



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Katedra genetiky a zemědělských biotechnologií

Diplomová práce

Morfologická a molekulární charakterizace kvasinek rodu
Zygosaccharomyces asociovaných se včelami

Autorka práce: Bc. Petra Javůrková

Vedoucí práce: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Konzultant práce: Ing. Karel Beneš, Ph.D.

České Budějovice
2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne 23. dubna 2021

Bc. Petra Javůrková

Abstrakt

Včelařství je jedním z nejstarších oborů lidské činnosti. Klíčovou roli v tomto oboru představuje včela medonosná (*Apis mellifera*), která je i významným opylovatelem zemědělských plodin a planě rostoucích rostlin. Přestože si včely během dlouhého evolučního vývoje vyvinuly obranné mechanismy proti různorodým vnějším vlivům, jejich existence je v současné době ohrožena řadou faktorů. Zajímavým prostředkem pro zvyšování imunity včelstva se zdá být včelí mikrobiota. Právě na ni se zaměřuje tato diplomová práce, s praktickou částí zaměřenou na kvasinky rodu *Zygosaccharomyces*.

Ze střev včelích larev, rousků a pylu bylo na vybraných kultivačních médiích izolováno dvacet vzorků/kmenů kvasinek. Na základě sekvenování úseku D1/D2 velké podjednotky ribozomální DNA byly v těchto dvaceti vzorcích identifikovány tři druhy rodu *Zygosaccharomyces*: *Z. rouxii*, *Z. favi* a *Z. mellis*.

Výstupem této práce jsou rovněž čtyři páry primerů, které byly navrženy v rámci úseku ITS a mohou být alternativou či doplněním molekulární charakterizace izolovaných kmenů kvasinek na základě jiného markerového úseku DNA. Všechny primery byly vyhodnoceny jako specifické pro druh *Z. rouxii*. Pomocí jednoho primerového páru byl amplifikován úsek v ITS regionu i u druhu *Z. mellis* a tento pár by tak mohl posloužit k identifikaci i tohoto druhu.

Poslední částí této práce je stanovení produkce ergosterolu v biomase kvasinek pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Ergosterol je produkován kvasinkami *Zygosaccharomyces* a podílí se tak mimo jiné i na vývoji včelího plodu. V této práci bylo zjištěno, že hladiny ergosterolu v kvasinkách nejsou jednotné a rovněž nekorelují s produkcí biomasy. Nejvyšší produkce ergosterolu byla zjištěna u druhu *Z. mellis*, vzorku získaného z pylu.

Výstupy této práce umožňují nový pohled na osídlení střevní mikrobioty včel a rovněž nabízejí potenciální význam do budoucnosti, zejména v aplikaci kvasinek jako zdroje ergosterolu pro vyvíjející se larvy.

Klíčová slova

Včela medonosná, mikrobiota včel, *Zygosaccharomyces*, PCR, molekulární klonování

Abstract

Beekeeping is one of the oldest fields of human activity. A key role in this field is played by the honey bee (*Apis mellifera*), which is also an important pollinator of agricultural crops and wild plants. Although bees have evolved defense mechanisms during their long evolution against a variety of external influences, bee's existence is currently threatened by several factors. An interesting way for increasing the immunity of the bee colony seems to be the honey bee microbiome. Honey bee microbiome is the main focus of this thesis, with a practical part focused on yeasts of the genus *Zygosaccharomyces*.

Twenty samples/strains of the yeasts were isolated from the intestines of bee larvae, pollen baskets, and pollen on selected culture media. Based on sequencing of the D1/D2 region of the large ribosomal DNA subunit, three species of the genus *Zygosaccharomyces* were identified in these twenty samples: *Z. rouxii*, *Z. favi* and *Z. mellis*.

Four pairs of primers were also designed within the ITS region and can be an alternative or complement to the molecular characterization of isolated yeast strains based on another marker region of DNA. All primers were evaluated as specific for *Z. rouxii* species. Using one pair of primers, the part of ITS region was also amplified in the species *Z. mellis*. According to this, these primers could also be used to identify this species as well.

The last part of this work is the determination of ergosterol production in yeast biomass by HPLC. Ergosterol is produced by the *Zygosaccharomyces* yeasts and it plays an important role in the development of the bee brood. It was found in this thesis, that ergosterol levels in yeasts are not uniform and also do not correlate with biomass production. The highest production of ergosterol was found in the species *Z. mellis*, which is a sample obtained from pollen.

The outputs of this work provide a new perspective on the colonization of the intestinal microbiota of bees and also offer potential significance for the future, especially in the application of yeast as a source of ergosterol for developing larvae.

Keywords

Honey bee, honey bee microbiome, *Zygosaccharomyces*, PCR, molecular cloning

Poděkování

Touto formou bych chtěla poděkovat především panu prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a cenné rady při vypracování této diplomové práce a rovněž Ing. Karlu Benešovi, Ph.D. za poznatky a pomoc s vypracováním této práce.

Obsah

Úvod.....	9
1. Literární přehled.....	10
1.1. Včely a jejich význam.....	10
1.1.1. Včela medonosná (<i>Apis mellifera</i>).....	10
1.1.2. Vývojová stádia včely medonosné	11
1.2. Zdraví včelstev	12
1.2.1. Imunita včel	12
1.2.2. Faktory s negativním dopadem na život včel	13
1.3. Symbiotické mikroorganismy během vývoje včely.....	14
1.3.1. Úvod do včelího mikrobiomu	14
1.3.2. Období larvy	17
1.3.3. Období dospělé včely.....	19
1.4. Mikroorganismy v pylu a ve včelích produktech.....	21
1.4.1. Aktivita vody ve vztahu k mikroorganismům	21
1.4.2. Pyl a plástový fermentovaný pyl	22
1.4.3. Med	23
1.5. Detekce a identifikace mikroorganismů.....	24
1.5.1. Kultivační postupy	25
1.5.2. Geny pro molekulární detekci.....	27
1.5.3. Molekulárně biologické metody	30
1.5.4. Další metody použité v této diplomové práci	32
2. Hypotézy a cíle práce	35
2.1. Hypotézy	35
2.2. Cíle práce	35
3. Metodika.....	36
3.1. Soubor vzorků a jejich příprava	36

3.1.1.	Kultivační média.....	36
3.1.2.	Izolace kvasinek.....	37
3.2.	Morfologická charakterizace.....	37
3.2.1.	Parametry pro morfologickou charakterizaci	38
3.3.	Molekulární charakterizace.....	38
3.3.1.	Izolace DNA	38
3.3.2.	PCR.....	39
3.3.3.	Elektroforéza na gelu	43
3.3.4.	Sekvenování.....	43
3.4.	Návrh primerů a optimalizace metody PCR	44
3.4.1.	PCR Klonování.....	44
3.4.2.	Návrh primerů.....	48
3.4.3.	Optimalizace metody PCR.....	48
3.4.4.	Sekvenování.....	48
3.5.	Měření koncentrace ergosterolu metodou HPLC.....	48
3.5.1.	Příprava vzorku.....	49
3.5.2.	Průběh analýzy.....	49
4.	Výsledky.....	50
4.1.	Izolace a kultivace kvasinek.....	50
4.2.	Morfologická charakterizace.....	50
4.2.1.	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	51
4.2.2.	<i>Zygosaccharomyces mellis</i>	52
4.2.3.	<i>Zygosaccharomyces favi</i>	52
4.3.	Molekulární charakterizace.....	53
4.3.1.	Sekvenování úseku ITS	53
4.3.2.	Sekvenování úseku D1/D2.....	53
4.4.	Návrh primerů	54

4.4.1.	Primery ZRxA.....	54
4.4.2.	Primery ZRxB.....	55
4.4.3.	Primery ZRxC.....	55
4.4.4.	Primery ZRxD.....	57
4.5.	Měření koncentrace ergosterolu pomocí HPLC.....	58
4.5.1.	Zpracování výsledků.....	58
5.	Diskuse	61
	Závěr.....	66
	Seznam obrázků	67
	Seznam tabulek	70
	Seznam použité literatury.....	71
	Seznam zkratk	80

Úvod

Včely medonosné (*Apis mellifera*) jsou důležitou součástí biosféry. Jako opylovatelé se podílejí na opylování mnoha planých i zemědělsky významných rostlin. Využití nacházejí rovněž při řízeném opylování, kde se podílejí až z 90 % na komerčním opylování.

Význam ekologický je doplňován významem kulturním, který je dán historií, domestikací včel i oborem včelařství. Zmíněné okruhy jsou rovněž úzce vázány na ekonomické dopady, které hospodaření se včelou medonosnou přináší. V posledních letech však dochází k významným úbytkům včelstev, a to zejména kvůli působení řady chorob a pesticidů. Zajímavý pohled na imunitu včel nabízí zkoumání včelího mikrobiomu.

Mikrobiota je pravděpodobně pro život včely nezbytná a v různém složení ji lze najít u larev i dospělých včel. Rozvoj molekulárně-biologických metod umožnil provádět řadu studií zaměřených na strukturu včelího mikrobiomu. Bylo poukázáno na význam mikroorganismů asociovaných se včelami a řada studií se snaží vysvětlit, případně objasnit, dosud neznámé mechanismy působení a roli těchto mikroorganismů.

Spektrum mikroorganismů, které jsou součástí včelí mikrobioty je široké a zahrnuje bakterie i houby. Zatímco včelí mikrobiota byla poměrně dobře prozkoumána na úrovni bakterií, informace o houbách zatím nejsou srovnatelné a nabízí se tak prostor pro jejich doplnění.

Jedním ze zástupců této komunity jsou kvasinky rodu *Zygosaccharomyces*. Izolaci těchto kvasinek a jejich charakterizaci je věnována praktická část této diplomové práce.

Diplomová práce si klade za cíl seznámit čtenáře se symbiotickými mikroorganismy asociovanými se včelou medonosnou, které se vyskytují v larvě i dospělých, jejich prostředí a včelích produktech. Cílem práce byla rovněž izolace a kultivace kvasinek rodu *Zygosaccharomyces* z pylu, pylových rousků a včelích larev. Získané izoláty byly charakterizovány pomocí morfologických a molekulárních charakteristik a rovněž u nich byla změřena produkce ergosterolu metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

1. Literární přehled

1.1. Včely a jejich význam

Včely patří mezi významné opylovatele planých rostlin i mnoha zemědělských plodin a poskytují tak nedocenitelné ekosystémové služby. V současné době je známo okolo 20 000 druhů včel tvořících samostatnou čeleď včelovití (*Hymenoptera: Apoidea*), zahrnující druhy společenské i včely samotářské (Fitzgerald, 2013).

Čeleď včelovitých zahrnuje rody včela, čmelák (*Bombus*) a tropické bezžihadlé včely (*Meliponini*). Přestože se jednotlivé druhy této čeledi liší způsobem svého života i místem výskytu, všechny jsou důležitými zemědělskými opylovateli různorodých plodin (Michener, 2013; McMenemy et al., 2018).

Vzhledem k významu včel v oblasti zemědělství i problémy spojené s jejich vymíráním je řadě z nich věnována v posledním letech velká pozornost. Nicméně nejznámějším druhem, nejen z hlediska fyziologie i chování, je včela medonosná (*Apis mellifera*) (Michener, 2007).

1.1.1. Včela medonosná (*Apis mellifera*)

Včely medonosné jsou společenský hmyz, který žije v trvalých koloniích a tvoří eusociální společenství sestávající z mnoha dělnic, trubců a jediné královny. Jedno včelstvo obvykle přežívá několik let, přičemž délka života jednotlivých včel je individuální dle sociálního postavení ve včelstvu (Winston, 1991; Gilliam, 1997).

Původ včely medonosné je situován do subsaharské Afriky, Evropy, částí západní Asie a Středního východu. V celém rozsahu výskytu i mezi relativně blízkými lokalitami vykazuje podstatné genetické a fenotypové variace jak behaviorálních, tak morfologických znaků. V současné době je však jediným druhem včel, který prošel domestikací (Cridland et al., 2017).

Med, vosk, propolis či mateří kašička jsou výstupními produkty včelařství, jednoho z nejstarších oborů lidské činnosti. Včela medonosná hraje přední roli i při řízeném opylování. Tento druh je využíván v zemědělství po celém světě a zajišťuje asi 90 % komerčního opylování. Zmíněné aspekty, historie i domestikace včely medonosné dokládají její význam ekologický, ekonomický i kulturní (Michener, 2007; Aizen et al., 2008; Meeus et al., 2017).

1.1.2. Vývojová stádia včely medonosné

Včela medonosná se vyvíjí proměnou dokonalou a její vývoj se sestává ze čtyř fází. Prvním stádiem je vajíčko. Následuje období larvy, které lze rozdělit na 5 instarů, a které je ukončeno přeměnou v kuklu. Kukla se již mění v dospělého jedince (imago) a vývoj je tak ukončen. Celková délka vývoje v dospělé včele se liší podle toho, zda se jedná o královnu – matku (15–17 dní), dělnici (19–22 dní) nebo trubce (24–25 dní) (Sammataro a Avitabile, 1998).

Za normálních okolností jsou všechna vajíčka v hníždě kladena pouze včelí matkou. Dělnice a matky se vyvíjejí z oplozených vajíček, které jsou oplozeny trubci, trubci se naopak líhnou z vajíček neoplozených. Zatímco vajíčka dělnic a trubců jsou kladena do buněk plástu, matky jsou odchovávány v mateřích miskách. Přesto přítomnost vajíček v mateřích miskách nemusí nutně vést k vývoji matky (Sammataro a Avitabile, 1998).

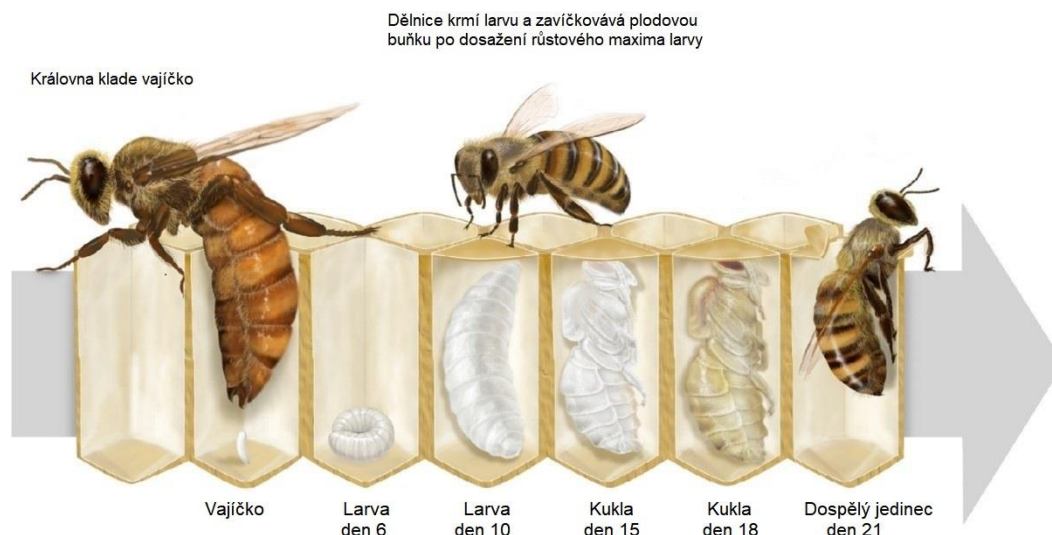
Vajíčko se po třech dnech přeměňuje v larvu. Larvy jsou krmeny dospělými dělnicemi a dostávají kašičku, která se tvoří v hypofaryngálních žlázách dělnic. Zatímco larvy matek jsou kašičkou (*royal jelly*) krmeny po celou dobu tohoto období, budoucí dělnice a trubci dostávají kašičku smíchanou s dalšími komponenty (*worker jelly*) po první tři dny vývoje larvy. Složení obou kašiček je odlišné a pravděpodobně částečně determinuje vývoj v matku (Sammataro a Avitabile, 1998; Wang et al., 2016).

Potrava larev se třetí den mění, a to za směs plástového pylu, medu a pylu. Plástový pyl (perga), neboli včelí chléb, je konečným produktem fermentace květového pylu, který dospělé včely shromažďují do plodových buněk. Aby se zabránilo jeho znehodnocení, přidávají k němu dělnice malé množství medu. V plodových buňkách následně pyl podléhá biochemickým změnám (Gilliam, 1979; Sammataro a Avitabile, 1998).

Stejně jako u ostatního hmyzu, k jediné defekaci dochází u larvy včel až těsně před zakuklením. Toto krátké období je někdy nazýváno jako předkukla (Sammataro a Avitabile, 1998; Mohr a Tebbe, 2006).

Kukla je poslední stádium před přeměnou do dospělé včely a během tohoto období dochází k rozsáhlým morfologickým změnám těla (obr. 1.1). Kukla již nepřijímá potravu a veškerou energii pro přeměnu získává ze zásob, které si vytvořila během předchozího stádia (Sammataro a Avitabile, 1998; Hroncová et al., 2015).

Vývoj plodu v dospělé včele ovlivňují dělnice, které o něj pečují, ale i matka a případně trubci, se kterými se matka páří. Zdravotní stav a reprodukční síla matky působí na vitalitu celé kolonie (Rangel et al., 2013).



Obrázek 1.1: Vývojová stádia včely medonosné. Převzato a upraveno z: <https://www.britannica.com/animal/honeybee> (Britannica, The Editors of Encyclopaedia, 2013).

1.2. Zdraví včelstev

Předpokladem pro využití benefitů, které včela poskytuje rozsáhlému ekosystému Země i člověku, je zdraví včel. V posledních letech však dochází k rozsáhlým ztrátám včelstev, které od roku 2010 činí každoročně zhruba 31–46 % (Steinhauer a vanEngelsdorp, 2017). Při analýze příčin, které souvisejí se ztrátou včelstev, nebyl prokázán jednoznačný signifikantní vliv parazitů nebo pesticidů. Vždy šlo o kombinaci více faktorů, které společně vedly k úhynu včelstva (vanEngelsdorp et al., 2009).

1.2.1. Imunita včel

Na imunitu včel můžeme pohlížet ze dvou směrů. Imunita jedince, zajištěna vlastním imunitním systémem a imunita celého včelstva, známá jako sociální imunita. Oba směry spolu úzce souvisí. Na imunitě jedince se podílí imunita sociální, humorální, a dále fyzikální bariéry a buněčná imunita. Součástí sociální imunity jsou mechanismy vyhýbání, rezistence a tolerance (Daníhlík a Petřivalský, 2015; Cremer et al., 2018).

Jedním z faktorů sociální imunity je tzv. hygienické chování. Hygienické chování pomáhá snižovat infekční tlak v úlu specifickým chováním jednotlivých včel, které umí rozpoznat nemocný či uhynulý plod a včas ho odstranit. Potlačení hygienického chování bývá způsobeno například vlivem pesticidů a může narušit sociální imunitu celého včelstva (Panasiuk et al., 2010; O'Neal et al., 2018).

Přestože význam sociální imunity je velký, nemenší význam je přikládán střevní mikroflóře jedince. Symbiotické mikroorganismy mají vliv na trávení potravy, degradaci toxických složek, vývoj imunity hostitele i zajištění obrany proti patogenům. Bylo potvrzeno, že vytvoření normální mikrobiální komunity je zásadní pro ochranu před oportunními patogeny včel (Moran et al., 2003; Kwong a Moran, 2016).

1.2.2. Faktory s negativním dopadem na život včel

V posledních letech, kdy dochází k intenzivnímu rozvoji v zemědělství, nabývají na významu přeměny přírodních krajín na hospodářské půdy. To souvisí s úbytkem kvality a pestrosti plodin, které slouží jako strava pro včely, horší dostupností potravy i se zvýšenou expozicí pesticidům (Allen-Wardell et al., 1998).

Expozice pesticidy může vést ke zhoršenému chování včel při hledání potravy, snížení kognitivních funkcí i oslabení imunity. Tím se včelstva stávají náchylnější k virům, bakteriím i dalším patogenům (Fünfhaus et al., 2018; O'Neal et al., 2018).

V souvislosti s onemocněním včel bylo identifikováno mnoho patogenů. Ze skupiny houbových patogenů může být jmenována *Nosema ceranae*, způsobující střevní onemocnění nosemozy, z parazitů *Varroa destructor* neboli kleštík včelí. Nejlépe popsány a ekonomicky nejdůležitějšími původci bakteriálních onemocnění jsou *Paenibacillus larvae*, původce moru včelího plodu a *Melissococcus plutonius*, původce hniloby včelího plodu. Zatímco hniloba včelího plodu je na území České republiky spíše sporadická, mor způsobuje celosvětové ztráty včel s významným ekonomickým dopadem (Genersch, 2010; Fünfhaus et al., 2018).

V prevenci a léčbě je důležité zachovat vysokou úroveň hygieny v chovu, a to ze strany chovatele i včel. Vyšlechtěné odolné linie včel, s dobrým čistícím pudem, mohou snížit riziko nákazy. Pozitivní výsledky taktéž přinesla výměna staré matky za novou z takto vyšlechtěných linií (Daníhlík a Petřivalský, 2015).

Primární prevencí v boji proti některým chorobám mohou být i metody genového inženýrství. In-Hui et al. (2020) úspěšně aplikovali genový knockout mechanismem

RNA interference v souvislosti s onemocněním noseμόzy, které způsobuje parazitická houba *Nosema ceranae*. Pozitivních výsledků bylo dosaženo aplikací dsRNA postiženým včelám, které cílily na geny související s funkcí mitozomů patogena (In-Hui et al., 2020).

1.3. Symbiotické mikroorganismy během vývoje včely

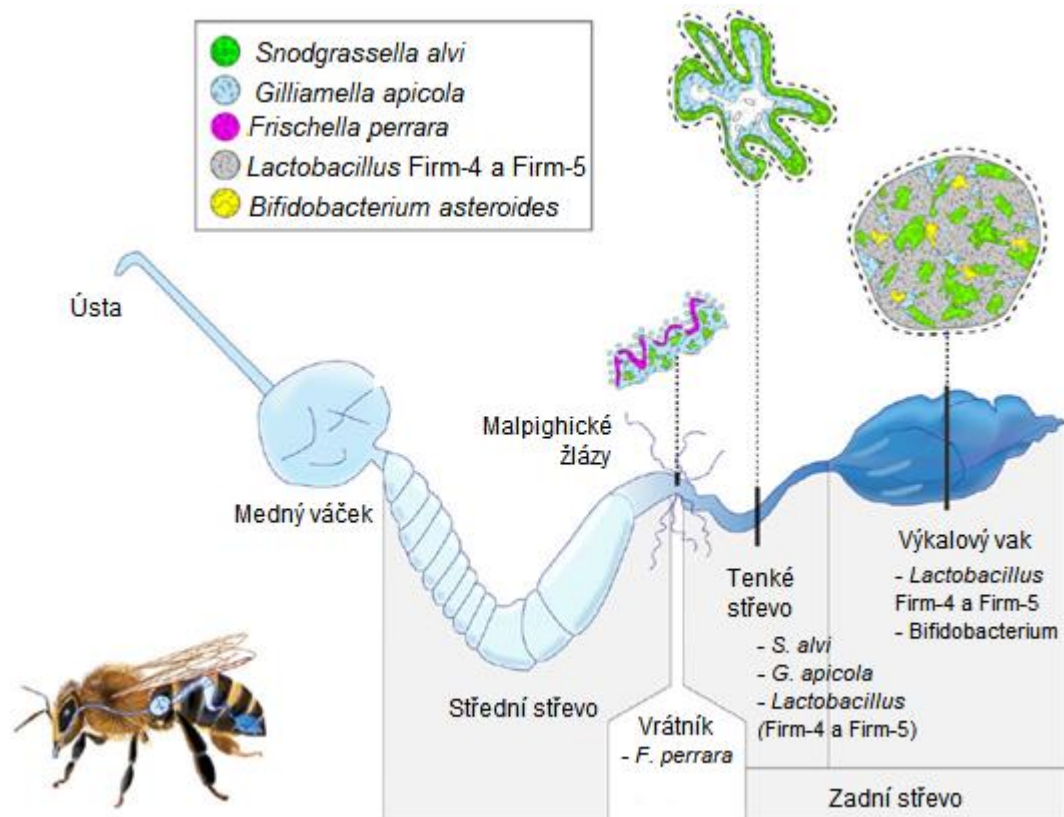
Zdraví včel je pozitivně ovlivněno střevní mikrobiotou. Oproti savcům včely představují lepší vědecký nástroj pro její pochopení, protože jejich kolonie jsou početně obsáhlé, v úlu je přítomno současně několik vývojových stádií a včely sdílejí svou potravu (Evans a Lopez, 2004). To dalo podnět řadě výzkumů vyzdvihující nejenom význam mikrobioty střevní, ale také mikroorganismů přítomných v přirozeném prostředí včel, potravě a včelích produktech.

1.3.1. Úvod do včelího mikrobiomu

Mikroorganismy asociované se včelou medonosnou zahrnují bakterie, houby a kvasinky. I když by se mohlo zdát, že bakteriím se dostává v řadě studií větší pozornosti, kvasinky i houby jsou pro vývoj včely neméně významné. Některé zdroje popisovaly asociaci těchto mikroorganismů se včelstvy nemocnými a jinak oslabenými (Gilliam, 1997). V současné době však víme, že houby (kvasinky a plísně) jsou významné především v období raného vývoje včel a pro larvy jsou například důležitým zdrojem ergosterolu, který si neumí samy vytvořit (Paludo et al., 2018).

Bakterie

V organismu včely i mezi včelími produkty je nejvíce bakterií obsaženo ve střevech (obr. 1.2). Tvoří tam jedinečnou mikroflóru, která se dynamicky mění v průběhu života a podílí se na různých životních procesech v těle. Některí zástupci například stimulují tvorbu hormonů, která urychluje vývoj dospělých dělnic (*Bifidobacterium*). Jiné druhy (*Gilliamella apicola*) jsou vybaveny enzymy pro degradaci pektinu, který je součástí pylu. Protože si včely neumí pektinázy tvořit samy, přítomnost těchto enzymů jim pomáhá při zpracování pylu, který je jejich zdrojem potravy (Kwong a Moran, 2016; Dong et al., 2020).



Obrázek 1.2: Bakteriální mikrobiota včely medonosné; medný váček obsahuje pouze malé množství bakterií převážně z potravy a z prostředí úlu, střední střevo obsahuje malé množství bakterií podobné bakteriím vrátníku. Převzato a upraveno z: Kwong a Moran (2016).

Střevo včely medonosné je osídleno zhruba deseti druhy (fylotypy) bakterií. Jedná se o vysoce specializované bakterie, které lze najít pouze ve včelích útrobach nebo v úlu. Druhy *Bartonella apis*, *Frischella perrara*, *Lactobacillus kunkeei*, *Bombella apis* a *Commensalibacter* sp. se vyskytují pouze u některých včel a většinou v populaci chybí. Druhy *Snodgrassella alvi*, *Gilliamella apicola*, dvě skupiny *Lactobacillus* (klady Firm-4 a Firm-5) a *Bifidobacterium asteroides* jsou všudypřítomné a nalezneme je u každé dospělé včely po celém světě (Kwong et al., 2017; Bonilla-Rosso a Engel, 2018).

První skupina bakterií zahrnuje napříč literárními zdroji různé bakterie v závislosti na metodice odběru vzorků, hloubce analýzy a definici střevní mikrobioty. V důsledku toho se uváděná bohatost bakteriálních druhů v literatuře liší. Obecně však existuje shoda v tom, že včelí střevní mikrobiota je relativně jednoduchá a konzervovaná z hlediska taxonomického složení (Bonilla-Rosso a Engel, 2018).

Druhá skupina tvoří tzv. jádro střevní mikrobioty, jednotné pro včely rodu *Apis*, *Bombus* i bezžihladlé včely (*Meliponini*). Jelikož včela medonosná, čmeláci i bezžihladlé včely žijí v sociálním společenství, přenáší se konzistentní mikrobiota

napříč generacemi. Jádro střevní mikroflóry vzniklo pravděpodobně již před 80 miliony lety, kdy těchto pět bakteriálních fylogrup kolonizovalo společného předka. Současně však došlo k rozdělení kmenů, a proto se kmeny mezi různými včelami liší (Kwong et al., 2017; Raymann a Moran; 2018).

Kvasinky a houby

Střevní mikroflóra včel obsahuje oproti velkému množství bakterií pouze méně než 1 % kvasinek a hub z celkového mikrobiomu. Přestože dříve byly považovány za ukazatele stresu, objevují se důkazy, že jsou pro svého hostitele prospěšnými až nezbytnými. Houby kolonizují již časná vývojová stadia včely a jejich výskyt setrvává až do dospělosti. V průběhu vývoje se však mění jejich složení, poměr i význam (Tauber et al., 2019).

Houbami asociovanými se včelami jsou houby rodů *Aspergillus*, *Penicillium*, *Monascus*, *Mucor*, *Talaromyces* a dalších. Pozitivní účinek na zdraví včel i jejich přímá asociace se včelou medonosnou byla však zatím prokázána pouze u některých z nich. Jejich přítomnost není pravidlem a je nejspíše ovlivněna ročním obdobím. Taktéž může být ovlivněna výskytem jiných, patogenních plísní. Byl například zjištěn zvýšený výskyt hub z řádu Mucorales v případě onemocnění zvápenatění včelího plodu. Toto onemocnění způsobuje houbový patogen *Ascosphaera apis* a zástupci Mucorales jsou jejími antagonisty (Gilliam et al., 1983; Sinacori et al., 2014; Barbosa et al., 2018).

Oproti plísním nebylo zatím izolováno mnoho kvasinek, které mají příznivý vliv na život včely medonosné. Mezi vybrané patří kvasinky rodů *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Candida* a *Wickerhamomyces* (Yun et al., 2019). Přestože Gilliam et al. (1974) prvně izolovala zástupce rodu *Candida* během experimentu se včelami krmenými herbicidy a antibiotiky, Paludo et al. (2019) konkrétněji popsal pozitivní vztah kvasinek rodu *Candida* k hostiteli. Pokus sice prováděl s bezžihadlymi včelami, ale jak je obecně předesíláno, bezžihadlé včely, čmeláci a včely medonosné často sdílejí podobnou mikroflóru (Kwong et al., 2017).

Kvasinky rodu *Candida* měly ve zmíněné studii (Paludo et al. 2019) vliv na vývoj larev bezžihadlých včel produkcí těkavých organických sloučenin, zejména etanolu a isoamyl alkoholu. Tyto látky *in vitro* modulovaly růst kvasinek rodu *Zygosaccharomyces*, producentů ergosterolu, který je dále využíván larvami. Obě těkavé látky jsou přítomny v plodových buňkách, což naznačuje, že tato stimulace

probíhá i v přirozeném prostředí. Kvasinky rodu *Zygosaccharomyces* byly již dříve izolovány ze všech zmíněných druhů včel (Paludo et al., 2018; Paludo et al., 2019).

1.3.2. Období larvy

Přestože se dříve předpokládalo, že vajíčka, larvy ani kukly žádné mikroorganismy neobsahují, trávicí trakt larev je mikroorganismy bohatě osídlen (Hroncová et al., 2015). Larvy získávají svou přirozenou mikroflóru z potravy. V prvních dnech dostávají kašičku, která byla vytvořena v hypofaryngálních žlázách dělnic a posléze jsou krmeny směsí plástového pylu (včelího chleba), květového pylu a medu (Mohr a Tebbe, 2006). Skladba přirozené mikrobioty je proměnlivá v rámci celého vývoje larvy a souvisí mimo jiné i se skladbou potravy (Yun et al., 2019).

Stejně jako u ostatního hmyzu, k jediné defekaci dochází u larev včel až těsně před zakuklením (Mohr a Tebbe, 2006). Trakt larvy je tak zbaven všech mikroorganismů a kontaminantů v něm přítomných, což zároveň vede i k eliminaci mikroorganismů patogenních. Přirozená bakteriální mikroflóra je obnovena do šesti dní od vylíhnutí dospělé včely (Gilliam et al., 1983; Hroncová et al., 2015).

Larvy jsou stejně jako dospělé včely osídleny bakteriemi jádra střevní mikroflóry. V prvním instaru je larva osídlena pouze velmi malým množstvím bakterií, což je pravděpodobně ovlivněno příjmem kašičky, která obsahuje proteiny potlačující bakteriální růst. Bakteriální mikroflóra v průběhu vývoje larvy narůstá a dosahuje svého maxima 6. den, v pátém instaru. V tuto chvíli je mikrobiální trakt larev, při poměru celkového počtu mikrobů na celkovou hmotnost trávicího traktu, téměř stejně bohatý, jako trakt dospělých včel. Nejhojněji zastoupenými bakteriemi v pátém instaru jsou druhy *Gilliamella apicola* a zástupci rodu *Lactobacillus* (Hroncová et al., 2015).

Bakterie podporují obranu proti patogenům spouštěním humorální imunitní odpovědi a vytvořením imunologické bariéry. U larev je z tohoto důvodu do budoucna velký potenciál v aplikaci probiotických bakterií, zejména druhů rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* (Hroncová et al., 2015). O působení kvasinek a hub není zatím srovnatelné množství informací, přesto byly některé mechanismy působení již popsány.

Například larvy chované *in vitro* na potravě doplněné o mycelium hub *Monascus* měly mnohem vyšší míru přežití ve srovnání s larvami chovanými za běžných podmínek. Houby rodu *Monascus* vykazují totiž antibiotickou a antifungální aktivitu,

kteřá hraje roli při ochraně larev před požitím kontaminované potravy. Tato houba byla izolována ze stavebního materiálu plodové buňky a jejím recyklováním a transportem dospělými včelami se přenáší do dalších hnízd. Larva se následně inokuluje pozřením potravy, která se uvnitř plodové buňky nachází (Menezes et al., 2015).

Paludo et al. (2019) oproti tomu prokázali inhibiční účinky houby *Monascus ruber* na další organismy izolované ze zárodečných buněk bezžihadlých včel. Zatímco *Candida* pozitivně stimulovala růst *Zygosaccharomyces*, růst obou kvasinek byl působením *Monascus ruber* potlačen. Protože larvy využívají *Zygosaccharomyces* jako zdroj ergosterolu, je jejich přítomnost v potravě nezbytná (Paludo et al., 2019).

Hormonální regulace metamorfózy včel

Metamorfóza hmyzu je řízena řadou hormonů, které zajišťují správný vývoj jedince. Vývoj larev je řízen především juvenilním hormonem a skupinou ekdysteroidů, což jsou steroidní hormony produkované prothorakálními žlázami u nezralého plodu a pohlavními žlázami u dospělých jedinců (Adams, 2009).

Ekdysteroidy jsou klíčovými hormony, zajišťujícími přeměnu z nezralých jedinců na dospělé. Zvýšení hladiny ekdysteroidů vede k apolýze, procesu odtržení staré kutikuly od epidermis, na kterou plynule navazuje proces svlékání (Adams, 2009).

Jedním z nejvýznamnějších ekdysteroidů, který reguluje svlékací proces u hmyzu, je 20E, známý také pod názvy β -ekdyson, ekdysteron nebo hmyzí svlékací hormon. Spektrum ekdysteroidů se však u různých druhů hmyzu liší, a to v závislosti na sterolovém substrátu a jejich enzymatickém aparátu (Pavlík et al., 2010; Lavrynenko et al., 2015).

Metabolická cesta C_{27} 20E začíná cholesterolem, který je metabolizován enzymy v prothorakálních žlázách. Někteří zástupci hmyzu mají enzymy, které katalyzují 24-dealkylaci fytoosterolů a fungálních steroidů na steroly podobné cholesterolu, které mohou být na C_{27} ekdysteroidy metabolizovány. U včely medonosné (*Apis mellifera*) však tato katalýza neprobíhá a tyto včely využívají jako hlavní hormon C_{28} ekdysteroid MaA (makisteron A), produkovaný z rostlinných steroidů. Jeho prekurzorem je pravděpodobně kampesterol (Svoboda et al., 1983; Paludo et al., 2018).

Z vyvíjejících se plodů včely byl také izolován 24-methylencholesterol, již dříve identifikován jako hlavní sterol dělnic a královen. Pro vývoj včely je pravděpodobně nezbytný a včelí dělnice jej mohou selektivně přenášet z jejich endogenních zásob

do vyvíjejícího se plodu prostřednictvím krmiva. Přesto jsou informace o tomto sterolu poměrně nedostatečné, a to zejména v souvislosti s jeho potenciální přeměnou v prekurzory makisteronu A (Feldlaufer et al., 1985).

Včely medonosné nejsou produkce cholesterolu schopné a v malém množství jej získávají z potravy, především z pylu (Clark a Bloch, 1959). Paludo et al. (2018) nicméně u larev bezžihladých včel *Scaptotrigona depilis* zjistili, že produkce ekdysteroidů může rovněž probíhat z ergosterolu, významného steroidního hormonu hub a kvasinek. *In vitro* testování vývoje larev *S. depilis* prokázalo, že ergosterol kvasinek *Zygosaccharomyces* sp. měl na pupaci larev podobnou míru účinku, jako na své producenty.

Závislost larev *S. depilis* na dodání sterolů kvasinkami *Zygosaccharomyces* sp. ukazuje význam zachování mikrobioty spojené se včelami. Kvasinky *Zygosaccharomyces* sp. byly již dříve izolovány z jiných včel, hlavně čmeláků, včel medonosných a dalších bezžihladých včel. Pravděpodobně budou tedy existovat i další podobné případy symbiózy mezi houbami a dalšími včelami (Paludo et al., 2018).

1.3.3. Období dospělé včely

U larvy dochází před zakuklením k defekaci, čímž se zbavuje veškeré střevní mikroflóry. Jelikož kukla není v průběhu vývoje krmena, ani nepřichází do styku s dospělými včelami, riziko kontaktu s mikroorganismy je velmi minimální. Obnovení přirozené mikroflóry začíná časně po vylíhnutí dospělé včely (Hroncová et al., 2015).

Mezi mikrobiotou dělnic a trubců nebyly dle Hroncové et al. (2015) nalezeny žádné signifikantní rozdíly. Odlišné složení mikroflóry lze pozorovat u matek. Jedním z důvodů je odlišná potrava ve formě mateří kašičky, která je zkrmována po celý jejich vývin (Tarpay et al., 2015).

Dělnice a trubci

Včelí dělnice zastávají ve včelstvu různorodé funkce a jejich pracovní náplň se v průběhu života mění. Z hlediska vědeckých publikací se úloha včelí dělnice často dělí pouze na dvě období – dělnice mladší, zajišťující potravu pro larvy a matku a dělnice starší, které vylétávají z úlu a starají se o sběr pylu.

Nově vylíhnuté včely získávají přirozenou mikroflóru konzumací medu, plástového pylu, nebo specifickým přenosem nektaru od ostatních dělnic (trophallaxis). Martinson et al. (2012) nicméně zjistili, že plástový fermentovaný pyl

postrádal téměř všechny bakteriální fylotypy a nemohl tak být jejich jediným zdrojem pro nově vylíhnuté včely.

Kolonizace určitými fylotypy bakterií však může nastat i kontaktem s povrchy v hnízdě nebo přirozeným výskytem v plodové buňce. Způsoby přenosu se u jednotlivých fylotypů liší, a i přes malé množství bakterií, které úl obsahuje, může několik málo buněk ve střevech mladé včely vytvořit plnou mikrobiotu (Martinson et al., 2012).

Kromě bakteriální mikrobioty střev byly symbiotické bakterie izolovány také z úst, hypofyzárních žláz i povrchu těla dospělé včely (Ribiére et al., 2019). Dospělé včely však těsně po vykuklení neobsahují téměř žádnou střevní mikroflóru a k výrazné změně dochází hned první den po vylíhnutí. Výjimkou je fungální mikrobiom, který je přítomen již u čerstvě vylíhnutých dělnic (Yun et al., 2019).

Prvními bakteriemi, které osídlují střevo, jsou bakterie jádra střevní mikroflóry – bakterie rodů *Frischella*, *Snodgrassella* a *Gliamella*. Kolonizaci střeva těmito bakteriemi až první den po vylíhnutí lze vysvětlit tím, že tyto bakterie jsou přenášeny výhradně sociálním kontaktem mezi včelami a ten v časném stádiu ihned po vylíhnutí ještě neprobíhá. Mezi prvním a třetím dnem od vylíhnutí dochází také k pomalému nárůstu dalších bakterií, zejména z rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* (Powell et al., 2014; Dong et al., 2020).

Narozdíl od bakteriální střevní mikroflóry, která je po celý život téměř neměnná, se výskyt houbových mikroorganismů liší. Mladé dělnice jsou kolonizovány převážně kvasinkami *Saccharomyces*, zatímco u starších lze najít celé spektrum houbových mikroorganismů (Tauber et al., 2019; Yun et al., 2019).

Pravděpodobně to souvisí s úlohou *Saccharomyces* při zpracování pylu v kašičku, které zajišťují mladé dělnice. *Saccharomyces* se jednak podílí se na detoxikaci potencionálních xenobiotik z rostlin, ale zároveň usnadňují trávení pylu. Podobné účinky byly nalezeny taktéž u rodu *Candida*. Jelikož se starší včely na tvorbě kašičky již nepodílí, je pro ně tato mikrobiota zbytečná. Starší včely jsou na druhou stranu mnohem více vystaveny vnějším mikroorganismům při vylétávání z úlu, což odpovídá širšímu spektru izolovaných houbových mikroorganismů (Tauber et al., 2019; Yun et al., 2019).

Včelí matka

Složení mikroflóry mezi matkou a dělnicemi se mírně liší a je ovlivněno příjmem mateří kašičky. Bakterie *Bombella apis* byla hojně izolována z mateří kašičky a hypofyzárních žláz dělnic, zatímco v jejich střevech téměř chyběla. Často byla naopak izolována ze střev matek. Ve střevech a vaječnicích matek byl také dominantní nález *Zygosaccharomyces*, ale výskyt *Saccharomyces* typický pro dělnice byl mírně potlačen (Tarpay et al., 2015; Yun et al., 2019).

Vedle potravy ovlivňuje přítomnost mikroorganismů také genová exprese, imunita, nebo přítomnost antioxidantů. Znamé jsou antagonistické účinky některých mikroorganismů, například bakterie *Lactobacillus*, která je antagonistou kvasinek. Antagonistický vztah *Lactobacillus* – *Saccharomyces* byl však prokázán pouze u dělnic, a to pravděpodobně kvůli specifitě hostitelského metabolismu a vlivu dalších mikrobů (Yun et al., 2019).

1.4. Mikroorganismy v pylu a ve včelích produktech

Schopnost mikroorganismů přežít v potravinách a dalším prostředí je určena vodní aktivitou. Aktivita vody se uvádí pod zkratkou a_w a jedná se o tzv. volnou vodu, která je v potravině k dispozici a není chemicky vázána (Tapia et al., 2007).

Vodní aktivita je definována jako poměr rovnovážného parciálního tlaku vodní páry nad daným biologickým materiálem (p) k rovnovážnému parciálnímu tlaku vodní páry nad čistou vodou (p_0) při dané teplotě. Při rovnováze potraviny s okolním vzduchem je aktivita vody totožná jako rovnovážná relativní vlhkost vzduchu. Protože rovnovážná relativní vlhkost vzduchu (%eRH) dosahuje hodnot 0–100 %, odpovídá 1 % hodnotě 0,01 vodní aktivity (Reid, 2007; Fontana, 2008).

$$\text{vodní aktivita } (a_w) = \frac{p}{p_0} = \frac{\%eRH}{100}$$

1.4.1. Aktivita vody ve vztahu k mikroorganismům

Vodní aktivita nabývá hodnot mezi 0 a 1 a je nepřímo úměrná osmotickému tlaku. Životaschopnost mikroorganismů je omezena minimálním množstvím volné vody v potravinách a pro různé mikroorganismy bývá odlišná. Pro většinu bakterií je minimální hodnota a_w 0,90; pro houby 0,75–0,90 a pouze malé množství je schopné růst při hodnotách ještě nižších. Obecně však převážná část mikroorganismů není schopna růstu při a_w pod 0,60 (Tapia et al., 2007).

Mikroorganismy, které jsou schopny růstu na substrátech s vysokým osmotickým tlakem, se označují jako osmofilní. Dříve uváděné označení osmotolerantní není úplně chybné, ale v poměrně nedávné době byly oba tyto termíny od sebe odděleny (Dakal et al., 2014).

Zvýšení osmotického tlaku, tedy snížení aktivity vody, je možné dosáhnout například sušením, proslazováním (sirupy) nebo solením. Primárně se jedná o způsob konzervace potravin v potravinářském průmyslu. Ze včelích produktů má nízkou aktivitu vody plástový pyl a med. Vodní aktivita medu je 0,6 a nižší, u plástového pylu kolísá dle vlhkosti prostředí. Nebývá však vyšší než 0,7 (Deak, 2007; Conklin et al., 2012).

Tyto vlastnosti souvisí s poměrně úzkým zastoupením mikroorganismů, které dokážou v medu či plástovém pylu přežít. Jelikož se jedná o mikroorganismy schopné přežít v podmínkách s vysokým obsahem cukru, jedná se často o významné kontaminanty potravin. Patří mezi ně například zástupci rodu *Zygosaccharomyces* (Čadež et al., 2015).

1.4.2. Pyl a plástový fermentovaný pyl

Včely získávají všechny stavební a nutriční látky z pylu a nektaru. Pyl je zdrojem proteinů, aminokyselin, lipidů, vitamínů a minerálů. Hlavním zdroje sacharidů je nektar. Starší dělnice vylétávají z hnízda, sbírají pyl z květů a transportují ho do úlu ve formě tzv. rousků, pylových košíčků na jejich nohách. Tento pyl je zpracován mladšími dělnicemi, které ho uloží do plodové komory a obalí ho vrstvou medu, aby se zabránilo znehodnocení. Takto uložený pyl prochází biochemickými změnami a konečný produkt se nazývá plástový fermentovaný pyl (včelí chléb). Včelí chléb slouží jako potrava pro dospělé včely a krmivo pro larvy (Gilliam, 1997).

Zrání včelího chleba

Pyl a včelí chléb se biochemicky liší. Proces zrání probíhá jako mléčné kvašení, které způsobují bakterie a kvasinky. Z bakterií jsou hlavními činiteli fermentace zástupci *Lactobacillus*, kteří produkují nejvíce kyseliny mléčné a zvýšením acidity stabilizují zrající pyl (Gilliam, 1979).

Pyl, který by však prošel pouze mléčným kvašením, by nebyl pro včely chutný a neměl by dostatečné nutriční hodnoty. Potřebné elementy jsou nejspíše dodávány díky kvasinkám, které zároveň podporují chuť včel ke konzumaci čerstvého včelího chleba. To by odpovídalo skutečnosti, že mnohem více kvasinek je izolováno

ze včelího chleba čerstvého než dlouhodobě uchovaného (Gilliam, 1979; Detry et al., 2020).

Další mikroorganismy izolované z pylu a včelího chleba

Jak již bylo zmíněno, nově vylíhnuté včely získávají přirozenou mikroflóru konzumací medu, včelího chleba, specifickým přenosem nektaru od ostatních dělnic nebo v prostředí úlu. Martinson et al. (2012) nicméně zjistili, že včelí chléb postrádal téměř všechny bakteriální fylotypy a nemohl tak být jejich jediným zdrojem pro nově vylíhnuté včely.

Naproti tomu je včelí chléb zdrojem jiných mikroorganismů, které se podílí na životním cyklu včel (Paludo et al., 2019; Detry et al., 2020). Kvasinky a houby převládaly v izolátech z pylu a včelího chleba ve výzkumu Gilliam (1997), kdy z pylu bylo izolováno 55 % hub a ze včelího chleba dokonce 85 % hub z celkového množství izolovaných mikroorganismů.

Detry et al. (2020) izolovali ze včelího chleba kvasinky rodu *Starmerella*, *Metschnikowia* a *Zygosaccharomyces*. Zatímco druhy *Starmerella* byly převážně izolovány z čerstvého produktu, *Zygosaccharomyces* dominovaly staršímu včelímu chlebu. Tyto kvasinky se do včelího chleba dostanou pravděpodobně v průběhu skladování pylu například z trávicího traktu včel (Detry et al., 2020).

Další houby byly izolovány z pylu, medu a hnízd bezžihadlých včel. Barbosa et al. (2018) zkoumali houby rodů *Penicillium* a *Talaromyces* a vliv jejich metabolitů na včely. Mykotoxin citrinin, produkovaný těmito druhy, byl popsán v pylu po celém světě a je znám jeho negativní vliv na člověka. U včel však v průběhu experimentu nebyl pozorován žádný negativní dopad na zdraví. Je to pravděpodobně díky adaptaci opylovatelů na různorodé plodiny, která se vyvíjela řadu let, nebo také působením synergistických či antagonistických mikroorganismů (Barbosa et al., 2018; Paludo et al., 2019).

1.4.3. Med

Včely produkují med pro zajištění výživy v úlu a získávají z něj mnoho cenných látek. Med je významný pro své antimikrobiální účinky, ale i obsah symbiotických mikroorganismů, které z něj včely takto získávají. Nicméně pro své vlastnosti může být zdrojem i potencionálně škodlivých mikroorganismů, čemuž se pro jeho úlohu ve výživě člověka převážně věnuje potravinářská mikrobiologie.

Bakterie izolované z medu patří k druhům *Bacillus* a *Clostridium*. Nejvýznamnějším patogenem je oportunní bakterie *Bacillus cereus*, producent enterotoxinu, zatímco ostatní druhy *Bacillus* patří mezi nepatogenní. Z bakterií *Clostridium* byla izolována v souvislosti s medem pouze *Clostridium botulinum*. Jedná se o producenta botuloxinu, toxinu, který způsobuje botulismus u lidí. Do včelího úlu se dostává jako kontaminant vody, nebo kontaktem produktu s infekčními povrchy. Přestože nákaza způsobená *Clostridium botulinum* může být u oslabených lidí fatální, u včel tato bakterie nepředstavuje žádné ohrožení (Snowdon a Clive, 1996; Silva et al., 2017).

Se včelami nebo jejich produkty jsou také asociovány houby, jejichž úloha není zatím dostatečně pochopena. Sinacori et al. (2014) izolovali z medů různého původu osm rodů hub. *Penicillium* a *Aspergillus* byly zastoupeny nejvíce a spolu s rody *Cladosporium* a *Alternaria* patří mezi běžné kontaminanty medu. Tyto houby mohou u člověka vyvolat závažné alergické reakce, avšak souvislost s onemocněním u včel je prokázána pouze u některých z nich (Sinacori et al., 2014).

Dalšími zástupci hub byly *Talaromyces* a *Monascus* bez negativního vlivu na včelstva. Přestože *Monascus* inhibuje růst některých kvasinek, byl prokázán i jeho pozitivní vliv na vývoj larev (Barbosa et al., 2017).

1.5. Detekce a identifikace mikroorganismů

Metody sloužící ke stanovení přítomnosti mikroorganismů lze obecně dělit na metody detekční a identifikační. Volba vhodné metody je mimo jiné závislá na hloubce a cíli analýzy. V některých případech může být dostačující potvrzení přítomnosti mikroorganismů na základě nukleové kyseliny nebo izolace řady mikroorganismů na kultivační půdě. Pro identifikaci jednotlivých mikroorganismů je však vhodnější zvolit metody přesnější, například detekci variabilních úseků DNA nebo využití mikroskopie či specifických kultivačních médií (Hurych et al., 2020).

Dříve byly kultivační metody založené na morfologickém určení mikroorganismu hojně využívané jako jediný způsob identifikace mikroorganismu. S rozvojem molekulárně biologických metod je nicméně snazší identifikace na základě stanovení nukleové kyseliny. Protože ale kultivace často předchází molekulárně biologickým metodám, v současné době se oba přístupy doplňují (Lau et al., 2015).

1.5.1. Kultivační postupy

Kultivace mikroorganismů na kultivačních půdách je základním způsobem izolace mikroorganismu. Kultivační půdy slouží především k pomnožení a musí splňovat vhodné podmínky pro růst daného mikroorganismu. Hlavními kritérii jsou dostatek živin, dostatek vody a vlhkosti, optimální teplota, pH a doba kultivace. Již samotné nároky mikroorganismů na kultivační podmínky mohou předurčit jejich taxonomické zařazení (Hurych et al., 2020).

Po izolaci mikroorganismu následuje jeho identifikace, a to biochemickými či antigenními testy, průkazem nukleové kyseliny nebo hmotnostní spektrometrií. I kultivace na selektivních půdách je často nedostatečná, a proto je pro určení rodu a druhu bakterie vhodné zvolit některou ze zmíněných metod přímého průkazu. Identifikaci mikroorganismu mohou usnadnit také mikroskopické techniky nebo stanovení citlivosti k antibiotikům (Hurych et al., 2020).
















Růst mikroorganismů je přídavky antimikrobiálních látek do kultivačních médií snadno ovlivnitelný. Například chloramphenicol je známé antibiotikum, které potlačuje růst bakterií, cycloeximide a biphenyl jsou naopak látky potlačující růst kvasinek a hub (Sinacori et al. 2014).

Morfologická charakterizace

Morfologické znaky mikroorganismů lze rozdělit podle použitých metod na znaky makroskopické a mikroskopické.

Makroskopické znaky jsou pozorovány na vybraných kultivačních médiích, nejčastěji na pevné agarové půdě. Vzhled kolonií může usnadnit identifikaci rodu, popřípadě i druhu mikroorganismu (Bursová et al., 2014).

Vzhled kolonie je výrazně ovlivněn několika faktory, a proto bývá nezbytné spolu s makroskopickým popisem uvádět rovněž podmínky kultivace (teplota a doba kultivace) a použité kultivační médium. Zatímco mladší kolonie bývají hladší, rýhování a další výrazné změny se mohou projevit později. Také složení živné půdy ovlivňuje vzhled kolonií. Při popisu vzhledu jsou sledovány například barva kolonií, konzistence, interakce s kultivačním médiem a profil, tvar a okraje kolonie (obr. 1.3) (Kocková-Kratochvílová, 1982; Bursová et al., 2014).

profil	tvár	okraj
 ploché	 okrouhlý	 vroubkovaný
 zvýšený	 laločnatý	 nepravidelný <i>caput medusae</i>
 vypouklý	 koncentrická stavba	 vláknitý
 pupkovitý	 sektorový	 svrašťelý
 knoflíkovitý		 rhizoidní
 bradavčitý		

Obrázek 1.3: Morfologické znaky kolonií (Bursová et al., 2014; převzato a upraveno z Havlová et al., 1993).

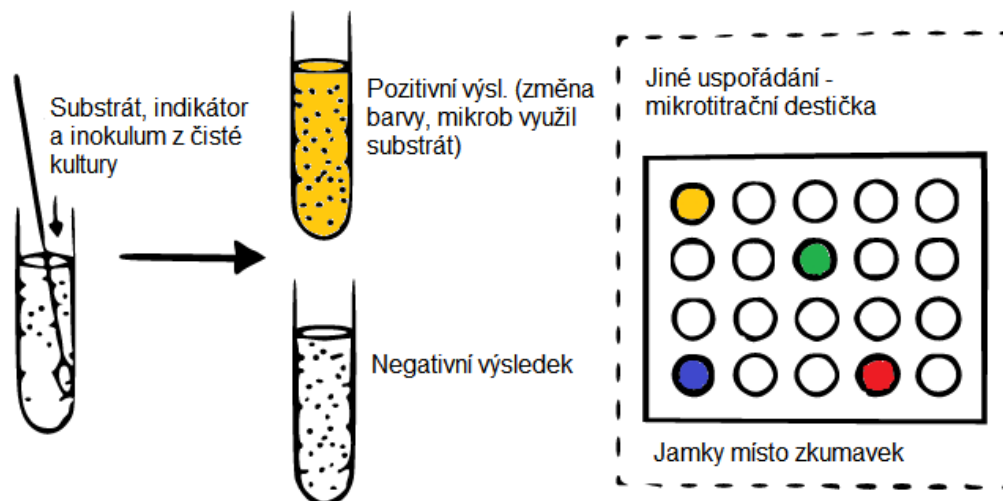
Mikroskopické znaky se popisují za využití světelného či elektronového mikroskopu. Mezi sledované znaky patří morfologie buněk, uspořádání i výsledek použitého barvení. Nativní preparáty se používají ojediněle, častěji jsou preparáty fixovány a následně barveny některou z metod barvení podle charakteru vzorku. Využíváno je například Gramovo barvení nebo barvení bakteriálních pouzder dle Burriho (Bursová et al., 2014).

Biochemické testy

Biochemické testy patří mezi metody identifikační. Po úspěšné kultivaci mikroorganismů lze díky biochemickým testům identifikovat jejich druh. Jedná se nicméně o metody jejichž význam klesá a jsou postupně nahrazovány modernějšími postupy (Hurych et al., 2020).

Principem těchto testů je vytvořit biochemický profil konkrétního izolátu, který odráží jeho pozitivitu či negativitu na vybrané chemické reakce. Provedení testů je různé, některé reakce lze testovat v rámci komerční soupravy v řadě zkumavek s tekutými médii, jiné je provedení na pevné půdě či přímo s kolonií na kličce (Hurych et al., 2020).

Mezi vybrané testy patří například tvorba sulfanu, štěpení urey, štěpení sacharidů, průkaz β -galaktosidázy, katalázový nebo koagulázový test. Pozitivní reakce je založena na změně barvy testovacího média, které je způsobeno změnou příslušného indikátoru (obr. 1.4) (Bursová et al., 2014; Hurych et al., 2020).



Obrázek 1.4: Princip biochemických testů: změna barvy kultivačního média. Převzato a upraveno z: Hurych et al. (2020).

1.5.2. Geny pro molekulární detekci

Cílem většiny molekulárně biologických metod, které slouží pro detekci či identifikaci bakterií a hub, jsou nejčastěji geny kódující ribozomální RNA. V případě prosté detekce je možné využít směsného vzorku k průkazu nukleové kyseliny, u identifikace je nutná předchozí izolace čisté kultury na vhodném kultivačním médiu (Leaw et al., 2006; Lau et al., 2015).

Každý organismus má jedinečnou DNA, která se mimo jiné skládá z variabilních a konzervovaných oblastí. V případě mikroorganismů existují oblasti konzervované, které mohou být společné i pro nižší taxonomické jednotky a oblasti variabilní, které mohou být odlišné na úrovni jednotlivých druhů (Clarridge, 2004).

Detekce bakterií

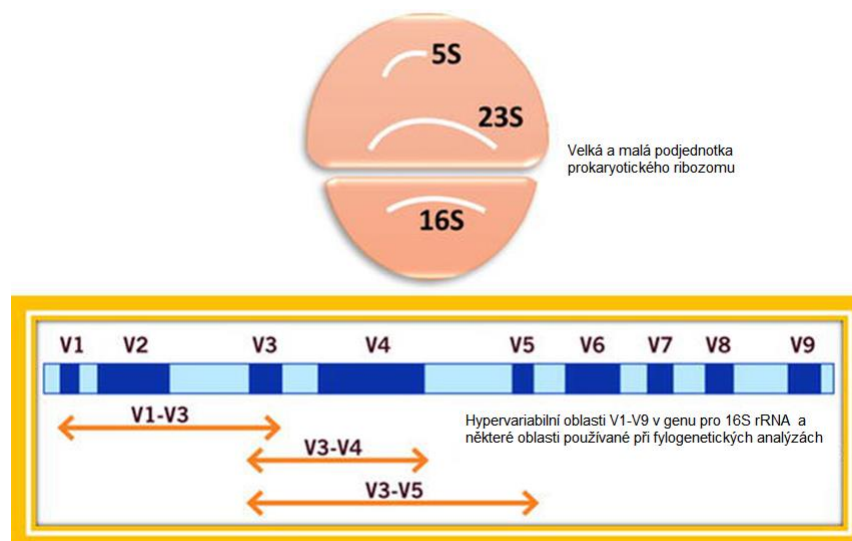
Pro identifikaci neznámých bakterií se nejčastěji využívá genu kódujícího 16S ribozomální RNA (zkráceně 16S rDNA). 16S ribozomální RNA je součástí malé podjednotky prokaryot (30S), zatímco velká podjednotka (50S) obsahuje řetězce 5S a 23S ribozomální RNA. Geny pro 16S a 23S jsou odděleny úsekem nekódující spacerové DNA, tzv. ITS oblastí (Internal Transcribed Spacer) (Lafontaine a Tollervey, 2001).

Sekvenování 16S rDNA se stalo stěžejním pro laboratorní diagnostiku i výzkum a jedná se o rychlou a přesnou metodu detekce. Výhodou je také schopnost detekovat bakterie z přímých klinických vzorků bez předchozího zisku čistých kultur,

což usnadňuje detekci bakterií obtížně kultivovatelných (Kim a Chun, 2014; Lau et al., 2015).

16S rDNA obsahuje oblasti konzervované, shodné pro všechny bakterie i úseky variabilní, charakteristické pro každý bakteriální druh. Na základě cíle výzkumné práce jsou dostupné sekvence velkého množství primerů, které lze pro detekci zvolit. Existují primery specifické pro bakterie jádra střevní mikroflóry i primery univerzální (Martinson et al., 2012; Lau et al., 2015).

16S rDNA obsahuje na přibližně 1 500 bp dlouhém úseku 9 hypervariabilních oblastí V1–V9 (obr. 1.5). Ve fylogenetických studiích se nejčastěji používá analýza oblastí V1–V2 a V6–V8 (Neefs et al., 1990; Clarridge, 2004). V nedávné době Ribiére et al. (2019) potvrdili význam dalšího úseku, V3–V4, patrně přínosnějšího pro popis střevní mikrobioty u včel.



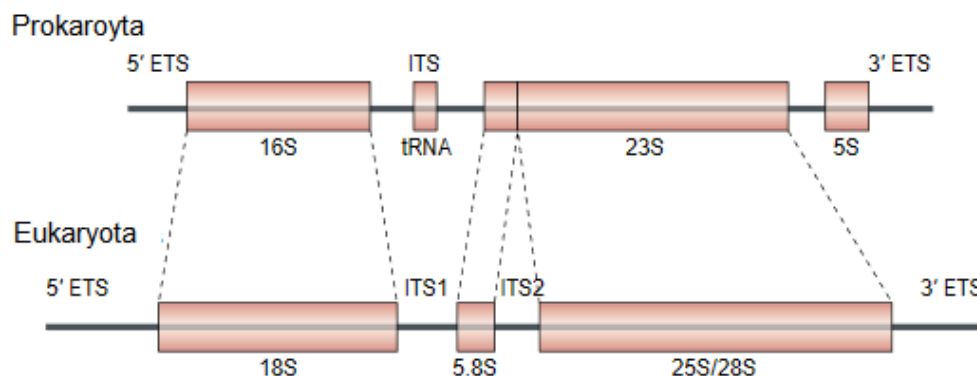
Obrázek 1.5: Znárodnění prokaryotického ribozomu a vizualizace hypervariabilních oblastí, které se střídají s úseky konzervovanými v genu 16S rDNA, a které slouží pro identifikaci bakterií. Převzato a upraveno z: Sánchez-Reyes a Folch-Mallol (2019).

Detekce kvasinek a hub

Ribozomy eukaryot jsou větší než prokaryotické a skládají se z malé ribozomální podjednotky 40S a velké podjednotky 60S. Každá podjednotka je tvořena proteiny a ribozomální RNA (rRNA). Malou podjednotku tvoří pouze jeden řetězec 18S rRNA, zatímco velká je tvořena třemi molekulami rRNA – 25S/28S, 5.8S a 5S (Lafontaine a Tollervey, 2001).

Oproti bakteriím jsou geny kódující rRNA eukaryot odděleny dvěma ITS úseky (obr. 1.6). První úsek ITS1 se nachází mezi geny pro 18S rRNA a 5.8S rRNA, druhý

úsek ITS2 odděluje geny pro 5.8S rRNA a 25S/28S rRNA (Lafontaine a Tollervey, 2001).



Obrázek 1.6: Organizace pre-rRNA u prokaryot a eukaryot. Pro identifikaci kvasinek a hub (eukaryota) se využívá úseků ITS1 a ITS2, které oddělují geny pro 18S rRNA a 5,8S rRNA, resp. 5,8S rRNA a 25S/28S rRNA. Převzato a upraveno z: Lafontaine a Tollervey (2001).

ITS úseky se využívají pro diagnostiku houbových mikroorganismů v řadě PCR modifikací, mezi něž patří PCR-RFLP, hybridizace i sekvenování. Variabilita v ITS úsecích umožňuje identifikaci i relativně blízkých druhů a množství známých sekvencí v genových databázích stále narůstá (Leaw et al., 2006).

Celá ITS oblast se stala oficiálním DNA barcodem pro identifikaci hub, protože se jedná o nejčastěji využívaný marker s největší pravděpodobností úspěšné identifikace široké škály druhů. Přestože někdy neobsahuje dostatečné variace pro rozlišení mezi všemi druhy, existují funkční primery, které působí univerzálně a doporučuje se tak ITS sekvenci zařadit do charakterizace každého nově popsaného druhu (Snosch et al., 2012; Samson et al., 2014).

Identifikaci hub pomocí ITS úseků je možné doplnit nebo nahradit dalšími markery. D1/D2 je hypervariabilní úsek, který je součástí genu pro 26S rRNA. Přestože se jedná o vhodný region pro identifikaci taxonů na vyšší úrovni, bývá sledován jako méně spolehlivý oproti ITS (Chen et al., 2001; Groenewald et al., 2011).

Dalšími možnostmi pro testování hub jsou geny pro β -tubulin (*BenA*), calmomodulin (*CaM*) nebo gen kódující podjednotku RNA polymerázy II (*RPB2*). *RPB2* je těžko amplifikovatelný a používá se spíše jako sekundární marker, gen *BenA* je naopak amplifikovatelný snadno, ale kvůli kolísání v počtu intronů někdy vede PCR k amplifikaci paralogních genů (Samson et al., 2014).

1.5.3. Molekulárně biologické metody

PCR

Polymerázová řetězová reakce (zkratka PCR z anglického „Polymerase Chain Reaction“) je nejznámější a nejvyužívanější molekulárně biologickou metodou současnosti, která umožňuje amplifikaci (zmnožení) určitých úseků DNA *in vitro*. PCR je aplikovatelná v celé řadě modifikací a téměř zpravidla je výchozím krokem pro řadu dalších metod (Kočárek, 2007; Snusnad a Simmons, 2015).

Pro správný průběh reakce je nezbytné zajistit templátovou DNA, množství deoxyribonukleotidfosfátů (dNTP), termostabilní DNA polymerázu a primery, krátké oligonukleotidové sekvence, které ohraničují požadovaný úsek DNA. Reakce probíhá v zařízení zvaném termocykler, který umožňuje variabilní změnu času a teploty v naprogramovaných cyklech (Šmarda et al., 2005).

PCR je tvořena třemi cyklicky se opakujícími fázemi. První fází je denaturace DNA při teplotě 92–95 °C, následuje hybridizace primerů za snížené teploty obvykle v rozmezí 50–65 °C a cyklus je ukončen syntézou nového vlákna DNA (elongace) při teplotě 70–72 °C. Teploty a časové intervaly jednotlivých fází se liší podle výchozího substrátu, primerů i podle použité polymerázy (Snusnad a Simmons, 2009; Brdička a Didden, 2015).

Reakce probíhá standardně při 20–40 opakováních a postupně dochází k exponenciálnímu nárustu počtu kopií DNA. Po ukončení reakce lze produkty vizualizovat pomocí elektroforézy v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu, případně elektroforézou kapilární. Jedná se o jednoduchou separační metodu, při které působením stejnosměrného elektrického proudu dochází k rozdělení fragmentů nukleových kyselin na základě jejich velikosti (Brdička a Didden, 2015).

Real time PCR

Metoda real time PCR je modifikací klasické PCR, která slouží ke kvantifikaci produktů během reakce. Z tohoto důvodu se lze setkat s označením qPCR (z anglického quantitative PCR) nebo PCR v reálném čase (Šmarda et al., 2005).

Princip reakce je obdobný jako u klasické PCR, ale kromě standardního složení je v reakci přítomna ještě sonda. Sonda je buď fluorescenčně značená a váže se na amplifikované vlákno, nebo jde o barvivo, které se vmezeří mezi dvouvláknovou DNA. Úkolem této sondy je indukce fluorescence, která přímo narůstá se zvyšujícím se množstvím PCR produktu (Hurych et al., 2020).

Aby bylo možné měřit intenzitu fluorescence, probíhá qPCR ve speciálně upraveném termocykleru, který indukuje fluorescenci ozářením excitačním UV zářením. Koncentrace fluorescenčního barviva je přímo úměrná množství DNA a výsledky lze vyhodnocovat ještě před ukončením všech cyklů (Kočárek, 2007).

PCR-RFLP

PCR-RFLP je metoda kombinující přednosti technik PCR a RFLP. Polymorfismus délky restričních fragmentů (odtud zkratka RFLP) je jev, který nastává po štěpení DNA restričními endonukleázami. Ještě předtím však probíhá klasická amplifikace požadovaného úseku DNA pomocí PCR a teprve poté jsou amplifikované úseky vystaveny působení enzymů (Šmarda et al., 2005).

Restriční endonukleázy jsou enzymy, které jsou schopny rozpoznat specifickou sekvenci v molekule DNA a v konkrétním místě ji rozštěpit. Sekvence místa je pro každý enzym specifická, a tak vznikají různě dlouhé DNA fragmenty. Úseky, které po štěpení vzniknou, se nazývají restriční fragmenty a detekují se pomocí gelové elektroforézy. Vzniklý profil fragmentované DNA je pro různé organismy jedinečný v důsledku mutací, které vedou k vytvoření či ztrátě rozpoznávacích míst pro restriční endonukleázy (Šmarda et al., 2005; Snusnad a Simmons, 2009).

Sekvenování

Sekvenování je metoda, pomocí které zjistíme přesné pořadí nukleotidů v molekule DNA. Díky jedinečnosti DNA každého z organismů slouží sekvenování pro jejich identifikaci a odlišení, ale našlo uplatnění také v řadě dalších odvětví, lékařství a výzkumech (Hurych et al., 2020).

Existují dvě odlišné „klasické“ techniky sekvenování. První je metoda Maxam-Gilbertova, založena na specifické degradaci řetězců nukleových kyselin pomocí chemických sloučenin. Druhým typem je Sangerovo sekvenování, enzymatická metoda, která je založena na specifické terminaci syntézy DNA (Šmarda et al., 2005).

Pro účely molekulární diagnostiky je využíván druhý postup a následující odstavce jsou věnovány pouze metodě Sangerově.

Sangerovo sekvenování probíhá obdobně jako PCR, syntézou komplementárního řetězce podle matricové DNA. Pro reakci je potřeba DNA polymeráza, matricová DNA (produkt PCR) a nukleotidy. Kromě dNTPs je do každé reakce přidáván v určitém poměru také po jednom z ddNTPs (dideoxyribonukleotidů). Oproti deoxyribonukleotidům ddNTPs na třetím uhlíku deoxyribosy chybí volná hydroxylová

skupina a v důsledku této absence je zabráněno dalšímu prodlužování řetězce. Oproti PCR se reakce účastní pouze jeden primer (Beránek, 2016).

Dříve probíhalo sekvenování ve čtyřech oddělených zkumavkách. Každá byla určena pro jiný dideoxynukleotid (např. ddATPs), v důsledku čehož byly ve zkumavce na konci reakce různě dlouhé fragmenty zakončené tímto nukleotidem. Obsah všech zkumavek se následně nanese na elektroforetický gel a po separaci bylo možné odečtení přesné sekvence nukleotidů v DNA (Beránek, 2016).

V současné době je sekvenování usnadněno použitím automatických sekvenátorů. Pro reakci se používají fluorescenčně značené dideoxyribonukleotidy, v důsledku čehož odpadá nutnost oddělených zkumavek. Vyhodnocení probíhá na principu kapilární elektroforézy a výstupem je graf, jehož jednotlivé vrcholy odpovídají příslušným nukleotidům (Kočárek, 2007; Beránek, 2016).

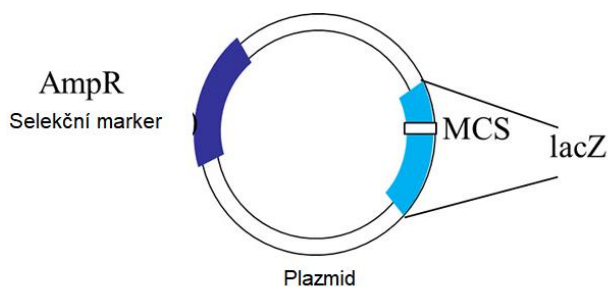
1.5.4. Další metody použité v této diplomové práci

Molekulární klonování

Molekulární klonování se řadí k metodám molekulární biologie. Jeho podstatou je přenos fragmentu nukleové kyseliny do klonovacího vektoru za vzniku rekombinantní molekuly DNA a následné pomnožení těchto molekul v hostitelské buňce (*in vivo*) (Šmarda et al., 2005).

Hlavními oblastmi využití jsou analýzy genomu organismů, izolace genů a jejich studium. Přínos spočívá zejména v namnožení izolovaných úseků DNA a jejich zpřístupnění ke studiu dalšími metodami (Šmarda et al., 2005; Beránek, 2016).

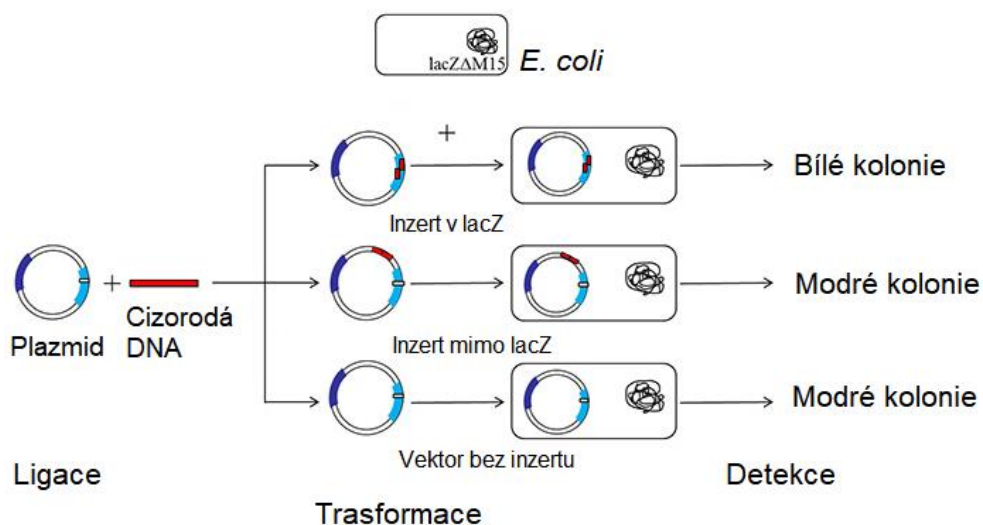
Výchozí molekulou pro molekulární klonování je fragment nukleové kyseliny obvykle o velikosti do několika kbp. Fragment (insert) je vložen do vybraného klonovacího vektoru v místě označovaném jako mnohočetné klonovací místo (MCS), které obsahuje několik restričních míst pro restriční endonukleázy. Jako klonovací vektory se používají plazmidy (obr. 1.7), bakteriofágy nebo umělé kvasinkové či bakteriální chromozomy. Vzniklá rekombinantní molekula je přenesena do hostitelské buňky (transformace), kterou bývá nejčastěji *Escherichia coli* (Šmarda et al., 2005; Beránek, 2016).



Obrázek 1.7: Struktura plazmidu. AmpR – gen rezistence k ampicilinu (selekční marker), MCS – mnohočetné klonovací místo, lacZ - gen kódující β -galaktosidázu. Převzato a upraveno z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/blue-white-screening.html> (sigmaaldrich.com, 2021).

Po transformaci jsou buňky *E. coli* kultivovány na selektivních médiích s přidavkem širokospektrých antibiotik, aby byl zajištěn růst pouze kolonií, jimž poskytla rezistenci právě rekombinantní molekula. Selektivní médium obsahuje kromě antibiotik také chromogenní substrát X-gal, jehož rozkladem vzniká produkt, který obarví bakteriální kolonie modře (Beránek, 2016).

Pro důkaz úspěšného zaklonování se používá nejčastěji tzv. modro-bílá selekce, která spočívá v produkci enzymu β -galaktosidázy bakteriemi *E. coli*. Produkce tohoto enzymu je řízena genem *lacZ*, jehož struktura může být vnesením fragmentu narušena. Pokud je *lacZ* gen narušen, není produkována funkční β -galaktosidáza. Nefunkční enzym tak není schopen metabolizovat substrát X-gal přítomný v médiu a kolonie, které obsahují vektor se zaklonovaným fragmentem, zůstávají bezbarvé (obr. 1.8) (Padmanabham et al., 2011).



Obrázek 1.8: Modro-bílá selekce. Znázorněny jsou všechny možné výstupy, pro další práci s vektory jsou selektovány bílé kolonie, tedy kolonie, které obsahují vektor se zaklonovaným fragmentem. Převzato a upraveno z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/blue-white-screening.html> (sigmaaldrich.com, 2021).

Kolonie obsahující vektor se zaklonovaným fragmentem jsou přeneseny do tekutého média a kultivovány. Z kultury je následně izolována plazmidová DNA, která obsahuje vložený inzert a může být dále zpracována, například pro sekvenování (Beránek, 2016).

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC – z anglického high-performance liquid chromatography) je separační metodou. Její podstata spočívá v distribuci složek směsi mezi dvěma fázemi – mobilní a stacionární, kdy vlastní separační proces závisí na různé míře interakce dělených látek s těmito fázemi (Káš et al., 2005).

Mobilní fázi je v případě HPLC rozpouštědlo, které unáší rozpuštěný vzorek kolonou, stacionární fázi tvoří polymerní sorbent, který je náplní chromatografické kolony. Vzorek je pod vysokým tlakem unášen kolonou a rozdělené látky jsou detekovány na výstupu kolony pomocí detektoru, kterým bývá hmotnostní spektrometr, detektor s diodovým polem nebo spektrofotometrický detektor (UV-VIS) (Hirt et al., 2016; Kopecká a Svobodová, 2019).

Pro každý analyt je charakteristický tzv. retenční čas, což je doba, kterou analyt stráví v separační koloně od doby nástřiku vzorku po detekci látky na výstupu. Látka, která nemá afinitu ke stacionární fázi a kolonou projde rozpuštěna ve fázi mobilní má tzv. mrtvý retenční čas (Káš et al., 2005; Kopecká a Svobodová, 2019).

Výsledkem analýzy je chromatogram, v němž každému analytu přísluší jeden chromatografický pík v určitém retenčním čase (osa x) s určitou intenzitou – množství separované látky (osa Y). Metodu lze aplikovat jako kvalitativní i kvantitativní (Kopecká a Svobodová, 2019).

2. Hypotézy a cíle práce

2.1. Hypotézy

Na základě studia literatury byly pro zpracování diplomové práce postaveny tyto hypotézy:

- Je možné pomocí kultivačních technik izolovat kvasinky rodu *Zygosaccharomyces* z pylu, pylových rousků a včelích larev?
- Lze pro identifikaci izolátů kvasinek využít molekulární analýzu úseků ITS a D1/D2, úseků genu pro velkou podjednotku rRNA?

2.2. Cíle práce

Diplomová práce je zaměřena na symbiotické mikroorganismy asociované se včelou medonosnou. Zpracování literární rešerše si proto klade za cíl podání přehledu o symbiotických mikroorganismech asociovaných se včelou medonosnou, vyskytující se ve včelí potravě, larvách i dospělých a poukázání na jejich význam.

Cíle diplomové práce jsou:

- Izolace a kultivace kvasinek rodu *Zygosaccharomyces* z pylu, pylových rousků a včelích larev.
- Získané čisté izoláty charakterizovat pomocí morfologických a molekulárních charakteristik.
- Získané výsledky zpracovat ve formě tabulek a zhodnotit v diskusi v konfrontaci s literárními údaji.

3. Metodika

3.1. Soubor vzorků a jejich příprava

Soubor vzorků byl tvořen dvaceti vzorky kvasinek *Zygosaccharomyces*. Sedmnáct vzorků bylo izolováno ze střev larev, dva vzorky pocházely z rousků a jeden vzorek z pylu. Odběr vzorků ze včelstev a izolace kvasinek byla provedena v průběhu roku 2019 a 2020. Během experimentu byly kvasinky uchovávány na šikmých agarech (médium 30% glukóza) v chladničce při 4 °C.

3.1.1. Kultivační média

V průběhu práce bylo využito několik kultivačních médií. Jejich seznam a použité chemikálie jsou uvedeny v tabulce 3.1.

Tabulka 3.1: Seznam použitých kultivačních médií.

30% glukóza (30G); pH 6,0

Chemikálie	Množství [g/l H₂O]
Glukóza	300 g
Yeast extract	30 g
Malt extract	30 g
Agar	20 g

YPD; pH 6,2

Peptone	20 g
Yeast extract	10 g
Glukóza	20 g
Agar	15 g

YMA, pH 6,2

Yeast extract	3 g
Malt extract	3 g
Glukóza	10 g
Peptone	5 g
Agar	20 g

Média byla připravena rozpuštěním navážky chemikálií v destilované vodě a úpravou pH na požadovanou hodnotu. K úpravě pH byla použita 1M kyselina chlorovodíková a 2M hydroxid sodný. Roztok byl následně sterilizován v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

Pro přípravu kultivační půdy na Petriho miskách bylo použito 20 ml média, pro přípravu šikmých agarů 8 ml média. Médium bylo naléváno asepticky v laminárním boxu do sterilního skla, které bylo předem sterilizováno v sušárně při 150 °C po dobu 2 hodin.

Tekutá média byla připravena ze stejných chemikálií s výjimkou agaru, který byl pro povahu média vynechán. Na jednu Erlenmeyerovu baňku bylo připraveno 50 ml média. Baňky byly sterilizovány v autoklávu až po přípravě média.

3.1.2. Izolace kvasinek

Vypreparovaná střeva larev včely medonosné byla homogenizována ve fyziologickém roztoku (0,9% NaCl) + 1% Tween 80 a rozprostřena po agarové plotně pomocí jednorázové mikrobiologické hokejky. Jako selektivní médium pro růst *Zygosaccharomyces* bylo zvoleno médium 30G (30% glukóza) a 50G (50% glukóza). Složení média 50G je totožné se složením média 30G (tab. 3.1), pouze se zvýšenou koncentrací glukózy (500 g glukózy / 1000 ml H₂O).

Vzorky pylu a rousků byly taktéž homogenizovány v malém množství fyziologickém roztoku + 1% Tween 80 a rozprostřeny na médiu 30G a 50G obdobným způsobem. Veškerá kultivační práce byla prováděna v laminárním boxu. Misky s médii byly následně inkubovány při 28 °C v termostatu a pravidelně sledovány do viditelného růstu mikroorganismů.

Narostlé kolonie byly následně přeočkovány sterilní inokulační kličkou podle rozdílů ve své morfologii na nová média 30G a opět inkubována za stejných podmínek. Takto bylo postupně získáno dvacet kolonií, které byly dále zpracovány jako výchozí vzorky pro morfologickou a molekulární charakterizaci.

Pro uchování kolonií pro další použití byly kvasinky očkované na šikmá média 30% glukózy v duplikátu. Malé množství kultury bylo odebráno inokulační kličkou z pevných agarových ploten a vlnovkou nanášeno do zkumavek s šikmým agarem. Takto naočkované zkumavky byly inkubovány 5 dní při 28 °C v termostatu. Narostlé kolonie byly uchovány při 4 °C v chladničce.

3.2. Morfologická charakterizace

Kolonie byly rozděleny do skupin na základě své makroskopické podobnosti a vybraní zástupci byly makroskopicky popsáni na médiu YMA a 30G. Schopnost diferenciaci různých mikroorganismů na odlišných typech médií se může lišit podle toho, zda daný mikroorganismus čerpá živiny z média a roste, nebo podle morfologických zvláštností, které na daném typu média vykazuje.

Z tohoto důvodu bylo pro popis kvasinek izolovaných ze střev a pylu vybráno médium YMA, na kterém byly lépe viditelné rozdíly mezi vybranými koloniemi.

Pro popis kvasinek izolovaných ze včelích rousků bylo použito pouze médium 30G, protože tyto kvasinky na médiu YMA nerostly.

Média byla připravena standardním postupem na Petriho misky. Vybrané kolonie byly očkované na plotnu inokulační kličkou z dříve naočkovaných agarových ploten. Kolonie byly inkubovány při 28 °C po dobu 5 dní, kdy byly pátý den morfologicky popsány a vyfoceny.

Vzhled popsaných kolonií byl zaznamenán snímacím zařízením OPTIKAM B5 (4086.B5) a příslušným softwarovým vybavením.

3.2.1. Parametry pro morfologickou charakterizaci

Kolonie byly popsány podle doporučení ze základní taxonomické práce Kurtzman et al. (2011). Schéma popisu je uvedeno v tabulce 3.2 a vychází z této práce.

Tabulka 3.2: Kritéria pro popis kvasinek na pevném médiu. Převzato a upraveno z: Kurtzman et al. (2011).

Kritérium	Hodnocení
Textura	Mukoidní, tekutá, viskózní, máslovitá, drolivá, membranózní
Barva	Bílá až krémová, výrazná – žlutá, oranžová, červená, a další
Povrch	Lesklý, matný, hladký, drsný, rýhovitý, celistvý
Elevace	Nízká, vyklenutá, kónická
Okraj	Celistvý, zvlněný, laločnatý, nepravidelný

3.3. Molekulární charakterizace

3.3.1. Izolace DNA

Pro izolaci DNA z kvasinek byl použit protokol dle Harju et al. (2004), který navrhl jednoduchou, rychlou a efektivní metodu izolace DNA. Tato metoda je rovněž méně ekonomicky náročná, protože nevyžaduje použití skleněných kuliček nebo speciálních enzymů.

Postup izolace DNA dle Harju et al. (2004)

Prvním krokem izolace byla příprava kvasinkové kultury, která sloužila jako výchozí materiál pro izolaci DNA. Pro tyto účely bylo malé množství kvasinkové kultury, která byla kultivována na běžně používaném médiu, přeneseno do Eppendorf zkumavek obsahujících 1,5 ml YPD média. V Eppendorf zkumavkách byly kvasinky kultivovány po dobu 20 hodin při 30 °C za neustálého třepání.

Pro další část izolace byl mezitím připraven lyzační pufr [(2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0)] s následnou sterilizací v autoklávu.

Buněčná kultura v Eppendorf zkumavkách byla po uplynutí doby kultivace stočena v centrifuze při 10 000 rpm po dobu 5 minut. Vzniklý pelet byl rozpuštěn v 200 μ l lyzačního pufru a umístěn na 10 minut do mrazáku při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po úplném zamrznutí byl roztok přemístěn do předehřáté vodní lázně na teplotu $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ na 1 minutu pro šokové roztátí. Postup byl ještě jednou zopakován.

Následně byly zkumavky vortexovány 30 sekund, k roztoku bylo přidáno 200 μ l chloroformu a zkumavky byly opět 2 minuty vortexovány. Směs byla centrifugována při 14 000 rpm 3 minuty, aby došlo k oddělení jednotlivých vrstev. Vodní vrstva byla přenesena do nových zkumavek obsahujících 400 μ l ledového 96% etanolu a směs byla 5 minut inkubována při pokojové teplotě. Následující centrifugace při 14 000 rpm 5 minut způsobila usazení peletu DNA na dně zkumavky.

Supernatant byl ze zkumavky odstraněn vylitím a pelet byl promyt 70% etanolem v množství 0,5 ml. Zbývající etanol byl opět odstraněn a pelet byl vysušen ve vakuové odparce při $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 minut. DNA byla rozpuštěna v 20 μ l TE pufru [10 mM Tris, 1 mM EDTA (pH 8,0)] a uchovávána v mrazáku při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Měření koncentrace

Koncentrace vyizolované DNA byla změřena na přístroji BioSpec-nano (Shimadzu). Tento přístroj měří na principu spektrofotometrie, kdy je při absorbanci 260 nm měřena koncentrace DNA a při absorbanci 280 nm její čistota, tj. přítomnost proteinů.

Jako slepý vzorek byl použit identický TE pufr, ve kterém byla DNA rozpuštěna a uchovávána. Na destičku přístroje bylo následně umístěno 1,5 μ l DNA a po změření přístrojem byla koncentrace vyhodnocena přidruženým softwarovým programem (Shimadzu).

Z důvodu vysokých koncentrací vyizolované DNA byla před PCR reakcí DNA každého vzorku naředěna na jednotnou koncentraci 50 ng/ μ l v TE pufru.

3.3.2. PCR

Pro sekvenování, které slouží k molekulární charakterizaci kvasinek v této diplomové práci, je nezbytným prvním krokem PRC reakce. Pro účely charakterizace byly vybrány dva úseky DNA v genomu kvasinek, které slouží k jejich identifikaci. Prvním byl úsek ITS, který obsahuje úseky ITS1 a ITS2 a ohraničují ho primery ITS1 (forward) a ITS 4 (reverse). Druhým vybraným úsekem byl úsek D1/D2, který je ohraničen primery NL1 (forward) a NL4 (reverse). Sekvence primerů jsou uvedeny v tabulce 3.3.

Tabulka 3.3: Sekvence použitých primerů.

Označení	Sekvence	Zdroj
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	White et al., 1990
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	White et al., 1990
NL1	5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'	Kurtzman a Robnett, 1997
NL4	5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'	Kurtzman a Robnett, 1997

Gradient PCR

Pro zjištění optimální teploty annealingu, při které probíhá nasedání primerů na cílový úsek bez vzniku dalších, interferujících produktů, byla provedena Gradient PCR. Tato modifikace PCR reakce umožňuje zjistit optimální teplotu nasedání primerů tím, že v každé zkumavce probíhá reakce při jiné teplotě, obvykle v rozmezí 45–65 °C a reakce je provedena pouze s jedním vzorkem. Reakce byla provedena v celkovém objemu 10 µl a její složení je uvedeno v tabulce 3.4. Reakční protokol je poté uveden v tabulce 3.5. Součástí přípravy byla rovněž negativní kontrola připravena za stejných podmínek, nicméně obsahující místo DNA čistou H₂O.

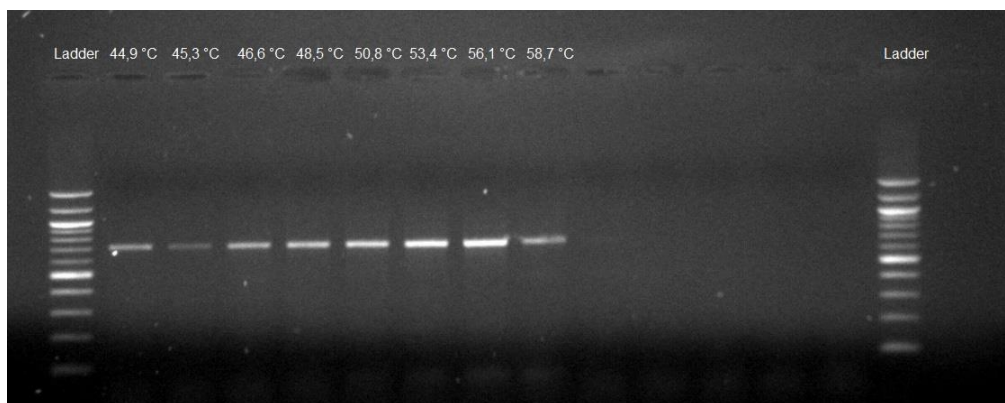
Tabulka 3.4: Složení PCR reakce pro Gradient PCR.

Reagencie	Objem
Master mix (Gotaq [®] Green Master Mix (Promega))	5 µl
H ₂ O	3 µl
Primer forward (10 pmol/µl)	0,5 µl
Primer reverse (10 pmol/µl)	0,5 µl
DNA (50 ng/µl)	1 µl
Celkem	10 µl

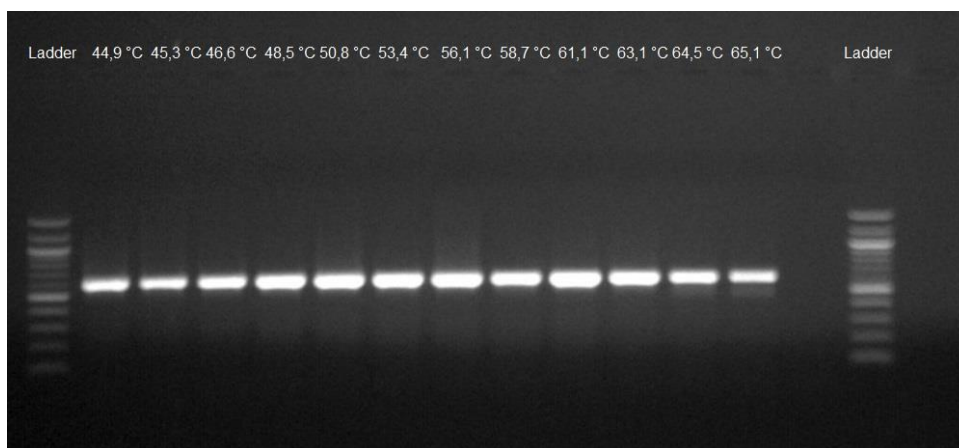
Tabulka 3.5: Reakční protokol pro Gradient PCR.

		Čas	Teplota
1 cyklus	Počáteční denaturace	5 min	95 °C
30 cyklů	Denaturace	45 s	95 °C
	Annealing	30 s	45–65 °C
	Extenze	1 min	72 °C
1 cyklus	Terminální extenze	7 min	72 °C
	Chlazení	∞	4 °C

Produkty byly vizualizovány elektroforeticky na 1% agarózovém gelu (obr. 3.1 a 3.2). Postup přípravy pro elektroforetickou separaci je uveden v kapitole níže.



Obrázek 3.1: Vizualizace Gradient PCR – optimalizace teploty annealingu primerů pro úsek ITS na 1% agarózovém gelu; rozmezí teplot v jednotlivých jamkách 45–65 °C.



Obrázek 3.2: Vizualizace Gradient PCR – optimalizace teploty annealingu primerů pro úsek D1/D2 na 1% agarózovém gelu; rozmezí teplot v jednotlivých jamkách 45–65 °C.

PCR reakce pro vybrané úseky

Po zjištění optimální teploty annealingu bylo pro oba páry primerů navrženo reakční schéma PCR reakce. Složení PCR reakce je uvedeno v tabulce 3.6, reakční protokol pro úsek ITS je uveden v tabulce 3.7 a reakční schéma pro úsek D1/D2 uvádí tabulka 3.8. Součástí obou reakcí byla také negativní kontrola.

Tabulka 3.6: Složení PCR reakce.

Reagencie	Objem
Master mix (Gotaq® Green Master Mix (Promega))	10 µl
H ₂ O	6 µl
Primer forward (10 pmol/µl)	1 µl
Primer reverse (10 pmol/µl)	1 µl
DNA (50 ng/µl)	2 µl
Celkem	20 µl

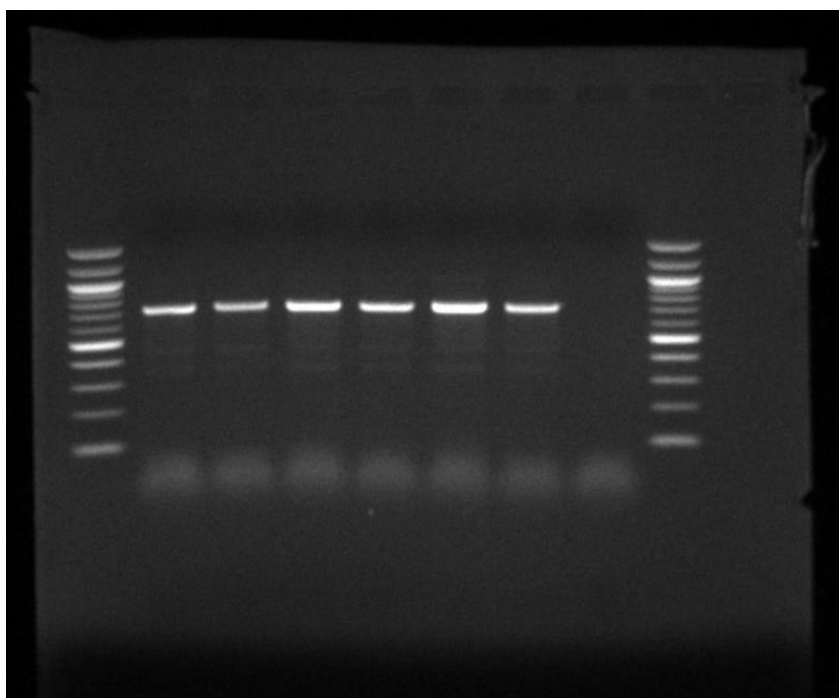
Tabulka 3.7: Reakční protokol pro úsek ITS.

		Čas	Teplota
1 cyklus	Počáteční denaturace	5 min	95 °C
30 cyklů	Denaturace	45 s	95 °C
	Annealing	45 s	53 °C
	Extenze	1 min	72 °C
1 cyklus	Terminální extenze	7 min	72 °C
	Chlazení	∞	4 °C

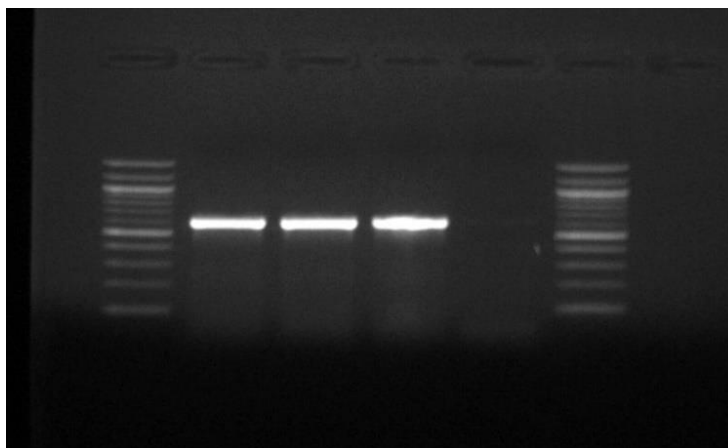
Tabulka 3.8: Reakční protokol pro úsek D1/D2.

		Čas	Teplota
1 cyklus	Počáteční denaturace	3 min	94 °C
30 cyklů	Denaturace	1 min	94 °C
	Annealing	1 min	58,5 °C
	Extenze	1 min	72 °C
1 cyklus	Terminální extenze	5 min	72 °C
	Chlazení	∞	4 °C

PCR produkty byly opět vizualizovány elektroforeticky na 1% agarózovém gelu (obr. 3.3 pro úsek ITS a obr. 3.4 pro úsek D1/D2)



Obrázek 3.3: PCR produkty úseku ITS o velikosti cca 700 bp.



Obrázek 3.4: PCR produkty úseku D1/D2 o velikosti cca 600 bp.

3.3.3. Elektroforéza na gelu

K vizualizaci všech PCR produktů byl použit 1% agarózový gel (1 g agarózy ve 100 ml pufru TBE) s použitím ethidium bromidu jako interkalačního činidla (7 μ l ve 100 ml). Agaróza byla rozpuštěna v požadovaném objemu pufru v mikrovlnné troubě, zchlazena, následně byl přidán ethidium bromid a po promíchání byl roztok nalit do elektroforetické vany s hřebínky.

Po ztuhnutí gelu bylo do každé kolonky napipetováno 10 μ l PCR produktu a 5 μ l 100 bp DNA ladderu jako velikostního markeru. Elektroforetická separace probíhala při 70 V 5 minut a při 120 V 40 minut.

Po separaci byla přítomnost produktů vizualizována pod UV světlem snímacího kamerového systému InGenius3 (Syngene) za využití přidruženého programu GeneSys (Syngene).

3.3.4. Sekvenování

PCR produkty vzorků určených k sekvenaci bylo nutné nejdříve přečistit od pozůstatků primerů a nukleotidů, které by mohly interferovat probíhající sekvenování. Následně byly vzorky sekvenovány externí firmou Seqme, s.r.o., která zajišťuje sekvenaci vzorků metodou podle Sangera.

Přečištění PCR produktů pomocí ExoSAP-ITTM (PCR Product Cleanup Reagent)

K 10 μ l PCR produktu bylo přidáno 2 μ l ExoSAP-ITTM. Následně reakce probíhala v termocykleru podle schématu uvedeného v tabulce 3.9.

Tabulka 3.9: Protokol pro přečištění PCR produktů pomocí ExoSAP-ITTM.

Teplota	Čas	Popis
37 °C	40 min	Degradace nukleotidů a primerů
80 °C	15 min	Inaktivace ExoSAP-IT TM

Příprava vzorku před sekvenováním

Před odesláním vzorků k sekvenování byla nutná jejich příprava. Složky, které tvořily finální produkt, jsou uvedeny v tabulce 3.10.

Tabulka 3.10: Složení vzorku před sekvenováním.

Složka	Množství
Přečištěný PCR produkt	5,5 μ l
H ₂ O	2 μ l
Primer – forward nebo reverse (10 pmol/ μ l)	2,5 μ l
Celkem	10 μl

Pro sekvenaci úseku ITS byly použity primery forward i reverse, nicméně výsledky reakce nebyly uspokojivé. Z tohoto důvodu byly navrženy nové primery nacházející se uvnitř této oblasti.

Pro sekvenaci úseku D1/D2 byly taktéž nejdříve použity oba primery. Pro uspokojivé chromatogramy získané z obou primerů byl pro identifikaci kvasinek následně vybrán a použit pouze primer forward (NL1).

Vyhodnocení a zpracování sekvencí

Získané sekvence byly zpracovány v programu Geneious 8.1.9 (<https://www.geneious.com>). Po úpravě sekvence byl exportovaný soubor vložen do nástroje BLAST[®] (Basic Local Alignment Search Tool). BLAST[®] slouží k porovnání (aligmentu) neznámých sekvencí se sekvencemi uloženými v databázi NCBI a umožňuje tak identifikaci sekvence vložené uživatelem.

3.4. Návrh primerů a optimalizace metody PCR

Sekvenace úseku ITS u vybraných vzorků vedla ke vzniku nečitelných chromatogramů a nebylo tak možné přesně identifikovat kvasinky na základě jejich sekvence DNA.

Z tohoto důvodu byl v první řadě úsek ITS zaklonován do plazmidů tak, aby každý plazmid obsahoval pouze jednu kopii ITS úseku a následně byla vyizolovaná plazmidová DNA osekvenována s univerzálními primery. Nejenže bylo po úspěšném zaklonování možné na základě sekvence DNA identifikovat druh kvasinky, ale získané sekvence nadále posloužily k návrhu specifických primerů.

3.4.1. PCR Klonování

Výchozím produktem pro klonování byl PCR produkt získaný podle reakčního protokolu pro ITS úsek popsany v tabulkách 3.6 a 3.7.

Elektroforéza na gelu

PCR produkty byly vizualizovány elektroforeticky na 1,5% agarózovém gelu (1,5 g agarózy ve 100 ml TBE pufru) s použitím ethidium bromidu jako interkalačního činidla (7 μ l na 100 ml). Do kolonek v gelu bylo pipetováno 5 μ l 100 bp DNA ladderu a 20 μ l PCR produktu. Separace probíhala 5 minut při 70 V a 1 hodinu a 20 minut při 120 V.

Izolace PCR produktu z gelu

Získané proužky byly vyříznuty z gelu pod UV světlem za použití skalpelu a zváženy na předvážkách. PCR produkt byl z gelu izolován pomocí kitu Nucleospin® gel and PCR clean-up (Macherey-Nagel). Extrakce PCR produktu z gelu je efektivním způsobem přečištění produktu od nežádoucích příměsí.

Vyříznutý bloček gelu byl přenesen do čisté Eppendorf zkumavky a bylo k němu přidáno 200 μ l NTI pufru/100 mg gelu. Směs byla inkubována při 50 °C po dobu 10 minut a průběžně vortexována do úplného rozpuštění gelu. Kolonka, která je součástí kitu, byla mezitím umístěna do sběrné zkumavky o objemu 2 ml. Následně byla inkubovaná směs přenesena na kolonku a centrifugována 30 s při 10 000 rpm. Roztok, který se přes membránu dostal do sběrné zkumavky, byl odstraněn. Na kolonku bylo přidáno 700 μ l NT3 pufru a následovala opět centrifugace za stejných podmínek. Roztok ze sběrné zkumavky byl odstraněn a tento krok byl ještě jednou zopakován.

Pro dokonalé odstranění pufru z membrány byla provedena další centrifugace při 10 000 rpm po dobu 1 minuty. Kolonky byly dále inkubovány při 70 °C 5 minut pro odstranění přebytečného etanolu a umístěny do nové Eppendorf zkumavky. V posledním kroku bylo na membránu nanášeno 20 μ l NE pufru a finální inkubace trvala 1 minutu při pokojové teplotě. Zkumavka byla centrifugována 1 minutu při 10 000 rpm a kolonka byla po centrifugaci odstraněna. Přečištěný PCR produkt byl připraven k dalšímu postupu v Eppendorf zkumavce.

Vlastní klonování

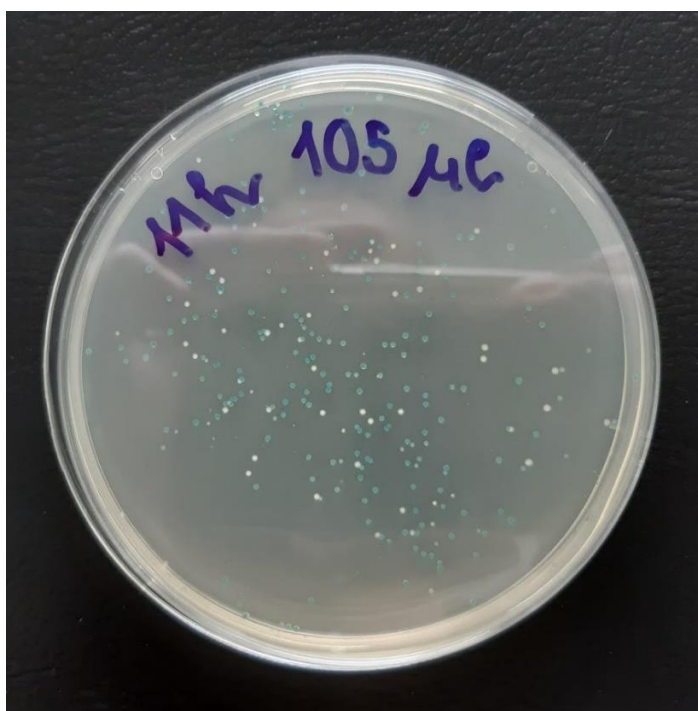
Do nových Eppendorf zkumavek bylo napipetováno 2 μ l přečištěného PCR produktu, 0,5 μ l salt solution a 0,5 μ l TOPO vektoru. Zkumavky byly inkubovány 20 minut při pokojové teplotě. Z těchto zkumavek byly odebrány 2 μ l směsi a vloženy do buněk *E. coli* s následnou inkubací na ledu po dobu 30 minut.

Po inkubaci na ledu následovala šoková změna teploty při 42 °C po dobu 30 sekund a opětovné umístění na led. Ke směsi bylo přidáno 250 µl SOC media pokojové teploty a zkumavky byly třepány 1 hodinu při 37 °C.

Během třepání zkumavek bylo připraveno selektivní médium LB s přidavkem ampicilinu, XGal a IPTG (Invitrogen). Médium bylo připraveno dle pokynů výrobce, tedy rozpuštěním v požadovaném objemu destilované vody a zahřátím v mikrovlnné troubě. Na každou Petriho misku bylo nalito zhruba 20 ml média.

Po hodinové inkubaci byl obsah zkumavek rozdělen v různých poměrech na misky s médiem a rovnoměrně rozprostřen pomocí laboratorní hokejky. Misky byly následně inkubovány přes noc při 37 °C.

Následující den byly misky umístěny do lednice při -4 °C. Po 6 hodinách byly patrné rozdíly mezi produkty, které se do vektoru zaklonovaly – bílá kolonie, nebo nikoliv – modrá kolonie (obr. 3.5).



Obrázek 3.5: PCR klonování: modro-bílá selekce, bílé kolonie nesoucí plazmidy s inzertem, modré kolonie obsahují plazmid bez inzertu.

Bílé kolonie, které jsou pro další postup žádoucí, byly vypíchnuty pomocí párátko a vloženy do 3 ml předem připraveného tekutého LB média s přidavkem ampicilinu (Invitrogen). Vybráno bylo několik kolonií z misek s různým ředěním. Zkumavky s obsahem média byly třepány při 37 °C přes noc.

Izolace plazmidové DNA

Přes noc došlo k nárůstu biomasy. Pro následnou izolaci plazmidové DNA bylo vybráno deset zkumavek. Izolace bylo provedena kitem Roti[®] – Prep Plasmid Mini (Roth) a při izolaci bylo postupování podle návodu výrobce.

Buněčná suspenze byla centrifugována 20 sekund při 10 000 rpm a následně byl odstraněn supernatant a zbývající médium. Pelet byl resuspendován v 300 µl lyzačního pufru. Ke směsi bylo přidáno 300 µl neutralizačního pufru obsahujícího RNAázu A a obsah byl promíchán převrácením zkumavek. Následně byly zkumavky centrifugovány při 10 000 rpm po dobu 5 minut.

Rotační kolonka byla umístěna do sběrné zkumavky, na membránu kolonky bylo nanášeno 100 µl aktivačního pufru a zkumavka byla centrifugována při 9 000 rpm po dobu 30 sekund. Roztok byl ze sběrné zkumavky odstraněn.

Na kolonku byl aplikován veškerý supernatant z předchozího kroku a následovala centrifugace 30 sekund při 9 000 rpm. Roztok byl ze sběrné zkumavky odstraněn a sběrná zkumavka byla vrácena ke kolonce. Na membránu kolonky bylo aplikováno 500 µl promývacího pufru a zkumavka byla centrifugována za stejných podmínek. Promývací krok byl zopakován se 700 µl promývacího pufru.

Pro odstranění zbývajícího etanolu byly zkumavky centrifugovány znovu, 1 minutu při 9 000 rpm. Kolonky byly následně umístěny do nových zkumavek a na membránu bylo nanášeno 30 µl elučního pufru. Po inkubaci trvající 1 minutu byly kolonky centrifugovány 1 minutu při 9 000 rpm a odstraněny. Plazmidová DNA byla eluována ve zkumavkách.

Sekvenování a vyhodnocení

Sekvenování bylo zajištěno externí firmou Seqme, s.r.o. Pro sekvenování bylo zasláno 5 µl plazmidové DNA získané izolací v předchozím kroku a k sekvenování byly použity univerzální primery M13F a M13R (tabulka 3.11). Vzorky byly sekvenovány oběma primery.

Tabulka 3.11: Sekvence univerzálních primerů použitých k sekvenování plazmidů.

Název primeru	Sekvence
M13F	5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'
M13R	5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'

Získané sekvence byly zpracovány v programu Geneious 8.1.9 (<https://www.geneious.com>). Po úpravě sekvence byl exportovaný soubor vložen do nástroje BLAST[®] pro identifikaci druhu kvasinek.

3.4.2. Návrh primerů

Vybrané kvalitní sekvence posloužily jako templát pro návrh primerů. Nejprve byl z vybraných sekvencí vytvořen alignment sekvencí v programu Geneious 8.1.9 a následně byly navrženy čtyři páry primerů v programu Primer3. Specifita navržených primerů byla ověřena nástrojem Primer-BLAST. Primery byly dodány firmou Macrogen.

3.4.3. Optimalizace metody PCR

S novými primery byla nejdříve provedena Gradient PCR pro zjištění optimální teploty annealingu primerů. Postup, reakční schéma i složení reakční směsi bylo identické jako v kapitole 3.3.2. Produkty byly vizualizovány na 1% agarózovém gelu za stejných podmínek popsaných v kapitole 3.3.3.

Na základě výsledku elektroforetických gelů bylo navrženo reakční schéma PCR reakce u každého páru primerů. PCR reakce proběhla se všemi vzorky a podle výsledků byla ještě v některých případech dodatečně upravena.

Sekvence primerů a reakční schémata jsou uvedeny v kapitole výsledků. Složení reakce je uvedeno výše v tabulce 3.6 a je identické pro všechny PCR reakce.

3.4.4. Sekvenování

Zpracování vzorků pro sekvenování s nově navrženými primery i vyhodnocení sekvencí je identické jako v kapitole 3.3.4.

3.5. Měření koncentrace ergosterolu metodou HPLC

Kvasinky jsou pro larvy přínosným zdrojem ergosterolu. Pro jejich význam bylo stanovení produkce ergosterolu součástí této diplomové práce. Koncentrace ergosterolu v kvasinkách byla změřena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie, která je účinnou metodou pro měření těchto metabolitů.

Současně s ergosterolem byla metoda navržena také pro další metabolity, 24-methylencholesterol a cholesterol. Podrobnější informace o významu ergosterolu a úloze těchto metabolitů v metabolické dráze včel byly uvedeny v teoretické části této diplomové práce.

3.5.1. Příprava vzorku

Vzorek kvasinek byl připraven do podoby suché biomasy, aby bylo možné sledované látky lépe extrahovat. Vzorky byly nejprve připraveny submerzní kultivací, tedy kultivací kvasinek do tekutého kultivačního média. Pro kultivaci bylo použito 50 ml média 30G v Erlenmeyerově baňce.

Do připravených baňek s médiem bylo naočkováno malé množství kvasinek z dříve narostlých pevných půd. Naočkované baňky byly kultivovány při 30 °C po dobu 48 hodin za nepřetržitého třepání.

Po uplynutí doby kultivace byl obsah baňek přenesen do zkumavek určených k centrifugaci a centrifugován 10 minut při 4 000 rpm. Supernatant byl odstraněn a biomasa byla přenesena na hliníkové misky. Misky byly zváženy na analytických vahách a následně umístěny do sušárny na 6 hodin při 105 °C.

Po vysušení byla suchá biomasa včetně hliníkových misek zvážena, přenesena do nových zkumavek, jemně rozmělněna a přelita 10 ml metanolu. Zkumavky byly umístěny do ultrazvukového sonikátoru a sonikovány 20 minut. Následně byly zkumavky ponechány přes noc při pokojové teplotě a následující den byl extrakt slit a použit pro analýzu.

3.5.2. Průběh analýzy

V první řadě byla připravena kalibrační křivka. Standardy sledovaných metabolitů – cholesterol, 24-methylencholesterol a ergosterol byly připraveny v koncentracích 0,01; 0,05; 0,1 a 0,5 mg/ml v metanolu. Připravená kalibrační řada byla změřena HPLC analyzátozem (Shimadzu, Nexera series) za následujících podmínek: typ kolony C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm; složení mobilní fáze a) H₃PO₄, pH 3 b) metanol, v poměru a:b = 1:99 izokraticky; průtok 1 ml/min; injection volume (nápich) 10 µl a run time (celkový čas analýzy) 20 minut. Detekce všech metabolitů probíhala při vlnové délce 210 nm UV-VIS detektorem.

Kalibrační křivka byla vyhodnocena v programu LabSolutions (Shimadzu). Extrakty z kvasinkové biomasy byly změřeny za stejných podmínek.

4. Výsledky

Cílem této diplomové práce bylo izolovat a charakterizovat kvasinky druhu *Zygosaccharomyces* asociovaných se včelami na základě morfologické a molekulární charakterizace.

4.1. Izolace a kultivace kvasinek

Vzorky pylu, rousků a vypreparovaná střeva larev včely medonosné byla homogenizována ve fyziologickém roztoku a kultivována na médiu 30G a 50G. Kolonie, které na médiu vyrostly, byly přeočkovány na nová média 30G a tímto postupem bylo získáno dvacet kmenů, které byly dále zpracovány jako výchozí vzorky pro morfologickou a molekulární charakterizaci.

Soubor získaných vzorků tvořilo dvacet kmenů kvasinek *Zygosaccharomyces*, které byly druhově identifikovány na základě sekvenace specifických úseků DNA. Vzorky byly různého původu, některé byly izolovány ze střev larev včely medonosné, jiné z rousků či pylu. Shrnutí původu vzorků a druh určený na základě sekvenace úseku D1/D2 je v tabulce 4.1.

Tabulka 4.1: Seznam vzorků, jejich původ a druh určený na základě molekulární charakterizace.

Č. vzorku	Původ	Druh	Č. vzorku	Původ	Druh
1	střevo	<i>Z. rouxii</i>	11	střevo	<i>Z. rouxii</i>
2	střevo	<i>Z. rouxii</i>	12	střevo	<i>Z. rouxii</i>
3	střevo	<i>Z. rouxii</i>	13	střevo	<i>Z. rouxii</i>
4	střevo	<i>Z. rouxii</i>	14	střevo	<i>Z. rouxii</i>
5	střevo	<i>Z. rouxii</i>	15	střevo	<i>Z. rouxii</i>
6	střevo	<i>Z. rouxii</i>	16	střevo	<i>Z. rouxii</i>
7	střevo	<i>Z. rouxii</i>	17	střevo	<i>Z. rouxii</i>
8	střevo	<i>Z. rouxii</i>	18	rouscky	<i>Z. favi</i>
9	střevo	<i>Z. rouxii</i>	19	rouscky	<i>Z. favi</i>
10	střevo	<i>Z. rouxii</i>	20	pyl	<i>Z. mellis</i>

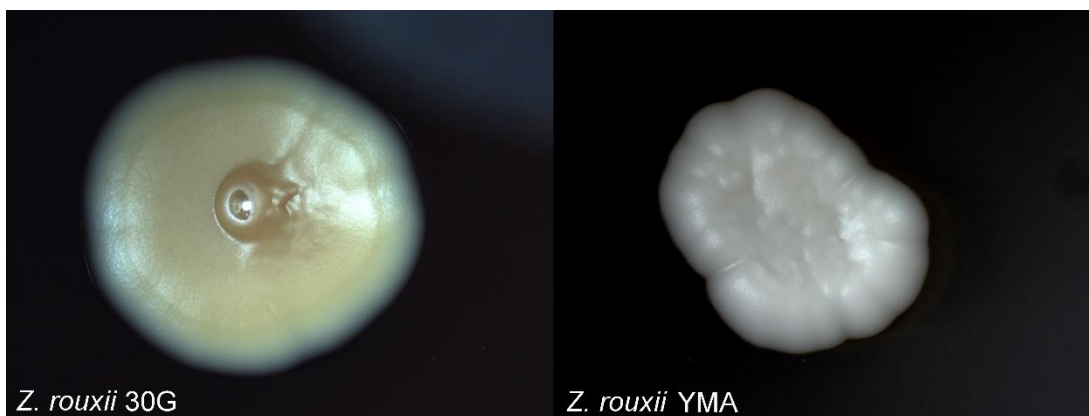
4.2. Morfologická charakterizace

Pro morfologickou charakterizaci byly kvasinky rozděleny do skupin podle charakteru růstu na pevném médiu a také podle toho, o jaký druh kvasinky se jednalo na základě molekulární charakterizace. U vybraných zástupců byl popsán charakter růstu na pevném médiu dle doporučených kritérií z publikace Kurtzman et al. (2011).

4.2.1. *Zygosaccharomyces rouxii*

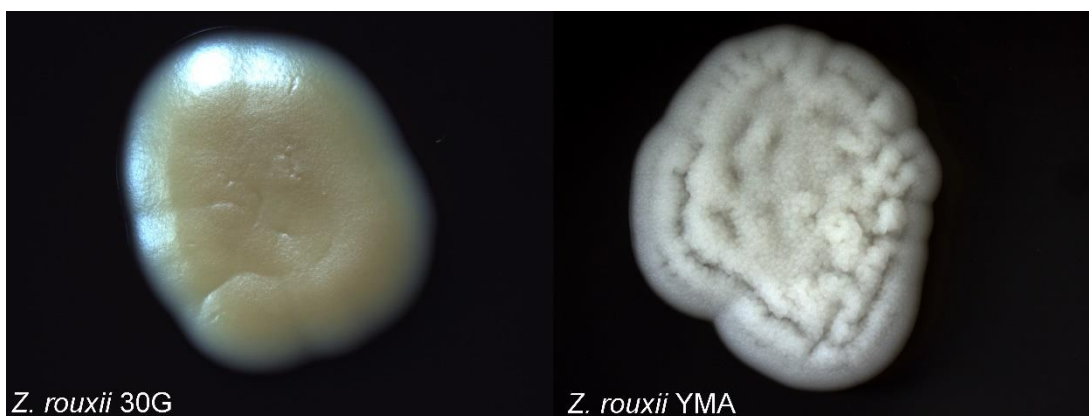
Podíl vzorků *Z. rouxii* tvořilo v rámci této diplomové práce 17 zástupců. Standardní doporučení pro morfologický popis bývá obvykle popis kultury staré 5 dní. Kmeny *Z. rouxii* však netvoří na médiu 30G po 5 dnech růstu velké diferenciační rozdíly, ty jsou patrné na médiu YMA. Pro popis byly vybrány dva kmeny, které se morfologicky odlišují, přestože se jedná od zástupce jednoho druhu. Ostatní kmeny se na obou médiích chovají obdobně a nebyly proto popsány.

První zástupce *Z. rouxii* tvoří na médiu 30G krémové až hnědě zbarvené kolonie s lesklým, hladkým povrchem a celistvým okrajem. Vzhled kolonií na médiu YMA je odlišný, kolonie jsou bílé, spíše matné s děleným povrchem. Elevace je nízká a okraj kolonií je zvlněný (obr. 4.1).



Obrázek 4.1: Kolonie *Z. rouxii* na médiích 30G a YMA.

Druhý zástupce *Z. rouxii* vykazuje za stejných podmínek na médiu 30G obdobné charakteristiky, jako předchozí popsaný vzorek. Vzhled kolonie se liší opět na médiu YMA. Kolonie jsou bílé s matným, zvrásněným povrchem, tvar kolonie je laločnatý, okraj svraštělý (obr. 4.2)



Obrázek 4.2: Kolonie *Z. rouxii* na médiích 30G a YMA.

4.2.2. *Zygosaccharomyces mellis*

Vzorek druhu *Z. mellis* pocházel z pylu. Druh *Z. mellis* po pěti dnech nevytvořil na médiu 30G ani YMA dostatečně velké kolonie pro morfologické hodnocení, proto byly zhodnoceny kolonie 14 dní staré. Druh *Z. mellis* nicméně na obou médiích tvoří kolonie značně odlišné od ostatních druhů – *Z. rouxii* a *Z. favi*

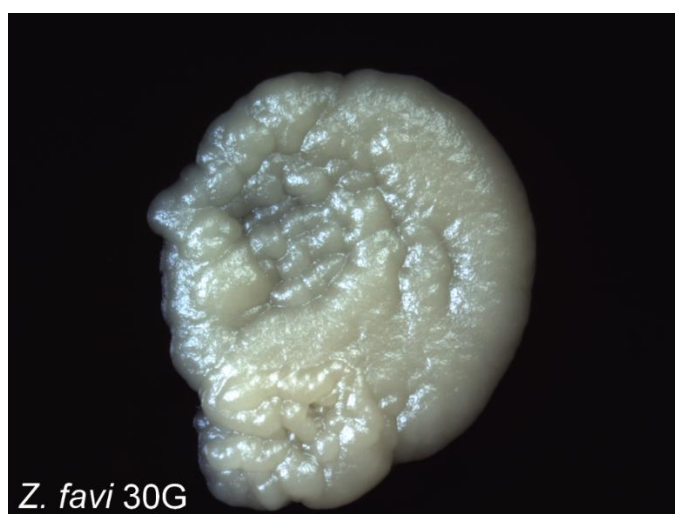
Na médiu 30G je vzhled kolonií zvrásněný, s třásnitým okrajem a hnědé barvy. Kolonie na YMA jsou oproti tomu opět bílé, stejně jako u předchozích druhů, nicméně se zvýšeným profilem stlačeným uprostřed, hrubou strukturou a nepravidelným okrajem (obr. 4.3).



Obrázek 4.3: Kolonie *Z. mellis* na médiích 30G a YMA.

4.2.3. *Zygosaccharomyces favi*

Vzorek *Z. favi* pochází z rousků a kultivace na jiném médiu (YMA, YPD) nebyla za vybraných podmínek úspěšná. *Z. favi* roste nicméně dobře na médiu 30G, přestože růst je oproti *Z. rouxii* pomalejší. Kolonie jsou béžové, barvou podobné předchozím druhům. Struktura je nicméně nepravidelná, dělená a s leklým povrchem (obr. 4.4).



Obrázek 4.4: Kolonie *Z. favi* na médiu 30G.

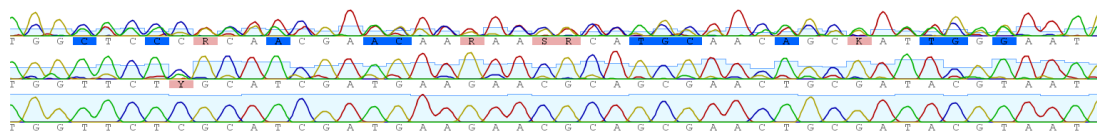
4.3. Molekulární charakterizace

Molekulární charakterizace kvasinek byla založena na sekvenování úseků ITS a D1/D2. Podle úseku D1/D2 se úspěšně podařilo určit druh kvasinek *Zygosaccharomyces* u všech dvaceti vzorků. Výstupem jsou rovněž nové primery pro úsek ITS, specifické pro kvasinky rodu *Zygosaccharomyces*. Tyto primery byly navrženy na základě sekvencí získaných ze zaklonovaných fragmentů ITS, které byly osekvenovány pomocí univerzálních primerů.

4.3.1. Sekvenování úseku ITS

Vybrané vzorky byly sekvenovány primery forward a reverse. Získané sekvence nicméně nebyly pro charakterizaci dostatečně kvalitní, a to ani po přečištění kvasinkové kultury a úpravě PCR cyklu. S přihlédnutím ke kvalitě sekvencí byly nicméně sekvence s primerem reverse o něco kvalitnější než sekvence s primerem forward.

Teprve po zaklonování úseku ITS do TOPO vektoru a sekvenaci zaklonovaných fragmentů se podařilo získat kvalitní sekvence dostatečné pro molekulární charakterizaci druhu (obr. 4.5)



Obrázek 4.5: Porovnání získaných sekvencí. První sekvence – část úseku ITS, primer forward; druhá sekvence – ITS, primer reverse; třetí sekvence – úsek ITS zaklonovaný do plazmidu (primer forward).

4.3.2. Sekvenování úseku D1/D2

Výsledky sekvenování úseku D1/D2 byly uspokojivé u obou primerů. Na základě sekvenace tohoto úseku se podařilo identifikovat druh kvasinek u všech vzorků. Jejich výčet je uveden v tabulce 4.2.

Tabulka 4.2: Druh kvasinek *Zygosaccharomyces* určený na základě sekvenace úseku D1/D2.

Vzorek	Druh	Vzorek	Druh	Vzorek	Druh	Vzorek	Druh
1	<i>Z. rouxii</i>	6	<i>Z. rouxii</i>	11	<i>Z. rouxii</i>	16	<i>Z. rouxii</i>
2	<i>Z. rouxii</i>	7	<i>Z. rouxii</i>	12	<i>Z. rouxii</i>	17	<i>Z. rouxii</i>
3	<i>Z. rouxii</i>	8	<i>Z. rouxii</i>	13	<i>Z. rouxii</i>	18	<i>Z. favi</i>
4	<i>Z. rouxii</i>	9	<i>Z. rouxii</i>	14	<i>Z. rouxii</i>	19	<i>Z. favi</i>
5	<i>Z. rouxii</i>	10	<i>Z. rouxii</i>	15	<i>Z. rouxii</i>	20	<i>Z. mellis</i>

4.4. Návrh primerů

Na základě analýzy sekvencí a konsensus sekvence plazmidové DNA se zaklonovaným úsekem ITS *Z. rouxii* byly navrženy čtyři páry primerů, specifické pro tyto kvasinky. Jejich sekvence jsou uvedeny v tabulce 4.3.

Tabulka 4.3: Sekvence nových primerů.

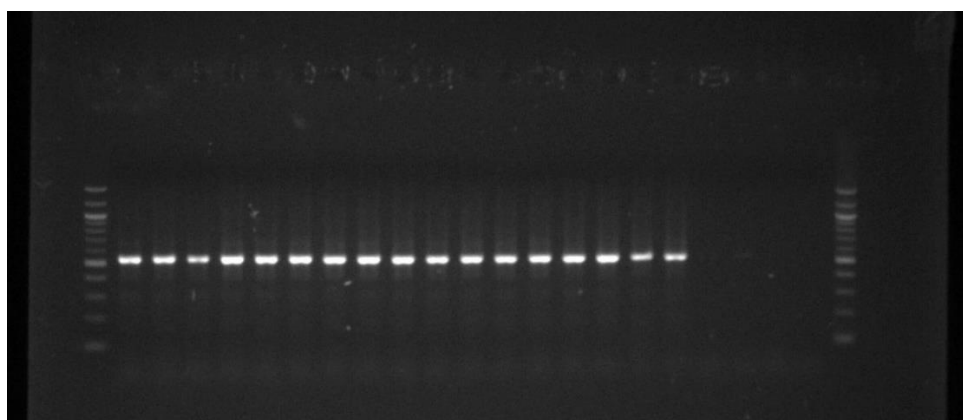
Označení primeru	Sekvence
ZRxA forward	5'-GCAAGGCCTGCGCTTAATTG-3'
ZRxA reverse	5'-CCTCTTCACTTTCGCCGAGT-3'
ZRxB forward	5'-CGCATCGATGAAGAACGCAG-3'
ZRxB reverse	5'-CCTCTTCACTTTCGCCGAGT-3'
ZRxC forward	5'-CATGCCTGTTTGAGCGTCAT-3'
ZRxC reverse	5'-CTCTTCACTTTCGCCGAGTC-3'
ZRxD forward	5'-CAAAGTGTTGGAGGGGAAGG-3'
ZRxD reverse	5'-TCGATGCGAGAACCAAGAGA-3'

Se všemi páry primerů byla nejdříve provedena Gradient PCR. Úsek DNA se podařilo úspěšně naamplifikovat u všech primerů a na základě gelu byla navržena optimální teplota annealingu pro každý pár. Reakční schéma PCR reakce bylo obdobné jako u úseku ITS a D1/D2 (tabulka 3.7 a 3.8), pro úsek ZRxA byla použita teplota annealingu 59,5 °C, pro úsek ZRxB 58,5 °C, pro ZRxC 57 °C a pro úsek ZRxD 55 °C.

Podle navržených reakčních protokolů byla provedena PCR reakce se všemi vzorky. Jak bylo očekáváno, vzorky *Z. rouxii* se podařilo naamplifikovat všechny, a to u všech párů primerů. Vzhledem k tomu, že nové primery vycházely právě ze vzorků *Z. rouxii*, předpokládalo se, že budou specifické právě pro tento druh kvasinek.

4.4.1. Primery ZRxA

Úspěšně se podařilo naamplifikovat všechny vzorky *Z. rouxii* (obr. 4.6).

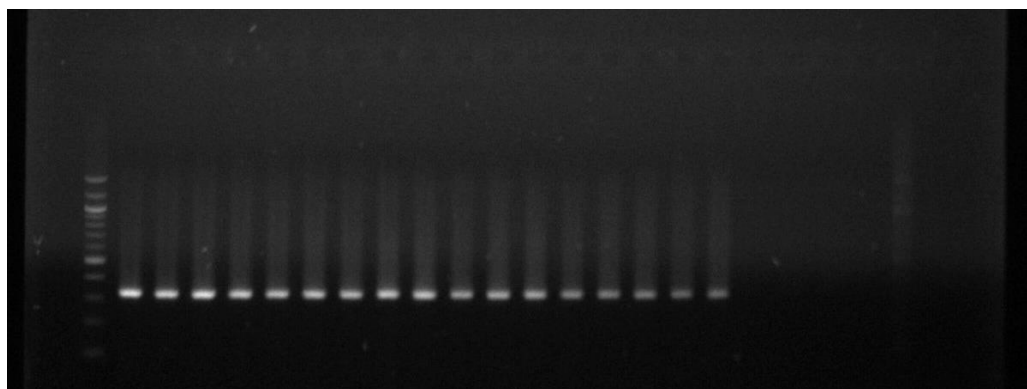


Obrázek 4.6: Výsledek PCR reakce s primery ZRxA, produkty o velikost cca 550 bp se podařilo naamplifikovat u všech vzorků *Z. rouxii*.

Na sekvenování byly poslány tři vzorky, které byly osekvenovány primery forward i reverse. U dvou vzorků byla sekvenace úspěšnější s primerem reverse, stejně jako tomu bylo u úseku ITS, sekvence s primerem forward byly nečitelné. Jeden vzorek se podařilo osekvenovat oběma primery. Všechny sekvenované vzorky byly na základě sekvence klasifikovány jako *Z. rouxii*, totožně jako podle úseku D1/D2.

4.4.2. Primery ZRxB

Stejně jako u předchozího páru primerů se podařilo úspěšně naamplifikovat všechny vzorky *Z. rouxii* (obr. 4.7).

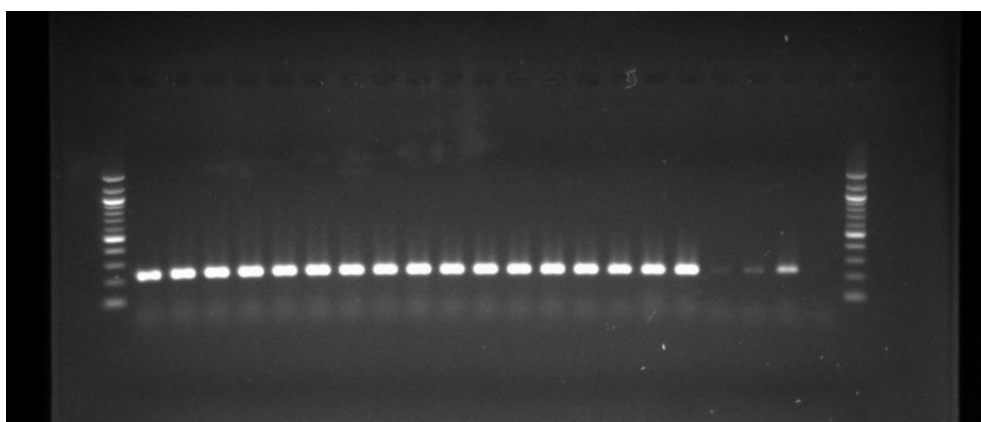


Obrázek 4.7: Výsledek PCR reakce s primery ZRxB, produkty o velikost cca 300 bp se podařilo naamplifikovat u všech vzorků *Z. rouxii*.

S těmito primery byly sekvenovány dva vzorky. Sekvenování i identifikace byly úspěšné u obou z nich, a to s primerem forward i reverse.

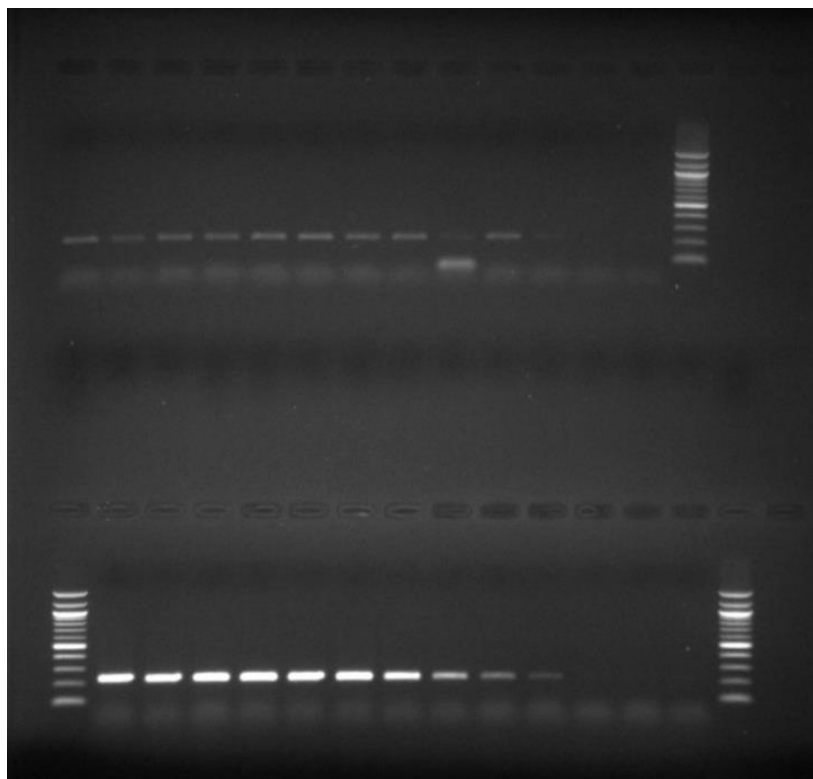
4.4.3. Primery ZRxC

Amplifikace produktů se zdařila u všech vzorků *Z. rouxii*, jak bylo očekáváno. Ke slabé amplifikaci produktu rovněž došlo u vzorků 18–19 (*Z. favi*) a 20 (*Z. mellis*) (obr. 4.8).



Obrázek 4.8: Výsledek PCR reakce s primery ZRxC, produkty o velikost cca 250 bp se podařilo naamplifikovat u všech vzorků *Z. rouxii* se slabou amplifikací rovněž u vzorků *Z. favi* a *Z. mellis*.

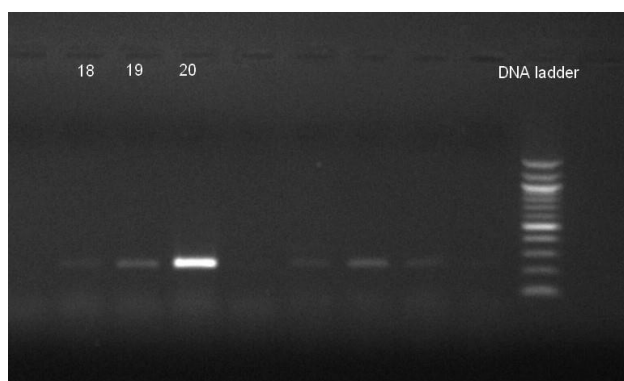
Sekvenování proběhlo u dvou vzorků *Z. rouxii* s primery forward a reverse, v obou případech úspěšně. Z důvodu slabé amplifikace produktů u vzorků 19 a 20 byla provedena samostatná Gradient PCR pro tyto vzorky (obr. 4.9). Cílem této Gradient PCR bylo zjistit, zda při jiných teplotách annealingu nevzniká kvalitnější produkt.



Obrázek 4.9: Gradient PCR vzorků 19 (nahore) a 20 (dole) s primery ZRxC.

Na základě výsledků Gradient PCR pro vzorky 19 (*Z. favi*) a 20 (*Z. mellis*) byl navržen samostatný protokol pro tyto dva druhy *Zygosaccharomyces*. Reakční protokol byl obdobný jako dříve, nicméně teplota annealingu byla snížena na 55 °C.

Vzorky 19 a 20 byly po úspěšné amplifikaci (obr. 4.10) zaslány na sekvenování primery forward i reverse.

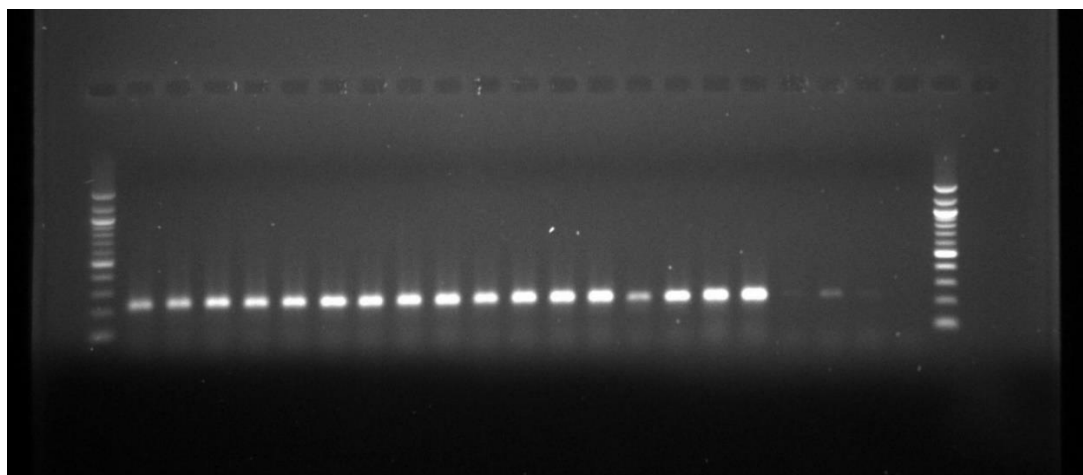


Obrázek 4.10: Výsledek PCR produktů vzorků 18–20 s primery ZRxC.

Vzorek 19, dle úseku D1/D2 klasifikovaný jako *Z. favi*, byl dle výsledků sekvenace primery ZRxC klasifikován jako *Z. rouxii*. Vzorek 20 byl nicméně určen shodně s identifikací dle úseku D1/D2, tedy jako druh *Z. mellis*.

4.4.4. Primery ZRxD

Amplifikace produktů proběhla u všech vzorků *Z. rouxii*, se slabou amplifikací u vzorků 18–20 (obr. 4.11).



Obrázek 4.11: Výsledek PCR reakce s primery ZRxD, produkty o velikost cca 250 bp se podařilo naamplifikovat u všech vzorků *Z. rouxii* se slabou amplifikací rovněž u vzorků *Z. favi* a *Z. mellis*.

Amplifikace všech produktů byla dle vizualizace na gelu úspěšná, sekvenace se však povedla pouze u jednoho ze dvou sekvenovaných vzorků. Kvalita sekvence nicméně nebyla příliš špatná, a proto by pro získání výsledků i u dalších vzorků pravděpodobně stačilo upravit čistotu produktu nebo upravit PCR cyklus. Z časových důvodů však další úpravy PCR reakce nebyly možné.

Díky slabé amplifikaci vzorků 18–20 byla se vzorky *Z. favi* a *Z. mellis* provedena nová Gradient PCR reakce, aby bylo možné zjistit, zda se při jiné teplotě annealingu primerů neamplifikují tyto produkty lépe.

Výsledky Gradient PCR však ani u jednoho ze vzorků neprokázaly lepší amplifikaci, z tohoto důvodu byly navrženy podmínky PCR reakce pro ZRxC také použity pro PCR reakci ZRxD se vzorky 18–20 (obr. 4.12)



Obrázek 4.12: Výsledek PCR produktů vzorků 18–20 s primery ZRxD.

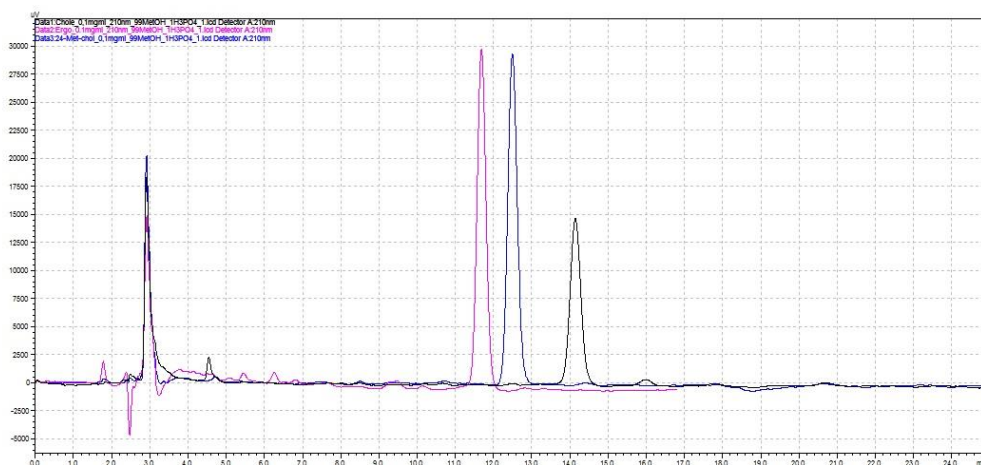
Amplifikace produktů byla však velmi slabá a vzorek *Z. favi* (19) se podařilo osekvenovat pouze se špatnou kvalitou chromatogramu po vyzkoušení obou primerů.

4.5. Měření koncentrace ergosterolu pomocí HPLC

Třetí částí této práce je měření koncentrace ergosterolu, který je produkován kvasinkami. Produkce ergosterolu metodou HPLC byla změřena pouze u některých vzorků, jejichž růst to za stanovených podmínek umožnil.

4.5.1. Zpracování výsledků

Pokud je sledovaný metabolit ve vzorku přítomen, na výsledném chromatogramu je v době retenčního času patrný pík. Retenční časy (RT) jednotlivých metabolitů byly cca 11,8 minut pro ergosterol, cca 12,5 minut pro 24-methylencholesterol a cca 14,2 minut pro cholesterol. Chromatogram se standardy o koncentraci 0,1 mg/ml je na obrázku 4.13.



Obrázek 4.13: Výsledek HPLC analýzy standardů o koncentraci 0,1 mg/ml. Růžový – ergosterol s RT cca 11,8 min; modrý – 24-methylencholesterol s RT cca 12,5 min; černý – cholesterol s RT cca 14,2 min.

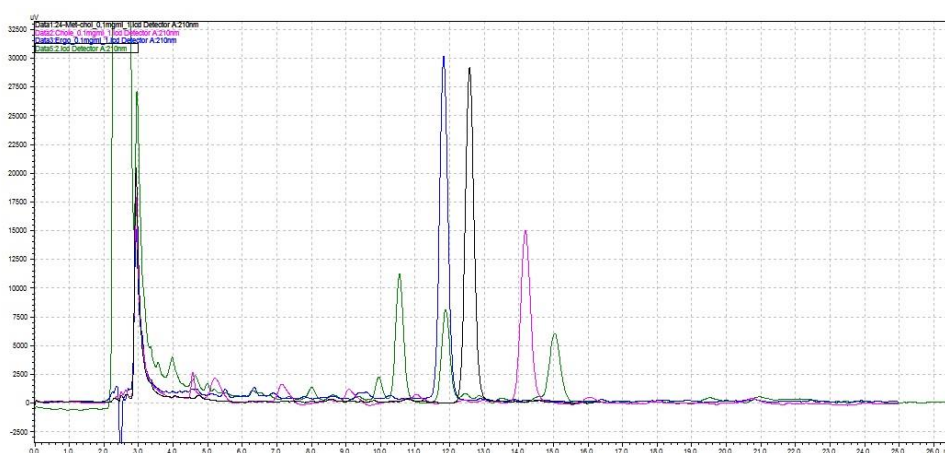
Na základě plochy píku je pak podle kalibrační křivky vypočtena koncentrace metabolitu. Výsledná koncentrace ergosterolu ve vzorcích byla zhodnocena podle kalibrační řady programem LabSolutions (Shimadzu). Pro význam ergosterolu v kvasinkách byla kvantitativně změřena pouze koncentrace ergosterolu, koncentrace 24-methylencholesterolu dopočítána nebyla a jeho přítomnost měla pouze informační charakter. Přítomnost cholesterolu pro povahu vzorku nebyla očekávána.

Koncentrace ergosterolu byla vyhodnocena v přepočtu na navážku suché biomasy, výsledky jsou uvedeny v tabulce 4.4.

Tabulka 4.4: Koncentrace produkovaného ergosterolu kvasinkami

Číslo vzorku	Ergosterol [mg/g suché biomasy]
1	0,3380
2	0,3405
3	0,3581
4	0,1740
10	0,3336
12	0,1685
13	0,1501
14	0,2119
15	0,2826
16	0,1278
17	0,2634
20	0,3603

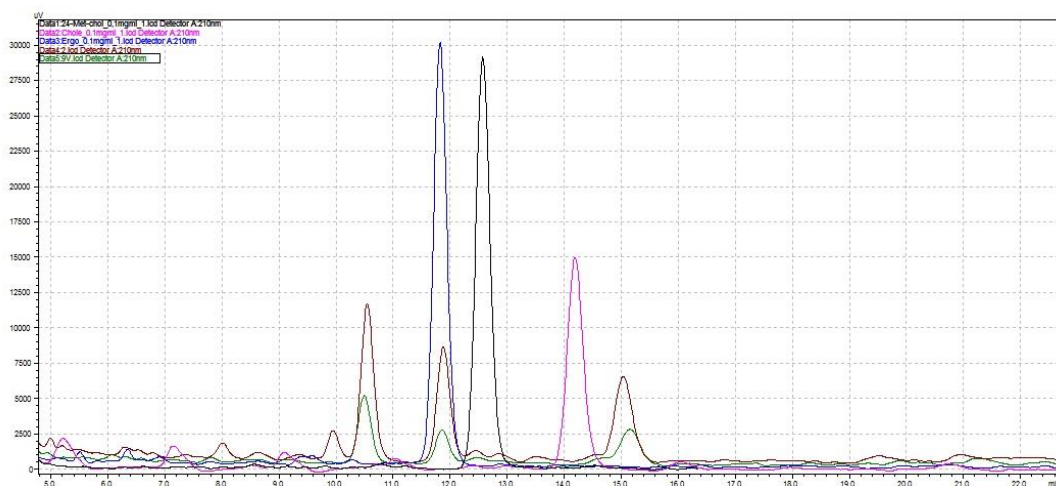
Vzorek s nejvyšší produkcí ergosterolu byl vzorek č. 20, zástupce *Z. mellis* izolovaný z pylu. Ze zástupců *Z. rouxii* izolovaných ze střev larev byl nejlepším producentem vzorek č. 3. Porovnání vzorku č. 3 oproti standardům měřených metabolitů, z něhož vychází vlastní vyhodnocení koncentrace, je znázorněno na obr. 4.14.



Obrázek 4.14: Chromatogram analýzy HPLC vzorku č. 3. Zelené píky – sledovaný vzorek, modrý pik – ergosterol, černý – 24-methylencholesterol, růžový – cholesterol.

Jak je z chromatogramu patrné, jediným metabolitem, který byl v kvasinkách nalezen, byl ergosterol. Cholesterol ani 24-methylencholesterol naměřeny nebyly. Ostatní píky naznačují přítomnost jiných metabolitů, které však nebyly identifikovány.

Na obr. 4.15 je chromatogram se standardy měřených metabolitů v porovnání se zástupci nejlepšího producenta *Z. rouxii* (vzorek č. 3) a producenta s nejnižšími hodnotami ergosterolu (vzorek č. 13). Z obrázku je patrné, že plocha píku odpovídá koncentraci metabolitu, a že spektrum látek je mezi kvasinkovými kmeny velmi podobné.



Obrázek 4.15: Chromatogram analýzy HPLC vzorku č. 3 a vzorku č. 13. Zelené píky – vzorek č. 13 (menší producent), hnědé píky – vzorek č. 3 (vyšší producent) modrý pík – ergosterol, černý – 24-methylencholesterol, růžový – cholesterol.

5. Diskuse

V literární rešerši byly shrnuty poznatky o včele medonosné a její mikrobiotě, založené na řadě vědeckých studií, které se této problematice věnují. Přesto, že bývá pozornost věnována jak mikrobiotě raných vývojových stádií včely (Hroncová et al., 2015) i dospělých jedinců (Raymann a Moran, 2018), řada témat zatím zůstává neotevřena.

Tato diplomová práce byla zaměřena na kvasinky rodu *Zygosaccharomyces* asociovaných se včelami, které se podařilo izolovat ze střev včelích larev, rousků a pylu. Na základě morfologických a molekulárních charakteristik jsou tyto kvasinky dobře popsány (Kurtzman et al., 2011), jejich funkční asociace se včelami však zatím minimálně.

První část metodického zpracování práce tvoří morfologická charakterizace izolovaných kvasinek. Podkladem pro tuto charakterizaci byla práce Kurtzman et al. (2011), jehož publikace tvoří ucelený soubor dostupných informací o kvasinkách, jejich kultivaci a charakterizaci. Přestože kolonie kvasinek i dalších mikroorganismů jsou na kultivačním médiu popisovány podle obecného schématu (struktura, velikost, okraje a další) samotné zhodnocení je vždy subjektivní.

V rámci této práce byly izolovány a charakterizovány tři druhy kvasinek *Zygosaccharomyces*: *Z. rouxii*, *Z. mellis* a *Z. favi*. Poslední, páté vydání knihy *The Yeasts* (Kurtzman et al., 2011) zahrnuje z rodu *Zygosaccharomyces* pouze druhy *Z. rouxii* a *Z. mellis*. Druh *Z. favi* byl objeven až později, v roce 2014 jeho popis publikovali Čadež et al. (2015).

Výskyt kvasinek rodu *Zygosaccharomyces* je obecně asociován se sladkými nápoji, ovocnými šťávami a dalšími obdobnými produkty. Jmenovitě jsou to hlavně druhy *Z. rouxii* a *Z. mellis*, které tvoří samotnou podskupinu a díky své vysoké osmotoleranci patří mezi hlavní kontaminanty potravin. I proto se lze setkat s jejich výskytem mimo jiné v medu nebo v plástovém pylu (včelím chlebu).

Vazbu těchto konkrétních druhů *Zygosaccharomyces* na med a plástový pyl lze díky jejich vysoké osmotoleranci odůvodnit právě tím, že med i plástový pyl se vyznačují nízkou aktivitou vody. Vzhledem k adaptaci vybraných druhů *Zygosaccharomyces* na prostředí s vysokým obsahem cukru je tedy pro ně toto prostředí optimální (Čadež et al., 2015).

Poměrně nový druh *Z. favi* byl kromě medu izolován také z plástového pylu. Detry et al. (2020) izolovali druh *Z. favi* ze staršího produktu (plástový pyl starý více než dvacet dní), zatímco Čadež et al. (2015) stáří produktu neuvádí. V této práci byl druh *Z. favi* izolován z rousků.

Proces zrání včelího chleba začíná u rouskového pylu, který je dělnicemi uložen do plodové komory, kde následně podléhá biochemickým pochodům. Izolace *Z. favi* z rousků v této diplomové práci poukazuje na pravděpodobnost, že tato kvasinka je v nezralém produktu již od počátku a pravděpodobně přetrvává i během procesu zrání plástového pylu.

Tato hypotéza je však v rozporu se studií Detry et al. (2020), kde z pylových rousků druh *Z. favi* izolován nebyl a objevil se až během třetího dne zrání plástového pylu, pravděpodobně přenosem od dospělých dělnic. Protože se však jedná o poměrně nový druh kvasinky, množství poznatků je zatím velmi malé.

Výskyt kvasinky druhu *Z. mellis* je nejčastěji ve včelím prostředí asociován s medem (Liu et al., 2016; Bovo et al., 2018) a plástovým pylem (Detry et al., 2020). Druh *Z. mellis* byl nicméně izolován i z rousků (Sinpoo et al., 2017) a ovarií i střev včelích matek (Yun et al., 2019). Přestože Yun et al. (2019) prokázali, že ovariím a střevu včelích matek *Zygosaccharomyces* sp. dominují, jejich výskyt u včelích dělnic byl významně nižší. V této diplomové práci byl druh *Z. mellis* izolovaný z pylu. Jedná se o první úspěšnou izolaci *Z. mellis* z pylu, výskyt *Z. mellis* z pylu doposud nebyl publikován.

Spektrum zdrojů, ze kterých byl k tomuto datu izolován druh *Z. rouxii*, je širší. Druh *Z. rouxii* patří mezi jeden z nejstarších izolovaných druhů tohoto rodu, již v roce 1884 jeho výskyt pod názvem *Saccharomyces rouxii* publikoval Boutroux. Široká ekologická valence pak může zdůvodnit často publikovaný výskyt tohoto druhu.

Díky své podobnosti s druhem *Z. mellis* byl také druh *Z. rouxii* izolován z medu (Bovo et al., 2018) a plástového pylu (Detry et al., 2020). Dále byl druh *Z. rouxii* izolován z trávicího ústrojí dospělých včel, zejména ze žaludku (Detry et al., 2020) a medového včáčku (Batra et al., 1973). Batra et al. (1973) rovněž popsali izolaci z plodových buněk larev.

Tato diplomová práce popisuje izolaci druhu *Z. rouxii* ze střev larev. Oproti předchozím zmíněným druhům *Zygosaccharomyces* je ve střevech larev výskyt

právě *Z. rouxii* patrně nejvíce pravděpodobný, vzhledem k jeho dřívější izolaci v jiných studiích z prostředí larev i dospělých včel.

Larvy získávají svou přirozenou mikroflóru z potravy, která je s výjimkou prvních několika dní tvořena směsí plástového fermentovaného pylu, pylu a medu (Mohr a Tebbe, 2006). Je tedy pravděpodobné, že i druhy *Z. favi* a *Z. mellis* se mohou vyskytovat ve střevech larev. Tyto druhy však doposud nebyly izolovány z dospělých dělnic. Pokud ale při přenosu mikrobioty mezi dospělci a larvami hraje větší roli mikrobiální osídlení dělnic než potravy, kterou larvy přijímají, tyto druhy se u larev vyskytovat nemusí. Odpověď na tyto otázky pravděpodobně není tak jednoduchá a žádala by rozsáhlejší studii zacílenou nejen na mikrobiální osídlení larev, ale rovněž na problematiku přenosu mikrobioty mezi dělnicemi a larvami.

Pro molekulární charakterizaci kvasinek *Zygosaccharomyces* byly v této práci použity dva úseky DNA, úsek D1/D2 a úsek ITS. V této práci se podařilo úspěšně určit všechny druhy *Zygosaccharomyces* právě díky úseku D1/D2, zatímco na základě sekvencí úseku ITS nebylo možné identifikovat druh *Z. rouxii* vzhledem k výskytu nejednoznačně identifikovaných nukleotidů v sekvenovaných vzorcích. Důvodem bylo patrně více ITS kopií, stejně jako již dříve popsali u *Zygosaccharomyces* Saksinchai et al. (2012), Solieri et al. (2013) a Čadež et al. (2015).

Leaw et al. (2006) shledali, že při odděleném sekvenování úseku ITS1 a ITS2 je vnitrodruhová divergence sekvence ITS1 vyšší než úseku ITS2, a z tohoto důvodu je pro identifikaci mikroorganismu přínosnější sekvenování pouze úseku ITS2. Tyto rozdíly však v současné době nejsou tak významné, protože častěji se již sekvenují oba úseky najednou.

Sekvenování oddělených úseků ITS1 a ITS2 se nabízí jako možnost pro řešení klonality, avšak protože v rámci časových možností nebyl prostor toto tvrzení ověřit, nelze ho potvrdit ani vyvrátit. Současně existuje více univerzálních primerů pro oba úseky ITS, často shodně označovaných jako primery ITS1 a ITS4, které by mohly být případně vyzkoušeny (White et al., 1990).

Egli a Henick-Kling (2001) předpokládali, že jediným řešením problému klonality je zaklonování úseku ITS do plazmidu a jeho následné osekvenování. Toto řešení aplikovali Čadež et al. (2015) a rovněž bylo využito v této diplomové práci.

Klonování se ukázalo jako zdařilé, na základě sekvenování plazmidové DNA s inzertem úseku ITS se podařilo získat chromatogramy se zřetelnými píky.

Podle nich byly potom vybrané vzorky vyhodnoceny jako *Z. rouxii*. Dva vzorky se sekvencemi primery forward i reverse následně posloužily jako templát pro tvorbu nových primerů.

Celkem byly navrženy čtyři páry primerů s o značením ZRxA, ZRxB, ZRxC a ZRxD. Velikost produktu ZRxA byla cca 550 bp a jednalo se tak o nejdelší sekvenovaný úsek z nových primerů. Velikost produktu ZRxB byla cca 300 bp, u produktů ZRxC a ZRxD pouze cca 250 bp.

Identifikace druhu se zdařila u všech sekvenovaných vzorků a pokrytí sekvenovaného vzorku s referenční sekvencí bylo téměř vždy stoprocentní, stejně jako shoda mezi nimi. Primery ZRxC a ZRxD však tvoří poměrně krátké fragmenty a pro identifikaci některých vzorků by tak nemusely být dostačující nebo správné.

Krátká délka fragmentu se ukázala jako problémová konkrétně u vzorku č. 19 (dle úseku D1/D2 druh *Z. favi*). S 99% pokrytím se srovnávanými sekvencemi byl tento vzorek po sekvenování primery ZRxC vyhodnocen jako druh *Z. rouxii*. Důvodem bylo umístění primerů ZRxC, které ohraničovaly úsek totožný mezi vzorky *Z. rouxii* a *Z. favi*. Primerový pár ZRxC nemohu z tohoto důvodu doporučit pro odlišení druhů *Z. favi* a *Z. rouxii*.

U vzorku č. 20 (*Z. mellis*) tento problém nenastal a vzorek byl na základě sekvenování identifikován jako druh *Z. mellis*, totožně jako u úseku D1/D2. Přestože sekvence primerů byla navržena podle matrice *Z. rouxii*, zdá se být tento úsek vhodný i pro identifikaci dalšího druhu *Zygosaccharomyces*.

Přestože úsek ITS a úsek D1/D2 patří bezesporu k nejčastěji využívaným identifikačním úsekům (Leaw et al., 2006), doporučuji na základě výsledků molekulární charakterizace za vhodné využití více identifikačních markerů, které by v případě nejasných výsledků pomohly s doplněním identifikace vzorku. Použití více identifikačních markerů se jeví jako efektivní způsob rovněž pro ověření výsledků.

Přestože ITS oblast je oficiálním DNA barcodem pro identifikaci hub (Snosch et al., 2012) v této práci by charakterizace pouze na základě úseku ITS nebyla dostatečná. Aby byla možná identifikace všech vzorků pouze na základě tohoto úseku, bylo by nezbytné nejdříve všechny vzorky zaklonovat. Použití více identifikačních markerů i případné klonování vzorků však může být časově, finančně i přístrojově náročné.

Poslední částí této práce bylo stanovení ergosterolu v kvasinkách metodou HPLC. Kvasinky rodu *Zygosaccharomyces* jsou významnými producenty ergosterolu, který larvy metabolizují na ekdysteroidy, hormony nezbytné pro proces svlékání (Paludo et al., 2018).

Jak bylo očekáváno, produkce ergosterolu byla zjištěna u všech zástupců *Zygosaccharomyces* použitých v této diplomové práci. K současnému datu však nebyla nalezena žádná studie, která by se zabývala produkcí ergosterolu u kvasinek rodu *Zygosaccharomyces* v souvislosti se včelami a jejíž výsledky by mohly být porovnány s výsledky získanými v této práci. V této práci bylo nicméně zjištěno, že naměřené hodnoty ergosterolu se mezi jednotlivými kmeny výrazně lišily. Rozdíly byly rovněž mezi druhy *Z. rouxii* a *Z. mellis*.

V rámci této práce nebyl ergosterol změřen pouze u druhu *Z. favi*, a to pravděpodobně kvůli jiným podmínkám růstu na kultivačním médium. V případě větších časových možností by však doplnění informace o produkci mohlo být zajímavým srovnáním k již naměřeným hodnotám.

Dalším metabolitem, který souvisí s metamorfózou včel je 24-methylencholesterol. Ten však musí včely získávat z jiného zdroje, protože stejně jako cholesterol jej kvasinky netvoří (Kitson et al., 2011). Podle očekávání tedy ani tyto metabolity při analýze HPLC nalezeny nebyly.

Studium produkce ergosterolu kvasinkami a vliv ergosterolu na včely opět nabízí prostor pro řadu dalších výzkumů. Nabízí se možnosti srovnání produkce s dalšími druhy *Zygosaccharomyces*, popřípadě s dalšími rody kvasinek, nebo jejich cílená aplikace včelím larvám.

Závěr

Symbióza mezi mikroorganismy a včelou medonosnou odkrývá nejenom množství mechanismů, jakými se oba systémy přirozeně doplňují, ale nabízí také možnosti, jak k nim může být v budoucnu přistupováno. Tato diplomová práce dokazuje druhovou rozmanitost kvasinek rodu *Zygosaccharomyces*, které souvisejí se včelou medonosnou i množstvím ergosterolu, který tyto kvasinky produkují.

V rámci této práce bylo dosaženo všech stanovených cílů. Ze vzorků pylu, rousků a střev včelích larev se podařilo izolovat kvasinky rodu *Zygosaccharomyces* a byla provedena morfologická charakterizace získaných kmenů kvasinek. I přes problémy s identifikací kvasinek na základě sekvenování úseku ITS byla provedena molekulární charakterizace izolovaných kmenů a byly navrženy a vyzkoušeny nové primery. Tyto nové primery jsou specifické k druhu *Z. rouxii* a mohou být tedy doplněním diagnostiky v budoucích analýzách.

Změření produkce ergosterolu metodou HPLC vedlo k zajímavým výsledkům. Produkce ergosterolu není mezi druhy *Z. rouxii* a *Z. mellis* jednotná, a to ani mezi samotnými kmeny *Z. rouxii*.

První hypotézu, zda je možné pomocí kultivačních technik izolovat kvasinky rodu *Zygosaccharomyces* z pylu, pylových rousků a včelích larev, lze potvrdit. Pomocí kultivačních médií, které splňují poměrně specifické nároky této kvasinky, je lze izolovat. Kvasinky *Zygosaccharomyces* byly kultivovány na médiích s vysokým obsahem cukru, které jsou díky osmofilnímu charakteru těchto kvasinek pro jejich růst optimální.

Druhá hypotéza, zda je možné pro identifikaci izolátů kvasinek využít molekulární analýzu úseků ITS a D1/D2 je pravdivá, nicméně cesta k identifikaci podle úseku ITS vedla přes klonování a návrh nových primerů. Tato práce však není první, ve které byly podobné problémy se sekvenováním úseku ITS popsány, obzvláště se zástupci rodu *Zygosaccharomyces*.

V řadě témat ještě zůstává prostor pro případné doplnění v budoucích studiích. Konkrétně se může jednat o izolaci dalších mikroorganismů z jiných produktů nebo včel, měření ergosterolu u dalších zástupců *Zygosaccharomyces* či jiných kvasinek, nebo zpracování znalostí o ergosterolu do krmení a výživy larev.

Seznam obrázků

Obrázek 1.1: Vývojová stádia včely medonosné. Převzato a upraveno z: https://www.britannica.com/animal/honeybee (Britannica, The Editors of Encyclopaedia, 2013).....	12
Obrázek 1.2: Bakteriální mikroflóra včely medonosné; medný váček obsahuje pouze malé množství bakterií převážně z potravy a z prostředí úlu, střední střevo obsahuje malé množství bakterií podobné bakteriím vrátníku. Převzato a upraveno z: Kwong a Moran (2016).....	15
Obrázek 1.3: Morfologické znaky kolonií (Bursová et al., 2014; převzato a upraveno z Havlová et al., 1993).	26
Obrázek 1.4: Princip biochemických testů: změna barvy kultivačního média. Převzato a upraveno z: Hurych et al. (2020).....	27
Obrázek 1.5: Znázornění prokaryotického ribozomu a vizualizace hypervariabilních oblastí, které se střídají s úseky konzervovanými v genu 16S rDNA, a které slouží pro identifikaci bakterií. Převzato a upraveno z: Sánchez-Reyes a Folch-Mallol (2019).....	28
Obrázek 1.6: Organizace pre-rRNA u prokaryot a eukaryot. Pro identifikaci kvasinek a hub (eukaryota) se využívá úseků ITS1 a ITS2, které oddělují geny pro 18S rRNA a 5,8S rRNA, resp. 5,8S rRNA a 25S/28S rRNA. Převzato a upraveno z: Lafontaine a Tollervey (2001).....	29
Obrázek 1.7: Struktura plazmidu. AmpR – gen rezistence k ampicilinu (seleční marker), MCS – mnohočetné klonovací místo, lacZ - gen kódující β-galaktosidázu. Převzato a upraveno z: https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/blue-white-screening.html (sigmaaldrich.com, 2021)...	33
Obrázek 1.8: Modro-bílá selekce. Znázorněny jsou všechny možné výstupy, pro další práci s vektory jsou selektovány bílé kolonie, tedy kolonie, které obsahují vektor se zaklonovaným fragmentem. Převzato a upraveno z: https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/blue-white-screening.html (sigmaaldrich.com, 2021).....	33
Obrázek 3.1: Vizualizace Gradient PCR – optimalizace teploty annealingu primerů pro úsek ITS na 1% agarózovém gelu; rozmezí teplot v jednotlivých jamkách 45–65 °C.	41

Obrázek 3.2: Vizualizace Gradient PCR – optimalizace teploty annealigu primerů pro úsek D1/D2 na 1% agarózovém gelu; rozmezí teplot v jednotlivých jamkách 45–65 °C.	41
Obrázek 3.3: PCR produkty úseku ITS o velikosti cca 700 bp.	42
Obrázek 3.4: PCR produkty úseku D1/D2 o velikosti cca 600 bp.	43
Obrázek 3.5: PCR klonování: modro-bílá selekce, bílé kolonie nesoucí plazmidy s inzertem, modré kolonie obsahují plazmid bez inzertu.	46
Obrázek 4.1: Kolonie <i>Z. rouxii</i> na médiích 30G a YMA.	51
Obrázek 4.2: Kolonie <i>Z. rouxii</i> na médiích 30G a YMA.	51
Obrázek 4.3: Kolonie <i>Z. mellis</i> na médiích 30G a YMA.	52
Obrázek 4.4: Kolonie <i>Z. favi</i> na médiu 30G.	52
Obrázek 4.5: Porovnání získaných sekvencí. První sekvence – část úseku ITS, primer forward; druhá sekvence – ITS, primer reverse; třetí sekvence – úsek ITS zaklonovaný do plazmidu (primer forward).	53
Obrázek 4.6: Výsledek PCR reakce s primery ZRxA, produkty o velikost cca 550 bp se podařilo naamplifikovat u všech vzorků <i>Z. rouxii</i>	54
Obrázek 4.7: Výsledek PCR reakce s primery ZRxB, produkty o velikost cca 300 bp se podařilo naamplifikovat u všech vzorků <i>Z. rouxii</i>	55
Obrázek 4.8: Výsledek PCR reakce s primery ZRxC, produkty o velikost cca 250 bp se podařilo naamplifikovat u všech vzorků <i>Z. rouxii</i> se slabou amplifikací rovněž u vzorků <i>Z. favi</i> a <i>Z. mellis</i>	55
Obrázek 4.9: Gradient PCR vzorků 19 (nahore) a 20 (dole) s primery ZRxC.	56
Obrázek 4.10: Výsledek PCR produktů vzorků 18–20 s primery ZRxC.	56
Obrázek 4.11: Výsledek PCR reakce s primery ZRxD, produkty o velikost cca 250 bp se podařilo naamplifikovat u všech vzorků <i>Z. rouxii</i> se slabou amplifikací rovněž u vzorků <i>Z. favi</i> a <i>Z. mellis</i>	57
Obrázek 4.12: Výsledek PCR produktů vzorků 18–20 s primery ZRxD.	58
Obrázek 4.13: Výsledek HPLC analýzy standardů o koncentraci 0,1 mg/ml. Růžový – ergosterol s RT cca 11,8 min; modrý – 24-methylencholesterol s RT cca 12,5 min; černý – cholesterol s RT cca 14,2 min.	58
Obrázek 4.14: Chromatogram analýzy HPLC vzorku č. 3. Zelené píky – sledovaný vzorek, modrý pík – ergosterol, černý – 24-methylencholesterol, růžový – cholesterol.	59

Obrázek 4.15: Chromatogram analýzy HPLC vzorku č. 3 a vzorku č. 13. Zelené píky – vzorek č. 13 (menší producent), hnědé píky – vzorek č. 3 (vyšší producent) modrý pík – ergosterol, černý – 24-methylencholesterol, růžový – cholesterol. 60

Seznam tabulek

Tabulka 3.1: Seznam použitých kultivačních médií.....	36
Tabulka 3.2: Kritéria pro popis kvasinek na pevném médiu. Převzato a upraveno z: Kurtzman et al. (2011).	38
Tabulka 3.3: Sekvence použitých primerů.	40
Tabulka 3.4: Složení PCR reakce pro Gradient PCR.	40
Tabulka 3.5: Reakční protokol pro Gradient PCR.	40
Tabulka 3.6: Složení PCR reakce.	41
Tabulka 3.7: Reakční protokol pro úsek ITS.....	42
Tabulka 3.8: Reakční protokol pro úsek D1/D2.....	42
Tabulka 3.9: Protokol pro přečištění PCR produktů pomocí ExoSAP-IT™.....	43
Tabulka 3.10: Složení vzorku před sekvenováním.....	44
Tabulka 3.11: Sekvence univerzálních primerů použitých k sekvenování plazmidů.	47
Tabulka 4.1: Seznam vzorků, jejich původ a druh určený na základě molekulární charakterizace.....	50
Tabulka 4.2: Druh kvasinek Zygosaccharomyces určený na základě sekvenace úseku D1/D2.....	53
Tabulka 4.3: Sekvence nových primerů.	54
Tabulka 4.4: Koncentrace produkovaného ergosterolu kvasinkami	59

Seznam použité literatury

Adams, M. E. (2009). Development, Hormonal Control of. In: Resh, H., Cardé, R. T. *Encyclopedia of Insects (Second Edition)*, druhé vydání, Elsevier, pp. 261–266. ISBN 978-0-12-374144-8.

Aizen, M. A. et al. (2008). Long-Term Global Trends in Crop Yield and Production Reveal No Current Pollination Shortage but Increasing Pollinator Dependency. *Current Biology*. 18(20):1572–1575.

Allen-Wardell, G. et al. (1998). The Potential Consequences of Pollinator Declines on the Conservation of Biodiversity and Stability of Food Crop Yields. *Conservation Biology*. 12:8–17.

Altschul, S. F., et al. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215:403–410.

Barbosa, R. N. et al. (2017). Phylogenetic analysis of *Monascus* and new species from honey, pollen and nests of stingless bees. *Studies in Mycology*. 86:29–51.

Barbosa, R. N. et al. (2018). New *Penicillium* and *Talaromyces* species from honey, pollen and nests of stingless bees. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111(10): 1883–1912.

Batra, L. R. et al. (1973). The mycoflora of domesticated and wild bees (Apoidea). *Mycopathologia et Mycologia Applicata*. 49:13–44.

Beránek, M. (2016). *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. Karolinum, Praha, 196 s. ISBN 9788024632469.

Bonilla-Rosso, G. a Engel, P. (2018). Functional roles and metabolic niches in the honey bee gut microbiota. *Current Opinion in Microbiology*. 43:69–76.

Bovo, S. et al. (2018). Shotgun metagenomics of honey DNA: Evaluation of a methodological approach to describe a multi-kingdom honey bee derived environmental DNA signature. *PLoS One*. 13(10):e0205575.

Brdička, R. a Didden, W. (2015): *Genetika v klinické praxi III*. Galén, Praha, 189 s. ISBN 9788074922268.

Britannica, The Editors of Encyclopaedia Britannica. (2013). Honeybee. [online]. Encyclopaedia Britannica [cit. 19.02.2021]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/animal/honeybee>

Bursová, E. et al. (2014). *Mikrobiologie potravin – praktická cvičení I. Obecná mikrobiologie. Revidované vydání.* Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Brno, 73 s. ISBN 978-80-7305-683-4.

Clark, A. J. a Bloch, K. (1959). The Absence of Sterol Synthesis in Insects. *Journal of Biological Chemistry.* 234(10):2578–82.

Clarridge, J. E. 3rd. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews.* 17(4):840-862.

Conklin, T. M. (2012). *Investigations of small hive beetle-yeast associations.* Disertační práce, The Pennsylvania State University, The Graduate School College of Agricultural Sciences.

Cremer, S. et al. (2018). Social Immunity: Emergence and Evolution of Colony-Level Disease Protection. *Annual Review of Entomology.* 63:105–123.

Cridland, J. M. et al. (2017). The Complex Demographic History and Evolutionary Origin of the Western Honey Bee, *Apis Mellifera*. *Genome Biology and Evolution.* 9(2):457–472.

Čadež, N. et al. (2015). *Zygosaccharomyces favi* sp. nov., an obligate osmophilic yeast species from bee bread and honey. *Antonie Van Leeuwenhoe.* 107(3):645–654.

Dakal, T. C. et al. (2014). Adaptive response and tolerance to sugar and salt stress in the food yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *International Journal of Food Microbiology.* 185:140–157.

Danihlík, J. a Petřivalský, M. (2015). Aktuální vědecké poznatky o imunitě a zdraví včel. *Veterinářství.* 6:434–441.

Deak, T. (2007). *Handbook of food spoilage yeasts, 2nd edition,* druhé vydání, Boca Raton: CRC Press. ISBN 978-1-4200-4493-5.

Detry, R. et al. (2020). Specialisation of Yeast Genera in Different Phases of Bee Bread Maturation. *Microorganisms.* 8(11):1789.

Dong, Z.-X. et al. (2020). Colonization of the gut microbiota of honey bee (*Apis mellifera*) workers at different developmental stages. *Microbiological Research.* 231:126370.

-
- Egli, C. M. a Henick-Kling, T. (2001). Identification of *Brettanomyces/Dekkera* species based on polymorphism in the rRNA internal transcribed spacer region. *American Journal of Ecology and Viticulture*. 52:241–247.
- Evans, J. D. a Lopez, D. L. (2004). Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*. 97(3):752–756.
- Feldlaufer, M. F. et al. (1985). Makisterone A: The major ecdysteroid from the pupa of the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Biochemistry*. 15(5):597–600.
- Fitzgerald, K. T. (2013). Insects-hymenoptera. In: Peterson, M. E. a Talcott, P. A. (Eds.): *Small Animal Toxicology, third edition, třetí vydání*, Elsevier, pp. 744–767. ISBN 9781455707171.
- Fontana, A. J. (2008). Water activity's role in food safety and quality. In: *The Second NSF International Conference on Food Safety*. Savannah, GA, USA, 7 s.
- Fünfhaus, A. et al. (2018). Bacterial pathogens of bees. *Current Opinion in Insect Science*. 26:89–96.
- Genersch, E. (2010). Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87(1):87–97.
- Gilliam, M. (1979). Microbiology of pollen and bee bread: the yeast. *Apidologie*. 10(1):43–53.
- Gilliam, M. (1997). Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiology Letters*. 155(1):1–10.
- Gilliam, M. et al. (1974). Yeasts isolated from honey bees, *Apis mellifera*, fed 2,4-D and antibiotics. *Journal of Invertebrate Pathology*. 24(3):349–356.
- Gilliam, M. et al. (1983). Hygienic behavior of honey bees in relation to chalkbrood disease. *Apidologie*. 14(1):29–39.
- Groenewald, M. et al. (2011). The value of the D1/S2 and internal transcribed spacers (ITS) domains for the identification of yeast species belonging to the genus *Yamadazyma*. *Persoonia*. 26:40–46.
- Harju, S. et al. (2004). Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. *BMC Biotechnology*. 4:8.

Havlová, I. et al. (1993). *Mikrobiologické metody v kontrole jakosti mléka a mlékárenských výrobků*. Praha, ČR: ÚZPI. 243 s. ISBN 80-85120-37-2.

Hirt, M. et al. (2016). *Soudní lékařství II. díl*. Grada, Praha, 240 s. ISBN 978-80-271-0268-6.

Hroncová, Z. et al. (2015). Variation in Honey Bee Gut Microbial Diversity Affected by Ontogenetic Stage, Age and Geographic Location. *PLoS ONE*. 10(3):e0118707.

Chen, Y-C. et al. (2001). Polymorphic Internal Transcribed Spacer Region 1 DNA Sequences Identify Medically Important Yeasts. *Journal of Clinical Microbiology*. 39(11):4042–4051.

In-Hui, K. et al. (2020). Increased survival of the honey bee *Apis mellifera* infected with the microsporidian *Nosema ceranae* by effective gene silencing. *Insect Biochemistry and Physiology*. 105(4):e21734.

Káš, J. et al. (2005). *Laboratorní techniky biochemie*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, 258 s. ISBN 978-80-7080-586-2.

Kim, M. a Chun, J. (2014). 16S rRNA Gene-Based Identification of *Bacteria* and *Archaea* using the EzTaxon Server. *Methods in Microbiology*. 41:61–74.

Kitson, S. M. et al. (2011). GPCR production in a novel yeast strain that makes cholesterol-like sterols. *Methods*. 55(4):287–292.

Kocková-Kratochvílová, A. (1982). *Kvasinky a kvasinkovité mikroorganismy*. Alfa, Bratislava, 409 s. ISBN 80-05-00644-6.

Kočárek, E. (2007). *Molekulární biologie v medicíně*. Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, Brno, 218 s. ISBN 978-80-7013-450-4.

Kopecká, I. a Svobodová, E. (2019). *Metody průzkumu historických materiálů*. Grada, Národní technické centrum, Praha, 96 s. ISBN 978-80-271-2240-0.

Kurtzman, C. P. a Robnett, C. J. (1997). Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *Journal of Clinical Microbiology*. 35:1216–1223.

Kurtzman, C. P. et al. (2011). *The Yeast, a Taxonomic Study, 5th edition*, páté vydání. Elsevier Science. 2354 s. ISBN 9780444521491.

-
- Kwong, W. K. a Moran, N. A. (2016). Gut microbial communities of social bees. *Nature Review Microbiology*. 14(6):374–384.
- Kwong, W. K. et al. (2017). Dynamic microbiome evolution in social bees. *Science Advances*. 3(3):e1600513.
- Lafontaine, D. L. J. a Tollervey, D. (2001). The function and synthesis of ribosomes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2(7):514–520.
- Lau, S. K. P. et al. (2015). Gene Amplification and Sequencing for Bacterial Identification. *Methods in Microbiology*. 42:433–464.
- Lavrynenko, O. et al. (2015). The ecdysteroidome of *Drosophila*: influence of diet and development. *Development*. 142(21):3758–68.
- Leaw, S. N. et al. (2006). Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. *Journal of Clinical Microbiology*. 44(3):693–699.
- Liu, G. et al. (2016). Identification of *Zygosaccharomyces mellis* strains in stored honey and their stress tolerance. *Food Science and Biotechnology*. 25(6):1645–1650.
- Martinson, V. G. et al. (2012). Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. *Applied and Environmental Microbiology*. 78(8):2830–2840.
- McMenamin, A. J. et al. (2018). Honey Bee and Bumble Bee Antiviral Defense. *Viruses*. 10(8):395.
- Meeus, I. et al. (2017). Safe-Guarding Bee Diversity and Food Provisioning. *Reference Module in Food Science*. Elsevier.
- Menezes, C. et al. (2015). A Brazilian social bee must cultivate fungus to survive. *Current Biology*. 25(21):2851–2855.
- Michener, C. D. (2007). *The Bees of the world, second edition*, druhé vydání, John Hopkins University Press, Baltimore, 992 s. ISBN 978-0801885730.
- Michener, C. D. (2013). The Meliponini. In: Vit, P., Pedro, S. R. M., Roubik, D. (Eds.), *Pot-Honey: A legacy of stingless bees*, Springer, New York, pp. 3–17. ISBN 978-1461449591.

-
- Mohr, K. I. a Tebbe, C. C. (2006). Diversity and phylotype consistency of bacteria in the guts of three bee species (Apoidea) at an oilseed rape field. *Environmental Microbiology*. 8(2):258–272.
- Moran, N. A. et al. (2003). A genomic perspective on nutrient provisioning by bacterial symbionts of insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100(2):14543–14548.
- Neefs, J. M. et al. (1990). Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Research*. 18:2237–2317.
- O’neal, S. T. et al. (2018). Interactions between pesticides and pathogen susceptibility in honey bees. *Current Opinion in Insect Science*. 26:57–62.
- Padmanabham, S. et al. (2011). Screening of Bacterial Recombinants: Strategies and Preventing False Positives. In: Brown, G. G.: *Molecular cloning – Selected Applications in Medicine and Biology*. IntechOpen. ISBN 978-953-307-398-9.
- Paludo, C. R. et al. (2018). Stingless Bee Larvae Require Fungal Steroid to Pupate. *Scientific Reports*. 8:1122.
- Paludo, C. R. et al. (2019). Microbial community modulates growth of symbiotic fungus required for stingless bee metamorphosis. *PLoS ONE*, 14(7):e0219696.
- Panasiuk, B. et al. (2010). Process of cleaning dead brood from cells in a honeybee colony. *Journal of Apicultural Science*. 54(1):5–1.
- Pavlík, M. et al. (2010). Metabolismus ekdysteroidů u hmyzu (Insecta) a význam hmyzí střevní mikroflóry. *Chemické listy*. 104:831–837.
- Powell, J. E. (2014). Routes of acquisition of the gut microbiota of the honey bee *Apis mellifera*. *Applied and Environmental Microbiology*. 80(23):7378–7387.
- Rangel, J. et al. (2013). The effects of honey bee (*Apis mellifera*) queen reproductive potential on colony growth. *Insectes Sociaux*. 60(1):65–73.
- Raymann, K. a Moran, N. A. (2018). The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. *Current Opinion in Insect Science*. 26:97–104.

Reid, D. S. (2007). Water Activity: Fundamentals and Relationships. In: Barbosa-Cánovas, G. V., Fontana Jr., A. J., Schmidt, S. J., Labuza, T. P.: *Water Activity in Foods: Fundamentals and Applications*. Blackwell Publishing, the Institute of Food Technologists, pp. 15–28. ISBN 9780470376454.

Ribiére, C. et al. (2019). Gut and Whole-Body Microbiota of the Honey Bee Separate Thriving and Non-thriving Hives. *Microbial Ecology*. 78(1):195–205.

Saksinchai, S. et al. (2012). A novel ascosporegenous yeast species, *Zygosaccharomyces siamensis*, and the sugar tolerant yeasts associated with raw honey collected in Thailand. *Fungal Diversity*. 52:123–139.

Sammataro, D. a Avitabile, D. (1998). *The Beekeeper's Handbook, third edition*, třetí vydání. Cornell University Press, New York. 208 s. ISBN 0801485037.

Samson, R. A. et al. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*. 78:141–173.

Sánchez-Reyes, A. a Folch-Mallol, J. L. (2019). Metagenomics-Based Phylogeny and Phylogenomic. In: Hozzein, W. N.: *Metagenomics – Basics, Methods and Applications*. IntechOpen. ISBN 978-1-83880-056-7.

Sigmaaldrich.com (2021). *Blue-White Screening & Protocols for Colony Selection*. [online] [cit. 19.02.2021]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/blue-white-screening.html>

Silva, M. S. et al. (2017). Microorganisms in Honey. In: de Alencar, V., de Toledo, A.: *Honey Analysis*, Intechopen.

Sinacori, M. et al. (2014). Cultivable microorganisms associated with honeys of different geographical and botanical origin. *Food Microbiology*. 38:284–294.

Sinpoo, C. et al. (2017). Dynamics of fungal communities in corbicular pollen and bee bread. *Chiang Mai Journal of Science*. 44(4):1244–1256.

Snosch, C. L. et al. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109(16):6241–6246.

Snowdon, J. A. a Clive, D. O. (1996). Microorganisms in honey. *International Journal of Food Microbiology*. 31(1–3):1–26.

Snusnad, D. P. a Simmons, M. J., (2009). *Genetika*. Masarykova univerzita, Brno, 871 s. ISBN 978-80-210-8613-5.

Solieri, L. et al. (2013). *Zygosaccharomyces sapae* sp. nov., isolated from Italian traditional balsamic vinegar. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 63:364–371.

Steinhauer, N. a vanEngelsdorp, D. (2017). Using Epidemiological Methods to Improve Honey Bee Colony Health. In: Vreeland, R., Sammataro, D.: *Beekeeping — From Science to Practice*. Springer, Cham. ISBN 978-3-319-60637-8.

Svoboda, J. A. et al. (1983). Definitive evidence for lack of phytosterol dealkylation in honey bees. *Experientia*. 39:1120–1121.

Šmarda, J. et al. (2005). *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita, Brno, 188 s. ISBN 9788021038417.

Tapia, M. S. et al. (2007). Effects of Water Activity (a_w) on Microbial Stability as a Hurdle in Food Preservation. In: Barbosa-Cánovas, G. V., Fontana Jr., A. J., Schmidt, S. J., Labuza, T. P.: *Water Activity in Foods: Fundamentals and Applications*. Blackwell Publishing, the Institute of Food Technologists, pp. 239–271. ISBN 9780470376454.

Tarpy, D. R. et al. (2015). Development of the Honey Bee Gut Microbiome throughout the Queen-Rearing Process. *Applied and Environmental Microbiology*. 81(9):3182–3191.

Tauber, J. P. et al. (2019). Effects of a Resident Yeast from the Honeybee Gut on Immunity, Microbiota, and *Nosema* Disease. *Insects*. 10(9):296.

vanEngelsdorp, D. et al. (2009). Colony Collapse Disorder: A Descriptive study. *PLoS ONE*. 4(8):e6481.

Wang, Y. et al. (2016). Comparison of the nutrient composition of royal jelly and worker jelly of honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie*. 47:48–56.

White, T. J. et al. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. (eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc., New York, pp. 315–322. ISBN 0-12-372181-4.

Winston, M. L. (1991). *The Biology of the Honey Bee*. Harvard University Press, Cambridge, MA, 294 s. ISBN 978-0674074095.

Yun, J.-H. et al. (2019). Social status shapes the bacterial and fungal gut communities of the honey bee. *Scientific reports*. 8(1).

Seznam zkratek

20E – β -ekdyson, ekdysteron

30G – kultivační médium 30% glukóza

50G – kultivační médium 50% glukóza

AmpR – gen rezistence k ampicilinu

a_w – aktivita vody (z angl. water activity)

BenA – β -tubulin

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool – nástroj pro porovnání získaných sekvencí s databází NCBI

bp / kbp – počet párů nukleových bází (z angl. base pair); případě kilobází

CaM – calmomodulin

ddNTP – dideoxynukleotid trifosfát

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dNTP – deoxynukleotid trifosfát

dsRNA – dvouvláknová RNA

HPLC – Vysokoučinná kapalinová chromatografie (z anglického high-performance liquid chromatography)

ITS – nekódující spacerová DNA (z angl. Internal Transcribed Spacer)

MaA – makisteron A

MCS – mnohočetné klonovací místo (z angl. multiple cloning site)

NCBI – Národní centrum pro biotechnologické informace (z angl. National Center for Biotechnology Information)

PCR – polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)

PCR-RFLP – metoda kombinující polymerázovou řetězovou reakci a polymorfismus délky restričních fragmentů (z angl. restriction fragment length polymorphism)

qPCR – kvantitativní PCR (real-time PCR)

rDNA – ribozomální DNA, úsek kódující ribozomální RNA

RNA – ribonukleová kyselina

RPB2 – gen kódující podjednotku RNA polymerázy II

rpm – otáčky za minutu (z angl. revolutions per minute)

rRNA – ribozomální RNA

RT – retenční čas

sp. – zkratka z latinského „species“, tedy druh; užívá se jako blíže neurčený druh určitého rodu

UV-VIS spektrofotometrie – ultrafialovo-viditelná spektrofotometrie

YMA – kultivační médium YMA (Yeast/Mold Agar)

YPD – kultivační médium YPD (Yeast Extract-Peptide-Dextrose)