

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Olomouc 2018

Kateřina Sapáková

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY



**Studium oplození u včely medonosné (*Apis mellifera*)
pomocí polymorfních mikrosatelitů**

Bakalářská práce

Kateřina Sapáková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2018

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

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

V Olomouci dne 4. 5. 2018

Souhrn

Tato bakalářská práce se zabývá oplozením matky včely medonosné (*Apis mellifera*) a odhadem počtu trubců, kteří se spářili s matkou.

V teoretické části bakalářské práce jsem charakterizovala řád blanokřídlí, čeleď včelovití, rod včela a zařadila jsem včelu medonosnou do taxonomického systému. Popsala jsem život ve včelstvu, základní anatomické a morfologické znaky včely medonosné s důrazem na pohlavní ústrojí matky a trubce. Zaměřila jsem se na páření matky a trubců a věnovala se haplodiploidnímu určení pohlaví u včely medonosné. Dále následuje obecná charakteristika mikrosatelitů a popsání mikrosatelitů izolovaných pro včelu medonosnou.

V praktické části jsem izolovala genomovou DNA 12 matek včely medonosné, od každého jedince dva vzorky. První vzorek byl z hlavy a hrudi, druhý vzorek ze zadečku, kde je uložený semenný váček se spermii trubců. Optimalizovala jsem podmínky pro PCR u 15 mikrosatelitů a vybrala jsem z nich 11 polymorfních.

Při testování vzorků poskytly všechny mikrosatelity PCR produkt, ale ani v jenom z případů se nepodařilo získat produkt s DNA ze zadečku odlišný od PCR produktů s DNA izolované z hlavy a hrudi. Celkem jsem u 11 mikrosatelitů detekovala od 2 do 12 alel na lokus.

Summary

This bachelor thesis studies the fertilization of honey bee queens (*Apis mellifera*) and attempts to estimate the number of drones that mated with the queen bee.

The theoretical section of the thesis contains the characterization of order Hymenoptera, family Apidae and classifies the honey bee in the taxonomical system. Further more it describes the life in a bee hive, basic anatomy and morphology with emphasis on the reproductive system of the honey bee. It focuses on the mating process between the queen bee and the drone. Special attention is given to the haplodiploid sex determination of honey bees. A general characteristic of microsatellites and particularly of microsatellites isolated for honey bees ends this section.

In the practical part of the thesis covers the isolations of genome DNA of 12 honey bee queens. From each subject two samples were taken. In the first isolation the head and chest was used, for the second one the abdomen, where the drone's seminal vesicles are located. Conditions were optimized for PCR for 15 microsatellites from which 11 polymorphic ones were chosen.

Every microsatellite produced PCR product while testing, however there were no differences between the DNA gathered from the first and the second isolation. On each of the microsatellites used, 2 to 12 alleles per locus were detected.

Chtěla bych poděkovat RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za cenné odborné rady, připomínky a čas, který mi věnoval nejen při experimentální části této bakalářské práce.

Obsah

1 Úvod	1
2 Literární přehled	3
2.1 Řád blanokřídlí	3
2.2 Čeleď včelovití	3
2.3 Rod včela	4
2.4 Druh včela medonosná	4
2.5 Život včelstva	6
2.6 Anatomie a morfologie včely medonosné	8
2.7 Rozmnožování včely medonosné	12
2.7.1 Shromaždiště trubců	12
2.7.2 Páření včelích matek s trubci	13
2.7.3 Včelí matka po páření	13
2.8 Genom včely medonosné	14
2.9 Haplodiploidní systém kódování pohlaví u blanokřídlého hmyzu	14
2.10 Mikrosatelity	16
2.11 Mikrosatelity včely medonosné	17
3 Materiál a metody	22
3.1 Biologický materiál	22
3.2 Chemikálie	22
3.3 Roztoky	23
3.4 Vybavení laboratoře	25
3.5 Izolace DNA	25
3.6 Amplifikované mikrosatelity u včely medonosné kraňské	26
3.7 Polymerázová řetězová reakce	27
3.8 Elektroforetická separace PCR produktů	28
4 Výsledky	31
5 Diskuze	36
6 Závěr	40
7 Literární zdroje	41

Seznam obrázků

Obr. č. 1: Geografické a fylogenetické vztahy vybraných poddruhů včely medonosné v Evropě, Africe a na Blízkém východě (Weinstock *et* Robinson, 2006).

Obr. č. 2: Matka včely medonosné kraňské ve včelstvu s dělnicemi.

Obr. č. 3: Průřez tělem dělnice včely medonosné s popsány vnitřními orgány (podle Prýmas *et al.*, 2017).

Obr. č. 4: Pohlavní ústrojí matky v průřezu zadečkem (Prýmas *et al.*, 2017).

Obr. č. 5: Schéma páření matek a trubců při panmiktickém (vlevo) a inbredním (vpravo) vztahu s ohledem na gen *csd* (Prýmas *et al.*, 2017).

Obr. č. 6: Elektroforetogram mikrosatelitového lokusu A8, u kterého bylo detekováno 6 alel při teplotě 54 °C.

Obr. č. 7: Elektroforetogram mikrosatelitového lokusu Ap66, u kterého byly detekovány 3 alely při teplotě 50 °C.

Obr. č. 8: Elektroforetogram mikrosatelitového lokusu A88, u kterého bylo detekováno 5 alel při teplotě 61 °C.

Seznam tabulek

Tab. č. 1: Seznam patnácti mikrosatelitových lokusů testovaných v rámci bakalářské práce s uvedením sekvence primerů a literárního zdroje.

Tab. č. 2: Složení PCR reakční směsi pro 24 vzorků.

Tab. č. 3: Podmínky PCR reakce.

Tab. č. 4: Koncentrace DNA ze vzorků dvanácti matek včely medonosné kraňské (*Apis mellifera carnica*).

Tab. č. 5: Charakteristika 15 mikrosatelitů, testovaných na 24 vzorcích (12 matkách) včely medonosné kraňské (*Apis mellifera carnica*).

1 Úvod

Mikrosatelity jsou krátké úseky DNA tvořené tandemovými repeticemi dlouhými maximálně do deseti nukleotidů, díky vysoké variabilitě jsou mikrosatelity používány jako genetické markery například v populační genetice pro určování paternity a struktury populací. Jejich význam je i v genetickém mapování. Pro jejich amplifikaci se využívá polymerázová řetězová reakce a následná separace vzniklých produktů.

Včela medonosná (*Apis mellifera*) je sociální hmyz, který žije v koloniích desítek tisíc jedinců. Tyto kolonie se nazývají včelstva a obvykle se skládají ze tří kast: z matky, z trubců a z dělnic. Matka je od počátku určena velikostí buňky, do které je vajíčko nakladeno a také tím, že v rané fázi vývoje larvy je krmena mateří kašičkou. Dospělá matka klade oplozená i neoplozená vajíčka. Většinu včel ve včelstvu tvoří dělnice, které se líhnou z oplozených vajíček a plní po dobu svého života různé úkoly pro růst a fungování včelstva. Z neoplozených vajíček se líhnou trubci. Tento způsob určování pohlaví je nazýván haplodiploidní. Trubci se při snubním letu spáří s matkou na místě, které se nazývá trubčí shromaždiště. Matka po spáření klade vajíčka přibližně 4–5 let.

V této bakalářské práci bych chtěla na základě analýzy mikrosatelitů určit počet trubců, pářících se s matkou při snubním letu.

Cíle práce

1. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce (včela medonosná, oplození u včel, haplodiploidní systém kódování pohlaví u blanokřídlého hmyzu, polymorfní mikrosatelity známé u včely medonosné).
2. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
3. PCR amplifikace DNA včelích matek a zásob trubčího spermatu v jejich tělech pro odhad počtu trubců, se kterými se pářily.

2 Literární přehled

2.1 Řád blanokřídlí

Blanokřídlí (Hymenoptera) jsou řádem hmyzu obsahujícím více než 150 000 popsaných druhů a zahrnují mnoho druhů včel, vos, lumků a mravenců (Everson, 2014). Dělí se na dva podřády: štíhlopasí (Apocrita) a širopasí (Symphyta). Širopasí se vyznačují tím, že jejich zadeček nasedá v celé šíři na hrud' a patří mezi ně například jehlatkovití, pilořitkovití nebo ploskohřbetkovití. Štíhlopasí mají oddělený zadeček od hrudi stopkou, aby ho mohli při vpichování kladélka do hostitele snáze ohnout (Žďárek, 2015). Podřád štíhlopasí zahrnuje naprostou většinu zástupců blanokřídlých, mezi kterými jsou i sršňovití, mravencovití a včelovití. Blanokřídlí jsou ekologicky velmi významní z důvodu velké škály rolí v ekosystému – například dravci, paraziti, opylovači apod. (Peters, 2017) a vyskytují se ve všech oblastech kromě polárních, nejhojněji jsou však zastoupeni v tropech a subtropích. Blanokřídlí patří mezi holometabolický hmyz a vyznačují se přeměnou dokonalou, tedy se vyvíjejí ve čtyřech stádiích – vajíčko, larva, kukla a dospělec. Pohlaví jedinců je určováno tím, zda je vajíčko oplozeno nebo ne. Z oplozených vajíček se stávají samice a z neoplozených se líhnou samci. Mezi oběma pohlavími často existuje extrémní pohlavní dimorfismus (Lindauer, 2016).

2.2 Čeleď včelovití

Čeleď včelovití (Apidae) zahrnuje včely, které jsou eusociální, ale nejvíce včel v této čeledi je samotářských (Gillott, 2005). V České republice se vyskytuje přibližně 600 druhů samotářských včel, podle ústrojí pro sběr pylu se rozdělují na včely nohosběrné (Podilegae) a břichosběrné (Gastrilegae). Tyto včely nežijí ve společenstvech a nemají dělnice, vyskytují se jen v dokonalých pohlavních formách – samci a samice (Veselý, 2003). Samice spárené se samci kladou vajíčka do buněk, které si samy vytvořily a zásobují je potravou pro larvy, většinou se nedožívají další generace. Samice vytvářejí buňky různým způsobem v různých materiálech a dle toho byly pojmenovány některé rody, např. pískorypka (*Andrena*), drvodělka (*Xylocopa*), zednice (*Osmia*), čalounice (*Megachile*). Další včely samotářky se jmenují podle vzhledu nebo dle rostlin, které opylují – šedosrstka (*Rhophitoides*), pelonoska (*Anthophora*), ploskočelka (*Halictus*), olejnice (*Macropis*) a mnohé další (Švamberk, 2000). Eusociální včelovití se vyznačují tím, že sbírají nektar a pyl nejen pro sebe, ale i pro larvy, které se tím potom také kontinuálně živí po celou dobu jejich vývoje. Mezi eusociální včelovité se řadí i rod včela.

2.3 Rod včela

Předpokládá se, že rod včela (*Apis*) existuje na této planetě v dnešní morfologické podobě nejméně 63 milionů let – podle morfologicky příbuzné včely (*Cretotrigona prisca*) zalité v jantaru. Někteří autoři se domnívají, že rod včela se vyvinul v tropické Eurasii (Ruttner, 1988), někteří že na středním východě (Garnery, 1992) a poté se stěhoval na sever a západ. Nejnovější poznatky ukazují, že včela původně pochází z Afriky (Whitfield *et al.*, 2006). Nicméně Evropy včela dosáhla do konce pleistocénu přibližně před 15 tisíci lety (Weinstock *et Robinson*, 2006). Ve Španělsku v Pavoučí jeskyni byly nalezeny kresby staré 12 tisíc let, které zobrazují vztah člověka a včel (výjev dvou postav při sběru medu) (Švamberk, 2003). Díky klimatickým podmínkám a rozmanitým druhům včelí pastvy se rod včela adaptoval a rozdělil do devíti druhů (Přidal *et al.*, 2008):

- *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 – včela medonosná,
- *A. florea* Fabricius, 1787 – v. květná,
- *A. cerana* Fabricius, 1793 – v. východní,
- *A. dorsata* Fabricius, 1793 – v. obrovská,
- *A. andreniformis* Smith, 1858 – v. trpasličí,
- *A. nigricincta* Smith, 1861 – v. celebeská,
- *A. laboriosa* Smith, 1871 – v. skalní,
- *A. koschevnikovi* Enderlein, 1906 – v. sundská,
- *A. nuluensis* Tingek, Koeniger *et* Koeniger, 1996 – v. sabašská.

Tyto druhy se také rozdělují na podrody podle velikosti. *A. dorsata* a *A. laboriosa* patří do podrodu *Megapis*. Druhy *A. florea* a *A. andreniformis* do podrodu *Micrapis*. Ostatní druhy jsou střední velikosti a patří do podrodu *Apis* (Přidal *et al.*, 2008).

2.4 Druh včela medonosná

Včela medonosná (*Apis mellifera*) je jeden z nejnámějších sociálně žijících zástupců blanokřídlého hmyzu a vyskytuje se v mnoha ekosystémech s výjimkou polárních oblastí a pouští (Winston, 1991). Včela medonosná má díky opylování kulturních a jiných planě rostoucích hmyzosubných rostlin velmi významný vliv na udržování rovnováhy mezi hmyzosubnými a větrosubnými rostlinami, která má velký význam v utváření charakteru krajiny (Švamberk, 2015). Pokud nejsou na daném území v dostatečné míře zastoupeni opylovači, především včela medonosná, může dojít k převaze rostlin větrosubných. Včela má vliv na hospodářství, a to produkcí medu, vosku, propolisu, pylu (pergy), mateří kašičky, včelího jedu, ale hlavně opylovací činností (Žďárek, 2015).

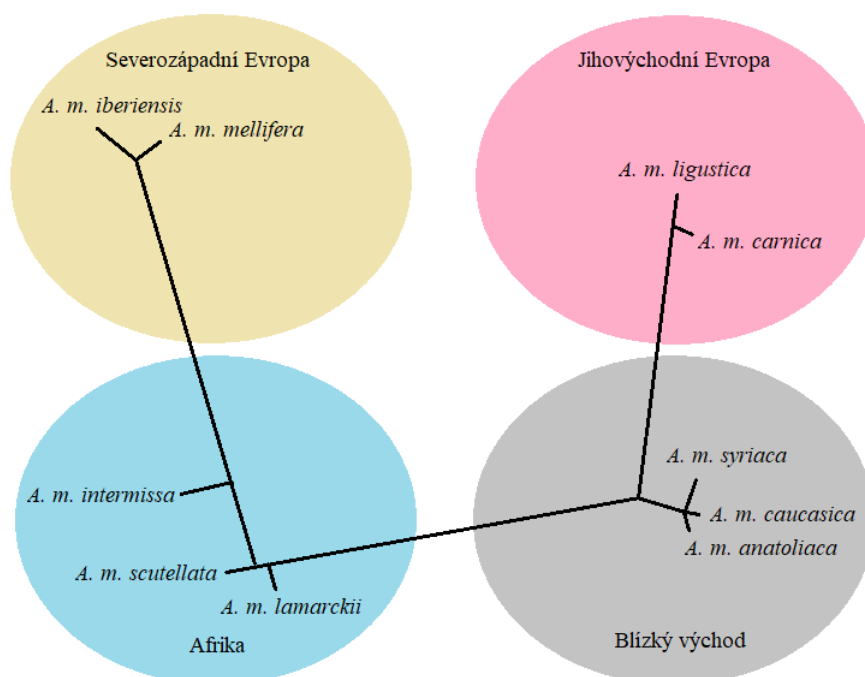
Druh včela medonosná se dle Pokorného *et* Šifnera (2004) taxonomicky řadí do:
říše živočišné (Animalia),
kmene členovci (Arthropoda),
podkmene vzdušnicovci (Tracheata),
třídy hmyz (Insecta),
podtřídy křídlatí (Pterygota),
řádu blanokřídílí (Hymenoptera),
podřádu štíhloпасí (Apokrita),
nadčeledi včely (Apoidea),
čeledi včelovití (Apidae),
rodu včela (*Apis*),
druhu včela medonosná (*Apis mellifera*).

Včela medonosná se rozděluje do mnoha poddruhů, kterých je nyní uznáno přibližně třicet. V rámci těchto poddruhů se rozeznávají i jejich ekotypy a chovná plemena, která jsou důležitá pro praktiky a udržení genetické struktury chovů (Oleksa *et* Tofilski, 2015). V rámci plemen mohou vzniknout i několikanásobní kříženci. Podruhy včely medonosné se rozdělují podle místa, kde se přirozeně vyskytují na podruhy severozápadní Evropy, jihovýchodní Evropy, Blízkého východu a Afriky (Weinstock *et* Robinson, 2006). Zástupci poddruhů Blízkého východu jsou například včela medonosná kyperská (*A. m. cypria*), v. m. kavkazská (*A. m. caucasica*) nebo v. m. anatolská (*A. m. anatoliaca*). Africké včely jsou například v. m. středoafriká (*A. m. scutellata*), v. m. tellská (*A. m. intermissa*) nebo v. m. egyptská (*A. m. lamarckii*). Nejznámější podruhy včely medonosné ze severozápadní Evropy jsou v. m. tmavá (*A. m. mellifera*), a v. m. iberská (*A. m. iberiensis*). V. m. kraňská (*A. m. carnica*) a v. m. vlašská (*A. m. ligustica*) jsou podruhy ze skupiny jihovýchodní Evropy (Winston, 1991) viz obrázek č.1.

V období po poslední době ledové osídlily naše území dva podruhy: včela medonosná tmavá (*A. m. mellifera*) a včela medonosná kraňská (*A. m. carnica*) (Přidal, 2005). O jejich přesném rozšíření na území ČR se vedou spory. Z důvodu měnícího se prostředí a migrace není zcela známé původní rozmístění poddruhů v ČR. První spolehlivá pozorování máme z 19. století, kdy včela medonosná tmavá žije v Čechách a na severní Moravě a včela medonosná kraňská žije na jihovýchodní Moravě. Nejrozšířenější včela byla u nás včela medonosná tmavá, která byla v polovině minulého století křížena s ostatními přiváženými podruhy, a tímto došlo k nekontrolovatelnému křížení a k zániku včely medonosné tmavé v původní čisté formě. Návrat k této původní čisté formě se nepodařilo realizovat a nyní se od roku 2001 na území České republiky smí podle zákona cho-

vat jen včela medonosná kraňská (Přidal *et al.*, 2008). Pro zjištění vlivu jiného poddruhu se využívá loketního indexu, který spolehlivě odliší tři poddruhy včely medonosné a to včelu medonosnou tmavou, v. m. kraňskou a v. m. kavkazskou (Čermák *et* Kašpar, 2008). Pro určování poddruhů je dále používáno mnoho jiných morfologických znaků například pigmentace (Ruttner *et al.*, 1978). I samotná buňka křídla může pomoci v identifikaci poddruhu (Francoy *et al.*, 2006). Nejnověji jsou využívány molekulárně biologické metody (Bouga *et al.*, 2011).

Obr. 1: Geografické a fylogenetické vztahy vybraných poddruhů včely medonosné v Evropě, Africe a na Blízkém východě (Weinstock *et* Robinson, 2006).



2.5 Život včelstva

Včela medonosná je blanokřídlý hmyz, který žije ve společenstvech zvaných včelstva. Ta jsou složená z jedné spářené matky, z trubců a z dělnic. Matka je zpravidla jediná ve včelstvu (viz obrázek č. 2) a dožívá se dvou až čtyř let (Prýmas, 2017). Jejím úkolem jsou zajištění soudržnosti včelstva a jeho základních funkcí (obranyschopnost, rozmnožovací, shromažďovací pudy a další funkce – pomocí vylučovaných feromonů). Další funkcí je kladení vajíček, a to až 2 000 vajíček za den (Grozinger *et al.*, 2007). Matka se po naklazení vajíček nestará o jejich ošetřování (Winston, 1991). To je úkolem dělnic, kterých je ve včelstvu od období klidu do období vrcholného rozvoje 20–80 tisíc. Délka života včely dělnice se podle fyzického zatížení dá ohraničit 6 týdny (letní generace) až 6 měsíci (zimní generace). Včela dělnice je nedokonalá samička se zakrnělými pohlavními

orgány, neschopná spáření, ale může za určité situace klást neoplozená vajíčka (viz dále), ze kterých se líhnou pouze trubci, a proto se tyto kladoucí včely dělnice nazývají trubčice. Dělnice procházejí za svůj život určitými funkčními stádii, která zajišťují chod včelstva (Fahrbach *et* Robinson, 1995). Tyto funkce na sebe navazují a většinou se aktivují podle vývoje některých žláz:

1. uklízečka (1.–3. den) kusadlová žláza,
2. kojička (4.–12. den) hltanová žláza,
3. stavitelka (12.–18. den) vosková žláza,
4. strážkyně (18.–21. den) jedové žlázy,
5. létavka (21.–úhyn) potřebné žlázy se vyvinuly již v průběhu předchozích stádií života.

Pracující členové společenstva projevují různé odchylky v druhu behaviorálních úkolů, které provádějí. Tyto úkoly jsou často spojeny se změnami ve fyziologii, které korelují s věkem, stejně jako rozdíly v morfologii. Tato úroveň společenské organizace je považována za příčinu enormního ekologického a evolučního úspěchu společenských druhů, včetně pokročilých skupin mravenců, vos a termitů (Oster *et* Wilson, 1978).

Trubec se líhne z neoplozeného vajíčka. Ve včelstvu se trubci vyskytují jen od dubna do srpna a jejich hlavní funkcí je spáření se s matkou (Veselý *et al.*, 2003).

Obr. 2: Matka včely medonosné kraňské ve včelstvu s dělnicemi.

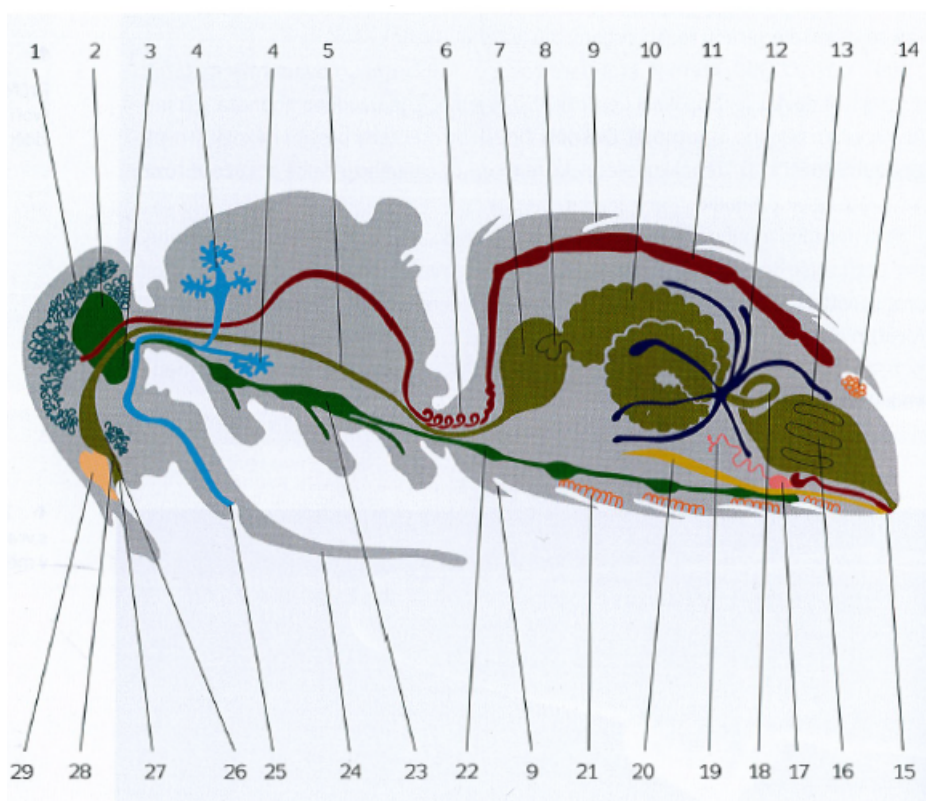


Foto: Petr Sapák

2.6 Anatomie a morfologie včely medonosné

Vnější kostru těla včely medonosné tvoří kutikula, jejíž základní látkou je chitin. Kutikula je pokryta trichomy, brvami, senzily, trny a šupinami. Tyto struktury mají za úkol plnit různé funkce, například krycí, termoregulační, smyslové nebo mechanické. Tělo včely se skládá ze tří hlavních částí a to hlavy (*caput*), hrudi (*thorax*) a zadečku (*abdomen*). Tyto části vznikly srústem několika článků. (Schönfeld, 1955)

Obr. 3: Průřez tělem dělnice včely medonosné s popsanými vnitřními orgány (podle Prýmas *et al.*, 2017).



1. hltanová žláza; 2. mozek; 3. podjícnové ganglium; 4. hrudní pysková žláza; 5. jícen; 6. spirální část aorty; 7. medné volátko; 8. česlo; 9. intersegmentální membrána; 10. mezenteron (žaludek); 11. srdce; 12. Malpighiho trubice; 13. výkalový váček; 14. Nasonovova žláza; 15. žihadlo; 16. žláza výkalového váčku; 17. jedový váček; 18. tenké střevo; 19. jedová žláza; 20. zakrnělý vaječník; 21. vosková žláza; 22. zadečkové ganglium; 23. hrudní ganglium; 24. sosák; 25. vyústění pyskové žlázy; 26. hltanová destička; 27. ústa; 28. hltan; 29. kusadlová žláza.

Hlava

Hlavu včely tvoří v přední části čelní štítek (*clypeus*), který slouží k pěchování pylu do buněk. Na čelním štítu jsou posazena článkovaná tykadla, která jsou velmi důležitá pro smyslové vnímání včely. Po stranách jsou uložena kusadla (*mandibulae*), používaná pro sběr pylu a propolisu, při úklidu a při obraně. Vertikálně od týlního otvoru je složený sosák (*proboscis*) tvořený lízavě sacím ústrojím. Na temenu hlavy jsou dvě složené oči a mezi nimi jsou tři jednoduchá očka. Hlava je s hrudí spojená stopkou. (Schönfeld, 1955)

Hrud'

Hrud' včely se rozlišuje na předohrud', středohrud' a zadohrud' a bedra. Hrud' nese tři páry nohou a dva páry křídel, která vznikla jako vychlípeniny kutikuly. Hrud' a zadeček jsou spojeny stopkou pro lepší pohyblivost. (Schönfeld, 1955)

Zadeček

Zadeček je typický viditelným článkováním. Kutikula zadečku je tvořena pevnými sklerity, které se na hřbetní straně nazývají tergity a na břišní straně sternity. Sklerity jsou spojené pružnými membránami, které umožňují roztažnost zadečku. Na konci zadečku vznikl přeměnou kladélka žihadlový aparát, který je u matky, dělnic i trubců různě přeměněn a používán na jiné účely. (Schönfeld, 1955)

Trávicí soustava

Trávicí trubice je rozdělena na tři části. První je přední (*stomodeum*), kterou tvoří hltan, medné volátko a česlo. Druhá část se nazývá střední (*mezenteron*), v ní dochází ke vstřebávání potravy a třetí je zadní část (*procotodeum*), zde se nachází střevo a výkalový váček. K trávicí soustavě neodlučitelně patří i žlázy. Největší žlázy v těle včely medonosné jsou kusadlová, pysková a hltanová. Ty jsou uloženy v hlavové části a slouží k úpravě potravy pro larvy, k úpravě nektaru a k tvorbě a formování pylových rousek. (Schönfeld, 1955)

Nervová soustava

Nervová soustava včely medonosné je gangliová. Přes celé tělo probíhá nervová páska, která v každém článku tvoří zuzliny tzv. ganglia. Z nich vycházejí nervy. V hlavě jsou ganglia, která vytvořila mozek. Níže splynutím několika ganglií vzniklo podjícnové

ganglium a hrudní ganglium. V zadečku je dalších pět ganglií a poslední z nich se při vysunutí žihadla odtrhne a zajišťuje pulzaci žihadla i po jeho oddělení. (Schönfeld, 1955)

Dýchací soustava

Dýchací plyny jsou po těle rozváděny pomocí vzdušnic. Ty jsou na povrchu těla vyústěny v průduchy, které pokračují do dýchacích vaků a větvením do trubic se dostávají do blízkosti buněk, kde dochází k výměně plynů. (Schönfeld, 1955)

Oběhová soustava

Oběhová soustava včely se skládá ze srdce, které je složeno z pěti komor a je uloženo pod tergity v zadečku. Dále se oběhová soustava skládá z aorty v hrudní části těla a cév, které jsou slepě zakončené. Oběhová soustava včely je otevřená a proudí v ní hemolymfa, která po těle rozvádí živiny a produkty metabolismu. Hemolymfa se po těle pohybuje pomocí podpůrných systémů, svalových blanek bránice a pulzačních váčků. (Schönfeld, 1955)

Vylučovací soustava

Vylučovací soustava se skládá z přibližně 150 Malpighických trubic, které jsou na jedné straně slepě zakončené a na druhé ústí do tenkého střeva. Odpadní látky poté včela vyloučí s výkaly z výkalového váčku. Včela také vylučuje dusíkaté látky ve formě kyseliny močové, podobně jako ptáci a plazi. Do vylučovací soustavy také patří Nasonovova a vosková žláza. (Schönfeld, 1955)

Pohlavní soustava

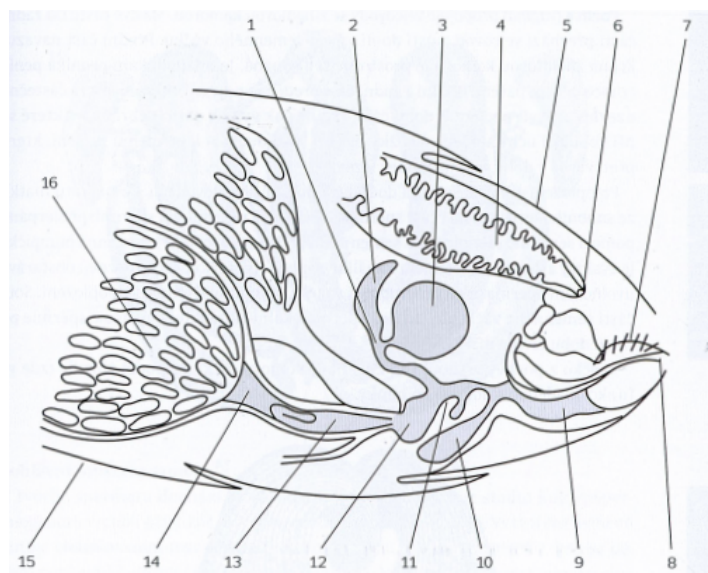
Reprodukční orgány včel jsou umístěny v zadečku, spolu s několika dalšími orgány zajišťujícími jiné tělesné funkce, jako je trávení a dýchání (Mackensen, 1948).

a) Samičí pohlavní orgány

Samičí pohlavní orgány jsou vyvinuty u matky a u dělnic jsou rudimentární. U matek je pohlavní ústrojí tvořeno pohlavními žlázami a vývody, na které navazují přídatné žlázy. Celé ústrojí je zakončeno kopulačním orgánem. Pohlavní orgány matky se skládají z vaječnicků, vejcovodů, pochvy, pohlavního vývodu, semenného váčku a kladélka. Vaječnický (*ovaria*) jsou párové žlázy uloženy v zadečku. Skládají se z vaječných rourek

(*ovariolae*), kterých je v každém vaječníku asi 150–200. Vaječníky zabírají značnou část zadečku a jejich objem se mění podle míry kladení a tvorby vajíček. Ve vaječných rourkách se vyvíjejí vajíčka (*ova*) a tyto vaječné rourky ústí do vejcovodu (*oviductus*). Vejcovody se spojují do jednoho vývodu – pochvy (*vagina*). Po bocích pochvy jsou předsíňky, které se rozšiřují a vytvářejí žihadlovou komoru. V zadní části do pochvy vyúsťuje semenný váček (*receptaculum seminis*), ve kterém jsou uloženy spermie po dobu 4–5 let. Spermie se dávkuje tzv. semennou pumpičkou, což jsou tři párové podélné svaly a tři párové kruhové svaly, upínající se k vývodu semenného váčku. Vlastní pohlavní vývod (*gonopor*) se nachází mezi žihadlem a posledním sternitem zadečku (Veselý *et al.*, 2003). Pohlavní ústrojí matky je vyobrazeno na obrázku č. 4.

Obr. 4: Pohlavní ústrojí matky v průřezu zadečkem (Prýmas *et al.*, 2017).



1. semenná pumpička; 2. žláza semenného váčku; 3. semenný váček; 4. výkalový váček; 5. poslední tergít; 6. řitní otvor; 7. žihadlová pochva; 8. žihadlo; 9. pochva; 10. pářící schrána; 11. poševní chlopeň; 12. společný vejcovod; 13. párový vejcovod; 14. nálevka vejcovodu; 15. sternit; 16. vaječník.

Vaječníky dělnic leží po stranách zadečku a mají jen 1–20 ovariol. V období, kdy je ve včelstvu přítomna matka, se při vývoji včely dělnice vyvinou i hypofaryngeální žlázy, které ve fázi kojičky vytvářejí produkt bohatý na bílkoviny, kterým dělnice krmí larvy. Pokud ve včelstvu matka chybí, tak tuto látku nepodávají larvám, a proto tyto dělnice nazývané trubčice vyrůstají s rozšířenými vaječníky a redukují se u nich tyto hypofaryngeální žlázy (Woyciechowski *et* Kuszewska, 2012). Poté tyto trubčice kladou pouze neoplozená vajíčka, ze kterých se líhnou trubci. V době opětovné přítomnosti

matky se pomocí jejích feromonů potlačuje vývoj vaječnicků dělnic a dělnice poté obvykle odstraňují tato nakladená vajíčka (Kocher *et* Grozinger, 2011). Přítomnost matky spolu s dělnicemi úspěšně potlačuje reprodukci dělnic, protože pouze 0,01–0,1 % dělnic v dobře fungující kolonii má aktivní vaječníky. Situace se změní, jestliže matka zemře a její kolonie nemá šanci vytvořit novou matku, protože pak začne 5 až 24 % dělnic klást neoplozená vajíčka (Ratnieks, 1993).

b) Samčí pohlavní orgány

Samčí pohlavní orgány se nacházejí v zadečku trubců. Tvoří je pohlavní žlázy, vývody, přídatné žlázy a vlastní kopulační orgán. Pohlavní orgány trubce tvoří pohlavní a hlenové žlázy, chámovod, chámojem, chámomet a kopulační orgán. Varlata (*testes*) se nacházejí v zadečku a mají ledvinovitý tvar. Skládají se asi z 200 semenných rourek (*folliculi*). Ty ústí do nálevkovitě rozšířeného chámovodu (*vas deferens*). Chámovody vytvářejí několik závitů, zvaných chámojem (*vesica seminalis*). Chámojemy se před zakončením zužují a připojují se k hlenové žláze (*glandula mucosa*). Vývody hlenových žláz se spojují a pokračují společným chámometem (*ductus ejaculatorius*), na který navazuje vlastní kopulační orgán (*penis*), který se po částech vyhrnuje z pohlavního otvoru pod análním otvorem. Z varlat odcházejí spermie do chámojemu, kde jsou až do ejakulace. (Veselý *et al.*, 2003)

2.7 Rozmnožování včely medonosné

Matka včely medonosné se obvykle páří s více trubci na místě zvaném trubčí shromaždiště při snubním letu (Veselý *et al.*, 2003).

2.7.1 Shromaždiště trubců

Je to stálé ohraničené území v přírodě, kde se v době snubního proletu trubci páří s matkami ze širokého okolí. Pokud se v blízkosti nachází více shromaždišť, trubci z určitého stanoviště zůstávají věrni jen jednomu (Schlüns *et al.*, 2005). Díky shromaždišti trubců se matka stihne, ve velmi krátkém časovém úseku 15–20 minut, spářit až s deseti trubci. Největší zájem o matku trubci projevují ve 14 až 22 m nad zemí. Trubčí shromaždiště jsou obvykle pozorována ve vzdálenosti 0,5 až 5 km od včelstva (Ruttner, 1976). Rej trubců sledujících matku čítá 300 až 500 jedinců a lze jej tedy snadno sledovat. Rej se rychle rozptylí a opět zformuje. Formace trvá jen zlomek sekundy a jedná se o pravidelné řady se špičkou vpředu (Veselý *et al.*, 2003). Zdá se, že se trubci na

různých shromaždištích koncentrují náhodně a hledají příležitost k páření. Tím se snižuje pravděpodobnost příbuzenského křížení, inbreedingu (Dos Santos *et al.*, 2016).

2.7.2 Páření včelích matek s trubci

Včelí matka může před snubním letem vyletět na několik orientačních letů. Několik dní před snubním letem mají dělnice o matku velký zájem, například ohmatávají matčin zadeček tykadly. V den páření se včely shromažďují na česnu a pomocí vonných žláz matku donutí opustit úl (Veselý *et al.*, 2003). Matky včely medonosné se s trubci páří za letu ve volném prostoru. Při vlastní kopulaci trubec k matce přilétá zezadu a odspodu. Asi 10–30 metrů nad zemí je trubec nad matkou a objímá nohama její zadeček. Důležitý popud k vlastnímu páření je otevření žihadlové komory matky. Trubčí kopulace probíhá v několika fázích, jen několik málo vteřin. Prvně se pomocí stahů hrudních a břišních svalů v zadečku trubce částečně obrátí kopulační orgán – penis, který se naplní vzduchem a hemolymfou a následně vyhřezne. Sperma se v této fázi přemisťuje z hlenových žláz a ze semenných váčků do cibulky penisu. Penis se zasouvá do kopulačního orgánu matky a v další fázi dochází k ejakulaci. Pomocí tlaku v penisu a dokončením vychlípení se sperma a hlen dostávají na povrch penisu. Trubec je s matkou spojen díky lepivým růžkům umístěným na penisu. Růžky se zakotví v žihadlové komoře matky. Poté probíhá ejakulace v pořadí sperma a hlen. Při otevření žihadlové komory matka zároveň otevírá i poševní chlopeč a tímto způsobem se sperma dostává do obou matčiných vejcovodů. Každý trubec matce předá asi 6 milionů spermií do vejcovodů (Kerr *et al.*, 1962). Předposlední fáze kopulace zahrnuje stupňující se tlak v penisu, až praskne jeho stěna a ztrátou pevnosti se matka s trubcem oddělí. Ve čtvrté poslední fázi trubec padá k zemi a hyne. Po vychlípení penisu naplněného hemolymfou trubec hyne bez ohledu na to, zdali se pářil nebo ne. V matčině žihadlové komoře zůstává zbytek trubčího kopulačního orgánu, ale to nebrání další kopulaci, protože se většinou přilepí na penis dalšího kopulujícího trubce. (Veselý *et al.*, 2003)

2.7.3 Včelí matka po páření

Po spáření a přiletu ze snubního letu, má matka ve vejcovodech přibližně 80–90 milionů spermií (Woyke, 1962) a na zadečku snubní znaménko. To tvoří zaschlý hlen a sperma, které vytékají z přeplněných vejcovodů. Během 48 hodin se z vejcovodů sperma přečerpá do semenného váčku a zbytek spermatu je vypuzen z těla ven. Dělnice pomáhají matce k přečerpání spermatu do semenného váčku mačkáním matky mezi se-

bou. Dělnice se snaží přebytečné sperma ze zadečku vypudit a pokud dělnice nespoupracují, sperma může ve vejcovodech i zatvrdnout (Veselý *et al.*, 2003). Dohromady se z vejcovodů do semenného vaku přečerpá pouze 4–7 milionů spermií (Laidlaw *et Page*, 1984). Matka může letět na další snubní let druhý den, pokud není semenný vak dostatečně zaplněn.

Nejdříve se myslelo, že sperma jednoho trubce se v semenném vaku drží pospolu a nemíchá se se spermiemi ostatních trubců (Taber, 1955). Později bylo zjištěno, že se sperma v semenném vaku od různých trubců společně smíchá (Page *et Metcalf*, 1982) a je rovnoměrně zastoupeno při oplození vajíček dělnic (Laidlaw *et Page*, 1984).

2.8 Genom včely medonosné

Vzhledem k velkému významu včely medonosné pro člověka a životní prostředí, byl v roce 2006 genom včely medonosné vybrán na sekvenování týmem National Human Genome Research Institute a National Institutes of Health. Genom včely medonosné byl sekvenován s použitím DNA z několika trubců, pocházejících z jediné matky. (Weinstock *et al.*, 2006)

Genom včely medonosné má asi 15 000 genů. Matka a dělnice jsou diploidní organismy s 32 chromozomy. 16 chromozomů pochází od samice a 16 chromozomů od samce. Trubec se líhne z neoplozeného vajíčka. Je haploidní a má 16 chromozomů, které jsou pouze od matky, bez ohledu na to, s kolika trubci se matka pářila (Beye *et al.*, 2003).

Všechny buňky trubce jsou haploidní a trubčí spermie nevznikají meiózou, ale mitózou. Trubec je tedy jen nástrojem pro přenos gamet, jehož genom je identický s genomem vajíčka, ze kterého se vyvinul (Prýmas *et al.*, 2017). Na rozdíl od trubce, je každá samice včely jedinečná kvůli rekombinaci matčiných chromozomů během tvorby vajíček, tedy každý jedinec má jedinečný genotyp, žádné dvě včely nejsou stejné. Rekombinace je zdrojem variability a ta je důležitá pro adaptaci a vlastní genetická strategie včel je vytvářet a udržovat extrémně vysoký stupeň této genetické variability. Protože trubec má pouze jednu sadu chromozomů, jeho všech 10 milionů spermií jsou klony a všechny obsahují pouze jednu identickou sadu chromozomů. Naopak vajíčka se mezi sebou značně geneticky liší. (Tucker *et Laidlaw*, 1966)

2.9 Haplodiploidní systém kódování pohlaví u blanokřídlého hmyzu

Všichni blanokřídlí mají haplodiploidní systém určování pohlaví; samci jsou haploidní a samice jsou diploidní. Studie ukázala, že nejméně 20 % živočišných druhů

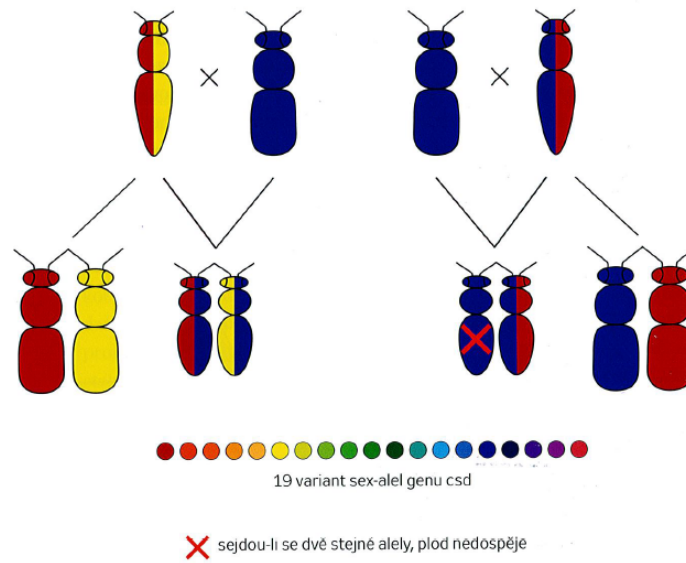
je haplodiploidních (Bull, 1983). Předpokládalo se, že jediné místo ke stanovení pohlaví u blanokřídlých je *sl-csd* (Single locus complementary sex determination), který leží na třetím chromozomu. Gen *csd* má nejméně 19 alelických forem (sex-alely). Pohlaví jedince tedy závisí na tomto alelickém složení v jediném lokusu. Haploidní (hemizygotní) jedinci jsou samci a diploidní (heterozygotní) jedinci jsou samice. Gen *csd* je umístěný uvnitř 36kb genomové oblasti, která je u samic včely medonosné vždy heterozygotní. Předpokládaná aminokyselinová sekvence z přepisu *csd* je složena převážně z opakovaného asparaginu a tyrosinu. Analýza transkriptu genu *csd* také předpovídá doménovou oblast, bohatou na arginin a serin. Gen *csd* byl klonován a sekvenován ze včely medonosné (Beye *et al.*, 2003) a od doby, kdy byl gen *csd* objeven, se našel u více než 60 druhů blanokřídlých (Heimpel *et de Boer*, 2008).

V roce 2008 vědci objevili nový gen pro určení pohlaví u včely medonosné, tento gen je nazýván *sl-fem*. Gen *fem* je konzervativní předchůdce genu, ze kterého vznikl gen *csd* a také kóduje protein zahrnující doménu bohatou na arginin a serin. Varianta genu pro trubce obsahuje předčasný stop kodon a varianta genu pro samici kóduje funkční protein. Srovnávací analýza genu *fem* a *csd* ukázala původ genu *csd* u včely medonosné z předka *fem* a poskytuje důkaz pro pozitivní selekci genu *csd* doprovázenou selekcí genu *fem*. (Hasselmann *et al.*, 2008)

Pokud se matka páří s trubcem, který má stejnou pohlavně určující alelu jako vajíčko, polovina z jejich diploidních genů bude homozygotní a z vajíčka se vyvine larva diploidního trubce. To je znázorněno na obrázku č. 5. S velkou pravděpodobností tento jev nastává díky inbreedingu (Dos Santos *et al.*, 2016). V přírodě bývají diploidní trubci zabiti dělnicemi již ve stádiu larvy. Dělnice likvidují diploidní homozygotní larvy trubců, které rozpoznají čichem, a to díky jinému složení feromonů v porovnání s tím, který produkují diploidní samičí larvy (Přidal, 2007).

Diploidní trubce včely medonosné se podařilo odchovat i ve včelstvu, ale nejčastěji bývají produkováni pro výzkum v laboratorních podmínkách a to za pomoci umělé inseminace matek. Při jejich vývoji ve včelstvu záleží na velikosti včelstva a na ročním období (Polaczek *et al.*, 2000). V podzimním období bylo možné ve včelstvu sledovat diploidní trubce až do stádia dospělosti, přestože je produkce diploidních trubců pro včelstvo velmi energeticky náročná (Zayed, 2009). Diploidní trubci jsou v přírodě produkováni jen zřídka a poté nejsou životaschopní, nebo jsou sterilní. Mají degradovaná varlata (Hugh *et al.*, 1974) se sníženým množstvím diploidních spermií, což vede k triploidnímu (sterilnímu) potomstvu. V mnoha případech mohou být diploidní trubci morfologicky odlišeni velikostí nebo hmotností (van Wilgenburg *et al.*, 2006).

Obř. 5: Schéma páření matek a trubců při panmiktickém (vlevo) a inbredním (vpravo) vztahu s ohledem na gen *csd* (podle Prýmas *et al.*, 2017).



2.10 Mikrosatelity

Mikrosatelity jsou sekvenční repetitivní DNA, které zahrnují proměnlivý počet (do 100) tandemových opakování. Podle některých zdrojů jsou tato opakování dlouhá 1–5 bp (Primmer *et al.*, 1997). V odlišných zdrojích je uvedeno, že mohou být dlouhá až 10 bp (Baker, 2000). Mikrosatelity se také označují jako STRs (Short Tandem Repeats) nebo SSRs (Simple Sequence Repeats). Mikrosatelity jsou všudypřítomné a vyskytují se tedy v prokaryotických i eukaryotických genomech, v kódujících i nekódujících oblastech DNA (Tóth *et al.*, 2000).

Mikrosatelity se podle nejzákladnějšího rozdělení dělí podle délky repetice a struktury repetitivní sekvenční. Dle délky repetice se můžeme setkat s mono-, di-, tri-, tetra- až dekanukleotidovými mikrosatelity (Baker, 2000). Dále se mikrosatelity dělí dle struktury sekvenční na dokonalé, nedokonalé, přerušené a složené. Dokonalé mikrosatelity nejsou přerušeny žádnou bází, která nepatří do opakujeícího se motivu. Nedokonalé mikrosatelity obsahují ve svém motivu bázi, která do tohoto opakujeícího se motivu nepatří. Přerušené mikrosatelity obsahují ve svém motivu sekvenci z několika bází. Složené mikrosatelity obsahují dvě a více jednotek repetice (Bhargava *et Fuentes*, 2010).

Studium mikrosatelitů je založeno na amplifikaci jejich repetitivní oblasti pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) a následné separaci amplifikovaných produktů (Chapuis *et Estoup*, 2007). PCR je založena na replikaci DNA a její podstatou je cyklicky se opakujeící termostabilní enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetěz-

cové DNA ve směru 5'→3' pomocí DNA polymerázy. Tento vybraný úsek je ohraničen dvojicí primerů, které se naváží na protilehlé řetězce DNA, aby jejich 3' konce směřovaly naproti sobě. DNA polymeráza a nukleotidy začínají syntetizovat nová vlákna protisměrně na obou matricích. Pro PCR se používají termostabilní polymerázy, izolované z různých organismů, které odolávají vysokým teplotám, například z bakterie *Thermus aquaticus*. Produkty PCR jsou vizualizovány za denaturujících podmínek v polyakrylamidových gelech, agarozových gelech, kapilární elektroforézou nebo fragmentační analýzou pomocí sekvenátoru. Údaje získané z analýzy mikrosatelitů jsou vhodné pro stanovení původu druhů (Evans, 1993), pro populační charakteristiku, příbuzenství (Estoup *et al.*, 1993) a pro mapování genomu (Sollignac *et al.*, 2003). Pro včelu medonosnou se mikrosatelity využívají v oblasti studia molekulární evoluce, k vytvoření teoretických modelů mutací, pro pochopení jejího reprodukčního a sociálně biologického chování (Franck *et al.*, 1998a).

2.11 Mikrosatelity včely medonosné

Včela medonosná má velký ekonomický a ekologický význam, a proto je u ní velký zájem o molekulární markery. Po dlouhou řadu let byla morfometrie jedinou možností jak poddruhy včely medonosné taxonomicky rozdělit. Ačkoliv byla tato pozorování velmi důležitá pro rozlišení poddruhů, pro celkové rozdělení byla nedostatečná. Morfometrii nahradilo studium allozymů, jehož genetický výklad je jednoznačný, ale allozomy přinesly jen málo informací. Hlavním důvodem byla nízká hladina polymorfních allozymů u včely stejně jako u dalších blanokřídlých (Estoup *et al.*, 1995). Významné pokroky poté byly dosaženy až se zavedením DNA technologií. První studie molekulárních technik se více věnovaly mitochondriální DNA a až poté se s rozvojem sekvenačních technik využívalo různých jaderných markerů. Příkladem molekulárních technik může být náhodná amplifikace polymorfní DNA (RAPD), DNA fingerprinting nebo studium mikrosatelitů (Baudry *et al.*, 1998). V posledních 30 letech se molekulární metody stávají stále důležitější při identifikaci poddruhů včely medonosné (Bouga *et al.*, 2011; Meixner *et al.*, 2013). Tyto molekulární metody jsou často založené na studiu mikrosatelitových markerů (Bodur *et al.*, 2007).

Estoup *et al.* (1993) popsali vůbec první mikrosatelity pro včelu medonosnou. V genomu včely medonosné a čmeláka zemního hledali opakující se (CT)_n a (GT)_n sekvence. (GT)_n opakování jsou nejhojnějšími mikrosatelity u vyšších obratlovců a objevují se v průměru každých 30 kb u lidí, 21 kb u krysa a 18 kb u myší. U včel se mikrosate-

lity s repeticí (CT)_n vyskytují v průměru každých 15 kb a (GT)_n repetice přibližně 34 kb. (CT)_n opakování je také bohatá skupina mikrosatelitů u savců. Avšak o izolaci mikrosatelitů hmyzu a jiných obratlovců než savců, se vědělo jen velmi málo. Fragmentární znalost mikrosatelitů u bezobratlých vedla ve studii k charakterizaci (CT)_n a (GT)_n opakujících se sekvencí u dvou druhů blanokřídlých (včely medonosné a čmeláka zemního). Ve studii byly částečné genomové knihovny včely medonosné konstruovány v plazmidech a prohledávány pomocí značených (CT)_n a (GT)_n syntetických oligonukleotidů. Použili celkovou DNA 12 dělnic včely medonosné z jednoho úlu. DNA byla kompletně rozštěpena pomocí restriční endonukleázy *Sau3A*. Restriční fragmenty mezi 200–600 bp byly extrahované z gelu a byly transformovány do kompetentních buněk. Průměrná velikost klonovaných inzertů od včely medonosné byla stanovena na 360 bp a z její DNA bylo izolováno celkem 75 mikrosatelitů – 52 (CT)_n a 23 (GT)_n. Mikrosatelity izolované v roce 1993 byly využity a pojmenovány v pozdějších publikacích.

Estoup *et al.* (1994) vybrali 10 mikrosatelitů ze 75 publikovaných (Estoup *et al.*, 1993), pojmenovali je a použili jako základ pro pochopení genetického vztahu členů včelstva mezi sebou, sociálního chování a pro zlepšení chovu včel. Pro studii použili DNA z několika desítek vzorků larev dělnic včely medonosné (od 47 až 94). DNA byla extrahována dle Garnery *et al.* (1990). Pro analýzu bylo použito 10 mikrosatelitů A7, A14, A28, A29, A35, A43, A76, A79, A107 a B124. Průměrná heterozygotnost byla vypočítána z alelických frekvencí populace (Nei, 1978). Ve vzorcích bylo zjištěno 12 odlišných otcovských genotypů. Jak se předpokládalo, rozdíl mezi lokusy byl velmi vysoký.

Estoup *et al.* (1995) pokračovali ve výzkumu mikrosatelitů u včel pro určení mikrosatelitové variace a pro zjištění genetické struktury. Pro studium včely medonosné použili 12 mikrosatelitů, vybrali nové mikrosatelity od Estoup *et al.* (1993) a pojmenovali je A113, A24 a A88, také použili další již publikované mikrosatelity A7, A14, A28, A29, A35, A43, A76, A107 a B124 (Estoup *et al.*, 1994). Vzorky DNA z devíti populací (afrických a evropských poddruhů) včely medonosné byly vyizolovány (Garnery *et al.*, 1990) a amplifikovány pomocí PCR a rozděleny v polyakrylamidovém gelu. Výsledky byly testovány, zda jsou v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou, a genetická struktura populace byla určena pomocí programu GENEPOP verze 1.2. Průměrná heterozygotnost a průměrný počet alel byly významně vyšší u afrických poddruhů než u evropských. Mikrosatelitové analýzy také potvrdily, že druh včela medonosná se během evoluce rozdělil do tří odlišných a hluboce diferencovaných linií.

Rowe *et al.* (1997) prezentovali primerové sekvence pro 18 mikrosatelitů včely medo-

nosné. DNA extrahovali ze tří včel medonosných iberských z jednoho včelstva v Austrálii. Mikrosatelity identifikovali pomocí sondy (GA)₁₀. Primery byly navrženy pro 16 potenciálních mikrosatelitů a jen u osmi byl zjištěný polymorfismus a ty pojmenovali B7, ED-R, FE1, FE2, FM-F, GH-F, GJ a HC.

Franck *et al.* (1998b) izolovali nový mikrosatelit. V publikaci použili mikrosatelity pro zkoumání původu poddruhů včel západní Evropy (*Apis mellifera*). Bylo použito přes 500 vzorků dělnic včely medonosné ze 17 populací a také byly použity mikrosatelitové lokusy publikované již dříve A7, A24, A28, A43, A88, A113 a B124 (Estoup *et al.*, 1995), poslední nově izolovaný lokus nazvali A8. Výsledky byly posouzeny pomocí Hardy-Weinbergovi rovnováhy, a vypočítány programem GENEPOP verze 1.2. Ve stejném roce pokračovali ve výzkumu a izolovali navíc i nové mikrosatelity Ap33, Ap36 a Ap43 (Franck *et al.*, 1998a).

Baudry *et al.* (1998) zachytili 142 trubců při snubním letu a pomocí dvaceti vysoce polymorfních mikrosatelitů studovali genetickou rozmanitost skupiny. Testované mikrosatelity byly A7, A14, A29, A76, A79, A107 a B124 (Estoup *et al.*, 1994), A113 (Estoup *et al.*, 1995), A8 (Franck *et al.*, 1998b) a Ap33, Ap36 a Ap43 (Franck *et al.*, 1998a). Další mikrosatelity od Estoup *et al.* (1993) pojmenovali Ap1, Ap12, Ap14, Ap16, Ap19, Ap34, Ap37 a Ap55. Studie ukázaly, že zachycení trubci vytvořili jednu skupinu čtyř bratrů, šest skupin po třech bratrech, 20 skupin dvou bratrů a 80 samostatných trubců. Tyto hodnoty jsou velmi blízko Poissonovy distribuce a zároveň ukazují nízkou pravděpodobnost inbreedingu.

Neumann *et al.* (1999) pokračovali ve výzkumu a využili mikrosatelity pro testování maternity u včely medonosné. Pro testování byly použity včelí matky a dělnice, ze kterých se izolovala DNA fenol-chloroformovou metodou a ta poté byla genotypována pomocí mikrosatelitů A43, A76, A107 a B124 (Estoup *et al.*, 1994).

Franck *et al.* (2001) zkoumali genetickou diverzitu včely medonosné v Africe. Použili osm afrických populací včely medonosné a šest mikrosatelitů, které byly izolované již dříve – A24, A28, A43, A88, A113 a B124 (Estoup *et al.*, 1995).

Chaline *et al.* (2002) využili 17 mikrosatelitů pro genetickou analýzu trubců. Tyto mikrosatelity pomohly rozlišit trubce, které produkovaly dělnice od trubců, kteří byli vyprodukováni matkou v době, kdy matka ve včelstvu stále byla. Mikrosatelity byly již dříve popsány A7, A14, A28, A29, A35, A43, A76, A107 a B124 (Estoup *et al.*, 1994), A24, A88 a A113 (Estoup *et al.*, 1995) a Ap14, Ap16, Ap19, Ap33 a Ap37 (Baudry *et al.*, 1998). V tomto výzkumu zjistili, že převážné množství trubců pocházelo od trubčic.

Solignac *et al.* (2003) učinili pokrok a prezentovali strukturu jaderných sekvencí 552

mikrosatelitů, společně se sekvencemi primerů a délkou sekvenovaných alel. Všech 552 mikrosatelitů je polymorfních u včely medonosné. Byla využita genomová DNA jedinců včely medonosné klonovaná z BAC knihovny (nepublikované) čtyř poddruhů. DNA byla zpracována jako u Estoup *et al.* (1993). Primery byly navrženy pomocí programu Oligo Primer Analysis Software (National Biosciences). Bylo testováno 552 mikrosatelitů, ale jen 36 jich bylo podrobně popsanych a publikovaných v tomto článku. Tyto mikrosatelity byly využity pro studii celého genomu včely medonosné (Weinstock, 2006) a pro konstrukci genetické mapy včely medonosné (Solignac *et al.*, 2004).

Previtali *et al.* (2008) pozorovali využití spermií v přirozeně spářených matkách po dobu dvou let. Původně byly analyzovány čtyři mikrosatelitové markery A7, A24, A76 a B124. Lokus A76 byl dostatečně variabilní a stačil k rozlišení genotypu matek a otcovských linií v šesti koloniích.

Delaney *et al.* (2009) zjišťovali úroveň genetické rozmanitosti uvnitř a mezi dvěma komerčními rozmnožovacími oblastmi matek USA. Použili deset variabilních mikrosatelitů již dříve popsanych A7, A24, A28, A88, A113 a B124 (Estoup *et al.*, 1995), Ap43 (Baundry *et al.*, 1998) a Ap55, Ap66 a Ap81 (Solignac *et al.*, 2003). Ve srovnání těchto dvou oblastí byla genová a genotypová diference u všech lokusů významná.

Muñoz *et al.* (2009) zkoumali genetickou strukturu a populační rozmanitost chorvatské včely medonosné kraňské (*Apis mellifera carnica*) pomocí pěti mikrosatelitů A7, Ap43, Ap55, A113 a B124 (Estoup *et al.*, 1995). Chorvatská populace byla rozdělena na severní a jižní subpopulaci. Tyto subpopulace vykazovaly různé úrovně vlivu italské populace, zatímco vlivu řecké populace bylo jen velmi málo.

Cánovas *et al.* (2011) studovali genetickou strukturu včely medonosné iberské (*Apis mellifera iberiensis*) analýzou 10 mikrosatelitních lokusů A7, A24, A28, Ap43, Ap55, Ap66, Ap81, A88, A107 a A113 (Solignac *et al.*, 2003). Celkem bylo zjištěno 124 alel a téměř všechny lokusy byly polymorfní, průměrný počet alel v každé populaci včely medonosné iberské se pohyboval mezi 5 a 7,5.

Alburaki *et al.* (2013) ve studii zkoumali genetickou rozmanitost včely medonosné ze Sýrie, Libanonu a Iráku. Využili 14 mikrosatelitů, deset z nich bylo již známých A7, A28, A43, A88 a A113 (Estoup *et al.*, 1995) a Ap43, Ap55, Ap81, B24 a B124 (Solignac *et al.*, 2003), zatímco čtyři další byly nově objevené a určené z genomu včely medonosné (Weinstock, 2006) a testované na polymorfismus. Jednalo se o mikrosatelity A8, Ap33, Ap36 a Ap66. Tito vědci zjistili, že včela medonosná syrská se vyskytuje jak v Sýrii, tak v Libanonu bez významné genetické variability mezi příslušnými populacemi. Syrské populace včel nejsou spojeny s orientální linií Blízkého východu, s výjimkou sporadické

introgrese některých populací v blízkosti tureckých a iráckých hranic.

Rahimi *et al.* (2014) využili pět již známých a popsanych mikrosatelitů A7, A28, A43, A113 a B124 (Estoup *et al.*, 1995) pro studium genetické rozmanitosti tří iráckých populací včel (*Apis mellifera meda*). Získaná data byla použita ke konstrukci fylogenetického stromu a rozdělení iráckých populací včel do různých fylogenetických větví.

Techer *et al.* (2015) studovali jadernou variabilitu včely medonosné pomocí mikrosatelitů na ostrově Rodrigues v Indickém oceánu. Na výzkum použili 18 mikrosatelitů A28, A29, A35, A43, A107 a B124 (Estoup *et al.*, 1994), A24, A88 a A113 (Estoup *et al.*, 1995), A8, Ap33 a Ap43, (Franck *et al.*, 1998) a Ap55, Ap66, Ap81, Ap273, Ap289 a Ac306 (Solignac *et al.*, 2003). Mikrosatelity A107 a Ap81 byly obtížně hodnotitelné kvůli vysoké frekvenci nulových alel. Z těchto důvodů byly odstraněny z této analýzy. Ostatní mikrosatelity byly úspěšně genotypové s alespoň deseti amplifikovanými alelami.

Oleksa *et Tofilski* (2015) použili pro určení poddruhů dělnic v kolonii ze smíšené populace včely medonosné tmavé (*Apis mellifera mellifera*) a včely medonosné kraňské *A. m. carnica* 17 mikrosatelitů, měření pomocí morfometrie a použili mikrosatelity A7, A24, A88 a A113 (Estoup *et al.*, 1995), Ap43 (Franck *et al.*, 1998a) a A25, Ac11, Ap28, Ap55, Ap66, Ap90, Ap103, Ap226, Ap238, Ap243, Ap249 a Ap256 (Solignac *et al.* 2003). Více než tři čtvrtiny kolonií byly zařazeny do stejného poddruhu oběma způsoby.

Pro vývoj a mapování genomu je obecně nutno velké množství reprezentativních markerů. Proto se v posledních letech rozmáhá hledání mikrosatelitů *in silico*, které spočívá v hledání markerů pomocí počítačů z DNA knihoven, které jsou uloženy v databázích pomocí speciálních softwarů. Včela medonosná je dobrým organismem pro studium heterogenních distribucí mikrosatelitů v genomu. Tento druh má 16 chromozomů o celkové velikosti genomu 262 Mbp a má zvláště vysokou míru rekombinace (20krát vyšší než u lidí) (Martin *et al.*, 2010).

Včela medonosná je klíčový model pro sociální chování. V roce 2006 byl genom včely medonosné sekvenován a porovnán s ostatními již známými genomy hmyzu např. octomilkou (*Drosophila melanogaster*) nebo molem (*Tineola bisselliella*). Ve srovnání s jinými sekvenovanými genotypy hmyzu, má genom včely medonosné vysoký obsah A + T (adenin, thymin) bází a postrádá velké rodiny transpozonů. Dále byly přeloženy geny pro interferenci RNA a DNA methylační geny. Včela medonosná má méně genů pro vrozenou imunitu, detoxifikační enzymy, kutikuly-vytvářející proteiny a chuťové receptory. Naopak má více genů pro odorantní receptory a nové geny oproti hmyzu jsou pro využití nektaru a pylu. Díky osekvenování včelího genomu, se podařilo podpořit africký původ včely medonosné.

3 Materiál a metody

3.1 Biologický materiál

Pro analýzu jsem využila genomickou DNA dvanácti matek a šesti dělnic včely medonosné kraňské (*Apis mellifera carnica*). Pro optimalizaci podmínek PCR reakce a základní charakteristiku mikrosatelitů jsem použila DNA šesti dělnic a DNA dvanácti matek byla použita k vlastnímu studiu oplození. Matky byly přirozeně oplozené a odebrané při výměně matek v roce 2016. Pocházely z jedné oplozovací stanice a byly odebrané z více stanovišť z chovu pana Svatopluka Sapáka v obci Hrušovany nad Jevišovkou (Znojensko). Matky i dělnice byly usmrceny zmáčknutím hlavy a uchovávány zmrazené při -15 °C. K izolaci DNA jsme společně s vedoucím bakalářské práce využili komerčně dodávaný kit – Exgene Tissue SV plus (GeneAll), který je mimo jiné vhodný též pro izolaci DNA z hmyzu.

3.2 Chemikálie

- Akrylamid (Sigma)
- *aTaq* DNA polymeráza (5 U/μl), M1241 (Promega)
- Bromfenolová modř (Serva)
- dNTPs (100 mmol/l, 400 μl), U1240 (Promega)
- Deionizovaná voda
- Dusičnan stříbrný (Sigma - Aldrich)
- Ethanol 96% roztok (Lihovar Vrbátky)
- Ethylendiaminotetraoctan sodný – Na₂EDTA (Lachner)
- Formaldehyd (AppliChem)
- Formamid (Lachema)
- Hydroxid sodný (Lachner)
- Chlorid sodný (Lachema)
- Kyselina boritá (Lachner)
- Kyselina dusičná 65% roztok (Lachner)
- Kyselina octová (Lachner)
- 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)
- Močovina (Lachner)
- N, N'-metylenbisakrylamid (Applichem)
- N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin – TEMED (Applichem)

- Peroxodisíran amonný (Lachner)
- Rain-off – tekuté stěrače (Sheran)
- Thiosíran sodný (Lachner)
- Trishydroxymethylaminomethan – Tris (AppliChem)
- Uhličitan sodný (Lachner)
- Xylenová modř (AppliChem)
- Izolační kit Exgene Tissue SV plus (GeneAll)
 - o TL pufr
 - o TB pufr
 - o BW pufr
 - o AE pufr
 - o TW pufr
 - o Proteináza K 20 mg/ml roztok

3.3 Roztoky

Akrylamid, 6% zásobní roztok:

- 150 ml 40% zásobní roztok akrylamid : N, N'- methylenbisakrylamid 19:1
- 420 g močovina
- 50 ml 10x TBE
- 484 ml deionizovaná voda

Dusičnan stříbrný, 0,1% roztok:

- 0,8 g dusičnan stříbrný
- 800 ml deionizovaná voda
- přidat 1,2 ml formaldehydu

Fix/stop roztok:

- 800 ml deionizovaná voda
- 88 ml ledová kyselina octová

Hydroxid sodný, 1 mol/l roztok:

- 40 g hydroxid sodný
- deionizovaná voda 1 l

Kyselina dusičná, 1% roztok:

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

Molekulární lepidlo:

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

Nanášecí roztok pro elektroforézu:

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

Peroxodisíran amonný, 10% roztok:

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

Polyakrylamidový gel, 6% roztok:

- 60 ml 6% zásobní roztok akrylamidu
- 400 μ l 10% roztok peroxodisíranu amonného
- 40 μ l N, N, N', N'- tetramethylethyldiamin

Reakční pufr, 10x

- 200 ml deionizovaná voda
- 3,028 g Tris (nebo 16,75 ml Tris 1 mol/l)
- pH upravit na hodnotu 9 pomocí HCl
- 9,325 g KCl
- 2,5 ml triton X-100
- po rozpuštění doplnit na 250 ml

TBE pufr, 10x zásobní roztok:

- 55 g kyselina boritá (H_3BO_3)
- 108 g trishydroxymethylaminomethanu (Tris)
- 40 ml roztoku Na_2EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
- 1 l deionizovaná voda

Vývojka:

- 24 g uhličitan sodný
- 800 ml deionizovaná voda
- 1,2 ml formaldehyd
- 160 μ l roztok thiosíranu sodného

3.4 Vybavení laboratoře

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

3.5 Izolace DNA

Genomická DNA byla izolována pomocí kitu Exgene Tissue SV plus, který je vhodný i pro izolaci DNA hmyzu (GeneAll). Komerčně dodávaný kit obsahoval potřebné pufrы i kolony s tubami. Protože jsme s tímto kitem dosud v laboratoři neměli zkušenosti, izolovala jsem nejdříve DNA z včelích dělnic. Tak jsem si zažila postup izolace a mohla posoudit kvalitu vyizolované DNA. Teprve poté, co jsem zjistila, že vyizolovaná DNA má dostatečnou koncentraci a kvalitu pro PCR reakci, jsem přistoupila na izolaci DNA z matek. Izolace DNA proběhla stejným způsobem u matek i u dělnic. Nejdříve se včela skalpelem rozřízla ve stopce a rozdělila na dvě části. Část první se skládala z hlavy a hrudi. Druhá část obsahovala zadeček, ve kterém je v případě matek uložen semenný váček se spermii trubců. Tyto dvě části byly izolovány zvlášť.

1. Včely rozříznout skalpelem ve stopce na dvě části. První část vložit do 1,5ml mikrozkuřavky a druhou vložit do druhé 1,5ml mikrozkuřavky.
2. Do každé mikrozkuřavky napipetovat 200 μ l TL pufru a v mikrozkuřavce materiál zhomogenizovat pomocí Potter-Elvehjemova homogenizátoru.
3. Připipetovat 20 μ l roztoku proteinázy K (20 mg/ml). Promíchat a inkubovat 1 hodinu a 15 minut v termobloku při teplotě 56 °C.
4. Po inkubaci, mikrozkuřavky pomocí centrifugy zcentrifugovat a supernatant přenést do nové mikrozkuřavky. Připipetovat 400 μ l TB pufru a poté celkový roztok aplikovat na fritu kolony a kolonu se speciální mikrozkuřavkou centrifugovat 1 minutu při 6 000 G.
5. Po centrifugaci vyměnit speciální mikrozkuřavku za čistou a na membránu kolony aplikovat 600 μ l BW pufru. Centrifugovat 30 sekund při 6 000 G.
6. Vyměnit speciální mikrozkuřavku a aplikovat na fritu 700 μ l TW pufru. Centrifugovat 30 sekund při 6 000 G. Odpad vylít a pro odstranění zbytkového pufru centrifugovat 1 minutu při 13 000 G.
7. Kolonu s fitou přesunout do čisté 1,5ml mikrozkuřavky a aplikovat na membránu 100 μ l AE pufru. Kolonu nechat 2 minuty stát při pokojové teplotě. Poté centrifugovat 1 minutu 13 000 G.
8. Na fritu kolony opět aplikovat 100 μ l AE pufru a centrifugovat 1 minutu 13 000 G.
9. Koncentraci DNA změřit pomocí spektrofotometru NanoDrop.
10. Vzorky zamrazit a pro následnou PCR amplifikaci už dále neředit.

3.6 Amplifikované mikrosatelity u včely medonosné kraňské

Ve své bakalářské práci jsem pro PCR amplifikaci využila 15 mikrosatelitů uvedených v tabulce č. 1. Tyto mikrosatelity v publikovaných člancích vykazovaly polymorfismus.

Tabulka č. 1: Seznam patnácti mikrosatelitových lokusů testovaných v rámci bakalářské práce s uvedením sekvence primerů a literárního zdroje.

Název lokusu	Sekvence primerů (5' → 3')	Literární zdroj
A7	F: GTTAGTGCCCTCCTCTTGC R: CCCTTCCTCTTTCATCTTCC	Estoup <i>et al.</i> , 1994
A8	F: CGAAGGTAAGGTAATGGAAC R: GCGGTTAAAGTTCTGG	Franck <i>et al.</i> , 1998b
A28	F: GAAGAGCGTTGGGTTGCAGG R: GCCGTTTCATGGTTACCACG	Estoup <i>et al.</i> , 1994
A29	F: AAACAGTACATTTGTGACCC R: CAACTTCAACTGAAATCCG	Estoup <i>et al.</i> , 1994
A43	F: CACCGAAACAAGATGCAAG R: CCGCTCATTAAGATACTCCG	Estoup <i>et al.</i> , 1994
A88	F: CGAATTAACCGATTTGTCG R: GATCGCAATTATTGAAGGAG	Estoup <i>et al.</i> , 1995
A113	F: GCAACAGGCGGGTTAGAG R: CAGGATAGGGTAGGTAAGAG	Estoup <i>et al.</i> , 1995
Ap33	F: TTTCTTTTTGTGGACAGCG R: AAATAAGGCGAAACGTGTG	Franck <i>et al.</i> , 1998a
Ap36	F: CTACGCGCTTACAGGGCA R: GCCGAAATTCAACGCTCA	Franck <i>et al.</i> , 1998a
Ap43	F: GCGTGACAGCTTATTCC R: CGAAGGTGGTTTCAGGCC	Franck <i>et al.</i> , 1998a
Ap55	F: GATCACTTCGTTTCAACCGT R: CATTCGGTATGGTACGACCT	Solignac <i>et al.</i> , 2003
Ap66	F: TTGCATTCGGTCTCCAGC R: ACTTGCCGCGGTATCTGA	Solignac <i>et al.</i> , 2003
Ap81	F: GCATCGTCGAGGCGTTGA R: GAAAAGTATTCCGCCGAGCA	Solignac <i>et al.</i> , 2003
B24	F: CACAAGTTCCAACAATGC R: CACATTGAGGATGAGCG	Solignac <i>et al.</i> , 2003
B124	F: GCAACAGGCGGGTTAGAG R: CAGGATAGGGTAGGTAAGAG	Estoup <i>et al.</i> , 1995

3.7 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce byla dělána pro 24 vzorků. Jeden vzorek se skládal z 1 μ l DNA z hlavy a hrudi, případně ze zadečku a z 9 μ l PCR směsi.

1. Do 1,5ml mikrozkuhavky napipetovat komponenty PCR v daném objemu, uvedené v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2: Složení PCR reakční směsi pro 24 vzorků.

Složky PCR směsi	Objem (μl)
Deionizovaná voda	177,6
Reakční pufr 10x	26,8
Roztok MgCl ₂ (25 mmol/l)	16,0
Roztok dNTPs (20 mmol/l)	2,8
Primer F (10 mmol/l)	13,2
Primer R (10 mmol/l)	13,2
<i>aTaq</i> DNA polymeráza (5U/μl)	4,0

- Po napipetování složek PCR, zkumavku zvortexovat a zcentrifugovat.
- Do 0,2ml PCR mikrozkuvek napipetovat 1 μl genomické DNA včely medonosné. PCR směs připipetovat do každé mikrozkuvky po 9 μl.
- Mikrozkuvky vložit do termocyklu, kde proběhne PCR reakce s podmínkami uvedenými v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3: Podmínky PCR reakce.

Reakční krok	Počet cyklů	Teplota (°C)	Čas
Počáteční denaturace DNA	1	94	5 min
Denaturace DNA	35	94	30 s
Annealing	35	50	30 s
Elongace	35	72	30 s
Závěrečné prodloužení	1	72	7 min

- Po vyjmutí z termocyklu uložit a skladovat mikrozkuvky v chladničce.

3.8 Elektroforetická separace PCR produktů

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

Příprava polyakrylamidového gelu

1. Malé i velké sklo umýt vodou a saponátem pomocí kartáčku. Následně plochy skel, které přijdou do styku s gelem, opláchnout deionizovanou vodou, osušit, dvakrát opláchnout 96% ethanolem a poté osušit papírovou utěrkou.
2. Plochu velkého skla, která bude v kontaktu s gelem, ošetřit přípravkem Rain-off. Ten rozetřít papírovou utěrkou a po zaschnutí 2x opláchnout deionizovanou vodou a sklo osušit papírovou utěrkou.
3. Plochu malého skla, která bude v kontaktu s gelem, ošetřit 1 ml molekulárního lepidla. Tento roztok rozetřít papírovou utěrkou a po zaschnutí čtyřikrát opláchnout 96% ethanolem. Po každém opláchnutí sklo osušit papírovou utěrkou.
4. Velké sklo přemístit do digestoře ošetřenou plochou vzhůru, na boční, podélné okraje přiložit spacers, na každou stranu jeden a přiklopit ošetřenou plochou menšího skla. Skla přichytit na obou stranách dvěma klipsy.
5. Do kádinky připravit 6% polyakrylamidový gel. Tímto roztokem vyplnit prostor mezi skly a mezi skla vsunout v místě naplňování hřebínek asi 0,5 cm hluboko. V místě vložení hřebínku sepnout čtyřmi klipsy. Gel nechat alespoň 1 hodinu polymerizovat.

Elektroforetická separace PCR produktů

1. Ztuhlý polyakrylamidový gel z obou stran očistit kartáčkem a deionizovanou vodou a osušit papírovým ručníkem.
2. Vložit do elektroforetické komůrky a uchytit šroubovacími úchyty. Do komůrky nalít TBE pufr a vytáhnout hřebínek.
3. Zapojit elektroforetickou komůrku ke zdroji, nastavit 90 W, napětí na 3000 V a proud na 150 mA a zapnout na 30 minut.
4. Do vzorků nanést po 5 μ l nanášecího pufru a vložit do termobloku na 3 minuty při 94 °C na denaturaci.
5. Po nahřátí gelu vypnout zdroj a odstranit zbytky gelu a bubliny, vložit hřebínek a nanést 2 μ l vzorku.
6. Zapojit elektroforetickou komůrku ke zdroji, nastavit 70 W, napětí na 3000 V a proud na 150 mA a zapnout na 1 hodinu 30 minut.

7. Do Erlenmeyerových baněk připravit roztoky na vizualizaci: 1. fix/stop roztok, 2. roztok 1% HNO_3 , 3. vývojku.

Vizualizace PCR produktů po elektroforetické separaci

1. Odpojit zdroj od elektroforetické komůrky a vyjmout skla. Vysunout spacery a nožem oddělit skla od sebe. Malé sklo s přilepeným gelem vložit do misky na třepačce a zalít fix/stop roztokem na 20 minut.
2. Fix/stop roztok slít zpět do baňky. 3x opláchnout deionizovanou vodou.
3. Dále na 4 minuty zalít sklo 1% HNO_3 . 4x opláchnout deionizovanou vodou.
4. Na 30 minut vložit malé sklo s gelem do roztoku AgNO_3 s 1,2 ml formaldehydu. Namočit do vody a rychle vložit do fotomisky s vývojkou s 1,2 ml formaldehydu a 160 μl $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.
5. Po dostatečné vizualizaci produktů do vývojky přilít fix/stop roztok, který zastaví reakci.
6. Poté namočit sklo na 2 minuty do deionizované vody a vložit do předehřáté sušárny na 60 °C, kde se gel vysuší.
7. Vysušený gel je možné hodnotit na negatoskopu.
8. Vyhodnocený gel se sklem ponořit na několik hodin do roztoku NaOH. Sklo po odlepení gelu omýt kartáčkem a saponátem, opláchnout deionizovanou vodou a usušit. Poté je opět připraveno pro další použití.

4 Výsledky

V této bakalářské práci bylo mým úkolem zjistit, s kolika trubci se matka během snubního letu spářila. Za pomoci polymorfních mikrosatelitů a jejich PCR amplifikace jsem zjišťovala, kolik alel od každého trubce je v produktech PCR reakce s DNA vyizolovanou ze zadečku matky, v němž se nachází semenný váček se spermii trubců. Pro dosažení níže uvedených výsledků se moje laboratorní práce skládala z několika kroků:

- Odběr materiálu pro izolaci DNA (podrobně popsáno v kapitole Materiály a metody – v podkapitole Biologický materiál).
- Optimalizace podmínek izolace DNA pomocí kitu Exgene Tissue SV plus (GenAll) na dělnicích včely medonosné.
- Izolace DNA z matek včely medonosné pro vlastní experiment.
- Optimalizace podmínek PCR pro jednotlivé páry primerů a zjištění variability jednotlivých mikrosatelitů.
- Amplifikace 24 vzorků DNA z dvanácti matek pomocí 11 polymorfních mikrosatelitů.

Izolace genomové DNA ze včely medonosné kraňské

Izolaci DNA jsem zkušebně provedla na dělnicích včely medonosné kraňské podle varianty návodu, která je speciálně vypracovaná pro izolaci DNA z hmyzu. Po izolaci jsem změřila koncentraci DNA na spektrofotometru nanodrop a otestovala jsem, že DNA lze pomocí PCR úspěšně amplifikovat. Koncentrace vyizolované DNA z jednotlivých částí včel nabývala velmi rozdílných hodnot, v řádu jednotek až desítek $\mu\text{g/ml}$. Nejlepší výsledek byl $57,3 \mu\text{g/ml}$. Podrobné výsledky koncentrace DNA u matek jsou uvedeny v tabulce č. 4. V některých případech, i po několika opakováních, vycházely záporné číselné hodnoty koncentrace. I s takovými vzorky jsem provedla PCR reakci, která poskytla produkt.

Tabulka č. 4: Koncentrace DNA ze vzorků dvanácti matek včely medonosné kraňské.

Vzorek	Koncentrace DNA ($\mu\text{g/ml}$)	
	Hlava a hrud'	Zadeček
1	-0,4	2,9
2	0,3	7,7
3	1,1	12,8
4	-0,5	2,3
5	14,4	4,9
6	9,7	57,3
7	1,7	5,0
8	-19,0	-10,1
9	1,4	8,3
10	1,0	8,6
11	0,1	11,2
12	2,9	34,0

Optimalizace podmínek PCR pro jednotlivé páry primerů

Dále bylo mým úkolem zoptimalizovat podmínky PCR reakce pro 15 mikrosatelitů. Na to jsem využila DNA šesti dělnic. Pro všechny mikrosatelity jsem na začátku použila stejné složení PCR mixu a stejný program termocykleru. Základní teplotu *annealigu* jsem zvolila 50 °C. Poté jsem dle vyhodnocení elektroforetogramu teplotu *annealigu* upravovala, aby bylo možné provést genotypizaci. Pokud se PCR produkt v polyakrylamidovém gelu jevil slabě, tak jsem teplotu *annealigu* postupně snižovala. Nejnižší dosažená teplota pro amplifikaci u studovaných mikrosatelitů byla u mikrosatelitu A43 při teplotě 44 °C. Pokud PCR produkt nebylo možné vyhodnotit, protože se v gelu jevil jako příliš intenzivní, teplotu *annealigu* jsem zvyšovala. Nejvyšší teplota pro amplifikaci u studovaných mikrosatelitů byla 66 °C, a to u mikrosatelitů Ap55 a Ap81. Pokud zvýšení teploty nevedlo k požadované kvalitě výsledku, přistoupila jsem na snížení koncentrace MgCl_2 v PCR reakční směsi z 1,6 nmol/l na 0,8 nmol/l. Toto jsem provedla u mikrosatelitu A7. Čas separace v polyakrylamidovém gelu byl ve všech případech 90 minut.

Všechny mikrosatelity nakonec poskytly PCR produkty. Mikrosatelity A43 a Ap81 poskytovaly monomorfní produkt a na základě toho, jsem je vyřadila z další práce. Mikrosatelity A113 a Ap55 poskytovaly polymorfní produkty, ale byly velmi problematicky hodnotitelné a proto jsem je z dalších analýz také vyřadila.

Amplifikace vzorků DNA z dvanácti matek pomocí 11 polymorfních mikrosatelitů

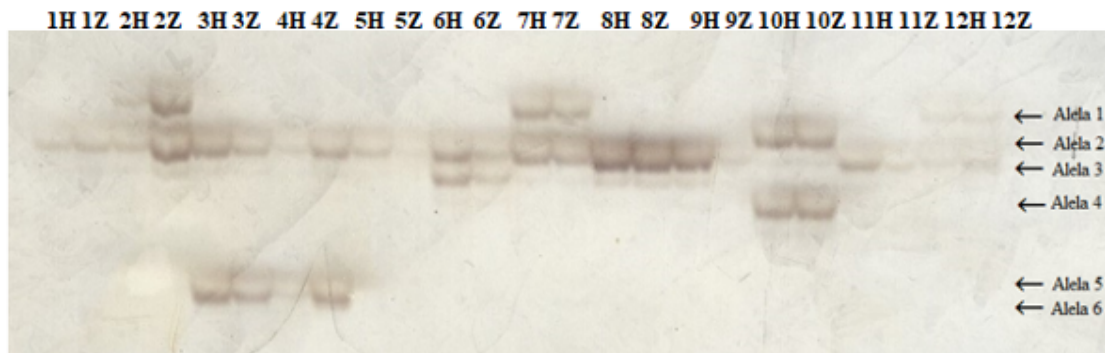
Pro amplifikaci jsem měla připravených dvanáct matek (dvacet čtyři vzorků). Vzorky byly od každé matky dva. První vzorek obsahoval DNA z hrudi a hlavy. Druhý vzorek obsahoval DNA ze zadečku. Těchto 24 vzorků jsem podrobila polymerázové řetězové reakci na vybraných 11 polymorfních mikrosatelitech a získala jsem od 2 do 12 alel na lokus. Pouze 5 mikrosatelitů mělo nad 5 alel na lokus. Byly tedy nevhodnější, protože poskytovaly nejvíce informací o variabilitě. Pokud se stalo, že v rámci PCR jeden ze vzorků od jednoho jedince nevyšel, tak jsem znovu v další reakci zopakovala oba dva vzorky společně ve stejném gelu, aby se zabránilo případným problémům při hodnocení. Teploty *annealigu* a počty alel uvádím v tabulce č. 5.

Tabulka č. 5: Charakteristika 15 mikrosatelitů, testovaných na 24 vzorcích (12 matkách) včely medonosné kraňské (*Apis mellifera carnica*).

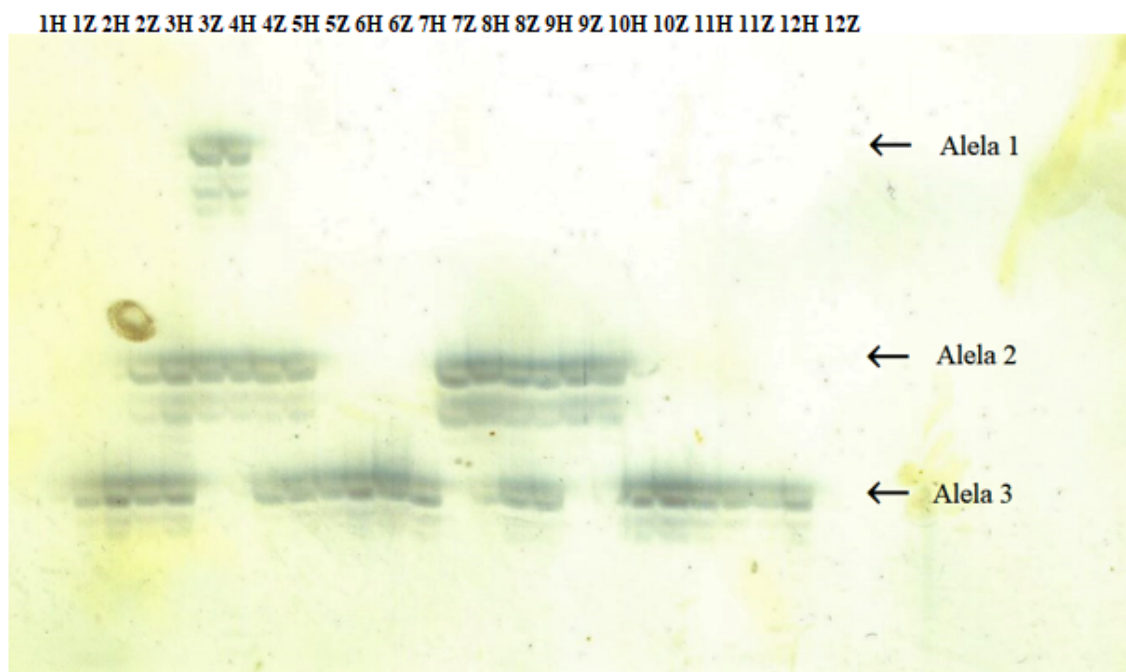
Lokus	Teplota <i>annealigu</i> (°C)	Počet alel
A7	52	4
A8	54	6
A28	65	2
A29	53	12
A43	44	Monomorfní
A88	61	5
A113	52	Polymorfní, nehodnotitelné
Ap33	60	5
Ap36	63	6
Ap43	65	3
Ap55	66	Polymorfní, nehodnotitelné
Ap66	50	3
Ap81	67	Monomorfní
B24	56	3
B124	51	2

Na následujících fotografiích jsou zobrazeny výsledky elektroforetické separace vybraných mikrosatelitů po PCR amplifikaci u dvanácti matek včely medonosné kraňské. Jedná se o lokusy A8, Ap66 a A88, u kterých bylo detekováno více alel.

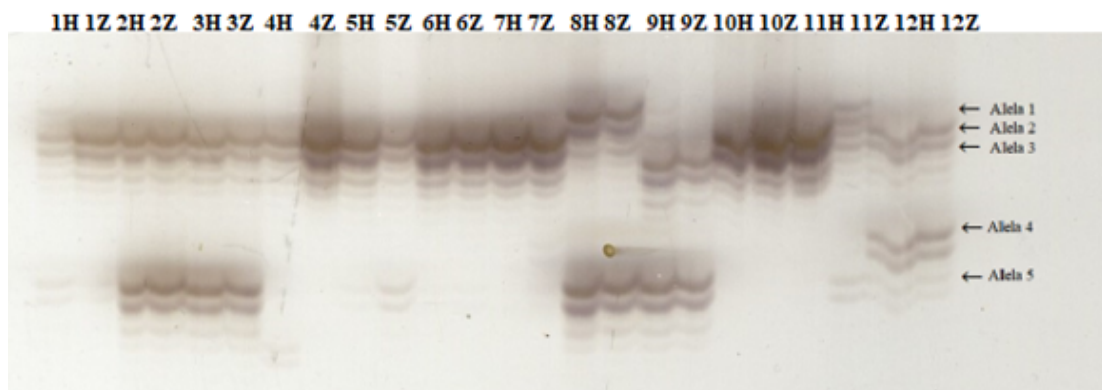
Obr. 6: Elektroforetogram mikrosatelitového lokusu A8, u kterého bylo detekováno 6 alel při teplotě 54 °C. Alely jsou označeny jako Alela 1 až Alela 6 a jedinci jsou označeni 1H, 1Z až 12H, 12Z (číslo označuje jedince, H = DNA z hlavy a hrudi, Z = DNA ze zadečku).



Obr. 7: Elektroforetogram mikrosatelitového lokusu Ap66, u kterého byly detekovány 3 alely při teplotě 50 °C. Alely jsou označeny jako Alela 1 až Alela 3 a jedinci jsou označeni 1H, 1Z až 12H, 12Z (číslo označuje jedince, H = DNA z hlavy a hrudi, Z = DNA ze zadečku).



Obr. 8: Elektroforetogram mikrosatelitového lokusu A88, u kterého bylo detekováno 5 alel při teplotě 61 °C. Alely jsou označeny jako Alela 1 až Alela 5 a jedinci jsou označeni 1H, 1Z až 12H, 12Z (číslo označuje jedince, H = DNA z hlavy a hrudi, Z = DNA ze zadečku).



Poslední cíl praktické části bakalářské práce nebyl naplněn, protože v rámci všech mikrosatelitů a všech dvanácti matek (vždy jeden vzorek z hlavy a hrudi, druhý ze zadečku), poskytla PCR naprosto stejný výsledek. Ve všech případech jsem získala v rámci těchto dvou vzorků homo- nebo heterozygotní konstituci alel. V případě mikrosatelitů se dvěma alelami je možné takový výsledek získat, ale u polymorfního mikrosatelitu s dvanácti alelami, by byl takový výsledek velmi nepravděpodobný. Ani v jednom případě se tedy nepodařilo získat ze vzorku DNA ze zadečku další, jinou alelu, která by nebyla v PCR produktu DNA z hlavy a hrudi. A ani v jednom případě se tedy nepodařilo prokázat amplifikaci DNA z trubčích spermií.

5 Diskuze

V této bakalářské práci jsem se snažila zjistit počet trubců, kteří se spářili s matkou. Toho jsem chtěla dosáhnout pomocí PCR amplifikace na celkem 15 mikrosatelitových lokusech a dvanácti matkách včely medonosné kraňské (*Apis mellifera carnica*). Pro izolaci DNA jsem musela ověřit vhodnost použitého kitu a osvojit si izolaci DNA pomocí něj na šesti dělnicích včely medonosné kraňské a poté jsem tuto DNA využila k optimalizaci podmínek PCR mikrosatelitů a zjištění jejich vlastností. Zjistila jsem, že dva z patnácti mikrosatelitů poskytují monomorfní produkt a další dva mikrosatelity poskytují polymorfní produkt, ale jsou problematicky hodnotitelné, proto jsem je vyřadila z dalšího testování. Zbýlých 11 mikrosatelitů poskytovalo polymorfní produkty a byly studovány na matkách. Vybrala jsem polymorfní, dobře hodnotitelné mikrosatelity, které jsem použila pro amplifikaci s DNA z matek včely medonosné kraňské. Z každé matky byly dva vzorky, první obsahoval DNA z hlavy a hrudi a druhý DNA ze zadečku, kde se nachází i semenný váček se spermiemi trubců. Dílčí kroky teoretické části bakalářské práce se povedly. Bohužel, ve všech produktech PCR reakce ze zadečku se nenacházely jiné alely, než alely, které byly i v produktu PCR reakce z hlavy a hrudi. PCR produkty získané amplifikací dvojic vzorků z matek dávaly stejný výsledek a nepodařilo se mi dosáhnout cíle a zjistit s kolika trubci se matka při snubním letu spáří.

Při optimalizaci PCR reakce jsem vyřadila mikrosatelity A43 a Ap81 z důvodu poskytnutí pouze monomorfního produktu. Mikrosatelit A43 byl testován Estoupem *et al.* (1994) a výsledný produkt mikrosatelitu byl polymorfní, našli 6 alel na 26 jedincích, jako teplotu *annealingu* zvolili 55 °C. Při mém pokusu byla teplota *annealingu* 44 °C. Mikrosatelit Ap81 použili Dalaney *et al.* (2009) a amplifikovali ho při teplotě *annealingu* 54 °C a produkt PCR reakce byl polymorfní, našli v jedné populaci více než 15 alel. Teplota, kterou jsem při pokusu zvolila já, byla 67 °C.

Dále jsem z pokusu vyřadila mikrosatelity A113 a Ap55 z důvodu obtížného hodnocení. Estoup *et al.* (1995) testovali mikrosatelit A113 s teplotou *annealingu* 60 °C, našli v jedné populaci až 11 alel na 36 jedincích. Problém s hodnocením nebyl popsán. Tento mikrosatelit byl použit i dále v dalších publikacích Franc *et al.* (1998b) nebo Rahimi *et al.* (2014). Já jsem použila teplotu *annealingu* 52 °C. Dalaney *et al.* (2009) amplifikovali mikrosatelit Ap55 s teplotou *annealingu* 54 °C, v jedné populaci našli 13 alel a nebyl zmíněn žádný problém, teplota použitá v tomto pokusu byla 66 °C.

V pokusu jsem získala produkty PCR reakce ze zadečku matky, ve všech případech totožné s produkty z hlavy a hrudi. Předpoklad byl, že produkty ze zadečku budou ob-

sahovat u polymorfních mikrosatelitů i alely, které patří DNA trubců. Důvody, které by mohly za negativní výsledky pokusu, zmiňuji v dalším textu:

a) Dvouleté matky včely medonosné nemají v semenném vřčku spermie

Matky použité pro studium oplození byly odebrané při výměně matek v roce 2016, tyto matky byly dvouleté. Možnost vykladení matek po dvou letech je velice nepravděpodobná a to je potvrzeno pozorováním matky ve včelstvu (Sapák, osobní sdělení). Matka na začátku svého kladení má v semenném vřčku okolo 5 milionů spermií (Mackensen, 1948; Page, 1986). Matka, obvykle jedna na kolonii, má desetinásobek délky života dělnic (Weinstock *et al.*, 2006) a v komerčním včelstvu žije průměrně 2 roky, klade až 2 000 vajíček denně se sezonními přestávkami a sperma uchovává roky bez ztráty životaschopnosti. Sperma je v semenném vřčku udržováno nehybně při konstatní teplotě a přežívá i desetiletí (Taber *et al.*, 1960; Boomsma *et al.*, 2005).

b) V zadečku matky včely medonosné jsou látky inhibující PCR reakci

Potencionální inhibitory PCR reakce mohou pocházet ze zdroje tkáně pro izolaci DNA, nebo také z purifikačních metod použitých při přípravě vzorku. Purifikační metody použité při izolaci, mnou zpracovaných vzorcích, byly v pořádku, protože izolace provedena na dělnicích i na matkách byla stejná (jak u izolace DNA z hlavy a hrudi, tak i izolace DNA ze zadečku). Není tedy pravděpodobné, že by látky v zadečku matky negativně ovlivňovaly PCR amplifikaci. Produkty PCR poskytovaly hodnotitelné výsledky. Další příklady inhibitorů jsou inhibitory pocházejících z buňky, které zahrnují například hem (Akane *et al.*, 1994) a některé další proteiny (DeFranchis *et al.*, 1998). U včely medonosné je jako negativní PCR inhibitor popsán pouze pigment z očí (Boncristiani *et al.*, 2011). Další studie ukazující na inhibici PCR u včely medonosné nejsou známé.

c) Špatné uchování vzorků včel

Včely dělnice i matky poskytnuté pro studium oplození byly zabity zmáčknutím hlavičky a poté uchovány v mrazicím boxu při -15 °C. Tyto vzorky byly z mrazicího boxu vyjmuty pouze pro izolaci DNA. Je nepravděpodobné, že by vzorky pro izolaci DNA byly špatně uchovány a DNA trubců v semenném vřčku byla poškozena, protože PCR reakce poskytla produkty s DNA matky. Tedy pokud by byly vzorky špatně uchovány, nevyšel by žádný produkt PCR reakce.

d) Sperma ze semenného vřčku je pro PCR reakci málo

Matka se páří s více než deseti trubci (Ruttner, 1976) a každý trubec matce předá přibližně 6 milionů spermií (Kerr *et al.*, 1962). Po spáření se matka vrací do úlu s průměrně

80–90 miliony spermií ve vejcovodech (Koeniger, 1986) a poté je přes 5 milionů spermií pomocí jejich motility a kontrakcí svalů matky převedeno do semenného vajíčku. Matka klade denně až 2 000 vajíček (Grozinger *et al.*, 2007). Matky, odebrané při výměně, byly pouze dva roky staré. Reakci PCR lze provést i s DNA z jedné buňky, a tak tedy není pravděpodobné, že za neúspěchem stálo malé množství spermií v semenném vajíčku.

e) Populace je silně inbrední

Sperma v semenném vajíčku matky je mixováno a různě agregováno (Franck *et al.*, 1999). Pořadí, ve kterém matka používá spermie od různých trubců pro oplození, má velký význam, protože mnohonásobné spáření u matky snižuje možnost genetického vztahu mezi členy kolonií a přispívá k redukci příbuznosti mezi matkou a trubci (Hamilton, 1964). Baudry *et al.* (1998) studovali trubce, kteří byli odebráni při snubním letu a zjišťovali rozmanitost skupiny. Zjistili, že genetická rozmanitost této skupiny je velmi blízká Poissonově distribuci a hodnoty ukazují velmi nízkou pravděpodobnost inbreedingu. Je nepravděpodobné, že by matky, použité pro studium byly oplozené trubci, kteří jsou geneticky tak uniformní, že by produkt PCR ze zadečku neposkytl žádnou alelu odlišnou od alel z hlavy a hrudi. Je tedy nepravděpodobné, že by v případě mnou zpracovaných dvanácti matek z volného páření, byla na lokalitě tak obrovská míra genetické uniformity trubců, vzhledem k tomu, že v případě mikrosatelitu A29 jsem v genotypch 12 matek našla 12 alel.

Závěrem diskuze navrhuji několik možností, které by mohly vést k naplnění cíle práce:

Díky vysokému počtu alel, by bylo vhodné, použít mikrosatelit A76 (Estoup *et al.*, 1994), který byl ve studiu otcovských linií včely medonosné mnohokrát využit. Autoři našli 17 alel na 30 jedincích. Tento mikrosatelit je podle různých zdrojů vysoce polymorfní a užitečný pro detekci otcovských linií – až dvanáct otcovských linií může být zjištěno pomocí tohoto mikrosatelitu (Previtali *et al.*, 2008). Dále bych doporučila použití mikrosatelitu A107, u kterého našli (Estoup *et al.*, 1994) až 22 alel na 30 jedincích.

Další možností by bylo odebírat smíšený vzorek na izolaci DNA z několika trubců, kteří jsou z neoplozených vajíček. PCR amplifikací je tak možné zjistit, jakou alelovou konstituci na daném mikrosatelitovém lokusu matka nese. Odchytem dělnic, jako v případě Previtali *et al.* (2008), izolací DNA a PCR amplifikací mikrosatelitů je možné zjistit, jaké alely jsou trubců, protože každá dělnice nese jednu alelu od matky a druhou alelu od otce (trubce).

Třetí možností je změnit postup izolace DNA. Semenný váček je tvořen DNA matky a spermie jsou tvořené DNA trubců. Pro získání trubčích spermií na izolaci DNA je možné vypitvat ze zedečku matky semenný váček. Izolace DNA ze spermií přímo ze semenného váčku matky by mohla přispět k získání vyšší koncentrace DNA pro polymerázovou řetězovou reakci, zlepšení její kvality a čistoty, a tedy snížení koncentrace případných inhibitorů PCR.

6 Závěr

Ve své bakalářské práci jsem se snažila zjistit počet trubců, kteří se při snubím letu spářili s matkou. Cíle jsem chtěla dosáhnout PCR amplifikací polymorfních mikrosatelitů, určených pro včelu medonosnou (*Apis mellifera*). Chtěla jsem porovnat výsledky PCR amplifikace s DNA včelí matky, vyizolované z hlavy a hrudi, se vzorky DNA matky vyizolované ze zadečku, kde kromě DNA matky jsou i v semenném váčku spermie všech trubců, se kterými se matka spářila.

V bakalářské práci jsem testovala celkem 15 mikrosatelitových lokusů, z nichž jsem vybrala 11 polymorfních pro vlastní pokus. Dále jsem při optimalizaci zjistila, že dva mikrosatelity poskytují monomorfní produkt a další dva mikrosatelity poskytují polymorfní produkt, ale jsou problematicky hodnotitelné, proto jsem je při optimalizaci vyřadila. S použitím 11 polymorfních mikrosatelitů jsem získala celkem od 2 do 12 alel na lokus. Pouze 5 mikrosatelitů mělo více než 5 alel na lokus a tedy tyto mikrosatelity měly největší vypovídající hodnotu.

Dílčí kroky bakalářské práce byly úspěšné. Bohužel, PCR amplifikací s DNA získanou izolací ze zadečku matek, se mi ve všech případech podařilo získat pouze PCR produkt, který obsahoval stejné produkty, jako PCR z hlavy a hrudi. Ani v jednom případě, neobsahoval další alely, které by pocházely od trubců s nimiž se matka spářila.

7 Literární zdroje

Akana A., Matsubara K., Nakamura H., Takahashi S., Kimura K. (1994) Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. *Journal of Forensic Sciences*, 2, 362–372.

Alburaki M., Bertrand B., Legout H., Moulin S., Alburaki A., Sheppard W.S., Garnery L. (2013) A fifth major genetic group among honeybees revealed in Syria. *BMC Genetics*, 14, 117.

Bhagrava A., Fuentes F.F. (2010) Mutational dynamics of microsatellites. *Molecular Biotechnology*, 44, 250–266.

Baker A.J. (2000) *Molecular Methods in Ecology*. Blackwell Science Ltd., Oxford.

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

Beye M. (2003) The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. *Cell*, 114, 419–429.

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

Boncrisiani H., Li J., Evans J.D., Pettis J., Chen Y. (2011) Scientific note on PCR inhibitors in the compound eyes of honey bees, *Apis mellifera*. *Apidologie*, 42, 457–460.

Boomsma J.J., Baer B., Heinze J. (2005) The evolution of male traits in social insects. *Annual Review of Entomology*, 50, 395–420.

Bouga M. *et al.* (2011) A review of methods for discrimination of honey bee populations as applied to European beekeeping. *Journal of Apicultural Research*, 50, 51–84.

Bull J.J. (1983) Evolution of Sex Determining Mechanisms. Benjamin/Cummings Publishing Company, Menlo Park, CA.

Cánovas F., Rúa P., Serrano J., Galián J. (2011) Microsatellite variability reveals beekeeping influences on Iberian honeybee populations. *Apidologie*, 42, 235–251.

Čermák K., Kašpar F. (2008) Včely v novém tisíciletí aneb poznání, ochrana a využití genetického bohatství a metodika plemenářské práce. Výzkumný ústav včelařský, Dol.

Defranchis R. (1988) A potent inhibitor of *Taq* polymerase copurifies with human genomic DNA. *Nucleic Acids Research*, 16, 10355–10355.

Delaney D.A., Meixner M.D., Schiff N.M., Sheppard W.S. (2009) Genetic characterization of commercial honey bee (Hymenoptera: Apidae) populations in the United States by using mitochondrial and microsatellite markers. *Annals of the Entomological Society of America*, 102, 666–673.

Dos Santos C.F., Francisco F.O., Imperatriz-Fonseca V.L., Arias M.C. (2016) Eusocial bee male aggregations: spatially and temporally separated but genetically homogenous. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 158, 320–326.

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

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

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

- Evans D.J. (1993) Parentage analysis in ant colonies using simple sequence repeat loci. *Molecular Ecology*, 2, 393–397.
- Everson G.W. (2014) Hymenoptera. In: *Encyclopedia of Toxicology* 3. Philip Wexler, Academic Press, Fresno, 984–985.
- Fahrbach S.E., Robinson G.E. (1995) Behavioral development in the honey bee: toward the study of learning under natural conditions. *Learnig and Memory*, 2, 199–224.
- Franck P., Garnery L., Solignac M., Cornuet J.M., Baudry E., Vautrin D. (1998a) Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*). II. Microsatellite loci. *Genetics Selection Evolution*, 30, 49–74.
- Franck P., Garnery L., Solignac M., Cornuet J.M., (1998b) The origin of West European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): new insights from microsatellite and mitochondrial data. *Evolution*, 52, 1119–1134.
- Franck P., Coussy H., Le Conte Y., Solignac M., Garnery L., Cornuet J.M. (1999) Microsatellite analysis of sperm admixture in honeybee. *Insect Molecular Biology*, 8, 419–421.
- Franck P., Garnery L., Loiseau A., Oldroyd B.P., Hepburn H.R., Solignac M., Cornuet J.M. (2001) Genetic diversity of the honeybee in Africa: Microsatellite and mitochondrial data. *Heredity*, 86, 420–430.
- Francoy T.M., Prado P.R.R., Goncalves L.S., Costa L.F., DeJong D. (2006) Morphometric differences in a single wing cell can discriminate *Apis mellifera* racial types. *Apidologie*, 37, 91–97.
- Garnery L., Cornuet J.M., Solignac M. (1992) Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Molecular Ecology*, 145–154.
- Garnery L., Cornuet J.M., Solignac M., Vautrin D. (1990) Phylogenetic relationships in the genus *Apis* inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Apidologie*, 22, 87–92.
- Gillott C.(2005) *Entomology*. Springer Netherlands, Dordrecht.

- Grozinger C.M., Fan Y., Hoover S.E.R., Winston M.L. (2007) Genome-wide analysis reveals differences in brain gene expression patterns associated with caste and reproductive status in honey bees (*Apis mellifera*). *Molecular Ecology*, 16, 4837–4848.
- Hamilton W.D. (1964) The genetical evolution of social behavior, I, II. *Journal of Theoretical Biology*, 7, 1–52.
- Hasselmann M., Gempe T., Schiott M., Nunes-Silva C.G., Otte M., Beye M. (2008) Evidence for the evolutionary nascence of a novel sex determination pathway in honeybees. *Nature*, 454, 519–522.
- Heimpel G.E., de Boer J.G. (2008) Sex determination in the Hymenoptera, *Annual Review of Entomology*, 53, 209–230.
- Hung A.F.C., Vinson S.B., Summerlin J.W. (1974) Male sterility in the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*. *Annals of the Entomological Society of America*, 6, 909–912.
- Chaline N., Ratnieks F.L.W., Burke T. (2002) Anarchy in the UK: Detailed genetic analysis of worker reproduction in a naturally occurring British anarchistic honeybee, (*Apis mellifera*), colony using DNA microsatellites. *Molecular Ecology*, 11, 1795–1803.
- Chapuis M.P., Estoup A. (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 621–631.
- Kerr W.E., Zucchi R., Nakakaira J.T., Butolo J.E. (1962) Reproduction in the social bees. *Journal of the New York Entomological Society*, 4, 265–270.
- Koeniger G. (1986) Reproduction and mating behaviour. *Bee genetics and breeding*. Academic Press, New York, 255–280.
- Kocher S., Grozinger C. (2011) Cooperation, conflict, and the evolution of queen pheromones. *Journal of Chemical Ecology*, 37, 1263–1275.
- Laidlaw H.H., Page R.E. (1984) Polyandry in honey bees (*Apis mellifera* L.): Sperm utilization and intracolony genetic relationships. *Genetics*, 108, 985–997.

Lindauer M. (2016) Hymenopteran. Encyclopedia Britannica, Encyclopedia Britannica, publikováno online <https://www.britannica.com/animal/hymenopteran>, navštíveno dne - 3.1.2018.

Mackensen O., Roberts W.C. (1948) A manual for the artificial insemination of queen bees, ET-250. United States Bureau of Entomology and Plant Quarantine, Washington, D. C.

Martin J.F., Pech N., Megléc E., Ferreira S., Costedoat C., Dubut V., Malausa T., Gilles A. (2010) Representativeness of microsatellite distributions in genomes, as revealed by 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing. BMC Genomics, 11, 560.

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

Nei M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. Genetics, 89, 583–590.

Neumann P., Moritz F.M.A., Mautz D. (1999) Using DNA microsatellites for maternity testing in honeybees (*Apis mellifera* L.). Apidologie, 30, 505–512.

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

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

Oster G.F., Wilson E.O. (1978) Caste and ecology in the social insects. Princeton University Press, Princeton.

Page R.E., Metcalf R.A. (1982) Multiple mating, sperm utilization, and social evolution. The American Naturalist, 2, 263–281.

Peters R.S. (2017) Evolutionary history of the Hymenoptera. Current Biology, 7, 1013–1018.

- Pokorný V., Šifner F. (2004) Atlas hmyzu. Paseka, Praha.
- Polaczek B., Neumann P., Schrick B., Moritz R.F.A. (2000) A new, simple method for rearing diploid drones in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, 31, 525–530.
- Previtali C., Bongioni G., Costa C., Lodesani M., Galli A. (2008) Observation by microsatellite DNA analysis of sperm usage in naturally mated honeybee queens (*Apis mellifera ligustica*) over a period of two years. *Italian Journal of Animal Science*, 7, 465–478.
- Primmer C.R., Raudsepp T., Chowdhary B.P., Müller A.P., Ellegren H. (1997) Low frequency of microsatellites in the avian genome. *Genome Research*, 7, 471–482.
- Prýmas L., Danihlík J., Dlouhá Š., Dostálková S., Kabát M., Hroncová Z., Petřivalský M. (2017) Včelařství II.. Pracovní společnost nástavkových včelařů CZ, Praha.
- Přidal A. (2005) Včela medonosná a její plemena. *Včelařství*, 2, 44–49.
- Přidal A. (2007) Determinace pohlaví u včel. *Moderní včelař*, 1, 25.
- Přidal A. (2008) Včely ve třetím tisíciletí. Výzkumný ústav včelařský, Dol, 52–53.
- Rahimi A., Mirmoayedi A., Kahrizi D., Abdolshahi R., Kazemi E., Yari K. (2014) Microsatellite genetic diversity of *Apis mellifera meda* Skorikov. *Molecular Biology Reports*, 41, 7755–7761.
- Ratnieks F.L.W. (1993) Egg-laying, egg-removal, and ovary development by workers in queenright honey bee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 3, 191–198.
- Rowe D., Rinderer T., Stelzer J., Oldroyd B.P., Crozier R.H. (1997) Seven polymorphic microsatellite loci in honeybees (*Apis mellifera*). *Insectes Sociaux*, 2, 85–93.
- Ruttner F. (1988) Methods of honeybee taxonomy: Past and present. In: *Biogeography and taxonomy of honeybees*. Springer, Berlin.

- Ruttner H. (1976) Investigations on the flight activity and the mating behavior of drones. VI. Flight on and over mountain ridges. *Apidologie*, 7, 331–341.
- Ruttner H., Tassencourt L., Louveaux J. (1978) Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L.. *Apidologie*, 4, 363–381.
- Schlüns H., Moritz R.F.A., Neumann P., Kryger P., Koeniger G. (2005) Multiple nuptial flights, sperm transfer and the evolution of extreme polyandry in honeybee queens. *Animal Behavior*, 1, 125–131.
- Schönfeld A. (1955) Anatomie, morfologie a fyziologie včely medonosné. Státní zemědělské nakladatelství, Praha.
- Solignac M., Vautrin D., Loiseau A., Mougél F., Baudry E., Estoup A., Garnery L., Habert M., Cornuet J.M. (2003) Five hundred and fifty microsatellite markers for the study of the honeybee (*Apis mellifera* L.) genome. *Molecular Ecology Notes*, 3, 307–311.
- Solignac M., Vautrin D., Baudry E., Mougél F., Loiseau A., Cornuet J.M. (2004) A microsatellite-based linkage map of the honeybee, *Apis mellifera* L. *Genetics*, 167, 253–262.
- Švamberk V. (2000) Tajemný svět včel. Víkend, Líbeznice.
- Švamberk V. (2003) Záhadné včely: Tajemný svět včel II. Víkend, Líbeznice.
- Švamberk V. (2015) Prostředí a včely. Spolek pro rozvoj včelařství MÁJA, Praha.
- Taber S., Blum M.S. (1960) Preservation of honey bee semen. *Science*, 131, 1734–1735.
- Taber S. (1955) Sperm distribution in the spermathecae of multiple-mated queen honey bees. *Journal of Economic Entomology*, 5, 522–525.
- Techer M.A., Clémencet J., Turpin P., Volbert N., Reynaud B., Delatte H. (2015) Genetic characterization of the honeybee (*Apis mellifera*) population of Rodrigues Island, based on microsatellite and mitochondrial DNA. *Apidologie*, 46, 445–454.

- Tóth G., Gáspári Z., Jurka J. (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*, 10, 967–981.
- Tucker K.W., Laidlaw H.H. (1966) The potential for multiplying a clone of honey bee sperm by androgenesis. *Journal of Heredity*, 57, 213–214.
- Van Wilgenburg E., Driessen G., Beukeboom L. (2006) Single locus complementary sex determination in Hymenoptera: an “unintelligent” design? *Frontiers in Zoology*, 3, 1–15.
- Veselý V. (2003) *Včelařství*. Brázda, Praha.
- Weinstock G.M., Robinson G.E. (2006) Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 443, 931–949.
- Whitfield C. W. *et al.* (2006) Thrice Out of Africa: Ancient and Recent Expansions of the Honey Bee, *Apis mellifera*. *Science*, 314, 642–645.
- Winston M. L. (1991) *The biology of the honey bee*. Harvard University Press, Cambridge.
- Woyke J. (1962) Natural and artificial insemination of queen honeybees. *Bee World*, 43, 183–275.
- Woyciechowski M., Kuszewska K. (2012) Swarming generates rebel workers in honeybees. *Current Biology*, 22, 707–711.
- Zayed A. (2009) Bee genetics and conservation, *Apidologie*, 3, 237–262.
- Žďárek J. (2015) *Hmyzí rodiny a státy*. Academia, Praha.