

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY



**Využití polymorfních mikrosatelitů při studiu páření
včely medonosné (*Apis mellifera*)**

Diplomová práce

Bc. Kateřina Sapáková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2020

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

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora: Kateřina Sapáková

Název práce: Využití polymorfních mikrosatelitů při studiu páření včely medonosné (*Apis mellifera*)

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

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

Rok obhajoby práce: 2020

Klíčová slova: Včela medonosná, *Apis mellifera*, páření, trubec, mikrosatelity.

Počet stran: 56

Počet příloh: 1

Jazyk: Český

Souhrn

Tato diplomová práce se zabývá pářením včely medonosné (*Apis mellifera*), odhadem počtu trubců, kteří se s matkou pářili a zalétavostí trubců v rámci stanovišť.

V teoretické části jsou charakterizovány tři kasty včel a život ve včelstvu. Je popsán život trubce a konkrétněji život abnormálních diploidních trubců. Dále je práce zaměřena na páření včely a způsob haplodiploidního určení pohlaví a v návaznosti objasnění zapojení vybraných genů *csd*, *fem* a *dsx* do určení pohlaví včely. Dále jsou zmíněny geny, které byly objeveny skupinou The Honey Bee Genome Sequencing Consortium. Následuje obecná charakteristika mikrosatelitů a popsání mikrosatelitů pro včelu medonosnou.

V praktické části této diplomové práce je zahrnut odběr vzorků z 5 různých stanovišť, celkem 5 matek a 60 trubců včely medonosné. Ze zadečků matek byly vypreparovány semenné vajíčky. Z nich z těl matek i těl trubců byla izolována DNA. Dále byly optimalizovány podmínky PCR pro 20 polymorfních mikrosatelitů.

Při testování vzorků na mikrosatelitech byl vyloučen jeden mikrosatelit, který neposkytl žádný PCR produkt a 3 mikrosatelity z důvodu poskytnutí pouze monomorfního PCR produktu. Následně u celkem 16 polymorfních mikrosatelitů na 65 testovaných jedincích (70 vzorcích) byla zjištěna většinou nízká variabilita a bylo detekováno od 2 do přibližně 12 alel na lokus. PCR produkty DNA ze semenného vajíčku neumožňují rozhodnout o přesném počtu trubců, kteří se páří s matkou.

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Kateřina Sapáková

Title: Use of polymorphic microsatellites in study of mating in honeybee (*Apis mellifera*)

Type of thesis: Master

Department: Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc

Supervisor: RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.

The year of presentation: 2020

Keywords: Honey bee, *Apis mellifera*, mating, drone, microsatellites.

Number of pages: 56

Number of appendices: 1

Language: Czech

Summary

This master thesis studies mating in honey bees (*Apis mellifera*) on drone congregation area, attempts to estimate the number of drones who mated with the queen bee and the drones flightability within their habitats.

The theoretical section of the thesis outlines the life in a bee hive. It focuses on the life of drones and specifically on the life of diploid drones. It describes the mating process between the queen and the drone, the haplodiploid sex determination of honey bees and the involvement of genes in complementary sex determination in honey bee *csd*, *fem* and *dsx*. The genes discovered by The Honey Bee Genome Sequencing Consortium are presented. A general characteristic of microsatellites and particularly the microsatellites isolated for the honey bee ends this section.

The practical part of the thesis covers the samples taken from bee hives and the isolation of the genome DNA of 5 bee queens and 60 drones. The spermatheca of the queen bee abdomen was dissected and from every sample the genome DNA was isolated. The conditions for PCR of 20 microsatellites were optimized. During the experiment four microsatellites were excluded, one withholding any PCR product and three microsatellites which provided only monomorphic PCR products. Subsequently, in a total of 16 polymorphic microsatellites in 65 tested individuals (70 samples), a low variability was found, whilst 2 to 12 alleles per locus were detected. PCR products of DNA from spermatheca are not capable to determine the exact number of drones that mated with the queen bee.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Petra Nádvořníka, Ph.D. a že jsem uvedla veškerou použitou literaturu.

V Olomouci dne 24. 7. 2020

Ráda bych poděkovala RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za přínosné odborné rady, připomínky, čas a přátelský přístup, který mi věnoval nejen při experimentální části této diplomové práce.

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíle práce	2
3	Literární přehled	3
3.1	Včela medonosná	3
3.2	Matka a dělnice včely medonosné	6
3.3	Trubec včely medonosné	8
3.4	Diploidní trubci	9
3.5	Páření včel	10
3.6	Haplodiploidní určení pohlaví	11
3.7	Genom včely medonosné	13
3.8	Mikrosatelity	15
3.9	Mikrosatelity včely medonosné	16
4	Materiál a metody	20
4.1	Biologický materiál	20
4.2	Použité chemikálie	20
4.3	Použité roztoky a jejich příprava	21
4.4	Seznam použitých přístrojů a zařízení	23
4.5	Izolace DNA	23
4.6	Amplifikace mikrosatelitů	24
4.7	Polymerázová řetězová reakce	26
4.8	Elektroforetická separace PCR produktů	27
5	Výsledky	30
6	Diskuze	38
7	Závěr	43
8	Literatura	44
9	Přílohy	57

Seznam obrázků

Obr. č. 1: Příbuzenské vztahy ve včelstvu.

Obr. č. 2: Vypreparované orgány zadečku matky včely medonosné (Schönfeld, 1955).

Obr. č. 3: Boční průřez orgány zadečku matky včely medonosné (Schönfeld, 1955).

Obr. č. 4: Matka pářící se s trubcem za letu (Schönfeld, 1955).

Obr. č. 5: Schéma pro určení pohlaví samců a samic včely medonosné.

Obr. č. 6: Vybraná spektra koncentrace DNA vzorků trubců změřených pomocí přístroje NanoDrop.

Obr. č. 7: Elektroforetogram PCR produktů mikrosatelitového lokusu A7.

Obr. č. 8: Elektroforetogram PCR produktů mikrosatelitového lokusu A14.

Obr. č. 9: Elektroforetogram PCR produktů mikrosatelitového lokusu Ap55.

Obr. č. 10: Elektroforetogram PCR produktů mikrosatelitového lokusu Ap81.

Obr. č. 11: Elektroforetogram PCR produktů mikrosatelitového lokusu Ap43.

Obr. č. 12: Elektroforetogram PCR produktů mikrosatelitového lokusu A88.

Seznam tabulek

Tab. č. 1: Délka vývoje zástupců jednotlivých kast včely medonosné (Schönfeld, 1955).

Tab. č. 2: Dvacet párů primerů pro PCR amplifikaci mikrosatelitů včely medonosné testovaných v této práci, s uvedenými sekvencemi a literárním odkazem.

Tab. č. 3: Složení PCR reakční směsi pro 72 vzorků.

Tab. č. 4: Časový a teplotní profil PCR reakce.

Tab. č. 5: Výsledky optimalizace PCR u 20 mikrosatelitních lokusů.

Tab. č. 6: Srovnání počtu alel jednotlivých mikrosatelitů v této diplomové práci s dalšími autory.

Tab. č. 7: Koncentrace DNA ze 70 vzorků matek a trubců včely medonosné kraňské.

1 Úvod

Mikrosatelity jsou většinou nekódující repetitivní oblasti DNA tvořené jednotkami opakování dlouhými maximálně do deseti nukleotidů. Jsou to vhodné genetické markery. Díky jejich vysoké variabilitě a počtu opakování se používají při studiu příbuzenství, genetickém mapování a populačně-genetických studiích. Studium mikrosatelitů je založeno na polymerázové řetězové reakci a následné elektroforetické separaci.

Včela medonosná (*Apis mellifera*) je vysoce socializovaný blanokřídlý hmyz žijící ve včelstvech, ve kterých se rozeznávají tři kasty: matka, dělnice a trubci. Matka je ve včelstvu jediná reprodukční samice a jejím úkolem je kladení vajíček. Dělnic je ve včelstvu několik desítek tisíc a jsou to většinou neplodné samice. Starají se o většinu úkonů ve včelstvu. Trubci jsou samci, jejichž jediným úkolem je spářit se s matkou. Páření probíhá mimo úl na místě zvaném trubčí shromaždiště, které se nachází na odlehlém místě. Na tomto shromaždišti se matka zpravidla jednou za život spáří s více trubci a sperma si uloží do semenného vaku. Spermatu má matka v semenném vaku dostatek po celý svůj reprodukční život. Matky a dělnice včely medonosné jsou diploidní organizmy a mají 32 chromozomů. Trubci jsou za normálních okolností haploidní se 16 chromozomy.

V této diplomové práci bych chtěla, na základě mikrosatelitové analýzy DNA získané ze spermií trubců uložených v semenném vaku matky. Dále bych chtěla určit počet trubců, kteří se s matkou páří a zalétavost trubců v rámci stanovišť pomocí mikrosatelitové analýzy DNA trubců a matek.

2 Cíle práce

1. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
2. Vypracování rešerše na téma diplomové práce (páření včely medonosné, biologické a genetické aspekty, mikrosatelity ve včelím genomu atd.).
3. PCR amplifikace DNA včelích matek a DNA ze zásob trubčího spermatu v jejich tělech pro určení počtu trubců, se kterými se pářily - optimalizace izolace trubčí DNA přímo z trubců a ze semenného váčku oplozených matek, výběr optimálních polymorfních mikrosatelitů (testování podmínek jejich amplifikace a PAGE separace).

3 Literární přehled

3.1 Včela medonosná

Včela medonosná (*Apis mellifera* L.) je vysoce socializovaný blanokřídlý hmyz, který je hlavním opylovačem zemědělských i nezemědělských druhů rostlin, a tím utváří krajinu. Četné potravinové komodity, jako je produkce mandlí, jablek nebo melounů se silně nebo výhradně spoléhají na včelu medonosnou při produkci ovoce, zeleniny nebo jejich semen (Klein *et al.*, 2007). V posledních několika desetiletích se velmi zvýšila závislost zemědělských činností na opylování včel (Aizen *et al.*, 2009).

Hmyz řádu blanokřídlí (Hymenoptera) tvoří extrémně různorodou skupinu s více než 115 000 popsányými druhy obsahujícími přibližně 10 % druhové rozmanitosti živočichů na Zemi (Munoz-Torres *et al.*, 2011). Řád blanokřídlí je dlouhodobě koevolučně propojen s krytosemennými rostlinami (Prýmas *et al.*, 2017) a životní styl blanokřídlých sahá od osamělých po komplexní sociální společenství. Tento hmyz je nezbytný pro udržení diverzity rostlin prostřednictvím opylení a rozptylu semen (LaSalle *et al.*, 1993).

Čeď včelovití (Apidae) zahrnuje včely eusociální a včely samotářské (Gillott, 2005). Eusociální včelovití, do kterých mimo jiné patří i čmeláci a bezžihadlé včely, sdílejí použití vosku při stavbě hnízda, ale včela medonosná používá vosk jako jediný konstrukční prvek pro stavbu jejich plástů (Breed, 2019).

Rod včela (*Apis*) zahrnuje 9 druhů, které se díky odlišným klimatickým podmínkám rozšířily do celého světa s výjimkou polárních oblastí (Přidal *et al.*, 2008). Rod včela se dělí na 3 skupiny: trpasličí včely (*Micrapis*), obří včely (*Macrapis*) a včely normální velikosti (*Apis*). Celkový vzhled všech druhů včel je velmi podobný, ale velikost se liší mezi druhy včel trpasličích a obřích. Zástupce trpasličích je například *A. florea*, jejichž dělnice je dlouhá 9–10 mm a zástupce obřího druhu je například *A. dorsata*, jejichž dělnice je dlouhá až 2 cm (Breed, 2019). Včely střední velikosti jako je *A. mellifera*, pocházejí pravděpodobně z Afriky (Weinstock *et Robinson*, 2006).

Včela medonosná je široce rozšířena v Africe, západní Asii a Evropě s více než 24 poddruhy, které lze na základě morfometrických a molekulárních studií rozdělit do nejméně čtyř linií: linie A v Africe, linie M v západní a severní Evropě, C linie ve východní Evropě a O linie na Blízkém východě a v západní Asii (Ruttner, 1988; Garnery *et al.*, 1992; Whitfield *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2012; Wallberg *et al.*, 2014). Později byla identifikována i pátá linie (Y) ze severovýchodní Afriky a Středního východu (Franck *et al.*, 2001) a možná další šestá linie byla popsána v Sýrii (Alburaki *et al.*, 2013). Poté, co

evropští osadníci kolonizovali různé části světa, byly transportovány a založeny různé linie včely medonosné spolu se včelařskými praktikami, kdy docházelo ke křížení více linií (Sheppard, 1989). V posledních letech se analyzují údaje, které určují původ včely medonosné (Han *et al.*, 2012; Wallberg *et al.*, 2014) a místo afrického původu se vědci přiklánějí spíše k původu asijskému.

Včela medonosná je v současné době jedním z mála druhů včel, který prošel podstatnou domestikací a žije v koloniích, které se nazývají včelstva. Ve včelstvech se vyskytují tři kasty včel: samičí kasty matka a dělnice a samčí kasta trubci (Moore *et al.*, 2015). Jedinci z těchto kast se liší v úlohách prováděných ve včelstvu a to se odráží i v rozdílech ve velikosti zástupců těchto kast (Winston, 1987), morfologii a délce života (Page *et Peng*, 2001). Každá tato kasta má své individuální morfologické znaky, kterými jsou od sebe jedinci různých kast velmi dobře odlišitelní, a také se každá kasta vyvíjí jinak dlouhou dobu (viz tabulka č. 1).

Tabulka č. 1: Délka vývoje zástupců jednotlivých kast včely medonosné (Schönfeld, 1955).

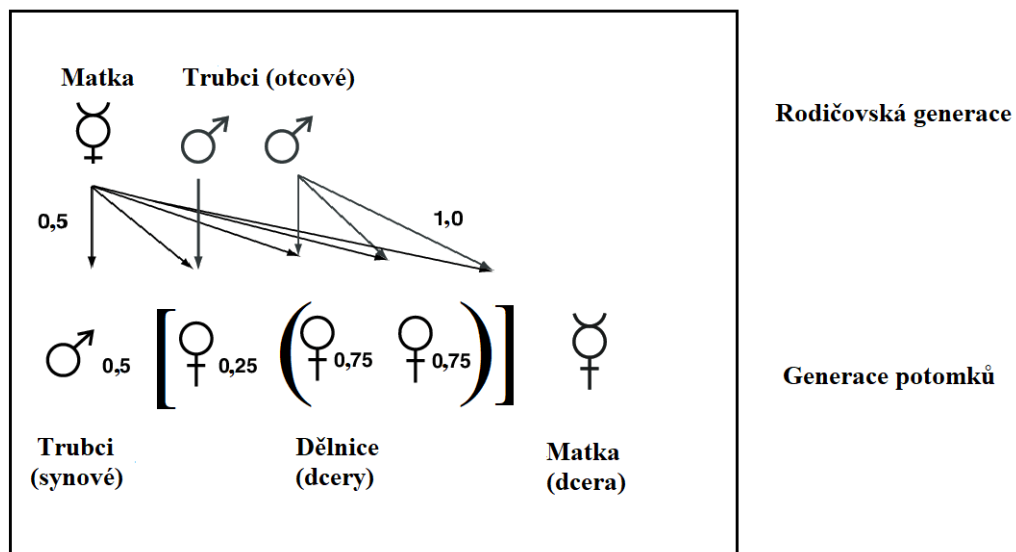
Kasta	Délka vývoje (dny)			
	Vajíčko	Larva	Kulka	Celkem
Matka	3	5	8	16
Dělnice	3	6	12	21
Trubec	3	7	14	24

Matka je zpravidla jediná v kolonii a specializuje se na kladení vajíček. Dojde-li k oplození vajíčka v těle matky, líhne se z vajíčka samice (dělnice nebo matka). V opačném případě se z vajíčka líhne samec (trubec). Trubců je ve včelstvu několik stovek. Jejich jediný úkol je páření se s matkou mimo úl na místě zvaném trubčí shromaždiště. V úlu se trubci vyskytují pouze určitou dobu a přes zimu ve včelstvu chybějí (Withrow *et al.*, 2018). Poslední kastou jsou dělnice. Ve včelstvu je jich nejvíce, až několik desítek tisíc (podle ročního období a síly včelstva). V závislosti na stáří dělnice plní v úlu různé úkony, které jsou dány i množstvím juvenilního hormonu a neurotransmiteru oktopaminu v hemolymfě (Schulz *et al.*, 2002) a to se nazývá věkový polyethismus (Meixner *et Moritz*, 2004). Včely jsou vrcholem sociálního vývoje u hmyzu. Dělnice nejsou za normálních podmínek fertilní a matka je jedinou plodnou samicí (Oxley *et Oldroy*, 2010). Matka signalizuje svou přítomnost ve včelstvu pomocí feromonů, což vede k inaktivaci vaječníků 99,99 % dělnic (Kocher *et Grozinger*, 2011). Pokud je matka defektní či ze včelstva zmizí,

přibližně třetina dělnic aktivuje své vaječníky a začne klást vajíčka. Kladou pouze neo-
plozená vajíčka z nichž se líhnout trubci (Dzierzon, 1845).

Matky se páří s více trubci během jediného období páření. Během tohoto období získají dostatek spermatu k oplození svých vajíček po celý reprodukční život (Brutscher *et al.*, 2019), čímž je včelstvo složeno z mnoha patrilinéárních podskupin (viz obrázek č. 1). Je zřejmé, že věková variabilita mezi dělnicemi je důležitým základem organizace včelstva. Kromě této věkově závislé variace chování bylo prokázáno, že genetická variabilita ovlivňuje to, co dělnice ve včelstvu provádějí za práci a také, že dělnice stejného věku a různých podrodin mají tendenci se specializovat na různé úkoly (Page *et Robinson*, 1991). Rozdělení úkolů dělnic v rámci včelstva tedy závisí i na jednotlivých podrodinách včel (Fuchs *et Moritz*, 1999). Včelstvo se skládá z mnoha podrodin. Příbuznost mezi jedinci se vyjadřuje pomocí koeficientu r , neboli relatedness - příbuznost. V rámci podrodiny jsou dělnice super sestry a $r = 0,75$ (Page *et Laidlaw*, 1988). Dělnice dvou různých podrodin jsou nevlastními sestrami a $r = 0,25$ (Meixner *et Moritz*, 2004).

Obrázek č. 1: Příbuzenské vztahy ve včelstvu. Upraveno podle Oxley *et Oldroyd*, 2010.



Legenda: Genetická příbuznost mezi jedinci v kolonii. Číselné hodnoty vyjadřují koeficient příbuznosti, přičemž čísla mezi dvěma jedinci naznačují genetickou příbuznost mezi těmito jedinci. Šipky označují cesty dědičnosti genetického materiálu od rodičů k potomkům. Dělnice, které sdílejí stejnou matku a otce jsou úplnými sourozenci (super sestry), dělnice sdílející stejnou matku, ale různé otce jsou polovičními sourozenci (nevlastní sestry).

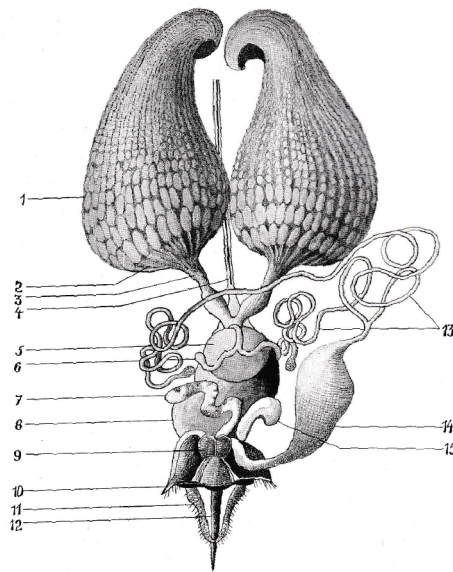
3.2 Matka a dělnice včely medonosné

Ačkoli matka a dělnice mají stejný genotyp, liší se velmi svým vývojem, fyziologií i chováním (Winston, 1991). To je pravděpodobně důsledek faktorů prostředí (Wang *et al.*, 2016). Larvy matek i dělnic jsou krmeny mateří kašičkou po dobu prvních 3 dnů vývoje. Larvy dělnic jsou následně krmeny směsí mateří kašičky, pylu a medu, zatímco larvy matek pouze mateří kašičkou (Haydak, 1943). Předpokládá se, že kvalita a množství larvální potravy jsou primární příčinou rozdílného vývoje (Haydak, 1943; Winston, 1991), strava ovlivní hladinu juvenilního hormonu produkovaného larvou. Hladina hormonu rozhodne, zda se z larvy vyvine dělnice nebo matka (Moore *et al.*, 2015). Matka se vyvíjí v buňce odlišné od buněk dělnic, buňka matky je zřetelně větší a je orientována vertikálně.

Šestnáctý den od naklazení vajíčka se matka líhne, a aby byla schopna vykonávat své funkce v úlu, musí se spářit s trubci. Před snubním letem vylétne matka z úlu na 1 až 2 orientační lety a poté na snubní let, při kterém se páří s trubci. Snubní let probíhá zpravidla 5. až 6. den od vylíhnutí, kdy letí až 3 km od úlu, kde se potká s tisíci trubci v oblasti zvané trubčí shromaždiště (Schmehl *et al.*, 2015). Pokud matka při prvním spáření nezíská dostatečné množství spermií, snubní let ještě jednou opakuje. Matka je ve včelstvu většinou jedinou reprodukční samicí (Anderson, 1963; Barron *et al.*, 2001). Rychlost, jakou může produkovat vajíčka, ovlivňuje růst včelstva. Včela medonosná se liší od jiného sociálního hmyzu v tom, že dělnice mohou matku nahradit jednou z jejích dcer. Dělnice posuzují plodnost matky na základě sledování počtu matek snášených vajíček a na míře a kvalitě jejich oplození. Pokud některý z těchto faktorů klesne, zahájí dělnice výměnu (Baer *et al.*, 2016).

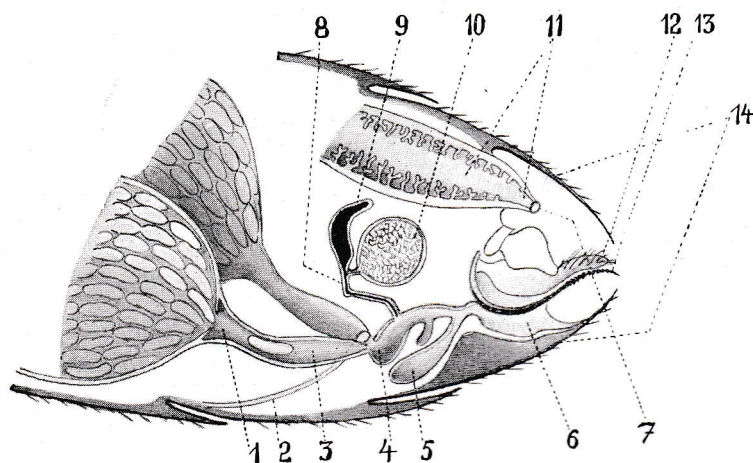
Kromě role matky jako primární reprodukční samice v kolonii, matka nepřetržitě uvolňuje směs feromonů, které pasivně udržují sociální soudržnost úlu (Brutscher *et al.*, 2019). Dělnice jsou fakultativně sterilní a aktivují vaječníky pouze tehdy, když je včelstvo bez matky nebo plodu. Toto rozdělení reprodukčních úkolů umožnilo vývoj silně odlišných kastových znaků, přičemž se matky a dělnice fyziologicky adaptovaly svým rolím (Oxley *et al.*, 2010). Reprodukční kvalita matky je definována nejen její potenciální plodností (převážně velikostí vaječníků), ale také její úspěšností v páření (Tarcy *et al.*, 2019). Uchovávání spermatu samicemi před oplozením vajíčka je fylogeneticky rozšířeným jevem a je často usnadněné přítomností specializovaných anatomických struktur v pohlavním ústrojí samic, jako jsou spermatéky viz obrázek č. 2 (Walker, 1980).

Obrázek č. 2: Vypreparované orgány zadečku matky včely medonosné (Schönfeld, 1955).



Legenda: 1 - vaječník, 2 - kalíšky vaječníků, 3 - vejcovod, 4 - nerv s nervovým zauzlením dole pod spojenými vejcovody, 5 - semenný váček, 6 - žláza semenného váčku, 7 - alkalická jedová žláza, 8 - poševní stěna, 9 - svalstvo žihadla, 10 - krycí šupina, 11 - žihadlová pochva, 12 - žihadlo, 13 - jedová žláza, 14 - jedový váček, 15 - výkalový vak.

Obrázek č. 3: Boční průřez orgány zadečku matky včely medonosné (Schönfeld, 1955).



Legenda: 1 - kalíšek vaječníku, 2 - nerv s nervovým zauzlením při ústí vejcovodů, 3 - vejcovod, 4 - přední díl pochvy, 5 - komora pro napojení pohlavního orgánu trubce, 6 - vyústění pochvy se žihadlovou komorou, 7 - vyústění výkalového vaku, 8 - pumpička s kanálkem pro chámová tělíska, 9 - žláza semenného váčku, 10 - semenný váček se spermatem, 11 - výkalový vak, 12 - pochva žihadla, 13 - žihadlo, 14 - průřezy posledních segmentů.

Uložení spermií v těle matky na základě jednoho nebo dvou snubních letů například umožňuje samicím oplodňovat vajíčka po delší dobu, čímž je zajištěna plodnost i v nepřítomnosti samců, matka díky tomu také není zbytečně vystavena riziku predace (Baer *et al.*, 2016). Polyandrií matka snižuje pravděpodobnost, že se ve včelstvu vyvinou letální diploidní trubci.

3.3 Trubec včely medonosné

Počet trubců v kolonii nepřesahuje 10 % počtu dospělé populace a závisí na fázi vývoje včelstva, počtu jedinců ve včelstvu, přítomnosti a věku matky a množství potravy, kterou má k dispozici (Czakońska *et al.*, 2015). Genetická výbava trubce, se odráží v jeho vitalitě a kvalitách. Pouze trubci s vysokou fitness a nejvyšší reprodukční zdatností se s matkou dokáží spářit. Trubec musí doletět na trubčí shromaždiště, kde zůstává po dobu, než přiletí matka. Matku mezi dalšími tisíci trubci musí najít a při páření předat své spermie, které si matka poté uloží do semenného vaku. U trubců je rozhodující schopnost pářit se (např. velikost těla) a schopnost inseminovat (např. kvalita spermií), aby se vlastnosti trubce předaly nové generaci. Konkurence mezi trubci je velká, u jedinců s vyšší sexuální konkurenceschopností je pravděpodobné, že budou mít vyšší reprodukční zdatnost ve srovnání s těmi méně konkurenceschopnými (Baer, 2005).

Na trubce jako rezervoáry genetických vlastností včelstva se zaměřilo jen několik málo studií. Více už se jich zaměřilo na vliv faktorů prostředí na reprodukční kvalitu trubců (Fisher *et Rangel*, 2018). Trubčí sperma může být negativně ovlivněno zdravotním stavem trubce (Peng *et al.*, 2015) nebo expozicí trubce agrochemikáliemi (Ciereszko *et al.*, 2016). Tyto faktory ovlivňují trubčí sperma v množství ejakulovaných spermií nebo ovlivňují molekulární vlastnosti spermatu (např. koncentrace ATP), snižují motilitu spermií a jsou zapojeny do nižší migrace spermií do semenného vaku nebo do přežití uložených spermií (Kairo *et al.*, 2016).

Včelstva dodatečně přizpůsobují produkci trubců podle sezóny; to se liší regionálně a produkce se zaměřuje především na jaro, vrcholí na začátku léta a postupně klesá s tím, jak postupuje sezóna (Boes, 2010). Větší včelstva mají však tendenci produkovat více trubců (Smith *et al.*, 2017), což naznačuje, že životní prostředí a dostupnost zdrojů jsou primárním faktorem určujícím chov trubců, nikoliv roční období (Tarpy *et Metz*, 2019). Během jejich ontogenetického vývoje jsou trubčí larvy krmeny mateří kašičkou obohacenou pylem. Složení stravy je upraveno tak, aby vyhovovalo věku larev (Haydak, 1970; Matsuka *et al.*, 1973; Hrassnigg *et Crailsheim*, 2005). Po vylíhnutí jsou mladí trubci stále

dělnicemi krmeni potravou bohatou na proteiny a aminokyseliny (Free, 1957; Haydak, 1970; Schmickl *et* Crailsheim, 2004). Během prvních 6 dnů jejich dospělého života se trubci živí pylem také bohatým na bílkoviny (Free, 1957; Szolderits *et* Crailsheim, 1993) a trubci starší více než 7 dní se živí medem, který je bohatý na sacharidy (Free, 1957). Vzhledem k hmotnosti trubců potřebují jejich larvy podstatně více potravy s různorodějším proteinovým složením, než larvy dělnic (Haydak, 1970; Winston, 1987). Trubci také rychle stárnou, s létáním začínají od cca 10. dne a žijí v průměru 30 dní, nezávisle na tom, kdy začali létat (Rueppell, 2005). S matkou se páří trubci, kteří jsou ve věku 15–23 dní, průměrně v 21. dnu věku (Couvillon *et al.*, 2010).

3.4 Diploidní trubci

Normálně se trubci vyvíjejí z neoplozených vajíček a jsou haploidní. Diploidní trubci (nazývaní také „biparentální trubci“) se vyvíjejí z oplozených vajíček (Woyke *et* Knytel, 1966), která jsou homozygotní v lokusu určujícím pohlaví. V přírodě diploidní trubci nepřežívají do konce vývoje larev. Larvy diploidních trubců jsou pojídány dělnicemi (Woyke, 1963) během několika hodin po vylíhnutí z vajíčka, nejčastěji do 36 hodin, a to i přesto, že jsou životaschopné.

Dospělí diploidní trubci mohou být chováni v laboratoři líhnutím vajíček v inkubátoru a kmením larev mateří kašičkou. Larva může být přenesena do včelstva po 2–3 dnech. V tomto věku je dělnice krmí normálně (Woyke, 1969).

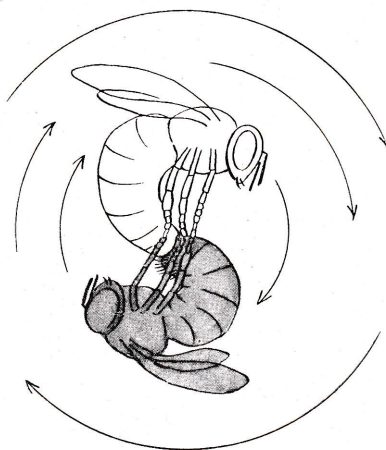
Diploidní trubci, kteří dospějí v laboratorních podmínkách jsou podobní haploidním trubcům. Ve srovnání s haploidními trubci jsou větší, těžší, mají menší varlata, méně testikulárních tubulů, méně křídlových háčků a nižší koncentraci vitellogeninu (antioxidační protein). Diploidní larvy trubců produkují více kutikulárních uhlovodíků než dělnice, ale méně než haploidní trubci. Diploidní trubci produkují diploidní spermie (Woyke *et* Skowronek, 1974) obsahující dvakrát tolik DNA než haploidní spermie (Herrmann *et al.*, 2005). Diploidní spermie jsou delší než haploidní spermie; jejich hlavička je zvláště dlouhá (Woyke, 1983). Ultrastruktura haploidních a diploidních trubců je podobná (Woyke, 1984). Teoreticky lze získat triploidní včely inseminací matky diploidními trubci, ale zatím toho nebylo dosaženo, protože diploidní trubci mají narušenou plodnost, především produkují malý počet spermií (Woyke, 1983).

3.5 Páření včel

Včelí matka se páří s více samci a tento jev se nazývá polyandrie. Páření se s více jedinci je jedním ze způsobů, jak si včely udržují například toleranci k parazitům a patogenům. Polyandrie je taxonomicky omezena na sociální hmyz (Strassmann, 2001) a u včel rodu *Apis* je na výjimečně vysoké úrovni. Odhady počtu trubců, se kterými se matky včely medonosné páří, jsou založené na molekulární genotypizaci dělnic (Tarpy *et al.*, 2004). Matky, které se páří jen s jediným trubcem nebo s malým počtem trubců, produkují včelstva, která jsou méně úspěšná než ta, ve kterých je matka, která se páří s větším počtem trubců. Haplodiploidní reprodukční systém generuje extrémně vysoké úrovně příbuznosti mezi dělnicemi ve včelstvech (Walker, 1980).

Včela medonosná se páří mimo úl na místě zvaném trubčí shromaždiště, které mívá v průměru 30–200 m a nachází se v rozmezí 15–40 m nad zemí. Zde se na konci jara a v létě shromažďují tisíce trubců (Ruttner, 1966). Trubci mohou uskutečnit i několik snubních letů za den (Zmarlicki *et Morse*, 1963). Umístění trubčího shromaždiště bývá stálé po několik let. Když se do trubčího shromaždiště dostaví matka, trubci se za ní formují do roje ve tvaru komety. Poté se matka postupně páří s několika trubci (Gries *et Koeniger*, 1996). Pro fitness včelstev je výhodnější trubčí shromaždiště s větším množstvím geneticky rozdílných trubců z různých včelstev, než malá shromaždiště, kde je větší pravděpodobnost menšího množství, ale navzájem víc příbuzných trubců (Baudry *et al.*, 1998).

Obrázek č. 4: Matka pářící se s trubcem za letu (Schönfeld, 1955).



Legenda: Trubec, který dohoní matku, přeletí nad ní a nohama obejme její zadeček. Matka otevře svou žihadlovou komoru a trubec stahy svalů hrudníku a zadečku vyvolá částečné obrácení svého kopulačního orgánu. Penis trubců je v klidu uložený v zadečku a při obrácení vyhřezává z těla ven, plní se vzduchem a hemolymfou a zasouvá se do žihadlové komory matky. Lepivé růžky penisu zakotví penis pevně v žihadlové komoře matky a neustále stoupající tlak v penisu vyvolá nejprve ejakulaci a následně prasknutí penisu, což přeruší spojení mezi trubcem a matkou (Veselý, 2003).

Počet trubců, kteří se s matkou páří se v odborné literatuře velmi liší. Starší informace udávají, že se matka se páří s 8 trubci (Woyke, 1955), nebo také s přibližně 12 trubci (Cornuet *et al.*, 1986; Kraus *et al.*, 2005). Tarpy *et al.* (2015) uvádějí, že se matka páří se 14 trubci. Některé nové studie založené na mikrosatelitové analýze, ukazují až na počet 34–77 trubců (Withrow *et Tarpy*, 2018). Vysoký počet trubců zajistí genovou diverzitu ve včelstvu, a to je pro něj výhodné například z hlediska zdraví a vitality (Tarpy *et al.*, 2012). Trubci, kteří se spáрили s matkou, hynou už během částečného obrácení penisu v důsledku přesunu veškeré hemolymfy do penisu, nebo záhy poté vyčerpáním (Veselý, 2003). Po spáření matky s trubci, které trvá přibližně 15–30 minut matka odletá zpět do včelstva a uloží sperma do semenného váčku (Baudry *et al.*, 1998). Plně inseminovaná matka si uloží přibližně 5–7 milionů spermií (Woyke, 1989). Po páření podstoupí matka značné fyziologické a behaviorální změny. Její vaječníky (dříve ve stavu zastaveného vývoje) dokončují poslední stádia zrání, protože se zvětšují a vajíčka se stanou životaschopnými a dosáhnou zralosti (Tanaka *et Hartfelder*, 2004). Matka po několika dnech po svém prvním nebo druhém snubním letu začne klást vajíčka (Koeniger *et al.*, 2014).

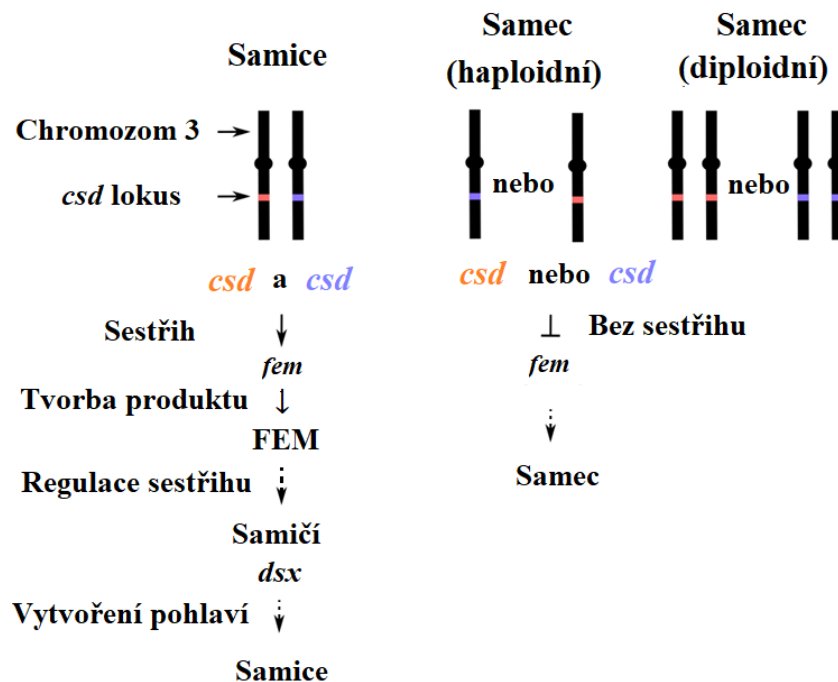
3.6 Haplodiploidní určení pohlaví

Pohlaví u včely medonosné je určeno haplodiploidním způsobem. Tento způsob determinace pohlaví byl poprvé objeven v roce 1845 katolickým knězem Johannem Dzierzonem. Dzierzon uvedl, že panenská matka, která nepodnikla snubní let, produkuje pouze potomstvo trubců (Dzierzon *et al.*, 1945). Jeho zpráva byla prvním popisem systému určování pohlaví, k němuž došlo více než 50 let před objevením pohlavních chromozomů. Studie ukázaly, že asi 20 % živočišných druhů je haplodiploidních. Tento způsob reprodukce si zachovává specifickou pozici při určování pohlaví, protože uniparentální samci zdědí náhodnou polovinu mateřského genomu, zatímco samice zdědí jak mateřské, tak otcovské geny, což znemožňuje jakýkoli chromozomální systém určující pohlaví (Bull, 1983). Navzdory tomu, že samci mají pouze 16 chromozomů a samice 32 chromozomů, proces oplodnění ani haploidní nebo diploidní stav vajíček neposkytuje plné určení pohlaví u včel (Gempe *et al.*, 2009). Totiž vytvoření diploidních trubců naznačovalo, že ani proces oplodnění ani haploidní nebo diploidní stav vajíčka neposkytují primární signál pro stanovení pohlaví u včel medonosných (Mackensen, 1951).

U samic včely medonosné je pohlaví určováno heterozygotností v lokusu Sex Determination Locus (SDL) nesoucí gen komplementárního určení pohlaví (*csd*). SDL je

lokus, který je u samic vždy heterozygotní, a proto pravděpodobně obsahuje další geny zapojené do určování pohlaví. U včel vznikla kaskáda pro určování pohlaví iniciovaná alelickým složením komplementárního genu pro určování pohlaví (*csd*) (viz obrázek č. 5): samci se vyvíjejí z haploidních nebo diploidních, ale pro gen (*csd*) homozygotních embryí, zatímco samice se vyvíjejí z diploidních, ale pro gen (*csd*) heterozygotních embryí. U samic heterozygotnost genu (*csd*) (tedy dvě různé alely na tomto lokusu) vedou k vytvoření samičích specifických variant genů *feminizer* (*fem*) a *doublesex* (*dsx*). U samců jsou vytvářeny samčí specifické varianty genů *fem* a *dsx* (Freitas *et al.*, 2020). Porovnáním ortologních genů u jiných druhů včel a vos se ukázalo, že gen *csd* vznikl duplikací genu v linii včel z kopie *feminizer* progenitorových genů (Gempe *et al.*, 2009).

Obrázek č. 5: Schéma pro určení pohlaví samců a samic včely medonosné. Upraveno podle (McAfee *et al.*, 2019).



Legenda: Pohlaví včely je určeno alelickým složením jediného genu (*csd*), komplementárního určování pohlaví. Z vajíčka se vyvine samec, pokud je *csd* haploidní nebo diploidní, ale homozygotní. Pokud je *csd* diploidní a heterozygotní, vznikne sestřihem gen *fem*, jehož produkt reguluje sestřih genu *dsx* a vyvine se samice.

Gen *csd* kóduje potenciální sestřihový faktor, který existuje v nejméně 15 alelických variantách, které se liší v průměru ve 3 % aminokyselin (Hasselmann *et Beye*, 2004). Genový produkt (CSD) je nezbytný pro vývoj samic, protože inaktivace genového produktu u samičích embryí způsobuje úplný přechod do samčího vývoje. Cíl produktu genu *csd* byl identifikován jako gen *feminizer* (*fem*) (Beye *et al.*, 2003).

Transkript genu *fem* se u samců a samic odlišuje sestřihem, to znamená, že pouze samičí buňky kódují funkční protein genu *fem* a samčí varianta genu *fem* kóduje předčasný stop kodon a neposkytuje žádný funkční produkt. Samčí specifické *fem* transkripty si zachovávají plný exon 3, který obsahuje stop kodon, takže translace končí předčasně. U samic je tato část exonu 3 plus exony 4 a 5 sestřižena, což vede k úplnému otevřenému čtecímu rámci, který kóduje protein složený z 403 aminokyselin - FEM protein (Hasselmann *et al.*, 2008). Sestřihovaný FEM protein zase reguluje sestřih genu *doublesex* (*dsx*), tedy nesestřihávaný gen *fem* není funkční a tak nechává gen *dsx* také nefunkční (McAfee *et al.*, 2019).

3.7 Genom včely medonosné

Včely poskytují nezbytné opylování rostlin a úpadek včel ohrožuje integritu ekosystému. S úbytky populací včel bylo spojeno několik faktorů, jako je ztráta stanovišť, patogeny a paraziti, expozice toxinům, špatná výživa a změna klimatu. Obavy z poklesu populace opylovačů se objevily v 90. letech 20. století a zesílily na počátku 21. století, a tak začal intenzivní biologický výzkum snažící se o zachování včel, který se soustředil na shromažďování důkazů o rozsahu a úbytku včel.

Nejznámější výzkum pro poznání včely medonosné je z roku 2006, kdy byl osekvenován genom včely medonosné. The Honey Bee Genome Sequencing Consortium je mezinárodní skupina vědců, vědeckých organizací a univerzit zabývající se genomikou, která se snaží rozluštit genomové sekvence včely medonosné. Consortium bylo založeno v roce 2001 americkými vědci. V USA je tento projekt financován například Národním výzkumným ústavem pro lidský genom nebo Ministerstvem zemědělství Spojených států. Molekulární analýzy ukázaly, že stovky až tisíce genů vykazují změny exprese, které korelují se změnami chování a s expozicí behaviorálně relevantním látkám. V průběhu evoluce se řada genů přeorientovala na eusocialitu. Zejména genové rodiny kódující mateří kašičku a protein vitellogenin začaly vykonávat funkce, které jsou spojené s diferenciací včel na jednotlivé kasty. Zvýšením počtu genů čichových receptorů a přepnutí genů CYP450 na metabolismus hormonů zajistilo komunikaci sociálního hmyzu. V genomu včel hrají důležitou roli miRNA, které ovlivňují genovou expresi specifickou pro věk a kasty. Dosud však bylo prokázáno, že pouze několik genů včel v příčinné souvislosti zprostředkuje přechod k chování při hledání potravy a to jsou geny: *foraging* (*Amfor*), *malvolio* (*Amvl*) a *vitellogenin* (*Vg*). (Weinstock *et al.*, 2006)

Vědecké poznatky ukázaly, že gen *Amfor* hraje roli při hledání potravy (Ben-Shahar *et al.*, 2002) u včel. Gen *Amfor* je exprimován primárně v optických lalocích mozku včel a v houbových tělískách, zejména v Kenyonových buňkách. Houbová tělíška jsou primárním centrem pro intermodální smyslové zpracování v mozku včely. Kenyonovy buňky přijímají vstupy z vizuálních a čichových oblastí a hrají důležitou roli v učení a paměti. Tento vzorec mozkové exprese naznačuje, že *Amfor* může přispívat ke změně sensorického zpracování, spojeného s pastvou (Weinstock *et Robinson*, 2006).

Gen *malvolio* (*Amvl*) u včel zvyšuje citlivost pro sacharózu. U včel starších (létavky) je tato citlivost vyšší než u včel mladších (kojičky) a je tedy ukazatelem věku, ve kterém včely začnou létat na pastvu (Pankiw *et Page*, 2003). Citlivost na sacharózu také označuje, zda se včela létavka specializuje na sběr pylu či nektaru, přičemž včely, které shromažďují pyl, vykazují větší citlivost na sacharózu. Odezva je tedy spojena s dělením práce včel jak mezi dělnicemi a létavkami, tak uvnitř samotného včelstva (Weinstock *et Robinson*, 2006).

Gen *vitellogenin* (*Vg*) hraje roli v rozvoji oocytů u mnoha druhů hmyzu, ale u včel byl zapojen do regulace širšího spektra chování. *Vitellogenin* interaguje s juvenilním hormonem, o kterém se předpokládá, že hraje důležitou roli při vývoji a dospívání (Page *et al.*, 2006). Nelson *et al.* (2007) prokázali, že gen *Vg* je zapojen do regulace chování při hledání potravy, což naznačuje roli *Vg* u fáze vývoje včely kojičky. Zjistili také, že umlčení genu *Vg* urychlilo u včely hledání potravy (Weinstock *et Robinson*, 2006).

Další poznatky jsou, že genom včel se vyvíjí pomaleji než genomy octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*) a komára (*Anopheles gambiae*). Pomalejší vývoj včel lze vysvětlit skutečností, že většina genů včel se nachází v oblastech bohatých na AT. Regiony bohaté na AT, na rozdíl od regionů bohatých na GC, se vyznačují nízkou frekvencí rekombinace. Včela medonosná byla po octomilce a komárovi teprve třetí hmyz na světě s osekvenovaným genomem. Celý genom včely medonosné byl sekvenován a zahrnuje asi 236 milionů párů bází a bylo v něm identifikováno 10 000 genů. Při analýze vědci zjistili, že včela medonosná pochází z Afriky a do Evropy se rozšířila ve dvou vlnách migrace (Whitfield *et al.*, 2006) a v porovnání s octomilkou a komárem má včela mnohem méně genů regulujících imunitu, detoxikaci a vývoj kutikly (Robertson *et Wanner*, 2006).

Pro živočišné organismy má význam nejen jaderná DNA, ale i mitochondriální DNA. U včely medonosné je mitochondriální DNA malá asi 16 000 bp obsahující 13 genů kódujících proteiny, 22 genů tRNA a 2 genů rRNA (Wallberg *et al.*, 2019), je to kruhová molekula, která je přenášena z matky na potomky. Dědičnost matky poskytuje interpretaci přímých dat mtDNA, které v kombinaci s relativně jednoduchými a levnými

testy mtDNA je jedním z nejpobulárnějších markerů genetického studia včel. Využití mitochondriální DNA bylo využito například při revizi jednotlivých poddruhů včely medonosné. Na základě morfologických údajů bylo uznáno 29 poddruhů včel (Engel 1999; Sheppard *et Meixner*, 2003) a včely byly seskupené do čtyř morfologických větví - C, M, A a O. Linie C zahrnuje sedm poddruhů: Včela medonosná kraňská (*Apis mellifera carnica*), v. m. vlašská (*A. m. ligustica*), v. m. makedonská (*A. m. macedonica*), v. m. sicilská (*A. m. siciliana*), v. m. řecká (*A. m. cecropia*), v. m. kyperská (*A. m. cypria*) a v. m. krétská (*A. m. adami*). Po zahrnutí mitochondriálních dat, byla linie O identifikována jako dílčí linie africké linie A a byla přejmenována na Z (Alburaki *et al.*, 2011). Navíc jedna mitochondriální linie byla pojmenována Y, ta byla identifikovaná v severovýchodní Africe (Franck *et al.*, 2001) a také patří do afrických linií (Meixner *et al.*, 2013; Bauer *et al.*, 2017).

Včela medonosná byla intenzivně studována, aby se vyhodnotil jak její fylogenetický původ, tak původ taxonomický. Ekonomická důležitost včely přiměla vědce k intenzivnímu hledání polymorfních mikrosatelitních markerů pro studium genomu včely (Dall'Olio *et al.*, 2007). V posledních 30 letech se molekulární metody staly důležité hlavně pro identifikaci poddruhů včel. Metody jsou založeny hlavně na jaderných mikrosatelitech, allozymech (Arias *et al.*, 2006) a mitochondriální DNA (mtDNA) (Frank *et al.*, 1998). V posledních letech se stalo důležitým také použití jednonukleotidových polymorfismů. Jiné molekulární metody, například založené na feromonech se používají jen zřídka (Oleksa *et Tofilski*, 2015). Pomocí genetických markerů, byl genetický výzkum zaměřen na pochopení toho, jak haplodiploidie včel ovlivňují konzervační biologii (Grozinger *et Zayed*, 2020). Jedním z nejvýznamnějších genetických markerů jsou mikrosatelity.

3.8 Mikrosatelity

Mikrosatelity, pod názvem jednoduché opakované sekvence (SSR) nebo krátká tandemová opakování (STR) jsou nekódující repetitivní oblasti DNA (Oliveira *et al.*, 2006). Různí autoři uvádějí různou délku jednotky repetice. Lai *et al.* (2003) uvádějí 1–6 bp, Primmer *et al.* (1997) 1–5 bp nebo Baker (2000) 1–10 bp. Počet opakování je specifický a celý mikrosatelitní lokus se skládá z několika stovek párů bází (Brooker, 2011). Mikrosatelity se vyskytují zhruba rovnoměrně po celém genomu eukaryotních i prokaryotních organismů, v nekódujících i kódujících oblastech. Jsou to vhodné genetické markery, díky své vysoké variabilitě a počtu opakování se používají při studiu mutací (Ashley *et Warren*, 1995), genetickém mapování (Kong *et al.*, 2002) a populačně-genetických studiích (Ro-

senberg *et al.*, 2002).

Mikrosatelity jsou klasifikovány podle typu opakované sekvence jako dokonalé, nedokonalé, přerušené nebo složené. V dokonalém mikrosatelitu není opakovaná sekvence přerušena žádnou bází, která nepatří k motivu (např. TATATATATATATATA), zatímco v nedokonalém mikrosatelitu je motiv narušen jednou bází, která neodpovídá sekvenci motivů (např. TATATATACTATATA). V případě přerušného mikrosatelitu existuje malá sekvence uvnitř opakované sekvence, která neodpovídá sekvenci motivů (např. TATA-TACGTGTATATATATA), zatímco složený mikrosatelit je tvořen jednou repeticí, na kterou bezprostředně navazuje úsek tvořený druhou repeticí (např. TATATATATAGTGTGTGTGT) (Oliveira *et al.*, 2006).

3.9 Mikrosatelity včely medonosné

Včela medonosná kraňská (*Apis mellifera carnica*) je v České republice, ale i v okolních zemích považována za potenciálně ohrožený poddruh včely medonosné. Hlavní příčinou je nelegální import jiných poddruhů a hlavně komerčního umělého plemene Buckfast. Morfometrické studie v minulosti poskytovaly velké množství informací o struktuře poddruhů včely medonosné a morfometrické parametry se stále používají k určení geografického původu včely. Měření morfometrických znaků je stále běžně užíváno podle Ruttnera (1988), ale tato metoda nemůže poskytnout podrobné informace o genetické struktuře populace. Mikrosatelity jsou užitečné pro testování genetické variability nejen na úrovni poddruhů a populace, ale i na úrovni jednotlivých členů populace a dokonce i pokud jsou tito členové přímo příbuzní. Během posledních dvou desetiletí byly mikrosatelity použity k analýze genetické rozmanitosti populací včel v mnoha zemích (Francis *et al.*, 2014; Nedic *et al.*, 2014; Uzunov *et al.*, 2014).

Ve srovnání s morfologickými markery poskytují molekulární markery vyšší taxonomické rozlišení, umožňují hlubší porozumění evolučním procesům, jsou stabilní a detekovatelné nezávisle na růstu, diferenciaci a vývoji organismu a nejsou ovlivňovány prostředím (Morin *et al.*, 2004; Agarwal *et al.*, 2008; Muñoz *et al.*, 2017). Na druhé straně jsou morfologické markery (loketní index žilnatiny křídla) stále levnější a snáze se používají. Pokud morfologické znaky nabízejí taxonomické rozlišení, které přesahuje úroveň druhu umožňující detekci genetické struktury, lze je použít k identifikaci populací, které lze později studovat pomocí molekulárních markerů (Patterson *et al.*, 2005; Ortego *et al.*, 2012).

První mikrosatelity pro včelu medonosnou popsali Estoup *et al.* (1993). Izolovali soubor 52 (CT)_n a 23 (GT)_n mikrosatelitů u včel a 24 (CT)_n a 2 (GT)_n mikrosatelitů u čmeláků. V průměru se (CT)_n mikrosatelity vyskytují s pravděpodobností 1 na 15 kbp a (GT)_n mikrosatelity s pravděpodobností 1 na 34 kbp u včel. U čmeláků se vyskytují (CT)_n mikrosatelity s pravděpodobností 1 na 40 kbp a (GT)_n s pravděpodobností 1 na 500 kbp. Porovnání s údaji dostupnými na obratlovcích naznačuje nižší podíl opakování u včel, ale rozdělení délky je velmi podobné bez ohledu na třídu. Mnoho (CT)_n a (GT)_n opakování je obklopeno různými typy mikrosatelitů, což odhaluje distribuci krátkých opakujících se sekvencí.

Solignac *et al.* (2003) uvedli základní strukturu sekvence 552 mikrosatelitů, spolu se sekvencemi primerů a délkou sekvenované alely. Tyto mikrosatelity byly izolovány z frakcí celogenomové DNA. Všech 552 lokusů uvedli jako polymorfní u včely medonosné. Mnoho z nich bylo také úspěšně amplifikováno jako polymorfní mikrosatelity u dalších tří druhů rodu *Apis*: *A. cerana* (58%), *A. dorsata* (59%) a *A. florea* (38%). V publikaci uvádějí shrnutí variability 36 mikrosatelitů vybraných z 552 lokusů ve třech hlavních vývojových liniích *A. mellifera*, 11 mikrosatelitů již bylo publikováno (Estoup *et al.*, 1995; Garnery *et al.*, 1998; Franck *et al.*, 2000).

Bodur *et al.* (2007) studovali genetickou variaci a diferenciaci na dvanácti populacích včel z Turecka a Kypru s devíti mikrosatelitními lokusy A7, A24, A28, A43, A113, Ap43, Ap68, Ap226 a Ac306 (Solignac *et al.*, 2003). Nalezli celkem 165 alel (v průměru 6,83 alely na lokus v populaci). Šest alel bylo zaznamenáno poprvé a čtyři alely byly už dříve známé, ale pouze v Africe.

Forfert *et al.* (2017) určovali počet spářených trubců s matkou a genetické složení včelstva pomocí pěti mikrosatelitů SV240, HB004, HB007, HB015 a HB005 (Estoup *et al.*, 1994). Matky před spářením vystavili neonikotinoïdům a zkoumali rozdíly mezi pářením matek ovlivněných a neovlivněných neonikotinoïdy. Matkám byly po páření pitvány semenné vácčky, aby následně určili počet uložených spermií. U matek ze včelstev vystavených neonikotinoïdům bylo pozorováno, že se páří s nižším počtem trubců, než matky neovlivněné. To vedlo ke snížení genetické rozmanitosti v jejich včelstvech a snížená genetická rozmanitost mezi dělnicemi negativně ovlivňuje vitalitu včelstva. Neonikotinoïdy tedy mohou mít skrytý účinek na zdraví kolonií snížením frekvence páření matek.

López-Urbe *et al.* (2017) využili 8 mikrosatelitních lokusů A113, A24, A88, Ap43, Ap81, B124, ApJC2 a A76 (Tarpay *et al.*, 2010), aby charakterizovali genetické složení zalétlých rojů a včel z chovu komerčních včelařů v Severní Karolíně. Důvodem byla

dříve zjištěná vysoká úroveň imunokompetence přirozeně žijících včel. Výsledky experimentů odhalují malou, ale významnou genetickou diferenciaci mezi zalétlými roji a včelstvy z chovu komerčních včelařů, což naznačuje spojení mezi těmito dvěma skupinami. Zjistili, že vyšší genetická diverzita mezi včelstvy znamená zvýšenou imunitní odpověď u zalétlých rojů, ale u neléčených včel, přestože tato skupina vykazovala výrazně vyšší průměrnou genetickou rozmanitost. Tato zjištění naznačují, že genetická rozmanitost je pozitivně spojena s imunokompetencí u zalétlých rojů a že výhody genetické rozmanitosti jsou u včel chovaných lidmi skryty, pravděpodobně v důsledku umělého výběru.

Simone-Finstrom *et al.* (2018) použili mikrosatelitní lokusy Am010, Am043, Am052, Am059, Am061, Am098, Am125 a Am553 (Delaney *et al.*, 2011) ve dvou PCR reakcích, pro genotypizaci potomků matek, které se spářily s trubci za stížených podmínek, například s přivázaným závažím na hrudi nebo omezením dalších letových pokusů matky po prvním snubním letu. Zjistili, že ani dodatečná hmotnost, ani omezené pokusy o páření neměly žádný významný vliv na efektivní frekvence páření experimentálních matek. Tato pozorování naznačují, že jednotlivé matky vykazovaly odlišné počty trubců, se kterými se spářily. Tato zjištění poskytují vhled do regulace chování páření matek a ovlivnění fitness včelstva.

Withrow *et Tarpy* (2018) se zabývali tím, do jaké míry jsou „královské“ podrodiny ve včelstvech kryptické. Objev těchto podrodin ve včelstvech významně ovlivňuje informace o stanovení kast, kolektivním rozhodovacím procesu reprodukce a systém páření včel. Pro genotypizaci byly provedeny multiplexní PCR s amplifikací 8 mikrosatelitních markerů A24, A76, A88, A113, Ap43, Ap81, ApJC2 a B124 (Estoup *et al.*, 1993; Delaney *et al.*, 2011; Evans *et al.*, 2013).

Hassett *et al.* (2018) měli za cíl prozkoumat genetické složení *A. m. mellifera* v Irsku s pomocí jaderných mikrosatelitů a mitochondriálních markerů. Molekulární data byla získána od 412 včel odebraných z 24 krajů po celém ostrově a bylo použito dvanáct mikrosatelitů A007, A28, A29, A43, A76, A273, Ac306, Ap1, Ap33, Ap226, Ap289 a B24 (Estoup *et al.*, 1995; Soland-Reckeweg *et al.*, 2009; Alburaki *et al.*, 2013). Mitochondriální data identifikovala 34 různých haplotypů, přičemž 63 % včel mělo sekvence identické s evropskými haplotypy, ale všechny ostatní haplotypy byly nové. Analýza struktury populace pomocí mikrosatelitových markerů ukazuje, že irská populace včely medonosné je geneticky různorodá a že 97,8 % včel byly čisté *A. m. mellifera*.

Původně byla v Argentině na včelaření využívána *Apis mellifera* evropského původu. Později se do Jižní Ameriky přes Brazílii dovezly včely afrického původu, které hybridizovaly s evropskými včelami.

zovaly se včelami přirozenými z Evropy, což vedlo ke vzniku afrikanizovaných populací, které se vyznačují agresivnějším chováním a pro chovatele a chov dalšími nepříznivými vlastnostmi. Ve studii Agra *et al.* (2018) je uvedena genetická charakterizace 396 včelstev z nejdůležitějšího včelařského regionu Argentiny s cílem poskytnutí aktualizovaného popisu struktury populace a genetické rozmanitosti komerčních a přirozených kolonií. Analýza byla provedená pomocí mitochondriálních COI-COII oblastí a devíti jaderných mikrosatelitů Ap043, Ap068, Ap085, Ap226, Ap256, Ac011, Ag005a a A113 (Estoup *et al.*, 1995; Solignac *et al.*, 2003). A byly detekovány tři evropské (M4, C1 a C2J) a tři africké (A1, A4 a A30) haplotypy. Evropské haplotypy byly většinou nalezeny v člověkem chovaných včelstvech, zatímco africké haplotypy byly detekovány ve vysokých frekvencích v zalétlých rojích. Mikrosatelitní data byla analyzována za účelem odhadu genetické variability populace. Také zjistili vysokou úroveň hybridizace mezi africkými a evropskými včelami medonosnými.

Gençer *et Kahya* (2019) použili pět polymorfních mikrosatelitních lokusů A024, A079, A43, A113 a Ap226 (Estoup *et al.*, 1995; Solignac *et al.*, 2003) na analýzu 144 trubců, kteří byli použiti k inseminaci 12 experimentálních matek. Testovali rozdíly v parametrech spermií mezi trubci malých rozměrů a trubci větších tělesných rozměrů a uměle inseminovaných matek s různými proporcemi spermatu z velkých a malých trubců. Výsledky ukázaly, že velcí trubci byli jen o málo konkurenceschopnější než trubci malého vzrůstu.

Nejnovější použití mikrosatelitů včely medonosné je od Eimanifar *et al.* (2020), kteří analyzovali genetickou variabilitu a celkovou populační strukturu včelích poddruhů *A. m. scutellata* a *A. m. capensis*, dva poddruhy včely v Jihoafrické republice. Ke studiu jejich genetické rozmanitosti autoři navíc použili mitochondriální DNA a jednonukleotidové polymorfismy. Analyzovali genetickou variabilitu a celkovou populační strukturu jak včelích poddruhů, tak hybridů jaderné i mitochondriální genotypizací jedinců odebraných z Jihoafrické republiky (N = 813 včel ze 75 úlu) v 19 mikrosatelitních DNA lokusech. Celkově našli v populaci v průměru 10 alel na lokus, s hodnotami heterozygotnosti v rozmezí od 0,81 do 0,86 na populaci.

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

V této diplomové práci byla využita genomická DNA včely medonosné kraňské (*Apis mellifera carnica*). První odběr včel byl proveden v červenci roku 2018 a bylo odebráno 16 matek po výměně z různých včelstev pana Svatopluka Sapáka z obce Hrušovany nad Jevišovkou. Tyto matky sloužily pro vycizování odběru semenného včáčku a optimalizaci PCR. V červenci roku 2019 byly prováděny odběry na 5 stanovištích, na každém z nich byla z jednoho včelstva odebrána 1 matka a 12 trubců, z čehož bylo 6 larev trubců z plodu a 6 dospělých trubců z plodiště. Tito jedinci sloužili na hlavní pokus této diplomové práce. Matky i trubci byli umístěni do igelitového sáčku a po ukončení práce na stanovišti hromadně vloženi do kuchyňské mrazničky při cca -20°C , ve které byli uchováni až do převozu do laboratoře. Převoz jedinců byl uskutečněn v polystyrenové krabici s předem vychlazenými bločky na cca -20°C . V laboratoři byli jedinci opět uchováni v mrazničce při -20°C .

4.2 Použité chemikálie

- Akrylamid (Sigma)
- *aTaq* DNA polymeráza (5 U/ μl), M1241 (Promega)
- Bromfenolová modř (Serva)
- dNTPs (100 mmol/l, 400 μl), U1240 (Promega)
- Deionizovaná voda
- Dusičnan stříbrný (Sigma - Aldrich)
- Ethanol 96% roztok (Lihovar Vrbátky)
- Ethylendiaminotetraoctan sodný (Lachner)
- Formaldehyd (AppliChem)
- Formamid (Lachema)
- Hydroxid sodný (Lachner)
- Chlorid sodný (Lachema)
- Kyselina boritá (Lachner)
- Kyselina dusičná 65% roztok (Lachner)
- Kyselina octová (Lachner)
- 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)
- Močovina (Lachner)

- N, N' - methylenbisakrylamid (Applichem)
- N, N, N', N' - tetramethylethylenediamin (AppliChem)
- Peroxodisíran amonný (Lachner)
- Rain-off - tekuté stěrače (Sheran)
- Thiosíran sodný (Lachner)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (AppliChem)
- Uhličitan sodný (Lachner)
- Xylenová modř (AppliChem)
- Izolační kit Exgene Tissue SV plus (GeneAll)
 - o TL pufr
 - o TB pufr
 - o BW pufr
 - o AE pufr
 - o TW pufr
 - o Proteináza K, 20 mg/ml roztok

4.3 Použité roztoky a jejich příprava

Akrylamid, 6% zásobní roztok:

- 150 ml 40% zásobní roztok akrylamid : N, N' - methylenbisakrylamid 19:1
- 420 g močovina
- 50 ml 10x TBE
- 484 ml deionizovaná voda
- Po rozpuštění složek zfiltrvat a uložit v temné lahvi v chladničce

Dusičnan stříbrný, 0,1% roztok:

- 0,8 g dusičnan stříbrný
- Rozpustit v 800 ml deionizované vody
- Před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu

Fix/stop roztok:

- 800 ml deionizovaná voda
- 88 ml ledová kyselina octová

Hydroxid sodný, 1 mol/l roztok:

- 40 g hydroxid sodný
- Doplnit deionizovanou vodou do 1 l

Kyselina dusičná, 1% roztok:

- 12 ml 65% kyselina dusičná
- 800 ml deionizovaná voda

Pracovní roztok 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu:

- 1 ml 0,5% kyselina octová v 96% ethanolu
- 3 µl 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu

Nanášecí roztok pro elektroforézu:

- 0,125 g xyleneová modř
- 0,125 g bromfenolová modř
- 100 ml formamid
- 25 ml deionizovaná voda

Peroxodisíran amonný, 10% roztok:

- 1 g peroxodisíranu amonného rozpustit v 8 ml deionizované vody
- doplnit na objem 10 ml

Polyakrylamidový gel, 6% roztok:

- 60 ml 6% zásobní roztok akrylamidu
- 400 µl 10% roztok peroxodisíranu amonného
- 40 µl N, N, N', N' - tetramethylethylendiaminu

Reakční pufr pro PCR, 10x

- 200 ml deionizovaná voda
- 3,028 g tris(hydroxymethyl)aminomethanu
- pH upravit na hodnotu 9 pomocí HCl
- 9,325 g KCl
- 2,5 ml Triton X-100
- Po rozpuštění doplnit na 250 ml

TBE pufr, 10x zásobní roztok:

- 55 g kyselina boritá
- 108 g tris(hydroxymethyl)aminomethanu
- 40 ml roztoku ethylendiaminotetraoctanu sodného 0,5 mol/l, pH 8,0
- Doplnit deionizovanou vodou do 1 l

Vývojka:

- 24 g uhličitan sodný
- Rozpustit v 800 ml deionizované vody
- Před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 µl 1% roztoku thiosíranu sodného

4.4 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Binokulární lupa SZX7 (Olympus)
- Elektroforetický zdroj EV232 (Consort)
- Externí osvětlení k binokulární lupě Highlight 2100 (Olympus)
- Chladnička kombinovaná (Whirlpool)
- Laboratorní váhy Mark S622 (BEL Engineering)
- Magnetická míchačka MR Hei-Combi (Heidolph)
- Mikropipety Finnpiquette 0,5 µl až 10 µl a 0,3 µl až 1 ml (Thermo Labsystems)
- Mikropipety Nichipet EX 0,5 µl až 1 ml (Nichiryo)
- Minicentrifuga CLE CSQSP (Clever Scientific)
- Minicentrifuga Prism mini (Labnet International)
- Negatoskop NEGA1 (Maneko)
- Spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)
- Sekvenční elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)
- Sušárna CAT 8050 (Contherm)
- Termocykler GenePro (BIOER Technology)
- Termocykler PTC 100-96 VHB (MJ Research)
- Termocykler TC XP (BIOER Technology)
- Třepačka Orbit 1 900 (Labnet International)
- Vortex mixer (Labnet International)
- Vortex MS2 (Ika)
- Výrobník deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)
- Výrobník ledu Icematic F100 Compact (Castel Mac)
- Výrobník šupinkového ledu (Brema)

4.5 Izolace DNA

Pomocí kitu Exgene Tissue SV plus (GeneAll) byla izolována genomická DNA z matek a trubců včely medonosné kraňské. Izolace byla provedena podle návodu, který byl součástí kitu, kapitola D, Izolace DNA z hmyzu a červů. Součástí kitu byly pufry a speciální mikrozkušavky s fritou pro izolaci, mikrozkušavky bez víčka a dále byly při izolaci využívány klasické 1,5ml mikrozkušavky, které nebyly součástí kitu. Tělo každé matky bylo skalpelem rozděleno na dvě části, první část hlava a hrud' byla dána do jedné mikro-zkušavky. Druhá část byl zadeček, ze zadečku byl pod binokulární lupou skalpelem a pinzetou vypreparován semenný váček se spermatem trubců, který byl dán do

druhé mikrozkušavky. Zbytek zadečku byl vložen do třetí mikrozkušavky. Všechny tři části byly zhomogenizovány a z každé části byla vyizolována DNA. Tělo trubců bylo homogenizováno celé pohromadě v jedné mikrozkušavce.

1. Zapnout termoblok a nechat ho nahřát na 56 °C.
2. Části včel v 1,5ml mikrozkušavkách pomocí Potter-Elvehjemova homogenizátoru zhomogenizovat. K homogenátu připipetovat 200 µl TL pufru a 20 µl proteinázy K (20 mg/ml).
3. Zvortexovat homogenát a vložit do vyhřátého termobloku (viz bod 1) na 1 hodinu. Po třiceti minutách zvortexovat.
4. Po inkubaci mikrozkušavky vyjmout, zvortexovat a zcentrifugovat. Supernatant přenést do speciální mikrozkušavky s kolonou a na fritu nanést 400 µl TB pufru a mikrozkušavku centrifugovat 1 minutu při 6 000 G.
5. Po centrifugaci vyměnit mikrozkušavku za novou, vložit do ní fritu a aplikovat 600 µl BW pufru. Centrifugovat 30 sekund při 6 000 G.
6. Vyměnit za čistou mikrozkušavku a na membránu kolony aplikovat 700 µl TW pufru a centrifugovat 30 sekund při 6 000 G. Odpad vylít a centrifugovat 1 minutu při 13 000 G pro odstranění zbytkového pufru.
7. Kolonu přemístit do nové mikrozkušavky a na membránu aplikovat 200 µl AE pufru. Nechat inkubovat 2 minuty při laboratorní teplotě a poté 1 minutu centrifugovat při 13 000 G. Odstranit kolonu a roztok s vyizolovanou DNA uchovat pro další použití.
8. Změřit koncentraci DNA a vzorky zamrazit pro PCR amplifikaci.

4.6 Amplifikace mikrosatelitů

V této diplomové práci jsem použila 20 mikrosatelitů, které v publikovaných článcích vykazovaly polymorfismus. Jejich seznam uvádí tabulka č. 2.

Tabulka č. 2: Dvacet párů primerů pro PCR amplifikaci mikrosatelitů včely medonosné testovaných v této práci, s uvedenými sekvencemi a literárním odkazem.

Mikrosatelit	Primery pro amplifikaci (5' → 3')	Literární zdroj
A7	F: GTTAGTGCCCTCCTCTTGC R: CCCTTCCTCTTTCATCTTCC	Estoup <i>et al.</i> , 1994
A8	F: CGAAGGTAAGGTAAATGGAAC R: GGCGGTAAAGTTCTGG	Franck <i>et al.</i> , 1998
A14	F: GTGTCGCAATCGACGTAACC R: GTCGATTACCGATCGTGACG	Estoup <i>et al.</i> , 1993
A28	F: GAAGAGCGTTGGTTGCAGG R: GCCGTTTCATGGTTACCACG	Estoup <i>et al.</i> , 1994
A29	F: AAACAGTACATTTGTGACCC R: CAACTTCAACTGAAATCCG	Estoup <i>et al.</i> , 1994
A35	F: GTACACGGTTGCACGGTTG R: CTTCGATGGTCGTTGTACCC	Moritz <i>et al.</i> , 2003
A43	F: CCGCTCATTAAGATATCCG R: CCGCTCATTAAGATACTCCG	Estoup <i>et al.</i> , 1994
A76	F: GCCAATACTCTCGAACAATCG R: GTCCAATTCACATGTCGACATC	Estoup <i>et al.</i> , 1994
A79	F: CGAAGGTTGCGGAGTCCTC R: GTCGTCGGACCGATGCG	Estoup <i>et al.</i> , 1994
A88	F: CGAATTAACCGATTTGTCG R: GATCGCAATTATTGAAGGAG	Estoup <i>et al.</i> , 1995
A107	F: CCGTGGGAGGTTTATTGTCG R: GGTTTCGTAACGGATGACACC	Estoup <i>et al.</i> , 1994
A113	F: CTCGAATCGTGGCGTCC R: CCTGTATTTTGCAACCTGC	Estoup <i>et al.</i> , 1995
Ap33	F: TTTCTTTTTGTGGACAGCG R: AAATAAGGCGAAACGTGTG	Franck <i>et al.</i> , 1998
Ap36	F: CTACGCGCTTACAGGGCA R: GCCGAAATTCAACGCTCA	Franck <i>et al.</i> , 1998
Ap43	F: GGCGTGCACAGCTTATTCC R: CGAAGGTGGTTTCAGGCC	Franck <i>et al.</i> , 1998
Ap55	F: GATCACTTCGTTTCAACCGT R: CATTTCGGTATGGTACGACCT	Solignac <i>et al.</i> , 2003
Ap66	F: TTGCATTCGGTCTCCAGC R: ACTTGCCGCGGTATCTGA	Solignac <i>et al.</i> , 2003
Ap81	F: GGATCGTCCAGGCGTTGA R: GAAAAGTATTCCGCCGAGCA	Solignac <i>et al.</i> , 2003

Tabulka č. 2: Pokračování.

Mikrosatelit	Primery pro amplifikaci (5' → 3')	Literární zdroj
B24	F: CACAAGTTCCAACAATGC R: CACATTGAGGATGAGCG	Solignac <i>et al.</i> , 2003
B124	F: GCAACAGGTCGGGTTAGAG R: CAGGATAGGGTAGGTAAGCAG	Estoup <i>et al.</i> , 1995

4.7 Polymerázová řetězová reakce

Se vzorky DNA byla prováděna polymerázová řetězová reakce (PCR). Každý vzorek se skládal z 1 µl genomické DNA a 9 µl PCR reakční směsi.

1. Rozmrazit, zvortexovat a centrifugovat složky pro PCR. Do 1,5ml zkumavky napipetovat komponenty pro PCR v objemech uvedených v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3: Složení PCR reakční směsi pro 72 vzorků.

Složky směsi	Objem (µl)
Deionizovaná voda	523,8
Reakční pufr pro PCR (10x)	80,4
Roztok MgCl ₂ (25 mmol/l)	48,0
Roztok dNTPs (20 mmol/l)	8,4
Primer F (10 mmol/l)	39,6
Primer R (10 mmol/l)	39,6
<i>aTaq</i> DNA polymeráza (5U/µl)	12,0

2. Zkumavku po napipetování PCR složek zvortexovat a centrifugovat na stolní mikrocentrifuze.
3. Do 0,2ml PCR mikrozukavky napipetovat do každé po 1 µl DNA včely medonosné a po 9 µl PCR reakční směsi.
4. Mikrozukavky vložit do termocykleru a nastavit podmínky reakce podle tabulky č. 4.
5. Po vyjmutí mikrozukavek z termocykleru skladovat vzorky v chladničce.

Tabulka č. 4: Časový a teplotní profil PCR reakce.

Reakční krok	Počet cyklů	Teplota (°C)	Čas
Počáteční denaturace DNA	1	94	5 min
Denaturace DNA	35	94	30 s
Nasedání primerů	35	50–65	30 s
Prodloužení	35	72	30 s
Závěrečné prodloužení	1	72	7 min

4.8 Elektroforetická separace PCR produktů

Elektroforetickou separaci DNA jsem provedla za denaturujících podmínek, s použitím elektroforetické komůrky S2 Whatman Biometra s dvěma skly o rozměrech 330 x 390 mm a 330 x 420 mm. Tloušťka polyakrylamidového gelu byla 0,4 mm.

Příprava polyakrylamidového gelu

1. Velké a malé sklo omýt pomocí saponátu a kartáčku s vodou. Plochy, které přijdou do styku s gelem, dvakrát omýt deionizovanou vodou a osušit. Poté dvakrát omýt 96% etanolem a osušit papírovou utěrkou.
2. Velké sklo ošetřit přípravkem Rain Off a rozetřít jej po celé ploše. Malé sklo přenést do digestoře a do 1,5ml mikrozkušavky připravit pracovní roztok 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu. Mikrozkušavku zavřít, protřepat a roztok rozetřít ubrouskem po celé ploše skla.
3. Velké sklo ošetřit dvakrát deionizovanou vodou a osušit pomocí ubrousků a poté sklo přesunout do digestoře. Opláchnout a osušit dva spacery a hřebínek, spacery položit na delší kraje ošetřené plochy velkého skla.
4. Malé sklo čtyřikrát ošetřit 96% etanolem a osušit papírovými ubrousky. Ošetřenou plochou položit malé sklo na velké sklo se spacery a přichytit po obou stranách dvěma klipsy.
5. Připravit roztok pro přípravu polyakrylamidového gelu a vlít mezi skla, do mezery vložit hřebínek rovnou stranou a připnout čtyřmi klipsy. Nechat ztuhnout minimálně 1 hodinu.

Elektroforetická separace PCR produktů

1. Skla se ztuhlým polyakrylamidovým gelem přemístit do dřezu a pomocí kartáčku a vody očistit povrch skel. Osušit papírovými utěrkami.
2. Připravit elektroforetickou komůrku a vložit do ní skla s gelem. Skla připevnit pomocí úchytů a do komůrky nalít TBE pufr 10x. Hřebínek vytáhnout a odstranit zbytky gelu v mezeře a propláchnout injekční stříkačkou.
3. Elektroforetickou komůrku zavřít připojit ke zdroji a nastavit parametry 90 W, napětí na 3 000 V a proud na 150 mA a nahřívat gel 30 min.
4. PCR mikrozkuvkám v destičce odstříhnout víčka a napipetovat 5 μ l nanášecího pufru. Vzorky na destičce vložit do termobloku a nastavit denaturaci při 94 °C po dobu 3 minut.
5. Po nahřátí gelu vypnout zdroj, odpojit vodiče a v mezeře odstranit zbytky gelu. Mezi skla vložit hřebínek a pomocí 8kanálové pipety nanést po 1,5 μ l každého vzorku do gelu.
6. Zapojit elektroforetickou komůrku ke zdroji a nastavit parametry 70 W, napětí 3 000 V a proud na 150 mA. Zdroj zapnout na 1,5 hodiny.
7. Do Erlenmeyerových baněk připravit tři roztoky pro vizualizaci: fix/stop roztok, roztok 1% HNO₃ a vývojku.

Vizualizace PCR produktů po elektroforetické separaci

1. Vypnout a odpojit zdroj od elektroforetické komůrky, vyjmout skla a nožem je oddělit od sebe. Malé sklo s přilepeným gelem vložit do misky a zalít fix/stop roztokem a nechat třepat 20 minut v digestoři.
2. Roztok slít zpět do baňky a sklo s gelem 3x opláchnout deionizovanou vodou.
3. Sklo s gelem zalít 1% HNO₃ roztokem, nechat třepat 4 minuty a poté roztok vylít do odpadu. Sklo s gelem 4x opláchnout deionizovanou vodou.
4. Do připraveného roztoku AgNO₃ připipetovat 1200 μ l formaldehydu. Sklo s gelem vložit do misky a na 30 minut zalít roztokem AgNO₃. Na 10 sekund vložit do misky s deionizovanou vodou.

5. Sklo přemístit do fotomisky s vývojkou a připetovat 1200 μ l formaldehydu a 160 μ l 1% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Po dostatečné vizualizaci vzorků, reakci zastavit fix/stop roztokem a poté vložit sklo na 2 minuty do misky s deionizovanou vodou a gel vložit do vyhřáté sušárny na 60 °C.
6. Po vysušení a zchladnutí se gel hodnotí na negatoskopu.
7. Vyhodnocený gel se sklem se vloží na několik hodin do roztoku 1 mol/l NaOH. Po odlepení gelu ze skla omýt kartáčkem a saponátem, opláchnout deionizovanou vodou a osušit. Poté je sklo připraveno pro další použití.

5 Výsledky

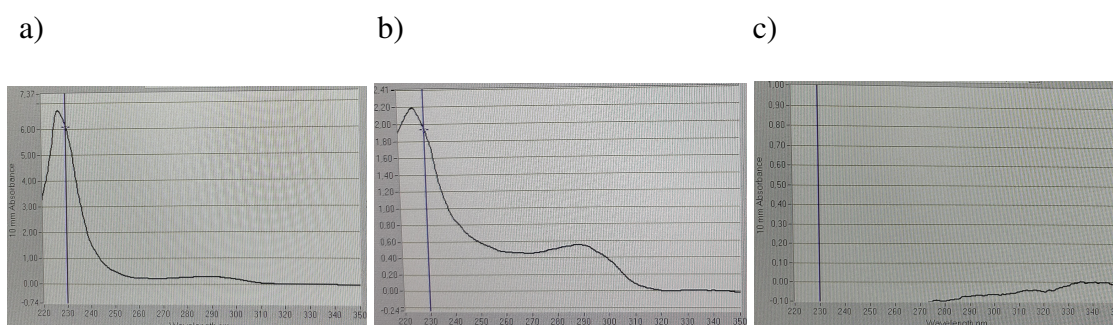
Cílem této diplomové práce je zjištění počtu trubců, se kterými se matka včely medonosné během snubního letu páří a dále zalétavost trubců v úlech. Práce sestává z několika částí:

- a) **Preparace semenného vajíčka a izolace DNA**
- b) **Výběr vhodných mikrosatelitů a optimalizace podmínek pro PCR**
- c) **Studium páření matek a jeho vyhodnocení**

a) Preparace semenného vajíčka a izolace DNA

V experimentální části jsem preparovala semenný vajíček ze zadečků 16 matek včely medonosné. Poté jsem z těla a semenného vajíčka zvlášť izolovala DNA podle varianty návodu, speciálně vypracované pro izolaci DNA z hmyzu z kitu Exgene Tissue SV plus (GeneAll), kapitola D. Dále jsem izolovala DNA ze 65 jedinců (70 vzorků), která byla použita pro vlastní pokus. Z každého vzorku byl vyizolován objem 200 μ l roztoku DNA a její koncentraci jsem změřila pomocí spektrofotometru NanoDrop. Koncentrace DNA nabývala rozdílných hodnot v rozmezí: od záporné hodnoty -6,3 μ g/ml, která byla ojedinělá, ostatní hodnoty byly naměřeny od 1,4 do 73,5 μ g/ml. Většina změřených koncentrací byla přibližně od 2 do 10 μ g/ml. Pro informaci přikládám 3 fotografie z displeje změření spektrofotometru NanoDrop (viz obrázek č. 6), kdy maximum křivky bylo v rozmezí 220–230 nm u většiny vzorků. Některé další vzorky vykazovaly velmi výrazný vrchol ve 290 nm.

Obrázek č. 6: Vybraná spektra koncentrace DNA vzorků trubců změřených pomocí přístroje NanoDrop.



Legenda:

- Obrázek a) Spektrum změřeného vzorku 2/11 jehož hodnota koncentrace byla 11,8 ng/ μ l.
Obrázek b) Spektrum změřeného vzorku 1/12 jehož hodnota koncentrace byla 8,9 ng/ μ l.
Obrázek c) Spektrum změřeného vzorku 5/3 jehož hodnota koncentrace byla -6,3 ng/ μ l.

b) Výběr vhodných mikrosatelitů a optimalizace podmínek pro PCR

Další částí mé diplomové práce byla optimalizace podmínek PCR pro 20 mikrosatelitových lokusů. 10 polymorfních mikrosatelitů z této práce jsem již pro včelu medonosnou optimalizovala ve své bakalářské práci a k těmto mikrosatelitům jsem přibrala 10 dalších mikrosatelitů, které jsem vybrala z článků, kde jsou publikované při výzkumech na včele medonosné a vykazují vysoký počet alel. Na tuto optimalizaci jsem využila DNA z těl 16 matek a DNA z jejich vypeparovaných semenných váčků. Reakční směs pro všechny mikrosatelity byla stejná, pouze se lišil přidaný pár primerů a koncentrace hořčnatých iontů. Pro PCR reakci jsem použila stejný program na termocykléru, ve kterém se pouze lišila teplota *annealigu*. Počáteční teplotu nasedání primerů (*annealingu*) jsem stanovila 60 °C. Teplotu *annealingu* jsem dále upravovala podle potřeby. Pokud reakce neposkytla žádný produkt, snižovala jsem teplotu *annealingu* až na 50 °C a pokud byl produkt příliš intenzivní a špatně hodnotitelný zvyšovala jsem teplotu *annealingu* až na 68 °C. Dále jsem v případě velmi intenzivního produktu při optimalizaci podmínek PCR reakce snižovala koncentraci hořčnatých iontů v PCR reakční směsi. Testovala jsem dvě koncentrace. Z počátečních 1,6 nmol/l na 1,2 nmol/l (při snížení na 3/4), nebo z počátečních 1,6 nmol/l na 0,8 nmol/l (při snížení na 1/2). V několika případech bylo třeba pro optimální rozlišitelnost alel mikrosatelitního lokusu prodloužit čas elektroforetické separace z 90 až na 180 minut.

Celkem jsem testovala 20 mikrosatelitů. Mikrosatelit A113 jsem při optimalizaci z pokusu vyřadila, protože opakovaně neposkytl žádný produkt PCR amplifikace. Tři mikrosatelity A35, A8 a Ap81, které vykazovaly v publikacích polymorfismus jsem testovala u všech jedinců s monomorfními výsledky a tyto mikrosatelity jsem vyloučila. Pro další analýzu jsem použila 16 mikrosatelitů. S těmito mikrosatelity jsem optimalizovala podmínky PCR reakce a čas elektroforetické separace. Výsledky optimalizace jsou shrnuty v tabulce č. 5.

Tabulka č. 5: Výsledky optimalizace PCR pro 20 mikrosatelitních lokusů u včely medonosné kraňské (*Apis mellifera carnica*). Pro každý mikrosatelit je uvedený název lokusu, teplota *annealingu*, délka elektroforetické separace, počet alel a změna v případě, že byla snižována koncentrace MgCl₂.

Lokus	Teplota (°C)	Čas	Počet alel	Koncentrace hořečnatých iontů
A7	58	2 hod	5	1/2x MgCl ₂
A8	57	2 hod 30 min	Monomorfní	
A14	68	2 hod 30 min	3	
A28	65	2 hod	2	
A29	57	2 hod	12*	
A35	62	1 hod 45 min	Monomorfní	1/2x MgCl ₂
A43	61	2 hod	4	
A76	53	2 hod 30 min	5–10*	1/2x MgCl ₂
A79	62	1 hod 45 min	4	1/2x MgCl ₂
A88	58	2 hod 45 min	5	
A107	64	2 hod	6	1/2x MgCl ₂
A113	50–65	1 hod	0	
Ap33	58	3 hod	5	
Ap36	55	2 hod	6–7*	
Ap43	59	2 hod	3	3/4x MgCl ₂
Ap55	60	3 hod	7–9*	1/2x MgCl ₂
Ap66	52	1 hod 30 min	4	
Ap81	50	1 hod 30 min	Monomorfní	
B24	59	1 hod 45 min	3	
B124	63	1 hod 30 min	4	

* Uvedené počty alel jsou pouze orientační.

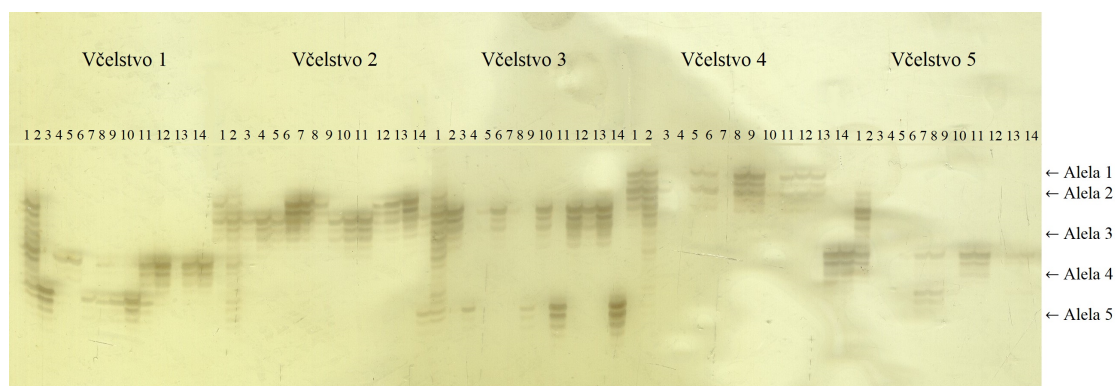
c) Studium páření matek a jeho vyhodnocení

V další části experimentu jsem použila 16 polymorfních mikrosatelitů. Pro amplifikaci vzorků DNA včely medonosné kraňské jsem využila izolovanou DNA ze 65 jedinců (70 vzorků) z 5 včelstev. Z každého včelstva byly amplifikovány dva vzorky DNA od matky, první vzorek byla genomická DNA z těla matky a druhý vzorek DNA byl ze semenného vajíčku matky, který mohl také obsahovat DNA matky a poté 12 vzorků trubců,

z toho 6 vzorků tvořily trubčí larvy vyvíjející se v plástu a dalších 6 vzorků bylo odchyceno v úlu jako dospělci. Těchto 70 vzorků jsem podrobila polymerázové řetězové reakci na vybraných polymorfních mikrosatelitových lokusech a získala jsem od 2 (A28) do přibližně 12 alel na lokus (A29).

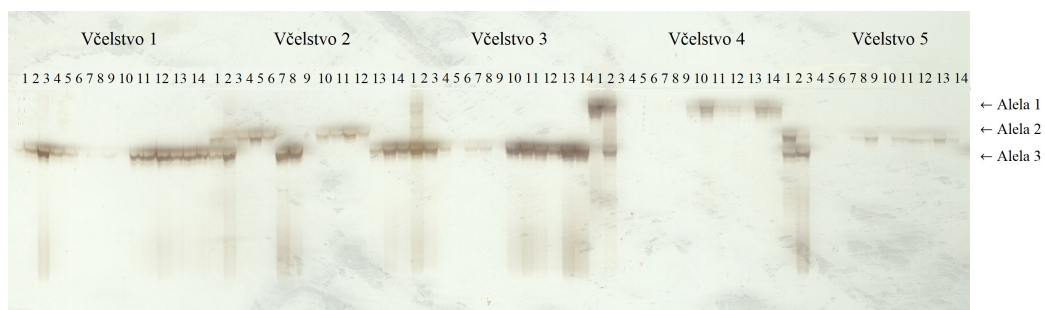
Výsledky elektroforetické separace mikrosatelitových lokusů po PCR amplifikaci. Jedná se o lokusy A7, u které jsem detekovala 5 alel na lokus (viz obrázek č. 7), A14, který má 3 alely na lokus (viz obrázek č. 8) a mikrosatelit Ap55, u kterého bylo detekováno 7 a více alel (viz obrázek č. 9).

Obrázek č. 7: Elektroforetogram PCR produktů mikrosatelitového lokusu A7 u včely medonosné kraňské (teplota *annealingu* 58 °C a poloviční koncentrace MgCl₂).



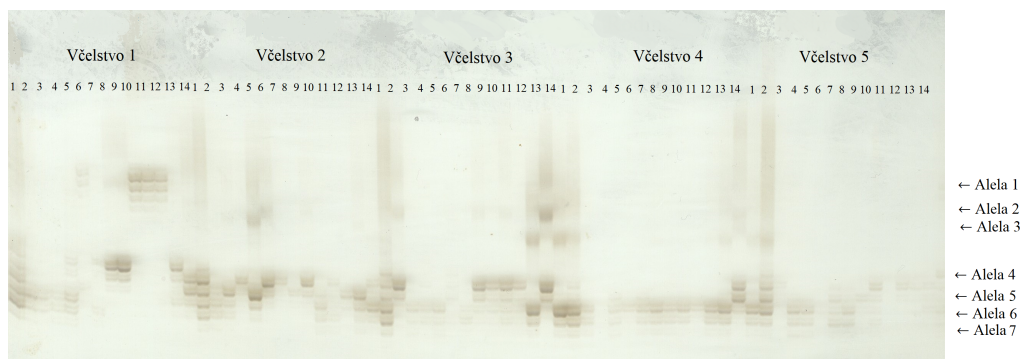
Legenda: Na elektroforetogramu je označeno 5 včelstev, v každém včelstvu je očíslováno 14 vzorků. Vzorek 1 je PCR amplifikát z DNA těla matky, vzorek 2 je PCR amplifikát z DNA semenného vajíčku matky. Vzorky 3 až 14 jsou PCR amplifikáty trubců, z toho 3 až 8 je DNA z trubců odebraných z plodového plástu, vzorky 9 až 14 jsou PCR amplifikáty DNA z dospělých trubců odchycených ve včelstvu. Alely jsou značené jako Alela 1 až 5.

Obrázek č. 8: Elektroforetogram PCR produktů mikrosatelitového lokusu A14 u včely medonosné kraňské (teplota *annealingu* 68 °C).



Legenda: Na elektroforetogramu je označeno 5 včelstev, v každém včelstvu je očíslováno 14 vzorků. Vzorek 1 je PCR amplifikát z DNA těla matky, vzorek 2 je PCR amplifikát z DNA semenného vajíčku matky. Vzorky 3 až 14 jsou PCR amplifikáty trubců, z toho 3 až 8 je DNA z trubců odebraných z plodového plástu, vzorky 9 až 14 jsou PCR amplifikáty DNA z dospělých trubců odchycených ve včelstvu. Alely jsou značené jako Alela 1 až 3.

Obrázek č. 9: Elektroforetogram PCR produktů mikrosatelitového lokusu Ap55 u včely medonosné kraňské (teplota *annealingu* 60 °C a poloviční koncentrace MgCl₂).

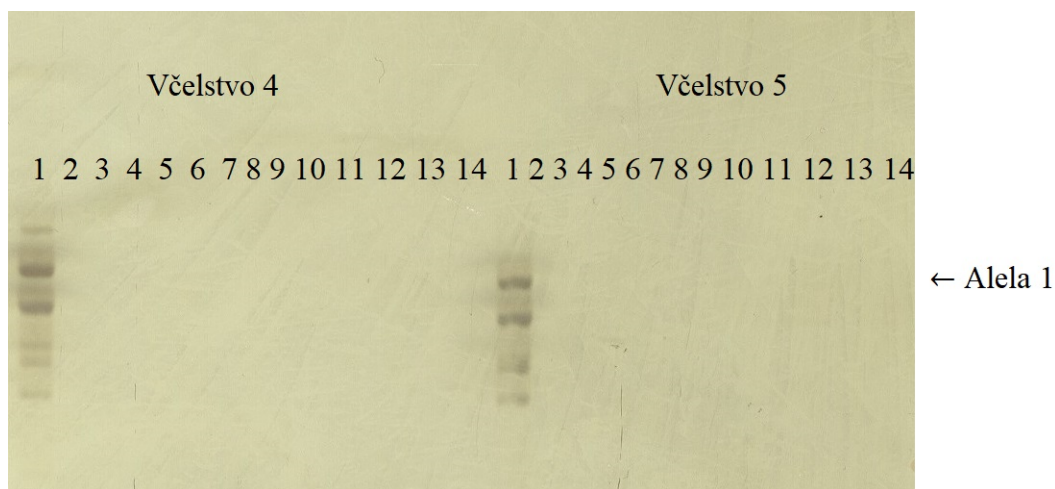


Legenda: Na elektroforetogramu je označeno 5 včelstev, v každém včelstvu je očíslováno 14 vzorků. Vzorek 1 je PCR amplifikát z DNA těla matky, vzorek 2 je PCR amplifikát z DNA semenného vajíčku matky. Vzorky 3 až 14 jsou PCR amplifikáty trubců, z toho 3 až 8 je DNA z trubců odebraných z plodového plástu, vzorky 9 až 14 jsou PCR amplifikáty DNA z dospělých trubců odchycených ve včelstvu. Alely jsou značené jako Alela 1 až 7.

Izolace DNA z matek i trubců a preparace semenných vajíčků matky proběhla úspěšně, tedy DNA ve všech vzorcích poskytla PCR produkty amplifikační reakce (s výjimkou mikrosatelitu A113, který neposkytoval produkt v žádném případě). PCR amplifikace některých mikrosatelitových lokusů u některých jedinců ani opakovaně PCR produkt neposkytla, což velmi pravděpodobně nesouvisí s kvalitou izolace DNA, protože u dalších mikrosatelitů tato DNA produkt běžně poskytovala.

U většiny mikrosatelitů a některých PCR produktů amplifikace DNA trubců poskytovala více než jeden PCR produkt (více než jednu alelu) a tyto produkty byly někdy rozdílné intenzity a v některých případech byla intenzita produktů v rámci jedince velmi podobná. Produkty nebyly vzájemně v postavení alely a extra bandu. Všechny tyto PCR reakce se testovaly opakovaně a vzorek vykazoval stejný charakter v elektroforetickém gelu. Nešlo tedy o chybu pipetování, ale jednalo se o problém PCR amplifikace, alely byly v různé pozici vůči sobě, tedy nejednalo se o PCR produkt alely a tzv. stutter bandy, které vznikají při PCR. PCR analýzou DNA některých trubců byly v gelu zaznamenány dvě, tři nebo dokonce čtyři alely (viz obrázek č. 12, vzorek 8). Při řešení tohoto problému jsem zvyšovala teplotu *annealingu* a snažila se dosáhnout pouze jednoho produktu, ale v tomto případě zmizely všechny produkty. Nedokázala jsem upravit podmínky PCR amplifikace, aby v elektroforetickém gelu byl pouze produkt jedné alely a jedinec by vykazoval haploidní genotyp. Ve své práci jsem zaznamenala mikrosatelit Ap81 (Obrázek č. 10), který poskytl produkt pouze s DNA z matek. U PCR amplifikátu z DNA trubců produkt zcela chyběl. I přes opakování reakce ani u 1 z 5 včelstev produkt u trubců tento mikrosatelit nikdy neposkytl.

Obrázek č. 10: Elektroforetogram PCR produktů mikrosatelitového lokusu Ap81 u včely medonosné kraňské (teplota *annealingu* 50 °C).

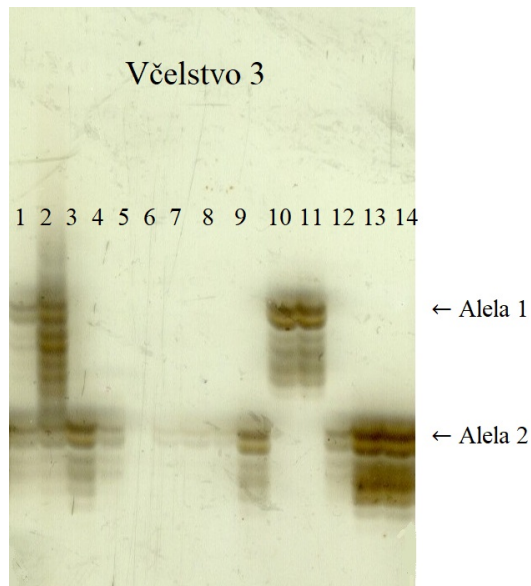


Legenda: Na elektroforetogramu jsou označena 2 včelstva, v každém včelstvu je očíslováno 14 vzorků. Vzorek 1 je PCR amplifikát z DNA těla matky, vzorek 2 je PCR amplifikát z DNA semenného včáčku matky. Vzorky 3 až 14 jsou PCR amplifikáty DNA trubců, z toho 3 až 8 je DNA z trubců odebraných z plodového plástu, vzorky 9 až 14 jsou PCR amplifikáty DNA z dospělých trubců odchycených ve včelstvu. PCR poskytla pouze 1 alelu (Alela 1).

DNA z těla matky poskytovala vždy homozygotní nebo heterozygotní PCR produkty, nikdy se nevyskytovaly zmnožené alely a to odpovídá tomu, že matka je vždy pro daný lokus homo- nebo heterozygot.

Všechny semenné včáčky vypreparované z matek poskytovaly produkty, které s různou intenzitou vždy zahrnovaly PCR produkty z těla matky, což je pravděpodobné, protože stěna semenného včáčku je součástí těla matky, tedy má její genetickou konstituci. Problém u produktů ze semenného včáčku byl ten, že většina mikrosatelitů vykazovala různé takzvané stutter bandy a nebylo možné jednoznačně určit počet alel u vícealelových vzorků. Tedy nebylo jasné, co je série stutter bandů a co je další alela, která v sekvenci pravidelně se vyskytujícími bandy navazuje. Naopak se velmi dobře hodnotily mikrosatelity s menším počtem alel, které měly přibližně dvě až čtyři alely, ale z hlediska nízkého počtu alel je nelze využít, protože mají nízkou variabilitu, byl to mikrosatelit Ap43 (viz obrázek č. 11). Vhodnější byly mikrosatelity vykazující vyšší variabilitu s pěti a více alely. Tyto mikrosatelity ale nejsou využitelné, protože jsou v nízké kvalitě kvůli velmi špatné hodnotitelnosti a nevyhovujícímu rozlišení alel. Byly to například mikrosatelity A88 (viz obrázek č. 12) a Ap36.

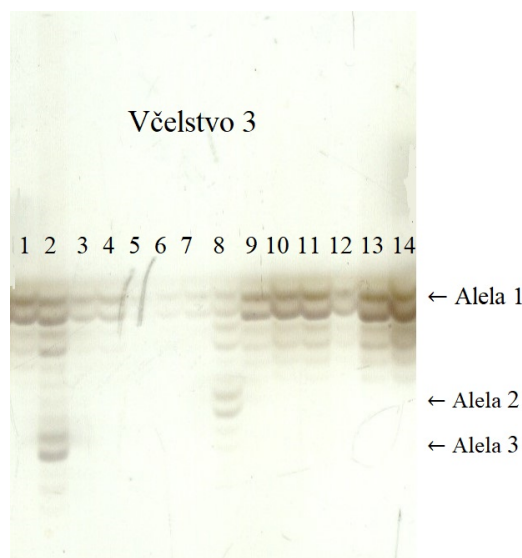
Obrázek č. 11: Elektroforetogram PCR produktů mikrosatelitového lokusu Ap43 u včely medonosné kraňské (teplota *annealingu* 59 °C a tříčtvrteční koncentrace MgCl₂).



Legeneda: Na elektroforetogramu je označeno 1 včelstvo, kde je očíslováno 14 vzorků. Vzorek 1 je PCR amplifikát z DNA těla matky, vzorek 2 je PCR amplifikát z DNA semenného vajíčku matky. Vzorky 3 až 14 jsou PCR amplifikáty trubců, z toho 3 až 8 je DNA z trubců odebraných z plodového plástu, vzorky 9 až 14 jsou PCR amplifikáty DNA z dospělých trubců odchycených ve včelstvu. Alely jsou označeny jako Alela 1 a Alela 2. Na obrázku je pouze ilustrační fotografie včelstva 3, celkem u všech 5 včelstev byly zachyceny 4 alely.

U mikrosatelitu A88 jsem detekovala trubce z plodu, který vykazoval alelu odlišnou od matky a navíc se tento jedinec v elektroforetickém gelu jevil jako diploidní. Jednalo se o alely, nikoli o tzv. stutter bandy, které postupně vyznívají. První alela jedince byla stejná jako u matky a druhá alela byla odlišná, než všechny ostatní alely ve včelstvu (viz obrázek č. 12, vzorek 8).

Obrázek č. 12: Elektroforetogram PCR produktů mikrosatelitového lokusu A88 u včely medonosné kraňské (teplota *annealingu* 58 °C).



Legenda: Na elektroforetogramu je označeno 1 včelstvo, kde je očíslováno 14 vzorků. Vzorek 1 je PCR amplifikát z DNA těla matky, vzorek 2 je PCR amplifikát z DNA semenného váčku matky. Vzorky 3 až 14 jsou PCR amplifikáty trubců, z toho 3 až 8 je DNA z trubců odebraných z plodového plástu, vzorky 9 až 14 jsou PCR amplifikáty DNA z dospělých trubců odchycených ve včelstvu. Alely jsou označeny jako Alela 1 až Alela 3. Na obrázku je pouze ilustrační fotografie včelstva 3, celkem u všech 5 včelstev bylo zachyceno 5 alel.

V praktické části své diplomové práce jsem provedla veškeré laboratorní optimalizace (izolace DNA, optimalizace PCR i amplifikace DNA), které byly potřebné. Mikrosatelitová PCR analýza DNA spermií ze semenného váčků z těla matky nebyla využitelná, protože více než polovina mikrosatelitů poskytovala nízkou variabilitu. Za předpokladu, že se matka páří s více než 10 trubci tyto mikrosatelity nebyly použitelné, protože poskytovaly maximálně pouze 12 alel a navíc špatně rozlišitelných. I kdyby rozlišitelnost byla, nedokázala by tato metoda podchytit více než 10 genetických variant trubců. Zbytek mikrosatelitů poskytoval pět a více alel a pouze u dvou případů mikrosatelitů odhaduji více než 10 alel na lokus, jednalo se o lokus A29 a A76. U těchto dvou mikrosatelitů jsem nebyla schopna odlišit jednotlivé alely a jasně určit počet trubců se kterými se matky pářily. Využití mikrosatelitů s větším počtem alel by mohlo být použité na odlišení lokalit s vysokou a nízkou hladinou polymorfismu. Zjistila jsem, že tato metoda analýzy mikrosatelitů tímto způsobem není vhodná a v rámci výskytu PCR artefaktů není možné 100% identifikovat všechny alely a spolehlivě je porovnávat v širší skupině jedinců.

6 Diskuze

Ve své diplomové práci jsem se snažila zjistit počet trubců spářených s matkou a zalétavost trubců v rámci stanoviště. Výsledků jsem chtěla dosáhnout pomocí PCR amplifikace 20 vybraných polymorfních mikrosatelitových lokusů. V pokusu jsem z 5 různých stanovišť odebrala 5 matek a 60 trubců včely medonosné kraňské (*Apis mellifera carnica*). Pro optimalizaci a osvojení preparace jsem využila 16 matek včely medonosné a z jejich zadečku jsem vypreparovala semenný váček. Matky v úlu kladly dva roky a poté byly vyměněny. DNA jsem izolovala pomocí kitu Exgene Tissue SV plus (GeneAll), kapitola D, Izolace DNA z hmyzu a červů. Provedením optimalizací teplot PCR, upravením koncentrace hořčnatých iontů a úpravou délky separace jsem zjistila, že polymorfní produkt poskytuje pouze 16 mikrosatelitových lokusů (viz tabulka č. 5) Monomorfní produkty jsem zaznamenala u mikrosatelitů A8, A35 a Ap81. Mikrosatelit A113 neposkytl žádný produkt.

V hlavní části experimentu jsem studovala 16 polymorfních mikrosatelitových lokusů na DNA matek a trubců včely medonosné kraňské odebraných společně při výměně matek. Očekávaných cílů této diplomové práce se nedosáhlo, dílčí kroky praktické části byly úspěšné. PCR amplifikace ze semenného váčku se spermatem trubců se v produktech PCR projevila v podobě dalších produktů (například extrabandy, stutter bandy), než v PCR produktech těla matky, ale z důvodu výrazně nižšího počtu alel, než které byly uvedeny v originálních publikacích (např. Estoup *et al.*, 1994; Franck *et al.*, 1998; Solignac *et al.*, 2003) a četných artefaktů v elektroforetickém gelu se nepodařilo výsledky vyhodnotit. U PCR produktů haploidních jedinců se v několika případech mikrosatelitů objevovaly znásobené alely a nulové alely. Znásobené alely se objevovali u trubců, kteří se podle literárních zdrojů měli ve včelstvu vyskytovat pouze jako haploidní jedinci, na PCR elektroforetogramu vzbuzovali dojem, že se jedná o diploidní, triploidní dokonce tetraploidní jedince, tyto artefakty se nepodařilo odstranit (Herrmann *et al.*, 2005). Někteří trubci naopak opakovaně neposkytovali PCR produkt, zde se pravděpodobně jednalo o nulové alely. U PCR produktů matek se objevily artefakty, nejspíš se jednalo o stutter bandy, které nebylo možné od dalších alel rozeznat. Z těchto výše uvedených důvodů se nepodařilo dosáhnout cíle praktické části této práce a počet trubců, kteří se páří s matkou a zalétavost trubců jsem nedokázala touto metodou zjistit.

V průběhu optimalizace jsem z pokusu vyřadila 4 mikrosatelity. Mikrosatelit A113 jsem vyřadila z důvodu neposkytnutí PCR produktu u žádného jedince. Tento mikrosatelit byl testován Estoupem *et al.* (1993) při teplotě *annealingu* 60 °C s počtem alel

11 na 36 jedincích včely medonosné. V mém pokusu jsem testovala teploty *annealingu* od 47–65 °C. Mikrosatelit neposkytl produkt při žádné teplotě a výměna chemikálií kvůli podezření na kontaminaci neodhalila problém. Sekvence primerů pro amplifikaci mikrosatelitů jsem podle literárního zdroje, ze kterého jsem čerpala, kontrolovala a nenalezla jsem chyby v přepisování ze zdroje, zadávání sekvence primerů a nebo jeho objednávání.

Mikrosatelity A8, A35 a Ap81 jsem vyloučila z důvodu poskytnutí pouze monomorfního produktu. Mikrosatelit A8 a mikrosatelit A35 byly použity De La Rúa *et al.* (2003) při studiu populace včely medonosné sicilské (*A. m. sicula*) u 95 jedinců ze 4 různých španělských ostrovů. U mikrosatelitu A8 získali 1–7 alel, což znamená, že tento mikrosatelit v některých populacích nevykazoval polymorfismus. U mikrosatelitu A35 De La Rúa *et al.* (2003) našli 5–8 alel. Mikrosatelit Ap81 jsem vyřadila z důvodu poskytnutí pouze monomorfního produktu u matky a u trubců neposkytl tento mikrosatelit žádný produkt. Mikrosatelit Ap81 na včele medonosné kyperské (*A. m. cypria*) testovali Kandemir *et al.* (2006) a amplifikací DNA u 64 jedinců ze severozápadu našli 9 alel a u 14 jedinců ze severovýchodu 3 alely.

V rámci experimentu jsem se setkala s několika problémy, které v práci nastaly:

1. Výrazně nižší počty alel jednotlivých mikrosatelitů

Většina mikrosatelitů, které jsem testovala, vykazovala výrazně nižší počet alel, než bylo uvedeno v publikacích. Ve většině případů se jednalo o velké odchylky, například u mikrosatelitu A7 jsem našla 4 alely a originální literatura uvádí 13 alel (Estoup *et al.*, 1995). V několika málo případech nebyly odchylky tak výrazné, například i mikrosatelitu A29 jsem našla 12 alel a v literatuře uvádějí 15 alel na lokus (Chen *et al.*, 2005). Pouze ve dvou případech jsem dosáhla stejných čísel, které uvádějí i autoři v literatuře. Jednalo se o mikrosatelit Ap66 se 4 alelami a mikrosatelit B24 se třemi alelami, bohužel se jednalo o mikrosatelity s nízkým počtem alel. Naopak se nikdy nestalo, že bych našla větší počet alel, než se v literatuře uvádí (viz tabulka č. 6).

Například mikrosatelit A76 použili Estoup *et al.* (1994) při studiu otcovství u včely medonosné tmavé (*A. m. mellifera*), kdy našli 17 alel u 30 jedinců. Baundry *et al.* (1998) ve studiu příbuzenství na trubčích shromaždištích na včele medonosné kraňské (*A. m. carnica*) u mikrosatelitu A76 zjistili až 50 alel u 142 trubců. Previtali *et al.* (2008) zjistili u včely medonosné italské (*A. m. ligustica*) až 12 otcovských linií díky tomuto vysoce polymorfnímu mikrosatelitu. Jen práce Châline *et al.* 2002, tvořila výjimku, když našli 8 alel u 94 jedinců. Ve své práci jsem našla přibližně 5–10 alel u 70 jedinců.

Tabulka č. 6: Srovnání počtu alel jednotlivých mikrosatelitů v této diplomové práci s dalšími autory. V mé práci se vždy jednalo o 70 jedinců.

Lokus	Tato práce	Srovnání	Jiné práce		
	Počet alel		Počet alel	Počet jedinců	Literární zdroj
A7	5	≪	13	54	Estoup <i>et al.</i> , 1995
A8	1	≪	10	60	Franck <i>et al.</i> , 1998
A14	3	<	7	44	Chen <i>et al.</i> , 2005
A28	2	≪	11	34	Estoup <i>et al.</i> , 1995
A29	12	<	15	38	Chen <i>et al.</i> , 2005
A35	1	≪	10	45	De la Rúa <i>et al.</i> , 2002
A43	4	≪	11	58	Estoup <i>et al.</i> , 1993
A76	5–10	≈	8	94	Châline <i>et al.</i> , 2002
A79	4	<	9	29	Estoup <i>et al.</i> , 1994
A88	5	≪	12	36	Estoup <i>et al.</i> , 1995
A107	6	≪	14	47	Chen <i>et al.</i> , 2005
A113	0	≪	11	58	Franck <i>et al.</i> , 1998
Ap33	5	≪	10	52	Estoup <i>et al.</i> , 1995
Ap36	6–7	≪	15	100	Franck <i>et al.</i> , 1998
Ap43	3	≪	18	56	Franck <i>et al.</i> , 1998
Ap55	7–9	≪	11	90	Muñoz <i>et al.</i> , 2009
Ap66	4	=	4	28	Strange <i>et al.</i> , 2008
Ap81	1	<	4	28	Strange <i>et al.</i> , 2008
B24	3	=	3	60	Franck <i>et al.</i> , 1998
B124	4	≪	13	36	Estoup <i>et al.</i> , 1995

Legenda:

- < Počet alel se méně liší
- ≪ Počet alel se více liší
- = Počet alel je stejný
- ≈ Počet alel je přibližně stejný

Mikrosatelit A107 byl použit Estoupem *et al.* (1994), kdy našli až 22 alel na 30 jedincích včely medonosné tmavé, v. m. kraňské a v. m. italské. Také Baundry *et al.* (1998) u toho mikrosatelitu zjistili 18 alel u 142 trubců v. m. kraňské. Dále Chen *et al.* (2005) získali 14 alel na 47 jedincích v. m. italské. V mém případě jsem zjistila pouze 6 alel na lokus amplifikací u zástupců 5 včelstev.

U mikrosatelitu A29 Baundry *et al.* (1998) zjistili 24 alel u 142 trubců v. m. kraňské. Chen *et al.* (2005) testovali mikrosatelit A29 u v. m. italské, kde zjistili 15 alel na 38 jedincích. V této práci jsem na 70 jedincích získala přibližně 12 alel u 70 jedinců v. m. kraňské.

2. Nulové alely u trubců

U některých trubců produkt nevznikal. Pravděpodobně se jedná o nulové alely. Tyto alely jsem detekovala napříč všemi použitými mikrosatelity. To znamená, že sekvence odpovídající alespoň jednomu z primerů určených k amplifikaci tohoto mikrosatelitu pravděpodobně obsahovala mutaci, která znemožnila nasednutí primerů a tedy provedení PCR amplifikace. Tento problém například zaznamenali i Olroyd *et al.* (1996) u mikrosatelitu A14, který studovali na včele *Apis dorsata*. Mikrosatelit A14 jsem využila i ve své práci a také jsem zaznamenala nulové alely (viz obrázek č. 8).

3. Zalétavost trubců

Mimo jiné PCR produkty trubců získané v pokusu vykazovaly artefakty, tím že byly di- tri- a někdy až tetraploidní, což neodpovídá realitě, kdy literatura tvrdí, že vitální trubci ve včelstvech jsou jen haploidní (Herrmann *et al.*, 2005) a nebo u nich opakovaně nevznikal produkt, tedy vznikaly nulové alely (Solignac *et al.*, 2004). Předpoklad byl, že alely prvních 6 trubců budou stejné jako některá z alel z těla matky, protože trubec má pouze genetickou výbavu matky a tedy pokud matka byla v daném lokusu homozygotní, může předat jen jednu alelu, pokud byla heterozygotní může předat jednu nebo druhou alelu (Evans *et al.*, 2004) a alely dalších 6 trubců budou stejné nebo odlišné od alel z těla matky, protože se může jednat o její syny nebo o zalétlé trubce. U mikrosatelitu A88 (viz obrázek č. 12) jsem se setkala s jedincem 8, tedy trubcem odebraným z plodu, který se v elektroforetické gelu jeví jako diploidní jedinec. Jedinec 8 obsahuje první alelu, stejnou jako má matka a druhou alelou se zcela liší od matky a ostatních jedinců ve včelstvu.

4. Artefakty PCR produktů DNA ze semenného včáku

Ve své diplomové práci jsem amplifikovala mikrosatelity A107 a A76, které mimo jiné nebyly snadno hodnotitelné z důvodu výskytu četných stutter bandů. PCR amplifikace těchto mikrosatelitů produkovala i artefakty viditelné jako slabší proužky, které jsou asociovány s hlavním produktem alely (například mikrosatelit Ap55, obrázek č. 11, jedinec 2). Tyto bandy jsou označovány jako stutter bandy a jejich vznik je zapříčiněn sklouznutím DNA polymerázy během amplifikace (Moritz *et al.*, 2003). K jejich vzniku dochází zejména u mikrosatelitů s dinukleotidovými repeticemi (Doveri *et al.*, 2008). Tento problém řešili i Eimanifar *et al.* (2020), když studovali genetickou diverzitu mezi včelou medonosnou středoafričskou (*A. m. scutellata*) a v. m. kapskou (*A. m. capensis*).

K řešení tohoto problému použili program MICRO-CHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004), který kromě odstranění chyb z důvodu stutter bandům byl použit i k identifikaci pravděpodobnosti výskytu chyb způsobených nulovými alelami a tomu, když PCR amplifikace jedince neposkytuje produkt.

Technika využitá v této diplomové práci je používána na včele medonosné k mnoha rozdílným studiím. Mikrosatelity byly úspěšně pro studium oplození využity (Jensen *et al.*, 2004; Previtali *et al.*, 2008). Mikrosatelity jsou vhodným nástrojem pro studium populací a přímé příbuznosti včel, nejsou však vhodné pro studium oplození, protože mikrosatelity mají buď málo alel a nedokáží odhalit takové množství jedinců, které se uvádí v literatuře (například u mikrosatelitu A76 našli autoři 17 alel u 30 jedinců (Previtali *et al.*, 2008) v této diplomové práci jsem našla pouze 5-10 alel u 70 jedinců) a nebo jejich PCR produkt je nepřehledný, že neumožnil kvantifikaci alel.

Mikrosatelity použité v této práci jsou použitelné například na přímé studie rodičovského původu, využitelné pro šlechtile včel a plemenářskou práci. Na základě provedených analýz nejsou vhodné pro určování počtu tubců, se kterými se matka spářila.

7 Závěr

V této diplomové práci jsem určovala počet trubců pářících se s matkou a zalétavost trubců v rámci stanovišť. Tohoto cíle jsem chtěla dosáhnout na základě PCR amplifikace polymorfních mikrosatelitů určených pro včelu medonosnou (*Apis mellifera*). Porovnávala jsem výsledky PCR amplifikace s DNA vyizolovanou z těla matky a semenného včáčku matky a s DNA vyizolovanou z trubců ze stejného úlu.

Testovala jsem 20 mikrosatelitových lokusů, z nichž jsem jich vybrala pouze 16 polymorfních. Při optimalizaci PCR jsem zjistila, že mikrosatelit A113 neposkytuje žádný produkt a mikrosatelity A8, A35 a Ap81 poskytují pouze monomorfní produkt. S použitím 16 polymorfních mikrosatelitů jsem získala od 2 do přibližně 12 alel na lokus.

Jednotlivé kroky mé diplomové práce byly úspěšné. PCR amplifikací DNA získanou ze semenného včáčku se podařilo získat i odlišné PCR produkty od DNA získané z těla matky. PCR produkty z DNA trubců obsahovaly v některých případech znásobené alely, nulové alely a artefakty, které neumožnily správné hodnocení výsledků.

Tímto experimentem jsem zjistila, že technika mikrosatelitové PCR analýzy s DNA trubců ze semenného včáčku není vhodná pro studium otcovství, protože PCR artefakty znemožňují relevantní hodnocení produktů a počty alel na jednotlivých lokusech jsou tak nízké, že neumožňují určit více než 10 trubců pářících se s matkou.

8 Literatura

Agarwal M., Shrivastava N., Padh H. (2008) Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports* 27, 617–631.

Agra M. N., Conte C. A., Corva P. M., Cladera J. L., Lanzavecchia S. B., Palacio M. A. (2018) Molecular characterization of *Apis mellifera* colonies from Argentina: genotypic admixture associated with ecoclimatic regions and apicultural activities. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 166, 724–738.

Aizen M. A., Garibaldi L. A., Cunningham S. A., Klien A. M. (2009) How much does agriculture depend on pollinators? Lessons from long-term trends in crop production. *Annals of Botany* 103, 1579–1588.

Alburaki M., Bertrand B., Legout H., Moulin S., Alburaki A., Sheppard W. S., Garnery L. (2013) A fifth major genetic group among honey bees revealed in Syria. *BMC Genetics* 14, 1–10.

Alburaki M., Moulin S., Legout H., Alburaki A., Garnery L. (2011) Mitochondrial structure of Eastern honey bee populations from Syria, Lebanon and Iraq. *Apidologie* 42, 628–641.

Anderson R. H. (1963) The laying worker in the Cape honeybee, *Apis mellifera capensis*. *Journal of Apicultural Research* 2, 85–92.

Arias M. C., Rinderer T. E., Sheppard W. S. (2006) Further characterization of honey bees from the Iberian Peninsula by allozyme, morphometric and mtDNA haplotype analyses. *Journal of Apicultural Research* 45, 188–196.

Ashley C. T., Warren S. T. (1995) Trinucleotide repeat expansion and human disease. *Annual Review of Genetics* 29, 703–728.

Baer B. (2005) Sexual selection in (*Apis*) bees. *Apidologie* 36, 187–200.

Baer B., Collins J., Maalaps K., den Boer S. P. A. (2016) Sperm use economy of honeybee (*Apis mellifera*) queens. *Ecology and Evolution* 6, 2877–2885.

Baker A. J. (2000) *Molecular methods in ecology*. Blackwell Science Ltd., Oxford.

Barron A., Oldroyd B., Ratnieks F. L. W. (2001) Worker reproduction in honeybees (*Apis*) and the anarchic syndrome: a review. *Behavior Ecology and Sociobiology* 50, 199–208.

Baudry E., Solignac M., Garnery L., Gries M., Cornuet J. M., Koeniger N. (1998) Relatedness among honeybees (*Apis mellifera*) of a drone congregation. Proceedings of the Royal Society of London Series B - Biological Sciences 265, 2009–2014.

Bauer M., Šťastný M., Gasper J., Bauerová M. (2017) Honey bees in Slovakia: A review. Slovak Journal of Animal Science 50, 149–153.

Ben-Shahar Y., Robichon A., Sokolowski M. B., Robinson G. E. (2002) Influence of gene action across different time scales on behavior. Science 296, 741–744.

Beye M., Hasselmann M., Fondrk M. K., Page R. E., Omholt S. W. (2003) The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. Cell 114, 419–429.

Bodur C., Kence M., Kence A. (2007) Genetic structure of honey bee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) populations of Turkey inferred from microsatellite analysis. Journal of Apicultural Research 46, 50–56.

Boes K. E. (2010) Honeybee colony drone production and maintenance in accordance with environmental factors: An interplay of queen and worker decisions. Insectes Sociaux 57, 1–9.

Breed M. D. (2019) Honeybees. Encyclopedia of Animal Behavior. Druhé vydání. Academic Press, London.

Brooker R. J. (2011) Genetics: Analysis and Principles. McGraw-Hill Companies, New York.

Brutscher L. M., Baer B., Niño E. L. (2019) Putative Drone Copulation Factors Regulating Honey Bee (*Apis mellifera*) Queen Reproduction and Health: A review. Insects 10, 8.

Bull J. J. (1983) Evolution of sex determining mechanisms. The Benjamin/Cummings Publishing Company. Menlo Park, California.

Ciereszko A., Wilde J., Dietrich G. J., Siuda M., Bak B., Judycka S., Karol H. (2017) Sperm parameters of honeybee drones exposed to imidacloprid. Apidologie 48, 211–222.

Couvillon M. J., Hughes W. O. H., Perez-Sato J. A., Martin S. J., Roy G. G. F, Ratnieks F. L. W. (2010) Sexual selection in honey bees: colony variation and the importance of size in male mating success. Behavioral Ecology 3, 520–525.

Cornuet J. M., Daoudi A., Chevalet C. (1986) Genetic pollution and number of matings in a black honeybee (*Apis mellifera mellifera*) population. Theoretical and Applied Genetics 73, 223–227.

Czekońska K., Chuda-Mickiewicz B. (2015) The ability of honeybee drones to ejaculate. *Journal of Apicultural Science* 2, 127–133.

Czekońska K., Chuda-Mickiewicz B., Samborski J. (2015) Quality of honeybee drones reared in colonies with limited and unlimited access to pollen. *Apidologie* 46, 1–9.

Dall'Olio R., Marino A., Lodesani M., Moritz R. F. A. (2007) Genetic characterization of Italian honeybees, *Apis mellifera ligustica*, based on microsatellite DNA polymorphisms. *Apidologie* 38, 207–217.

Delaney D. A., Keller J. J., Caren J. R., Tarpy D. R. (2011) The physical, insemination, and reproductive quality of honey bee queens (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 42, 1–13.

De la Rúa P., Galián J., Serrano J., Moritz R. F. A. (2002) Microsatellite analysis of non-migratory colonies of *Apis mellifera iberica* from south-eastern Spain. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 40, 164–168.

De la Rúa P., Galián J., Serrano J., Moritz R. F. A. (2003) Genetic structure of Balearic honeybee populations based on microsatellite polymorphism. *Genetics Selection Evolution* 35, 339–350.

Doveri S., Lee D., Maheswaran M., Powell W. (2008) Molecular markers – history, features and applications. Science Publishers, Enfield, 23–68.

Dzierzon J. (1845) Gutachten über die von Herrn Direktor Stöhr im ersten und zweiten Kapitel des General-Gutachtens aufgestellten Fragen. *Eichstädter Bienenzeitung* 1, 109–113.

Eimanifar A., Pieplow J. T., Asem A., Ellis J. D. (2020) Genetic diversity and population structure of two subspecies of western honey bees (*Apis mellifera* L.) in the Republic of South Africa as revealed by microsatellite genotyping. *Journal of Life and Environmental Sciences* 8:e8280.

Engel M. S. (1999) The taxonomy of recent and fossil honey bees (Hymenoptera: Apidae, *Apis*). *Journal of Hymenoptera Research* 8, 165–196.

Estoup A., Garnery L., Solignac M., Cornuet J. M. (1995) Microsatellite variation in honeybee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure test of the infinite-allele and stepwise mutation models. *Genetics* 140, 679–695.

Estoup A., Solignac M., Cornuet J. M. (1994) Precise assessment of the number of patriline and of genetic relatedness in honeybee colonies. *Proceedings of the Royal Society of London Series B - Biological Sciences* 258, 1–7.

Estoup A., Solignac M., Harry M., Cornuet J. M. (1993) Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in two insect species *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Nucleic Acids Research* 21, 1427–1431.

Evans J. D., Schwarz R. S., Chen Y. P., Budge G., Cornman R. S., De la Rúa P., J. R. de Miranda, Foret S., Foster L., Gauthier L., Genersch E., Gisder S., Jarosch A., Kucharski R., Lopez D., Lun Ch. L., Moritz R. F. A., Maleszka R., Muñoz I., Pinto A. M. (2013) Standard methods for molecular research in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research* 52, 1–54.

Evans J. D., Shearman D. C. A., Poldroyd B. (2004) Molecular basis of sex determination in haplodiploids. *Trends in Ecology and Evolution* 19, 1–3.

Fisher A. II., Rangel J. (2018) Exposure to pesticides during development negatively affects honey bee (*Apis mellifera*) drone sperm viability. *PLoS One* 13: e0208630.

Forfert N., Troxler A., Retschnig G., Gauthier L., Straub L., Moritz R. F. A., Neumann P., Williams G. R. (2017) Neonicotinoid pesticides can reduce honeybee colony genetic diversity. *PLoS One* 12: e0186109.

Francis R. M., Kryger P., Meixner M., Bouga M., Ivanova E., Andonov S., Berg S., Bienkowska M., Büchler R., Charistos L., Costa C., Dyrba W., Hatjina F., Panasiuk B., Pechhacker H., Kezić N., Korpela S., Le Conte Y., Uzunov A., Wilde J. (2014) The genetic origin of honey bee colonies used in the COLOSS Genotype Environment Interactions Experiment: a comparison of methods. *Journal of Apicultural Research* 53, 188–204.

Franck P., Garnery L., Loiseau A. (2001) Genetic diversity of the honey bee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. *Heredity* 86, 420–430.

Franck P., Garnery L., Celebrano G., Solignac M., Cornuet J. M. (2000) Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*). *Molecular Ecology* 9, 907–921.

Franck P., Garnery L., Solignac M., Cornuet J. M. (1998) The origin of west European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): New insights from microsatellite and mitochondrial data. *Evolution* 52, 1119–1134.

Free J. B. (1957) The food of adult drone honeybees (*Apis mellifera*). *British Journal of Animal Behaviour* 5, 7–11.

Freitas F. C. d. P., Buchholtz J., Nunes F. M. F., Cristino A. S., Simoes Z. L. P. (2020) Characterization of sex-specific variants of *doublesex* and *feminizer* genes in stingless bee species. *Apidologie*. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00735-8>.

Fuchs S., Moritz R. F. A. (1999) Evolution of extreme polyandry in the honeybee *Apis mellifera* L. Behavioral Ecology and Sociobiology volume 45, 269–275.

Garnery L., Cornuet J. M., Solignac M. (1992) Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. Molecular Ecology 3, 145–154.

Garnery L., Franck P., Baudry E., Vautrin D., Cornuet J. M., Solignac M. (1998). Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*). Genetics Selection Evolution 30, 31–47.

Gempe T., Beye M., Hasselmann M., Schiøtt M., Hause G., Otte M. (2009) Sex determination in honeybees: two separate mechanisms induce and maintain the female pathway. PLoS Biol 7(10): e1000222.

Gençer H. V., Kahya Y. (2019) Sperm competition in honey bees (*Apis mellifera* L.): the role of body size dimorphism in drones. Apidologie 51, 1–17.

Grozinger C. M., Zayed A. (2020) Improving bee health through genomics. Nature Reviews Genetics 21, 277–291.

Gries M., Koeniger N. (1996) Straight forward to the queen: pursuing honeybee drones (*Apis mellifera* L.) adjust their body axis to the direction of the queen. Journal of Comparative Physiology 179, 539–544.

Han F., Wallberg A., Webster M. T. (2012) From where did the Western honeybee (*Apis mellifera*) originate? Ecology and Evolution 2, 1949–1957.

Hasselmann M., Beye M. (2004) Signatures of selection among sex-determining alleles of the honey bee. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101, 4888–4893.

Hasselmann M., Gempe T., Schiøtt M., Nunes-Silva C. G., Otte M., Beye M. (2008) Evidence for the evolutionary nascence of a novel sex determination pathway in honeybees. Nature 454, 519–522.

Hassett J., Browne K. A., McCormack G. P., Moore E., Soland G., Geary M. (2018) A significant pure population of the dark European honey bee (*Apis mellifera mellifera*) remains in Ireland. Journal of Apicultural Research 57, 337–350.

Haydak M. H. (1943) Larval food and development of castes in the honeybee. Journal of Economic Entomology 36, 778–792.

Haydak M. H. (1970) Honey bee nutrition. Annual Review of Entomology 15, 143–156.

Herrmann M., Trenzcek T., Fahrenhorst H., Engels W. (2005) Characters that differ between diploid and haploid honey bee (*Apis mellifera*) drones. *Genetics and Molecular Research* 4, 624–641.

Hrassnigg N., Crailsheim K. (2005) Differences in drone and worker physiology in honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 36, 255–277.

Châline N., Ratnieks F. L. W., Burke T. (2002) Anarchy in the UK: Detailed genetic analysis of worker reproduction in a naturally occurring british anarchistic honeybee, *Apis mellifera*, colony using DNA microsatellites. *Molecular Ecology* 11, 1795–1803.

Chen S. L., Li J. K., Zhong B. X., Su S. K. (2005) Microsatellite analysis of royal jelly producing traits of Italian honeybee (*Apis mellifera ligustica*). *Yi Chuan Xue Bao* 32, 1037–1044.

Jensen A. B., Palmer K. A., Chaline N., Raine N. E., Tofilski A., Martin S. J., Pedersen B. V., Boomsma J. J., Ratnieks F. L. W. (2005) Quantifying honey bee mating range and isolation in semi-isolated valleys by DNA microsatellite paternity analysis. *Conservation Genetics* 6, 527–537.

Kairo G., Provost B., Tchamitchian S., Abdelkader F. B., Bonnet M., Cousin M., Sénéchal J., Benet P., Kretzschmar A., Belzunces L. P. (2016) Drone exposure to the systemic insecticide Fipronil indirectly impairs queen reproductive potential. *Scientific Reports* 6, 31904.

Kandemir I., Meixner M. D., Ozkana A., Sheppard W. S. (2006) Genetic characterization of honey bee (*Apis mellifera cypria*) populations in northern Cyprus. *Apidologie* 37, 547–555.

Klein A.M., Vaissière B. E., Cane J. H., Steffan-Dewenter I., Cunningham S. A., Kremen C., Tscharntke T. (2007) Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 274, 303–313.

Kong A., Gudbjartsson D. F., Sainz J., Jonsdottir G. M., Gudjonsson S. A., Richardsson B., Sigurdardottir S., Barnard J., Hallbeck B., Masson G., Shlien A., Palsson S. T., Michael L. F., Thorgeirsson T. E., Gulcher J. F., Stefansson K. (2002) A high-resolution recombination map of the human genome. *Nature Genetics* 31, 241–247.

Kocher S., Grozinger C. (2011) Cooperation, conflict, and the evolution of queen pheromones. *Journal of Chemical Ecology*, 37, 1263–1275.

Koeniger G., Koeniger N., Tiesler F. K. (2014) Paarungsbiologie und Paarungskontrolle bei der Honigbiene. Buschhausen, Herten.

Kraus F. B., Neumann P., Moritz R. F. A. (2005) Genetic variance of mating frequency in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Insectes Sociaux* 52, 1–5.

Lai Y., Sun F. (2003) The relationship between microsatellite slippage mutation rate and the number of repeat units. *Molecular Biology and Evolution* 20, 2123–2131.

LaSalle J., Gauld I. D. (1993) Hymenoptera: their biodiversity, and their impact on the diversity of other organisms. *Hymenoptera and Biodiversity*. CAB International, London.

López-Urbe M. M., Appler R. H., Youngsteadt E., Dunn R. R., Frank S. D., Tarpay D. R. (2017) Higher immunocompetence is associated with higher genetic diversity in feral honey bee colonies (*Apis mellifera*). *Conservation Genetics* 18, 659–666.

Mackensen O. (1951) Viability and sex determination in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Genetics* 36, 500–509.

McAfee A., Pettis J. S., Tarpay D. R., Foster L. J. (2019) Feminizer and doublesex knock-outs cause honey bees to switch sexes. *PLoS Biology* 17: e3000256.

Matsuka M., Naohisa W., Kazuko T. (1973) Analysis of the food of larval drone Honeybees. *Journal of Apicultural* 12, 3–7.

Meixner M. D., Moritz R. F. A. (2004) Clique formation of super-sister honeybee workers (*Apis mellifera*) in experimental groups. *Insectes Sociaux* 51, 43–47.

Meixner M. D., Pinto M. A., Bouga M., Kryger P., Ivanova E., Fuchs S. (2013) Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*, *Journal of Apicultural Research* 52, 1–28.

Moore A. P., Wilson M. E., Skinner J. A. (2015) Honey bee queens: evaluating the most important colony member. The University of Tennessee, Knoxville TN.

Morin P. A., Luikart G., Wayne R. K. (2004) SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 19, 208–216.

Moritz R. F. A., Scharpenberg H., Lattorff H. M. G., Neumann P. (2003) A technical note for using microsatellite DNA analyses in haploid male DNA pools of social Hymenoptera. *Insectes Sociaux* 4, 398–400.

Muñoz I., Dall’Olio R., Lodesani M., De la Rúa P. (2009) Population genetic structure of coastal Croatian honeybees (*Apis mellifera carnica*). *Apidologie* 40, 617–626.

Muñoz I., Henriques D., Jara L., Johnston J. S., Chávez-Galarza J., De la Rúa P., Pinto M. A. (2017) SNPs selected by information content outperform randomly selected microsatellite loci for delineating genetic identification and introgression in the endangered dark European honeybee (*Apis mellifera mellifera*). *Molecular Ecology Resources* 17, 783–795.

Munoz-Torres M. C., Reese J. T., Childers Ch. P., Bennett A. K., Sundaram J. P., Childs K. L., Anzola J. M., Milshina N., Elisk Ch. G. (2011) Hymenoptera Genome Database: integrated community resources for insect species of the order Hymenoptera. *Nucleic Acids Research* 39, 658–662.

Nedic N., Francis R. M., Stanisavljevic L. (2014) Detecting population admixture in honey bees of Serbia. *Journal of Apicultural Research* 53, 303–313.

Nelson C. M., Ihle K. E., Fondrk M. K., Page R. E., Amdam G. V. (2007) The gene *vitellogenin* has multiple coordinating effects on social organization. *PLoS Biology* 5, 673–677.

Oleksa A., Tofilski A. (2015) Wing geometric morphometrics and microsatellite analysis provide similar discrimination of honey bee subspecies. *Apidologie* 46, 49–60.

Oliveira E. J., Pádua J. G., Zucchi M. I., Vencovsky R. (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29, 294–307.

Olroyd B. P., Smolenski A. J., Cornuet J. M., Wongsiri S., Estoup A., Rinderer T. E., Crozier R. H. (1996) Levels of polyandry and intracolony genetic relationships in *Apis dorsata* (Hymenoptera: Apidae). *Annals of the Entomological Society of America* 89, 276–283.

Ortego J., Aguirre M. P., Cordero P. J. (2012) Genetic and morphological divergence at different spatiotemporal scales in the grasshopper *Mioscirtus wagneri* (Orthoptera: Acrididae). *Journal of Insect Conservation* 16, 103–110.

Oxley P., Oldroyd B. P. (2010) The genetic architecture of honeybee breeding. *Advances in Insect Physiology* 39, 83–118.

Page R. E., Laidlaw H. H. (1988) Full sisters and super sisters: a terminological paradigm. *Animal Behavior* 36, 944–945.

Page R. E., Peng C. Y. S. (2001) Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Experimental Gerontology* 36, 695–711.

Page R. E., Robinson G. E. (1991) The genetics of division of labour in honeybee colonies. *Advances in Insect Physiology* 23, 117–171.

Page R. E., Scheiner R., Erber J., Amdam G. V. (2006) The development and evolution of division of labor and foraging specialization in a social insect (*Apis mellifera* L.). *Current Topics in Developmental Biology* 74, 253–286.

Pankiw T., Page R. E. (2003) Effect of pheromones, hormones, and handling on sucrose response thresholds of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Comparative Physiology A* 189, 675–684.

Patterson J., Schofield C. (2005) Preliminary study of wing morphometry in relation to tsetse population genetics: Research in action. *South African Journal of Science* 101, 132–134.

Peng Y., Baer-Imhoof B., Millar H. A., Baer B. (2015) Consequences of *Nosema apis* infection for male honey bees and their fertility. *Scientific Reports* 5, 10565.

Previtali C., Bongioni G., Costa C., Lodesani M., Galli A. (2008) Observation by microsatellite DNA analysis of sperm usage in naturally mated honeybee queens (*Apis mellifera ligustica*) over a period of two years. *Italian Journal of Animal Science*, 7, 465–478.

Primmer C. R., Raudsepp T., Chowdhary B. P., Muller A. P., Ellegren H. (1997) Low frequency of microsatellites in the avian genome. *Genome Research* 7, 471–482.

Prýmas L., Danihlák J., Dlouhá Š., Dostálková S., Kabát M., Hroncová Z., Petřivalský M. (2017) *Včelařství II. Pracovní společnost nástavkových včelařů CZ*, Praha.

Přidal A., Čermák K., Kašpar F., Titěra D., Veselý V. (2008) *Včely ve třetím tisíciletí. Výzkumný ústav včelařský s.r.o. Dol.*

Robertson H. M., Wanner K. W. (2006) The chemoreceptor superfamily in the honey bee, *Apis mellifera*: Expansion of the odorant, but not gustatory, receptor family. *Genome Research* 16, 1395–1403.

Rosenberg N. A., Pritchard J. K., Weber J. L., Cann H. M., Kidd K. K., Zhivotovskiy L. A., Feldman M. W. (2002) Genetic structure of human populations. *Science* 298, 2381–2385.

Rueppell O., Fondrk M. K., Page R. E. Jr. (2005) Biodemographic analysis of male honey bee mortality. *Aging Cell* 4, 13–19.

Ruttner F. (1966) The life and flight activity of drones. *Bee World* 47, 93–100.

Ruttner F. (1988) *Biogeography and taxonomy of honeybees*. Springer-Verlag, New York.

Sheppard W. S. (1989) A history of the introduction of honey bee races into the United States, I and II. *American Bee Journal* 129, 664–667.

Sheppard W. S., Meixner M. D. (2003) *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee subspecies from Central Asia. *Apidologie* 34, 367–375.

Schmehl D. R., Tomé H. V. V., Mortensen A. N., Martins G. F., Ellis J.D. (2015) Protocol for the *in vitro* rearing of honey bee (*Apis mellifera* L.) workers. *Journal of Apicultural Research* 55, 113–129.

Schmickl T., Crailsheim K. (2004) Inner nest homeostasis in a changing environment with special emphasis on honey bee brood nursing and pollen supply. *Apidologie* 35, 249–263.

Simone-Finstrom M., Tarpay D. R. (2018) Honey bee queens do not count mates to assess their mating success. *Journal of Insect Behavior* 31, 200–209.

Schönfeld A. (1955) Anatomie, morfologie a fyziologie včely medonosné. Státní zemědělské nakladatelství, Praha.

Schulz D. J., Barron A. B., Robinson G. E. (2002) A role for octopamine in honeybee division of labor. *Brain, Behavior and Evolution* 60, 350–359.

Smith M. L., Koenig P. A., Peters J. M. (2017) The cues of colony size: How honey bees sense that their colony is large enough to begin to invest in reproduction. *Journal of Experimental Biology* 220, 1597–1605.

Soland-Reckeweg G., Heckel G., Neumann P., Fluri P., Excoffier L. (2009) Gene flow in admixed populations and implications for the conservation of the Western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Insect Conservation* 13, 317–328.

Solignac M., Vautrin D., Baudry E., Loiseau A., Mougél F., Cornuet J. M. (2004) A Microsatellite-Based Linkage Map of the Honeybee, *Apis mellifera* L. *Genetics* 167, 253–262.

Solignac M., Vautrin D., Loiseau A., Mougél F., Baudry E., Estoup A., Garnery L., Habert M., Cornuet J. M. (2003) Five hundred and fifty microsatellite markers for the study of the honeybee (*Apis mellifera* L.) genome. *Molecular Ecology Notes* 3, 307–311.

Strange J. P., Garnery L., Sheppard W. S. (2008) Morphological and molecular characterization of the Landes honey bee (*Apis mellifera* L.) ecotype for genetic conservation. *Journal of Insect Conservation* 12, 527–537.

Strassmann J. (2001) The rarity of multiple mating by females in the social Hymenoptera. *Insectes Sociaux* 48, 1–13.

- Szolderits M. J., Crailsheim K. (1993) A comparison of pollen consumption and digestion in honeybee (*Apis mellifera carnica*) drones and workers. *Journal of Insect Physiology* 39, 877–881.
- Tanaka E. D., Hartfelder K. (2004) The initial stages of oogenesis and their relation to differential fertility in the honey bee (*Apis mellifera*) castes. *Arthropod Structure and Development* 33, 431–442.
- Tarpy D. R., Caren J. R., Delaney D. A., Sammataro D., Finley J., Loper G. M., DeGrandi-Hoffman G. (2010) Mating frequencies of Africanized honey bees in the south western USA. *Journal of Apicultural Research* 4, 302–310.
- Tarpy D. R., Delaney D. A., Seeley T. D. (2015) Mating frequencies of honey bee queens (*Apis mellifera* L.) in a population of feral colonies in the Northeastern United States. *PLoS One* 10: e0118734.
- Tarpy D. R., Keller J. J., Caren J. R., Delaney D. A. (2012) Assessing the mating health of commercial honey bee queens. *Journal of Economic Entomology* 105, 20–25.
- Tarpy D. R., Metz B. N. (2019) Reproductive senescence in drones of the honey bee (*Apis mellifera*). *Insects* 10, 11.
- Tarpy D. R., Nielsen R., Nielsen D. I. (2004) A scientific note on the revised estimates of effective paternity frequency in *Apis*. *Insectes Sociaux* 51, 203–204.
- Uzunov A., Maixner M. D., Kiprijanovska H., Kryger P., Ralph B., Bouga M., Gregorc A., Andonov S., Ivanova E., Dobi P., Francis R. M. (2014) Genetic structure of *Apis mellifera macedonica* in the Balkan peninsula based on microsatellite DNA polymorphism. *Journal of Apicultural Research* 53, 288–295.
- Van Oosterhout C., Hutchinson W. F., Wills D. P., Shipley P. (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4, 535–538.
- Veselý V. (2003) *Včelařství*. Brázda, Praha.
- Wang Y., Ma L., Zhang W., Cui X., Wang H., Xu B. (2016) Comparison of the nutrient composition of royal jelly and worker jelly of honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 47, 48–56.
- Walker W. F. (1980) Sperm utilization strategies in nonsocial insects. *The American Naturalist* 115, 780–799.

Wallberg A., Bunikis I., Pettersson O. V., Mosbech M. B. (2019) A hybrid *de novo* genome assembly of the honeybee, *Apis mellifera*, with chromosome-length scaffolds. *BMC Genomics* 20: 275.

Wallberg A., Han F., Wellhagen G., Dahle B., Kawata M., Haddad N., Simões Z. L. P., Allsopp M. H., Kandemir I., De la Rúa P. (2014) A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature Genetics* 46, 1081.

Weinstock G. M., Robinson G. E. (2006) Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 443, 931–949.

Winston M. L. (1987) *The biology of the honey bee*. První vydání. Harvard University Press, Cambridge.

Winston M. L. (1991) *The biology of the honey bee*. Druhé vydání. Harvard University Press, Cambridge.

Whitfield Ch. W., Behura S. K., Berlocher S. H., Clark A. G., Johnston J. S., Sheppard W. S., Smith D. R., Suarez A. V., Weaver D., Tsutsui N. D. (2006) Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science* 314, 642–645.

Withrow J. M., Tarpay D. R. (2018) Cryptic royal subfamilies in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *PloS One* 13: e0199124.

Woyke J. (1955) Anatomico-physiological changes in queen-bees returning from mating flights, and the process of multiple mating. *Bulletin L'Académie Polonaise des Science* 3, 175–180.

Woyke J. (1963) What happens to diploid drone larvae in a honeybee colony. *Journal of Apicultural Research* 2, 73–75.

Woyke J. (1969) A method of rearing diploid drones in a honeybee colony. *Journal of Apicultural Research* 8, 65–74.

Woyke J. (1983) Lengths of haploid and diploid spermatozoa of the honeybee and the question of the production of triploid workers. *Journal of Apicultural Research* 22, 146–149.

Woyke J. (1984) Ultrastructure of single and multiple diploid honeybee spermatozoa. *Journal of Apicultural Research* 23, 123–135.

Woyke J. (1989) Results of instrumental insemination. The instrumental insemination of the queen bee. *Apimondia*.

Woyke J., Knytel A. (1966) The chromosome number as proof that drones can arise from fertilized eggs of the honeybee. *Journal of Apicultural Research* 5, 149–154.

Woyke J., Skowronek W. (1974) Spermatogenesis in diploid drones of the honeybee. *Journal of Apicultural Research* 13, 183–190.

Zmarlicki C., Morse R. A. (1963) Drone congregation areas. *Journal of Apicultural Research* 2, 64–66.

9 Přílohy

Tabulka č. 7: Koncentrace DNA ze 70 vzorků matek a trubců včely medonosné kraňské.

Včelstvo 1		Včelstvo 2		Včelstvo 3		Včelstvo 4		Včelstvo 5	
Jedinec	c (ng/μl)	Jedinec	c (ng/μl)	Jedinec	c (ng/μl)	Jedinec	c (ng/μl)	Jedinec	c (ng/μl)
Matka 1/T	5,1	Matka 2/T	3,1	Matka 3/T	3,0	Matka 4/T	65,3	Matka 5/T	20,8
Matka 1/S	9,7	Matka 2/S	5,5	Matka 3/S	3,3	Matka 4/S	2,1	Matka 5/S	5,2
Trubec 1/1	25,7	Trubec 2/1	2,4	Trubec 3/1	17,2	Trubec 4/1	4,9	Trubec 5/1	4,0
Trubec 1/2	4,9	Trubec 2/2	6,3	Trubec 3/2	3,8	Trubec 4/2	4,1	Trubec 5/2	7,8
Trubec 1/3	4,1	Trubec 2/3	17,7	Trubec 3/3	3,8	Trubec 4/3	3,2	Trubec 5/3	-6,3
Trubec 1/4	3,2	Trubec 2/4	15,9	Trubec 3/4	6,5	Trubec 4/4	9,8	Trubec 5/4	3,5
Trubec 1/5	6,6	Trubec 2/5	12,9	Trubec 3/5	5,1	Trubec 4/5	2,4	Trubec 5/5	6,5
Trubec 1/6	7,2	Trubec 2/6	7,7	Trubec 3/6	1,4	Trubec 4/6	5,7	Trubec 5/6	4,3
Trubec 1/7	1,6	Trubec 2/7	4,8	Trubec 3/7	2,1	Trubec 4/7	15,8	Trubec 5/7	8,6
Trubec 1/8	5,9	Trubec 2/8	2,2	Trubec 3/8	4,3	Trubec 4/8	1,4	Trubec 5/8	7,8
Trubec 1/9	3,1	Trubec 2/9	3,0	Trubec 3/9	5,1	Trubec 4/9	1,6	Trubec 5/9	4,8
Trubec 1/10	2,4	Trubec 2/10	5,7	Trubec 3/10	2,0	Trubec 4/10	12,5	Trubec 5/10	5,5
Trubec 1/11	5,3	Trubec 2/11	11,8	Trubec 3/11	9,0	Trubec 4/11	3,6	Trubec 5/11	9,3
Trubec 1/12	8,9	Trubec 2/12	73,5	Trubec 3/12	23,7	Trubec 4/12	3,5	Trubec 5/12	3,9

Legenda:

Matka T - DNA z těla matky

Matka S - DNA spermií ze semenného vaku matky

Trubci 1-6 - Larvy trubců odebraní z plodu

Trubci 7-12 - Dospělci trubců odchycení z úlu