekvencí krysí DNA (Wang *et al.*, 2003).

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Biologický materiál

Biologický materiál ve formě včelí měli obsahující roztoče byl poskytnut třemi včelaři (šest lokalit) z okresů Frýdek-Místek (2 lokality), Chrudim (2 lokality) a Znojmo (2 lokality). Před samotnou izolací genomické DNA byli kleštíci z měli odebráni flotační metodou, spočívající v rozmíchání měli v 96% ethanolu. Postupným promícháváním směsi se roztoči vztlakem dostali k hladině, ze které byli odpipetováni do Petriho misky. Po očištění od zbylých drobných nečistot byli kleštíci tříděni do popsaných sterilních mikrozkuvek, ve kterých byli uchováváni v mrazicím boxu při -20 °C do doby, než byli použiti pro izolaci genomické DNA.

### 4.2 Izolace genomické DNA kleštíka včelího

Genomická DNA z 1–100 jedinců kleštíka včelího byla izolována za použití izolačního kitu Exgene™ DNA micro (GeneAll). Izolace byla prováděna na základě protokolu (část D, Izolace DNA z vlasů a částí nehtů), který byl přiložen v rámci manuálu ke kitu výrobcem spolu s dalším materiálem nutným pro izolaci.

Pufry byly po otevření uchovávány při pokojové teplotě (15–25 °C). Roztok 20 mg/ml proteinázy K, rozmíchaný v uchovávacím pufru pro proteinázu K, a 1 mol/l vodný roztok DTT (dithiothreitol) byly při častém používání skladovány v chladničce při 4 °C, při přerušení práce na dobu delší než 1 den pak v -20 °C.

Před plánovaným použitím byly roztoky proteinázy K a DTT umístěny do stojánku, kde při pokojové teplotě rozmrzly, následně byly zvortexovány a zcentrifugovány.

#### **Postup izolace genomické DNA ze vzorků kleštíka včelího:**

1. Předehřát digitální termoblok na 56 °C.
2. Vzorky jedinců kleštíka včelího, tříděné po 1–100 kusech, dát do 1,5ml mikrozkuvky, přidat 200 µl CL pufru a materiál v něm zhomogenizovat pomocí mikrohomogenizátoru.
3. Ke zhomogenizovanému materiálu přidat 20 µl 20 mg/ml roztoku proteinázy K a 20 µl 1 mol/l roztoku DTT, důkladně zvortexovat a inkubovat 1 hodinu při



56 °C v termobloku. Každých 10 minut mikroskopickou vortexovat pro lepší lyzi tkání kleštíků.

4. Digitální termoblok nastavit na 70 °C.
5. Materiál v mikroskopické 10 vteřin centrifugovat ve stolní centrifuze.
6. Ke směsi přidat 200 µl BL pufru, důkladně vortexovat. Inkubovat 10 minut při 70 °C v digitálním termobloku.
7. Materiál v mikroskopické 10 vteřin centrifugovat ve stolní centrifuze.
8. Ke směsi přidat 200 µl 96% ethanolu, vše důkladně vortexovat a 10 vteřin centrifugovat ve stolní centrifuze.
9. Přenést supernatant do mikrokolony se sběrnou nádobkou, centrifugovat 1 minutu při 6 000 G. Sběrnou nádobku vyměnit za novou.
10. Do mikrokolony přidat 500 µl BW pufru, centrifugovat 1 minutu při 6 000 G. Sběrnou nádobku vyměnit za novou.
11. Do mikrokolony přidat 700 µl TW pufru, centrifugovat 1 minutu při 6 000 G. Sběrnou nádobku vylít do odpadu a nasadit zpět pod mikrokolonu.
12. Centrifugovat na maximální otáčky 3 minuty pro odstranění zbytkového promývacího pufru. Mikrokolonu přenést do nové 1,5ml mikroskopické.
13. Do mikrokolony přidat 50 µl AE pufru nebo deionizované vody. Inkubovat 1 minutu při pokojové teplotě. Centrifugovat 1 minutu na maximální otáčky.
14. Vyizolovanou genomickou DNA jedinců kleštíka včelího uchovávat při -20 °C, během používání uchovávat v chladničce.

### **4.3 PCR amplifikace segmentů DNA kleštíka včelího**

PCR amplifikace segmentu genu pro sodíkový kanál kleštíka včelího, zahrnujícího analyzované pozice mutací měněných nukleotidů, byla vždy prováděna na DNA izolované z populace kleštíků z jednoho stanoviště. Pro amplifikaci byly použity dva typy PCR reakce. Jedna se prováděla s dvojicí primerů za účelem optimalizování podmínek amplifikace a pro účely detekce bodových mutací bylo zvoleno uspořádání PCR reakce se třemi primery v PCR amplifikační směsi. Výčet všech primerů používaných pro amplifikaci je uvedený v tabulce 6 (uvedena v oddílu 5 Výsledky) a základní složení PCR reakční směsi pro analýzu 3 vzorků je uvedeno v tabulce 5. Postup práce byl následující:

1. Rozmrazit složky PCR reakční směsi po vytažení z -20 °C, důkladně zvortexovat a zcentrifugovat.
2. Do 1,5ml mikrozkušavek napipetovat složky PCR reakční směsi podle složení uvedeného v tabulce 5. Směs důkladně zvortexovat a zcentrifugovat.
3. Do PCR mikrozkušavek napipetovat 2 µl vyizolované genomické DNA o koncentraci 10–50 µg/ml.
4. Do každé PCR mikrozkušavky připipetovat 18 µl PCR reakční směsi, důkladně zvortexovat a zcentrifugovat.
5. PCR mikrozkušavky vložit do termocykléru s nastaveným teplotním a časovým profilem dle schématu 1.

**Tabulka 5: Základní složení PCR reakční směsi pro amplifikaci 3 vzorků.**

Složky PCR reakční směsi	Pipetovaný objem (µl)	
	Varianta se dvěma primery	Varianta se třemi primery
Deionizovaná voda	40,4	38,2
Reakční pufr 10x	6,7	6,7
Roztok MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/l)	8,0	8,0
Roztok dNTPs (20 mmol/l)	0,7	0,7
Primer V10F* (10 µmol/l)	1,1	2,2
Primer V11R* (10 µmol/l)	1,1	1,1
Primer diagnostický** (10 µmol/l)	–	1,1
aTaq DNA polymeráza (5 U/µl)	1,0	1,0

\*\* Sekvence převzatých primerů V10F a V11R jsou uvedeny v tabulce 6 (tabulka 6 se nachází v oddílu 5 Výsledky).

\* Výčet diagnostických primerů a jejich sekvencí je rovněž uvedený v tabulce 6.

**Schéma 1: Základní teplotní a časový profil PCR reakce**

1. 94 °C .... 5 min
2. 94 °C .... 30 s  
 50 °C .... 30 s  
 72 °C .... 30 s } 35 cyklů
3. 72 °C .... 7 min

Pro jednu PCR amplifikační reakci byly použity dva nebo tři primery v dané PCR reakční směsi (viz tabulka 5). Výčet všech používaných primerů je uveden v tabulce 6 (nachází se v oddílu 5 Výsledky). Objem deionizované vody v PCR reakční směsi byl upravován v závislosti na objemu použitých primerů, respektive objemu roztoku MgCl<sub>2</sub> o koncentraci 25 mmol/l tak, aby byl celkový objem reakční směsi konstantní.

#### 4.4 Zpracování PCR produktů pomocí elektroforetické separace

Elektroforetická separace PCR produktů byla prováděna v horizontální elektroforetické komůrce HU10 (Scie-Plas), postup přípravy gelu a samotné separace byl následující:

1. Sestavit horizontální elektroforetickou komůrku do polohy pro nalití gelu a do bočních drážek vaničky vsadit hřebínek o 16 jamkách.
2. Připravit 1,5% roztok agarózového gelu, do zchlazeného roztoku připipetovat 2  $\mu$ l roztoku GoodView a roztok nalít do vaničky elektroforetické komůrky. Gel nechat tuhnout minimálně půl hodiny.
3. Vaničku v elektroforetické komůrce otočit o 90° jamkami k záporné elektrodě, komůrku naplnit TBE pufrem po vyznačenou rysku, hřebínek vyjmout.
4. Do první jamky gelu napipetovat 1,5  $\mu$ l markeru délky DNA smíšeného se stejným objemem nanášecího pufru, do ostatních jamek po 6  $\mu$ l PCR produktu smíšeného s nanášecím pufrem (4  $\mu$ l PCR produktu + 2  $\mu$ l nanášecího pufru).
5. Elektroforetickou komůrku uzavřít a připojit ke zdroji stejnosměrného elektrického proudu, na zdroji nastavit hodnotu 80 V.
6. Elektroforetickou separaci nechat probíhat 50 min, nebo dokud se bromfenolová modř nedostane do 1/2–2/3 délky gelu, poté vypnout zdroj a odpojit elektroforetickou komůrku.
7. Separované PCR produkty v gelu vizualizovat pomocí UV transiluminátoru.

#### 4.5 Software

Pro navržení diagnostických primerů a hodnocení kvality všech primerů používaných pro PCR amplifikaci jsem použila program Primer3 (Rozen *et* Skaletsky; 2000) dostupný online.

Porovnání nukleotidových sekvencí, podle kterých jsem navrhovala diagnostické primery, jsem provedla v programu Mega7 (Kumar *et al.*, 2016), který je volně přístupný ke stažení.

#### 4.6 Použité chemikálie

- 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs)
- Agarose Electrophoresis Grade, Ultra Pure (Life Technologies)
- Blue/Orange Loading Dye, 6x (Promega)
- Deionizovaná voda
- Ethanol 96% roztok (Lihovar Vrbátky)
- GeneRuler DNA Ladder 100 bp (Thermo Scientific)
- GoodView Nucleic Acid Stain (Sigma-Aldrich)
- Izolační kit Exgene<sup>TM</sup> Genomic DNA micro (GeneAll)
  - AE pufr (10 mmol/l Tris-HCl; pH 9,0; 0,5mmol/l EDTA)
  - BL pufr
  - BW pufr
  - CL pufr
  - Proteináza K 20 mg/ml roztok (rozpuštěna v uchovávacím pufru pro proteinázu K)
  - TW pufr

#### 4.7 Použité roztoky

##### Agarózový gel, 1,5% roztok:

- 50 ml TBE pufru
- 0,75 g agarózy

##### Dithiothreitol, 1 mol/l roztok:

- 0,15425 g dithiothreitolu (DTT)
- 1 ml deionizované vody
- připravený roztok uchovávat v mrazáku při -20 °C
- před použitím rozmrazit při pokojové teplotě

#### TBE pufr

- 5,5 g kyseliny borité ( $H_3BO_3$ )
- 10,8 g trishydroxymethylaminomethanu (Tris)
- 4,0 ml roztoku kyseliny ethylendiaminotetraoctové (EDTA) 0,5 mol/l, pH 8,0
- doplnit deionizovanou vodou na 1 l

#### **4.8 Použité laboratorní přístroje**

- Centrifuga Spectrafuge 16M (Labnet International)
- Digitální termoblok Dry Bath AccuBlock™ (Labnet International)
- Dokumentační systém G:Box (Syngene)
- Horizontální elektroforetická komůrka HU10 (Scie-Plas)
- Chladnička kombinovaná (Samsung)
- Laboratorní váhy PS 210.R2 (Radwag)
- Mikropipety Nichipet EX 0,5  $\mu$ l - 1 ml (Nichiryo)
- Mikrovlnná trouba (Daewoo)
- Minicentrifuga Spectrafuge mini (Labnet International)
- NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)
- Termocyklér TC-E s blokem D (BIOER Technology)
- Termocyklér TC-XP s blokem D PTC-100 (BIOER Technology)
- UV transiluminátor s dokumentačním systémem G:BOX (Syngene)
- Vortex mixer (Labnet International)
- Výrobník deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)
- Zdroj stejnosměrného elektrického proudu Power Station 300 (Labnet)

## 5 Výsledky

Cílem mé práce bylo optimalizovat podmínky a uspořádání PCR amplifikační reakce tak, aby touto reakcí bylo možné identifikovat přítomnost bodových mutací na nukleotidových pozicích 3004 a 3154 v genu pro sodíkový kanál kleštíka včelího, jejichž výskyt je spojován s jeho rezistencí k varroacidní látce tau-fluvalinátu.

Experimentální část práce jsem řešila postupně ve třech na sebe navazujících celcích: a) připravit kleštíky pro izolaci genomické DNA a tuto izolaci provést, b) navrhnout specifické diagnostické primery pro amplifikaci sledovaného úseku genu a c) sestavit vhodnou diagnostickou reakci se třemi primery v PCR reakční směsi a zoptimalizovat složení této reakční směsi, včetně podmínek pro PCR amplifikaci DNA kleštíka.

### **a) Příprava kleštíků pro izolaci genomické DNA, izolace genomické DNA**

Vzorky kleštíků jsem získala z vymetené včelí měli, kterou tvoří směsný odpad hromadící se na dně úlu pod obsazeným včelím dílem. Po vymetení měl 3 dny prosychala rozprostřená na podložce, poté jsem ji uchovávala v nádobách s prodyšným víkem v lednici, protože měl je náchylná k plesnivění.

Kleštíky jsem před izolací genomické DNA musela od včelí měli oddělit. Separaci kleštíků jsem provedla flotační metodou určenou k oddělování složek směsí na základě odlišné smáčivosti jejich povrchů. Ve své práci jsem použila pro flotaci roztok 96% ethanolu.

Vzorek měli jsem nasypala do 500ml kádinky a zalila ho 100 ml ethanolu, skleněnou tyčinkou jsem obsah kádinky rozmíchala na homogenní směs a poté jsem do kádinky přilila dalších 200 ml ethanolu. Po rozvření obsahu kádinky jsem kleštíky vyplavané na hladinu odpipetovala standardní 1ml automatickou pipetou pomocí špičky s ustřiženým koncem. Odpipetované kleštíky jsem přenesla do Petriho misky a po očištění od nečistot jsem je třídila do 1,5ml mikrozkušavek po 1–100 jedincích. Abych mohla provést izolaci genomické DNA, bylo nutné vytřídit ze vzorku měli minimálně jednoho kleštíka. Ze tří vzorků včelí měli jsem nezískala žádného kleštíka.

Izolaci genomické DNA kleštíků jsem prováděla pomocí izolačního kitu Exgene™ Genomic DNA micro (GeneAll) podle přiloženého laboratorního protokolu určeného pro izolaci genomické DNA z vlasů a nehtů, který jsem vyhodnotila jako

typově nejvhodnější. Vsádku kleštíků v 1,5ml mikrozkuhavce jsem rozetřela mikrohomogenizátorem v 200 µl CL pufru, další průběh izolace jsem prováděla podle výše zmíněného postupu uvedeného v izolačním protokolu kitu Exgene™ Genomic DNA micro (GeneAll).

Testováním vsádek obsahujícím 1–300 kleštíků jsem stanovila jako nejvhodnější pro izolaci vsádku 50 jedinců. Při tomto počtu kleštíků nehrozilo ucpání izolační kolony a vylučovala jsem DNA o čistotě vhodné pro PCR amplifikaci. Po vymytí DNA zachycené v izolační koloně 50 µl deionizované vody jsem získala DNA o koncentraci 100–300 µg/ml (průměrná hodnota koncentrace činila 200 µg/ml). Vyšší počet kleštíků ve vsádce než je 50 jedinců výrazně nezvyšuje koncentraci vyizolované genomické DNA.

#### **b) Navržení diagnostických primerů pro PCR amplifikaci DNA kleštíka včelího**

Detekci bodových mutací postihujících nukleotidové pozice 3004 a 3154 v genu pro sodíkový kanál, které byly detekovány ve vztahu k rezistenci kleštíka včelího k tau-fluvalinátu, jsem se rozhodla provádět pomocí PCR amplifikační reakce se třemi primery v PCR reakční směsi.

K dispozici jsem již měla dva protisměrně orientované primery – V10F (primer nasedá na pozici 2786–2805) a V11R (primer nasedá na pozici 3250–3232), převzaté od Huberta *et al.* (2013). Tyto dva primery jsem pro amplifikaci DNA použila, protože amplikon, který pomocí nich vzniká, obsahuje nukleotidové pozice 3004 a 3154. Pozice nasednutí primerů V10F a V11R na templátovou DNA je uvedena ve schématu 1.

K přímému určení přítomnosti či absence bodové mutace v DNA má podle teoretického předpokladu sloužit diagnostický primer. Navrhovala jsem dvě skupiny diagnostických primerů – jednu pro určení bodové mutace nukleotidu 3004, a druhou pro detekci mutace nukleotidu 3154. Diagnostické primery jsem navrhovala tak, aby na základě orientace jejich 3' a 5'-konce vzhledem k templátové DNA při amplifikaci tvořily PCR produkt s primerem V10F nebo V11R. Obecně PCR produkt vzniká vždy amplifikací DNA pomocí dvou primerů, z nichž jeden nese ve svém názvu na posledním místě písmeno F z anglického označení „Forward“ a druhý písmeno R z označení „Reverse“ – takto označené primery jsou protisměrně orientované.





**Produkt A** (délka 465 bp) vzniká po amplifikaci DNA ohraničené primery V10F+V11R (mutace nukleotidů 3004 nebo 3154 nemá vliv na zisk PCR produktu, pokud je DNA amplifikovaná pouze touto dvojicí primerů).

**Produkty B<sub>w</sub>, C<sub>w</sub>, D<sub>w</sub> a E<sub>w</sub>** (všechny označené dolním indexem <sub>w</sub>) by podle teoretického předpokladu měly vznikat po amplifikaci mutací nezměněné templátové DNA primerem s označením W, který je ve dvojici s primerem V10F (produkty B<sub>w</sub> a C<sub>w</sub>) nebo ve dvojici s primerem V11R (produkty D<sub>w</sub> a E<sub>w</sub>).

**Produkty B<sub>M</sub>, C<sub>M</sub>, D<sub>M</sub> a E<sub>M</sub>** (všechny označené dolním indexem <sub>M</sub>) by podle teoretického předpokladu měly vznikat po amplifikaci mutací změněné templátové DNA primerem s označením M, který je ve dvojici s primerem V10F (produkty B<sub>M</sub> a C<sub>M</sub>) nebo ve dvojici s primerem V11R (produkty D<sub>M</sub> a E<sub>M</sub>).

PCR produkt diagnostického primeru vzniká pouze tehdy, když tento primer nasedne zcela komplementárně na templátovou DNA a může se s ní přitom svým 3'-koncem párovat. Tedy PCR produkty diagnostických primerů s označením W mají být získány při amplifikaci mutací nezměněné DNA (ať se jedná o primery s číselným označením 3004 nebo 3154) a PCR produkty diagnostických primerů označených písmenem M (s číselným označením 3004 nebo 3154) mají vznikat při amplifikaci templátové DNA, která je na odpovídající nukleotidové pozici mutovaná.

Určení bodových mutací nukleotidových pozic 3004 a 3154 v templátové DNA by mělo být možné díky navržení dvou typů diagnostických primerů pro detekci bodových mutací na těchto pozicích. Tyto typy diagnostických primerů se vzájemně liší nukleotidem nacházejícím se na jejich 3'-konci. Pro identifikaci bodové mutace nukleotidu 3004 se zde nachází C cytosin (*Wild type*) nebo G guanin (*Mutant*). Pro identifikaci bodové mutace nukleotidu 3154 by měl být podle teoretického předpokladu na základě článku Huberta *et al.* (2013) na 3'-konci diagnostického primeru T thymin (*Wild type*) nebo C cytosin (*Mutant*). 3'-konec diagnostického primeru je vždy navržen tak, aby nasedal na nukleotidovou pozici v templátové DNA, jejíž mutaci má potvrdit nebo vyvrátit.

Primery označené písmenem W (*Wild type*) nasedají 3'-koncem na nukleotid v templátové DNA nezměněný mutací – na nukleotidové pozici 3004 nasedají diagnostické primery 3'-koncem na cytosin, na nukleotidové pozici 3154 na thymin (na

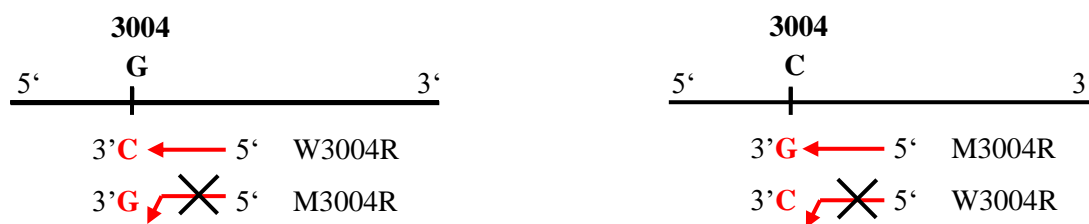
základě teoretického předpokladu). Primery označené písmenem M (*Mutant*) nasedají 3'-konce na mutovaný nukleotid v DNA – na nukleotidové pozici 3004 nasedají diagnostické primery 3'-konce na guanin, na nukleotidové pozici 3154 na cytosin (teoretický předpoklad). Zobrazeno ve schématu 2. Diagnostické primery označené číslem 3154 však v důsledku chybného navržení ve skutečnosti nasedají na nukleotidovou pozici 3156 (vysvětlení viz strana 53 a Diskuze, strana 62).

Jestliže nedojde ke zcela komplementárnímu spárování nukleotidu na 3'-konci diagnostického primeru s pozičně odpovídajícím nukleotidem v templátové DNA (může se jednat o nukleotid 3004 nebo nukleotid 3154 postihovaný bodovou mutací), má podle teoretického předpokladu dojít k odchýlení 3'-konce diagnostického primeru od templátového vlákna a PCR reakce tak nemá proběhnout (zobrazeno ve schématu 2).

**Schéma 2: Princip nasedání diagnostických primerů W3004R a M3004R na nukleotidovou pozici 3004 v templátové DNA, pokud je a) prováděna amplifikace DNA s původní sekvencí a b) prováděna amplifikace mutací změněné DNA.**

a) *původní sekvence*

b) *mutací změněná sekvence*



Bodové mutace nukleotidových pozic 3004 nebo 3154 by podle teoretického předpokladu mělo být možné detekovat pomocí PCR amplifikační reakce místo toho, aby se prováděla sekvenace segmentu zahrnujícího tyto nukleotidové pozice. Pro potvrzení či vyvrácení přítomnosti konkrétní bodové mutace by měla být amplifikace vzorku DNA z jedné populace kleštíků (tato DNA je rozpipetovaná do dvou PCR mikrozkušavek) prováděna dvěma souběžně probíhajícími PCR reakcemi, které se liší složením primerů v PCR reakčních směsích. V každé z nich jsou obsaženy celkem tři primery, na vzniku PCR amplifikačního produktu se vždy podílí pouze dva ze tří přítomných primerů. První PCR reakční směs obsahuje diagnostický primer (označení W) specifický pro nukleotidovou pozici v templátové DNA nezměněnou bodovou mutací a druhá PCR reakční směs obsahuje diagnostický primer (označení M) pro nukleotidovou pozici mutovanou. Zbylé dva z celkem tří primerů v reakční směsi (kromě diagnostického primeru W nebo M) jsou primery V10F a V11R, které

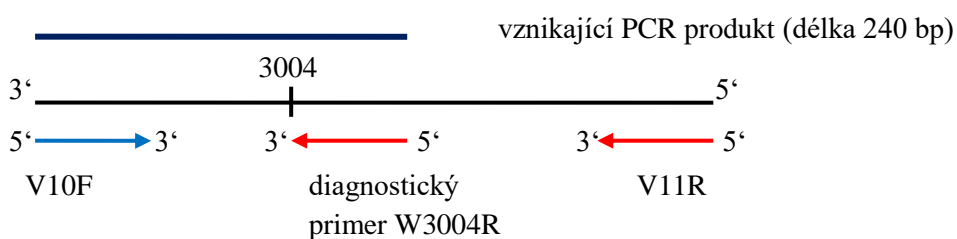
amplifikují segment zahrnující nukleotidové pozice ovlivňované bodovými mutacemi (viz schéma 3).

Diagnostický primer nasedá na templátovou DNA do pozice mezi okrajovými primery V10F a V11R (schéma 3). V případě, že je diagnostický primer zcela komplementární s templátovou DNA, probíhá amplifikace DNA pomocí tohoto diagnostického primeru a jednoho okrajového primeru – toho o protisměrné orientaci (diagnostický *Reverse* primer R+V10F nebo diagnostický *Forward* primer F+V11R). Amplifikací vzniká odpovídající PCR produkt B<sub>w</sub>, B<sub>M</sub>, C<sub>w</sub>, C<sub>M</sub> nebo D<sub>w</sub>, D<sub>M</sub>, E<sub>w</sub>, E<sub>M</sub> (viz schéma 1). Pokud není diagnostický primer zcela komplementární s templátovou DNA, žádný PCR produkt od něj nevzniká, vzniká místo toho PCR produkt primerů V10F+V11R (PCR produkt A na schématu 1).

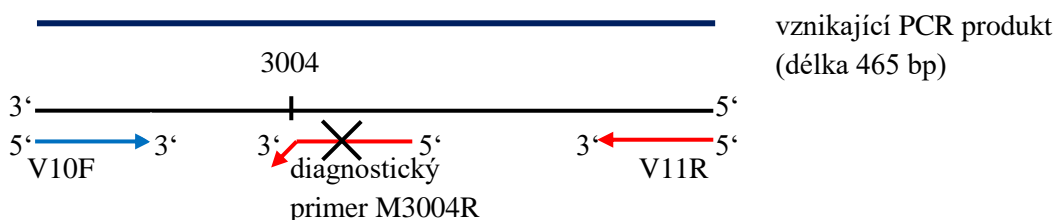
Princip vzniku PCR produktu při amplifikaci templátové DNA za použití reakční směsi obsahující tři primery je uvedený na schématu 3.

**Schéma 3: PCR amplifikace DNA kleštíka včelího za použití PCR reakční směsi obsahující tři primery, při které tvoří získaný PCR produkt a) dvojice primerů V10F+Reverse diagnostický primer (W3004R) a b) dvojice primerů V10F+V11R (diagnostický primer M3004R není na svém 3'-konci komplementární s templátovou DNA). Zobrazeno pro průběh amplifikace při detekci bodové mutace nukleotidu 3004.**

a) PCR produkt vznikající amplifikací DNA nezměněné mutací pomocí dvojice primerů V10F+W3004R.



b) PCR produkt vznikající amplifikací DNA nezměněné mutací pomocí dvojice primerů V10F+V11R (diagnostický primer M3004R není na svém 3'-konci komplementární s templátovou DNA).



Například: pokud má na nukleotidovou pozici v templátové DNA nezměněnou bodovou mutací (*Wild type*) nasedat diagnostický primer, který má na svém 3'-konci nukleotid v mutované variantě (s *Wild type* DNA nekompatibilní diagnostický primer M), nevede amplifikace DNA od tohoto diagnostického primeru k syntéze vlákna DNA. PCR produkt vzniká pomocí zbylých primerů V10F+V11R (PCR produkt A na schématu 1) a v tomto upořádání PCR reakce slouží jako potvrzení, že PCR amplifikace templátové DNA nebyla inhibovaná vnější kontaminací či chybou. Pokud by byla provedena PCR amplifikace templátové DNA pouze dvojicí primerů (diagnostický primer+protisměrně orientovaný okrajový primer V10F nebo V11R) a diagnostický primer by s DNA nebyl zcela komplementární, nevznikl by pomocí těchto dvou primerů žádný PCR produkt. Nebylo by tedy možné spolehlivě a jednoznačně určit, zda tato skutečnost vypovídá o přítomnosti či absenci bodové mutace v DNA kleštíku, nebo o tom, že PCR amplifikační reakce selhala z nějakého jiného důvodu (kontaminace PCR reakční směsí, chyba při pipetování, nastavení termocykléru apod.).

Sekvence všech diagnostických primerů navržených pro PCR amplifikaci genu pro sodíkový kanál, v jehož sekvenci se objevují bodové mutace nukleotidů 3004 a 3154, a dvojice převzatých primerů V10F a V11R, jsou uvedeny v tabulce 6.

**Tabulka 6: Sekvence převzatých primerů (označené \*), publikovaných Hubertem *et al.* (2013), a diagnostických primerů nasedajících na mutacemi postihované nukleotidové pozice 3004 a 3154 (respektive 3156 viz strana 53 a Diskuze, strana 62) genu pro sodíkový kanál kleštíka včelího, které byly detekovány ve vztahu k jeho rezistenci k tau-fluvalinátu.**

Primer	Sekvence (5'–3')	Pozice nasednutí primeru (5'–3')	Vazba 3'-konce nukleotidu na pozici
V10F*	TGAAGCTTATGGCGAAAAG	2786–2804	2804
V11R*	CGAGAAAGAACGGGATACA	3250–3232	3250
W3004R	ACACAAAGGTCAGGTTACCCAG	3025–3004	3004
M3004R	ACACAAAGGTCAGGTTACCCAC		
W3004F	GGCAAGACGATAGGAGCTC	2986–3004	
M3004F	GGCAAGACGATAGGAGCTG		
W3154R	CACCCGAAAGACAATCATC	3174–3156 <sup>Δ</sup>	3156 <sup>Δ</sup>
M3154R	CACCCGAAAGACAATCATG		
W3154F	TTAGATTTTCATGCACTCGTTG	3136–3156 <sup>Δ</sup>	
M3154F	TTAGATTTTCATGCACTCGTTC		

Legenda k tabulce 6:

<sup>Δ</sup> Diagnostické primery označené číslem 3154 (které mají být používány pro detekci bodové mutace nukleotidu 3154 a nasedat svým 3'-koncem na tento nukleotid v templátové DNA) nasedají v důsledku jejich chybného navržení na nukleotid 3156 (viz strana 53 a Diskuze, strana 62).

### c) PCR amplifikační reakce

PCR amplifikaci části genu pro sodíkový kanál kleštíka včelího, obsahující nukleotidové pozice 3004 a 3154, jsem prováděla nejdříve za použití PCR reakční směsi obsahující dvojici primerů V10F+V11R (abych zjistila optimální teplotu *annealingu*  $T_a$  primerů, koncentraci hořčnatých iontů apod.). Poté jsem za použití těchto reakčních podmínek testovala, zda vznikají PCR produkty amplifikací DNA dvojicemi primerů V10F+diagnostický primer R (*Reverse*) a V11R+diagnostický primer F (*Forward*). Pokud PCR produkt těchto dvojic primerů nevznikl, snažila jsem se adekvátně upravit podmínky PCR reakce ( $T_a$ , koncentrace hořčnatých iontů). Jestliže PCR produkt těchto primerů po amplifikaci DNA vznikl, provedla jsem optimalizaci podmínek PCR reakce pro amplifikaci templátové DNA za použití reakční směsi obsahující tři primery (pro plánovanou detekci bodových mutací a hodnocení rezistence populací kleštíků).

#### Reakční podmínky pro amplifikaci templátové DNA primery V10F+V11R

Pro počáteční optimalizaci amplifikace jsem použila doporučené parametry PCR reakce používané pro amplifikaci DNA provedenou pomocí dvojice převzatých primerů V10F+V11R. Při použití doporučené teploty *annealingu*  $T_a$  56 °C jsem nezískala PCR produkty, které by byly po elektroforetické separaci v gelu a vizualizaci spolehlivě detekovatelné. Postupně jsem tedy snižovala  $T_a$  až na 48 °C, čímž jsem získala PCR produkty, které se po zviditelnění na gelu jevíly jako kontrastnější pruh. Následně jsem zvýšila koncentraci hořčnatých iontů v PCR reakční směsi na dvojnásobnou (na 3,4 mmol/l) z původních 1,8 mmol/l. Při použití koncentrace hořčnatých iontů 3,4 mmol/l v PCR reakční směsi jsem mohla zvýšit  $T_a$  na 50–52 °C, přičemž PCR produkt o velikosti 465 bp, vzniklý amplifikací DNA pomocí dvojice primerů V10F+V11R, byl po vizualizaci dobře detekovatelný (obrázek 6).

### Amplifikace templátové DNA za použití diagnostických primerů teoreticky nasedajících na nukleotidovou pozici 3154

Při amplifikaci templátové DNA diagnostickými primery, podle teoretického předpokladu nasedajícími na nukleotid 3154, (každý použitý ve dvojici s k němu protisměrně orientovaným primerem V10F nebo V11R) jsem nezískala žádné PCR produkty (jedná se o teoreticky odvozené PCR produkty  $C_W$ ,  $C_M$ ,  $D_W$ ,  $D_M$ ,  $E_W$  a  $E_M$  na schématu 1). Pro amplifikaci jsem použila jak diagnostické primery dle předpokladu nasedající na nukleotid 3154 nezměněné mutací, tak diagnostické primery nasedající na nukleotid 3154 mutované. Jednalo se o dvojice primerů V10F+W3154R (PCR produkt  $C_W$  na schématu 1), V10F+M3154R (PCR produkt  $C_M$  na schématu 1), W3154F+V11R (PCR produkt  $E_W$  na schématu 1) a M3154F+V11R (PCR produkt  $E_M$  na schématu 1). Diagnostické primery označené číslem 3154 jsou totiž chybně navrženy a posledním nukleotidem na svém 3'-konci nasedají na nukleotid 3156 v templátové DNA, místo na nukleotid 3154 (viz Diskuze, strana 62).

Vzhledem k tomu, že mutační změna nukleotidu 3154 nemá přímý vztah k rezistenci kleštíka k tau-fluvalinátu, nebyla detekce bodové mutace nukleotidové pozice 3154 pro mou práci prioritní. Diagnostiku rezistence kleštíka včelího jsem tedy prováděla pouze ve vztahu k detekci bodové mutace nukleotidu 3004 ve *VmNa* genu pro sodíkový kanál tohoto parazita.

### Amplifikace templátové DNA za použití diagnostických primerů nasedajících na nukleotidovou pozici 3004

Při amplifikaci templátové DNA pomocí diagnostických primerů, které jsou svým nukleotidem na 3'-konci komplementární k odpovídajícímu nukleotidu 3004 v templátové DNA, jsem narazila na problém při použití *Forwardových* diagnostických primerů W3004F a M3004F. Oba tyto diagnostické primery by podle teoretického předpokladu měly tvořit PCR produkt spolu s protisměrně orientovaným primerem V11R (teoreticky odvozené PCR produkty  $D_W$  a  $D_M$  na schématu 1). Amplifikace DNA dvojicí primerů W3004F+V11R ani dvojicí M3004F+V11R však nevedla ke vzniku PCR produktu, který by byl hodnotitelný. Ten se po vizualizaci v gelu jevil jako šmouha. Diagnostické primery W3004F a M3004F jsem tedy pro amplifikaci templátové DNA dále nepoužívala.

Pro detekci bodové mutace nukleotidu 3004 v DNA kleštíka včelího jsem vyhodnotila jako nejlépe fungující *Reverse* primery W3004R a M3004R. Tyto diagnostické primery mají podle teoretického předpokladu amplifikovat templátovou DNA spolu s protisměrně orientovaným primerem V10F za vzniku PCR produktu o délce 240 bp (mluvíme tedy o dvojici primerů V10F+W3004R a dvojici V10F+M3004R, amplifikací vznikají PCR produkty B<sub>W</sub> a B<sub>M</sub>, viz schéma 1). Jelikož v analyzovaných vzorcích DNA kleštíků nebyl nalezen žádný vzorek DNA s mutovaným nukleotidem 3004 (na mutované nukleotidové pozici 3004 se v této situaci má nacházet guanin místo cytosinu), získala jsem produkt o délce 240 bp pouze při amplifikaci DNA dvojicí primerů V10F+W3004R (ne s primery V10F+M3004R). Optimální T<sub>a</sub> pro amplifikaci DNA těmito primery činila 50 °C, hodnotitelný PCR produkt však vznikal i při vyšších T<sub>a</sub> (až 56 °C).

#### Optimalizace podmínek pro amplifikaci templátové DNA za použití PCR reakční směsi obsahující tři primery

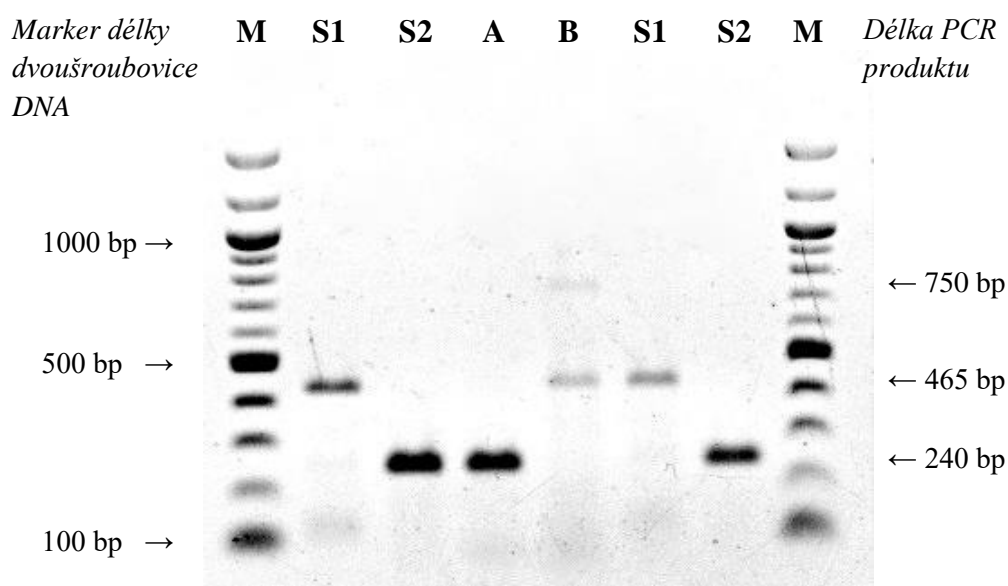
Trojice primerů v PCR reakční směsi byla vždy tvořena primery V10F a V11R a třetím, diagnostickým primerem (W3004R nebo M3004R) se specifickým nukleotidem na jeho 3'-konci, který pozičně odpovídá nukleotidové pozici 3004 (ovlivňované bodovou mutací).

Každý vzorek DNA určený pro zkušební stanovení mutace nukleotidu 3004 byl rozdělen do dvou PCR mikrozkušavek a amplifikován za použití PCR reakčních směsí, které se od sebe navzájem liší ve složení primerů. V první PCR reakční směsi jsou obsaženy primery V10F+V11R+W3004R (primer W3004R je zcela komplementární s templátovou DNA obsahující mutací nezměněný nukleotid 3004). Ve druhé PCR reakční směsi jsou obsaženy primery V10F+V11R+M3004R (primer M3004R je zcela komplementární s templátovou DNA obsahující mutací změněný nukleotid 3004). Pokud by v budoucnu měla být tato PCR amplifikace se třemi primery v reakční směsi používána k detekci bodové mutace nukleotidu 3004 v DNA kleštíka včelího (a stanovení jeho rezistence k tau-fluvalinátu), měl by být vzorek z jedné populace kleštíků amplifikován oběma těmito PCR reakcemi. Mělo by tak být na základě teoretického předpokladu možné určit, zda jsou populace kleštíků vnímavé, rezistentní či částečně rezistentní k tau-fluvalinátu (viz schéma 4 v části Diskuze).

Při optimalizování podmínek pro amplifikaci DNA za použití PCR reakční směsi se třemi primery jsem postupným testováním stanovila nejvýhodnější vzájemný poměr primerů V10F:V11R:W3004R (respektive V10F:V11R:M3004R) jako 2:1:1. Zvýšená koncentrace *Forward* primeru V10F měla pozitivní vliv na získání výraznějšího PCR produktu po jeho rozdělení gelovou elektroforézou a vizualizaci (obrázek 6).

Vizualizované PCR produkty, které jsem získala amplifikací DNA kleštíka včelího izolované z populace, která je vnímavá k tau-fluvalinátu (nenese bodovou mutaci nukleotidové pozice 3004), jsou zobrazeny na následujícím elektroforetogramu (obrázek 6).

**Obrázek 6: Elektroforetogram produktů PCR amplifikace segmentu *VmNa* genu pro sodíkový kanál kleštíka včelího, zahrnujícího nukleotidovou pozici 3004 nezměněnou mutací. Amplifikace byla prováděna pomocí primerů V10F, V11R, W3004R a M3004R v kombinacích, které jsou uvedeny pod obrázkem. Elektroforetická separace v agarózovém gelu o 1,5% koncentraci probíhala 90 minut při napětí 60 V.**



*Legenda: Délky PCR produktů jsou uvedeny včetně délky primerů, které se podílely na jejich vzniku.*

*M: marker délky dvoušroubovice DNA*

*S1: PCR produkt ohraničený primery V10F+V11R (velikost 465 bp), vzniklý z PCR reakční směsi s dvojicí primerů V10F+V11R.*



*S2: PCR produkt ohraničený primery V10F+W3004R (velikost 240 bp), vzniklý z PCR reakční směsi s dvojicí primerů V10F+W3004R.*

*A: PCR produkt amplifikovaný primery V10F+W3004R, vzniklý z PCR reakční směsi se třemi primery V10F+V11R+W3004R (velikost 240 bp).*

*B: PCR produkt amplifikovaný primery V10F+V11R, vzniklý z PCR reakční směsi se třemi primery V10F+V11R+M3004R (velikost 465 bp; dále je patrný nespecifický produkt velikosti přibližně 750 bp).*

Amplifikaci DNA za účelem stanovení či vyvrácení přítomnosti bodové mutace nukleotidu 3004, jejíž PCR produkty jsou viditelné na obrázku 6, jsem prováděla dvěma PCR reakcemi, které se lišily složením primerů v reakčních směsích. V reakční směsi první PCR reakce se nacházely primery V10F+V11R+W3004R (jamka A; velikost PCR produktu dvojice amplifikujících primerů V10F+W3004R je 240 bp) a ve druhé reakční směsi primery V10F+V11R+M3004R (jamka B; velikost PCR produktu dvojice amplifikujících primerů V10F+V11R je 465 bp, patrný je rovněž nespecifický produkt přibližné délky 750 bp).

Zvýšením  $T_a$  pro amplifikaci DNA za použití PCR reakční směsi obsahující tři primery V10F+V11R+M3004R jsem dosáhla postupného zmenšení tvorby nespecifického PCR produktu (přibližné délky 750 bp), ovšem se vzrůstem  $T_a$  (až na 56 °C) se začal tvořit jiný nespecifický PCR produkt o délce asi 200 bp. Výsledný PCR produkt délky 456 bp primerů V10F+V11R postupně s teplotou vzrůstající na 56 °C ovšem ztrácel na intenzitě. Proto jsem nakonec zvolila jako kompromisní  $T_a$  50 °C, i když jsem na elektroforetogramu nacházela nespecifický PCR produkt (o přibližné délce 750 bp). V PCR reakční směsi jsem použila koncentraci hořčnatých iontů 3,4 mmol/l, díky které jsem získala vizuálně výrazné PCR produkty

Pro porovnání a standardizaci délky nukleotidového řetězce vzniklého diagnostického PCR produktu jsem provedla i amplifikaci DNA pomocí dvojice primerů V10F+V11R (jamka S1; PCR produkt velikosti 465 bp) a dvojice primerů V10F+W3004R (jamka S2; PCR produkt velikosti 240 bp). Na levém a pravém okraji elektroforetogramu je viditelný komerční marker délky dvoušroubovice DNA. Po pravé straně obrázku 6 jsou pro přehlednost vyznačené získané PCR produkty s jejich délkou.

Během izolování a analýzy genomické DNA kleštika včelího se mi nepodařilo identifikovat žádnou populaci kleštíků, v jejíž DNA by byla přítomná mutace

nukleotidu C→G na pozici 3004, která má spojitost se vznikem rezistence kleštíka k varroacidní látce tau-fluvalinátu. Nebyla jsem tedy schopná otestovat chování primerů V10F, V11R, W3004R a M3004R během amplifikace sekvence genu pro sodíkový kanál s mutací změněným nukleotidem 3004. Amplifikace sekvence genu pro sodíkový kanál, ve které by nukleotid 3004 byl změněn bodovou mutací, by však měla být v případě pozitivního vzorku populace kleštíků úspěšná (při amplifikaci za použití primerů V10F+V11R+M3004R v reakční směsi má dle předpokladu vznikat PCR produkt primerů V10F+M3004R délky 240 bp).

Na základě navržených podmínek pro PCR amplifikaci vzorku DNA dvěma PCR reakcemi, lišícími se ve složení primerů v reakční směsi, je možné určit mutaci nukleotidu 3004 v DNA kleštíka včelího zatím s částečnou spolehlivostí. Pro jednoznačné vyslovení závěru bude třeba podrobit analýze i genomickou DNA z populací kleštíků, které jsou k varroacidní látce tau-fluvalinátu rezistentní. Tyto populace kleštíků se mi ovšem během mé práce nepodařilo detekovat.

Na skutečnost, že jsem získala pouze část PCR produktů ze všech, které jsem na počátku mé práce teoreticky odvodila, má značný vliv zvýšená prašnost v laboratoři způsobená nedostatečně fungující vzduchotechnikou a klimatizací. V této laboratoři jsem na počátku pracovala se vzorky DNA kleštíků a později jsem je zde skladovala spolu s dalším používaným materiálem. Problémy se vzduchotechnikou v laboratoři stály za opakujícími se kontaminacemi, ke kterým docházelo během izolace genomické DNA kleštíků i její PCR amplifikace. Prvních několik měsíců experimentální práce bylo takto znehodnoceno, protože jsem netušila, že opakující se kontaminace PCR reakcí jsou způsobované problémy se vzduchotechnikou v prostorách laboratoře. V experimentální práci tak došlo ke zbytečnému zdržení, jelikož jsem hledala zdroj problémů v kvalitě chemikálií, jejich přípravě, ve správném nastavení přístrojového vybavení laboratoře (pH metr, termocyklér, autokláv). K vyřešení problému nevedly ani pokusy se sterilizací vzduchu pomocí germicidní lampy. Všechna výše jmenovaná opatření opakujícím se kontaminacím nezabránila a byla bezvýsledná.

Po nalezení zdroje kontaminací jsem přípravu PCR reakčních směsí prováděla v laboratoři (ve *flowboxu*), ve které by prašnost měla být adekvátně regulovaná. Při mých doposud získaných laboratorních zkušenostech však nemohu plně vyloučit, že ke kontaminaci PCR amplifikačních reakcí nemohlo částečně docházet i v této době

(vzorky DNA kleštíků a další používaný materiál jsem vzhledem k prostorovým možnostem katedry skladovala v „kontaminované“ laboratoři). Jediným spolehlivým řešením je tedy pouze oprava vzduchotechniky a klimatizace v domovské laboratoři, která je však plánovaná až po odevzdání této bakalářské práce.

## 6 Diskuze

V této bakalářské práci jsem se zabývala detekcí bodových mutací nukleotidů 3004 a 3154 v genu pro sodíkový kanál, které se v DNA kleštíka včelího (*Varroa destructor*) vyskytují v souvislosti se vznikem jeho rezistence k tau-fluvalinátu. Pro detekci těchto bodových mutací jsem použila PCR amplifikaci segmentu genu pro sodíkový kanál za účasti specifických primerů, které nukleotidem na svém 3'-konci komplementárně nasedají na odpovídající nukleotid v templátové DNA ovlivňovaný bodovou mutací (na nukleotid 3004 nebo 3154). Metodu se mi podařilo optimalizovat zatím částečně, jelikož jsem neměla k dispozici DNA s mutací změněným nukleotidem 3004. Detekci bodové mutace nukleotidu 3154 jsem nebyla schopná provést, protože diagnostické primery nasedající na tento nukleotid nebyly schopny templátovou DNA amplifikovat.

### **a) Příprava kleštíků pro izolaci genomické DNA, izolace genomické DNA**

Pro oddělení kleštíků od včelí měli pomocí flotační metody se jako flotační roztok nejčastěji používá technický alkohol nebo stolní olej (Navrátil *et al.*, 2012). V Národní referenční laboratoři pro zdraví včel fungující na Státním veterinárním ústavu v Olomouci je jako flotační tekutina používán technický alkohol. Ve své práci jsem použila pro flotaci roztok 96% ethanolu. Druh použité flotační tekutiny by nicméně neměl mít výrazně odlišný vliv na získané množství kleštíků odebraných tímto způsobem ze včelí měli.

Izolaci genomické DNA jsem prováděla z 50 samic kleštíků, aby bylo možné postihnout co nejširší heterogenitu sekvencí DNA vyskytující se u kleštíků v dané populaci. Samce kleštíka jsem pro izolaci DNA nepoužila, jelikož dosahují v porovnání se samicemi malé velikosti a v měli se vyskytují v minimálním počtu (Čermák *et al.*, 2016). Izolaci DNA z 50 samic kleštíků prováděli ve své práci také autoři Wang *et al.* (2003) během amplifikace DNA pro určení sekvence *VmNa* genu pro sodíkový kanál kleštíka včelího. Z 50 samic kleštíků izolovali DNA rovněž Hubert *et al.* (2013) při detekci nukleotidových pozic, které podléhají bodovým mutacím ve spojitosti s rezistencí kleštíka. Během izolace genomické DNA pomocí kitu Exgene<sup>TM</sup> Genomic DNA micro (GeneAll), za použití protokolu pro izolaci genomické DNA z vlasů a nehtů, jsem získala DNA o koncentraci postačující pro PCR amplifikační reakci i po izolaci DNA pouze z jedné samice kleštíka.

Pro PCR amplifikaci jsem používala vyizolovanou genomickou DNA kleštíků rozpuštěnou v 50 µl deionizované vody. Výrobce izolačního kitu Exgene™ Genomic DNA micro (GeneAll) doporučuje pro rozpuštění deklarovaný pufr s označením AE (10 mmol/l Tris-HCl; 0,5 nmol/l EDTA o pH 9,0). Amplifikace DNA rozpuštěné v tomto pufru však byla problematická a nevedla ke vzniku vizuálně výrazných PCR produktů po jejich elektroforetické separaci a vizualizaci. Pravděpodobně dochází k interferenci způsobené roztokem EDTA obsaženým v AE pufru, který snižuje celkovou koncentraci hořčnatých iontů obsažených v PCR reakční směsi během amplifikace DNA (Anonymous23, 2017). Další možností je pak inhibice PCR amplifikace z důvodu kontaminace vzorků DNA (viz strana 57), ke které mohlo dojít během třizení kleštíků v domovské laboratoři s problematickou vzduchotechnikou (v době, kdy nebyl známý původce kontaminací). Eluci DNA z izolační kolony jsem prováděla deionizovanou vodou, kterou je podle výrobce kitu možné rovněž použít.

#### **b) Navržení diagnostických primerů pro PCR amplifikaci DNA kleštíka včelího**

Vycházela jsem z předpokladu, že PCR amplifikace DNA neproběhne, pokud se diagnostický primer zcela komplementárně nepáruje s templátovou DNA (Jing *et al.*, 2012). Konkrétně pokud se nukleotid na 3'-konci diagnostického primeru nepáruje s místem v templátové DNA ovlivňovaným bodovou mutací (jedná se o nukleotidy 3004 nebo 3154), tedy vzájemně nejsou zcela komplementární, DNA polymeráza nebude diagnostický primer prodlužovat a syntetizovat vlákno DNA (Jing *et al.*, 2012). Pokud je 3'-konec navrženého diagnostického primeru k nukleotidu v templátové DNA komplementární, PCR amplifikace DNA od tohoto diagnostického primeru má proběhnout. Nesouladu vazby 3'-konce primeru s templátovou DNA vzniklému v důsledku vzájemné nekomplementarity se využívá například u analýzy SNP (*Single nucleotide polymorphism*), která slouží jako diagnostická technika v genetických a evolučních studiích (Jing *et al.*, 2012).

Všechny diagnostické primery jsem navrhovala tak, aby jimi bylo možné provádět PCR amplifikaci ve dvojici s primerem V10F nebo V11R, které jsem převzala z publikace Huberta *et al.* (2013). Autoři pomocí primerů V10F a V11R amplifikovali segment *VmNa* genu pro sodíkový kanál kleštíka včelího, ve kterém detekovali přítomnost bodových mutací nukleotidů 3004 a 3154 spojovaných s rezistencí kleštíka k tau-fluvalinátu.

### Hodnocení kvality převzatých primerů V10F a V11R pomocí programu Primer3

Kvalitu převzatých primerů V10F a V11R jsem před amplifikací DNA hodnotila pomocí programu Primer3 (Rozen *et* Skaletsky; 2000). Podle hodnocení tohoto programu nejsou primery V10F a V11R ideálně navrženy. Hodnocení pro primer V10F zní: „*T<sub>m</sub> too low/high hairpin stability (thermodynamic approach 39,74 °C = the calculated value of the melting temperature of the most stable hairpin structure of the primer or oligo.*“ (Tzn. teplota tání  $T_m$  primeru je příliš nízká, primer vykazuje vysokou vlásenkovou stabilitu při teplotě 47,28 °C = vypočítaná hodnota teploty tání nejstabilnější vlásenkové struktury primeru nebo oligonukleotidu) (Primer3 – Rozen *et* Skaletsky; 2000). Pro primer V11R zní hodnocení programu Primer3 stejně, přičemž jako  $T_m$  nejvyšší vlásenkové stability byla stanovena teplota 39,74°C (Primer3 – Rozen *et* Skaletsky; 2000).

Pro svou práci jsem se i přes hodnocení kvality Primerem3 rozhodla primery V10F a V11R použít, jelikož podle výsledků Huberta *et al.* (2013) by měla být amplifikace DNA těmito primery proveditelná bez problémů.

### c) PCR amplifikace DNA kleštika včelího

Během mé práce jsem opakovaně nebyla schopná získat PCR produkt amplifikace DNA pomocí některých dvojic primerů, ve kterých byly obsaženy převzaté primery V10F a V11R. Primer V11R neamplifikoval templátovou DNA ve dvojici s primery W3004F, M3004F, W3154F ani M3154F (viz schéma 1, jedná se o teoreticky odvozené PCR produkty  $D_w$ ,  $D_M$ ,  $E_w$  a  $E_M$ ). Primer V10F neamplifikoval templátovou DNA ve dvojici s primery W3154R ani M3154R (viz schéma 1, jedná se o teoreticky odvozené PCR produkty  $C_w$  a  $C_M$ ). Ani po osobní komunikaci s autory článku Hubertem *et al.* (2013) jsem nebyla schopná určit, z jakého důvodu je nemožné provést amplifikaci DNA pomocí primerů V10F a V11R se spolehlivými výsledky. Jejich odpovědi byly vyhybavě neurčité. Během amplifikace jsem byla nucená snížit teploty *annealingu* primerů V10F a V11R o 6 °C (z doporučených 56 °C na 50 °C) za současného navýšení koncentrace hořečnatých iontů v PCR reakční směsi na dvojnásobek (z 1,8 mmol/l na 3,4 mmol/l).

PCR amplifikaci DNA kleštika pomocí primeru V11R použitého ve dvojici primerů M3004F+V11R a M3154F+V11R jsem však nebyla schopná adekvátně posoudit, jelikož jsem k analýze neměla k dispozici templátovou DNA obsahující mutované nukleotidy 3004 a 3154.

Na základě hodnocení kvality primerů V10F a V11R programem Primer3 je pravděpodobné, že tyto primery tvoří během amplifikace DNA vláskovité struktury. Může tak docházet k jejich nespecifické vazbě na vlákno templátové DNA nebo k úplnému či částečnému zablokování PCR amplifikace (Anonymous14, 2017; Rozen *et Skaletsky*; 2000).

#### Amplifikace templátové DNA pomocí diagnostických primerů nasedajících na nukleotidovou pozici 3154 (respektive 3156)

Během amplifikace DNA jsem narazila rovněž na problémy při používání diagnostických primů navržených pro detekci bodové mutace nukleotidu 3154. Amplifikační reakce za použití diagnostických primerů W3154F, M3154F, W3154R a M3154R nevedla ke vzniku PCR produktu. Podle teoretického předpokladu by měl být amplifikací DNA získán minimálně jeden PCR produkt, pokud na nukleotid 3154 v templátové DNA diagnostický primer nasedá. K problémům při amplifikaci sekvence těmito diagnostickými primery by teoreticky mohlo dojít za předpokladu, že v blízkosti nukleotidu 3154 proběhla další bodová mutace, která brání jejich nasednutí na templátovou DNA (Jing *et al.*, 2012).

Provedla jsem tedy porovnání sekvence genu pro sodíkový kanál (GenBank označení AY259834.1, publikovaná Wangem *et al.*, 2003, podle které jsem navrhovala diagnostické primery pro detekci mutace) se sekvencí, ve které byly identifikovány mutace nukleotidů 3004 a 3154 (GenBank označení KC152655.2, publikovaná Hubertem *et al.*, 2013). Sekvence jsem porovnávala pomocí programu Mega7 (Kumar *et al.*, 2016) a zjistila jsem, že se tyto sekvence liší nukleotidem na pozici 3156.

V blízkosti nukleotidu 3154 proběhla další mutace (supresorová) (Prelich, 1999), postihující nukleotid 3156, jejíž vznik autoři Hubert *et al.* (2013) ve svém článku vůbec neokomentovali. Na nukleotidové pozici 3156 se tedy dle sekvence publikované těmito autory nachází cytosin (jedná se o C v kodonu TTC, který kóduje aminokyselinu Phe na pozici 1052) (GenBank označení KC152655.2). V první publikované sekvenci *VmNa* genu pro sodíkový kanál (Wang *et al.*, 2003) se na nukleotidové pozici nachází guanin (jedná se o G v kodonu TTG, který kóduje aminokyselinu Leu na pozici 1052) (GenBank označení AY259834.1). Odlišnost těchto dvou sekvencí (na nukleotidové pozici 3156) jsem zaznamenala až po navržení všech diagnostických primerů. Tato skutečnost vedla k tomu, že diagnostické primery W3154R, W3154F, M3154R a M3154F jsou na základě neúplných informací publikovaných Hubertem *et al.* (2013)

navržené chybně. Jejich 3'-konec se páruje s nukleotidovou pozicí 3156 v templátové DNA, místo s pozicí 3154.

Diagnostické primery W3154F a M3154F (navržené pro amplifikaci DNA ve dvojicích W3154F+V11R nebo M3154F+V11R) mají na nukleotidové pozici 3154 thymin (*Wild type DNA*). Na nukleotidové pozici 3156 pak guanin (DNA populací kleštíků sekvenovaná Wangem *et al.*, 2003) nebo cytosin (DNA populací kleštíků sekvencovaná Hubertem *et al.*, 2013). Pokud by amplifikace templátové DNA některou z těchto dvojic primerů nevedla ke vzniku PCR produktu, svědčila by tato skutečnost o vzniku bodové mutace nukleotidu 3154, případně by amplifikace mohla selhat z jiných příčin (například kontaminace PCR reakční směsí). Amplifikace templátové DNA diagnostickými primery W3154R a M3154R (navržené pro amplifikaci DNA ve dvojicích V10F+W3154R nebo V10F+M3154R) by neměla být závislá na tom, zda je nukleotid 3154 v templátové DNA mutovaného (*Mutant*) nebo původního typu (*Wild type*). K selhání amplifikace templátové DNA by mělo dojít pouze v důsledku blokování PCR reakce v důsledku vysoké vlásenkové aktivity oblasti ve vzdálenosti přibližně 20 nukleotidů (v 5' i 3' směru) od nukleotidu 3154 nebo z jiných příčin (například kontaminace PCR reakční směsí).

Primery W3154R, W3154F, M3154R a M3154F jsou pro spolehlivou detekci bodové mutace nukleotidu 3154 nepoužitelné. V neprospěch amplifikace oblasti DNA zahrnující nukleotid 3154 přispívá mimo jiné i fakt, že primery nasedající ve vzdálenosti přibližně 20 nukleotidů (nalevo i napravo od nukleotidu 3154) vykazují podle hodnocení programu Primer3 (Rozen *et Skaletsky*; 2000) vysokou vlásenkovou aktivitu.

#### PCR amplifikace templátové DNA za použití reakční směsi obsahující tři primery

Určení přítomnosti či absence bodové mutace v templátové DNA pomocí PCR amplifikace za použití reakční směsi obsahující tři primery jsem prováděla, abych vyloučila získání negativních výsledků amplifikace jako následku kontaminace či chyby při pipetování. Tři primery v PCR reakční směsi při amplifikaci DNA byly použity například ve studii Wanga *et al.* (2011). Autoři v tomto uspořádání prováděli určení pohlaví jedinců volavky žlutozobé (*Egretta eulophotes*). Trojice primerů byla složená z jednoho primeru přímého (*Forward primer*) a dvou primerů zpětných (*Reverse*) v poměru 1:1:1. Autoři na základě použití stejné PCR reakční směsi se třemi primery



získali odlišně dlouhé PCR produkty v závislosti na tom, zda prováděli amplifikaci ptačího Z nebo W chromozómu (Wang *et al.*, 2011). Ve své práci jsem na rozdíl od Wanga *et al.* (2011) použila poměr tří primerů v reakční směsi jako 2:1:1 (V10F:V11R:W3004R či V10F:V11R:M3004R), přičemž převažuje množství *Forward* primeru V10F oproti každému z *Reverse* primerů (V11R, W3004R nebo M3004R). Při použití tohoto poměru jsem po vizualizaci v gelu detekovala výraznější PCR produkty, než při použití vzájemného poměru primerů 1:1:1.

Pro detekci bodové mutace nukleotidu 3004 jsem v reakčních směsích použila primery V10F+V11R+W3004R nebo V10F+V11R+M3004R. Oba primery označené písmenem R nasedají na stejné vlákno DNA. Dochází mezi nimi tedy ke kompetici o to, který z nich se bude podílet na vzniku PCR produktu spolu s protisměrně orientovaným primerem V10F (Patrinose *et Ansorge*, 2010). Na základě článku Patrinose *et Ansorge* (2010) jsem teoreticky odvodila, že by po amplifikaci DNA měly vznikat dva PCR produkty (pokud je diagnostický primer zcela komplementární s templátovou DNA). Jeden PCR produkt délky 465 bp (pomocí primerů V10F+V11R) a jeden PCR produkt délky 240 bp (pomocí primerů V10F+W3004R, případně V10F+M3004R). V důsledku vzájemné kompetice by měl vznikat kratší PCR produkt ve větší míře. Po provedení amplifikace templátové DNA jsem zjistila, že tento kratší PCR produkt plně blokuje vznik druhého, delšího PCR produktu (délky 465 bp; za předpokladu, že diagnostický primer na DNA nasedá zcela komplementárně). Pokud se diagnostický primer komplementárně s templátovou DNA nepáruje, vzniká místo něj pouze PCR produkt primerů V10F+V11R (Patrinose *et Ansorge*, 2010).

Pro detekci bodových mutací v DNA kleštíka PCR amplifikací za použití tří primerů v PCR reakční směsi by měla být použita taková DNA polymeráza, která postrádá 5'→3' exonukleázovou aktivitu. Diagnostický primer nasedlý na vlákno DNA (mezi okrajové primery V10F a V11R) by byl v opačném případě aktivitou této DNA polymerázy odstraněn (Holland *et al.*, 1991).

#### Problémy nastalé při amplifikaci templátové DNA pomocí tří primerů v PCR reakční směsi

Při amplifikaci mutací nezměněné DNA za použití reakční směsi obsahující primery V10F+V11R+M3004R vznikal kromě diagnostického PCR produktu délky 465 bp nespecifický PCR produkt o velikosti asi 750 bp. Docházelo tak pravděpodobně

v důsledku nespecifické vazby diagnostického primeru M3004R do jiných sekvencí DNA (Anonymous, 2014). Program Primer3 hodnotí kvalitu primerů V10F a V11R jako nedostačující pro bezproblémovou amplifikaci templátové DNA (Rozen *et Skaletsky*; 2000), jak již bylo uvedeno výše v textu (vysoká vlásenková aktivita při teplotě 47,28 °C – V10F, respektive 39,74 °C – V11R). Dalším možným důvodem vzniku nespecifického produktu o přibližné délce 750 bp může být zvýšená koncentrace primeru V10F u použitého poměru primerů 2:1:1 v PCR reakční směsi (V10F:V11R:W3004R respektive V10F:V11R:M3004R) (Anonymous14, 2017).

Při amplifikaci templátové DNA s mutací nezměněným nukleotidem 3004, za použití PCR reakční směsi obsahující primery V10F+V11R+M3004R, vznikal při zvýšení  $T_a$  na 56 °C další nespecifický PCR produkt o délce asi 200 bp. K jeho vzniku může docházet v důsledku zablokování prodlužování primeru V11R, pokud na část templátových molekul DNA (ve směru prodlužování primeru V11R) nasedá i diagnostický primer M3004R (i když 3'-konec tohoto *Mutant* diagnostického primeru není s nukleotidem 3004 ve *Wild type* templátové DNA komplementární) (Patrinos *et Ansorge*, 2010).

#### Teoreticky odvozené výsledky amplifikace DNA kleštíka včelího z populací vnímavých a rezistentních k tau-fluvalinátu









V rámci jedné populace kleštíků může vykazovat rezistenci k tau-fluvalinátu pouze část jedinců (tedy pouze část kleštíků takovéto populace nese v DNA mutaci nukleotidu 3004) (Martin, 2002; Hubert *et al.*, 2013). Ve schématu 4 jsem uvedla, které PCR produkty by podle teoretického předpokladu měly vzniknout po PCR amplifikaci DNA populací kleštíků, u kterých je nukleotid 3004 nezměněný nebo změněný bodovou mutací. Dále jsem uvedla situaci, kdy je amplifikována DNA, která byla vyizolovaná z populace kleštíků, ve které nese mutaci nukleotidu 3004 pouze část jedinců (Martin, 2002; Hubert *et al.*, 2013). Výsledek PCR amplifikace mutací změněné DNA jsem však nemohla experimentálně potvrdit, protože se mi během mé práce nepodařilo tuto mutovanou DNA vyizolovat.

Pokud by byla amplifikaci podrobena DNA vyizolovaná pouze z jednoho kleštíka, mělo by být podle teoretického předpokladu také možné určit, zda je tento jedinec homozygotem pro přítomnost či absenci bodové mutace nukleotidu 3004, nebo zda je pro tuto mutaci heterozygotní (mutace nukleotidu 3004 se vyskytuje pouze v jednom vlákně DNA). Podle teoreticky odvozených výsledků ve schématu 4 by byl

jedinec homozygotem pro absenci bodové mutace nukleotidu 3004 (vlevo), homozygotem pro přítomnost této mutace (uprostřed) či heterozygotem (vpravo). Sloupec napravo oddělený silnější svislou čarou zobrazuje situaci, která by po amplifikaci DNA nikdy neměla nastat.

**Schéma 4: Teoreticky odvozené produkty dvojic PCR amplifikací DNA kleštíka včelího (*Varroa destructor*) z populace, ve které se bodová mutace nukleotidu 3004 (zleva): vyskytuje, nevyskytuje (odhadovaný výsledek PCR amplifikace) a vyskytuje u části jedinců (částečně odhadovaný výsledek PCR amplifikace). V pravém sloupi je zobrazena situace, která by PCR amplifikací DNA podle teoretického předpokladu nikdy neměla nastat.**


 PCR produkt 465 bp (modrá)  
 PCR produkt 240 bp (červená)

	Směsný vzorek DNA kleštíka v pozici nukleotidu 3004 genu pro <i>VmNa</i> kanál							
	bez mutace		s mutací		bez i s mutací		nikdy by nemělo nastat	
<b>Použité primery</b>	V10F+ V11R+ W3004R	V10F+ V11R+ M3004R	V10F+ V11R+ W3004R	V10F+ V11R+ M3004R	V10F+ V11R+ W3004R	V10F+ V11R+ M3004R	V10F+ V11R+ W3004R	V10F+ V11R+ M3004R
<b>Výsledek PCR v gelu</b>								
<b>Závěr</b>	Populace vnímavá k tau-fluvalinátu		Populace rezistentní k tau-fluvalinátu		Část jedinců populace rezistentní k tau-fluvalinátu		Chyba v provedení, nutno analýzu zopakovat	

Při amplifikaci DNA kleštíků jedné populace (vzorek DNA je ve dvou PCR mikrozkušavkách) dvěma souběžnými PCR reakcemi lišícími se ve složení primerů v PCR reakčních směsích (primery V10F+V11R+W3004R v jedné, a primery V10F+V11R+M3004R ve druhé PCR reakční směsi) by měly vždy vzniknout minimálně v jedné PCR mikrozkušavce PCR produkty délky 240 bp (Jing *et al.*, 2012). Jeden z diagnostických primerů (W3004R nebo M3004R) se má podle teoretického předpokladu vždy svým 3'-koncem zcela komplementárně párovat s odpovídajícím nukleotidem 3004 v templátové DNA (Patrinos *et al.*, 2010; Jing *et al.*, 2012).

Další práce na detekci bodové mutace nukleotidu 3004 mající vztah k rezistenci kleštíka včelího k tau-fluvalinátu.

Pro budoucí práci na detekci bodové mutace nukleotidu 3004 v genu pro sodíkový kanál kleštíka včelího hodlám použít nové primery nahrazující primery V10F a V11R, které by byly programem Primer3 (Rozen *et* Skaletsky; 2000) lépe hodnoceny.

Vzhledem k tomu, že se mi během izolace a analýzy DNA kleštíka včelího nepodařilo identifikovat žádnou populaci (ze šesti analyzovaných), která by v DNA nesla bodovou mutaci nukleotidu 3004 C→G (cytosin→guanin), nemohla jsem otestovat amplifikaci této DNA pomocí pro ni navržených diagnostických primerů M3004F a M3004R. Pro jednoznačné vyslovení závěru o možnosti potvrdit nebo vyvrátit přítomnost bodové mutace nukleotidu 3004 v genu pro sodíkový kanál pomocí PCR amplifikační za použití PCR reakční směsi obsahující trojici primerů, bude nutné vyizolovat DNA rezistentní populace kleštíků a v detekci bodové mutace nukleotidu 3004 v DNA kleštíků dále pokračovat. Dodání vzorků rezistentních kleštíků pro budoucí práci jsem se pokusila zajistit domluvou s RNDr. Františkem Kašparem, který vede pokusný včelín Pekařov (detašované pracoviště Výzkumného ústavu včelařské v Dole) (Anonymou24, 2017), v němž je mimo jiné sledován mechanismus vzniku rezistence kleštíků k varroacidům obsahujícím jako účinnou látku tau-fluvalinát.

## 7 Závěr

V této bakalářské práci jsem se zabývala detekcí bodových mutací nukleotidových pozic 3004 a 3154 ve *VmNa* genu pro sodíkový kanál kleštíka včelího (*Varroa destructor*), které mají spojitost se vznikem rezistence kleštíka k varroacidní látce tau-fluvalinátu. Detekci těchto mutací jsem prováděla PCR amplifikační reakcí za použití PCR reakční směsi obsahující tři primery. Přítomnost či absence bodové mutace v DNA kleštíků měla být určena vznikem odpovídajícího PCR produktu od diagnostického primeru, jehož 3'-koncový nukleotid je komplementární k jemu odpovídajícímu nukleotidu v templátové DNA (ovlivňovanému bodovou mutací).

Detekci bodové mutace nukleotidu 3154 jsem nebyla schopná provést, protože jsem diagnostické primery určené pro její detekci chybně navrhla v důsledku nepublikovaných skutečností týkajících této bodové mutace. Mutace nukleotidu 3154 nicméně nemá přímý vliv na rezistenci kleštíků k tau-fluvalinátu, proto nebylo její stanovení pro mou práci prioritní. Optimalizaci podmínek PCR amplifikační reakce pro detekci bodové mutace nukleotidu 3004 se třemi primery v PCR reakční směsi jsem prováděla na směsných vzorcích genomické DNA kleštíka včelího izolovaných z populací kleštíků. V žádném vzorku DNA jsem nedetekovala mutaci nukleotidu 3004. Nemohla jsem tedy ověřit, zda je mnou uvedené uspořádání PCR amplifikační reakce pro detekci bodové mutace 3004 naprosto spolehlivé.

V další práci na detekci bodové mutace nukleotidu 3004, která má vztah k rezistenci kleštíků k tau-fluvalinátu, hodlám pokračovat, jakmile se mi podaří detekovat a vyizolovat DNA, která je na této nukleotidové pozici mutovaná.

## 8 Seznam zkratek

A	adenin
ABPV	virus akutní paralýzy včel
BQCV	virus zčernání matečnicků
C	cytosin
CBPV	virus chronické paralýzy včel
CWV	virus zakalených křídel
DDT	dichlordifenyltrichlorethan
DTT	dithiothreitol
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	deoxynukleosidtrifosfáty
DWV	virus deformovaných křídel
G	guanin
IAPV	izraelský virus akutní paralýzy
KBV	kašmírský včelí virus
kdr	rezistence k insekticidům obsahujícím dichlordifenyltrichlorethan a pyrethroidy, vznikající v důsledku bodových mutací ( <i>knockdown resistance</i> )
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
PCR	polymerázová řetězová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
SBPV	virus pomalé paralýzy včel
SBV	virová nákaza včelího plodu (pytlíčkovitost plodu)
T	thymin

## 9 Použitá literatura

Anderson, A.I. (1994): Non-reproduction of *Varroa jacobsoni* in *Apis mellifera* colonies in Papua New Guinea and Indonesia. *Apidologie*, 25, 412–421.

Anderson, D.L., Trueman, J.W.H. (2000): *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology*, 24, 165–189.

Anonymous1 (2016): *Apis mellifera* taxonomy. National center for biotechnology information. Dostupné online na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=7460>, navštíveno dne 13. 10. 2016.

Anonymous10 (2016): Apitraz 500 mg proužky do úlů medonosných včel. Dostupné online na: <https://pribalovy-letak.info/apitraz-500-mg>, navštíveno dne 15. 2. 2017.

Anonymous11 (2016): Fluvalinate. Dostupné online na: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+6659>, navštíveno dne 2. 11. 2016.

Anonymous12 (2016): Tau-fluvalinate. Internatinal Programme on Chemical Safety, Chemical Safety Information from Ingovernmental Organizations. Dostupné online na: <http://www.inchem.org/documents/ukpids/ukpids/ukpid81.htm>, navštíveno dne 2. 11. 2016.

Anonymous13 (2016): *Varroa destructor* gene sequences. National center for biotechnology information. Dostupné online na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=varroa%20destructor#see-all>, navštíveno dne 15. 11. 2016.

Anonymous14 (2017): PCR Troubleshooting – Nonspecific Bands od Primer-Dimers. Bio-Rad. Dostupné online na: <http://www.bio-rad.com/en-cz/applications-technologies/pcr-troubleshooting#gel2>, navštíveno dne: 2. 3. 2017.

Anonymous15 (2017): Community register od veterinally medicinal products – VarroMed. European Commision. Dostupné online na: <http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/html/v203.htm>, navštíveno dne 8. 3. 2017.

Anonymous16 (2017): VarroMed – souhrnné informace o přípravku. Dostupné online na: [https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2017/20170202136456/anx\\_136456\\_cs.pdf](https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2017/20170202136456/anx_136456_cs.pdf), navštíveno dne: 8. 3. 2017.

Anonymous17 (2017): Oxuvar – souhrnné informace o přípravku. Dostupné online na: <http://uskvbl.cz/cs/registrace-a-schvalovani/registrace-vlp/seznam-vlp/aktualne-registrovane-vlp/detail-pipravku-vlp?Id=0910f7c780864f20>, navštíveno dne 10. 3. 2017.

Anonymous18 (2017): Tau-fluvalinate structure. Pubmed. Dostupné online na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/fluvalinate>, navštíveno dne 9. 3. 2017.

Anonymous19 (2017): Flumethrin structure. PubMed. Dostupné online na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6033664#section=Top>, navštíveno dne 8. 3. 2017.

Anonymous20 (2017): Acrinathrin structure. PubMed. Dostupné online na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6436606#section=2D-Structure>, navštíveno dne 8. 3. 2017.

Anonymous21 (2017): Amitraz structure. PubMed. Dostupné online na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/36324#section=2D-Structure>, navštíveno dne 8. 3. 2017.

Anonymous22 (2017): Varroamonitoring systém. Dostupné online na: <http://www.varroamonitoring.cz/home.do>, navštíveno dne 10. 4. 2017.

Anonymous23 (2017): Determination of Total Calcium and Magnesium Ion Concentration, University of Canterbury, New Zealand. Dostupné online na: [http://www.outreach.canterbury.ac.nz/chemistry/documents/magnesium\\_calcium.pdf](http://www.outreach.canterbury.ac.nz/chemistry/documents/magnesium_calcium.pdf), navštíveno dne 24. 4. 2017.

Anonymous24 (2017): Pokusný včelín Pekařov. Boj s varroózou. Dostupné online na: [http://www.pvpekarov.cz/\\_sgg/m2m4\\_1.htm](http://www.pvpekarov.cz/_sgg/m2m4_1.htm), navštíveno dne 24. 4. 2017.

Anonymous2 (2016): *Varroa destructor* taxonomy. National center for biotechnology information. Dostupné online na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=109461>, navštíveno dne 12. 10. 2016.

Anonymous3 (2016): *Varroa* taxonomy. National center for biotechnology information. Dostupné online na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=62624>, navštíveno dne 1. 11. 2016.

Anonymous4 (2008): Principy monitoringu. Projekt VMS. Pracovní společnost nástavkových včelařů CZ, z.s. Dostupné online na: [http://www.psnv.cz/index.php?option=com\\_content&view=article&id=55:principy-monitoringu-spadu-kletika-veliho-varroa-destructor&catid=35:vms&Itemid=57](http://www.psnv.cz/index.php?option=com_content&view=article&id=55:principy-monitoringu-spadu-kletika-veliho-varroa-destructor&catid=35:vms&Itemid=57), navštíveno dne 19. 9. 2016.

Anonymous5 (2008): Varroosis of Honey Bee. OEI Terrestrial Manual 2008. Dostupné online na <http://www.oie.int/>, navštíveno dne 31. 10. 2016.

Anonymous6 (2016): Znění zákona 166/1999 Sb. Dostupné online na: [http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/Legislativa-MZe\\_uplna-zneni\\_zakon-1999-166-viceoblasti.html](http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/Legislativa-MZe_uplna-zneni_zakon-1999-166-viceoblasti.html), navštíveno dne 1. 11. 2016.



Anonymous7 (2016): Aktuálně registrované Veterinární léčivé přípravky. Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv. Dostupné online na: <http://uskvbl.cz/cs/registrace-a-schvalovani/registrace-vlp/seznam-vlp/aktualne-registrovane-vlp>, navštíveno dne 3. 10. 2016.

Anonymous8 (2003): GABON PA 92 proužky *ad usum veterinarium*. Návody k použití léčiv. Dostupné online na: <http://pardubicti-vcelari.cz/pages/leciva/gabon-pa-92-web.pdf>, navštíveno dne 16. 10. 2016.

Anonymous9 (2014): Gabon Flum 4 mg proužky do úlu k léčení varroázy včel. Návody k použití léčiv. Dostupné online na: <http://pardubicti-vcelari.cz/pages/leciva/fluminfo.pdf>, navštíveno dne 16. 10. 2016.

Bailey, L., Ball, B.V., Perry, J.N. (1981): The prevalence of viruses of honey bees in Britain. *Annals of Applied Biology*, 97, 109–118.

Bailey, L., Gibbs, A.J., Woods, R.D. (1963): Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology*, 21, 390–395.

Ball, B.V. (1985): Acute paralysis virus isolates from honeybee, *Apis mellifera*, colonies infested with *Varroa jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research*, 24, 115–119.

Ball, B.V. (1989): *Varroa jacobsoni* as a virus vector. In: Cavalloro R. (Ed.): Present status of varroatosis in Europe and progress in the varroa mite control. Italy, Udine. 241–244.

Beaurepaire, A.L., Truong, T.A., Fajardo, A.C., Dinh, T.Q., Cervancia, C., Moritz, R.F.H. (2015): Host specificity in the honeybee parasitic mite, *Varroa* spp. in *Apis mellifera* and *Apis cerana*. *PLoS ONE Journal* 10, 8.

Brown, M., Learner, J., Wilford, J. (2015): Managing *Varroa*. Leaflet. The Animal and Plant Health Agency National Agri–Food Innovation Campus, York.

Catterall, W.A., (2000): From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 26, 13–25.

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.

Čermák, K., Gruna, B., Hajdušková, J., Holub, P., Klíma, Z., Kovařík, I., Navrátil, S., Texl, P., Texl, F., Rytina, Tůma, Z. (2016): Včelařství, 1. díl. Pracovní společnost nástavkových včelařů CZ, z.s. České Budějovice.

- Dainat, B., Ken, T., Berthoud, H., Neumann, P. (2009): The ectoparasitic mite *Tropilaelaps mercedesae* (Acari, Laelapidae) as a vector of honeybee viruses. *Insectes Socioux*, 56, 40–43.
- Danihlík, J. (2008): Kyselina mravenčí a šťavelová v chovu včel. *Moderní včelař*, 6, 27–28. Dostupné online na: <http://www.mojevcely.eu/news/kyselina-mravenci-a-stavelova-v-chovu-vcel/>, navštíveno dne 2. 10. 2016.
- De Jong, D., De Jong, P.H., Goncalves, L.S. (1982): Weight loss and other damage to developing worker honey bees from infestation with *Varroa jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research*, 21, 165–167.
- De Ruijter, A., Pappas, N. (1983): Karyotype and sex determination of *Varroa jacobsoni* Oud. affecting honey bees: present status and needs. *Proceeding of a meeting of the EC Experts' Group*. Italy, Udine. 41–44.
- Dong, K. (1993): Molecular mechanism of knockdown (*kdr*)-type resistance to pyrethroid insecticides in the German cockroach (*Blattella germanica* L.). PhD práce. Cornellova univerzita, Ithaca, New York, USA. Dostupné online na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11721523>, navštíveno dne: 25. 1. 2017.
- Dong, K. (2007): Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invertebrate Neuroscience*, 7, 17–30.
- Donzé, G., Guerin, P.M. (1994): Behavioural attributes and parental care of *Varroa* mites parasitizing honeybee brood. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 34, 305–319.
- Donzé, G., Herrmann, M., Bachofen, B., Guerin, P.M. (1996): Effect of mating frequency and brood cell infestation rate on the reproductive success of the honeybee parasite *Varroa jacobsoni*. *Ecological Entomology*, 21, 17–26.
- Eyer, M., Chen, Y.P., Schäfer, M.O., Pettis, J., Neumann, P. (2007): Small hive beetle, *Aethina tumida*, as a potential biological vector of honey bee viruses. *Apidologie*, 40, 419–428.
- Fuchs, S., Langenbach, K. (1989): Multiple infestation of *Apis mellifera* L. brood cells and reproduction in *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, 20, 257–266.
- Genersch, E., Aubert, M. (2010): Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Veterinary Research*, 41, 54.
- Gisder, S., Aumeier, P., Genersch, E. (2009): Deformed wing virus (DWV): viral load and replication in mites (*Varroa destructor*). *Journal of General Virology*, 90, 463–467.
- Griffiths, R., Double, M.C, Orr, K., Dawson, R.J.G. (1998): A DNA test to sex most birds, *Molecular Ecology*, Dostupné online na: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-294x.1998.00389.x/abstract>, navštíveno dne: 1. 3. 2017.

- Gregorc, A., Pogačnik, A., Bowen, I.D. (2004): Cell death in honeybee (*Apis mellifera*) larvae treated with oxalic or formic acid. *Apidologie*, 35, 453–460.
- Hamilton, W. D. (1967): Extraordinary sex ratios. *Science*, 156, 477–488.
- Harris, J., Danka, R. (2008): *Varroa* mite Reproductions Guideline. *Varroa* Reproductions Guideline. Courtesy of Jeff Harris & Robert Danka USDA Honey Bee Breeding. Baton Rouge.
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H. (1991): Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry*, 88, 7276–7280.
- Hubert, J., Nesvorná, M., Kamler, M., Kopecký, J., Tyl, J., Titěra, D., Stará, J. (2013): Point mutations in the sodium channel gene conferring tau-fluvalinate resistance in *Varroa destructor*. *Wiley Online Library. Pest Management Science*, 70, 889–894.
- Ionescu-Varo, M., Suci, M. (1979): Prälimin角度ben über Anatomie und Histochemie der Milbe *Varroa jacobsoni* Oudemans. Bekämpfung und Vorbeugung der *Varroatose*. Apimondia Publishing House, 41–55, Bukurešť.
- Jing, L., Shunmou, H., Meiyu, S., Shengyi, L., Yumei, L., Wanxing W., Xiurong, Z., Hanzhong, W., Wei, H. (2012): An improved allele-specific PCR primer design method for SNP marker analysis and its application. *Plant Methods*, 8, 34.
- Jeyaprakash, A., Hoy, M.A. (2009): First divergence time estimate of spiders, scorpions, mites and ticks (subphylum: Chelicerata) inferred from mitochondrial phylogeny. *Experimental and Applied Acarology*, 47, 1–18.
- Kamler, F., Veselý, V., Titěra, D. (2014): Celý rok proti varroáze, podle metodik Výzkumného ústavu včelařského v Dole. Výzkumný ústav včelařský v Dole, Libčice nad Vltavou.
- Klíma, Z. (2016): Ozdravná opatření proti varroóze a moru včelího plodu. Přednáška spolupořádaná Pracovní společností nástavkových včelařů-CZ, z.s., prezentováno dne 3. 12. 2016, Olomouc.
- Koch, W., Ritter, W. (1991): Experimental examinations concerning the problem of deformed emerging bees after infestation with *Varroa jacobsoni*. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 38, 337–344.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016): MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33, 1870–1874.

- Kustermann, T. (1990): Untersuchungen zur populationsstruktur der milbe *Varroa jacobsoni* Oud. in zellen schlupfender arbeiterinnenbrut von *Apis mellifera* L. Diplomová práce. Univerzita Hohenheim, Stuttgart, Německo. Dostupné online na: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00891056/document>, navštíveno dne: 25. 1. 2017.
- Malena, M. (2015): Nařízení Státní veterinární správy. Mimořádná veterinární opatření. Dostupné online na: [http://eagri.cz/public/web/file/367729/Narizeni\\_varroaza.pdf](http://eagri.cz/public/web/file/367729/Narizeni_varroaza.pdf), navštíveno dne 22. 3. 2017.
- Martin, M. (2004): Acaricide (pyrethroid) resistance in *Varroa destructor*. *Bee World*, 85, 67–69.
- Martin, S.J. (1994): Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in worker brood of the honey bee *Apis mellifera* L. under natural conditions. *Experimental and Applied Acarology*, 18, 87–100.
- Martin, S.J. (1995): Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in drone brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions. *Experimental and Applied Acarology*, 19, 199–210.
- Martin, S.J., Cook, C. (1996): Effect of host brood type on number of offspring produced by the honeybee parasite *Varroa jacobsoni*. *Experimental and Applied Acarology*, 20, 387–390.
- Martin, S.J., Holland, K., Murray, M. (1997): Non-reproduction in honeybee mite *Varroa jacobsoni*. *Experimental and Applied Acarology*, 21, 539–549.
- Münstedt, K., Münstedt, K.P., Teichfischer, P. (2015): Přehled virů napadajících včelstva. *Moderní včelař*, 3, 22.
- Narahashi, T. (1988): Molecular and cellular approaches to neurotoxicology: past, present and future. In: Lunt G.G. (Ed.). *Neurotoxicology: Molecular basis of drug and pesticide action*, 563–582.
- Navrátil, S., Klíma, Z., Palíková, M. (2012): Choroby včel – multimediální pomůcka. Dostupné online na: <https://fvhe.vfu.cz/static/informace-o-fakulte/sekce-ustavy/uvozp/choroby-vcel/index.html>, navštíveno dne 11. 3. 2017.
- Nozal, M.J., Bernal, J.L., Gómez, L.A., Higes, M., Meana, A. (2003): Determination of oxalic acid and other organic acids in honey and in some anatomic structures of bees. *Apidologie*, 34, 181–188.
- O'Reilly, A.O., Khambay, B.P.S., Williamson, M.S., Field, L.M., Wallace, B.A., Davies, T.G.E. (2006): Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. *Biochemistry*, 396, 255–263.

- O'Reilly, A.O., Williamson, M.S., González-Cabrera, J., Turberg, A., Field, L.M., Wallace, B.A. (2013): Predictive 3D modelling of the interactions of pyrethroids with the voltage-gated sodium channels of ticks and mites. *Pest Management Science*, 3561.
- Parker, R., Guarna, M.M., Melathopoulos, A.P., Moon, K.-M., White, R., Huxter, E., Pernal S.F., Foster, L.J. (2012): Correlation of proteome-wide changes with social immunity behaviors provides insight into resistance to the parasitic mite, *Varroa destructor*, in the honey bee (*Apis mellifera*). *Genome Biology*, 13, R81.
- Patrinos, G., Ansorge, W.J. (2010): *Molecular diagnostics*. Academia Press, Second edition, 22.
- Pohl, F. (2008): Varroáza: Jak ji poznat a úspěšně potírat. Víkend. Líbeznice.
- Pohl, F. (2015): Včelaření nejen pro začátečníky. Víkend. Líbeznice.
- Prelich, G. (1999): Suppression mechanisms: Themes from variations. *Trends in Genetics*, 15, 261–266.
- Přidal, A. (2007): Odborná včelařská terminologie: Názvosloví živočichů a parazitismus. *Včelařství*, 59, příloha 7–8.
- Rehm, S.-M., Ritter, W. (1989): Sequence of the sexes in the offspring of *Varroa jacobsoni* and the resulting consequences for calculation of the developmental period. *Apidologie*, 20, 339–343.
- Rozen, S., Skaletsky, H. J. (2000): Primer 3 on the WWW for general users and for biologists programmers. In: Miesner S, Krawetz SA (Eds.) *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Human Press Inc., Totowa, 365–386.
- Sabelis, M.W., Nagelkerke, C.J. (1992): Sex allocation and pseudo-arrhenotoky in phytoseiid mites: an overview. *Evolution and diversity of sex ratio in insects and mites*. *Experimental and Applied Acarology*, 4, 512–541.
- Sammataro, D., Yoder, J.A. (2011): *Honey Bee Colony Health: Challenges and Sustainable*. CRC Press, First edition.
- Smith, R H., Shaw, M.R. (1980): Haplodiploid sex ratios and the mutation rate. *Nature*, 287, 728–729.
- 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.
- Steiner, J., das Graças Pompolo, S., Takahashi, C.S., Gonçalves, L.S. (1982): Cytogenetics of the acarid *Varroa jacobsoni*. *Revista Brasileira de Genética*, 5, 841–844.

Veselý, V. (2003): Včelařství. 2. vydání. Brázda. Praha.

Veselý, V. (2010): Změny v distribuci Gabonu PA 92. Včelařství. Časopis. Dostupné online na: <http://www.vcelarstvi.cz/files/formulare/gabon.pdf>, navštíveno dne 3. 10. 2016.

Wang, R., Liu, Z., Dong, K., Jelzen, P., Pettis, J., Huang, Z. (2002): Association of novel mutations in a sodium channel gene with fluvalinate resistance in the mite, *Varroa destructor*. Journal of Apicultural Research Impact and Description, 41, 17–25.

Wang, R., Huang, Z.Y., Dong, K. (2003): Molecular characterization of an arachnid sodium channel gene from the varroa mite (*Varroa destructor*). Insect Biochemistry and Molecular Biology, 33, 733–739.

Wang, Z., Zhou, X., Lin, Q., Fang, W., Chen, X. (2011): New primers for sex identification in the Chinese Egret and other ardeid species. Molecular Ecology Resources 1, 176–179.

Yang, X., Cox-Foster, D. (2007): Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence and microbial challenge. Parasitology, 134, 405–412.

Yue, C., Genersch, E. (2005): RT-PCR analysis of Deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). Journal of General Virology, 86, 3419–3424.