

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Molekulární detekce vybraných
bodových mutací odpovědných za
rezistenci k pyrethroidům v genu
pro sodíkový kanál kleštíka včelího
(*Varroa destructor*)**

Diplomová práce

Bc. Kateřina Lahnerová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2019

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

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

V Olomouci dne 29. 4. 2019

SOUHRN

Tato diplomová práce je zaměřena na molekulární diagnostiku rezistence kleštíka včelího (*Varroa destructor*) k pyrethroidní látce *tau*-fluvalinátu. Molekuly *tau*-fluvalinátu se váží na sodíkové kanály v buňkách roztoče a způsobují jejich nevratné otevření, čímž dochází k trvalému transportu sodných iontů do buňky a narušení iontového gradientu. Rezistence parazita k této látce je způsobována bodovými mutacemi nukleotidů 1710 a 1712 v genu pro sodíkový kanál kleštíka včelího (*VmNa*), které vedou k aminokyselinovým substitucím na pozici 925 (číslováno dle *Vssc1 Musca domestica*) polyproteinového produktu genu. Molekula *tau*-fluvalinátu se není schopna na mutantní formu sodíkového kanálu vázat, nedochází tak k narušení transportu sodných iontů a roztoči po aplikaci látky přežívají.

Teoretická část diplomové práce je zaměřena na biologii kleštíka včelího na molekulární i obecné úrovni, popis mechanismů vzniku rezistence roztočů k akaricidním látkám používaným k jejich hubení, charakterizaci těchto látek a na výčet technik, které byly a jsou používány k určování rezistence kleštíka k *tau*-fluvalinátu.

Praktická část práce se zabývá návrhem a optimalizací diagnostické metody umožňující detekci bodových mutací nukleotidů 1710 a 1712 v genu pro sodíkový kanál, které stojí za vznikem rezistence kleštíka k *tau*-fluvalinátu. Pro detekci mutací je navržena tříprimerová alelicky specifická PCR amplifikace (3-PAS-PCR) využívající schopnosti diagnostických primerů detekovat přítomnost bodových mutací a charakterizovat je co do konkrétní nukleotidové varianty. 3-PAS-PCR umožňuje jednoduchou, plošnou, časově a finančně nenáročnou diagnostiku rezistence kleštíků k *tau*-fluvalinátu.

SUMMARY

This master thesis is focused on molecular diagnostics of resistance of *Varroa destructor* to the pyrethroid substance *tau*-fluvalinate. *Tau*-fluvalinate molecules bind to sodium channel in mite's cells and lead to its permanent opening. That causes non-interrupted influx of sodium ions into cells and ion gradient disruption. *Varroa* resistance is caused by point mutations at nucleotide positions 1710 and 1712 in sodium channel gene (*VmNa*), which lead to amino acid substitutions at position 925 (according to *Vssc1 Musca domestica* numbering) of polyprotein product of this gene. *Tau*-fluvalinate molecules are not able to bind at mutant form of sodium channels, so sodium ions transport is not disrupted and mites survive *tau*-fluvalinate treatment.

Theoretical part of this thesis targets on *Varroa* mite biology on molecular and general level, then on acaricides resistance mechanisms and on characterization of techniques which have been used to determine *Varroa* resistance to *tau*-fluvalinate.

Practical part deals with design and optimization of diagnostic method which enables detection of point mutations at positions 1710 and 1712 in sodium channel gene which lead to *Varroa* mite resistance to *tau*-fluvalinate. Mutations detection is implemented by three-primed allele specific PCR reactions (3-PAS-PCR) in which diagnostic primers are used to detect presence of these mutations and to characterize their nucleotide variants. 3-PAS-PCR enables simple, areal detection and time and financially undemanding diagnosis of *Varroa* mite resistance to *tau*-fluvalinate.

PODĚKOVÁNÍ

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

Dále bych ráda poděkovala doktoru Františku Kašparovi za poskytnutí samic rezistentních kleštíků včelích (*Varroa destructor*) homozygotního genotypu 925V, doktoru Joelu González-Cabrerovi za poskytnutí cDNA (ve formě PCR produktů) samic vnímavých kleštíků homozygotního genotypu 925L a cDNA samic rezistentních kleštíků homozygotních genotypů 925V, 925M a 925I. V neposlední řadě pak doktorce Anastasii Tsagkarakou z výzkumného týmu doktora Eleftheriose Allisandrakise za poskytnutí genomické DNA samic rezistentních kleštíků homozygotního genotypu 925I a kleštíků heterozygotního genotypu 925I/L.

OBSAH

1	Úvod	1
2	Cíle práce	2
3	Literární přehled	3
3.1	Kleštík včelí a jeho zařazení do systému.....	3
3.1.1	Struktura genomu kleštíka včelího	4
3.1.2	Rozmnožování kleštíka včelího.....	5
3.2	Chemické varroacidní (akaricidní) přípravky	6
3.3	Molekulární aspekty rezistence roztočů k akaricidům	9
3.3.1	Gen pro sodíkový kanál kleštíka včelího (<i>VmNa</i> gen)	11
3.3.2	Sodíkový kanál kleštíka včelího (<i>VmNa</i>)	12
3.3.3	Vazba varroacidů na sodíkový kanál.....	13
3.3.4	Mutace asociované s rezistencí k varroacidům	14
3.3.5	Techniky navržené k detekci mutací způsobujících rezistenci kleštíka včelího k pyrethroidům.....	16
4	Materiál a metody	18
4.1	Biologický materiál	18
4.2	Izolace genomické DNA kleštíka včelího	19
4.3	Vzorky DNA kleštíka včelího ze zahraničí	20
4.4	PCR amplifikace genomické DNA kleštíka včelího	21
4.5	Zpracování PCR produktů pomocí elektroforetické separace.....	22
4.6	Ověření přítomnosti mutace pomocí certifikované metodiky	22
4.7	Sekvenace vybraných vzorků vyizolované genomické DNA kleštíka.....	23
4.7.1	Izolace PCR produktů z gelu	23
4.7.2	Sekvenace	24
4.8	Použité programy.....	24
4.9	Použité chemikálie.....	25
4.10	Použité roztoky	25
4.11	Použité soupravy	26
4.12	Použité laboratorní přístroje	26

5	Výsledky	28
5.1	Izolace genomické DNA kleštíka včelího	28
5.2	Roztřídění vzorků DNA podle přítomnosti či absence bodové mutace pomocí restrikčního štěpení.....	29
5.3	Návrh okrajových a diagnostických primerů.....	30
5.4	Optimalizace podmínek PCR reakce, testování úspěšnosti amplifikace DNA okrajovými a diagnostickými primery, výběr nejvhodnějších primerů.....	32
5.5	Tříprimerová PCR amplifikace	38
5.5.1	Diagnostika rezistence kleštíka včelího k <i>tau</i> -fluvalinátu pomocí tříprimerové PCR amplifikace.....	40
5.5.2	Reakční podmínky tříprimerové PCR amplifikace	43
5.5.3	Detekce rezistence kleštíka včelího k <i>tau</i> -fluvalinátu pomocí tříprimerové PCR amplifikace na vzorcích DNA z ČR	44
5.6	Sekvenace vybraných vzorků vyzolované DNA pro potvrzení spolehlivosti diagnostické metody	45
5.7	Tříprimerová alelicky specifická PCR diagnostická metoda (3-PAS PCR) k určování rezistence kleštíka včelího k <i>tau</i> -fluvalinátu	46
6	Diskuze	50
6.1	Izolace genomické DNA kleštíka včelího	50
6.2	Roztřídění vzorků DNA podle přítomnosti či absence bodové mutace, restrikční štěpení.....	51
6.3	Návrh okrajových a diagnostických primerů.....	52
6.4	Tříprimerová PCR amplifikace	54
6.5	Diagnostika rezistence kleštíka včelího k <i>tau</i> -fluvalinátu pomocí tříprimerové PCR amplifikace.....	55
6.5.1	Rezistence k <i>tau</i> -fluvalinátu u jedinců s mutací v homozygotní formě	56
6.5.2	Rozsah intenzity rezistence kleštíků na odběrových stanovištích v ČR....	57
7	Závěr	60
8	Použitá literatura	61

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

3-PAS-PCR	tříprimerová alelicky specifická polymerázová řetězová reakce (<i>three primered allele specific polymerase chain reaction</i>)
ABPV	virus akutní paralýzy včel (<i>acute bee paralysis virus</i>)
ADAR	skupina enzymů katalyzujících adenosin-inosinovou editaci RNA (<i>adenosine deaminase on RNA</i>)
AchE	acetylcholinesteráza
Cds	kódující sekvence (<i>coding sequence</i>)
CpG	CpG dinukleotidy (cytosin-fosfát-guanin) akumulované v různých částech genomu
DDT	dichlordifenyltrichlorethan
DWV	virus deformovaných křídel (<i>deformed wing virus</i>)
EC ₅₀	koncentrace látky, která způsobí určitý efekt u 50 % testovaných organismů dané populace za definovaných podmínek, veličina statisticky odvozená (<i>median effective concentration</i>)
GABA	gama-aminomáselná kyselina (<i>gamma-aminobutyric acid</i>)
GLFLN 1	napětově řízený sodíkový kanál olihně
IAPV	izraelský virus akutní paralýzy (<i>Israeli acute paralysis virus</i>)
KBV	kašmírský včelí virus (<i>Kashmir bee virus</i>)
kdr	rezistence k insekticidům obsahujícím dichlordifenyltrichlorethan a pyrethroidy, vznikající v důsledku bodových mutací (<i>knockdown resistance</i>)
LD ₅₀	dávka látky, která je smrtelná pro 50 % testovaných organismů (<i>lethal dose 50 %</i>)

LINE	douhé rozptýlené jaderné elementy (<i>long interspersed nuclear elements</i>)
LTR	dlouhé koncové repetice (<i>long terminal repeats</i>)
PCR-SSCP	polymerázové řetězové reakce (<i>polymerase chain reaction</i>) s následným jednovláknovým konformačním polymorfismem (<i>single stranded conformation polymorphism</i>)
Rdl	typ GABA receptoru (podle <i>dieldrin-resistant mutant Drosophila line</i>)
VGSC	napětově řízený sodíkový kanál (<i>voltage-gated sodium channel</i>)
VmNa	gen pro sodíkový kanál kleštíka včelího (<i>Varroa mite sodium channel</i>)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Chemická struktura akaricidních sloučenin obsažených v syntetických varroacidech.....	7
Obrázek 2: Princip nasedání 3'-konce diagnostických primerů CGR a GGR na nukleotidovou pozici 1710 v templátové DNA.	32
Obrázek 3: Část <i>VmNa</i> genu kleštíka včelího s vyznačenými introny, exony, pozicí nasedání okrajových a diagnostických primerů určujících substituce aminokyseliny 925.	35
Obrázek 4: Princip PCR amplifikace DNA pomocí PCR reakční směsi obsahující tři primery.	359, 40
Obrázek 5: Diagnostická tříprimerová amplifikace 2 typů DNA molekul kleštíka včelího zachycených na území České republiky.....	41
Obrázek 6: Vzorek DNA (<i>wild-type</i> DNA) podrobený amplifikaci pomocí tříprimerových PCR reakčních směsí obsahujících diagnostický primer CGR, GGR, AAR nebo G_F v kombinaci s okrajovými primery Fo1 + Ro1.....	42
Obrázek 7: Porovnání intenzity vizualizovaných PCR produktů amplifikace vzorku <i>wild-type</i> DNA kleštíka včelího pomocí okrajových primerů Fo1 + Ro1 (A) a dalších autorů...	53

SEZNAM SCHÉMAT

Schéma 1: Základní teplotní a časový profil PCR reakce.....	22
Schéma 2: Teplotní a časový profil průběhu sekvenačního značení PCR produktů.	24
Schéma A: Hodnocení rizika rezistence kleštíka včelího k <i>tau</i> -fluvalinátu na základě přítomnosti mutantní alely analýzou DNA z jednoho nebo z více kleštíků.	46
Schéma B: Určení genotypu a související vnímavosti či rezistence kleštíků včelích vůči <i>tau</i> -fluvalinátu u jedinců odebraných v ČR, Evropě nebo mimo území Evropy.	47
Schéma C: Složení PCR reakční směsi.	48
Schéma D: Teplotní a časový profil PCR reakce.....	48

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Seznam veterinárních léčivých přípravků pro včely obsahujících syntetické varroacidy, aktuálně registrovaných v České republice dle opatření Státní veterinární správy pro rok 2019.	8
Tabulka 2: Lokality sběru vzorků kleštíků určených pro molekulární detekci rezistence k <i>tau</i> -fluvalinátu, doplněné o počet odběrových stanovišť, rok sběru vzorků a způsob léčebného ošetření zdrojových včelstev.	19
Tabulka 3: Složení PCR reakční směsi pro amplifikaci 6 vzorků.....	21
Tabulka 4: Okrajové primery určené k amplifikaci segmentu <i>VmNa</i> genu kleštíka včelího, obsahujícího nukleotidové pozice 1710 a 1712.	30
Tabulka 5: Diagnostické primery navržené k určení nukleotidové varianty na pozicích 1710, 1712 anebo 1710 + 1712 <i>VmNa</i> genu kleštíka včelího.....	31
Tabulka 6: Diagnostické primery vhodné k detekci bodových mutací nukleotidů 1710 a 1712, amplifikující templátovou DNA spolu s uvedeným protisměrně orientovaným okrajovým primerem, tvořící PCR produkty o uvedených velikostech.....	31
Tabulka 7: Rozkreslení výsledku diagnostické amplifikace čtyř možných homozygotních (7a) a šesti heterozygotních (7b) variant DNA, lišících se v nukleotidech na pozicích 1710 a 1712 <i>VmNa</i> genu kleštíka včelího.	37, 38
Tabulka 8a: Hodnocení rezistence kleštíka včelího vůči <i>tau</i> -fluvalinátu <u>na území Evropy</u> na základě přítomnosti diagnostických PCR produktů vzniklých amplifikací jeho DNA.	48
Tabulka 8b: Hodnocení rezistence kleštíka včelího vůči <i>tau</i> -fluvalinátu <u>bez územního omezení</u> na základě přítomnosti diagnostických PCR produktů vzniklých amplifikací jeho DNA.....	49

1 Úvod

Varroacidní přípravky na bázi *tau*-fluvalinátu se váží na sodíkový kanál kleštíka včelího (*Varroa destructor*) v kapse formované segmenty S4, S5 a P-smyčkou domény DII, a dále segmentem 6 domény DIII polypeptidu sodíkového kanálu. Po jejich navázání setrvává pór sodíkového kanálu v otevřeném stavu, což vede k permanentnímu toku sodných iontů do buňky a disrupci membránového potenciálu mezi vnitřním a vnějším povrchem cytoplazmatické membrány. Bodové mutace nukleotidů 1710 a 1712 (GenBank Accession no. KC152655.2), způsobující aminokyselinové substituce na pozici 925 polypeptidového produktu genu pro sodíkový kanál, znemožňují navázání *tau*-fluvalinátu do výše zmíněné kapsy, a tudíž způsobují rezistenci roztoče k *tau*-fluvalinátu.

V této diplomové práci se budu zabývat detekcí bodových mutací na nukleotidových pozicích 1710 a 1712 genu pro sodíkový kanál, které stojí za vznikem rezistence kleštíka včelího (*Varroa destructor*) k *tau*-fluvalinátu, látce přítomné v některých varroacidních přípravcích. K detekci bodových mutací budu používat PCR amplifikaci zájmového segmentu genu, provedenou za pomoci specificky navržených diagnostických primerů. Cílem mé práce bude navrhnout a optimalizovat uspořádání PCR amplifikační reakce tak, aby ji bylo možné použít pro detekci přítomnosti či nepřítomnosti bodové mutace výše zmíněných nukleotidových pozic, a určit tak vnímavost kleštíků k *tau*-fluvalinátu. Tato metoda by měla být dostatečně robustní, jednoduchá, časově a finančně nenáročná a umožňovat plošnou diagnostiku rezistence kleštíků k *tau*-fluvalinátu v napadených včelstvech.

2 Cíle práce

1. Vypracování rešerše na téma diplomové práce.
2. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
3. PCR amplifikace DNA kleštíka včelího (*Varroa destructor*) za účelem detekce bodových mutací v genu pro sodíkový kanál, způsobujících rezistenci kleštíka k varroacidům na bázi *tau*-fluvalinátu. To zahrnuje:
 - a) Přípravu kleštíků včelích pro izolaci genomické DNA a její provedení.
 - b) Navržení diagnostických primerů pro detekci bodových mutací.
 - c) Optimalizaci podmínek a uspořádání PCR amplifikačních reakcí pro detekci bodových mutací.
 - d) Ověření přítomnosti bodových mutací restrikcí štěpením PCR produktů a sekvenací vybraných vzorků DNA.

3 Literární přehled

3.1 Kleštík včelí a jeho zařazení do systému

Kleštík včelí (*Varroa destructor*) (Anderson *et* Trueman, 2000) je ektoparazitický roztoč napadající včelu medonosnou (*Apis mellifera*). Ke svému rozmnožování využívá plodové buňky plástů, ve kterých se vyvíjejí nedospělé včely. Předpokládalo se, že všechna aktivně se krmící vývojová stadia kleštíka se vyživují sáním hemolymfy hostitele (Anderson *et* Trueman, 2000; Le Conte *et al.*, 2010). Výzkum posledních let však ukázal, že jako potravu využívají místo hemolymfy tukovou tkáň hostitele (Ramsey *et* vanEngelsdorp, 2016). Na území dnešní České republiky (tehdejšího Československa) byl kleštík včelí poprvé zachycen v roce 1978 (Pohl, 2008; Čermák *et al.*, 2016).

V rámci systematického zařazení náleží kleštík včelí do třídy pavoukovci (Arachnida), řádu roztoči (Acari) a skupiny parazitických roztočů v rámci čeledi kleštíkovití (Varroidae) (Anderson *et* Trueman, 2000; Anonymous1, 2018).

Tělo kleštíka je shora kryto kutikulárním štítem, který s narůstajícím stářím jedince přechází od světle hnědé po červenohnědou barvu. Čtyři páry kráčivých končetin pokryté drápky a přísavkami slouží kleštíkovi k zachycení se na včele, sám se však aktivně v rámci úlu nepohybuje, pokud k tomu není donucen (Čermák *et al.*, 2016). Chelicery a pedipalpy ve frontální části těla mají funkci čichového a hmatového orgánu (Veselý, 2003).

Samice jsou v porovnání se samci větší, dosahují šířky 1,5–1,9 mm a délky 1,1–1,5 mm. Samci mají tělo okrouhlejší, dosahují délky asi 0,8 mm (Veselý, 2003).

Kleštík způsobuje u včel onemocnění varroózu (kleštíkovitost), během které poškozují kutikulu hostitele a živí se tukovou tkání napadených jedinců. Při rozsáhlejším napadení dochází ke značnému snížení fitness celého včelstva (Rosenkranz *et al.*, 2010; van Dooremalen *et al.*, 2013). Včelstva hynou v průběhu 2–3 let po prvotní infestaci, pokud nedojde k včasnému léčebnému zásahu (Fries *et al.*, 2006). Kleštík je mimo jiné přenašečem řady bakteriálních (Hubert *et al.*, 2015) a virových onemocnění včel (Genersch *et* Aubert, 2010; Münstedt *et al.*, 2014; Wilfert *et al.*, 2016). Funguje jako přímý vektor při přenosu onemocnění akutní paralýzy včel (ABPV), kašmírského včelího viru (KBV), izraelského viru akutní paralýzy včel (IAPV) a viru deformovaných křídel (DWV) (Genersch *et* Aubert, 2010; Sammataro *et* Yoder, 2011). Do těla napadené včely

se infekční virové částice dostávají přes kutikulu narušenou při přísátí roztoče. Při napadení včelí larvy, vyvíjející se v plodové buňce, mají tyto napadení jedinci po dosažení dospělosti často pozměněnou tělní morfolonii a četné tělní deformace (týká se především DWV). Včely nakažené virovým onemocněním až během dospělosti (fekálně-orální cestou) nevykazují zpravidla žádné morfologické změny tělní stavby. Může u nich však docházet ke snížení schopnosti odolávat dalším onemocněním, krátkověkosti, změně chování a změně míry agresivity (Genersch *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2016).

3.1.1 Struktura genomu kleštíka včelího

K oddělení vývojové větve, do které spadá kleštík včelí, od vývojové větve nejbližších klíšťat, došlo před 336 ± 26 miliony lety (Jeyaparakash *et al.*, 2009). V porovnání s genomy ostatních roztočů a zmíněných klíšťat je genom kleštíka velikostně ani ne poloviční. Dosahuje celkové velikosti 565 ± 3 Mbp (normalizováno podle DNA *Drosophila virilis*) (Cornman *et al.*, 2010), genom klíštěte jeleního (*Ixodes scapularis*) má pro porovnání velikost 2100 Mbp (Hill *et al.*, 2005). V genomu kleštíka byly detekovány rozsáhlé oblasti tvořené LTR transpozóny (*long-terminal repeats*), LINEs (*long interspersed nuclear elements*), spolu s otáčivě se replikujícími helitrony a aktivně se přemísťujícími elementy, které všechny přispívají ke genomové evoluci (Cornman *et al.*, 2010; Gajić *et al.*, 2016).

Při studiu míry exprese genů byly odhaleny rozdíly mezi jedinci parazitujícími na původním hostiteli včele východní (*Apis cerana*) a mezi jedinci parazitujícími na evropské včele medonosné (*Apis mellifera*). Rozdíly v míře exprese byly detekovány u genů asociovaných s mitochondriální respirací, apoptózou, u genů regulujících reprodukci a oogenezi (Glady *et al.*, 2016). Jelikož se kleštík včelí dostal na území Evropy až v průběhu posledních přibližně 60 let, není jeho adaptace na nového hostitele zcela dokonalá a do jisté míry mu způsobuje stres. Tomu nasvědčuje i zvýšená exprese nově demetylovaných genů řídících mitochondriální respiraci a apoptózu (Gladys *et al.*, 2016). Nicméně i přes tato fakta je adaptace a evoluce populací kleštíka značně dynamická a efektivní, což potvrzuje rychle se šířící rezistence roztoče k varroacidům a jeho vysoce adaptivní koevoluce s virem způsobujícími onemocnění včel, a to jak na území Evropy, tak i mimo ni (Mondet *et al.*, 2014; Gladys *et al.*, 2016).

Znatelné rozdíly v míře metylace genů jsou patrné i v rámci jedné populace kleštíků, a to především u jedinců lišících se vnímavostí k varroacidům, látkám

používaným k jejich hubení. U rezistentních jedinců dochází k výrazné demethylaci DNA v oblasti CpG ostrovů (Strachecka *et al.*, 2015), což způsobuje aktivaci původně deaktivovaných genů. Demetylované geny vykazují vyšší mutagenní aktivitu ve srovnání s geny metylovanými (Xia *et al.*, 2012), a tudíž u nich stoupá riziko vzniku spontánních mutací. Změna v metylaci CpG ostrovů může být epigeneticky přenášena do potomstva (Holliday *et Grigg*, 1993; Ledón-Rettig *et al.*, 2012), kde je rychle fixována v důsledku inbredního rozmnožování kleštíků.

I přes sourozenecké páření, samce s haploidním genotypem a značně působící efekt hrdla lahve není u kleštika redukován genetický polymorfismus. Obecně se rozlišují dva základní haplotypy – haplotyp J (*Japanese*) parazitující na včele medonosné v Japonsku, Americe a na Thaiwanu, a haplotyp K (*Korean*), který je rozšířený celosvětově (Anderson *et Trueman*, 2000). Později byl popsán další sub-haplotyp v rámci haplotypu K (Navajas *et al.*, 2010; Gajić *et al.*, 2013) a heteroplazmická linie kleštika včelího (Gajić *et al.*, 2016). Variabilitu na úrovni genů lze u kleštika najít mezi populacemi jednotlivých úlů, kolonií, i v rámci větších geografických celků (Dynes *et al.*, 2016). K míšení populací kleštíků dochází přirozenou cestou prostřednictvím jejich přenosu na včelách zalétávajících do cizích úlů. Stále častěji jsou však včelstva uměle přesouvána z důvodu jejich umístění do oblastí bohatějších na potravu, případně jsou stěhována v důsledku obchodu se včelstvy, což umožňuje rychlejší a rozsáhlejší míšení geneticky diverzifikovaných populací kleštíků (Cornman *et al.*, 2010).

K analýze populační variability kleštíků je využíváno 10 neutrálních polymorfních mikrosatelitových lokusů z celkového počtu dvou desítek identifikovaných mikrosatelitových lokusů. Jedná se o lokusy vj272, vj292, vj294, vj295 (Evans, 2000), a lokusy VD001, VD112, VD114, VD119, VD126, VD163 (Solignac *et al.*, 2003). Analýzou těchto 10 lokusů bylo identifikováno 42 polymorfních alel, které se vyskytují v počtu 2 až 13 alel na jeden lokus (Dynes *et al.*, 2016). Autoři studie uvádějí pro těchto 10 lokusů celkovou hodnotu heterozygotnosti jako 0,09, typickou pro populace s vysokým procentem inbredního křížení, což odpovídá rozmnožovací situaci popsané u kleštika (Dynes *et al.*, 2016).

3.1.2 Rozmnožování kleštika včelího

Rozmnožovací strategií kleštika včelího je pseudo-arrhenotokie (De Jong *et al.*, 1982; Martin *et al.*, 1997). Spářené matky kladou vajíčka s diploidní sadou chromozomů

($2n = 14$), ze kterých se vyvíjejí samice, a haploidní vajíčka ($n = 7$), ze kterých se líhnou samci (Steiner *et al.*, 1982; De Ruijter *et Pappas*, 1983; Martin *et al.*, 1997). Ve vajíčkách, ze kterých se vyvíjejí samci, dochází krátce po splnutí pohlavních buněk k eliminaci paternální sady chromozomů (Sabelis *et Nagelkerke*, 1992; De La Filia *et al.*, 2015).

Oplozené samice kladou vajíčka do buněk včelího plodu před jeho zavíčkováním. Při dostatečném počtu zakladených plodových buněk lze najít v každé napadené buňce zpravidla jednu dospělou samici kleštíka (Fuchs *et Langenbach*, 1989). S desetinásobně vyšší frekvencí si samice kleštíka vybírají k napadení buňky larev déle se vyvíjejícího trubčího plodu (24 dní), dělníčí plod se vyvíjí pouze 21 dní (Martin *et Cook*, 1996). Vyšší efektivity rozmnožování je dále dosaženo naklazením pouze jednoho vajíčka, ze kterého se vyvíjí samec, z dalších 4–5 nakladených vajíček se vyvíjejí samice (De Ruijter *et Pappas*, 1983; Rehm *et Ritter*, 1989; Brown *et al.*, 2015). Embryonální vývoj roztoče začíná již ve vajíčku v těle matky (Ionescu-Varo *et Suci*, 1979; Rehm *et Ritter*, 1989), po naklazení vajíček jsou embrya multicekulární, v pokročilém stádiu diferenciaci (Rehm *et Ritter*, 1989). Vývoj kleštíka od nakladeného vajíčka po dosažení dospělosti trvá 6,2 dne u samice a 6,9 dne u samce. Po dovršení pohlavní dospělosti dochází ke spáření nově vylíhlé generace kleštíků v rámci jedné plodové buňky včel (sourozenecké páření) (Hamilton, 1967; Pohl, 2008). Spářené samice kleštíka unikají z plodové buňky po jejím otevření přichycené na líhnoucí se včele, samci v buňce hynou (Martin, 1994).

I při vysoké úrovni inbreedingu nedochází u kleštíků k inbreední depresi (Beaurepaire *et al.*, 2015; Dynes *et al.*, 2016). Heterozygotnost populace v úlu se zachovává především díky přenosu jedinců přichycených na včelách zalétlých ze sousedních včelstev (Frey *et Rosenkranz*, 2014; Forfert *et al.*, 2015), a dále díky nesourozeneckému páření kleštíků v plodových buňkách napadených více samicemi – matkami. Na konci vegetačního období totiž dochází ke snížení poměru počtu zakladených plodových buněk k počtu kleštíků, kteří je napadají, a tak musí být jedna plodová buňka napadena větším počtem dospělých samic (Beaurepaire *et al.*, 2017).

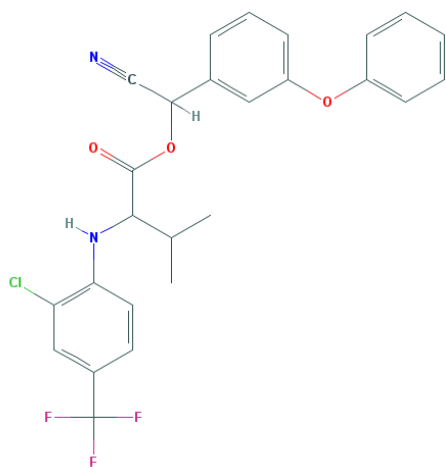
3.2 Chemické varroacidní (akaricidní) přípravky

Kontrola a redukce počtu kleštíků v napadeném včelstvu je nejčastěji prováděna za použití chemických látek s varroacidním účinkem (Watkins, 2011). Do nepočetné skupiny používaných varroacidních látek náleží pyrethroidy **tau-fluvalinát**, **flumethrin** a **acrinathrin**, a formamidinový derivát **amitraz** (Martin, 2004; Maggi *et al.*, 2011).

Strukturní vzorce jmenovaných sloučenin jsou uvedeny na obrázku 1a)–d). V tabulce 1 jsou uvedeny aktuálně registrované veterinární léčivé přípravky pro včely, které obsahují výše uvedené sloučeniny. K látkám s varroacidním účinkem jsou řazeny také organofosfátové sloučeniny (**coumaphos** a **malathion**), jejichž používání je však již ve světě zakázáno (Maggi *et al.*, 2011).

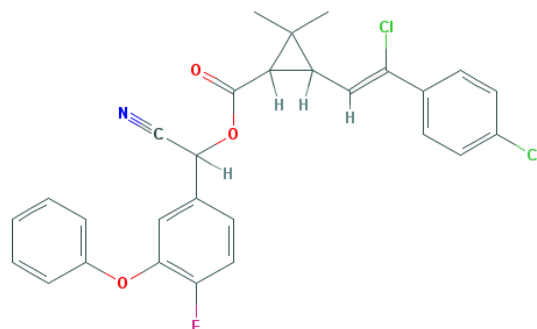
Obrázek 1: Chemická struktura akaricidních sloučenin obsažených v syntetických varroacidech.

a) Tau-fluvalinát



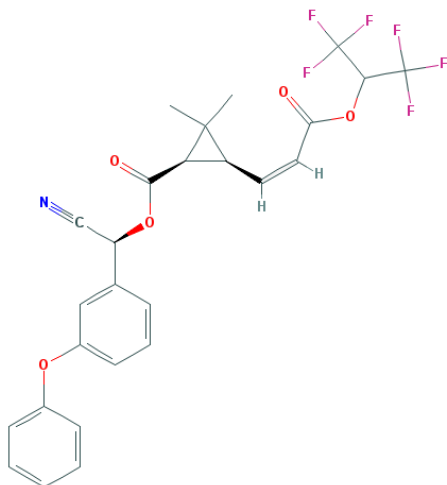
Anonymous2 (2018)

b) Flumethrin



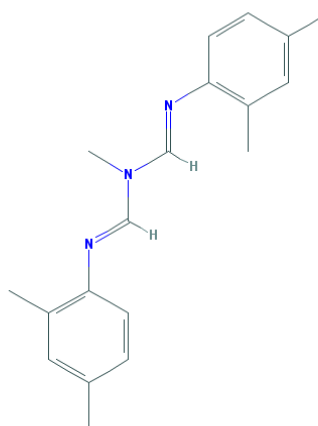
Anonymous3 (2018)

c) Acrinathrin



Anonymous4 (2018)

d) Amitraz



Anonymous5 (2018)

Tabulka 1: Seznam veterinárních léčivých přípravků pro včely obsahujících syntetické varroacidy, aktuálně registrovaných v České republice dle opatření Státní veterinární správy pro rok 2019 (převzato a upraveno z Hubert *et al.*, 2017; Anonymous6, 2018; Anonymous9, 2019).

Přípravek	Účinná látka	Obsah účinné látky	Forma aplikace
Apitraz	Amitraz	500 mg/proužek	Kontaktní proužek
Apivar	Amitraz	500 mg/proužek	Kontaktní proužek
Gabon PF	<i>Tau</i> -fluvalinát	90 mg/proužek	Kontaktní proužek
M-1 AER	<i>Tau</i> -fluvalinát	240 mg/ml	Koncentrát pro roztok k léčebnému ošetření včel
MP 10 FUM	<i>Tau</i> -fluvalinát	24 mg/ml	Fumigační roztok
PolyVar Yellow	Flumethrin	275 mg/proužek	Kontaktní proužek
Varidol	Amitraz	125 mg/ml	Fumigační roztok

V průběhu posledních třiceti let účinnost varroacidních látek rapidně klesla v důsledku vyselektování početných rezistentních populací klesťků, a to na území Evropy (Milani, 1995; Spreafico *et al.*, 2001; Thompson *et al.*, 2003), Severní Ameriky (Elzen *et al.*, 2000; Rodriguez-Dehaibes *et al.*, 2005), Jižní Ameriky (Maggi *et al.*, 2011) a jihozápadní Asie (Farjamfar *et al.*, 2018).

V rámci skupiny pyrethroidních varroacidů *tau*-fluvalinátu, flumethrinu a acrinathrinu, které svým účinkem cílí na sodíkový kanál, byla prokázána křížová rezistence (Soderlund, 2008). Jedná se o typ rezistence vznikající u skupiny látek se stejným mechanismem účinku (blokace sodíkového kanálu). Na odlišném principu je založena takzvaná mnohonásobná rezistence mezi pyrethroidem *tau*-fluvalinátem a derivátem formamidinu amitrazem, patřícími do různých strukturních skupin varroacidů, které se v buňce navazují na odlišná receptorová místa a mají různý mechanismus účinku. Amitraz na rozdíl od výše uvedených pyrethroidů cílí na oktopaminový receptor, jehož aktivitu blokuje (Elzen *et al.*, 2000; Casida *et al.*, 2013). Ke vzniku mnohonásobné rezistence dochází nejčastěji v důsledku vzniku mutací v genech pro detoxikační enzymy, přičemž dochází k zvýšení efektivity metabolizace strukturně odlišných látek (Sammataro *et al.*, 2005; Hubert *et al.*, 2017). Mnohonásobná

rezistence byla zaznamenána také mezi v dnešní době již zakázanými organofosfáty (coumaphosem a malathionem) a pyrethroidy *tau*-fluvalinátem a cypemethrinem (Kanga *et al.*, 2010).

Rezistence k pyrethroidům je dána mutantní alelou vyskytující se v DNA v homozygotní formě (Davies *et al.*, 2007). Bylo potvrzeno, že po aplikaci pyrethroidu dochází v populaci kleštíků k nárůstu počtu jedinců s homozygotním genotypem pro mutantní alelu udílející rezistenci. V nepřítomnosti varroacidu jsou pak rezistentní homozygotní jedinci rychle eliminováni ve prospěch vnímavých jedinců (homozygotních pro *wild-type* alelu nebo heterozygotních) (González-Cabrera *et al.*, 2013, 2016 a 2018). Rezistentní jedinci mají totiž v nepřítomnosti varroacidu významně nižší fitness, než jedinci vnímaví (Kliot *et Ghanim*, 2012). Podíl heterozygotních jedinců je obecně nízký, což je v korelaci se způsobem dědičnosti vlastností v rámci haplo-diploidního kódování pohlaví kleštíka, a také s dědičností a projevem *knockdown* a *super-knockdown resistance* mutací, které způsobují rezistenci kleštíka k varroacidům (Solignac *et al.*, 2005; Davies *et al.*, 2007).

3.3 Molekulární aspekty rezistence roztočů k akaricidům

Sekvence genomu modelového organismu pro studium roztočů svilušky chmelové (*Tetranychus urticae*) ukázala, že k akaricidové rezistenci dochází v důsledku diverzifikace a nárůstu počtu genů pro detoxikační enzymy, nebo kvůli necitlivosti vazebného místa enzymu či buněčného receptoru k vázající se molekule. Rezistence roztočů pak může být zapříčiněna jak mutacemi v DNA jaderné, tak v DNA organelové (především mitochondriální), která vykazuje maternální dědičnost (Van Leeuwen *et al.*, 2008; Van Leeuwen *et Dermauw*, 2016).

Mutace v mitochondriálních genech ovlivňují diverzifikaci a funkční aktivitu detoxikačních enzymů. Jedná se především o geny pro cytochrom P450 monooxygenázy, karboxyl/cholinesterázy, glutathion-S-transferázy a ATP-vazebné kazetové transportéry (Smisaert, 1964; Grbić *et al.*, 2011; French-Constant, 2013; Feyereisen *et al.*, 2015). U kleštíků rezistentních k *tau*-fluvalinátu jsou detoxikační enzymy aktivnější, například monooxygenázy v rámci detoxikačního systému cytochromu P450 (Watkins, 1997).

Pravděpodobně nejvýznamnějším typem mutací navozujícím rezistenci roztočů k akaricidům jsou takzvané *kdr* nebo *super-kdr* mutace (*knockdown resistance*), které

způsobují snížení citlivosti nervového systému k působící látce v důsledku přítomnosti bodových mutací v genech pro buněčné receptory (Wang *et al.*, 2002). Tento způsob rezistence roztočů byl odhalen studiem rezistence *T. urticae* k organofosfátům, které se váží na acetylcholinesterázu (AChE) (Smisjaert, 1964). Stejný princip rezistence byl dále potvrzen u napětově řízeného sodíkového kanálu (VGSC) vázajícího pyrethroidy, DDT a dicofol, a u GABA-chloridových kanálů vázících organochloriny a fenylpyrazol (ffrench-Constant, 2013).

Mutace genu pro VGSC, způsobující pyrethroidovou rezistenci, byly detekovány u řady roztočů a jim blízkých příbuzných živočichů. Kromě svlušky chmelové (*T. urticae*), svlušky bramborové (*T. evansi*) a svlušky ovocné (*Panonychus citri*), byly mutace ve VGSC genu způsobující pyrethroidovou rezistenci nalezeny i u zákožky svrabové (*Sarcoptes scabiei*) a kleštíka včelího (*Varroa destructor*) (Feyereisen *et al.*, 2015). Tyto bodové mutace se však co do pozice výskytu neshodují s žádnou ze dvou nejčastěji detekovaných mutací typických pro ostatní členovce, kterými jsou bodové mutace způsobující substituci aminokyseliny L1014F v doméně DII smyčky L5–6 (*kdr*) a substituci aminokyseliny M918T (*super-kdr*) (Nyoni *et al.*, 2011). U členovců byly kromě těchto dvou substitucí dále identifikovány substituce M918I/L/V, T929C/I/N/V, L923F, G933V, I936V (Dong *et al.*, 2014).

Mutace navozující rezistenci roztočů k syntetickým pyrethroidům jsou převážně druhově specifické. Způsobují aminokyselinové substituce F1638I (*T. urticae*), G1535D (*T. scabies*) a F1528L (*V. destructor*) v doméně DIII smyčky L6 a substituci L1024V (*T. urticae*) v doméně DII smyčky L6 (Wang *et al.*, 2002; Pasay *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009; Tsagkarakou *et al.*, 2009). Substituce L925V v doméně DII smyčky L6 sodíkového kanálu VGSC je asociována s rezistencí kleštíka včelího k *tau*-fluvalinátu (González-Cabrera *et al.*, 2013; Hubert *et al.*, 2013).

Oproti množství druhově specifických, rezistenci navozujících mutací v genech pro sodíkový kanál a acetylcholinesterázu je známo pouze několik mutací v genu pro GABA receptory, které váží cyklodieny a fenylpyrazoly (ffrench-Constant *et al.*, 1998; ffrench-Constant, 2013). S nejvyšší frekvencí se vyskytuje substituce A301S, která nemění pouze vazebné místo receptoru Rdl (podle *dieldrin-resistant mutant Drosophila line*), ale také destabilizuje konformaci receptoru a tím neumožňuje navázání insekticidu (Zhang *et al.*, 1994). U roztočů se nachází několik homologních genů pro Rdl receptor, přičemž k navození rezistence k cyklodienům a fenylpyrazolům musí dojít současně

k mutaci všech sekvenčně homologních genů pro Rdl (Zhang *et al.*, 1994; Dermauw *et al.*, 2012). Mutace T6M v GABA-aktivovaném Rdl receptoru kleštíka včelího způsobuje změnu efektu působení thymolu, látky s varroacidními účinky. Thymol při vazbě na *wild-type* formu receptoru snižuje hodnotu GABA EC₅₀, zatímco při vazbě na mutantní T6M formu receptoru působí thymol jako inhibitor receptoru (Prince *et Lummis*, 2014).

Na rezistenci kleštíků k pyrethroidům má mimo jiné také vliv množství přítomných povrchových kutikulárních proteinů a aktivita povrchových proteáz, které se podílejí na metabolizaci xenobiotik (Strachecka *et al.*, 2013). Metabolizace *tau*-fluvalinátu je zprostředkována hydrolytickými reakcemi, následovanými oxidací a konjugací metabolitů s aminokyselinami glycinem, serinem, threoninem a valinem, a cholovou, taurocholovou a taurochendeoxycholovou kyselinou (Roberts *et Hutson*, 1999). Vzniklé konjugáty metabolizovaného *tau*-fluvalinátu místo varroacidního účinku naopak zpevňují kutikulu kleštíka, která se stává méně prostupnou pro množství sloučenin, včetně samotných akaricidů. Alternativně může být molekula *tau*-fluvalinátu (celý název: (RS)- α -kyano-3-fenoxybenzyl-*N*-(2-chloro- α,α,α -trifluoro-*p*-tolyl)-*D*-valinát) rozložena proteolytickým systémem za vzniku valinu, čímž přestává být pro roztoče toxická (Roberts *et Hutson*, 1999; Strachecka *et al.*, 2013). U kleštíků rezistentních k *tau*-fluvalinátu byla detekována zvýšená aktivita povrchových proteáz podílejících se na rozkladu varroacidů a v souladu s tímto faktem i snížené množství povrchových (Strachecka *et al.*, 2013).

3.3.1 Gen pro sodíkový kanál kleštíka včelího (*VmNa* gen)

Kódující DNA sekvence genu pro sodíkový kanál kleštíka včelího (*VmNa*) (GenBank Assesion no. AY259834) dává vzniknout cDNA o délce 6645 bp, otevřený čtecí rámec kóduje 2215 aminokyselin. Výsledný proteinový produkt má přibližnou relativní molekulovou hmotnost 248 kDa (Wang *et al.*, 2003; Anonymous11, 2019). Polypeptid *VmNa* genu je organizovaný do čtyř homologních domén (DI–DIV) upínajících se k cytoplazmatické membráně. Každá doména je tvořena šesti transmembránovými segmenty (S1–S6) (O'Reilly *et al.*, 2006).

V rámci sekvence *VmNa* genu byly identifikovány čtyři možné exony (dle splicingových variant) a jeden intron. Tři ze čtyř splicingových variant jsou charakteristické pouze pro *VmNa* gen, čtvrtá varianta (exon 3) má evolučně konzervované homology i v dalších vývojových liniích. Těmi jsou geny pro sodíkový kanál některých

hmyzích zástupců a sodíkový kanál Na_v1.6 (Scn8a) obratlovců (Plummer *et al.*, 1997; Tan *et al.*, 2002).

Unikátní exon 1 kódující DIIS2–S3 (DII doména, S2–S3 segmenty) se liší ve dvou aminokyselinách od *para* genu pro sodíkový kanál, izolovaného z *Drosophila virilis* (Thackeray *et Ganetzky*, 1995), který kóduje DIIS4–S5. Unikátní exon 2 kóduje oblast druhého intracelulárního linkeru v blízkosti DIIS6, kde se nachází potenciální místo pro proteinkinázu C. Fosforylace aminokyselin v oblasti linkeru může modulovat aktivitu kanálu tak, jako je tomu u savčích sodíkových kanálů (Catterall, 2000). Třetí unikátní exon 4 obsahuje stop kodon. Pokud je tedy splicingem upřednostněn exon 4, je finální proteinový produkt *VmNa* na C'-konci o 45 aminokyselin kratší. Zkrácení polyproteinu na C'-konci významně moduluje aktivitu sodíkového kanálu a hraje kritickou roli v jeho funkčnosti (Mantegazza *et al.*, 2001).

Funkční diverzita sodíkového kanálu je kromě alternativního splicingu zajišťována RNA editací. Pozorována byla u *D. melanogaster* (editace *DmNa_v* genu sodíkového kanálu) a u kleštíka včelího je předpokládána (Hanrahan *et al.*, 2000; Rieder *et al.*, 2013). Nejčastěji se vyskytujícím typem editace genomu je editace adenosininosinová, katalyzovaná enzymy skupiny ADAR (*Adenosine Deaminase on RNA*) (Bass, 2001; Nishikura, 2010). Enzymy ADAR váží dvouvláknovou molekulu RNA a katalyzují deaminaci adenosinu na inosin, který je při translaci rozeznáván jako guanosin (Nishikura, 2010; Rieder *et al.*, 2013).

3.3.2 Sodíkový kanál kleštíka včelího (*VmNa*)

Základní struktura a organizace *VmNa* kanálu (někdy také označení *VdNa_v*) je totožná se strukturou napětově řízených sodíkových kanálů členovců (Arthropoda) i savců (Mammalia). Konzervovaná je struktura transmembránového segmentu S4, dále intracelulárního linkeru (L3) mezi DIII–DIV, a také výskyt strukturního motivu DEKA (aminokyseliny aspartát, glutamát, lysin a alanin) (Catterall, 2000; Wang *et al.*, 2003).

Transmembránový segment S4 obsahuje 4–8 pozitivně nabitých aminokyselin nacházejících se na každé třetí pozici polypeptidu, a to u všech doposud známých sodíkových kanálů. Má funkci napětového senzoru iniciujícího napětím řízenou aktivaci kanálu. Intracelulární linker (L3) mezi doménami DIII–DIV slouží k rychlé inaktivaci kanálu (Catterall, 2000). Ve struktuře všech známých sodíkových kanálů lze najít aminokyselinový motiv DEKA. Tvoří jej aminokyseliny aspartát, glutamát, lysin

a alanin. Tento motiv se nachází v krátkém segmentu spojujícím segmenty S5 a S6 domény DI–DIV, které formují vysoce selektivní kanálový pór propouštějící pouze Na⁺ ionty (Catterall, 2000). Domény DI, DII, DIII a DIV se při formování póru sodíkového kanálu uspořádávají postupně (ve směru hodinových ručiček) (O'Reilly *et al.*, 2006).

Regulace aktivity *VmNa* kanálu probíhá prostřednictvím fosforylace. Byla identifikována čtyři potenciální místa pro fosforylaci cAMP-dependentní proteinkinázy (PKA). Tři z nich (na pozicích Ser-623, Ser-637 a Ser-722) jsou v místě prvního cytoplazmatického linkeru, poslední pak v druhém cytoplazmatickém linkeru. Ve struktuře se nachází 12 potenciálních N⁺-koncových glykosylačních míst (Wang *et al.*, 2003). Aktivace i inaktivace kanálu je velmi rychlá, k poloviční maximální aktivaci dochází při –18 mV a k poloviční maximální inaktivaci při –29 mV (Du *et al.*, 2009a). Gosselin-Badaroudine *et Chahine* (2017) nově uvádějí vyšší hodnotu pro napěťovou aktivaci kanálu rovnající se ($-9,9 \pm 1,1$) mV, pro jeho inaktivaci pak hodnotu ($-28,2 \pm 0,5$) mV.

Aminokyselinové složení vazebné domény VGSC roztočů a ostatních členovců se vzájemně liší. Tato vzájemná diferenciací umožňuje vývoj selektivních akaricidů působících pouze na ektoparazitické roztoče, bez destruktivního vlivu na hostitele, jako je tomu v případě varroacidů cílících na kleštika včelího, parazita včely medonosné (O'Reilly *et al.*, 2014).

3.3.3 Vazba varroacidů na sodíkový kanál

Pyrethroidní látky ovlivňují funkci sodíkového kanálu živočichů. Váží se na otevřený kanál, prodlužují jeho aktivaci a zabraňují inaktivaci, což vede k nárůstu doby, po kterou má transportovat příslušné ionty. Dochází k narušení koncentračního gradientu sodných i jiných iontů na extracelulární a intracelulární straně buněčné membrány, následované zamezením přenosu nervových vzruchů (Narahashi, 2000; Soderlund, 2012; Silver *et al.*, 2014; O'Leary *et Chahine*, 2018).

Pyrethroidy se u roztočů i hmyzu váží na sodíkový kanál v kapse formované helikálním linkerem spojujícím DIIS4–S5, helixy DIIS5 a DIIS6, a DIIP smyčkou. Menší molekula DDT se oproti tomu váže pouze mezi helixy DIIS5 a DIIS6, nedostává se do kontaktu s linkerem propojujícím DIIS4–S5 (Usherwood *et al.*, 2007; Du *et al.*, 2009b). Oblast kapsy má hydrofobní charakter stejně jako membrána buňky, tudíž je vazba molekuly pyrethroidu na kanál značně nespecifická (O'Reilly *et al.*, 2014). Druhé

potenciální místo vazby pyrethroidů na sodíkový kanál je formováno helikálním linkerem domény DI, DIS5 a DIIS6, analogickým k výše uvedené kapse (DIIS4–S5, helixy DIIS5 a DIIS6, DIIP smyčka) (O'Reilly *et al.*, 2006; O'Leary *et Chahine*, 2018). Obě zmíněná místa vázající pyrethroidy jsou vzájemně osově symetrická.

Při porovnání aminokyselinového složení a prostorové struktury vazebných míst sodíkového kanálu u hmyzu a u roztočů lze najít signifikantní rozdíly, které zásadně ovlivňují účinnost vázání se většiny akaricidů (O'Reilly *et al.*, 2014). U roztočů se ve střední části helixu DIIS5 nachází na aminokyselinové pozici 933 (dle číslování Vssc1 proteinu sodíkového kanálu *Musca domestica*) aminokyseliny glycin, alanin nebo valin, zatímco u hmyzu se na této pozici nachází cystein. Relativně velké molekuly *tau*-fluvalinátu a flumethrinu se snadněji navazují na sodíkový kanál roztočů. Vazba na analogické místo hmyzího sodíkového kanálu, kde se vyskytují postranní funkční skupiny cysteinu, je problematictější (Dong *et al.*, 2014; O'Reilly *et al.*, 2014). Proto by měly molekuly *tau*-fluvalinátu a flumethrinu vykazovat vyšší afinitu vazby na sodíkový kanál roztočů. Gosselin-Badaroudine *et Chahine* (2017) však na základě svých pozorování uvádějí, že vyšší afinitu a citlivost k ošetření *tau*-fluvalinátem má sodíkový kanál včel. V rámci studie prováděné na napěťově řízeném sodíkovém kanálu VdNa_v1 kleštika včelího a AmNa_v1 včely medonosné uvádějí následující hodnoty EC₅₀ (*median effective concentration*). Pro VdNa_v1 kleštika při působení *tau*-fluvalinátu o koncentraci 10 μmol·dm⁻³ je EC₅₀ = (160 ± 50) nmol/l a pro AmNa_v1 včely je EC₅₀ = (60 ± 20) nmol/l (Gosselin-Badaroudine *et Chahine*, 2017). Hodnota LD₅₀ (LD₅₀ = *lethal dose 50 %*) *tau*-fluvalinátu je podle dalších autorů asi o 14 % nižší u kleštika, tudíž indikuje vyšší akutní toxicitu působení na parazita (Santiago, 2000).

3.3.4 Mutace asociované s rezistencí k varroacidům

Doposud identifikované bodové mutace asociované s rezistencí kleštika včelího k *tau*-fluvalinátu byly nalezeny v doméně DIIS4–S6 (Wang *et al.*, 2002; González-Cabrera *et al.*, 2013). Zapříčiňují aminokyselinovou substituci na pozici 925 vznikajícího polypeptidu (číslováno dle *Musca domestica* Vssc1 proteinu). Tato substituce je klíčová pro vznik rezistence kleštika k syntetickým pyrethroidům.

Aminokyselinové pozici 925 odpovídá v alternativním, dříve používaném číslování aminokyselinová pozice 1002 (GenBank Accession no. AY259834, cDNA) (González-Cabrera *et al.*, 2013; Hubert *et al.*, 2013). V textu bude dále pro označení

pozice aminokyselinových substitucí způsobujících rezistenci kleštíka k *tau*-fluvalinátu používáno dnes upřednostňované číselné označení 925.

První identifikovanou aminokyselinovou substitucí způsobující rezistenci kleštíka k *tau*-fluvalinátu byla substituce L925V (González-Cabrera *et al.*, 2013). Později byly identifikovány také substituce aminokyselin L925M a L925I (González-Cabrera *et al.*, 2016). Výše zmíněné aminokyselinové substituce jsou způsobeny bodovými mutacemi nukleotidů na pozicích 1710 a 1712 (GenBank Accession no. KC152655.2, parciální cds). V alternativním číslování dle sekvence AY259834 (cDNA) odpovídají těmto nukleotidovým pozicím pozice 3004 a 3006 (Hubert *et al.*, 2013; González-Cabrera *et al.*, 2016). V textu bude dále pro označení uvedených nukleotidových pozic postihovaných těmito bodovými mutacemi používáno upřednostňované novější číslování pozic 1710 a 1712 (GenBank Accession no. KC152655.2) (Hubert *et al.*, 2013).

Aminokyselinovou substitucí L925V způsobuje bodová mutace nukleotidu C(1710)→G, byla objevena u populací kleštíků v centrální a jihovýchodní Anglii (González-Cabrera *et al.*, 2013) a v České republice (Hubert *et al.*, 2013). Aminokyselinovou substitucí L925M způsobuje bodová mutace nukleotidu C(1710)→A, a poslední aminokyselinovou substitucí L925I dvě současné mutace C(1710)→A a G(1712)→A. Klešticí postižení těmito dvěma substitucemi byli nalezeni na jihovýchodě Severní Ameriky (González-Cabrera *et al.*, 2016). Aminokyselinová substituce L925I byla identifikována také v Řecku, jedná se o první výskyt této substituce na území Evropy (Alissandrakis *et al.*, 2017).

Kromě mutací vedoucích k substitucím na aminokyselinové pozici 925 byly u kleštíka včelího nalezeny i další bodové mutace snižující senzitivitu sodíkového kanálu k pyrethroidům, které však samy o sobě nezpůsobují vznik rezistence. Tyto mutace vedou k aminokyselinovým substitucím L826P v linkeru spojujícím DIIS6–DIVS1, dále pak substituci F758L v DIIS6 a substituci I928V v DIVS5 (Wang *et al.*, 2002). Aminokyselinovou substitucí F758L lze najít ve všech doposud známých sekvencích sodíkových kanálů živočichů. Aminokyselinová substituce I928V nebyla nalezena pouze v sekvenci proteinu GLFLN1 sodíkového kanálu olihně (Wang *et al.*, 2002; González-Cabrera *et al.*, 2013, 2016).

Role některých mutací při vzniku rezistence k syntetickým pyrethroidům byla postupně vyvrácena. Tyto mutace souvisejí pouze s vnitrodruhovou variabilitou a geografickou separací populací kleštíků. Vedou k aminokyselinovým substitucím

R1318G a M1823I v intracelulárním linkeru mezi DII–DIII, což je oblast sodíkového kanálu všeobecně vykazující vysokou variabilitu napříč druhy (González-Cabrera *et al.*, 2013).

3.3.5 Techniky navržené k detekci mutací způsobujících rezistenci kleštíka včelího k pyrethroidům

K detekci bodových mutací způsobujících rezistenci kleštíka včelího k pyrethroidům byla jako první používána tzv. lahvičková metoda (Milani, 2015). Stanovuje se při ní procentuální mortalita roztoče (LC₅₀, LC₉₀ a LC₉₅) vůči definované koncentraci varroacidu. Principiálně se jedná o jednoduchý test, jeho nevýhodou však je nutnost pracovat s živým biologickým materiálem (kleštíky). Výsledky testu jsou navíc významně ovlivněny podmínkami experimentu (například teplotou a vlhkostí), přičemž lze těžko přiřadit informaci o molekulárním základu rezistence.

Pozici mutací způsobujících rezistenci k pyrethroidům lze určit sekvenací úseků zájmových genů. Při zjišťování rezistence kleštíka k *tau*-fluvalinátu se sekvenace provádí na úseku genu pro sodíkový kanál (*VmNa*) obsahujícím nukleotidové pozice 1710 a 1712 (GenBank Accession no. KC152655.2) (Hubert *et al.*, 2013), a také na mitochondriálních genech pro cytochromoxidázu I, II a III ATP syntázu 6 a cytochrom b (COI, COII-ATP6, ATP6-COIII a Cytb dle sekvence GenBank Accession no. AJ493124.1) (Evans *et Lopez*, 2002; Navajas *et al.* 2002; Strachecka *et al.*, 2015). Nevýhodou sekvenování je však značná cena experimentu (pro rutinní použití) a omezená dostupnost potřebného laboratorního vybavení (především sekvenátoru) v menších laboratořích.

Mutace ve výše zmíněných mitochondriálních genech byly detekovány také pomocí polymerázové řetězové reakce a následného jednovláknového konformačního polymorfismu (PCR-SSCP) (Strachecka *et al.*, 2015). Při analýze PCR produktů v polyakrylamidovém gelu za nedenedurujících podmínek dávají vzorky kleštíků rezistentních k *tau*-fluvalinátu vzniknout čtyřem bandům, DNA *tau*-fluvalinát senzitivních jedinců pak pouze dvěma bandům. Na hmotnostním odlišení jednotlivých řetězců DNA se kromě rozdílů v jejich sekvencích podílí také míra metylace DNA v CpG ostrovech, která u rezistentních jedinců výrazně klesá (Strachecka *et al.*, 2015).

Další diagnostická metoda využívá pro genotypizaci a určení konkrétní alelické varianty na nukleotidových pozicích 1710 a 1712 (aminokyselinové substituce L925V/M/I) fluorescenčně značené Taqman[®] próby (González-Cabrera *et al.*, 2016).

Autoři navrhli próbu pro určení *wild-type* alely (L925) a tři próby pro určení mutantních alel (L925V, L925I a L925M). Jedná se o specifickou multiplexní metodu umožňující diskriminaci až šesti různých alel v reakci. Nevýhodou je však vysoká cena analýzy a nutnost využívání speciálního přístrojového vybavení (real-time PCR termocyklér).

Nejnovější metoda PCR-RFLP využívá k určení přítomnosti mutace na nukleotidové pozici 1710 restriční štěpení pomocí *SacI* restriční endonukleázy (González-Cabrera *et al.*, 2018; Hubert *et al.*, 2018). Enzym štěpí motiv GAGCT/C mezi nukleotidovými pozicemi 1709 a 1710, a je tudíž schopný odlišit *wild-type* alelu mající na pozici 1710 cytosin od mutantních alel, u kterých je cytosin nahrazen guaninem nebo adeninem. Po namnožení úseku DNA obsahujícího pozici 1710 a přidání restričního enzymu do reakce jsou na výsledném elektroforetogramu viditelné dva štěpné produkty po rozštěpení původního PCR produktu *wild-type* alely (1710: C), nebo pouze jeden nerozštěpený produkt v případě detekce mutantní alely (1710: G/A). V případě heterozygotního jedince pro rezistentní alelu jsou na elektroforetogramu viditelné tři produkty odpovídající nerozštěpenému původnímu PCR produktu a dvojici produktu štěpných. Výhodou této metody jsou především nízké nároky na laboratorní vybavení a možnost snadného rozlišení *wild-type* a rezistentních homozygotů, či heterozygotů. Není však možné určit, který nukleotid změněný mutací a způsobující rezistenci kleštika k *tau*-fluvalinátu se na pozici 1710 nachází (Stará *et al.*, 2019).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Včelí měl obsahující kleštíky byla včelaři odebrána v průběhu let 2015–2018 z 22 stanovišť na území okresů Frýdek-Místek (14), Chrudim (1), Šumperk (4) a Znojmo (3). Rozpis a počet jednotlivých lokalit sběru kleštíků a informace o varroacidní látce aplikované na zdrojové včelstvo před sběrem kleštíků jsou uvedeny v tabulce 2.

Kleštíci, u kterých byla určena rezistence k *tau*-fluvalinátu (při léčení nebyli k této látce vnímaví), byli poskytnuti RNDr. Františkem Kašparem (Pokusný včelín Pekařov, Výzkumný ústav včelařský s.r.o. v Dole). Tito kleštíci byli odebíráni ze 4 stanovišť (A–D). Na 3 stanoviště (A, C a D) byly v průběhu 4 let opakovaně aplikovány přípravky obsahující syntetické varroacidní látky. Kleštíci byli odebíráni ze sběrné podložky ve spodní části úlu vždy po léčebném ošetření včelstva. U skupiny A byl pro léčení použit přípravek obsahující *tau*-fluvalinát (1. sběr), následně fumigačně amitraz (2. sběr). U skupiny C přípravek obsahující flumethrin, u skupiny D nejprve přípravek obsahující flumethrin (1. sběr) a následně fumigačně amitraz (2. sběr). Poslední testovací skupina B byla v průběhu čtyř let ošetřována pouze varroacidními přípravky na bázi organických kyselin (kyselina šťavelová a mravenčí) a sloužila jako negativní kontrola.

Izolaci genomické DNA předcházelo očištění kleštíků odebraných v měli od nečistot. Byla použita flotační metoda spočívající v rozmíchání měli v 96% ethanolu a následném odebrání roztočů plovoucích na hladině. Poté byli kleštíci tříděni do popsaných sterilních mikroskopů, ve kterých byli uchováni v mrazicím boxu při –20 °C do doby, než byli použiti pro izolaci genomické DNA.

Tabulka 2: Lokalita sběru vzorků kleštíků určených pro molekulární detekci rezistence k *tau*-fluvalinátu, doplněná o počet odběrových stanovišť, rok sběru vzorků a způsob léčebného ošetření zdrojových včelstev.

Lokalita	Počet stanovišť	Rok sběru vzorků	Účinná látka	
Baranovice (okres Frýdek-Místek)	1	2016	<i>tau</i> -fluvalinát	
Hrušovany nad Jevišovkou (okres Znojmo)	3	2015	<i>tau</i> -fluvalinát	
Dobrá (okres Frýdek-Místek)	1	2016	<i>tau</i> -fluvalinát	
Frýdek-Místek (okres Frýdek-Místek)	2	2016	<i>tau</i> -fluvalinát	
Janovice (okres Frýdek-Místek)	2	2015	<i>tau</i> -fluvalinát	
Lískovec (okres Frýdek-Místek)	3	2016 a 2018	<i>tau</i> -fluvalinát	
Pekařov (okres Šumperk)	4 (A–D)	2017	A	<i>tau</i> -fluvalinát
				<i>tau</i> -fluvalinát + amitraz
			B	kyselina mravenčí
			C	flumethrin
			D	flumethrin + amitraz
Pržno (okres Frýdek-Místek)	2	2015	<i>tau</i> -fluvalinát	
Sedliště (okres Frýdek-Místek)	2	2016	<i>tau</i> -fluvalinát	
Vojtěchov (okres Chrudim)	1	2015, 2016 a 2017	<i>tau</i> -fluvalinát	
Vratimov (okres Frýdek-Místek)	1	2016	<i>tau</i> -fluvalinát	

4.2 Izolace genomické DNA kleštíka včelího

Genomická DNA z 1, 5, 10 nebo 50 jedinců kleštíka včelího byla izolována za použití izolačního kitu Exgene™ DNA micro (GeneAll), protokol D (Izolace DNA z vlasů a částí nehtů). Přibližné koncentrace vyizolované DNA jsou uvedeny v části 5 Výsledky (str. 28).

Pufry byly po otevření uchovávány při laboratorní teplotě (20–25 °C). Roztok 20 mg/ml proteinázy K v uchovávacím pufru a 1 mol/l vodný roztok DTT (dithiothreitol) byly skladovány v –20 °C. Postup izolace DNA byl následující:

1. Kleštíky tříděné po 1, 5, 10 nebo 50 kusech zhomogenizovat v 1,5ml mikrozkuvkách mikrohomogenizátorem v 200 µl CL pufru. Přidat 20 µl 20 mg/ml roztoku proteinázy K a 20 µl 1 mol/l roztoku DTT, důkladně zvortexovat a inkubovat 1 h při 56 °C v termobloku. Každých 10 min mikrozkuvku vortexovat pro lepší lyzi tkání kleštíků.
2. Ke směsi v mikrozkuvce přidat 200 µl BL pufru, důkladně zvortexovat a krátce zcentrifugovat. Inkubovat 10 min při 70 °C v digitálním termobloku.
3. Ke směsi v mikrozkuvce přidat 200 µl roztoku 96% ethanolu, vše důkladně zvortexovat a 10 s centrifugovat v minicentrifuze.
4. Supernatant přenést do mikrokolonky se sběrnou nádobkou, centrifugovat 1 min při 6 000 G. Obsah sběrné nádoby vylít do odpadu.
5. Do mikrokolonky přidat 500 µl BW pufru, centrifugovat 1 minutu při 6 000 G. Obsah sběrné nádoby vylít do odpadu.
6. Do mikrokolonky přidat 700 µl TW pufru, centrifugovat 1 min při 6 000 G. Obsah sběrné nádoby vylít do odpadu. Centrifugovat na maximální otáčky 3 min pro odstranění zbytkového promývacího pufru. Mikrokolonku přenést do nové 1,5ml mikrozkuvky. Na membránu kolonky přidat 50 µl deionizované vody. Inkubovat 1 min při pokojové teplotě. Centrifugovat 1 min na maximální otáčky.
7. Vyizolovanou genomickou DNA jedinců kleštíka včelího uchovávat v –20 °C, během používání uchovávat v chladničce.

4.3 Vzorky DNA kleštíka včelího ze zahraničí

Pro optimalizaci diagnostické metody byly mimo jiné použity vzorky genomické DNA a cDNA, u kterých byla sekvenační analýzou potvrzena přítomnost jedné ze tří doposud identifikovaných bodových mutací nukleotidů 1710 či 1712, dále pak vzorek cDNA o *wild-type* genotypu. Z pohledu aminokyselinových substitucí vzniklých v důsledku těchto bodových mutací se jednalo o mutantní vzorky cDNA L925V, L925M a L925I (homozygotní konstituce) a *wild-type* vzorek L925 (homozygotní konstituce). Všechny vzorky cDNA byly po domluvě poskytnuty výzkumným týmem J. González-

Cabrery (University of Valencia, Valencia, Španělsko). Vzorke zaslané genomické DNA nesly mutaci způsobující aminokyselinovou substituci L925I (homozygotní i heterozygotní konstituce). Byly poskytnuty A. Tsagkarakous z výzkumného týmu E. Alissandrakise (Technological Educational Institute of Crete, Heraklion, Řecko).

4.4 PCR amplifikace genomické DNA kleštika včelího

Složení PCR reakční směsi pro analýzu 6 vzorků je uvedeno v tabulce 3.

1. Z rozmražených složek napipetovat podle složení uvedeného v tab. 3 PCR reakční směs. Před napipetováním DNA polymerázy k dalším složkám reakční směsi tuto směs důkladně zvortexovat a zcentrifugovat, po přidání DNA polymerázy pouze lehce zcentrifugovat.

Tabulka 3: Složení PCR reakční směsi pro amplifikaci 6 vzorků.

Složky PCR reakční směsi	Pipetovaný objem (μl)	
	Varianta se 2 primery	Varianta se 3 primery
Deionizovaná voda	44,4	41,1
Reakční pufr 10x	6,7	6,7
Roztok MgCl ₂ (25 mmol/l)	8,0	8,0
Roztok dNTPs (20 mmol/l)	0,7	0,7
Primer okrajový F (forward)*. ^Δ (10 μmol/l)	3,3	3,3
Primer okrajový R (reverse)*. ^Δ (10 μmol/l)	3,3	3,3
Primer diagnostický* (10 μmol/l)	–	3,3
aTaq DNA polymeráza (5 U/μl)	1,0	1,0

* Sekvence vlastních primerů jsou uvedeny v tabulce 3 (část 5 Výsledky).

^Δ Pro amplifikaci vzorků cDNA byla použita dvojice primerů V10F (5'-TGAAGCT TATGGCGAAAAG-3') a V11R (5'-CGAGAAAGAACGGGATACA-3') dávající PCR produkt o velikosti 465 bp (Hubert et al., 2013).

2. Do PCR mikrozkuvek napipetovat 1 μl vyizolované genomické DNA a cDNA o koncentraci 5–15 μg/ml. Následně napipetovat 9 μl PCR reakční směsi.
3. PCR mikrozkuvky vložit do termocykléru s nastaveným teplotním a časovým profilem dle schématu1:

Schéma 1: Základní teplotní a časový profil PCR reakce.

1. 94 °C 5 min
 2. 94 °C 30 s
 - 60 °C 30 s
 - 72 °C 30 s
- } 35 cyklů
3. 72 °C 7 min

4.5 Zpracování PCR produktů pomocí elektroforetické separace

Elektroforetická separace PCR produktů byla prováděna v horizontální elektroforetické komůrce HU10 (Scie-Plas) v 1,5% agarózovém gelu obsahujícím 3 μ l roztoku GoodView (na 50 ml agarózového gelu). Do jamek gelu bylo pipetováno 5 μ l PCR produktu smíšeného s 2 μ l nanášecího pufu. Elektroforetická separace probíhala při 80 V po dobu 45 min. PCR produkty separované v gelu byly vizualizovány pomocí G:Box dokumentačního systému (Syngene).

4.6 Ověření přítomnosti mutace pomocí certifikované metodiky

K základnímu rozřídění vzorků DNA izolovaných z jednotlivých kleštíků na vzorky DNA nesoucí mutaci nukleotidu 1710 (kleštíci rezistentní k *tau*-fluvalinátu) a vzorky DNA bez mutace (kleštíci vnímaví), byla použita Certifikovaná metodika pro hodnocení rezistence roztoče *Varroa destructor* vůči *tau*-fluvalinátu (Hubert *et al.*, 2018).

Vzorky DNA byly podrobeny PCR amplifikaci pomocí primerů v1440f (5'-ATTAGGTCTTTGCCATTGCTA-3') a v2022r (5'-CTCCTTCCATACGCTATA TGC-3') (Hubert *et al.*, 2018). Výsledný PCR produkt délky 603 bp byl štěpen pomocí restriční endonukleázy *SacI* (New England BioLabs[®], kat. č. R0156S) podle pracovního postupu doporučeného výrobcem. Na rozštěpení 1 μ g DNA byl použit 1 μ l roztoku enzymu. Množství PCR produktu získaného po amplifikaci templátové DNA bylo odhadnuto porovnáním s velikostním standardem 100 bp DNA Ladder (New England BioLabs[®], kat. č. N3231S). Postup restričního štěpení byl následující:

1. Do 0,2ml mikrozkušavky napipetovat 10 μ l PCR produktu, přidat 2 μ l 10x NEBuffer 1.1 a 0,4 μ l restriční endonukleázy *SacI*, směs doplnit na celkový objem 20 μ l deionizovanou vodou. Směs důkladně promíchat propipetováním a inkubovat ji v termobloku nastaveném na 37 °C po dobu 15 min.

2. Po uplynutí 15 min inkubace zvýšit inkubační teplotu na 65 °C a směs inkubovat dalších 20 min, čímž dojde k inaktivaci enzymu.
3. Poté vzorky elektroforeticky separovat v 1,5% agarózovém gelu při napětí 80 V po dobu 45 min. Separované produkty vizualizovat pomocí G:Box dokumentačního systému (Syngene).

4.7 Sekvence vybraných vzorků vyizolované genomické DNA kleštíka

U šesti náhodně vybraných vzorků DNA pocházejících z kleštíků z České republiky, u kterých byla předem určena přítomnost či nepřítomnost mutace nukleotidu 1710 pomocí restriktivního štěpení enzymem *SacI*, byla provedena sekvence zájmové části *VmNa* genu.

4.7.1 Izolace PCR produktů z gelu

PCR produkty byly izolovány pomocí QIAquick Gel Extraction Kitu podle postupu uvedeného ve Spin Handbook 07/2002 (Quiagen).

1. Připravit 1% agarózový gel v 1x TAE pufru (0,75 g agarózy, 75 ml 1x TAE pufru). Po rozvaření agarózy přidat do roztoku 4 µl 1% roztoku ethidium bromidu, směs nalít do sestavené elektroforetické vaničky s hřebínkem. Nechat tuhnout 45 min.
2. Po ztuhnutí gelu nalít do elektroforetické vaničky s gelem 1x TAE pufr, do jamek gelu nanést po 20 µl PCR produktu smíšeného se 4 µl nanášecího pufru, dále do vedlejší jamky 1,5 µl standardu délky dvoušroubovice DNA. Separovat při 80 V po dobu 45 min.
3. Při UV vizualizaci vyříznout z gelu sterilním skalpelem separované PCR produkty a umístit je do 1,5ml mikrozkušavek. Určit hmotnost vyříznutých bločků gelu.
4. Do každé mikrozkušavky přidat QG pufr v objemovém poměru 3:1 (QG pufr:gelový bloček). Mikrozkušavky inkubovat v termobloku při 50 °C do rozpuštění gelu (asi 5 min).
5. Do mikrozkušavek přidat 1 objem izopropanolu (při navážce 100 µg gelového bločku přidat 100 µl izopropanolu). Důkladně zvortexovat a zcentrifugovat. Směs napipetovat do kolonek pro izolaci DNA. Kolonky centrifugovat 1 min při 13 000 G. Vylít obsah sběrné zkumavky.
6. Do kolonky přidat 500 µl QG pufru, centrifugovat 1 min při 13 000 G. Vylít obsah sběrné zkumavky.

7. Do kolonky přidat 750 μ l PE pufru, centrifugovat 1 min při 13 000 G. Vylít obsah sběrné zkumavky. Kolonky opět zcentrifugovat.
8. Kolonky umístit do nových 1,5ml mikrozkuavek, na membránu kolonek napipetovat 30 μ l deionizované vody a nechat stát 1 min. Centrifugovat 1 min při 13 000 G. Izolovanou DNA dlouhodobě uchovávat v -20 °C.

4.7.2 Sekvenace

Vyizolované PCR produkty byly označeny pomocí Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kitu podle návodu uvedeného výrobcem. Postup přípravy vzorků:

1. Před označením naředit PCR produkty (20 ng DNA v 1 reakci).
2. Připravit 2 reakční směsi lišící se ve variantě použitého primeru (primer Fo1 nebo Ro1). Složení pro 1 reakci: 1 μ l Big Dye pufru, 1 μ l Big Dye, 2 μ l primeru (1,6 pmol/ μ l). Směs rozpipetovat po 4 μ l do 0,2ml mikrozkuavek.
3. K reakční směsi napipetovat 6 μ l naředěného PCR produktu.
4. Mikrozkuavky umístit do termocykleru s nastaveným teplotním a časovým profilem (uvedeno ve schématu 2).

Schéma 2: Teplotní a časový profil průběhu sekvenačního značení PCR produktů.

1. 95 °C 5 min
 2. 95 °C 30 s
 - 55 °C 30 s
 - 72 °C 30 s
 3. 72 °C 10 min
- } 25 cyklů

4.8 Použité programy

Pro navržení primerů a hodnocení jejich předpokládané kvality pro PCR amplifikaci byl použit program Primer3 (verze 0.4.0) (Rozen *et* Skaletsky; 2000) dostupný online. Primery byly navrhovány na základě DNA sekvence *VmNa* genu kleštíka včelího uvedené pod GenBank Accession no. KC152655.2 (Hubert *et al.*, 2013).

Vizualizace nasedání primerů na templátovou DNA byla provedena za použití programu Geneious (verze 2019.0.4).

Výstup sekvenační analýzy vybraných PCR produktů byl hodnocen za pomoci softwaru Mega 7 (Kumar *et al.*, 2016).

4.9 Použité chemikálie

- 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs®)
- Agarose Electrophoresis Grade, Ultra Pure (Life Technologies)
- Agaróza I™ Biotechnology Grade (Amresco)
- Bromfenolová modř (Serva)
- Deionizovaná voda
- Ethanol 70% a 96% roztok (Lihovar Vrbátky)
- Ethylendiaminotetraoctan sodný – Na₂EDTA (Lachner)
- GeneRuler DNA Ladder 100 bp (Thermo Scientific)
- GoodView Nucleic Acid Stain (Sigma-Aldrich)
- Izopropanol (Lachner)
- Kyselina boritá (Lachner)
- Restrikční endonukleáza *SacI* a NEBuffer 1.1 10x (kat. č. N3231S, New England Biolabs®)
- Trishydroxymethylaminomethan – Tris (AppliChem)
- Xylenová modř – Xylencyanol FF (AppliChem)

4.10 Použité roztoky

Agarózový gel, 1,5% roztok

- 50 ml TBE pufru
- 0,75 g agarózy

Dithiothreitol, 1 mol/l roztok

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

Ethidium bromid, 1% roztok

- 0,1 g ethidium bromid
- 100 ml deionizované vody

TAE pufr, 1x zásobní roztok

- 40 mmol/l Tris-acetát
- 2 mmol/l EDTA

- doplnit deionizovanou vodou na 1 l

TBE pufr, 10x zásobní roztok

- 55 g kyseliny borité (H_3BO_3)
- 108 g trishydroxymethylaminometanu (Tris)
- 40 ml roztoku kyseliny ethylendiaminotetraoctové (EDTA) 0,5 mol/l, pH 8,0
- doplnit deionizovanou vodou na 1 l

Nanášecí pufr (obsahující xlenovou modř)

- 0,5 ml glycerol
- 20 μ g xylene cyanol
- 0,5 ml deionizované vody

4.11 Použité soupravy

- ExgeneTM Genomic DNA Micro Isolation Kit (GeneAll)
- Big Dye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific)
- QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)

4.12 Použité laboratorní přístroje

- Centrifuga Spectrafuge 16M (Labnet International)
- Digitální termoblok Dry Bath AccuBlockTM (Labnet International)
- Dokumentační systém G:Box (Syngene)
- Fluorometr Hoefer DyNa Quant 200 (Amersham Biosciences)
- Horizontální elektroforetická komůrka HU10 (Scie-Plas)
- Chladnička kombinovaná (Samsung)
- Laboratorní váhy PS 210.R2 (Radwag)
- Laminární box PV-100 (Telstar)
- Mikropipety Nichipet EX 0,5 μ l–1 ml (Nichiryo)
- Mikrovlnná trouba (Daewoo)
- Minicentrifuga Spectrafuge mini (Labnet International)
- Spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)
- Termoblok AccuThermTM Microtube Shaking Incubator (Labnet International)
- Termoblok Mixing Block MB-102 (BIOER Technology)

- Termocykler TC-XP s blokem D PTC-100 (BIOER Technology)
- Termocykler T-Personal (Biometra)
- UV transluminátor UVT-14 L (Herolab)
- Vortex mixér (Labnet International)
- Výrobek deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)
- Zdroj stejnosměrného elektrického proudu Power Station 300 (Labnet International)

5 Výsledky

Cílem této práce bylo navrhnout sadu specifických primerů a optimalizovat uspořádání a podmínky PCR amplifikační reakce tak, aby ji bylo možné použít k určení bodových mutací nukleotidů na pozicích 1710 a 1712 genu pro sodíkový kanál kleštika včelího, které způsobují rezistenci roztoče k varroacidní látce *tau*-fluvalinátu.

Experimentální část práce byla řešena v navazujících celcích. Jednalo se o:

- 5.1 Izolaci genomické DNA kleštíků odebraných z jednotlivých stanovišť (včelstev), očištěných od nečistot pomocí flotace.
- 5.2 Roztřídění vzorků vyizolované genomické DNA podle přítomnosti či absence bodové mutace nukleotidu 1710 za použití Certifikované metodiky pro hodnocení rezistence roztoče *Varroa destructor* vůči *tau*-fluvalinátu (Hubert *et al.*, 2018) využívající restriční štěpení (PCR-RFLP), a na základě těchto výsledků vytvoření testovací základny vzorků genomické DNA pro optimalizaci diagnostické metody.
- 5.3 Návrh párů okrajových primerů pro namnožení úseku *VmNa* genu obsahujícího nukleotidové pozice 1710 a 1712, a dále sady specifických diagnostických primerů pro diskriminaci známých nukleotidových variant na zmíněných pozicích.
- 5.4 Výběr nejvhodnější dvojice okrajových primerů a variant diagnostických primerů pomocí testovací PCR amplifikace, ověření amplifikační kompatibility páru okrajových primerů a příslušných diagnostických primerů.
- 5.5 Příprava tříprimerové PCR amplifikace, optimalizace reakčních podmínek PCR amplifikace.
- 5.6 Sekvenace vybraných vzorků genomické DNA pro finální ověření spolehlivosti diagnostické metody.

5.1 Izolace genomické DNA kleštika včelího

Kleštici určeni pro izolaci genomické DNA byli od nečistot z včelí měli očištěni flotací v 70% ethanolu. Izolaci genomické DNA kleštika včelího pomocí izolačního kitu ExgeneTM Genomic DNA micro (GeneAll) bylo při izolaci DNA z jedné samice kleštika získáno 50 μ l DNA o koncentraci přibližně 10 ng/ μ l, z 5 jedinců DNA o koncentraci asi

30 ng/μl, z 10 jedinců DNA o koncentraci přes 100 ng/μl a z 50 jedinců DNA o koncentraci asi 300 ng/μl.

DNA byla z kolony vymyta 50 μl deionizované vody místo vymývacího AE pufru (součást izolačního kitu), některá ze složek AE pufru by mohla negativně ovlivňovat výsledek sekvenační analýzy vzorků DNA.

5.2 Roztřídění vzorků DNA podle přítomnosti či absence bodové mutace pomocí restričního štěpení

K roztřídění vzorků vyizolované genomické DNA podle přítomnosti či absence bodové mutace nukleotidu 1710 byla použita Certifikovaná metodika pro hodnocení rezistence roztoče *Varroa destructor* vůči *tau*-fluvalinátu (Hubert *et al.*, 2018) využívající přístup PCR-RFLP. Byla tak sestavena testovací základna *wild-type* C(1710) a mutantních G/A(1710) vzorků genomické DNA pro optimalizaci zde prezentované diagnostické metody pro určování rezistence kleštíka k *tau*-fluvalinátu.

Vzorky genomické DNA izolované z jednoho kleštíka byly podrobeny amplifikaci pomocí okrajových primerů v1440f+v2022r (Hubert *et al.*, 2018), přičemž byl získán PCR produkt o délce 603 bp. Tento PCR produkt byl následně štěpen pomocí enzymu restriční endonukleázy *SacI* (New England BioLabs®, kat. č. R0156S) podle pracovního postupu doporučeného výrobcem.

V případě, kdy byl štěpení *SacI* restriční endonukleázou podroben 603 bp dlouhý PCR produkt vzniklý amplifikací *wild-type* DNA, která pocházela z nerezistentních (vnímavých) kleštíků, kteří nenesli bodovou mutaci na nukleotidové pozici 1710, docházelo ke vzniku dvou fragmentů o délce 270 bp a 333 bp, které byly po elektroforetické separaci a následné vizualizaci detekovatelné jako dva bandy. Jestliže byl restričnímu štěpení pomocí restriční endonukleázy *SacI* podroben 603 bp dlouhý PCR produkt vzniklý amplifikací DNA nesoucí bodovou mutaci na nukleotidové pozici 1710 (DNA pocházející z rezistentních kleštíků), nedošlo k jeho rozštěpení a po elektroforetické separaci a vizualizaci tvořil pouze jeden band.

Vzorky genomické DNA kleštíků včelích s určenou přítomností či nepřítomností mutace nukleotidu 1710 (rezistentních či vnímavých k *tau*-fluvalinátu) byly uchovávány v -20 °C, dokud nebyly použity pro optimalizaci diagnostické metody využívající PCR amplifikaci DNA pomocí specifických diagnostických primerů.

5.3 Návrh okrajových a diagnostických primerů

Pro detekci bodových mutací nukleotidových pozic 1710 a 1712 ve *VmNa* genu kleštíka včelího byly navrženy dvě sady specifických primerů (Primer 3). První sadu tvořila série dvojic okrajových primerů sloužících k amplifikaci zájmového segmentu *VmNa* genu. Druhou sadu pak tvořila série diagnostických primerů umožňujících detekci známých nukleotidových variant potenciálně se nacházejících na pozicích 1710 a 1712.

Celkem byly navrženy čtyři dvojice okrajových primerů (o *forward* a *reverse* uspořádání), jejichž sekvence jsou uvedeny v tab. 4. Dále pak 13 specifických diagnostických primerů (o *forward* i *reverse* orientaci), jejichž sekvence jsou uvedeny v tab. 5. Primery byly navrhovány na základě sekvence DNA uvedené pod GenBank Accession no. KC152655.2 (Hubert *et al.*, 2013).

Tabulka 4: Okrajové primery určené k amplifikaci segmentu *VmNa* genu kleštíka včelího, obsahujícího nukleotidové pozice 1710 a 1712. Tučně vyznačené primery byly vyhodnoceny jako nejvhodnější k použití v rámci vlastní optimalizované diagnostické metody pro detekci bodových mutací způsobujících rezistenci kleštíka k *tau*-fluvalinátu. Teplota T_m primerů je určena programem Primer3.

Primer	Sekvence 5'–3'	T_m (°C)	Délka produktu (bp)
Fo1	CGCGCATTAACGCATTAAC	61,47	335
Ro1	GAGAGAAGCGAGGTCACAGG	60,14	
Fo2	CGCAACTTCTTCGAACACAA	60,03	623
Ro2	GGAGCAAGTTTTGACCTTCG	59,85	
Fo3	TGCAGATAAACCGGGATTTG	60,83	757
Ro3	GTACGGCGGAATGACCATAG	60,35	
Fo4	GAATCGTTTCTGCGTGTGTAC	58,30	247
Ro4	ACAATGAGCCAACGAAGGAA	60,64	

Tabulka 5: Diagnostické primery navržené k určení nukleotidové varianty na pozicích 1710, 1712 anebo 1710 + 1712 *VmNa* genu kleštíka včelího. Tučně vyznačené primery byly určeny jako vhodné k detekci bodových mutací (vyznačeny červeně) a byly použity pro další optimalizaci metody. *Wild-type* sekvence nese nukleotidovou konstituci C(1710) + G(1712).

Primer	Sekvence 5'–3'	T _m (°C)	Určuje variantu [(báze)pozice]	
A_F	TGGGCAAGACGATAGGAGCTA	62,13	(A)1710	–
C_F	GGGCAAGACGATAGGAGCTC	61,26	(C)1710	–
G_F	GGGCAAGACGATAGGAGCTG	62,20	(G)1710	–
AAF	TGGGCAAGACGATAGGAGCTATA	62,21	(A)1710	(A)1712
AGF	GGGCAAGACGATAGGAGCTATG	62,28	(A)1710	(G)1712
CGF	GGCAAGACGATAGGAGCTCTG	61,42	(C)1710	(G)1712
GGF	GGCAAGACGATAGGAGCTGTG	62,24	(G)1710	(G)1712
_AR	CCAACACAAAGGTCAGGTTACCT	61,52	–	(A)1712
_GR	CAACACAAAGGTCAGGTTACCC	60,67	–	(G)1712
AAR	CCAACACAAAGGTCAGGTTACCTAT	61,64	(A)1710	(A)1712
AGR	AACACAAAGGTCAGGTTACCCAT	60,89	(A)1710	(G)1712
CGR	AACACAAAGGTCAGGTTACCCAG	61,52	(C)1710	(G)1712
GGR	AACACAAAGGTCAGGTTACCCAC	61,41	(G)1710	(G)1712

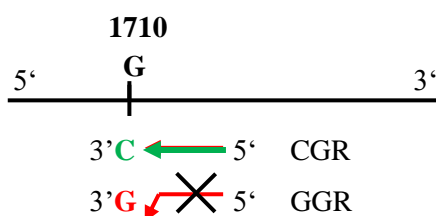
Dvoupísmenný název diagnostického primeru popisuje, kterou nukleotidovou sestavu (*wild-type* či mutantní) na pozicích 1710 a 1712 templátové DNA (vždy v tomto pořadí) má primer detekovat. Dolní podtržítka v názvu primeru poukazuje na skutečnost, že daný primer slouží k detekci pouze jedné ze dvou zmíněných bodových mutací, přičemž je umístěno na pozici nukleotidu, který není primerem diagnostikován (opět v pořadí pozic 1710 a 1712). Písmeno „F“ označuje *forward* a „R“ označuje *reverse* směr nasedání primeru na templátovou DNA.

Specifické diagnostické primery byly navrženy tak, aby jejich 3'-koncový nukleotid nasedal na pozici 1710 nebo 1712 templátové DNA, a aby detekoval bázi na pozici 1710 nebo 1712 (či na obou pozicích zároveň). Diagnostické primery se od sebe vzájemně v 3'-koncovém nukleotidu liší (respektive některé i v třetím nukleotidu od 3'-konce). Podle obecného předpokladu platí, že k amplifikaci DNA od primeru dochází pouze v případě úplné komplementarity 3'-konce tohoto primeru s templátovou DNA, na kterou nasedá. U navržených specifických diagnostických primerů je využito zmíněné

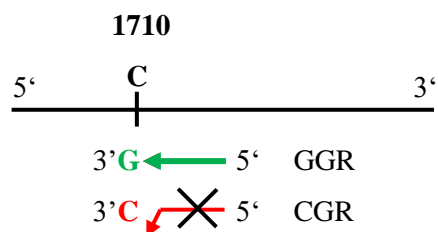
odlišnosti 3'-konce těchto primerů k určení přítomnosti a konkrétní varianty nukleotidové báze v templátové DNA na pozicích 1710 nebo 1712, případně na obou pozicích zároveň. A to v závislosti na tom, která varianta diagnostického primeru při amplifikaci templátové DNA dává vzniknout PCR produktu (obr. 2).

Obrázek 2: Princip nasedání 3'-konce diagnostických primerů CGR a GGR na nukleotidovou pozici 1710 v templátové DNA, pokud je a) prováděna amplifikace *wild-type* DNA s C(1710) v sekvenci (DNA amplifikuje diagnostický primer CGR) a b) prováděna amplifikace mutací změněné DNA (DNA amplifikuje diagnostický primer GGR). Převzato a upraveno z Lahnerová (2017).

a) *původní wild-type sekvence*
(k primeru komplementární vlákno)



b) *mutací změněná sekvence*
(k primeru komplementární vlákno)



5.4 Optimalizace podmínek PCR reakce, testování úspěšnosti amplifikace DNA okrajovými a diagnostickými primery, výběr nejvhodnějších primerů.

Okrajové primery

Byla provedena amplifikace smíšeného vzorku DNA vyizolovaného z 50 kleštíků pomocí čtyř dvojic navržených okrajových primerů (Fo1+Ro1, Fo2+Ro2, Fo3+Ro3 a Fo4+Ro4). Amplifikace byla postupně prováděna při teplotách *annealingu* primerů T_a (*annealing temperature*) v intervalu 58–64 °C, aby bylo možné určit optimální T_a . Kromě toho byla hodnocena kvalita amplifikace DNA jednotlivými dvojicemi primerů. Hodnotícím parametrem kvality amplifikace bylo porovnání intenzity vizualizovaných očekávaných PCR produktů v gelu, nepřítomnost nespecifických PCR produktů po amplifikaci DNA a výsledná optimální T_a dané dvojice okrajových primerů (ideálně blíží se teoretické T_m okolo 60 až 62 °C).

Jako nejvhodnější pro amplifikaci byla určena dvojice okrajových primerů **Fo1+Ro1**, která dávala v rámci intervalu testovaných T_a primerů vzniknout pokaždé nejintenzivnějšímu PCR produktu (délka PCR produktu 335 bp). Během amplifikace

DNA těmito primery nevznikaly žádné nespecifické PCR produkty a zájmový PCR produkt byl jasně hodnotitelný. Zbylé tři dvojice okrajových primerů byly shledány pro diagnostiku nevhodnými. Dvojice okrajových primerů Fo2 + Ro2 (PCR produkt 623 bp) a Fo3 + Ro3 (PCR produkt 757 bp) dávaly kromě hlavního produktu vzniknout nespecifickým PCR produktům o přibližné velikosti 100 bp. PCR produkt dvojice primerů Fo3 + Ro3 navíc nebyl co do intenzity příliš výrazný (čtvrtinová intenzita při porovnání s intenzitou PCR produktu dvojice primerů Fo1 + Ro1). Amplifikace DNA dvojicí primerů Fo4 + Ro4 (247 bp) nedávala vzniknout nespecifickým PCR produktům, ale hlavní PCR produkt byl méně intenzivní, než produkt dvojice primerů Fo1 + Ro1.

Diagnostické primery

Následně byla testována specifita 13 diagnostických primerů prostřednictvím amplifikací vzorků genomické DNA a/nebo cDNA izolované z jednoho kleštíka. Diagnostika přítomnosti a variant bodových mutací má být prováděna primárně na DNA genomické. Během optimalizace metody však nebyly k dispozici vzorky genomické DNA o všech doposud popsaných mutantních variantách. Proto musela být specifita diagnostických primerů testována i na vzorcích cDNA.

Cílem primární analýzy diagnostických primerů bylo vybrat ty z nich, které budou jasně identifikovat nepřítomnost či přítomnost bodové mutace nukleotidů 1710 a/nebo 1712 a jejich konkrétní varianty bez vzniku nespecifických amplifikačních produktů. Sledovalo se mimo jiné, zda všechny varianty diagnostických primerů, určené k identifikaci jedné nukleotidové varianty, respektive dvou (na téže nukleotidové pozici), dávají po amplifikaci stejného vzorku DNA vzájemně si neodporující výsledek (varianta nukleotidové báze určená těmito diagnostickými primery při amplifikaci na stejné templátové DNA je ve všech případech shodná). Nedostatečně specifické varianty diagnostických primerů, které dávaly vzniknout neodpovídajícím, nejasně hodnotitelným či nespecifickým PCR produktům, byly z další práce vyloučeny.

Každý z diagnostických primerů byl v PCR reakční směsi přítomen spolu s k němu protisměrně orientovaným okrajovým primerem. V případě amplifikace genomické DNA se jednalo o primerové uspořádání Fo1 primer + *reverse* diagnostický primer nebo Ro1 primer + *forward* diagnostický primer (velikosti PCR produktů viz tab. 6). Amplifikace vzorků cDNA byla prováděna za pomoci stejných diagnostických *forward* a *reverse* primerů, které však byly ve trojici s okrajovými primery V10F a V11R.

Uspořádání bylo následující: V10F + diagnostický *reverse* primer nebo V11R + diagnostický *forward* primer (velikosti PCR produktů viz tab. 6). Podmínky amplifikace se řídily těmi uvedenými v tabulce 3 a schématu 1 (str. 21 a 22).

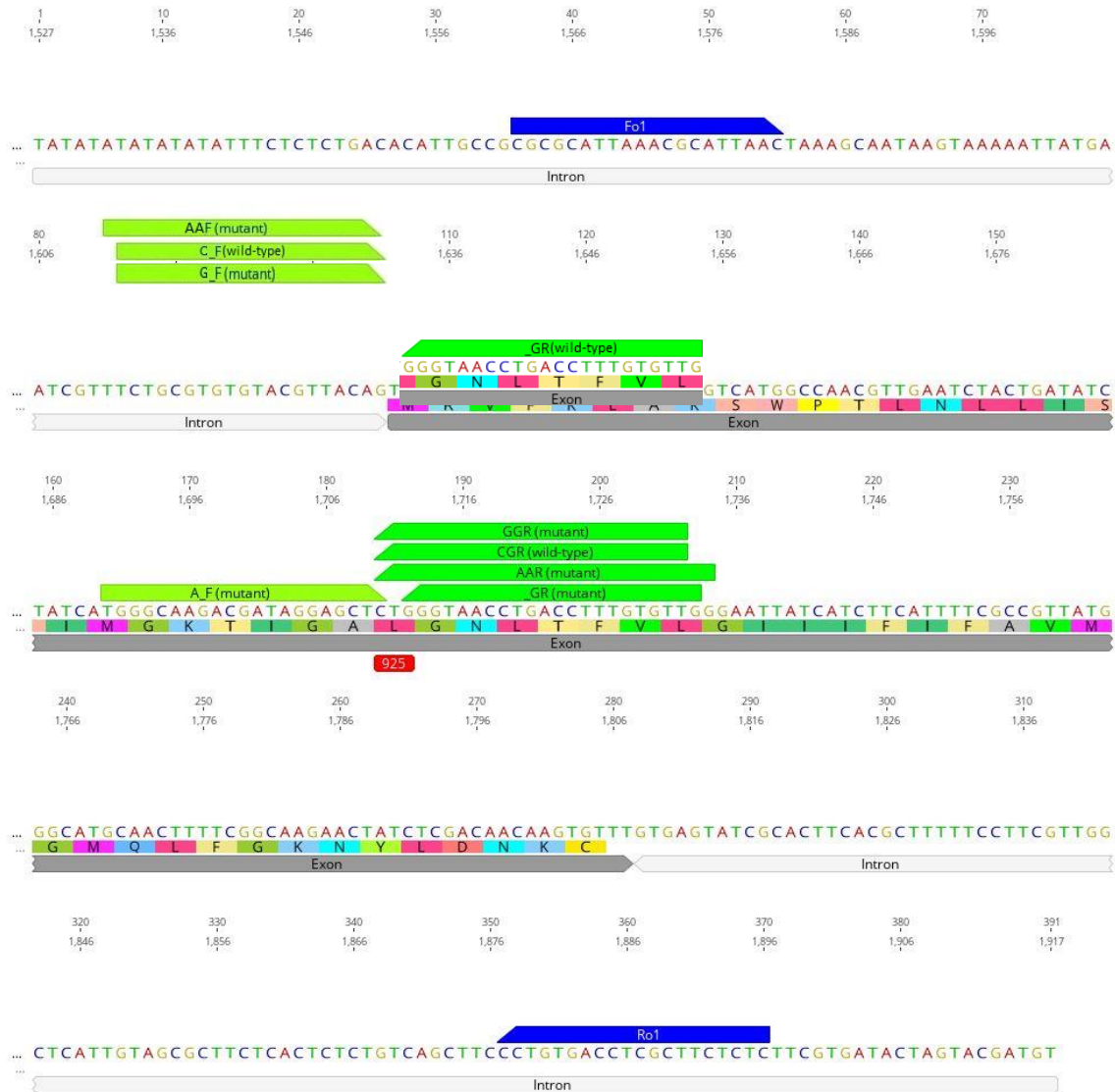
Jako **vhodné pro diagnostiku** rezistentních populací kleštěk nesoucích ve *VmNa* genu bodové mutace nukleotidů 1710 a 1712 byly vybrány následující diagnostické primery: **C_F**, **_GR** a **CGR** (amplifikující *wild-type* DNA) a primery **A_F**, **G_F**, **AAF**, **AAR** a **GGR** (amplifikující příslušně mutovanou DNA). Jako optimální T_a pro amplifikaci DNA pomocí těchto diagnostických primerů byla určena T_a 60 °C. Se zvyšující se teplotou *annealingu* docházelo ke snižování intenzity v gelu vizualizovaných PCR produktů. Délka PCR produktů výše zmíněných diagnostických primerů + odpovídajícího protisměrného okrajového primeru je uvedena v tab. 6. Vizualizace diagnostických a okrajových primerů na molekule templátové DNA je viditelná na obr. 3 dále v textu.

Jako **nespecifické, a tudíž nepoužitelné**, byly shledány diagnostické primery **AGF**, **CGF**, **GGF**, **_AR** a **AGR**. Tyto primery dávaly vzniknout PCR produktům při amplifikaci všech vzorků genomické DNA (*wild-type* i mutantních). Stejný výsledek byl získán i po amplifikaci cDNA vzorků. Změně výsledku amplifikace nepomohla ani úprava vzájemného poměru složek PCR reakční směsi, teplotního profilu termocyklu ani zvýšení T_a primerů.

Tabulka 6: Diagnostické primery vhodné k detekci bodových mutací nukleotidů 1710 a 1712, amplifikující templátovou DNA spolu s uvedeným protisměrně orientovaným okrajovým primerem, tvořící PCR produkty o uvedených velikostech.

Diagnostický primer	Amplifikace genomické DNA		Amplifikace cDNA	
	Okrajový primer	Délka produktu (bp)	Okrajový primer	Délka produktu (bp)
A_F	Ro1	207	V11R	267
C_F	Ro1	206	V11R	266
G_F	Ro1	206	V11R	266
AA_F	Ro1	207	V11R	267
_GR	Fo1	172	V10F	242
AAR	Fo1	173	V10F	243
CGR	Fo1	171	V10F	241
GGR	Fo1	171	V10F	241

Obrázek 3: Část *VmNa* genu kleštíka včelího s vyznačenými introny (světle šedá) a exony (tmavě šedá), a pozicí nasedání okrajových primerů (modrá) a diagnostických primerů (zelená) určujících substituce aminokyseliny 925 (červená).



Amplifikace vzorků genomické DNA i cDNA o nukleotidových konstitucích A(1710) + A(1712), C(1710) + G(1712) a G(1710) + G(1712) všemi specifickými diagnostickými primery uvedenými v tab. 6 dávaly spolehlivé nezaměnitelné výsledky. Problematické byly amplifikace vzorků cDNA o nukleotidové konstituci A(1710) + G(1712). Přímá diagnostika tohoto typu mutace pomocí primerů AGF nebo AGR není možná, protože tyto primery jsou pro diagnostiku nepoužitelné (nespecifita). Tento mutantní typ DNA byl kromě diagnostických primerů A_F a _GR (určují tuto mutaci) amplifikován nespecificky rovněž dalšími diagnostickými primery (AAF, AAR

a GGR určenými k detekci mutací), k čemuž nemá docházet (vznik falešně pozitivních výsledků). Určení mutantní nukleotidové konstituce A(1710) + G(1712) v homozygotní i heterozygotní sestavě je však možné při amplifikaci této DNA za pomoci jiných navržených diagnostických primerů (A_F, G_F a _GR), a při použití schematického postupu diagnostické amplifikace (viz tab. 7a a 7b). V rámci první PCR reakce je amplifikace prováděna pomocí diagnostického primeru A_F, který s protisměrně orientovaným okrajovým primerem Ro1 tvoří PCR produkt o velikosti 207 bp. V rámci druhé pomocí diagnostického primeru G_F, přičemž dochází ke vzniku PCR produktu primerů G_F a protisměrného okrajového primeru Ro1 o velikosti 206 bp. V rámci třetí pomocí diagnostického primeru _GR, přičemž dochází ke vzniku PCR produktu primerů _GR a protisměrného okrajového primeru Fo1 o velikosti 172 bp. Tyto tři reakce umožňují odlišení problematicky detekovatelného genotypu A(1710) + G(1712) od zbylých tří genotypů. V rámci rutinní diagnostiky mutací však není nutné provádět amplifikaci pomocí všech tří variant (A_F, G_F a G_R) diagnostických primerů (viz tab. 7a a 7b).

Rutinní diagnostika

Na základě výše uvedených výsledků je pro rutinní diagnostiku přítomnosti či absence mutací nukleotidů 1710 a 1712 *VmNa* genu **v rámci Evropy** dostačující použití **tří variant diagnostických primerů** (v kombinaci s příslušným protisměrně orientovaným okrajovým primerem Fo1 nebo Ro1) v rámci tří PCR reakcí. Jedná se o primery **CGR**, **GGR** a **AAR** (v modře podbarvených buňkách v tab. 7a a 7b), které určují přítomnost tří typů nukleotidových konstitucí (genotypů) na pozicích 1710 a 1712 (CG, GG a AA), které byly doposud na území Evropy identifikovány.

Pro analýzu populací kleštíků **bez územního omezení** (mimo území Evropy), v místech výskytu mutantních jedinců s nukleotidovou konstitucí A(1710) + G(1712), je možné amplifikační analýzu výskytu bodových mutací rutinně provádět za použití **čtyř diagnostických primerů** (opět v kombinaci s příslušným okrajovým primerem Fo1 nebo Ro1). Jedná o diagnostické primery **AAR**, **CGR**, **GGR** a **G_F**.

Rozpis diagnostiky všech mutantních a *wild-type* variant DNA *VmNa* kanálu v homozygotním i heterozygotním uspořádání (doposud zachycených i teoreticky odvozených), prováděné pomocí vybraných specifických diagnostických primerů, je uvedený níže v tab. 7. Růžově podbarvené heterozygotní genotypy pro varianty GG/AG

a GG/AA, a dále AG/AG a AA/AG od sebe nelze pomocí zde prezentované diagnostické metody odlišit. Heterozygotní genotyp GG/AG (šedá v tab. 7) však nebyl doposud nikdy zachycen. Jedinci s mutantní nukleotidovou konstitucí GG nebo AA se vyskytují na geograficky vzdálených a oddělených územích (GG–Evropa, AG–Amerika), proto není pravděpodobnost vyselektování heterozygotních mutantních jedinců GG/AG zatím příliš vysoká, heterozygotní jedinci mají také sníženou fitness. V případě nerozlišitelných genotypů AG/AG a AG/AA byly varianty zachyceny, u genotypu AG/AA se však jednalo o statisticky nevýznamné zastoupení (González-Cabrera *et al.*, 2016, tab. 1). Proto by tato skutečnost neměla mít vliv na použitelnost prezentované diagnostické metody.

Tabulka 7: Rozkreslení výsledku diagnostické amplifikace čtyř možných homozygotních (**7a**) a šesti heterozygotních (**7b**) variant DNA, lišících se v nukleotidech na pozicích 1710 a 1712 *VmNa* genu kleštíka včelího. Barevné vyznačení: mutace vyskytující se na území Evropy (zelená), diagnostické primery pro diagnostiku v rámci Evropy (modrá) a pro celosvětovou diagnostiku (žlutá), vzájemně nerozlišitelné nukleotidové konstituce (růžová), teoreticky odvozená nukleotidová konstituce (šedá).

Tabulka 7a:

Homozygotní konstituce				Diagnostický primer							
1710	1712	1710	1712	CGR	GGR	AAR	G_F	A_F	C_F	AAF	_GR
				<i>Délka produktů (bp):</i>							
				171	171	173	206	207	206	207	172
C	G	C	G	✓					✓		✓
G	G	G	G		✓		✓				✓
A	A	A	A			✓		✓		✓	
A	G	A	G		✓	✓		✓		✓	✓

Tabulka 7b:

Heterozygotní konstituce				Diagnostický primer							
1710	1712	1710	1712	CGR	GGR	AAR	G_F	A_F	C_F	AAF	_GR
				<i>Délka produktů (bp):</i>							
				171	171	173	206	207	206	207	172
C	G	G	G	✓	✓		✓		✓		✓
C	G	A	A	✓		✓		✓	✓	✓	✓
G	G	A	A		✓	✓	✓	✓		✓	✓
G	G	A	G		✓	✓	✓	✓			✓
C	G	A	G	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓
A	A	A	G		✓	✓		✓		✓	✓

Legenda: Prázdné pole = amplifikace nevede ke vzniku PCR produktu.

Zelený potvrzující znak = amplifikace vede ke vzniku PCR produktu.

Červený potvrzující znak = amplifikace vede ke vzniku PCR produktu, k čemuž nemá docházet.

5.5 Tříprimerová PCR amplifikace

Při určování nukleotidových variant na pozicích 1710 a 1712 mají být, dle počátečního návrhu diagnostické metody, jednotlivé diagnostické primery schopny amplifikace DNA, která bude prováděna za použití tříprimerové PCR směsi sestávající z diagnostického primeru a dvou vzájemně protisměrně orientovaných okrajových primerů. Všechny tři primery (dva okrajové a jeden primer diagnostický) budou tedy přítomny společně v jedné PCR reakční směsi a společně se budou podílet na vzniku 1 (kontrolního) či 2 (kontrolního + diagnostického) PCR produktů v rámci jedné reakce. Dva PCR produkty vznikají v případě amplifikace DNA za účasti všech tří primerů: 1) dvojice okrajových primerů (Fo1 + Ro1), a 2) diagnostického primeru (zcela komplementárního na svém 3'-konci k nukleotidu 1710 respektive 1712 v templátové

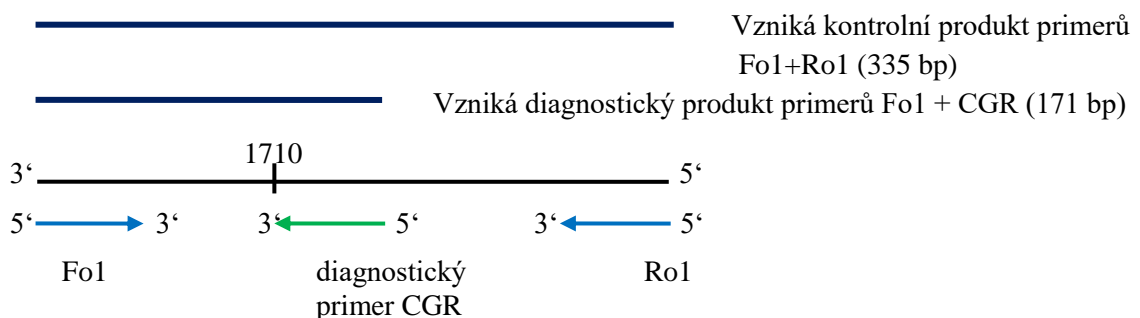
DNA) a k němu protilehlého okrajového primeru (např. CGR + Fo1 v případě amplifikace *wild-type* DNA s cytosinem na pozici 1710 v kódujícím vlákně templátu).

U amplifikace DNA provedené klasicky pomocí dvojice protihlehlých primerů (diagnostický + protisměrně orientovaný okrajový primer) není v případě nepřítomnosti amplifikačního PCR produktu možné spolehlivě určit, z jakého důvodu k této situaci došlo. Tedy zda za negativním výsledkem amplifikace stojí nekomplementarita diagnostického primeru s templátovou DNA, kontaminace PCR směsi, chyba v pipetování, nevhodné nastavení termocykléru nebo jiný faktor bránící úspěšné amplifikaci templátu.

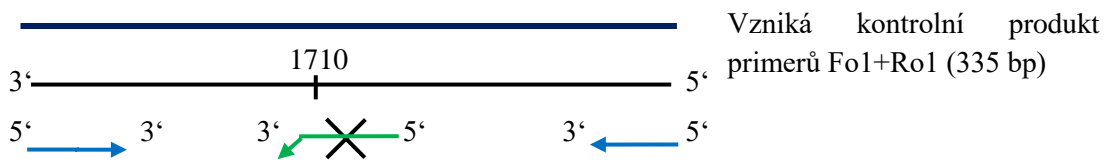
V případě tříprimerové amplifikace DNA dávají okrajové primery Fo1 + Ro1 vzniknout PCR produktu (kontrolní, 335 bp) nezávisle na přítomnosti či nepřítomnosti mutace kteréhokoliv z nukleotidů 1710 nebo 1712 (obr. 4). PCR produkt primerů Fo1 + Ro1 slouží k potvrzení, že amplifikace DNA pomocí diagnostického primeru v dané reakční směsi je teoreticky možná a nebrání jí např. nízká koncentrace nebo kvalita templátové DNA.

Obrázek 4: Princip PCR amplifikace DNA pomocí PCR reakční směsi obsahující tři primery v případě amplifikace: a) templátové DNA komplementární s 3'-koncem diagnostického primeru, a b) templátové DNA, která není komplementární s 3'-koncem diagnostického primeru. Demonstrováno pro průběh amplifikace *wild-type* DNA pomocí trojice primerů obsahující a) *wild-type* diagnostický primer a b) diagnostický primer pro určení mutantní varianty DNA. Převzato a upraveno podle Lahnerová (2017).

a) Amplifikací *wild-type* DNA nezměněné mutací vznikají 2 různé PCR produkty pomocí dvojic primerů Fo1 + CGR a Fo1 + Ro1 (všechny tři primery přítomny v PCR reakční směsi).



b) Amplifikaci wild-type DNA nezměněné mutací vzniká 1 PCR produkty pouze pomocí dvojice primerů Fo1 + Ro1 (kontrolní PCR produkt). Diagnostický primer GGR je přítomen v PCR reakční směsi, ale není na svém 3'-konci komplementární s templátovou DNA, proto nevzniká 171 bp dlouhý diagnostický PCR produkt.



Amplifikace vzorku DNA pomocí PCR reakční směsi obsahující tři primery musí být prováděna pomocí enzymu DNA polymerázy bez exonukleázové aktivity. V případě nasednutí všech tří primerů (dvojice okrajových primerů Fo1 + Ro1 a komplementárního diagnostického primeru) by docházelo při prodlužování okrajového primeru Ro1 k odbourání diagnostického primeru CGR o stejné orientaci (obr. 4a). Diagnostický primer (CGR) by v tomto případě bránil DNA polymeráze prodlužující okrajový primer (Ro1) pokračovat v amplifikaci, a tudíž by byl její 5'→3' exonukleázovou aktivitou odstraněn. Nedocházelo by tak ke vzniku diagnostického PCR produktu (primerů Fo1 + CGR) a byl by získán falešně negativní výsledek amplifikace.

5.5.1 Diagnostika rezistence kleštíka včelího k *tau*-fluvalinátu pomocí tříprimerové PCR amplifikace

Následně byla provedena finální optimalizace podmínek diagnostické PCR reakce v tříprimerovém uspořádání. Jak bylo zmíněno výše v textu, tříprimerová PCR reakční směs vždy sestávala z dvojice okrajových primerů Fo1 a Ro1 (případně dvojice okrajových primerů V10F a V11R v případě amplifikace cDNA) a jednoho z k finální diagnostice vybraných diagnostických primerů (A_F, G_F, AAR, _GR, CGR nebo GGR). Celkové složení jednotlivých komponent PCR reakční směsi obsahující tři primery je uvedeno na str. 27 v tabulce 3 (kapitola 4.3 PCR amplifikace DNA kleštíka včelího).

Amplifikací DNA za použití tříprimerové PCR reakční směsi obsahující plně komplementární variantu diagnostického primeru docházelo ke vzniku dvou PCR produktů (kontrolního 335 bp + diagnostického 171, 173 nebo 206 bp v závislosti na konkrétní variantě a *forward* nebo *reverse* orientaci tohoto primeru). Intenzita obou vzniklých PCR produktů byla po elektroforetické separaci a následné vizualizaci stejná, případně vyšší u kratšího (diagnostického) ze dvou vzniklých PCR produktů. V případě, kdy měla amplifikovaná templátová DNA sníženou kvalitu (částečně degradovaná DNA

izolovaná z poškozených kleštíků), docházelo ojediněle pouze ke vzniku kratšího (diagnostického) PCR produktu diagnostického + protisměrného okrajového primeru.

Při amplifikaci vzorků DNA z kleštíků odebraných na území České republiky docházelo ke tvorbě dvou PCR produktů (kontrolního a diagnostického) v případě amplifikace *wild-type* DNA o nukleotidové konstituci C(1710) + G(1712) za použití tříprimerové reakční směsi obsahující diagnostický primer CGR (obr. 5, vzorek 1A). Dále docházelo ke vzniku kontrolního a diagnostického PCR produktu po amplifikaci mutantní DNA o konstituci G(1710) + G(1712) pomocí tříprimerové reakční směsi obsahující diagnostický primer GGR (obr. 5, vzorek 2B) nebo primer G_F (335 + 206 bp). Jiné nukleotidové konstituce než tyto (v homozygotní sestavě) nebyly na území České republiky zachyceny.

Po amplifikaci DNA prováděné pomocí tříprimerové PCR reakční směsi obsahující na 3'-konci nekomplementární diagnostický primer docházelo ke vzniku pouze jednoho PCR produktu (kontrolního) vytvořeného dvojicí okrajových primerů Fo1 + Ro1 (délka 335 bp) (obr. 5, vzorky 1B a 2B). Ten se tvořil také po amplifikaci vzorků DNA kleštíků z České republiky prováděné pomocí tříprimerových PCR reakčních směsí obsahujících diagnostický primer AAR.

Obrázek 5: Diagnostická tříprimerová amplifikace 2 typů DNA molekul kleštíka včelího zachycených na území České republiky. Vzorky 1A a 1B náleží *wild-type* DNA o nukleotidové konstituci C(1710) + G(1712), vzorky 2A a 2B náleží mutantní DNA o konstituci G(1710) + G(1712), které způsobují aminokyselinovou substituci L925V, působící rezistenci kleštíka k *tau*-fluvalinátu. Jedná se o homozygoty pro tyto nukleotidové mutace. Číslice 1 a 2 označují číslo vzorku, písmena A a B složení primerů v PCR reakční směsi.



Legenda: viz další strana

Legenda: M...velikostní standard 100 bp.

1...vzorek DNA č. 1 (wild-type DNA).

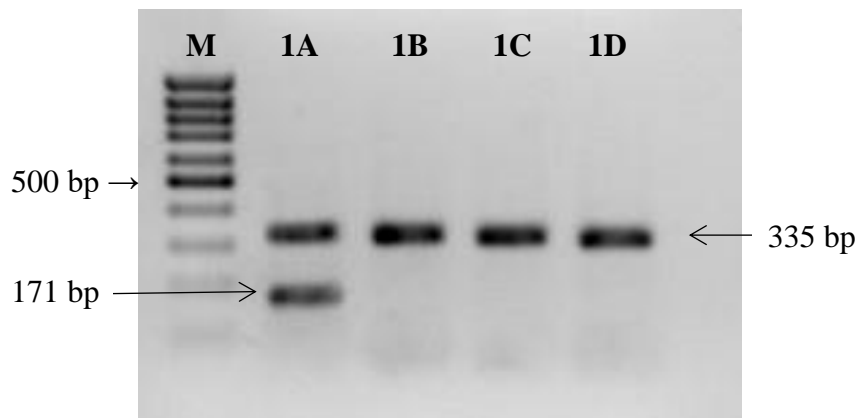
2...vzorek DNA č. 2 (mutantní DNA).

*A...PCR směs obsahuje primery Fo1 + **CGR** + Ro1 (určuje wild-type nukleotidovou konstituci C(1710) + G(1712)).*

*B...PCR směs obsahuje primery Fo1 + **GGR** + Ro1 (určuje mutantní nukleotidovou konstituci G(1710) + G(1712)).*

Na obr. 6 je vyobrazena amplifikace jednoho vzorku DNA pocházejícího z kleštíka odebraného v České republice. Pro amplifikaci byly v rámci tříprimerových reakčních směsí použity postupně všechny čtyři varianty diagnostických primerů (postupně CGR, GGR, AAR nebo G_F), všechny PCR reakční směsi obsahovaly také okrajové primery Fo1 + Ro1. Analyzovaná DNA na obr. 6 nenese mutaci způsobující rezistenci kleštíka k *tau*-fluvalinátu, jedná se o *wild-type* DNA, a proto dochází ke vzniku diagnostického PCR produktu pouze u reakční směsi obsahující diagnostický primer CGR (171 bp).

Obrázek 6: Vzorek DNA (č. 1, *wild-type* DNA) podrobený amplifikaci pomocí tříprimerových PCR reakčních směsí obsahujících diagnostický primer CGR, GGR, AAR nebo G_F (postupně 1A, 1B, 1C, 1D) v kombinaci s okrajovými primery Fo1 + Ro1.



Legenda: M...velikostní standard 100 bp.

1...vzorek DNA č. 1.

*A...PCR směs obsahuje primery Fo1 + **CGR** + Ro1 (určuje wild-type DNA C(1710) + G(1712)).*

*B...PCR směs obsahuje primery Fo1 + **GGR** + Ro1 (určuje mutantní DNA G(1710) + G(1712)).*

*C...PCR směs obsahuje primery Fo1 + **AAR** + Ro1 (určuje mutantní DNA A(1710) + A(1712)).*

*D...PCR směs obsahuje primery Fo1 + **G_F** + Ro1 (určuje mutantní DNA G(1710)).*

Diagnostická analýza přítomnosti bodových mutací pomocí tříprimerových reakčních směsí byla kromě vzorků genomické DNA z kleštíků z České republiky prováděna rovněž se vzorky genomické DNA kleštíků o homozygotní nukleotidové konstituci (genotypu) pro A(1710) + A(1712) a heterozygotní konstituci C(1710) + G(1712)/A(1710) + A(1712) zachycených na území Řecka (amplifikace pomocí reakčních směsí obsahujících okrajové primery Fo1 + Ro1 a postupně jeden ze specifických diagnostických primerů). Tříprimerové diagnostické analýze byly podrobeny rovněž vzorky cDNA pocházející z USA (homozygotní nukleotidové konstituce), v rámci tříprimerových reakčních směsí však byly okrajové primery Fo1 + Ro1 (amplifikují genomickou DNA) nahrazeny primery V10F + V1R, které umožňují amplifikaci cDNA molekul. Amplifikace vzorků cDNA dávala i po změně varianty okrajových primerů (v kombinaci s primery diagnostickými) výsledky konzistentní s výsledky amplifikace získanými při použití Fo1 a Ro1 okrajových primerů (s kombinací se stejnými diagnostickými primery) pro amplifikaci genomické DNA.

5.5.2 Reakční podmínky tříprimerové PCR amplifikace

Jako optimální T_a pro amplifikaci DNA pomocí PCR reakční směsi obsahující tři primery byla určena T_a 60 °C, stejně jako v případě amplifikace dvouprimerové. Se zvyšující se teplotou *annealingu* docházelo ke snižování intenzity v gelu vizualizovaných PCR produktů, především produktu primerů Fo1 + Ro1 (kontrolní, 335 bp). Jako maximální vhodná T_a pro amplifikaci DNA pomocí tříprimerové PCR reakční směsi (Fo1 + Ro1 + diagnostický primer) byla určena T_a 64 °C. Při vyšších teplotách *annealingu* byl výsledek amplifikace DNA nehodnotitelný.

Zvýšením koncentrace hořčnatých iontů v PCR reakční směsi nedošlo k výrazné změně intenzity vizualizovaných bandů. V rámci zachování vysoké specifity diagnostické metody tedy byla jako ideální určena koncentrace hořčnatých iontů v PCR reakční směsi na 1,8 mmol/l.

K významné změně intenzity vizualizovaných PCR produktů (zvýšení intenzity kontrolního produktu okrajových primerů o délce 335 bp) nedošlo ani v případě úpravy vzájemného poměru tří primerů obsažených v jedné PCR reakční směsi. Testovány byly tyto vzájemné poměry primerů:

- a) Fo1 : diagnostický primer F : Ro1 (v tomto pořadí) - 1:1:1, 1:1:2, 1:1:3, 2:1:1, 3:1:1.
- b) Fo1 : diagnostický primer R : Ro1 (v tomto pořadí) - 1:1:1, 1:1:2, 1:1:3, 2:1:1, 3:1:1.

Nejlépe hodnotitelný výsledek amplifikace DNA byl získán při zastoupení primerů Fo1:diagnostický primer:Ro1 v PCR reakční směsi, které bylo **1:1:1**.

Po optimalizaci tříprimerové diagnostické metody s DNA vyizolovanou z jednoho kleštíka byla provedena analýza rozlišovací schopnosti této metody při amplifikaci směsných vzorků DNA. Směsné vzorky DNA byly vytvořeny smísením vzorků DNA se známou nukleotidovou konstitucí (*wild-type* a mutantní) na pozicích 1710 a 1712 genu pro sodíkový kanál. Jednotlivé směsné vzorky se lišily ve zájemném poměru zastoupení mutantní a *wild-type* DNA. Byly testovány směsné vzorky obsahující mutantní a *wild-type* DNA v poměrech 1:1, 1:2, 1:4, 1:6, 1:9, 1:11 a 1:14.

Po amplifikaci všech směsných vzorků DNA bylo zjištěno, že je možné spolehlivě stanovit přítomnost mutantních molekul DNA, jestliže se tyto nacházejí ve směsi s *wild-type* DNA ve vzájemném poměru **1:4** (separace v 1,5% agarózovém gelu, vizualizace dokumentačním systémem G:Box (Syngene) po barvení GoodView Nucleic Acid Stain (Sigma-Aldrich)). Při použití barviva s vyšší rozlišovací schopností (nižším detekčním limitem) v porovnání s barvivem GoodView (např. ethidium bromid nebo GelRed), je možné detekovat přítomnost mutantních molekul DNA, které jsou ve směsi s *wild-type* molekulami ve vzájemném poměru až 1:9. V tomto případě je však výrazně omezena možnost rozlišení přítomnosti mutace v rámci heterozygotní nukleotidové konstituce. Během rutinní laboratorní diagnostiky je tedy vhodnější provádět analýzu rezistence kleštíků k *tau*-fluvalinátu na vzorcích DNA jednotlivců (pro charakterizaci konkrétní heterozygotní konstituce) nebo na směsných vzorcích DNA vyizolované z 5 jedinců.

5.5.3 Detekce rezistence kleštíka včelího k *tau*-fluvalinátu pomocí tříprimerové PCR amplifikace na vzorcích DNA z ČR

Detekce rezistence kleštíka včelího k *tau*-fluvalinátu (v rámci ČR) byla provedena na vzorcích DNA (směsných nebo z jednotlivců) z celkového počtu 22 sběrných stanovišť v okresech Frýdek-Místek, Chrudim, Šumperk a Znojmo (tab. 2). Všechny analyzované vzorky DNA izolované z jednoho jedince byly homozygotní konstituce. Analýza neodhalila přítomnost rezistentních kleštíků na stanovištích v okresech Frýdek-Místek, Chrudim a Znojmo, i když jsou na těchto stanovištích k léčebnému ošetření včelstev pravidelně používány varroacidní přípravky obsahující *tau*-fluvalinát.

Rezistentní kleštíci byli identifikováni na třech odběrových stanovištích v lokalitě Pokusného včelínu Pekařov (okres Šumperk). Jednalo se o stanoviště A (1. sběr po ošetření *tau*-fluvalinátem, 2. sběr po ošetření amitrazem), stanoviště C (sběr po ošetření flumethrinem) a stanoviště D (1. sběr po ošetření flumethrinem, 2. sběr po ošetření amitrazem) (tab. 2). Všichni testovaní rezistentní jedinci nesli ve své DNA mutaci G(1710) ve *VmNa* genu. V rámci 1. sběru kleštíků na stanovišti A byli tříprimerovou diagnostickou analýzou identifikováni rovněž vnímaví kleštíci mající *wild-type* DNA, ve které se na nukleotidové pozici 1710 nachází cytosin C(1710). Žádný rezistentní kleštík nebyl identifikován analýzou jedinců pocházejících ze stanoviště B, které bylo ošetřováno pouze organickými kyselinami (kyselina mravenčí a šťavelová). Všichni kleštíci ze stanoviště B měli *wild-type* variantu DNA s C(1710).

5.6 Sekvenace vybraných vzorků vyizolované DNA pro potvrzení spolehlivosti diagnostické metody

Z důvodu finálního ověření spolehlivosti tříprimerové diagnostické metody bylo doplňkově sekvenováno 6 vybraných vzorků DNA, které byly určeny pomocí tříprimerové diagnostické metody a Certifikované metodiky pro hodnocení rezistence roztoče *Varroa destructor* vůči *tau*-fluvalinátu (Hubert *et al.*, 2018) jako *wild-type* nebo mutantní. Pro analýzu výstupu získaného sekvenátorem byl použit program Mega7 (Kumar *et al.*, 2016). Sekvenované PCR produkty délky 335 bp byly získány amplifikací templátové DNA pomocí primerů Fo1 + Ro1.

U tří ze šesti vzorků DNA byla sekvenací určena homozygotní konstituce pro C(1710) + G(1712), odpovídající *wild-type* variantě DNA. U zbývajících tří vzorků byla sekvenací určena homozygotní konstituce pro G(1710) + G(1712) odpovídající mutantní variantě DNA zachycené na území České republiky. Nukleotidové konstituce šesti vzorků DNA určené sekvenací odpovídají týmž, které byly u těchto vzorků určeny pomocí naší diagnostické tříprimerové metody a Certifikované metodiky (Hubert *et al.*, 2018) v rámci rozlišení *wild-type* a mutantních molekul.

Diagnostickou tříprimerovou detekční metodu, jejíž spolehlivost byla ověřena sekvenací zájmových úseků *VmNa* genu a Certifikovanou metodikou (Hubert *et al.*, 2018), lze tedy spolehlivě použít pro určení přítomnosti či absence bodových mutací nukleotidů 1710 a 1712 ve *VmNa* genu, tedy *wild-type* a mutantních variant DNA kleštíka včelího, které vedou k jeho vnímavosti či rezistenci k varroacidní látce *tau*-fluvalinátu.

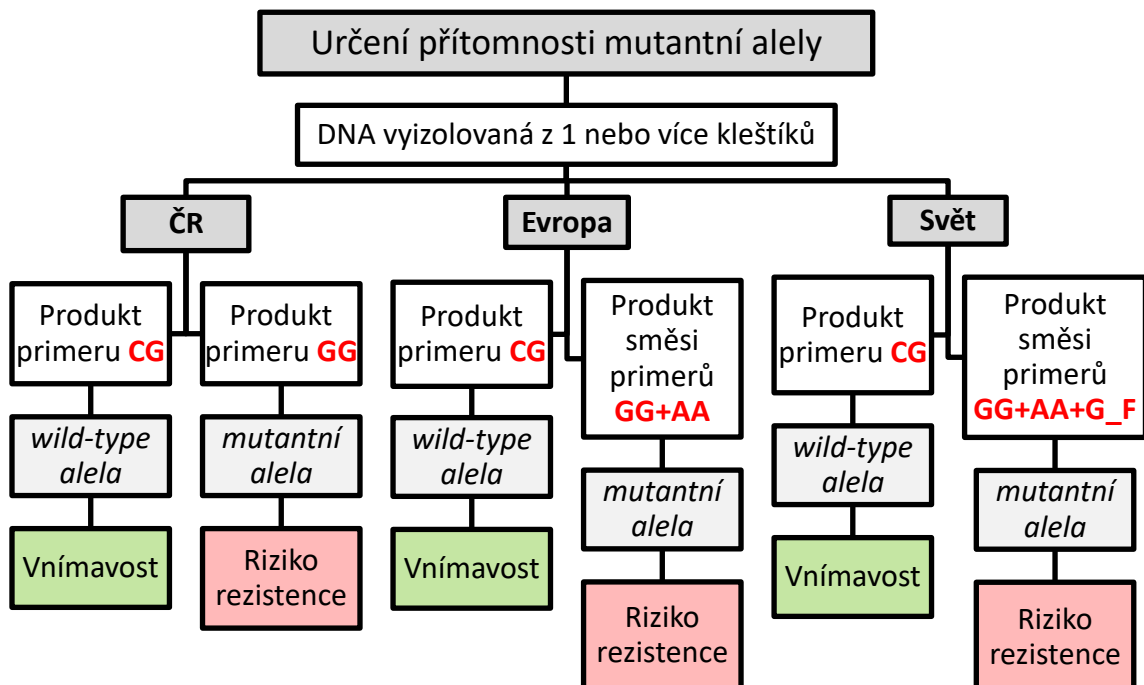
5.7 Tříprimerová alelicky specifická PCR diagnostická metoda (3-PAS PCR) k určování rezistence kleštíka včelího k *tau*-fluvalinátu

Tato kapitola stručně shrnuje postup při diagnostice rezistence kleštíka včelího k *tau*-fluvalinátu pomocí tříprimerové PCR, pro níž byl vytvořen oficiální název Tříprimerová alelicky specifická PCR (3-PAS-PCR, *3-primere* *allele specific polymerase chain reaction*). K diagnostice rezistence je potřeba 6 specifických primerů.

Uživatelům 3-PAS-PCR metody je při analýze vzorků genomické DNA doporučen následující pracovní postup:

1. Izolace genomické DNA (komerční kit, fenol-chloroformová metoda atd.)
2. Výběr postupu diagnostiky na základě původu kleštíků a očekávané komplexnosti získaných výsledků analýzy: určení přítomnosti mutantní alely (podle **schématu A**), nebo rezistence/vnímavosti či konkrétního genotypu (podle **schématu B**).

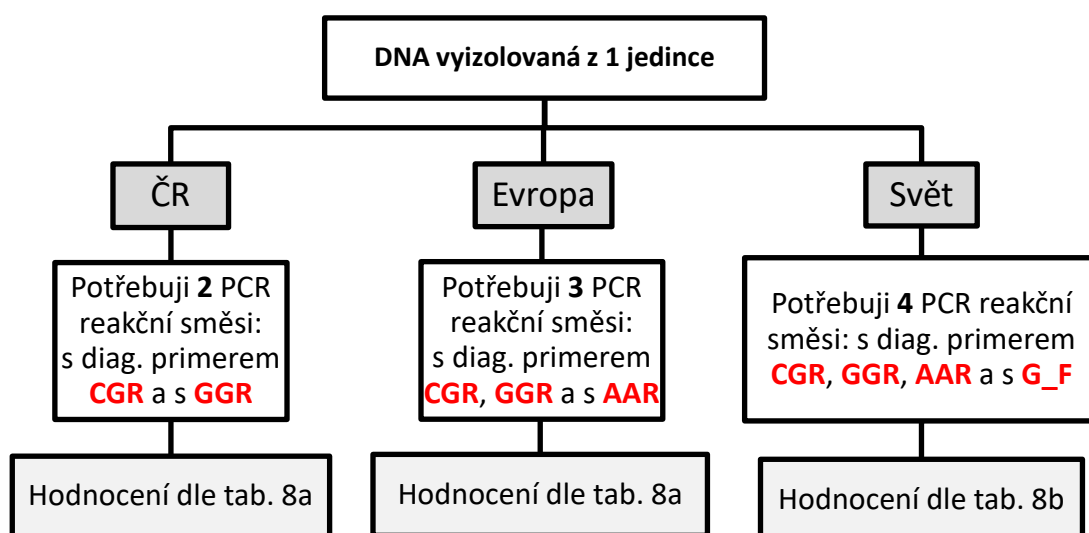
Schéma A: Hodnocení rizika rezistence kleštíka včelího k *tau*-fluvalinátu na základě přítomnosti mutantní alely analýzou DNA z jednoho nebo z více kleštíků. Diagnostické primery jsou červeně vyznačeny.



Každá PCR reakční směs obsahuje navíc kromě diagnostického(ckých) primeru(ů) dvojici okrajových primerů *Fo1* + *Ro1* tvořících kontrolní PCR produkt.

V případě zjišťování pouze přítomnosti mutanční alely (schéma A) je pro maximální zjednodušení analýzy možné připravit dvě primerové směsi: 1. obsahující okrajové primery *FoI+RoI* a diagnostický primer *CGR* pro určení wild-type DNA, 2. obsahující okrajové primery *FoI+RoI* a všechny 3 diagnostické primery pro mutanční DNA (*GG*, *AA* a *G_F* v závislosti na geografickém původu vzorků (ČR, Evropa nebo svět)). Základní složení PCR reakční směsi uvedené ve schématu C je pak nutné upravit v závislosti na konečném objemu všech obsažených primerů. Je nutné pipetovat 0,55 μ l každého z primerů (koncentrace každého 10 μ mol/l) pro 1 reakci, objem deionizované vody doplnit do 10 μ l celkového objemu reakce, objem ostatních složek směsi zůstává nezměněný. Po detekci přítomnosti mutanční alely je možné provést následnou amplifikaci (dle schématu B) pro určení konkrétní varianty mutace.

Schéma B: Určení genotypu a související vnímavosti či rezistence kleštíků včelích vůči tau-fluvalinátu u jedinců odebraných v ČR, Evropě nebo mimo území Evropy. Diagnostické primery jsou červeně vyznačeny.



*... Každá tříprimerová PCR reakční směs obsahuje kromě jednoho diagnostického primeru dvojici okrajových primerů *FoI + RoI* tvořících kontrolní PCR produkt.

V případě analýzy vzorku DNA izolované z jednoho kleštíka je možné určit přítomnost/nepřítomnost mutace a její konstituci (homozygotní/heterozygotní). V případě izolace směsné DNA (z 2–5 kleštíků) je možné zachytit přítomnost mutace v tomto vzorku DNA, ne však její konstituci.

3. Příprava PCR reakční směsi (schéma C). Rozpis je uveden pro 6 reakcí, výsledný objem jedné reakce je 10 μ l (9 μ l PCR reakční směs + 1 μ l DNA).

Nastavení časového a teplotního profilu PCR amplifikace na termocykléru je uvedeno ve schématu D.

Schéma C: Složení PCR reakční směsi.

Složky PCR reakční směsi	6 reakcí (μl)
Deionizovaná voda	41,1
Reakční pufr 10x	6,7
Roztok MgCl ₂ (25 mmol/l)	8,0
Roztok dNTPs (20 mmol/l)	0,7
Primer Fo1 (10 μmol/l)	3,3
Primer Ro1 (10 μmol/l)	3,3
Primer diagnostický (10 μmol/l)	3,3
<i>aTaq</i> DNA polymeráza (5 U/μl)	1,0
DNA templát (10 ng)	1,0

Schéma D: Teplotní a časový profil PCR reakce.

1. 94 °C 5 min
 2. 94 °C 30 s
 - 60 °C 30 s
 - 72 °C 30 s
 3. 72 °C 7 min
- } 35 cyklů

4. Elektroforetická separace PCR produktů v 1,5% agarózovém gelu, 45 min, 80 V, vizualizace výsledků.
5. Hodnocení rezistence dle tabulky 8a (Evropa, příp. jen ČR) a 8b (celosvětově).

Tabulka 8a: Hodnocení rezistence kleštěníka včelího vůči *tau*-fluvalinátu na území Evropy na základě přítomnosti diagnostických PCR produktů vzniklých amplifikací jeho DNA.

Nukleotidová pozice				Aminokyselina (pozice 925)	Produkt PCR reakce s diagnostickým primerem:			Rezistence
1710	1712	1710	1712		CGR	GGR	AAR	
					Délka produktů (bp)			
					171	171	173	
Homozygoti				ČR				
C	G	C	G	L / L	✓			NE
G	G	G	G	V / V		✓		ANO
A	A	A	A	I / I			✓	ANO
Heterozygoti								
C	G	G	G	L / V	✓	✓		Riziko
C	G	A	A	L / I	✓		✓	Riziko
G	G	A	A	V / I		✓	✓	Riziko

Tabulka 8b: Hodnocení rezistence kleštíka včelího vůči *tau*-fluvalinátu bez územního omezení na základě přítomnosti diagnostických PCR produktů vzniklých amplifikací jeho DNA.

Nukleotidová pozice				Aminokyselina (pozice 925)	Produkt PCR reakce s diagnostickým primerem:				Rezistence
1710	1712	1710	1712		CGR	GGR	AAR	G_F	
					Délka produktů (bp)				
					171	171	173	206	
Homozygoti									
C	G	C	G	L / L	✓				NE
G	G	G	G	V / V		✓		✓	ANO
A	A	A	A	I / I			✓		ANO
A	G	A	G	M / M		✓	✓		ANO
Heterozygoti									
C	G	G	G	L / V	✓	✓		✓	Mutantní alela
C	G	A	A	L / I	✓		✓		Mutantní alela
C	G	A	G	L / M	✓	✓	✓		Mutantní alela
G	G	A	A	V / I		✓	✓	✓	ANO
G	G	A	G	V / M*		✓	✓	✓	ANO
A	A	A	G	I / M		✓	✓		ANO

Legenda: Prázdné pole = amplifikace nevede ke vzniku diagnostického PCR produktu.

Zelený potvrzující znak = amplifikace vede ke vzniku diagnostického PCR produktu.

Červený potvrzující znak = amplifikace vede ke vzniku nespecifického PCR produktu.

* teoreticky odvozená kombinace mutantních nukleotidových variant.

6 Diskuze

Cílem této diplomové práce byl návrh, tvorba a následná optimalizace diagnostické metody, která by umožnila rutinní diagnostiku rezistence kleštíka včelího (*Varroa destructor*) k *tau*-fluvalinátu. Tato rezistence je způsobována bodovými mutacemi nukleotidů 1710 a 1712 ve *VmNa* genu, které by mělo být možné navrženou diagnostickou metodou, využívající tříprimerové PCR amplifikace se specifickými diagnostickými primery, snadno a účinně detekovat. Diagnostické primery umožňují diskriminaci mutací prostřednictvím detekce komplementarity jejich 3'-koncevého nukleotidu a odpovídajícího, potenciálně mutací změněného nukleotidu v templátové DNA, na který 3'-koncevý nukleotid diagnostického primeru nasedá.

6.1 Izolace genomické DNA kleštíka včelího

Kleštíci odebraní ve včelí měli byli od nečistot očištěni pomocí flotační metody v 96% ethanolu. Ten může být nahrazen také stolním olejem (Návrátil *et al.*, 2012). Vzhledem k tomu, že kleštíci byli dále podrobeni izolaci DNA, nebylo použití stolního oleje jako flotační tekutiny vhodné.

Izolace genomické DNA byla prováděna za použití izolačního kitu ExgeneTM Genomic DNA micro (GeneAll) a protokolu pro izolaci genomické DNA z vlasů a nehtů. V izolačním protokolu byl změněn poslední krok - vymytí DNA zachycené na membráně izolační kolony pomocí AE pufru (10 mmol/l Tris-HCl; 0,5 mmol/l EDTA, pH 9,0). Tento vymývací pufr byl nahrazen deionizovanou vodou, jelikož byly vzorky DNA dále sekvenovány a použití AE pufru proto nebylo vhodné (obsah solí). PCR amplifikace provedená se vzorky DNA rozpuštěnými v deionizované vodě místo AE pufru také dávala po amplifikaci vzniknout intenzivnějším PCR produktům.

Izolace DNA byla rovněž zkušebně provedena pomocí fenol-chloroformové metody, která je v Laboratoři populační genetiky (Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UPOL) rutinně používána k izolaci genomické DNA z ptáčích erytrocytů. Porovnáním úspěšnosti izolace DNA touto metodou a pomocí komerčně vyráběného kitu nebyly ve výtěžnosti zaznamenány významné rozdíly. Vzhledem k relativně vysoké toxicitě chemikálií používaných při izolaci DNA fenol-chloroformovou metodou byl dále pro izolaci DNA používán uvedený komerční kit.

Genomická DNA byla izolována z 1, 5, 10 nebo 50 dospělých samic kleštíka včelího. Samci nebyli pro izolaci použiti, jelikož se ve včelí měli nacházet v minimálním

počtu, dosahují menší velikosti a jejich haploidní genom ($n=7$) obsahuje pouze poloviční množství genomické DNA (Martin *et al.*, 1997).

Směsné vzorky obsahující DNA z více individuí byly použity pro základní optimalizaci diagnostické metody, která vyžadovala provedení většího množství zkušebních reakcí. Množství DNA získané z jednoho individua (kleštíka) je omezené. Vzorky DNA pocházející z jednoho jedince byly použity pro výběr nejvhodnějších diagnostických primerů a optimalizaci tříprimerové PCR amplifikace. Pro rutinní diagnostiku rezistence kleštíka včelího k *tau*-fluvalinátu je vhodné použít vzorek DNA izolované z jednotlivce či směsný vzorek DNA pocházející z 5 až maximálně 10 jedinců. Počet 10 kleštíků pro izolaci genomické DNA používají ve svých pracích také autoři Hubert *et al.* (2018), kteří prezentují možnost detekce rezistence kleštíků k *tau*-fluvalinátu pomocí restrikčního štěpení. Autoři Millán-Leiva *et al.* (2018) využívající pro detekci rezistence rovněž restrikční štěpení izolují genomickou DNA z jednoho jedince.

6.2 Roztřídění vzorků DNA podle přítomnosti či absence bodové mutace, restrikční štěpení

Před samotnou analýzou specifity navržených okrajových a diagnostických primerů bylo potřeba provést základní roztřídění vzorků vyizolované DNA kleštíků podle rezistence k *tau*-fluvalinátu (tedy přítomnosti či absence mutace nukleotidu 1710 či 1712). Vzhledem ke geografickému umístění stanovišť, ze kterých byly odebírány vzorky kleštíků, by mělo značně převažovat množství kleštíků vnímavých (*wild-type* DNA). Oblasti odběru vzorků doposud nejsou rezistencí k *tau*-fluvalinátu výrazně postiženy, jak dokazují pozorování místních včelařů. Ke spolehlivému určení stavu rezistence ve zmíněných lokalitách však chybí větší množství podrobnějších dat (Kamler *et al.*, 2016; Stará *et al.*, 2019). Stav rezistence kleštíků k *tau*-fluvalinátu ve zmíněných oblastech není zanesen ani v online databázi vytvořené Státní veterinární správou (Anonymous7, 2019), ve které jsou shromažďována data o rezistenci kleštíků k varroacidům získaná touto organizací.

Základní roztřídění vzorků DNA podle přítomnosti či absence mutace nukleotidu 1710 (či 1712) bylo provedeno pomocí Certifikované metodiky pro hodnocení rezistence roztoče *Varroa destructor* vůči *tau*-fluvalinátu (Hubert *et al.*, 2018). V rámci uvedené metodiky je využito restrikčního štěpení naamplifikovaného úseku DNA enzymem *SacI*, který rozeznává palindromický motiv GAGCT/C a štěpí *wild-type* variantu vlákna DNA mezi nukleotidovými pozicemi 1709 a 1710. Stejný princip možnosti určení mutace

nukleotidu 1710, za využití aktivity enzymu *SacI* rozeznávajícího totéž restriční místo, byl v témže roce publikován i autory Millán-Leiva *et al.* (2018). Metodiky obou autorských kolektivů se výrazněji liší pouze ve dvojici primerů, které jsou využity k amplifikaci zájmového úseku *VmNa* genu, který má být rozštěpen (obr. 7 viz níže v textu).

Po restriční analýze byly vzorky DNA ze všech chovných soukromých stanovišť ohodnoceny jako *wild-type* bez mutace (vnímavé populace). Rozsáhlá rezistence k *tau*-fluvalinátu však byla potvrzena u naprosté většiny vyselektovaných vzorků, které byly odebrány RNDr. Františkem Kašparem v lokalitách Pokusného včelínu Pekařov (Anonymous8, 2019). V rámci tohoto detašovaného pracoviště Výzkumného ústavu včelařského v Dole je prováděn výzkum rezistence kleštíků k syntetickým varroacidům a selekce včelstev odolných vůči napadení kleštíkem. Rezistentní populace kleštíků jsou zde v omezeném počtu udržovány.

6.3 Návrh okrajových a diagnostických primerů

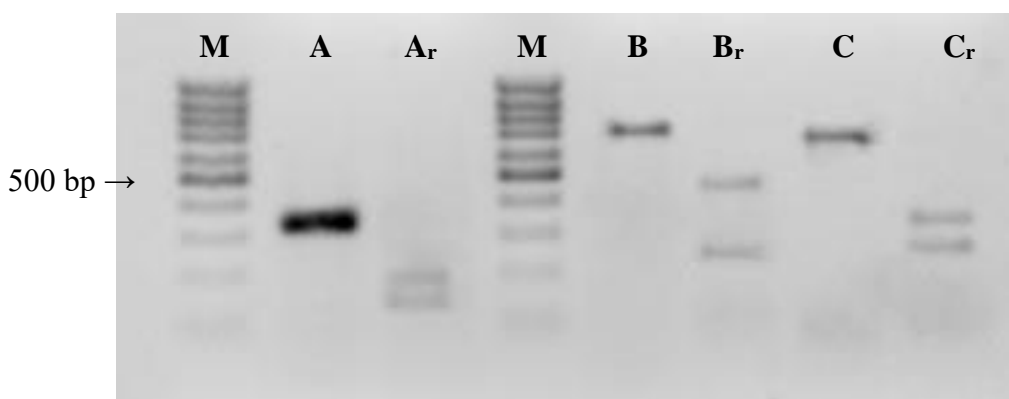
Všechny primery používané v rámci této diplomové práce byly navrhovány pomocí programu Primer3 (Rozen *et Skaletsky*, 2000). Při návrhu okrajových primerů bylo cílem získat takovou primerovou dvojici, která bude amplifikovat templátovou DNA bez současného vzniku nespecifických PCR produktů. Amplifikace DNA touto dvojicí primerů by rovněž měla vést ke vzniku velkého množství DNA kopií, ideálně kopírující exponenciální závislost $x \cdot 2^n$, kde x je počáteční množství molekul templátové DNA vstupujících do reakce a n je počet amplifikačních cyklů. Pokud by amplifikace templátové DNA vybranou primerovou dvojicí měla nízkou výtěžnost, nebylo by možné tuto primerovou dvojici v rámci tříprimerové PCR reakční směsi použít pro vznik kontrolního PCR produktu. Během tříprimerové PCR amplifikace totiž dochází ke snížení množství vznikajícího PCR produktu okrajových primerů ve prospěch kratších amplikonů diagnostického primeru (+ protisměrně orientovaného primeru okrajového). Výsledek amplifikace by tudíž nebyl hodnotitelný z důvodu nízké intenzity vizualizovaných PCR produktů.

Kvalita a výtěžnost PCR amplifikace dvojicemi okrajových primerů (celkem 4 dvojice) byla rovněž porovnávána s inzenzitou vizualizovaných PCR produktů, které byly získány amplifikací DNA pomocí dvojic primerů navržených Hubertem *et al.* (2018) a Millán-Leiva *et al.* (2018). Jako nejvhodnější byla vybrána dvojice okrajových primerů Fo1+Ro1 (PCR produkt délky 335 bp). Výsledek amplifikace je viditelný na obrázku 7.

Vzhledem k téměř dvojnásobné délce PCR produktů primerové dvojice 1,273iR + 1,273iF (PCR produkt délky 701 bp) (Millán-Leiva *et al.*, 2018) i dvojice v1440f + v2022r (PCR produkt délky 603 bp) (Hubert *et al.*, 2018), jsou jejich PCR produkty po vizualizaci intenzitou asi poloviční.

Pro tříprimerovou diagnostiku rezistence kleštíků k *tau*-fluvalinátu je vhodné pracovat s takovou dvojicí okrajových primerů, která vede ke vzniku výrazného, intenzivního PCR produktu.

Obrázek 7: Porovnání intenzity vizualizovaných PCR produktů amplifikace vzorku *wild-type* DNA kleštíka včelího pomocí okrajových primerů Fo1 + Ro1 (A) a dalších autorů Millán-Leiva *et al.* a Huberta *et al.* (B a C). Vzorky A–C nesoucí navíc označení spodním indexem A_r–C_r byly podrobeny restričnímu štěpení enzymem *Sac*I, který štěpí *wild-type* variantu DNA.



Legenda: *M*...velikostní standard 100 bp.

A...amplifikace DNA primery Fo1 + Ro1 (PCR produkt 335 bp).

A_r...restriční fragmenty délky 148 bp a 187 bp.

B...amplifikace DNA primery 1,273iR + 1,273iF (PCR produkt 701 bp), (Millán-Leiva *et al.*, 2018).

B_r...restriční fragmenty délky 437 bp a 264 bp.

C...amplifikace DNA primery v1440f + v2022r (PCR produkt 603 bp), (Hubert *et al.*, 2018).

C_r...restriční fragmenty délky 333 bp a 270 bp.

Při návrhu diagnostických primerů byl klíčový předpoklad, že amplifikace DNA od jakéhokoliv primeru je možná pouze v případě, kdy je tento primer zcela komplementární s templátovou DNA, důležitá je především komplementarita 3'-konce primeru s templátem (Jing *et al.*, 2012). Pokud není 3'-konec primeru komplementární, nenasedne dobře na templátovou DNA a enzym DNA polymeráza není schopen tento primer prodlužovat a syntetizovat během amplifikace nové komplementární vlákno DNA.

Tento princip je kromě výše popsané diagnostické metody určování rezistence kleštíka k *tau*-fluvalinátu využíván u analýzy SNP (*Single nucleotide polymorphism*) (Jing *et al.*, 2012) uplatňující se v populačních a evolučních studiích.

6.4 Tříprimerová PCR amplifikace

Hlavní výhodou PCR amplifikace DNA kleštíka včelího za pomoci tříprimerové PCR reakční směsi obsahující dva protisměrně orientované okrajové primery a jeden primer diagnostický, je fakt, že ve výsledku dochází pokaždé ke vzniku jednoho kontrolního PCR produktu. Lze tak jasně určit, že PCR amplifikace za použití dané reakční směsi probíhala a nedošlo k její inhibici. Proto je tato tříprimerová PCR amplifikace vysoce vhodná pro použití u diagnostických metod.

Tříprimerová PCR amplifikace byla v minulosti například použita k určování pohlaví jedinců volavky žlutozobé (*Egretta eulophotes*) (Wang *et al.*, 2011). Stejně jako v případě použití v rámci detekce bodových mutací způsobujících rezistenci kleštíka k *tau*-fluvalinátu, autoři i zde použili k amplifikaci DNA dvojici primerů pokaždé dávající vzniknout PCR produktu (namnožení úseku DNA na chromozomu Z, kontrolní produkt), a dále jeden primer specifický – pro ptačí chromozom W (diagnostický produkt). V případě detekce pohlaví u volavky však autoři používali pro amplifikaci pouze jednu stejnou trojkombinaci primerů (existuje pouze jedna varianta diagnostického primeru). Amplifikace DNA vedla ke vzniku dvou PCR produktů lišících se délkou v případě analýzy samičí DNA (heterogametické pohlaví, pohlavní chromozomy ZW), a jednoho PCR produktu při analýze samčí DNA (homogametické pohlaví, pohlavní chromozomy ZZ). Stejně jako při diagnostice rezistence kleštíků k *tau*-fluvalinátu, i zde byly primery v PCR reakční směsi přítomny ve vzájemném poměru 1:1:1.

Stejný princip detekce mutace prostřednictvím specifické vazby 3'-koncového nukleotidu diagnostického primeru, jako u zde prezentované diagnostiky rezistence kleštíka k *tau*-fluvalinátu, byl využit k diskriminaci polymorfních variant genů, které mají spojitost s vyšší pravděpodobností propuknutí Alzheimerovy choroby (polymorfismus SNP genů BIN1, CLU, ABCA7, CR1 a PICALM) (Darawi *et al.*, 2013). Jedná se metodu Alelově specifické PCR (*Allele specific PCR*, AS-PCR) Autoři používají k diskriminaci jednotlivých alelických variant diagnostické primery lišící se vzájemně 3'-koncovým nukleotidem. Stejně jako v případě detekce rezistentních kleštíků, i zde jsou jednotlivé amplifikační reakce prováděny pomocí tří primerů, nicméně v rámci dvou oddělených PCR amplifikačních reakcí. Nejprve dvojicí okrajových primerů (tvoří kontrolní produkt)

a poté diagnostickým primerem spolu s protisměrně orientovaným okrajovým primerem (tvorba diagnostického produktu). Koncentrace primerů v rámci reakční směsi však ve většině případů není stejná. Autoři tento primerový poměr upravují v závislosti na variantě genu, jehož alelické varianty jsou danými primery detekovány, a také v závislosti na délce jednotlivých primerů (Darawi *et al.*, 2013).

Při detekci mutací ve *VmNa* genu kleštíka včelího byly kromě vzájemného poměru zastoupení tří primerů v PCR reakční směsi (1:1:1) rovněž testovány poměrové varianty s vyšším zastoupením jednoho nebo druhého okrajového primeru. V prvním případě toho, který je svou 5'-3' orientací protilehlý k oběma zbývajícím primerům obsaženým v reakční směsi, ve druhém případě toho okrajového primeru, který má stejnou orientaci, jako daný primer diagnostický. Okrajový primer se pak ve směsi nacházel ve dvojnásobné či trojnásobné koncentraci vůči primerům zbývajícím. Vzhledem k faktu, že při PCR amplifikaci dochází k přednostnímu vzniku kratších PCR produktů na úkor delších (Lorenz, 2012), vzniká při tříprimerové amplifikaci větší množství kratšího PCR produktu (diagnostický + protisměrně orientovaný okrajový primer), než produktu dvou okrajových primerů. Po vizualizaci elektroforeticky separovaných PCR produktů je pak delší produkt většinou méně výrazný (poloviční intenzita) ve srovnání s kratším produktem. Zvýšením koncentrace primeru protilehlého ke zbývajícím dvěma primerům měla být teoreticky kinetika PCR amplifikace posunuta ve prospěch vzniku delšího PCR produktu (Lorenz, 2012). Po změně vzájemného primerového poměru však nedošlo ke zdatelné změně intenzity vizualizovaných PCR produktů.

6.5 Diagnostika rezistence kleštíka včelího k *tau*-fluvalinátu pomocí tříprimerové PCR amplifikace

Diagnostická tříprimerová amplifikace směsných vzorků DNA je schopná odhalit jednoho rezistentního kleštíka (mutantního homozygota), pokud je izolace DNA prováděna z 5 jedinců (vizualizace pomocí G:Box vizualizačního systému (Syngene), barvení GoodView Nucleic Acid Stain (Sigma-Aldrich)). Jestliže je DNA vyizolována z kleštíků, kteří byli před izolací uchováváni v optimálních podmínkách (mrazicí box, očištění od včelí měli, nevystavení slunečnímu záření a dlouhodobému působení vlhkosti v prostředí úlu), je možné odhalit přítomnost mutantní alely ve směsném vzorku DNA z 10 jedinců. Vzhledem k tomu, že DNA kleštíků může být v některých případech znehodnocena vlivem postupné degradace (u déle uhynulých kusů v prostředí úlu s vyšší vzdušnou vlhkostí a teplotou) je doporučeno pro zcela spolehlivou diagnostiku provádět

izolaci DNA z maximálně 5 jedinců (pokud chci znát přítomnost mutantní alely, pro určení genotypu je nutné izolovat DNA pouze z 1 kleštíka). Zvýšení intenzity vizualizovaných PCR produktů je možné dosáhnout použitím barviva pro nukleové kyseliny s nižším detekčním limitem a vyšší rozlišovací schopností (např. GelRed, ethidium bromid).

Co do rozsahu postihnutelné diverzity DNA obsažené v jednom analyzovaném vzorku (obsahuje DNA pocházející od více jedinců) je tedy tříprimerová diagnostika srovnatelná s diagnostickou metodou využívající restriční štěpení (Hubert *et al.*, 2018). Autoři provádějí izolaci DNA ze směsných vzorků 10 jedinců. V rámci druhé diagnostické metody využívající k určení rezistence kleštíků restriční štěpení (Millán-Leiva *et al.*, 2018) je DNA izolována z jednoho jedince.

Hlavní nevýhodou diagnostických metod využívajících k určení rezistence kleštíků k *tau*-fluvalinátu restriční je fakt, že tyto metody nejsou schopné určit konkrétní typ mutace (nebo mutací) postihujících nukleotidové pozice 1710 a 1712 (Stará *et al.*, 2019). Restriční endonukleáza určuje pouze to, zda je nukleotid 1710 mutovaný (v tomto případě není enzym schopný rozštěpit naamplifikovaný úsek DNA molekuly). Oproti tomu zde popsána tříprimerová diagnostická metoda umožňuje rozlišení *wild-type* nemutované DNA i DNA mutované, u které je dále možné určit všechny mutantní genotypy (pro nukleotidové pozice 1710 a 1712: *wild-type* CG, mutantní GG, AA a AG).

Konkrétní genotypy na nukleotidových pozicích 1710 a 1712 je možné určit s využitím multiplexních TaqMan® fluorescenčních prób v rámci TaqMan® diagnostické analýzy (González-Cabrera *et al.*, 2013 a 2016). Tyto próby jsou navrženy pro detekci všech 4 dosud identifikovaných genotypů zmíněných nukleotidových pozic. Autoři se ve svém výzkumu zabývali především rozlišováním homozygotní a heterozygotní alelické konstituce na nukleotidových pozicích 1710 a 1712 postihovaných mutacemi, ne detekcí mutací (mutantních alel) ve směsných vzorcích DNA. V porovnání s tříprimerovou diagnostickou metodou je TaqMan® analýza rovněž finančně nákladnější a vyžaduje použití real-time termocykléru.

6.5.1 Rezistence k *tau*-fluvalinátu u jedinců s mutací v homozygotní formě

Aby docházelo u kleštíků ke vzniku rezistence k *tau*-fluvalinátu, musí se bodové mutace nukleotidů 1710 a 1712 vyskytovat v DNA v rámci homozygotního genotypu (Alissandrakis *et al.*, 2017; González-Cabrera *et al.*, 2013, 2016 a 2018). Jedinci

heterozygotní (pro současnou kombinaci přítomnosti *wild-type* a mutantní alely) nejsou zpravidla rezistentní (např. kombinace CG/GG). Heterozygoti pro dvě různé mutace vykazují při ošetření rezistenci k *tau*-fluvalinátu. U některých heterozygotů se může vyskytovat pouze zvýšená odolnost vůči působení *tau*-fluvalinátu (González-Cabrera *et al.*, 2013, 2016).

Tříprimerová PCR amplifikační metoda není schopna rozlišit heterozygotní jedince GG/AG od heterozygotů GG/AA. Vzhledem k tomu, že tyto heterozygotní jedinci jsou rezistentní, není v tomto případě nutné rozlišovat konkrétní nukleotidovou konstituci a jedinci GG/AG i GG/AA mohou být charakterizováni jako rezistentní k působení *tau*-fluvalinátu. Heterozygoté GG/AA však nebyli doposud v rámci analýzy rezistence kleštíka k *tau*-fluvalinátu a populačních studií sledujících diverzitu detekováni (González-Cabrera *et al.*, 2016, 2018).

Další důležitou skutečností, která kompenzuje problematičnost rozlišení některých nukleotidových kombinací pomocí tříprimerové diagnostické metody, konkrétně homozygotních jedinců AG/AG od heterozygotních jedinců AA/AG, je snížená fitness heterozygotů v přirozených populacích. Frekvence zastoupení heterozygotů je menší než 5 %, ať už v případě heterozygotů pro dvě různé mutace, nebo pro *wild-type* a mutantní nukleotidovou kombinaci (Alissandrakis *et al.*, 2017). Zachycení rezistentních homozygotů AG/AG je tudíž pravděpodobnější, než zachycení vnímavých heterozygotů AA/AG (jedná se o rezistentní jedince).

Vzájemné rozlišení mutantních genotypů GG/AG a GG/AA případně AG/AG a AA/AG v přirozených populacích kleštíků je teoreticky možné odvodit z frekvence výskytu dalších genotypů, které se v dané populaci také vyskytují a byly analýzou zachyceny. Dynamika šíření mutantních alel v rámci populací kleštíků však nebyla doposud sledována, stejně tak vliv haplodiploidního rozmnožovacího systému kleštíka na šíření rezistence k *tau*-fluvalinátu a studována nebyla ani vzájemná výše fitness všech mutantních genotypů (Farjamfar *et al.*, 2018; González-Cabrera *et al.*, 2018).

6.5.2 Rozsah intenzity rezistence kleštíků na odběrových stanovištích v ČR

Analýzou kleštíků odebraných na stanovištích v okresech Frýdek-Místek, Chrudim a Znojmo (tab. 2) nebyly nalezeni žádní jedinci rezistentní k *tau*-fluvalinátu, i když jsou na všech zmíněných lokalitách pravidelně používány k léčebnému ošetření včelstev varroacivní přípravky obsahující *tau*-fluvalinát. Aplikovány jsou však na doporučení Státní veterinární správy ČR (Anonymous9, 2019) a Výzkumného ústavu

včelařského v Dole (Anonymous10, 2019) v doporučeném léčebném schématu, které omezuje dlouhodobé používání těchto přípravků z důvodu nechtěné selekce rezistentních populací roztoče.

Rezistentní roztoči byli nalezeni na třech stanovištích v okrese Šumperk (Výzkumný včelín Pekařov). Jedná se o stanoviště, na kterých jsou rezistentní populace roztoče udržovány z důvodu pochopení mechanismu vzniku rezistence kleštíka k jednotlivým syntetickým varroacidním látkám. Místní zdrojová včelstva (tab. 2) byla po dobu 4 let ošetřována kombinací syntetických varroacidů v podletí a na podzim (Anonymous10, 2019). V průběhu 4 let byla zaznamenána snížená účinnost *tau*-fluvalinátu (pokles na účinnost 25 %) a flumethrinu, u kterého se ustálila na účinnosti 90 % (pozorování RNDr. F. Kašpara).

U všech rezistentních jedinců byla identifikována pouze přítomnost bodové mutace G(1710). Výskyt této mutace ve *VmNa* genu kleštíka je v korelaci s jeho rezistencí k *tau*-fluvalinátu (Wang *et al.*, 2002), či s výrazným snížením varroacidního účinku zmíněné látky. V rámci analýzy kleštíků pocházejících z 1. sběru ve skupině A (spad po aplikaci *tau*-fluvalinátu) byli identifikováni jak klešticí rezistentní nesoucí mutaci G(1710), tak vnímaví s cytosinem na nukleotidové pozici 1710. Počet identifikovaných rezistentních kleštíků výrazně převažoval počet kleštíků vnímavých, blížil se 75% zastoupení. Ve 2. sběru ve skupině A (spad po aplikaci amitrazu) byli identifikováni pouze rezistentní klešticí s mutantním G(1710) (data získaná RNDr. F. Kašparem).

Klešticí odebraní v rámci 2. sběru ve skupině A po ošetření zdrojového včelstva amitrazem (tito klešticí byli vnímaví k amitrazu) nesli ve *VmNa* genu mutaci nukleotidu 1710(G), která je přímo spojována s rezistencí kleštíka k *tau*-fluvalinátu (Wang *et al.*, 2002). Tato odběrová skupina A byla v rámci prvního léčení (po kterém následoval 1. odběrový sběr) ošetřena *tau*-fluvalinátem, tudíž klešticí odebraní v rámci 2. sběru po přeléčení včelstva amitrazem, museli první ošetření *tau*-fluvalinátem přežít a být k této látce rezistentní. Rezistenci těchto kleštíků k *tau*-fluvalinátu potvrzuje přítomnost mutace 1710(G) v jejich DNA. Tato skutečnost však vypovídá o tom, že v rámci odběrové skupiny A nedochází u kleštíků ke vzniku mnohonásobné rezistence mezi látkami *tau*-fluvalinátem a amitrazem, jak bylo pozorováno dříve (Casida *et* Durkin, 2013; Kamler *et al.*, 2016; Hubert *et al.*, 2017). Ke vzniku mnohonásobné (či křížové) rezistence by mělo docházet podle Soderlunda (2008) i mezi varroacidními látkami *tau*-fluvalinátem a flumethrinem (případně dalšími varroacidními látkami). Pozorování uskutečněná v rámci Pokusného včelínu Pekařov (F. Kašpar) však tomuto tvrzení odporují. Všichni

kleštíci ze skupiny D, odebrání po ošetření flumethrinem (1. sběr, vnímaví k flumethrinu), mají ve své DNA bodovou mutaci G(1710), a na základě přítomnosti této mutace jsou rezistentní k *tau*-fluvalinátu (Wang *et al.*, 2002). Pokud by mělo docházet ke vzniku křížové rezistence mezi látkami *tau*-fluvalinátem a flumethrinem, museli by být všichni kleštíci rezistentní k *tau*-fluvalinátu (a nesoucí mutaci nukleotidu 1710) zároveň rezistentní i k varroacidní látce flumethrinu, k čemuž podle výše uvedených pozorování nedochází. Případně by musela být rezistence k *tau*-fluvalinátu dána i jinou mutací jiného lokusu. Toto tvrzení však zatím nebylo potvrzeno. Rezistence k flumethrinu nebyla doposud přímo asociována s žádnou mutací v DNA kleštíků, je ale pravděpodobné, že je způsobována mutacemi na jiných nukleotidových pozicích, než na 1710 a 1712 ve *VmNa* genu. Žádné mutace způsobující tuto rezistenci (včetně rezistence k amitrazu) však nebyly doposud identifikovány (Santiago *et al.*, 2000; Kamler *et al.*, 2016).

7 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo navrhnout a optimalizovat diagnostickou metodu umožňující plošnou detekci rezistence kleštíka včelího k *tau*-fluvalinátu prostřednictvím detekce bodových mutací nukleotidů 1710 a 1712 ve *VmNa* genu pro sodíkový kanál, které způsobují aminokyselinové substituce na pozici 925. Diagnostická tříprimerová metoda (3-PAS-PCR) využívá PCR amplifikaci templátové DNA pomocí tří primerů obsažených v jedné PCR reakční směsi, jsou jimi dva okrajové primery amplifikující úsek *VmNa* genu obsahujícího nukleotidové pozice 1710 a 1712 postihované mutacemi, a jeden primer diagnostický, umožňující určení konkrétní mutační varianty těchto nukleotidových pozic. Pro určení absence či přítomnosti (a varianty) mutace je klíčový 3'-koncový nukleotid konkrétní varianty diagnostického primeru, který danou mutaci selektivně charakterizuje.

V této práci navržená 3-PAS-PCR diagnostická metoda umožňuje detekci *wild-type* varianty DNA s nukleotidy cytosinem (C) na pozici 1710 a guaninem (G) na pozici 1712, dále pak detekci tří mutantních genotypů G(1710) + G(1712), A(1710) + G(1712) a A(1710) + A(1712), které způsobují rezistenci kleštíka včelího k *tau*-fluvalinátu, a to jak u homozygotních tak heterozygotních jedinců. K diagnostické analýze slouží set dvou okrajových a čtyř specifických diagnostických primerů.

Analýza rezistence kleštíků prováděná na vzorcích DNA kleštíků odebraných z 22 stanovišť na území České republiky v okresech Frýdek-Místek, Chrudim, Šumperk a Znojmo, odhalila přítomnost *wild-type* genotypu C(1710) + G(1712) a mutantního genotypu G(1710) + G(1712) způsobeného bodovou mutací G(1710). Tato bodová mutace G(1710), typická pro evropské kleštíky rezistentní k *tau*-fluvalinátu, byla detekována u populací ze stanovišť v okrese Šumperk v rámci Pokusného včelínu Pekařov, kde jsou tyto populace kleštíků udržovány za účelem studia mechanismu vzniku varroacidových rezistencí. Na stanovištích v okresech Frýdek-Místek, Chrudim a Znojmo byly zachyceni pouze vnímaví kleštíci s *wild-type* genotypem C(1710) + G(1712). Mutantní genotypy A(1710) + G(1712) a A(1710) + A(1712) nebyly v analyzovaných populacích kleštíků na území České republiky objeveny. Pro optimalizaci diagnostických primerů určujících přítomnost genotypů A(1710) + G(1712) a A(1710) + A(1712) proto byly použity vzorky genomické DNA pocházející z Řecka a cDNA pocházející z USA.

V porovnání s jinými diagnostickými metodami je tříprimerová metoda levnější, proveditelná se standardním laboratorním vybavením a výsledky testů jsou snadno a rutinně hodnotitelné.

8 Použitá literatura

Alissandrakis, E., Ilias, A., Tsagkarakou, A. (2017): Pyrethroid target site resistance in Greek populations of the honey bee parasite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *Journal of Apicultural Research*, 56: 625–630.

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

Andino, G.K., Gribskov, M., Anderson, D.L., Evans, J.D., Hunt, G.J. (2016): Differential gene expression in *Varroa jacobsoni* mites following a host shift to European honey bees (*Apis mellifera*). *BioMed Central Genomics*, 17: 926.

Anonymous1 (2018): *Varroa* taxonomy. National center for biotechnology information. Navštíveno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&id=62624&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>, dne 25. 9. 2018.

Anonymous2 (2018): *Tau*-fluvalinate structure. PubMed. Navštíveno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/fluvalinate>, dne 2. 10. 2018.

Anonymous3 (2018): Flumethrin structure. PubMed. Navštíveno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6033664#section=Top>, dne 2. 10. 2018.

Anonymous4 (2018): Acrinathrin structure. PubMed. Navštíveno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6436606#section=2D-Structure>, dne 2. 10. 2018.

Anonymous5 (2018): Amitraz structure. PubMed. Navštíveno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/36324#section=2D-Structure>, dne 2. 10. 2018.

Anonymous6 (2018): Seznam aktuálně registrovaných veterinárních přípravků k léčebnému ošetření včel. Navštíveno na: <http://www.uskvbl.cz/cs/registrace-a-schvalovani/schvalovani-vp/seznam-vp>, dne 18. 12. 2018.

Anonymous7 (2019): Rezistence roztoče *Varroa destructor* k tau-fluvalinátu. Navštíveno na: <https://www.svsr.cz/rezistence-roztoce-varroa-destructor-k-tau-fluvalinatu/>, dne 4. 1. 2019.

Anonymous8 (2019): Pokusný včelín Pekařov, Výzkumný ústav včelaský s.r.o. Navštíveno na: http://www.pvpekarov.cz/_sgg/m1_1.htm, dne 4. 1. 2019.

Anonymous9 (2019): Metodika kontroly zdraví zvířat a nařízené vakcinace na rok 2019. Navštíveno na: <http://www.vcelarstvi.cz/dokumenty-cms/metodika-kontroly-zdravi-zvirat-2019.pdf>, dne 18. 1. 2019.

Anonymous10 (2019): Schéma tlumení varroázy po celý rok. Navštíveno na: <http://www.beedol.cz/varroaza/>, dne 18. 1. 2019.

Anonymous11 (2019): Sodium channel protein, *Varroa destructor*. Navštíveno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q86D77>, dne 24. 3. 2019.

Bass, B.L. (2001): RNA editing. Oxford University Press, Oxford, Velká Británie.

Beaurepaire, A.L., Krieger, K.J., Moritz, R.F.A. (2017): Seasonal cycle of inbreeding and recombination of the parasitic mite *Varroa destructor* in honeybee colonies and its implications for the selection of acaricide resistance. *Infection, Genetics and Evolution*, 50: 49–54.

Beaurepaire, A.L., Truong, T.A., Fajardo, A.C., Dinh, T.Q., Cervancia, C., Moritz, R.F.A. (2015): Host specificity in the honeybee parasitic mite, *Varroa* spp. in *Apis mellifera* and *Apis cerana*. *PLoS ONE*, 10(8): e0135103.

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

Casida, J.E., Durkin, K.A. (2013): Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annual Review of Entomology*, 58: 99–117.

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

Cornman, R.S., Schatz, M.C., Johnston, J.S., Chen, Y.-P., Pettis, J., Hunt, G., Bourgeois, L., Elsik, C., Anderson, D., Grozinger, C.M., Evans, J.D. (2010): Genomic survey of the ectoparasitic mite *Varroa destructor*, a major pest of the honey bee *Apis mellifera*. *BioMed Central Genomics*, 11: 602.

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

- Darawil, M.N., Ai-Vyryn, Ch., Ramasamy, K., Hua, P.P.J., Pin, T.M., Kamaruzzaman, S.B., Majeed, A.B.A. (2013): Allele-specific polymerase chain reaction for the detection of Alzheimer's disease-related single nucleotide polymorphisms. *BMC Medical Genetics*, 14: 27.
- Davies, T.G., Field, L.M., Usherwood, P.N., Williamson, M.S. (2007): DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life*, 59: 151–162.
- De Jong, D., De Jong, P.H., Goncalves, L.S. (1982): Weight loss and other damage to developing worker honey bees from infestation with *Varroa jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research*, 21: 165–167.
- De La Folia, A.G., Bain, S.A., Ross, L. (2015): Haplodiploidy and the reproductive ecology of Arthropods. *Current Opinion in Insect Science*, 9: 36–43.
- De Ruijter, A., Pappas, N. (1983): Karyotype and sex determination of *Varroa jacobsoni* Oud. affecting honey bees: present status and needs. Proceeding of a meeting of the EC Experts' Group, 41–44, Itálie.
- Dermauw, W., Ilias, A., Riga, M., Tsagkarakou, A., Grbić, M., Tirry, L., Van Leeuwen, T., Vontas, J. (2012): The cys-loop ligand-gated ion channel gene family of *Tetranychus urticae*: implications for acaricide toxicology and a novel mutation associated with abamectin resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42: 455–465.
- Dong, K., Du, Y., Rinkevich, F., Nomura, Y., Xu, P., Wang, L., Silver, K., Zhorov, B.S. (2014): Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 50: 1–17.
- Du, Y., Nomura, Y., Liu, Z., Huang, Z.Y., Dong, K. (2009a): Functional expression of an arachnid sodium channel reveals residues responsible for tetrodotoxin resistance in invertebrate sodium channels. *Journal of Biological Chemistry*, 284: 33869–33875.
- Du, Y., Nomura, Y., Luo, N., Liu, Z., Lee, J.E., Khambay, B., Dong, K. (2009b): Molecular determinants on the insect sodium channel for the specific action of type II pyrethroid insecticides. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 234: 266–272.
- Dynes, T.L., De Roode, J.C., Lyons, J.I., Berry, J.A., Delaplane, K.S., Brosi, B.J. (2016): Fine scale population genetic structure of *Varroa destructor*, an ectoparasitic mite of the honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 50: 49–54.

- Elzen, P.J., Baxter, J.R., Spivak, M., Wilson, W.T. (2000): Control of *Varroa jacobsoni* Oud. resistant to fluvalinate and amitraz using coumaphos. *Apidologie*, 31: 437–441.
- Evans, J., Lopez, D. (2002): Complete mitochondrial DNA sequence of the important honey bee pest, *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *Experimental and Applied Acarology*, 27: 69–78.
- Evans, J.D. (2000): Microsatellite loci in the honey bee parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Molecular Ecology*, 9: 1436–1438.
- Farjamfar, M., Saboori, A., González-Cabrera, J., Hernández Rodríguez, C.S. (2018): Genetic variability and pyrethroid susceptibility of the parasitic honey bee mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in Iran. *Experimental and Applied Acarology*, 76: 139–148.
- Feyereisen, R., Dermauw, W., Van Leeuwen, T. (2015): Genotype to phenotype, the molecular and physiological dimensions of resistance in arthropods. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 121: 61–77.
- French-Constant, R.H. (2013): The molecular genetics of insecticide resistance. *Genetics*, 194: 807–815.
- French-Constant, R.H., Pittendrigh, B., Vaughan, A., Anthony, N. (1998): Why are there so few resistance associated mutations in insecticide target genes? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 353: 1685–1693.
- Forfert, N., Natsopoulou, M.E., Frey, E., Rosenkranz, P., Paxton, R.J., Moritz, R.F.A. (2015): Parasites and pathogens of the honeybee (*Apis mellifera*) and their influence on inter-colonial transmission. *PLoS One*, 10(10): e0140337.
- Frey, E., Rosenkranz, P. (2014): Autumn invasion rates of *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) into honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies and the resulting increase in mite populations. *Journal of Economic Entomology*, 107: 508–515.
- Fries, I., Imdorf, A., Rosenkranz, P. (2006): Survival of mite infested (*Varroa destructor*) honey bee (*Apis mellifera*) colonies in a Nordic climate. *Apidologie*, 37: 564–570.
- Fuchs, S., Langenbach, K. (1989): Multiple infestation of *Apis mellifera* L. brood cells and reproduction in *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, 20: 257–266.

Gajić, B., Radulović, Z., Stevanović, J., Kulisić, Z., Vucicević, M., Simeunović, P., Stanimirović, Z. (2013): Variability of the honeybee mite *Varroa destructor* in Serbia, based on mtDNA analysis. *Experimental and Applied Acarology*, 61: 97–105.

Gajić, B., Stevanović, J., Radulović, Ž., Kulišić, Z., Vejnović, B., Glavinić, U., Stanimirović, Z. (2016): Haplotype identification and detection of mitochondrial DNA heteroplasmy in *Varroa destructor* mites using ARMS and PCR-RFLP methods. *Experimental and Applied Acarology*, 70: 287–297.

Genersch, E., Aubert, M. (2010): Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Veterinary Research*, 41: 54.

González-Cabrera, J., Bumann, H., Rodríguez-Vargas, S., Kennedy, P.J., Krieger, K., Altreuther, G., Hertel, A., Hertlein, G., Nauen, R., Williamson, M.S. (2018): A single mutation is driving resistance to pyrethroids in European populations of the parasitic mite, *Varroa destructor*. *Journal of Pest Science*, 91: 1137–1144.

González-Cabrera, J., Davies, T.G.E., Field, L.M., Kennedy, P.J., Williamson, M.S. (2013): An amino acid substitution (L925V) associated with resistance to pyrethroids in *Varroa destructor*. *PLoS ONE*, 8(12): e82941.

González-Cabrera, J., Rodríguez-Vargas, S., Davies, T.G.E., Field, L.M., Schmehl, D., Ellis, J.D., Krieger, K., Williamson, M.S. (2016): Novel mutations in the voltage-gated sodium channel of pyrethroid-resistant *Varroa destructor* populations from the southeastern USA. *PLoS ONE*, 11(5): e0155332.

Gosselin-Badaroudine, P., Chahine, M. (2017): Biophysical characterization of the *Varroa destructor* NaV1 sodium channel and its affinity for tau-fluvalinate insecticide. *FASEB Journal*, 31: 3066–3071.

Grbić, M., Van Leeuwen, T., Clark, R.M., Rombauts, S., Rouze, P., Grbić, V., Osborne, E.J., Dermauw, W., Ngoc, P.C., Ortego, F., Hernández-Crespo, P., Diaz, I., Martinez, M., Navajas, M., Sucena, É., Magalhães, S., Nagy, L., Pace, R.M., Djuranović, S., Smaghe, G., Iga, M., Christiaens, O., Veenstra, J.A., Ewer, J., Villalobos, R.M., Hutter, J.L., Hudson, S.D., Velez, M., Yi, S.V., Zeng, J., Pires-daSilva, A., Roch, F., Cazaux, M., Navarro, M., Zhurov, V., Acevedo, G., Bjelica, A., Fawcett, J.A., Bonnet, E., Martens, C., Baele, G., Wissler, L., Sanchez-Rodriguez, A., Tirry, L., Blais, C., Demeestere, K., Henz, S.R., Gregory, T.R., Mathieu, J., Verdon, L., Farinelli, L., Schmutz, J., Lindquist, E., Feyereisen, R., Van de Peer,

- Y. (2011): The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. *Nature*, 479: 487–492.
- Hamilton, W.D. (1967): Extraordinary sex ratios. *Science*, 156: 477–488.
- Hanrahan, C.J., Palladino, M.J., Ganetzky, B., Reenan, R.A. (2000): RNA editing of the *Drosophila para* Na⁺ channel transcript. Evolutionary conservation and developmental regulation. *Genetics*, 155: 1149–1160.
- Hill, C.A., Wikel, S.K. (2005): The *Ixodes scapularis* genome project: an opportunity for advancing tick research. *Trends in Parasitology*, 21: 151–153.
- Holliday, R., Grigg, G. (1993): DNA methylation and mutation. *Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 285: 61–67.
- Hubert, J., Erban, T., Kamler, M., Kopecký, J., Nesvorná, M., Hejdanková, S., Titěra, D., Tyl, J., Zurek, L. (2015): Bacteria detected in the honeybee parasitic mite *Varroa destructor* collected from beehive winter debris. *Journal of Applied Microbiology*, 119: 640–654.
- Hubert, J., Nesvorná, M., Doskočil, I., Kamler, M., Stará, J. (2018): Certifikovaná metodika pro hodnocení rezistence roztoče *Varroa destructor* vůči tau-fluvalinátu. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., ISBN 978-80-7427-280-6.
- Hubert, J., Nesvorná, M., Kamler, M., Kopecký, J., Tyl, J., Titěra, D., Stará, J. (2013): Point mutations in the sodium channel gene conferring tau-fluvalinate resistance in *Varroa destructor*. *Pest Management Science*, 70: 889–894.
- Hubert, J., Nesvorná, M., Stará, J. (2017): Poznatky o rezistenci kleštíka zhoubného (*Varroa destructor*) vůči akaricidům. *Veterinářství*, 67: 560–566.
- Ionescu-Varo, M., Suci, M. (1979): Präliminargaben über anatomie und histochemie der milbe *Varroa jacobsoni* Oudemans. Bekämpfung und Vorbeugung der Varroatose. Apimondia Publishing House, 41–55, Bukurešť, Rumunsko.
- Jeyaprakash, A., Hoy, M.A. (2009): First divergence time estimate of spiders, scorpions, mites and ticks (subphylum: Chelicerata) inferred from mitochondrial phylogeny. *Experimental and Applied Acarology*, 47: 1–18.

- Jing, L., Shunmou, H., Meiyu, S., Shengyi, L., Yumei, L., Wanxing, W., Xiurong, Z., Hanzhong, W., Wei, H. (2012): An improved allele-specific PCR primer design method for SNP marker analysis and its application. *Plant Methods*, 8: 34.
- Kamler, M., Nesvorna, M., Stara, J., Erban, T., Hubert, J. (2016): Comparison of *tau*-fluvalinate, acrinathrin, and amitraz effects on susceptible and resistant populations of *Varroa destructor* in a vial test. *Experimental and Applied Acarology*, 69: 1–9.
- Kang, Y., Blanco, K., Davis, T., Wang, Y., DeGrandi-Hoffmane, G. (2016): Disease dynamics of honeybees with *Varroa destructor* as parasite and virus vector. *Mathematical Biosciences*, 275: 71–92.
- Kliot, A., Ghanim, M. (2012): Fitness costs associated with insecticide resistance. *Pest Management Science*, 68: 1431–1437.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016): MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33: 1870–1874.
- Le Conte, Y., Ellis, M., Ritter, W. (2010): *Varroa* mites and honey bee health: can *Varroa* explain part of the colony losses? *Apidologie*, 41: 353–363.
- Ledón-Rettig, C., Richards, C., Martin, L. (2012): Epigenetics for behavioral ecologists. *Behavioral Ecology*, 24: 311–324.
- Liu, Z., Tan, J., Huang, Z.Y., Dong, K. (2006): Effect of a fluvalinate-resistance-associated sodium channel mutation from *Varroa* mites on cockroach sodium channel sensitivity to fluvalinate, a pyrethroid insecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36: 885–889.
- Lorenz, T.C. (2012): Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies, *Journal of Visualized Experiments*, 63: e3998.
- Maggi, M.D., Ruffinengo, S.R., Mendoza, Y., Ojeda, P., Ramallo, G., Floris, I., Eguaras, M.J. (2011): Susceptibility of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) to synthetic acaricides in Uruguay: *Varroa* mites' potential to develop acaricide resistance. *Parasitology Research*, 108: 815–821.
- Mantegazza, M., Yu, F.H., Catterall, W.A., Scheuer, T. (2001): Role of the C-terminal domain in activation of brain and cardiac sodium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 15348–15353.

- Martin, S.J. (1994): Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in worker brood of the honey bee *Apis mellifera* L. under natural conditions. *Experimental and Applied Acarology*, 18: 87–100.
- Martin, S.J. (2004): Acaricide (pyrethroid) resistance in *Varroa destructor*. *Bee World*, 85: 67–69.
- Martin, S.J., Cook, C. (1996): Effect of host brood type on number of offspring produced by the honeybee parasite *Varroa jacobsoni*. *Experimental and Applied Acarology*, 20: 387–390.
- Martin, S.J., Holland, K., Murray, M. (1997): Non-reproduction in honeybee mite *Varroa jacobsoni*. *Experimental and Applied Acarology*, 21: 539–549.
- Milani, N. (1995): The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to pyrethroids: a laboratory assay. *Apidologie*, 26: 415–429.
- Millán-Leiva, A., Hernández-Rodríguez, C.S., González-Cabrera, J. (2018): New PCR–RFLP diagnostics methodology for detecting *Varroa destructor* resistant to synthetic pyrethroids. *Journal of Pest Science*, 91: 937–941.
- Mondet, F., de Miranda, J.R., Kretzschmar, A., Le Conte, Y., Mercer, A.R. (2014): On the front line: quantitative virus dynamics in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies along a new expansion front of the parasite *Varroa destructor*. *PLoS ONE Pathology*, 10(8): e1004323.
- Münstedt, K., Münstedt, K.P., Teichfischer, P. (2015): Přehled virů napadajících včelstva. *Moderní včelař*, 12, 3: 22.
- Narahashi, T. (1996): Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. *Pharmacology and Toxicology*, 78: 1–14.
- Narahashi, T. (2000): Neuroreceptors and ion channels as the basis for drug action: past, present, and future. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 294: 1–26.
- Navajas, M., Anderson, D.L., de Guzman, L.I., Huang, Z.Y., Clement, J., Zhou, T., Le Conte, Y. (2010): New Asian types of *Varroa destructor*: a potential new threat for world apiculture. *Apidologie*, 41: 181–193.
- Navajas, M., Solignac, M., Le Conte, Y., Cros-Arteil, S., Cornuet, J. (2002): The complete sequence of the mitochondrial genome of the honey-bee ectoparasite *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata). *Molecular Biology and Evolution*, 19: 2313–2317.

Navrátil, S., Klíma, Z., Palíková, M. (2012): Choroby včel – multimediální pomůcka. Navštíveno na: <https://fvhe.vfu.cz/static/informace-o-fakulte/sekce-ustavy/uvozp/choroby-vcel/index.html>, dne 4. 1. 2019.

Nishikura, K. (2010): Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases. *Annual Review of Biochemistry*, 79: 321–349.

Nyoni, B.N., Gorman, K., Mzilahowa, T., Williamson, M.S., Navajas, M., Field, L.M., Bass, C. (2011): Pyrethroid resistance in the tomato red spider mite, *Tetranychus evansi*, is associated with mutation of the *para*-type sodium channel. *Pest Management Science*, 67: 891–897.

O'Reilly, A.O., Khambay, B.P., Williamson, M.S., Field, L.M., Wallace, B.A., Davies, T.G. (2006): Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. *Biochemistry Journal*, 396: 255–263.

O'Leary, M.E., Chahine, M. (2018): Mechanisms of drug binding to voltage-gated sodium channels. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 246: 209–231.

O'Reilly, A.O., Williamson, M.S., González-Cabrera, J., Turberg, A., Field, L.M., Wallace, B.A., Davies, T.G.E. (2014): Predictive 3D modelling of the interactions of pyrethroids with the voltage-gated sodium channels of ticks and mites. *Pest Management Science*, 70: 369–377.

Pasay, C., Arlian, L., Morgan, M., Vyszynski-Moher, D., Rose, A., Holt, D., Walton, S., McCarthy, J. (2008): High-resolution melt analysis for the detection of a mutation associated with permethrin resistance in a population of scabies mites. *Medical and Veterinary Entomology*, 22: 82–88.

Plummer, N.W., McBurney, M.W., Meisler, M.H. (1997): Alternative splicing of the sodium channel CN8A predicts a truncated two-domain protein in fetal brain and non-neuronal cells. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 24008–24015.

Pohl, F. (2008): Varroáza: Jak ji poznat a úspěšně potírat. Víkend. Líbeznice, Česká republika.

Price, K.L., Lummis, S.C.R. (2014): An atypical residue in the pore of *Varroa destructor* GABA-activated RDL receptors affects picrotoxin block and thymol modulation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 55: 19–25.

- Přidal, A. (2007): Odborná včelařská terminologie: Názvosloví živočichů a parazitismus. Včelařství, 59: Příloha 7–8.
- Ramsey, S.D., Ochoa, R., Bauchan, G., Gulbranson, C., Mowery, J.D., Cohen, A., Lim, D., Joklik, J., Cicero, J.M., Ellis, J.D., Hawthorne, D., vanEngelsdorp, D. (2019): *Varroa destructor* feed primarily on honey bee fat body not hemolymph. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 116: 1792–1801.
- Rehm, S.-M., Ritter, W. (1989): Sequence of the sexes in the offspring of *Varroa jacobsoni* and the resulting consequences for calculation of the developmental period. Apidologie, 20: 339–343.
- Rieder, L.E., Staber, C.J., Hoopengardner, B., Reenan, R.A. (2013): Tertiary structural elements determine the extent and specificity of messenger RNA editing. Nature Communications, 4: 22–32.
- Roberts, T., Hutson, D. (1999): *Tau*-fluvalinate. Metabolic pathways of agrochemicals Part two: Insecticides and Fungicides, 14: 670–677.
- Rodriguez-Dehaibes, S.R., Otero-Colina, G., Sedas, V.P., Jimenez, J.A.V. (2005): Resistance to amitraz and flumethrin in *Varroa destructor* populations from Veracruz, Mexico. Journal of Apicultural Research, 44: 124–125.
- Rosenkranz, P., Aumeier, P., Ziegelmann, B. (2010): Biology and control of *Varroa destructor*. Journal of Invertebrate Pathology, 103: 96–119.
- Rozen, S., Skaletsky, H. J. (2000): Primer 3 on the WWW for general users and for biologists programmers. In: Miesner S, Krawetz SA (ed.) Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology, 365–386, Human Press Inc., Totowa, New Jersey, USA.
- Sabelis, M.W., Nagelkerke, C.J. (1992): Sex allocation and pseudo-arrhenotoky in phytoseiid mites: an overview. Evolution and diversity of sex ratio in insects and mites. Experimental and Applied Acarology, 4: 512–541.
- Sammataro, D., Untalan, P., Guerrerob, F., Finleya, J. (2005): The resistance of *Varroa* mites (Acari: Varroidae) to acaricides and the presence of esterase. International Journal of Acarology, 31: 67–74.
- Sammataro, D., Yoder, J.A. (2011): Honey bee colony health: challenges and sustainable. Chemical Rubber Company (CRC) Press, First edition. Oxford, Velká Británie.

- Santiago, G.P., Otero-Colina, G., Sánchez, D.M., Guzmán, M.E.R., Vandame, R. (2000): Comparing effects of three Acaricides on *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) using two application techniques. *Florida Entomologist*, 83: 468–476.
- Silver, K.S., Du, Y., Nomura, Y., Oliveira, E.E., Salgado, V.L., Zhorov, B.S., Dong, K. (2014): Voltage-gated sodium channels as insecticide target sites. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 46: 389–433.
- Smitsaert, H.R. (1964): Cholinesterase inhibition in spider mites susceptible and resistant to organophosphate. *Science*, 143: 129–131.
- Soderlund, D.M. (2008): Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels. *Pest Management Science*, 64: 610–616.
- Soderlund, D.M. (2010): State-dependent modification of voltage gated sodium channels by pyrethroids. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 97: 78–86.
- Soderlund, D.M. (2012): Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. *Archives of Toxicology*; 86: 165–181.
- Solignac, M., Cornuet, J.M., Vautrin, D., Le Conte, Y., Anderson, D., Evans, J., Cros-Arteil, S., Navajas, M. (2005): The invasive Korea and Japan types of *Varroa destructor*, ectoparasitic mites of the Western honeybee (*Apis mellifera*), are two partly isolated clones. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272: 411–419.
- Solignac, M., Vautrin, D., Pizzo, A., Navajas, M., Le Conte, Y., Cornuet, J.-M. (2003): Characterization of microsatellite markers for the apicultural pest *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and its relatives. *Molecular Ecology Notes*, 3: 556–559.
- Spreafico, M., Eordegh, F.R., Bernardinelli, I., Colombo, M. (2001): First detection of strains of *Varroa destructor* resistant to coumaphos. Results of laboratory tests and field trials. *Apidologie*, 32: 49–55.
- Stará, J., Pekár, S., Nesvorná, M., Erban, T., Vinšová, H., Kopecký, J., Doskočil, I., Kamler, M., Hubert, J. (2019): Detection of *tau*-fluvalinate resistance in the mite *Varroa destructor* based on the comparison of vial test and PCR–RFLP of *kdr* mutation in sodium channel gene. *Experimental and Applied Acarology*, 77:161–171.

- Steiner, J., das Graças Pompolo, S., Takahashi, C.S., Gonçalves, L.S. (1982): Cytogenetics of the acarid *Varroa jacobsoni*. *Revista Brasileira de Genética*, 5: 841–844.
- Strachecka, A., Borsuk, G., Olszewski, K., Paleolog, J. (2015): A new detection method for a newly revealed mechanism of pyrethroid resistance development in *Varroa destructor*. *Parasitology Research*, 114: 3999–4004.
- Tan, J., Liu, Z., Nomura, Y., Goldin, A.L., Dong, K. (2002): Alternative splicing of an insect sodium channel gene generates pharmacologically distinct sodium channels. *Journal of Neuroscience*, 22: 5300–5309.
- Thackeray, J.R., Ganetzky, B. (1995): Conserved alternative splicing patterns and splicing signals in the *Drosophila* sodium channel gene *para*. *Genetics*, 141: 203–214.
- Thompson, H., Ball, R., Brown, M., Bew, M. (2003): *Varroa destructor* resistance to pyrethroid treatments in the United Kingdom. *Bulletin of Insectology*, 56: 175–181.
- Tsagkarakou, A., Van Leeuwen, T., Khajehali, J., Ilias, A., Grispou, M., Williamson, M.S., Tirry, L., Vontas, J. (2009): Identification of pyrethroid resistance associated mutations in the *para* sodium channel of the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Insect Molecular Biology*, 18: 583–593.
- Usherwood, P.N., Davies, T.G., Mellor, I.R., O'Reilly, A.O., Peng, F., Vais, H., Khambay, B.P., Field, L.M., Williamson, M.S. (2007): Mutations in DIIS5 and the DIIS4-S5 linker of *Drosophila melanogaster* sodium channel define binding domains for pyrethroids and DDT. *FEBS Letters*, 581: 5485–5492.
- van Dooremale, C., Stam, E., Gerritsen, L., Cornelissen, B., van der Steen, J., van Langevelde, F., Blacquiere, T. (2013): Interactive effect of reduced pollen availability and *Varroa destructor* infestation limits growth and protein content of young honey bees. *Journal of Insect Physiology*, 59: 487–493.
- Van Leeuwen, T., Dermauw, W. (2016): The molecular evolution of xenobiotic metabolism and resistance in chelicerate mites. *Annual Review of Entomology*, 61: 475–498.
- Van Leeuwen, T., Vanholme, B., Van Pottelberge, S., Van Nieuwenhuysse, P., Nauen, R., Tirry, L., Denholm, I. (2008): Mitochondrial heteroplasmy and the evolution of insecticide resistance: non-Mendelian inheritance in action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 5980–5985.

- Veselý, V. (2003): Včelařství. 2. vydání. Brázda. Praha, Česká republika.
- Wang, R., Huang, Z.Y., Dong, K. (2003): Molecular characterization of an arachnid sodium channel gene from the *Varroa* mite (*Varroa destructor*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33: 733–739.
- Wang, R., Liu, Z., Dong, K., Elzen, P.J., Pettis, J., Huang, Z. (2002): Association of novel mutations in a sodium channel gene with fluvalinate resistance in the mite, *Varroa destructor*. *Journal of Apicultural Research*, 41: 17–25.
- Wang, Z., Zhou, X., Lin, Q., Fang, W., Chen, X. (2011): New primers for sex identification in the Chinese Egret and other ardeid species. *Molecular Ecology Resources*, 1: 176–179.
- Watkins, M. (1997): Resistance and its relevance to beekeeping. *Bee World*, 78: 15–22.
- Watkins, M. (2011): Chemical control of *Varroa*. Carreck, N.L. (ed.) *Varroa: still a problem in the 21st century?* International Bee Research Association, 33–42, Cardiff, Velká Británie.
- Wilfert, L., Long, G., Leggett, H.C., Schmid-Hempel, P., Butlin, R., Martin, S.J.M., Boots, M. (2016): Deformed wing virus is a recent global epidemic in honeybees driven by *Varroa* mites. *Science*, 80: 351.
- Xia, J., Han, L., Zhao, Z. (2012): Investigating the relationship of DNA methylation with mutation rate and allele frequency in the human genome. *BioMed Central Genomics*, 13: 7.
- Zhang, H.G., French-Constant, R.H., Jackson, M.B. (1994): A unique amino acid of the *Drosophila* GABA receptor with influence on drug sensitivity by two mechanisms. *The Journal of Physiology*, 479: 65–75.