Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: NEKO

Bc. Sylvie Hejdánková

Parazitická bakterie *Arsenophonus* u včely medonosné a jejího parazita *Varroa destructor*

Parasitic bacteria *Arsenophonus* in honeybee and its parasite *Varroa destructor*

Diplomová práce

Školitel: doc. Mgr. Jan Hubert, Ph.D.

Praha, 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 30. 4.2016

Podpis

Výzkum byl podpořen Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR (projekt LH14060).

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli doc. Mgr. Janu Hubertovi, Ph.D. za veškeré rady, za odborné vedení v laboratoři a hlavně za trpělivost při sepisování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat za užitečné rady a pomoc Ing. Martě Nesvorné a za poskytnutí vzorků MVDr. Martinu Kamlerovi.

Abstrakt

Bakterie *Arsenophonus* je parazitická bakterie, která je přenášena jak vertikálně, tak horizontálně. Svůj přenos posiluje manipulací s hostitelem jevem zvaným zabíjení samců. Vyskytuje se u hmyzu, klíšťat a křižáka obecného (*Araneus diadematus*).

Úlohou této diplomové práce byla detekce parazitické bakterie *Arsenophonus* u včely medonosné a jejího parazita *Varroa destructor*.

Zjistili jsme, že v obou hostitelských taxonech se nachází bakterie *Arsenophonus*, jež byla taxonomicky identifikována jako bakterie *Arsenophonus nasoniae*. Nález bakterie *Arsenophonus* v roztočích *Varroa destructor* je unikátním objevem. V dvojicích roztoč *Varroa destructor* a včela medonosná odebraných z jednoho úlu jsme prokázali signifikantně vyšší četnost výskytu bakterie *Arsenophonus* u roztočů *Varroa destructor* oproti včelám medonosným.

Z našich poznatků můžeme usuzovat, že roztoč *Varroa destructor* může sloužit jako vektor pro přenos bakterie *Arsenophonus* mezi včelami medonosnými. Výsledky této diplomové práce by mohly vést k budoucímu využití bakterie *Arsenophonus* v biologické kontrole roztoče *Varroa destructor*.

Klíčová slova: *Arsenophonus*, *Arsenophonus nasoniae*, včela medonosná, *Apis mellifera*, *Varroa destructor*, reprodukční parazit

Abstract

Arsenophonus is vertically and horizontally transmitted parasitic bacteria and strengthens its transfer through phenomenon called *son killing*. *Arsenophonus* has been detected in the arthropod hosts, insects, ticks and the garden spider *Araneus diadematus*.

The aim of this study is detection parasitic bacteria *Arsenophonus* in honeybees and its parasite *Varroa destructor*.

We find out that bacteria *Arsenophonus* is present in both hosts and it is identified as *Arsenophonus nasoniae*. Detection of bacteria *Arsenophonus* is discovered for the first time in *Varroa destructor* mites. We proved that the frequency of bacteria *Arsenophonus* in mites *Varroa destructor* is significantly higher than in honeybees.

This study shows that the mite *Varroa destructor* could act as a vector for transmission parasitic bacteria *Arsenophonus* among honeybees. Results of this study could lead to the future application of *Arsenophonus* as a biological control for the mite *Varroa destructor*.

Keywords: *Arsenophonus*, *Arsenophonus nasoniae*, honeybee, *Apis mellifera*, *Varroa destructor*, reproductive parasite

Obsah

1. Úvod 8
   1.1. Cíle 8
   1.2. Taxonomie 9
   1.3. Výskyt 10
   1.4. Morfologie a lokalizace 11
   1.5. Způsob přenosu 12
   1.6. Vliv na fenotyp 14
      1.6.1. *Son killing* 14
      1.6.2. Další vlivy bakterie *Arsenophonus* na fitness hostitelů 16
      1.6.3. Proč se udrží *son killing* v hostiteli 17
   1.7. Roztoč *Varroa destructor* 18
   1.8. Včela medonosná 20
2. Materiál a metodika 21
   2.1. Odběr materiálu 21
      2.1.1. Roztoči ze zimní měli 21
      2.1.2. Vzorky roztočů *Varroa destructor* a včely medonosné *Apis mellifera* získané v témže včelstvu 22
      2.1.3. Královny a doprovod 24
   2.2. Extrakce 24
      2.2.1. Extrakce DNA z roztoče *Varroa destructor* 24
      2.2.2. Extrakce DNA ze vzorků včely medonosné *Apis mellifera* 25
   2.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR) 26
      2.3.1. Reakční směs Mastermix 26
      2.3.2. Strategie výběru vzorku 26
      2.3.3. Detekční primery 27
      2.3.4. Průběh PCR reakce 28
   2.4. Vizualizace PCR produktů 30
   2.5. Klonování a sekvenování 30
      2.5.1. Přečištění amplikonů ze vzorků 30
      2.5.2. Ligace 31
      2.5.3. Příprava agarových misek 31
      2.5.4. Klonování 31
      2.5.5. PCR klonů DNA 32
   2.6. Sekvenování 32
      2.6.1. Sangerovské sekvenování klonovaných produktů 32

2.6.2. New generation sequencing....32
2.7. Analýza dat....33
2.7.1. Bioinformatická analýza dat....33
2.7.2. Statistická analýza dat....34
2.8. Fylogenetická analýza....34
3. Výsledky....36
3.1. Specificita detekčních primerů – ověření....36
3.2. Výskyt bakterie *Arsenophonus* v královnách a doprovodu....37
3.3. Výskyt bakterie *Arsenophonus* v roztočích ve vzorcích zimní měli....38
3.4. Bakterie *Arsenophonus* v mikrobiomu populace roztočů a včel odebraných ze stejného úlu....39
3.5. Fylogeneze....43
4. Diskuze....44
4.1. Výskyt....44
4.2. Taxonomie....45
4.3. Teorie příčiny výskytu bakterie *Arsenophonus*....46
4.4. Horizontální přenos....47
4.5. *Son killing*?....48
4.6. Biologický boj....49
5. Souhrn....50
6. Seznam použité literatury....51
7. Přílohy....i

Seznam použitých zkratek

PCR	Polymerázová řetězová reakce
Sk	zabíjení synů (*son killing*)
PSR	otcovský poměr pohlaví (paternal sex ratio)
A-	populace přeléčená antibiotiky, tj. neinfikovaná bakterií *Arsenophonus*
A+	populace nakažená bakterií *Arsenophonus*

1. Úvod

V posledních letech dochází po celém světě k velkým periodickým vymíráním včelstev (Colony Collapse Disorder – CCD). Jednou z uváděných příčin bývá roztoč *Varroa destructor* (Martin, 2001), který na včelách parazituje, a tím oslabuje včelí kolonie, až dojde k jejich zániku (shrnuto v Sammataro *et al.*, 2000). Včely i roztoči jsou si taxonomicky blízcí, a proto je obtížné vyvinout pesticidy s odlišným toxickým účinkem. Z tohoto důvodu je důležité objevit nějakou slabinu roztočů, kterou mohou být právě symbiotické bakterie. Výzkum „symbiotických" či „parazitických" bakterií může mít důležitou úlohu v biologické kontrole škůdců (Zabalou *et al.*, 2004; Zchori-Fein *et al.*, 2007).

V současné době byla identifikována symbiotická bakterie *Wolbachia*, která byla nalezena jak u roztoče *Varroa destructor* (Pattabhiramaiah *et al.*, 2011), tak u včely medonosné (*Apis mellifera*) (Hoy *et al.*, 2003; Jeyaprakash *et al.*, 2009). Kromě této bakterie se poprvé podařilo identifikovat bakterii *Arsenophonus*. Tato bakterie je maternálně i horizontálně děděná a její způsob manipulace s reprodukcí hostitele spočívá v tzv. zabíjení samců (Skinner, 1985). Bakterie zabíjí samčí embrya a tím mění poměr pohlaví roztočů ve prospěch samičího. Vyskytuje se u hmyzu (Nováková *et al.*, 2009), klíšťat (Grindle *et al.*, 2003) a křižáka obecného (*Araneus diadematus*) Clerck, 1757 (Duron *et al.*, 2008). Bakterie *Arsenophonus* byla detekována i u včel medonosných (Nováková *et al.*, 2009) a její zvýšený výskyt byl zaznamenán ve včelstvech postižených CCD (Cornman *et al.*, 2012).

Včely medonosné jsou významnými opylovači rostlin, na jejichž existenci je navázána řada dalších organismů. V poslední době však dochází k jejich značnému úbytku. Roztoč *Varroa destructor* má v tomto masivním úhynu pravděpodobně klíčovou úlohu. Výsledky mé diplomové práce mohou napomoci objasnění vztahů bakterie *Arsenophonus* s roztočem *Varroa destructor* a vést tak k jeho účinnější kontrole. Pro hlubší pochopení vlivu parazitických bakterií na jejich hostitele je nezbytné popsat jejich výskyt.

1.1. Cíle

Hlavní záměr této práce byla detekce bakterie *Arsenophonus* v roztoči *Varroa destructor* a včele medonosné. Za tímto účelem byly stanoveny následující cíle:

1) Jaké je taxonomické zařazení bakterie *Arsenophonus*?

2) Nachází se bakterie *Arsenophonus* častěji v roztočích *Varroa destructor*, nebo ve včelách medonosných?
3) Nachází se bakterie *Arsenophonus* ve včelích matkách nebo v jejich doprovodu?

1.2. Taxonomie

Bakterie *Arsenophonus* náleží do čeledi *Enterobacteriaceae* třídy γ - proteobakterie (Gherna *et al.*, 1991). Tato gramnegativní bakterie byla poprvé objevena v roce 1986 v parazitické vosičce *Nasonia vitripennis* (Walker, 1836) (Hymenoptera, Pteromalidae) (Gherna *et al.*, 1991; Werren *et al.*, 1986). O pět let později jí byl udělen název *Arsenophonus nasoniae* gen. nov., sp. nov. a *Arsenophonus* byl označen za nově objevený rod (Gherna *et al.*, 1991). V rámci rodu evidujeme další dva taxony *Arsenophonus*, bakterii *Arsenophonus triatominarum* a bakterii *Arsenophonus arthropodicus*. Postavení dalších bakterií v rámci rodu *Arsenophonus* je předmětem diskuzí, jedná se zejména o Candidatus *Phlomobacter fragariae* a Candidatus *Riesia pediculicola* (Allen *et al.*, 2007; Zreik *et al.*, 1998).

Bakterie Candidatus *Phlomobacter fragariae* byla shledána příbuznou bakterii *Arsenophonus nasoniae* s 92% podobností sekvencí 16S rRNA podle Zreik *et al.* (1998). K zařazení do rodu *Arsenophonus* se přiklání i Salar *et al.* (2010), Sémétey *et al.* (2007) a Bressan *et al.* (2012) na základě fylogenetických studií založených na 16S rRNA a genech *spo*T-*spo*U-*rec*G.

Ačkoliv se symbiont vší bakterie Candidatus *Riesia pediculicola* od bakterií rodu *Arsenophonus* značně liší, např. ve velikosti bakterií a velikosti genomu, byla u této bakterie také zjištěna příbuznost k bakteriím rodu *Arsenophonus* (Allen *et al.*, 2007). Allen *et al.* (2007) identifikovali na základě molekulární fylogenetické analýzy 16S rRNA 89% sekvenční podobnost s bakterií *Arsenophonus arthropodicus*.

Linie bakterie *Arsenophonus* asociované s hostiteli klíšťat, rostlin, zákeřnic, molic, některými druhy klošů a mravenců tvoří krátké větve s nízkou divergencí a nestálou pozicí v rámci rodu *Arsenophonus*, která se vyznačuje velkým množstvím polytomií (Nováková *et al.*, 2009). Pro symbionty vší patřící do rodu *Riesia* či některé kloše jsou naopak typické dlouhé větve. Robustní klastry tvoří bakterie *Arsenophonus* vyskytující se u zákeřnic, některých druhů klošů a stejnokřídlých (Nováková *et al.*, 2009). Podle Nováková *et al.* (2009) není klad *Arsenophonus* monofyletický a ani jej nemůžeme rozdělit do fylogeneticky odlišných ekologických typů.

Podle Dale *et al.* (2006) se překvapivě velmi blízce příbuzné linie rodu *Arsenophonus* vyskytují u vzdáleně příbuzných druhů hostitelů. To může být pravděpodobně způsobeno horizontálním přenosem mezi vzdáleně příbuznými druhy členovců.

1.3. Výskyt

Bakterie *Arsenophonus* se nachází u hmyzu (Nováková *et al.*, 2009), klíšťat (Grindle *et al.*, 2003) a křižáka obecného (*Araneus diadematus*) Clerck, 1757 (Duron *et al.*, 2008). Podle Duron *et al.* (2008) byla zatím zjištěna nákaza bakterií *Arsenophonus* u 5 % členovců.

V této době evidujeme výskyt bakterie *Arsenophonus nasoniae* u parazitických vosiček (*Nasonia*) (Gherna *et al.*, 1991), mravkolvů (Myrmeleontidae) (Dunn & Stabb, 2005), molic (Aleyrodidae) (Thao & Baumann, 2004), pijáků a klíšťat (Amblyommidae a Ixodidae) (Clay *et al.*, 2008; Dergousoff a Chilton, 2010; Grindle *et al.*, 2003; Mediannikov *et al.*, 2012). Bakterie *Arsenophonus arthropodicus* byla detekována u klošů (Hippoboscidae) (Dale *et al.*, 2006). Bakterie *Arsenophonus triatominarum* byla nalezena u zákeřnic (*Triatoma*) (Hypša & Dale, 1997) a mšic (Aphidoidea) (Russell *et al.*, 2003). U merovitých (Psyllidae) byly nalezeny sekvence s nejvyšší podobností bakterii *Arsenophonus nasoniae* a *Arsenophonus triatominarum* (Spaulding & von Dohlen, 2001; Subandiyah *et al.*, 2000). Bakterie *Arsenophonus* sp. byla dále detekována u klošů (Streblidae) (Trowbridge *et al.*, 2006).

U vší (Anoplura) byla detekována bakterie Candidatus *Riesia pediculicola* (Allen *et al.*, 2007). Bakterii Candidatus *Phlomobacter fragariae* detekovali u jahod (*Fragaria × aranassa Duch.)* (Tanaka *et al.*, 2006; Terlizzi *et al.*, 2007) a v nektaru mandloně obecné (*Amygdalus comminis*) a citroníku rajském (*Citrus paradisi*) (Aizenberg-Gershtein *et al.*, 2013).

Výskyt bakterie *Arsenophonus nasoniae* byl prokázán i u včely medonosné (Nováková *et al.*, 2009; Babendreier *et al.*, 2007) a zvýšený výskyt bakterie *Arsenophonus* byl zaznamenán ve včelstvech postižených CCD (Cornman *et al.*, 2012). Bakterie *Arsenophonus* byla také nalezena ve včelami sbíraném pylu (Corby-Harris *et al.*, 2014).

Vzhledem ke schopnosti jak vertikálního tak horizontálního přenosu bakterie *Arsenophonus* bychom mohli předpokládat její masivní výskyt, ten však např. ve srovnání s bakterií *Wolbachia* je poměrně nízký. Pokud porovnáme výskyt bakterie *Arsenophonus* a *Wolbachia* u taxonu *Nasonia*, zjistíme, že bakterie *Wolbachia* se nachází u všech zástupců oproti bakterii *Arsenophonus* s nižším výskytem (Balas *et al.*, 1996; Raychoudhury *et al.*, 2009).

Bakterie *Wolbachia* se tedy jeví jako úspěšnější, ačkoliv má omezenější možnosti přenosu, protože se přenáší především maternálně (Hoffmann & Turelli, 1988). To lze vysvětlit neúspěšným horizontálním přenosem bakterie *Arsenophonus*, který nemusí dosahovat v přirozených podmínkách stejných hodnot jako při výzkumu v laboratoři (Duron *et al.*, 2010). Další příčinou může být i rozdílný dopad na fitness hostitele, kdy rozdílné náklady pro hostitele mohou ovlivnit „ochotu" hostitele danou bakterii přenášet. Svou roli však určitě hraje i důkladnější výzkum bakterie *Wolbachia*, která byla popsána o 50 let dříve než bakterie *Arsenophonus* (Hertig, 1936). Z důvodu nedostatku informací o ovlivnění fitness hostitele bakterií *Arsenophonus* lze toto téma doporučit dalšímu studiu.

1.4. Morfologie a lokalizace

Tato tyčinkovitá bakterie byla poprvé objevena a izolována v roce 1986 týmem Werren *et al.* (1986) z tkáně parazitické vosičky *Nasonia vitripennis* (Walker, 1836) (Hymenoptera, Pteromalidae) a hemolymfy jejího hostitele *Neobellieria bullata* (Parker, 1916) (Diptera, Sarcophagidae). Jedná se o nepohyblivé vláknité bakterie, jejichž šířka činí 0,40 – 0,57 pm a dosahují délky 6,9 – 10,0 pm (Gherna *et al.*, 1991). V koloniích vytváří kulovité útvary. U *Nasonia vitripennis* byla zjištěna infekce bakterií *Arsenophonus nasoniae* ve středním střevě, mozku, tukovém tělesu, svalech, očích, samičích reprodukčních orgánech a v hemocytech (Huger *et al.*, 1985).

Bakterie *Arsenophonus nasoniae* byla lokalizována metodou fluorescenční in situ hybridizace (FISH) u molice bavlníkové *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) (Hemiptera, Aleyrodidae) v bakteriocytech, ve středním střevě a slinných žlázách (Rana *et al.*, 2012).

Bakterie *Arsenophonus triatominarum* byla nalezena pomocí elektronové mikroskopie v cytoplazmě hemocytů, ve slinných žlázách, srdci, nervovém gangliu, viscerální svalovině, nefrocytech, vaječnících, varlatech a dorzálních cévách *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera, Reduviidae) (Hypša & Dale, 1997).

Pomocí primerů specifických pro tkáně byla bakterie *Arsenophonus arthropodicus* detekována v hemocytech, tukovém tělese, střevě a reprodukčních orgánech v *Pseudolynchia canariensis* (Macquart in Webb & Berthelot, 1839) (Diptera, Hippoboscidae) (Dale *et al.*, 2006).

Pomocí elektronové mikroskopie nalezli Bressan *et al.* (2009) bakterii Candidatus *Phlomobacter fragariae* ve slinných žlázách, střevě a samičích reprodukčních orgánech *Pentastiridius leporinus* (Linnaeus, 1761) (Hemiptera, Cixiidae).

Bakterii Candidatus *Riesia pediculicola* lokalizovali Sasaki-Fukatsu *et al.* (2006) v bakteriocytech ve středním střevě, vejcovodech a oocytech vši šatní *Pediculus humanus* Linnaeus, 1758 (Phthiraptera, Pediculidae) a Allen *et al.*, (2007) v bakteriomech (autor uvádí mycetomech) vši dětské *Pediculus humanus capitis* DeGeer, 1778 (Phthiraptera, Pediculidae) pomocí metody FISH.

Při použití rodově specifických sond metodou FISH byla bakterie *Arsenophonus* lokalizována v bakteriocytech molicovitých *Siphoninus phillyreae* (Haliday, 1835) (Škaljac *et al.*, 2013), molice bavlníkové (Gottlieb *et al.*, 2008; Škaljac *et al.*, 2013), molice skleníkové *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood, 1856) (Skaljac *et al.*, 2010) a *Bemisia tuberculata* Bondar, 1923 (Hemiptera, Aleyrodidae) (Marubayashi *et al.*, 2014).

Bakterie *Arsenophonus* byla nejčastěji detekována v samičích reprodukčních orgánech, bakteriocytech, hemocytech a trávicím traktu. Při detailnější lokalizaci byla nacházena i ve slinných žlázách, tukovém tělese a svalovině. Tato problematika je však zatím okrajovým tématem, kdy bylo prozkoumáno pouze úzké spektrum hostitelských taxonů. Lze jej doporučit dalšímu studiu.

1.5. Způsob přenosu

Bakterie *Arsenophonus* je přenášena jak vertikálně z matky na potomstvo, tak prostou infekcí (Skinner, 1985). Svůj přenos posiluje manipulací s reprodukcí hostitele. Tento fenomén se nazývá zabíjení synů (*son killing, sk*). Způsobuje mortalitu samčího potomstva a vychýlení poměru pohlaví ve prospěch samičího.

Reciprokým křížením nakažených a nenakažených samic a samců Skinner (1985) potvrdil maternální přenos *sk* znaku, kdy v případě křížení nakažené samice s nakaženým či nenakaženým samcem došlo v F2 generaci ke zvýšení počtu nevylíhnutých vajíček. Pokud byl křížen nakažený samec s nenakaženou samicí, došlo k nízké mortalitě vajíček stejně jako v případě kontrolního křížení neinfikovaného samce s neinfikovanou samicí, což dokazuje, že se nejedná o případ paternálního přenosu ani o dědičný faktor chromosomálního charakteru.

V dalším experimentu Skinner (1985) zjistil, že k přenosu bakterie dojde i při tzv. superparazitismu, kdy na jednom hostiteli parazituje několik vosiček *Nasonia vitripennis.* Poté co byl nakaženým samicím zpřístupněn hostitel k parazitaci, byly odebrány a stejný hostitel byl poskytnut nenakaženým samicím. Výsledné potomstvo jak nakažených, tak původně nenakažených samic vyvíjejících se na stejném hostiteli, vykazovalo *sk* znaky projevující se vysokou mortalitou potomků ve srovnání s potomstvem, kdy se na superparazitismu podílely pouze neinfikované samice. *Sk* znak byl dále přenášen vertikálně po několik generací. U 72 ze 74 vajíček původně nenakažených samic vystavených kontaktu s nakaženými vajíčky byla zjištěna infekce bakterií *Arsenophonus*, což činí 97% účinnost přenosu bakterie. Bylo zjištěno, že hostitel je infikován při parazitaci a sáním hemolymfy ze společného hostitele dojde k nákaze potomků (Skinner, 1985; Werren *et al.*, 1986).

Horizontální přenos bakterie *Arsenophonus* v rámci superparazitismu byl potvrzen i v případě přenosu na nepříbuzné druhy, kdy Duron *et al.* (2010) zkoumali efektivnost přenosu bakterie *Arsenophonus* z parazitické vosičky *Nasonia vitripennis* na jiné druhy vosiček čeledi kovověnkovití *N. giraulti* Darling, 1990; *N. longicornis* Darling, 1990; *Muscidifurax raptorellus* Kogan & Legner, 1970 (Hymenoptera, Pteromalidae) a vzdáleněji příbuzný druh *Melittobia acasta* (Walker, 1839) (Hymenoptera, Eulophidae) (Duron *et al.*, 2010). Jako spolehlivý důkaz horizontálního přenosu bakterie *Arsenophonus* byla přítomnost infekce u jedinců F2 generace, která se objevila u všech zmíněných druhů ve srovnání s nulovým výskytem u kontrolních neinfikovaných populací. U infikovaných potomků byla dále testována schopnost vertikálního přenosu v dalších generacích, která se projevila s 80% účinností v případě potomků F2 generace a u nejméně jedné linie každého druhu po dalších pět generací. Prokázán byl i zpětný horizontální přenos z *Muscidifurax raptorellus* infikovaného bakterií *Arsenophonus* na neinfikovaného hostitele *Nasonia vitripennis*.

Vertikální a zároveň horizontální přenos bakterie *Arsenophonus* můžeme považovat za unikátní, srovnáme-li bakterii *Arsenophonus* s ostatními bakteriemi schopnými manipulovat s reprodukcí hostitele, jako jsou bakterie *Wolbachia* a *Cardinium*, které využívají převážně maternálního přenosu (Hoffmann & Turelli, 1988; Zchori-Fein *et al.*, 2001). Kvůli těsnému symbiotickému vztahu s hostitelem je pro ně obtížné přežívat mimo tělo hostitele a přenášet se infekcí (Dobson *et al.*, 2002).

1.6. Vliv na fenotyp

1.6.1. *Son killing*

Nasonia vitripennis je drobná vosička, která parazituje na mouchách zejména z čeledi bzučivkovití (Calliphoridae), z čeledi masařkovití (Sarcophagidae) a z čeledi mouchovití (Muscidae), svá vajíčka klade do jejich kukel (shrnuto ve Whiting, 1967). Tato vosička využívá při reprodukci tzv. arrhenotokní partenogeneze neboli haplodiploidie, kdy se z oplozených vajíček líhnou diploidní samice a z neoplozených haploidní samci.

Poměr pohlaví těchto vosiček mohou ovlivňovat dva faktory: (i) počet samic na hostiteli, (ii) bakterie *Arsenophonus*. V případě, že se nachází na hostiteli pouze jedna samice vosičky *Nasonia vitripennis*, dochází k převažujícímu samičímu poměru pohlaví (Werren, 1980; Werren, 1983). S přibývajícím počtem přítomných samic je poměr pohlaví vyrovnanější, protože se zvyšuje kompetice mezi nepříbuznými syny podle Hamiltonovy teorie lokální kompetice o partnery (Hamilton, 1967). Dále byl prokázán vliv bakterie *Arsenophonus*.

Bakterie *Arsenophonus* dokáže manipulovat s poměrem pohlaví vosičky *Nasonia vitripennis* snižováním počtu samčího potomstva, čehož dosahuje specifickým jevem nazývaným zabíjení synů (*son killing, sk*) (Skinner, 1985). Způsobuje masivní ztráty samčích zárodků a tím umožní dominanci potomků samičího pohlaví.

V experimentu Skinnera (1985) dosahovaly počty samčích potomků infikovaných samic pouze 0 – 5 % oproti neinfikovaným samicím s 11 – 15 % samčích potomků. Příčinou takto nízkého počtu samčího potomstva v případě samic nakažených bakterií *Arsenophonus* je mortalita samčího potomstva, která dosahovala v experimentu Skinner (1985) až 77 %. K podobnému výsledku dospěli i Balas *et al.* (1996), kde mortalita samčího potomstva činila 68 % v případě samic nakažených bakterií *Arsenophonus*. Dalším efektem *sk* v experimentu Skinner (1985) bylo značné snížení celkového počtu nakladených vajíček nakažených samic ve srovnání s kontrolními neinfikovanými samicemi, které produkovaly až o třetinu více vajíček. V případě vajíček nakažených samic navíc nedošlo u 75,9 % k vylíhnutí potomků. U vajíček nenakažených samic se jednalo pouze o 2,6 – 2,9 % nevylíhnutých vajíček.

Werren *et al.* (1986) v experimentu nakazili 15 jedinců parazitické vosičky *Nasonia vitripennis* bakterií *Arsenophonus*. Veškeré jejich potomstvo vykazovalo znaky zabíjení synů vyznačující se dominancí samičího poměru pohlaví a vyšší mortalitou samčích potomků. V dalších generacích byl však efekt *sk* již snížen (Werren *et al.*, 1986).

Duron *et al.* (2010) porovnávali přenos *sk* znaku u infikovaných a neinfikovaných panenských samic, které produkují pouze haploidní samce, a u oplozených samic produkujících jak dcery, tak syny. Tento srovnávací experiment prováděli u různých druhů parazitických vosiček *Nasonia vitripennis, N. giraulti, N. longicornis, Muscidifurax raptorellus* a *Melittobia acasta* (Duron *et al.*, 2010).

V případě druhů *Nasonia vitripennis, N. giraulti, N. longicornis* a *Muscidifurax raptorellus* měly panenské samice infikované bakterií *Arsenophonus* prokazatelně nižší počty samčích potomků oproti kontrolnímu samčímu potomstvu neinfikovaných samic (Duron *et al.*, 2010). Celkové snížení potomstva z důvodu mortality samčích potomků u panenských samic *Nasonia vitripennis* potvrdili i Balas *et al.* (1996). Vyšší mortalita synů byla naměřena u blíže příbuzných parazitických vosiček *Nasonia* (81,2 - 92,5 %) než u vzdáleněji příbuzného *Muscidifurax raptorellus* (50 %) (Duron *et al.*, 2010). U panenských samic *Melittobia acasta* nedošlo k produkci žádného potomstva.

Počty samčího potomstva infikovaných oplozených samic dosahovaly nižších hodnot než v případě samic nenakažených, což vedlo k vychýlení poměru pohlaví ve prospěch samičího (Duron *et al.*, 2010). V případě oplozených samic *Melittobia acasta* nakažených bakterií *Arsenophonus* bylo pozorováno pouze 10% snížení počtu samčího potomstva oproti potomstvu kontrolních neinfikovaných samic. Nízké počty samčího potomstva jsou pro tento druh charakteristické (shrnuto v Matthews *et al.*, 2009), takže tento výsledek není třeba zohledňovat. Oproti tomu Balas *et al.* (1996) nezaznamenali významné rozdíly v počtu celkového potomstva nakažených oplozených samic u *Nasonia vitripennis* oproti kontrolním nenakaženým oplozeným samicím, což vysvětlují běžnou dominancí samičího potomstva u tohoto druhu, kdy počty samčího potomstva jsou natolik nízké, že jejich mortalita nebyla statisticky zaznamenatelná.

Mechanismus, kterým bakterie *Arsenophonus* dokáže manipulovat s poměrem pohlaví u vosičky *Nasonia vitripennis*, byl částečně odhalen týmem Ferree *et al.* (2008). Bakterie *Arsenophonus* je schopna zabránit vytvoření maternálního centrozomu, čímž zamezí vyvinutí se samčích vajíček v larvu a dochází k jejich mortalitě (Ferree *et al.*, 2008). Podle Ferree *et al.* (2008) bakterie *Arsenophonus* vypouští toxin, jenž prostoupí vitelinní a plazmatickou membránou vajíčka a zabrání vytvoření centrozomu.

Zajímavým experimentem bylo zkřížení samic *Nasonia vitripennis* nakažených bakterií *Arsenophonus* se samci, u kterých se vyskytoval tzv. „otcovský poměr pohlaví“ (paternal sex ratio, *PSR*) (Ferree *et al.*, 2008). PSR se projevuje narozením téměř výlučně

samčího potomstva a dochází k němu při zkřížení samice se samcem, jehož spermie obsahují nadpočetné chromozomy (Werren *et al.*, 1981; Werren & van den Assem, 1986; Nur *et al.*, 1988). Tyto chromozomy způsobí nesprávnou funkci otcovských chromozomů v embryu, která vede k jejich ztrátě (Nur *et al.*, 1988). Příčinou dominance samčích potomků tedy není mortalita samičího potomstva, ale nemožnost vývinu samic kvůli haplodiploidnímu určení pohlaví, které při absenci otcovských chromozomů umožňuje vznik pouze haploidních samců (Werren *et al.*, 1981).

Při zkřížení samic parazitických vosiček *Nasonia vitripennis* infikovaných bakterií *Arsenophonus* s PSR samci došlo k produkci potomstva s 90% dominancí samčího pohlaví (Ferree *et al.*, 2008). Toto potomstvo bylo nakaženo bakterií *Arsenophonus*, což by mohlo vést k závěru, že tato bakterie se nesnaží zabíjet samčí potomstvo, ale pouze eliminovat vývoj jedinců z neoplozených vajíček (Ferree *et al.*, 2008). Jedním ze způsobů, jak „vyléčit" hostitele od parazitického účinku *son killing* bakterie *Arsenophonus*, se tedy jeví oplození samic spermií obsahující nadpočetné chromozomy PSR.

1.6.2. Další vlivy bakterie *Arsenophonus* na fitness hostitelů

V případě populace molice bavlníkové *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) nakažené bakterií *Arsenophonus* byl zkoumán vliv na fitness hostitele po přeléčení populace antibiotiky tetracyklin (Raina *et al.*, 2015). Výsledky prokázaly, že samice přeléčené populace (A-) ve srovnání s nakaženou (A+) nakladly více vajíček, tj. A+: 69.4 ± 3.91; A-: 115.2 ± 6.65. V počtu vylíhlých larev nebyly zjištěny významné rozdíly. Překvapivě nebyly zjištěny ani výrazné rozdíly v poměru pohlaví mezi nakaženou a přeléčenou populací, jak bychom mohli předpokládat vzhledem k jevu *son killing* u *Nasonia vitripennis* způsobeným bakterií *Arsenophonus*. Odporuje to i tvrzení Ferree *et al.*(2008), podle nichž je jev *son killing* úzce spjat se specifickým haplodiploidním určením pohlaví *Nasonia vitripennis*, to se však vyskytuje i u molice skleníkové (Byrne a Devonshire, 1996).

Výsledky Raina *et al.* (2015) statisticky analyzovali a zjistili přítomnost korelace mezi plodností (počet nakladených vajíček) a počtem jedinců, kteří se dožili dospělosti, a dále korelaci mezi líhnivostí (počet vylíhlých larev) a počtem dospělců.

Dále přítomnost bakterie *Arsenophonus* ovlivnila délku vývoje od vajíčka po dospělce a počet jedinců úspěšně se vyvinutých v dospělce (Raina *et al.*, 2015). Jedinci přeléčené populace se vyvíjeli pomaleji oproti jedincům kontrolní infikované populace. Také počet

dospělců, kteří úspěšně dokončili svůj vývoj, byl vyšší v přeléčené populaci. Nečekaným zjištěním je rozdílná doba trvání inkubace vajíčka a doba trvání 2. a 4. instaru, která byla prokazatelně delší v případě jedinců přeléčených tetracyklinem.

Vliv bakterie *Arsenophonus* byl zaznamenán i v případě délky života, kde se jak samci, tak samice přeléčené populace dožívali výrazně vyššího věku (Raina *et al.*, 2015). V případě samců se jednalo o průměrně 6,2 dnů více než kontrolní populace a v případě samic dokonce o 11 dnů více než infikovaná populace.

Tyto výsledky jednoznačně prokazují, že přítomnost bakterie *Arsenophonus* snižuje celkovou fitness hostitele molice skleníkové projevující se ve snížené plodnosti, líhnivosti a kratší délce života.

1.6.3. Proč se udrží *son killing* v hostiteli

V současné době známe tři teorie vysvětlující udržení *son killing* v populacích: (i) uvolnění zdrojů, (ii) zamezení inbreedingu a (iii) teorie inokula (Balas *et al.*, 1996). První pochází od Skinner (1985), podle něhož samičí potomstvo samice s *sk* znakem má díky mortalitě synů více zdrojů, čímž se zvýší jejich fitness a mají tak konkurenční výhodu oproti ostatním. Pro samotnou samici se však jedná o ztrátu, protože energie vynaložená do produkce synů mohla být využita pro ně samotné. Druhá teorie uvažuje využití nákazy bakterie *Arsenophonus* jako způsob, kterým sestry zabrání páření se svými bratry (Werren, 1987). V případě kompletního projevu *son killing* dojde k mortalitě všech samčích potomků, čímž je inbreeding znemožněn. I když přenos bakterie *Arsenophonus* není úplný, je možnost inbreedingu alespoň snížena a infikované samice jsou i přesto zvýhodňovány selekcí. Podle Balas *et al.* (1996) je třetí hypotézou tvorba inokula bakterií *Arsenophonus* v usmrcených samčích potomcích, kteří zemřeli díky *son killing* způsobeném bakterií *Arsenophonus*. Tato inokula slouží pro horizontální přenos bakterie *Arsenophonus*, naopak samičí potomstvo slouží pro vertikální přenos (Balas *et al.*, 1996).

První teorii vyvrátili Balas *et al.* (1996), kteří měřili průměr šířky hlavy infikovaných a neinfikovaných samic vosiček *Nasonia vitripennis* a *N. longicornis* pro porovnání jejich fitness. Překvapivým zjištěním byly nižší hodnoty průměru šířky hlavy infikovaných samic, což svědčí pro neplatnost teorie uvolnění zdrojů, podle které by měly infikované samice větší fitness kvůli větší velikosti. K podobnému závěru došli i Raina *et al.* (2015), kteří zjistili nižší

hodnoty plodnosti, líhnivosti a kratší délku života u samic molice skleníkové nakažené bakterií *Arsenophonus*, což je jasný důkaz snížení celkové fitness hostitele.

Alternativním vysvětlením může být uplatnění hypotézy uvolnění zdrojů pouze v přemnožené populaci, protože poměr pohlaví *N. vitripennis* se mění právě na základě přemnoženosti populace. S přibývajícím počtem samic stoupá počet samců, při nízkých počtech samic výrazně převažují samice (Werren, 1980; Werren, 1983), a proto se v nepřemnožených populacích nemůže uvolnit dostatečné množství zdrojů (Balas *et al.*, 1996). Navíc podle Balas *et al.* (1996) stačí bakterii *Arsenophonus* pouze 5,5 – 5,7% nárůst fitness infikovaných samic oproti neinfikovaným pro udržení se selekcí.

Druhou teorii podporují rovnice vytvořené Werren (1987), které řeší otázku, zda *son killing* zvyšuje fitness nakažených samic. Vyplývá z nich, že k udržení *son killing* dochází i v případě, kdy inbreeding není příliš nákladný pro fitness samic.

Balas *et al.* (1996) uvažují ještě čtvrtou teorii, jež vznikla spojením několika teorií předchozích. Podle ní je pro udržení bakterie klíčový horizontální přenos a *son killing* je pouze jeho vedlejším efektem. Domnívají se, že s nástupem schopnosti horizontálního přenosu bakterie se objevila nová *son killing* forma bakterie, která konkurovala původní formě bakterie, která nezpůsobovala *son killing*. Nová forma bakterie bylo schopná využít zabíjení synů k zvýšení fitness hostitele a tak původní formu překonat. Způsob získání fitness přitom mohlo vycházet z uvolnění zdrojů nebo zabránění inbreedingu.

Z dosavadních poznatků nelze vyvodit jednoznačné závěry, které by nám objasnily skutečnou příčinu udržení bakterie *Arsenophonus* v populacích hostitelů. Klíčovou úlohu zde však nepochybně hraje schopnost bakterie *Arsenophonus* přenášet se jak vertikálně, tak horizontálně.

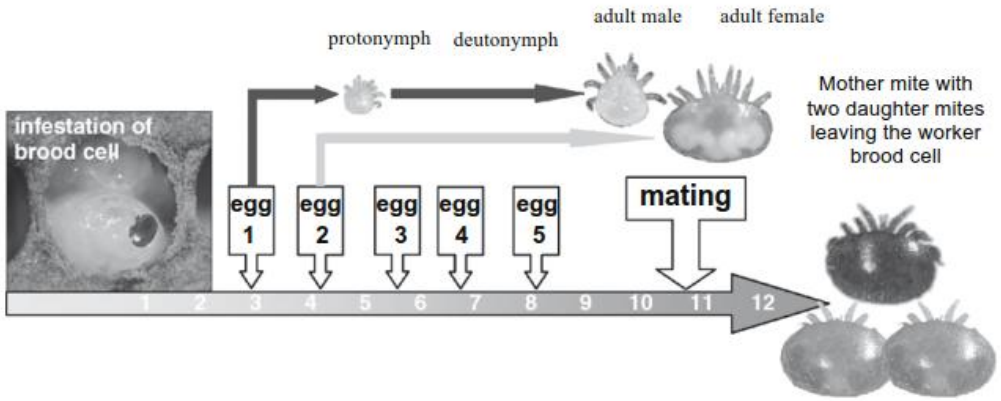
1.7. Roztoč *Varroa destructor*

Roztoč *Varroa destructor* (Anderson & Trueman, 2000) je parazitický roztoč náležící do čeledi kleštíkovití (Varroidae) řádu čmelíkovců (Mesostigmata). Roztoč parazituje především na včelách medonosných (*Apis mellifera*) Linnaeus, 1758 a na včelách východních (*Apis cerana* Fabricius, 1793), kdy způsobuje tzv. varroázu (Delfinado & Baker, 1974). Je celosvětově rozšířený s výjimkou Austrálie (shrnuto v Rosenkranz *et al.*, 2010).

U roztoče *Varroa destructor* evidujeme pohlavní dimorfismus. Samice jsou větší, oválné s hnědým zbarvením a sklerotizovaným štítem (Oudemans, 1904). Samci jsou menší, hruškovitého tvaru s bílým zbarvením a nižší sklerotizací štítu (Delfinado & Baker, 1974).

Životní cyklus roztoče *Varroa destructor* je úzce spjat s jeho hostitelem a můžeme jej rozdělit na dvě fáze: reprodukční a foretickou (Obr. 1). Jeho rozmnožování probíhá v buňkách včelího plodu (Sevilla, 1963, citováno podle Akratanakul, 1975).V buňkách se samice živí hemolymfou larvy a při dostatečném nasycení naklade první vajíčko (Rehm & Ritter, 1989). Roztoči mají haplodiploidní určení pohlaví, kdy první vajíčko je neoplozené a vylíhne se z něj haploidní samec (Rehm & Ritter, 1989). Další vajíčka jsou již oplozená vedoucí k produkci samic. Celkem samice naklade kolem 5-6 vajíček, což je determinováno velikostí buněk včelího plodu (Martin, 1994). Potomstvo se vylíhne v larvu a živí se sáním hemolymfy kukly včel (Sevilla, 1963, citováno podle Akratanakul, 1975). Dceřiné samice se posléze páří se samcem, tj. synem původní matky pokud se nenalézá v buňce více samic (Donze *et al.*, 1996). Spářené samice po vylíhnutí plodu opouští buňku. Jejich další vývoj probíhá foreticky na dospělých včelách následovaný reprodukční fází opět v buňkách plodu (Sevilla, 1963, citováno podle Akratanakul, 1975). Samec nemá dostatečně vyvinuté ústní ústrojí a zanedlouho hyne (Delfinado & Baker, 1974; Akratanakul, 1975).

Obr. 1 – Životní cyklus roztoče *Varroa destructor* převzato z Rosenkranz *et al.*, 2010



1.8. Včela medonosná

Včela medonosná (*Apis mellifera*) Linnaeus, 1758 je společenský hmyz náležící do čeledi včelovití (Apidae) řádu blanokřídlí (Hymenoptera). Včelí společenstvo se vyznačuje speciální strukturou zahrnující včelí královnu neboli matku, trubce a dělnice, které zastávají různé funkce v rámci včelstva. Jednou z funkcí dělnic je tzv. doprovod včelí matky, který se o včelí matku stará, tj. neustále ji krmí, čistí a také předávají feromony včelí královny ostatním včelám (shrnuto v Pham-Delegue *et al.*, 1993).

V posledních letech dochází po celém světě k velkým periodickým vymírání včelstev (Colony Collapse Disorder – CCD). Příčina vzniku není jednoznačně prokázána, eviduje se kolem 60 možných jevů, jako je špatná výživa včel, používání pesticidů, různé patogenní organismy, atd. (Evans *et al.*, 2009). Ve včelstvech postižených CCD byl prokázán vyšší počet patogenních mikroorganismů oproti CCD negativním včelstvům dle studie (Cornman *et al.*, 2012). Největším nebezpečím pro evropská včelstva je však právě varroáza.

Napadení včelstva roztočem *Varroa destructor* způsobuje celkové oslabení včelí kolonie vedoucí při vysokém stupni nákazy až k jejímu úhynu (shrnuto v Sammataro *et al.*, 2000). Problém léčby varroázy akaricidními přípravky spočívá v současném škodlivém působení na zdravé včely a včelí produkty (Lodesani *et al.*, 2008). Další komplikací je vznik rezistence (Milani, 1994). Ideálním řešením se jeví biologický boj, ale v současné době nejsou žádné metody biologické kontroly známy. Velký potenciál má tzv. symbiont-based control strategy, která využívá symbiotických mikroorganismů v boji se škůdci (Zchori-Fein *et al.*, 2007). Objasnění vztahů bakterie *Arsenophonus* s roztočem *Varroa destructor* a včelou medonosnou by mohlo vést k jeho účinnější kontrole.

2. Materiál a metodika

2.1. Odběr materiálu

2.1.1. Roztoči ze zimní měli

Odběr vzorků zimní měli zajistil Výzkumný ústav včelařský v Dole, jejichž laboratoř nám vzorky poskytla. Vzorky samic roztočů *Varroa destructor* byly pomocí flotace (Ritter, 2008) odebrány ze zimní měli na 27 stanovištích České republiky v prosinci 2010 a v lednu 2011 (Tab. 1). Jeden vzorek obsahoval 10 dospělých samic roztoče *Varroa destructor*. Zimní měl byla vždy smetena pouze z jednoho včelína na dané lokalitě. Roztoči byli uchováni v 96% etanolu v mrazicím boxu (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA) o teplotě -80°C do extrakce DNA.

Tabulka 1 – Sledované lokality v České republice v zimě 2010 - 2011

No.	**Stanoviště**	**Okres**	**GPS souřadnice**	
1	Trhanov	Domažlice	49°25'7"	12°50'40"
2	Horní Bojanovice	Břeclav	48°57'20"	16°47'41"
3	Bulhary	Břeclav	48°49'22"	16°43'55"
4	Myslín	Písek	49°32'7"	14°1'36"
5	Přibice	Brno - venkov	48°57'33"	16°34'40"
6	Kurdějov	Břeclav	48°57'12"	16°46'5"
7	Brod nad Dyjí	Břeclav	48°52'38"	16°31'38"
8	Moravská Nová Ves	Břeclav	48°48'26"	17°0'55"
9	Hlohovec	Břeclav	48°46'21"	16°46'16"
10	Kdyně	Domažlice	49°23'35"	13°3'39"
11	Omice	Brno - venkov	49°11'19"	16°27'4"
12	České Velenice	Jindřichův Hradec	48°46'47"	14°56'11"
13	Radějov	Hodonín	48°51'56"	17°20'7"

14	Hořenice	Náchod	50°22'12"	15°54'48"
15	Klášterec nad Ohří	Chomutov	50°24'5"	13°10'53"
16	Obora	Jičín	50°21'56"	15°30'47"
17	Heřmanova Huť	Plzeň - sever	49°42'37"	13°4'39"
18	Újezdec	Jindřichův Hradec	49°12'16"	14°47'7"
19	Klenov	Jindřichův Hradec	49°11'40"	14°53'22"
20	Lom u Tachova	Tachov	49°49'14"	12°40'41"
21	Kruh	Semily	50°33'51"	15°29'33"
22	Majdalena	Jindřichův Hradec	48°57'33"	14°51'19"
23	Pravčice	Kroměříž	49°19'33"	17°29'34"
24	Železnice	Jičín	50°28'43"	15°22'48"
25	Kadaň	Chomutov	50°23'9"	13°15'16"
26	Střeleč	Jičín	50°28'56"	15°15'37"
27	Kývalka	Brno - venkov	49°11'24"	16°26'57"

2.1.2. Vzorky roztočů *Varroa destructor* a včely medonosné *Apis mellifera* získané v témže včelstvu

Vzorky samic roztočů *Varroa destructor* a dělnic včel medonosných byly odebrány na 7 stanovištích České republiky během roku 2014 a 2015 ve spolupráci s Výzkumným ústavem včelařským v Dole (Tab. 2). Roztoči byli sbíráni ze spadových desek, které byly ponechány na dně úlu po dobu sedmi dní od použití akaricidního přípravku. Na základě počtu roztočů ze spadové desky byly následně stanoveny jednotlivé kategorie: (1) – 1-50 roztočů, (2) – 51-100 roztočů, (3) – 101 a více roztočů (Tab. 2). Na každé lokalitě byli roztoči spočítáni a umístěni do sterilních plastových 1,5ml Eppendorfových zkumavek (Sterile Microcentrifuge Tube 1,5 ml, Eppendorf® Safe-Lock™, Hamburg, Germany). Počty odebraných roztočů a použité léčebné látky jsou uvedeny v Tabulce 3. Současně s roztoči

bylo pomocí smetáčku odebráno 10 jedinců včel z první plodové plástve a umístěno do igelitového sáčku (Tab. 3). Odebrané vzorky včel byly převezeny do laboratoře na ledě. Po transportu byli roztoči i včely uloženi do mrazicího boxu o teplotě -80°C až do extrakce DNA.

Tabulka 2 – Sledované lokality v České republice v letech 2014/2015

No.	Stanoviště	GPS souřadnice		Datum odběru	Počet včelstev	Napadení varroázou		
						1	2	3
1	Horní Lhota	49°35′43″	14°57′25″	26. 9. 2014	1		1	
2	Kývalka	49°11′24″	16°26′57″	14. 9. 2015	1			1
3	Postřižín	50°13′59″	14°23′12″	29. 10. 2014	4		2	2
4	Přelovice	50°13′59″	14°23′12″	14. 9. 2015	2		2	
5	Hole	50°10′53″	14°15′49″	29. 10. 2014	1			1
				3. 12. 2014	2		1	1
6	Střeleč	50°29′3″	15°15′14″	10. 2. 2014	3	3		
7	Štoky - Skřivánek	49°30′9″	15°35′19″	8. 7. 2014	13		2	11

Legenda: Kategorie napadení varroázou; (1) – 1-50 roztočů, (2) – 51-100 roztočů, (3) – 101 a více roztočů.

Tabulka 3 – Počty odebraných jedinců a použité akaricidní přípravky u jednotlivých lokalit

No.	Stanoviště	Včelstvo	*Varroa destructor*	*Apis mellifera*	Léčba
1	Horní Lhota	H2	50	10	Gabon PA92
2	Kývalka	K59	41	10	Formidol 40mL
3	Postřižín	P1	50	10	Formidol 40mL
		P2	50	10	
		P3	50	10	
		P4	50	10	
4	Přelovice	Pr1	50	10	Formidol 40mL Gabon PA92
		Pr2	50	10	
5	Hole	S5	10	10	Formidol 40mL
		S7	10	10	
		S8	50	10	
6	Střeleč	St1	30	10	Formidol 40mL
		St2	30	10	
7	Štoky - Skřivánek	Z1	50	10	Gabon PA92
		Z29	50	10	
		Z33	50	10	
		Z40	50	10	

		Z41	50	10	
		Z705	50	10	
		Z706	50	10	
		Z707	50	10	
		Z708	50	10	
		Z713	50	10	
		Z714	50	10	
		Z717	50	10	
		Z74	50	10	

2.1.3. Královny a doprovod

Odběr vzorků včely medonosné zajistil Výzkumný ústav včelařský v Dole, který nám vzorky poskytl po výměně matek. Vždy jedna královna a její doprovod (10 mladušek) bylo odebráno z úlů VÚVč a z úlů v Horní Lhotě v roce 2015 (Tab. 4). Následně byly včely umístěny do plastových transportních klícek a převezeny na ledě do laboratoře, kde byly uskladněny v hlubokomrazicím boxu o teplotě -80°C až do extrakce DNA.

Tabulka 4 – Sledované lokality v České republice v roce 2015

No.	Stanoviště	Okres	GPS souřadnice	
1	Máslovice Dol	Praha - východ	50°12'14.326"	14°22'0.411"
2	Horní Lhota	Benešov	49°35′43″	14°57′25″

2.2. Extrakce

2.2.1. Extrakce DNA z roztoče *Varroa destructor*

Extrakce byla provedena shodným způsobem pro všechny vzorky roztočů. Dle typu experimentu od 10 do 50 jedinců bylo ve sterilních plastových 1,5ml Eppendorfových zkumavkách čištěno pro odstranění povrchové mikroflóry 5% chlornanem sodným (Savo, Unilever, London, UK), 96% etanolem po dobu 3 min a poté 3x opláchnuto pomocí sterilního fosfátového pufru s tweenem (PBST: 3,2 mM Na_2HPO_4; 0,5 mM KH_2PO_4; 1,3 mM KCl; 135 mM NaCl s 0,05% w/w detergent Tween® 20) (vše Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Dospělé samice roztočů byly následně rozmělněny ve zkumavce s 500 μL PBST pomocí homogenizační tyčinky (cat No. 440613, Monrovia, CA, USA). DNA byla izolována na

základě pokynů protokolu Genomic DNA Mini Kit (Tissue) Protocol (Cat. No. GT100; Geneaid Biotech Ltd., New Taipei City, Taiwan). Vzorky byly uchovány v mrazicím boxu o teplotě -40°C do analýzy DNA.

2.2.2. Extrakce DNA ze vzorků včely medonosné *Apis mellifera*

Extrakce DNA ze včel probíhala shodně pro všechny typy vzorků, tj. bylo použito 10 dospělých dělnic na jeden vzorek, v případě včelích matek byly tyto matky homogenizovány odděleně od doprovodu za vzniku dvou vzorků. Včely byly čištěny pro odstranění povrchové mikroflóry 5% chlornanem sodným, 2x pomocí 96% etanolu a poté 2x pomocí sterilního fosfátového pufru s tweenem. Včely byly umístěny do skleněného homogenizátoru (Potter-Elvehjem homogenizer, Kavalier, Sázava, ČR) spolu s 6 ml PBST, kde byl každý vzorek homogenizován po dobu 2 minut. Následně byl homogenát umístěn do sterilních 15ml plastových zkumavek (Cat No. D1003; KRD, Praha, ČR) a zcentrifugován 5min/845 xg (Thermo Scientific Multispeed Centrifuge CL31R, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA). Vzniklý supernatant byl přemístěn do sterilních 15ml plastových zkumavek. Byl použit protokol Fenol-chloroformové extrakce DNA v následující modifikaci: (1) K supernatantu bylo přidáno 6 ml fenol/chloroform/isopropanolu (Roti-Phenol®, Cat. No. A156.2, Carl Roth, Karlsruhe, Německo). Vzniklá směs byla jemně protřepána a stočena 3381 xg po dobu 5 minut; (2) Vrchní fáze byla odebrána do nové zkumavky a smíchána s 6 ml fenol/chloroform/isopropanolem. Vzniklá směs byla jemně protřepána a stočena; (3) Supernatant byl promísen s 6 ml chloroform/isopropanolem (24:1), vzniklá směs byla jemně protřepána a stočena. Tento krok byl znovu opakován; (4) 700 µl výsledného supernatantu bylo přepipetováno do sterilních plastových 1,5 ml Eppendorfových zkumavek. Bylo přidáno 70 µl octanu sodného (Sodium acetate trihydrate, Cat. No. 6131-90-4, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO USA) a 500 µl isopropanolu; (5) Směs byla jemně protřepána a umístěna do mrazicího boxu (-80°C) na 20 min; (5) Po uplynutí 20 min byla směs centrifugována (13 523xg, 15 min); (6) Pro získání pevné fáze (pelet) byla odpipetována kapalná část a promyta 500 µl 70% etanolem a zcentrifugována; (7) Byl odstraněn etanol a přidán 1000 µl 70% etanolu a znovu centrifugován; (8) Znovu byl odstraněn etanol a vzorky vysušeny (Speed Vac, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA); (9) Pelet byl rozpuštěn přidáním 100 µl ohřáté ddH_2O (60 °C) a rozrušováním pipetou; (10) DNA byla následně přečištěna pomocí Geneclean® Turbo kit (Cat No. 1102-600, MP Biomedicals,

Santa Ana, CA, USA) a zcentrifugována 5min/13 523xg. Do středu membrány kolonky bylo napipetováno 100 µl ohřáté ddH_2O (60°C), ponecháno 5 min odstát a zcentrifugováno. Dále byly vzorky uchovány v mrazicím boxu o teplotě -40°C do analýzy DNA.

2.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

2.3.1. Reakční směs Mastermix

Do mikrozkumavky byly napipetovány všechny složky v uvedeném složení dle Tabulky 5, v pořadí: destilovaná voda pro PCR, PCR pufr, směs nukleotidů, oba primery (F a R) a nakonec enzym – termostabilní DNA *Taq* polymeráza (vše Promega, Madison, WI, USA). Celkový reakční objem musí být 25 µl. Vše bylo promíseno.

Tabulka 5 – Reakční směs Master Mix pro 1 vzorek s objemem 25 µl

Složka	**Množství**
H_2O	18,875µl
Pufr	2,5µl
dNTPs	0,5µl
Forward primer	1µl
Reverse primer	1µl
Polymeráza	0,125 µl
DNA	1µl

2.3.2. Strategie výběru vzorku

Z každého vzorku byla provedena PCR reakce s eubakteriálními primery. Vzorek byl dále zpracováván v případě získání amplikonu příslušné velikosti (cca 1400 bp) pro tuto reakci. V případě absence amplikonu za použití eubakteriálních primerů byla u příslušného vzorku opakována izolace. Dále následovalo ověření přítomnosti bakterie *Arsenophonus*. PCR produkty pozitivní na přítomnost bakterie *Arsenophonus* byly následně ověřeny pomocí klonování a sekvenace (Kapitola 2.5.).

2.3.3. Detekční primery

Pro prokázání přítomnosti bakteriální DNA a detekci bakterie *Arsenophonus* ve vzorcích DNA byla použita PCR amplifikace genu pro 16S rRNA za použití taxonově specifických primerů dle Tabulky 6. Taxonově specifické primery pro bakterii *Arsenophonus* Ars, yaeT, fbaA, ftsK, zapA a aprA byly vyhledány v literatuře (Wilkes *et al.*, 2011). Primery Arsph_1 nadesignoval Ing. Jan Kopecký, Ph.D. z Výzkumného ústavu rostlinné výroby (Hubert *et al.*, 2015).

Tabulka 6 – Použité detekční primery

Taxon	**Lokus**	**Název**	**Primer 5'-3'**	**Délka (bp)**	**Autor**
Bakterie	16S rRNA	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	1465	Weisburg *et al.* (1991)
		1492R	CGGTTACCTTGTTACGACTT		
		27Fmod	AGRGTTTGATCMTGGCTCAG	300	www.mrdnalab.com
		ill519Rmod	GTNTTACNGCGGCKGCTG		www.mrdnalab.com
Morganella/ *Arsenophonus*	16S rRNA	ArsF	GGGTTGTAAAGTACTTTCAGTCGT	804	Wilkes *et al.* (2011)
		ArsR2	GTAGCCCTRCTCGTAAGGGCC		
Arsenophonus	16S rRNA	Arsph_1F	TTGGGCCTCACACCTTC	1107	Hubert *et al.* (2015)
		Arsph_1R	AGACTCCAATCCGGACTTC		
	fbaA	fbaAf	GCYGCYAAAGTTCRTTCTCC	659	Wilkes *et al.* (2011)
		fbaAr	CCWGAACCDCCRTGGAAAACAAAA		
	yaeT	yaeTf	GCATACGGTTCAGACGGGTTTG	473	
		yaeTr	GCCGAAACGCCTTCAGAAAAG		
	ftsK	ftsKf	GTTGTYATGGTYGATGAATTTGC	445	
		ftsKr	GCTCTTCATCACYATCAWAACC		
	zapA	zapAf	GGGTCACATACCTATTTT	594	
		zapAr	GTAGTCGCCTGGGTGGG		
	aprA	aprAf	CATTTAATTCCAAGAAC	513	
		aprAr	GAAAGTCTGCTTGTCCATCTCC		
Vektorový	*pUC/M*	pUC/M 13F	GTTTTCCCAGTCACGAC	240	Vieira &

primer	*13*	pUC/M 1R	ACAGGAAACAGCTATGAC		Messing (1982)

2.3.4. Průběh PCR reakce

Mikrozkumavky s reakční směsí Master Mix a DNA byly vloženy do teplotního thermocycleru (C1000 Touch™ Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Na thermocycleru byl spuštěn program s přednastavenými podmínkami (Tab. 7).

PCR reakce probíhaly s pozitivní a negativní kontrolou, kde jako pozitivní kontrola byla použita DNA z již dříve ověřených vzorků dostupných v laboratoři a jako negativní kontrola byl použit Master Mix bez DNA.

Tabulka 7 – Program PCR reakce s jednotlivými primery

Primer	F27 R1492	27Fmod ill519Rmod	Arsph_1	Ars fbaA yaeT ftsK	zapA aprA	pUCM	F27 R1492	27Fmod ill519Rmod	Arsph_1	Ars fbaA yaeT ftsK	zapA aprA	pUCM
Krok	**Teplota (°C)**						**Čas**					
1.	94	94	94	94	94	94	2 min	3 min	3 min	3 min	3 min	5min
2.	94	94	94	94	94	94	1 min 50 sec	30 sec	30 sec	30 sec	30 sec	1min
3.	50	53	57	52	50	54	60 sec (30x)	40 sec (30x)	45 sec (35x)	45 sec (35x)	45 sec (35x)	50s (35x)
4.	72	72	72	72	72	72	1 min 50 sec	1 min	60 sec	52 sec	52 sec	1min 30s
5.	72	72	72	72	72	72	10 min	5 min	5 min	5 min	5 min	5min

2.4. Vizualizace PCR produktů

PCR produkty byly následně vizualizovány pomocí elektroforézy v agarosovém gelu. Molekuly DNA zde byly děleny podle svého náboje a velikosti. S ohledem na předpokládané délky amplikonů byl použit 1% či 2% agarosový gel v závislosti na velikosti fragmentu (SeaKem® LE Agarose, Lonza, Rockland, ME, USA) v pufru (Tris Acetate-EDTA buffer,T9650, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO USA). DNA byla vizualizována pomocí fluorescenčního barviva Sybr (SYBR® Safe DNA Gel Stain, Cat No.S33102, Invitrogen,Eugene, OR USA) ve formě „proužků". Velikost fragmentu byla určena na základě srovnání polohy proužku DNA na gelu s migrací směsi fragmentů se známým počtem bp v gelu, tzv. DNA ladder. Do jamek byly vloženy 4 μl DNA, které byly obarveny pomocí vkládacího pufru Zipruler (DNA Loading Dye, ZipRuler™ Express DNA Ladder Set, Cat No.SM1373, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA), a do první jamky byly naneseny 4 μl markeru DNA ladder (ZipRuler™ Express DNA Ladder 1,SM1373, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA). Gel byl umístěn do elektroforetické soustavy (ENDURO™ 300V Power Supply, E0303, Labnet International, Inc., Edison, NJ USA), kde elektroforéza probíhala při konstantním napětí 100 V po dobu 25 min. DNA byla následně vizualizována v UV světle v transiluminátoru (Transilluminator, InGenius L, Syngene, Cambridge, United Kingdom), kde byl pomocí počítačového programu GeneSnap (GeneSnap from SynGene7.12.1, Syngene, Cambridge, United Kingdom) pořízen elektronický záznam gelu.

V případě, že se v agarosovém gelu nachází proužek příslušné velikosti a zároveň vychází pozitivní kontrola, dané amplikony byly považovány za pozitivní. Pokud se však amplikon o dané délce nezobrazil, ale pozitivní kontrola o příslušné délce se na gelu nachází, považujeme dané vzorky za negativní. Absence proužku u negativní kontroly dokazuje, že v dané PCR reakci nedošlo ke kontaminaci. Potom byly PCR produkty uchovány v mrazicím boxu o teplotě -80°C do přečištění DNA.

2.5. Klonování a sekvenování

2.5.1. Přečištění amplikonů ze vzorků

Vzorky pozitivní na přítomnost bakterie *Arsenophonus* byly přečištěny dle následujících protokolů Wizard® SV Gel a PCR product clean-up system kit (Cat No.

A9282, Promega, Madison, WI, USA) nebo Geneclean® Turbo kit (Cat No. 1102-600, MP Biomedicals,Santa Ana, CA, USA). Nebyly prokázány rozdíly mezi těmito kity a protokoly.

2.5.2. Ligace

Přečištěné vzorky byly následně zaligovány dle protokolu pGEM – T Vector System I (a,b) (Cat No.A3600, Promega Corporation, Madison, WI, USA). Vzorky byly uchovány v mrazicím boxu o teplotě -80°C až do klonování vzorků.

2.5.3. Příprava agarových misek

Příprava misek probíhala podle protokolu PCR Cloning Handbook (QIAGEN, 2001, Hilden, Germany) s určitými modifikacemi, které jsou zachyceny v postupu níže:

Agarové misky byly připraveny z 20 g LB agaru (Luria Bertani Agar, Miller, M1151, HIMEDIA, Brno, ČR) a 0,5 l dd H2O. Tato směs byla následně rozpuštěna ve sterilní skleněné lahvi na magnetickém míchadle (MSH-300, Magnetic Stirrer with hot plate, Biosan, Riga, Lotyšsko). Poté byla směs zklávována při teplotě 120 °C po dobu 30 min (PS 20A, CHIRANA, BMT Medical Technology, Brno, ČR). Vzápětí byla reakční směs ponořena do vodní lázně (Waterbath, Memmert, Schwabach, Německo) a zchlazena tímto krokem na 55 °C. Potom bylo do směsi přidáno 1 ml Ampicilinu, 2 ml X-Gal a 0,5 ml IPTG (vše QIAGEN, Hilden, Germany) za míchání na míchadle. Následně byla směs rozlita do sterilních plastových misek a ponechána do ztuhnutí (2 – 3 hodiny). Na agarové misky bylo pipetou naneseno 100 µl směsi s DNA, která byla po celé misce rozmístěna pomocí zahnuté skleněné tyčinky. Misky se směsí byly umístěny do sušárny s teplotou 37 °C na dobu nejméně 12 hod.

2.5.4. Klonování

Klonování proběhlo dle protokolu PCR Cloning Handbook (QIAGEN, 04/2001, Hilden, Germany) s následujícími modifikacemi: 1) Byla připravena vodní lázeň s teplotou 42 °C (Waterbath, Memmert, Schwabach, Německo); 2) SOC médium (Krypton 20 g, yeast extrakt 5,5 g, NaCl 10 ml, KCl 2,5 ml na 1 l dd H_2O) bylo umístěno do třepačky (Shaking Incubator NB-205, N-BIOTEK Co., Ltd, Gyeonggi-do, Korejská republika) za teploty 37 °C a 230 rpm po dobu 30 min; 3) Byly rozpuštěny buňky (JM 109 Competent Cells, Promega,

Madison, WI, USA); 4) 25 µl buněk bylo přidáno do ligační směsi, promícháno 3x pipetou a celý objem přemístěn do 15ml sterilních plastových zkumavek; 5) Zkumavky s reakční směsí byly ponechány na ledu po dobu 25 min; 6) Následně byly zkumavky ponořeny na 1 min do vodní lázně (42 °C) a poté vráceny zpět na led, kde byly zkumavky ponechány 2 min; 7) Do směsi bylo přidáno 950 µl SOC Média; 8) Reakční směs byla vložena do třepačky a třepána při teplotě 37 °C po dobu 2 hod; 9) Po vyjmutí z třepačky byly vzorky uchovány v mrazicím boxu o teplotě -80°C do PCR klonů.

2.5.5. PCR klonů DNA

Na miskách vyrostly bakteriální klony bílé a modré barvy dle selektivity umožněné genem *LacZ*. Klony námi zkoumané DNA byly barvy bílé. Byla použita PCR amplifikace plazmidu, pro kterou byl vytvořen Master Mix s primery pUC/M13 (Tab. 6). K Master Mixu bylo přidáno pomocí párátka malé množství bakteriálních buněk přímo do reakční směsi. Na thermocycleru byl spuštěn program s přednastavenými podmínkami dle Tabulky 7.

PCR produkty byly následně vizualizovány pomocí elektroforézy v agarosovém gelu stejně jako u Kapitoly 2.4. Při zjišťování velikosti fragmentu bylo nutno k dané velikosti fragmentu nejdříve přičíst velikost vektoru, tj. 240 bp, a sečtenou velikost následně srovnávat s výsledky gelu. Za pozitivní byly považovány amplikony o příslušné délce. PCR produkty byly následně uchovány v mrazicím boxu o teplotě -80°C až do analýzy DNA.

2.6. Sekvenování

2.6.1. Sangerovské sekvenování klonovaných produktů

Sangerovské sekvenování bylo použito pro vzorky klonů obsahujících části genu bakterie *Arsenophonus* anebo fragmentu genu 16S rRNA získaného pomocí eubakteriálních primerů. V případě ověření specificity primerů pro detekci bakterie *Arsenophnonus* bylo od každé kombinace primerů vybráno 5 pozitivních klonů na 1 vzorek, které byly poslány na osekvenování do laboratoře Macrogen (Macrogen Korea, Soul, Korejská republika).

2.6.2. New generation sequencing

NGS bylo uplatněno pro sekvenaci 16S rRNA genu ve vzorcích DNA z dvojic včel a roztočů. Vzorky DNA byly odeslány do laboratoře MR DNA (http://mrdnalab.com/,

Shallowater, TX, USA). Zde byla provedena PCR s primery 27Fmod a ill519Rmod, kdy k Forward primeru byl připojen barcode (Tab. 6). PCR reakce probíhala podle podmínek uvedených v Tabulce 7 pomocí HotStarTaqPlus Master Mix kitu (QIAGEN, 2001, Hilden, Germany) následovaná ověřením výsledků na 2% agarosovém gelu. Jednotlivé PCR produkty byly následně smíchány na základě jejich molekulární váhy a koncentrace DNA. Poté byly sdružené vzorky purifikovány pomocí magnetických kuliček Ampure XP beads (http://mrdnalab.com/, Shallowater, TX, USA). Potom byla z PCR produktů vytvořena DNA knihovna podle protokolu Illumina TruSeq DNA library preparation protocol. Sekvenace proběhla na sekvenátoru Miseq v laboratoři MR DNA (http://mrdnalab.com/, Shallowater, TX, USA).

2.7. Analýza dat

2.7.1. Bioinformatická analýza dat

Pro Sangerovské sekvenování byly zanalyzovány jednostranné nebo oboustranné sekvence dle velikosti amplikonu (pod 700 bp jednostranné, nad 700 bp oboustranné). Tyto sekvence byly upraveny pomocí programu CodonCodeAligner, verze 1.5.2 (CodonCode Corporation, Dedham, MA, USA). Specificita primerů byla ověřena porovnáním získaných sekvencí se sekvencemi v GenBanku (Bilofsky *et al.*, 1986) pomocí nBlastu (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/,Altschul *et al.*, (1997)). Byly vybrány sekvence nejvyšší podobnosti. Před analýzou 16S rRNA genů získaných z eubakteriálních primerů pomocí sangerovského sekvenování byly odstraněny chimerické sekvence z datového souboru pomocí programů MALLARD 1.02 (Ashelford *et al.*, 2006) a PINTAIL 1.1 (Ashelford *et al.*, 2005). Následovala bioinformatická analýza, kterou jsem prováděla pod vedením Ing. Jana Kopeckého, Ph.D. Po odstranění chimerických sekvencí bylo získáno 285 sekvencí pro tvorbu operačních taxonomických jednotek (OTU) definovaných na 3% vzdálenosti v programu mothur v. 1. 32. 0. Software (Schloss *et al.*, 2009). Sekvence byly na základě bakteriální taxonomie přiřazeny pomocí Ribosomal database project naïve Bayesian Classifier (Wang *et al.*, 2007). Vybrané reprezentativní sekvence byly následně porovnány s GenBank stejným principem, jaký je popsán výše.

Zpracování NGS sekvencí probíhalo pod vedením Ing. Jana Kopeckého, Ph.D. Byly využity programy USEARCH (Edgar, 2010) a mothur, 1.35.0 software (Schloss *et al.*, 2009) podle standardního postupu MiSeq (MiSeq SOP (Kozich *et al.*, 2013). Detailní popis analýzy

viz Hubert *et al.* (2016) (v tisku), zde zkráceně. Sekvence byly zařazeny do kontigencí v programu mothur, kde byly zbaveny barcodů a primerů. Následně byly klastrovány v programu UPARSE (Edgar, 2013). Klastry byly definovány na 3% vzdálenosti za vzniku operačně taxonomických jednotek, které byly poté taxonomicky identifikovány pomocí naïve Bayesian Classifiers využitím databáze Ribosomal database project RDPII (http://rdp.cme.msu.edu) (Cole *et al.*, 2013). Referenční sekvence pro jednotlivé OTU byly využity pro vytvoření alignmentu sekvencí dle databáze SILVA (Quast *et al.*, 2013). V tomto souboru byly detekovány chiméry pomocí programu UCHIME (Edgar *et al.*, 2011). V referenčních sekvencích byly eliminovány sekvence chloroplastů a mitochondrií. Vybrané reprezentativní sekvence byly následně porovnány s GenBank stejným principem, jaký je popsán výše.

2.7.2. Statistická analýza dat

Statistická analýza dat byla provedena pouze pro soubor dat získaných s NGS, analýza byla prováděna s Mgr. Janem Hubertem, Ph.D. Z výsledků v programu UPARSE byl vytvořen soubor pro analýzu v programu mothur. Byl zjištěn nejmenší počet sekvencí pro vzorek, tj. 5 017 sekvencí a na tento soubor sekvencí byl vytvořen podvzorek. Pro účely této diplomové práce bylo z podvzorku zpracováno zastoupení jednotlivých bakteriálních taxonů. Pro vizualizaci byly zhotoveny grafy relativních zastoupení bakteriálních taxonů v KRONA zobrazení v programu Krona (Ondov *et al.*, 2011). Toto zobrazení bylo následně editováno v programu INKSCAPE (https://inkscape.org). Mikrobiom v párových vzorcích včel a roztočů byl porovnán pomocí Vennových diagramů. Ty byly vytvořeny pro párové vzorky v programu mothur na datovém podsouboru. Vennovy diagramy charakterizují počty sdílených a unikátních bakteriálních taxonů párových vzorků včel medonosných a roztočů *Varroa destructor* získaných z jednoho úlu. Dále jsme se zaměřili na výskyt bakterie *Arsenophonus* u včel medonosných a roztočů *Varroa destructor*. Relativní abundance OTU pro *Arsenophonus* ve vzorcích včel a roztočů *Varroa destructor* byly porovnávány pomocí příkazu METASTATS (White *et al.*, 2009) v programu mothur.

2.8. Fylogenetická analýza

Alignment sekvencí bakterie *Arsenophonus*16S rRNA byl zhotoven v programu SILVA Incremental Aligner v.1.2.11. (Pruesse *et al.*, 2012). Pro testování modelu evoluce

sekvencí byl zvolen program jModelTest v.2.1.7 (Darriba *et al.*, 2012; Guindon & Gascuel, 2003). Vybrán byl smíšený model GTR+G+I (Generalised Time Reversible + gamma correction + invariant sites). Rekonstrukce fylogeneze proběhla Bayesovskou analýzou pomocí programu PhyloBayes-MPI, v.1.4e (Lartillot *et al.*, 2009) a metodou maximální pravděpodobnosti (maximum-likelihood) PhyML v.3.0 (Guindon *et al.*, 2010). Fylogramy byly upraveny v programu MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2007).

3. Výsledky

3.1. Specificita detekčních primerů – ověření

Pro ověření přítomnosti bakteriální DNA a kvality extrakce ze vzorků bylo použito primerů kódujících gen 16S rRNA 27F a 1492R. Vzorky, kde byly prokázány amplikony z eubakteriálních primerů o velikosti 1465 bp, byly považovány za pozitivní na přítomnost bakteriální DNA. V následujícím kroku byly vzorky zimní měli, u kterých byla potvrzena přítomnost bakteriální DNA, použity pro detekci bakterie *Arsenophonus* pomocí detekčních primerů ArsF a ArsR2. Za pozitivní byly v tomto případě považovány amplikony o délce 804 bp. Amplikony byly klonovány a klony sekvenovány. Porovnáním sekvencí klonů se sekvencemi v GenBanku však bylo zjištěno, že získané sekvence vykazují vysokou podobnost k bakterii *Morganella morganii* (HM133591.1) (99-100% sekvenční identita) a tyto detekční primery nejsou specifické pro bakterii *Arsenophonus* (Tab. 8). Výjimkou byly klony z lokality Střeleč, které porovnáním se sekvencemi v GenBank vykazovaly příbuznost s bakterií *Arsenophonus nasoniae* (FN545282.1). Vzhledem k nespecifitě primerů ArsF a ArsR2 v případě vzorků roztočů ze zimní měli nebylo těchto primerů využito pro detekci bakterie *Arsenophonus* u včely medonosné.

Pro potvrzení přítomnosti bakterie *Arsenophonus* v uvedených lokalitách byly tedy v literatuře vyhledány a použity další specifické primery genů kódujících protein vnější membrány *yaeT* (473 bp), fruktosa-bisfosfát aldolázu třídy II *fbaA* (659 bp), protein dělení buněk *ftsK* (445 bp) a zinek dependentní proteiny *aprA* (513 bp) a *zapA* (594 bp). Dále byly navrženy a testovány nové primery genu pro 16S rRNA Arpsh_1F a Arsph_1R o velikosti 1107 bp.

Klony získané z roztočů ze vzorků zimní měli pomocí primerů *yaeT* (473 bp) či *fbaA* (659 bp) vykazovaly srovnáním se sekvencemi v GenBank99% sekvenční identitu s *Arsenophonus nasoniae* (FN545250 a FN542641), a proto tyto primery považujeme za specifické pro bakterii *Arsenophonus*. Použitím primerů *ftsK* (445 bp), *zapA* (594 bp) a *aprA* (513 bp) nebylo dosaženo pozitivního výsledku, tj. nebyl nalezen amplikon odpovídající velikosti.

V případě klonů získaných ze vzorků včel pomocí primerů *yaeT* (473 bp), *fbaA* (659 bp) a *ftsK* (445 bp) byl získán amplikon odpovídající velikosti. Za pozitivní vzorek v tomto případě považujeme detekci bakterii *Arsenophonus* alespoň jedním ze specifických

primerů, tj. *yaeT* či *fbaA*. Sekvence získané ze vzorků včel pomocí primerů *yaeT*, *fbaA* a *ftsK* však neodpovídaly bakterii *Arsenophonus* a srovnáním se sekvencemi v GenBank bylo dosaženo nespecifického výsledku. Použitím primerů *zapA* (594 bp) a *aprA* (513 bp) nebylo dosaženo pozitivního výsledku, tj. nebyl nalezen amplikon odpovídající velikosti.

Pro identifikaci bakterie *Arsenophonus* byly nadesignovány a testovány nově nadesignované primery genu pro 16S rRNA Arpsh_1F a Arsph_1R o velikosti 1107 bp. Získané sekvence ze vzorků roztočů ze zimní měli srovnáním se sekvencemi z GenBanku již vykazovaly 99% sekvenční identitu s *Arsenophonus nasoniae* (NR042811), a proto tyto primery považujeme za specifické pro bakterii *Arsenophonus*. Za pozitivní vzorek v tomto případě považujeme detekci bakterie *Arsenophonus* pomocí primerů Arpsh_1. Identifikace bakterie *Arsenophonus* byla potvrzena i fylogenetickým stromem (Kapitola 3.5.). Porovnáním sekvencí získaných ze vzorků včel se sekvencemi v GenBank byla u většiny klonů zjištěna 99% sekvenční identita s bakterií *Arsenophonus* (DQ508172.1), v případě jednoho klonu bylo dosaženo nespecifického výsledku.

Dalším krokem analýzy v případě vzorků včel bylo sekvenování nové generace (Next-Generation Sequencing) pomocí přístroje Illumina MiSeq.

Tabulka 8 – Identifikace bakteriálních taxonů *Morganella* a *Arsenophonus* ve vzorcích samic roztočů *Varroa destructor* ze zimní měli pomocí primerů Ars, které byly prokázány jako nespecifické pro bakterii *Arsenophonus*. Sekvence byly klasifikovány pomocí Ribosomal database project naïve Bayesian rRNA classifier a porovnány pomocí BLASTu se sekvencemi v GenBank.

RDP klasifikace			**Porovnání se sekvencemi v GenBank**			
Taxon			**id %**	**Přiřazená sekvence**	**Acces. No.**	**id %**
Gamma-proteobacteria	Enterobacteriales	*Morganella*	100	*Morganella* sp.	HM133591.1	99
		Arsenophonus	100	*Arsenophonus nasoniae*	FN545282.1	100

3.2. Výskyt bakterie *Arsenophonus* v královnách a doprovodu

Za pozitivní vzorek v tomto případě považujeme detekci bakterii *Arsenophonus* pomocí specifického primeru, tj. Arsph_1. Z celkového počtu 23 vzorků doprovodu a matek, byla bakterie *Arsenophonus* detekována jak ve vzorcích z Horní Lhoty, tak v Máslovicích Dol pomocí PCR (Tab. P1). Přítomnost bakterie *Arsenophonus* se podařilo prokázat celkem u třech doprovodů včelí matky (Tab. P1). Oproti tomu všechny vzorky matek vyšly

na bakterii *Arsenophonus* negativně. Vzhledem k malému počtu vzorků nelze více vyhodnotit.

3.3. Výskyt bakterie *Arsenophonus* v roztočích ve vzorcích zimní měli

Knihovna sekvencí 16S rRNA genu obsahovala 596 sekvencí, které představují 29 OTU_{97}. Z toho bakterie *Arsenophonus* OTU 6 zaujímala 21 sekvencí. Bakterie *Morganella morganii* OTU 1 byla přítomná v 17 z 27 lokalit (Tab. 9). Oproti tomu přítomnost bakterie *Arsenophonus* OTU 6 byla prokázána pouze v jediné lokalitě a to v lokalitě Střeleč (Tab. 9). Pomocí specifických primerů Arsph, *yaeT* a *fbaA* nebyla bakterie *Arsenophonus* detekována na jiné lokalitě než na lokalitě Střeleč.

Na tomto stanovišti byl získán amplikon za použití primerů Arsph_1F a Arsph_1R, klony tohoto amplikonu byly sekvenovány a získané sekvence jsou vysoce podobné sekvencím *Arsenophonus nasoniae* (NR042811) (sekvenční identita 99 %). Při použití primerů *yaeT* a *fbaA* vykazovaly sekvence taktéž 99% sekvenční identitu s bakterií *Arsenophonus nasoniae* (FN545250 a FN542641).

Tabulka 9 – Počty sekvencí klonů 16S rRNA přiřazených bakteriím na jednotlivých stanovištích a výsledky detekce pomocí taxon specifických primerů.

Včelstvo	*Morganella morganii*	*Arsenophonus nasoniae*
Trhanov	21*	
Horní Bojanovice	21*	
Bulhary	22*	
Myslín	20*	
Přibice	18*	
Kurdějov	14	
Brod nad Dyjí	20*	
Moravská Nová Ves	28*	
Hlohovec	22*	
Kdyně	27*	
Omice	20*	
České Velenice	26*	
Radějov	5	
Hořenice		
Klášterec nad Ohří		
Obora		
Heřmanova Huť		
Újezdec		

Klenov		
Lom u Tachova		
Kruh		
Majdalena	*	
Pravčice	*	
Železnice		
Kadaň	*	
Střeleč		21
Kývalka	*	

Legenda: * značí potvrzení přítomnosti bakterie pomocí získání amplikonu ze specifických primerů ArsF a ArsR2, které jsme prokázali jako nespecifické pro *Arsenophonus*

3.4. Bakterie *Arsenophonus* v mikrobiomu populace roztočů a včel odebraných ze stejného úlu

Celkem bylo v rámci výzkumu mikrobiomu *Varroa destructor* a včely medonosné analyzováno 52 párových vzorků včelstev ze 7 včelínů. Data byla získána sekvenací V1-V3 oblasti 16S rRNA. Získáno bylo 1 320 238 sekvencí z 16S rRNA genu, které tvořily 132 OTU_{97}. Z toho bakterie *Arsenophonus* OTU 2 zaujímala 127 168 sekvencí, z čehož 586 sekvencí bylo detekováno u včely a 126 582 sekvencí u roztoče *Varroa destructor*. Reprezentativní sekvence pro OTU2 vykazuje 99% podobnost s *Arsenophonus nasoniae* (GenBank Access No: NR_042811).

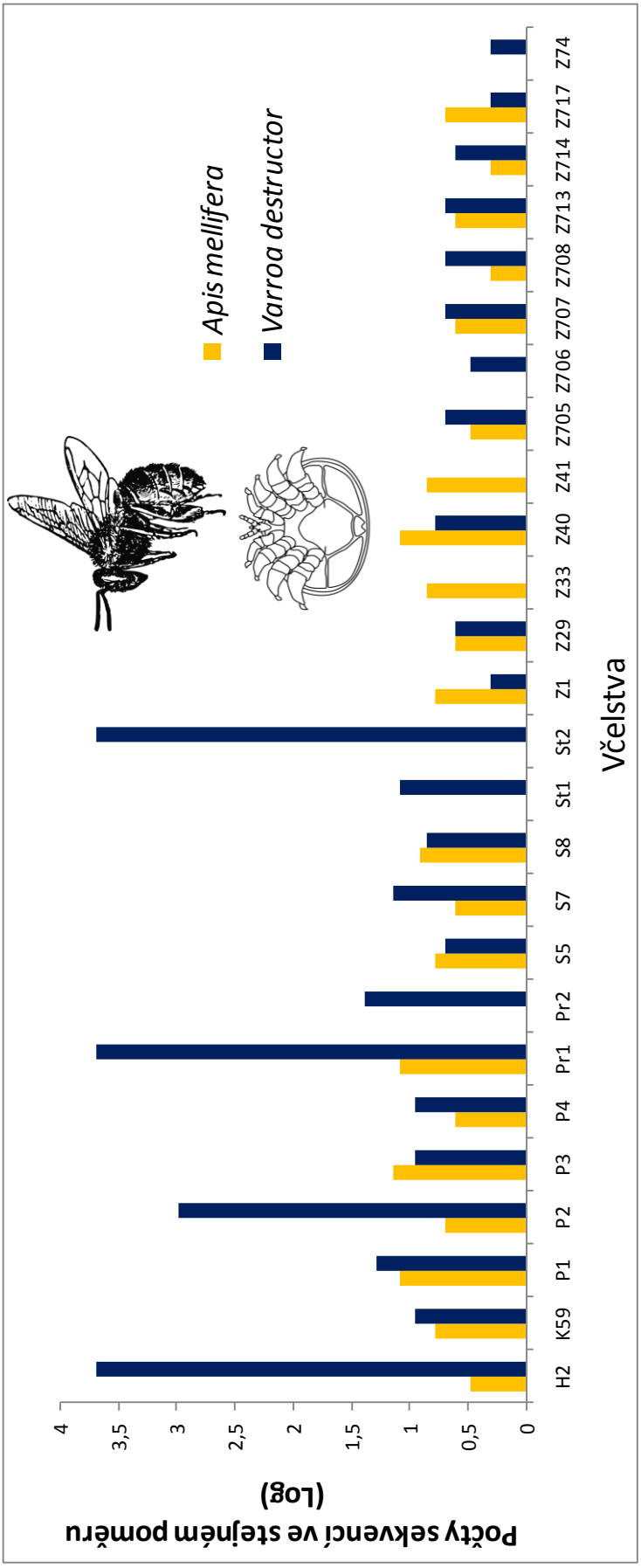
Relativní abundance byly porovnávány pomocí METASTATS analýzy, která prokázala signifikantně vyšší četnost výskytu bakterie *Arsenophonus* u roztoče *Varroa destructor* (P=0,012; pro 10 000 permutací). Podíl bakterie *Arsenophonus* v mikrobiomu *Varroa destructor* je 216× vyšší než v mikrobiomu včely (VD: $\bar{x}$ = 0,122054; σ = 0,062603; AM: $\bar{x}$ = 0,000997; σ = 0,000157). Porovnání pro jednotlivé vzorky ukazuje Obr. 2. Korelace mezi výskytem bakterie *Arsenophonus* ve vzorcích včel medonosných a roztočů *Varroa destructor* vycházející ze spočteného Pearsonova korelačního koeficientu (r = 0,0002, P = 0,999) není signifikantní.

Grafy zhotovené programem Krona vizualizují poměrné zastoupení dominantních bakteriálních OTU párových vzorků včel a roztočů *Varroa destructor*, které zároveň znázorňují i hierarchickou strukturu klasifikace. Vyšších hodnot relativního zastoupení bakterie *Arsenophonus* OTU 2 dosáhla u roztoče *Varroa destructor* na čtyřech stanovištích (13-99 %): Horní Lhota (H2), Postřižín (P2), Přelovice (Pr1), Střeleč (St2) (Obr. P2B, P5B,

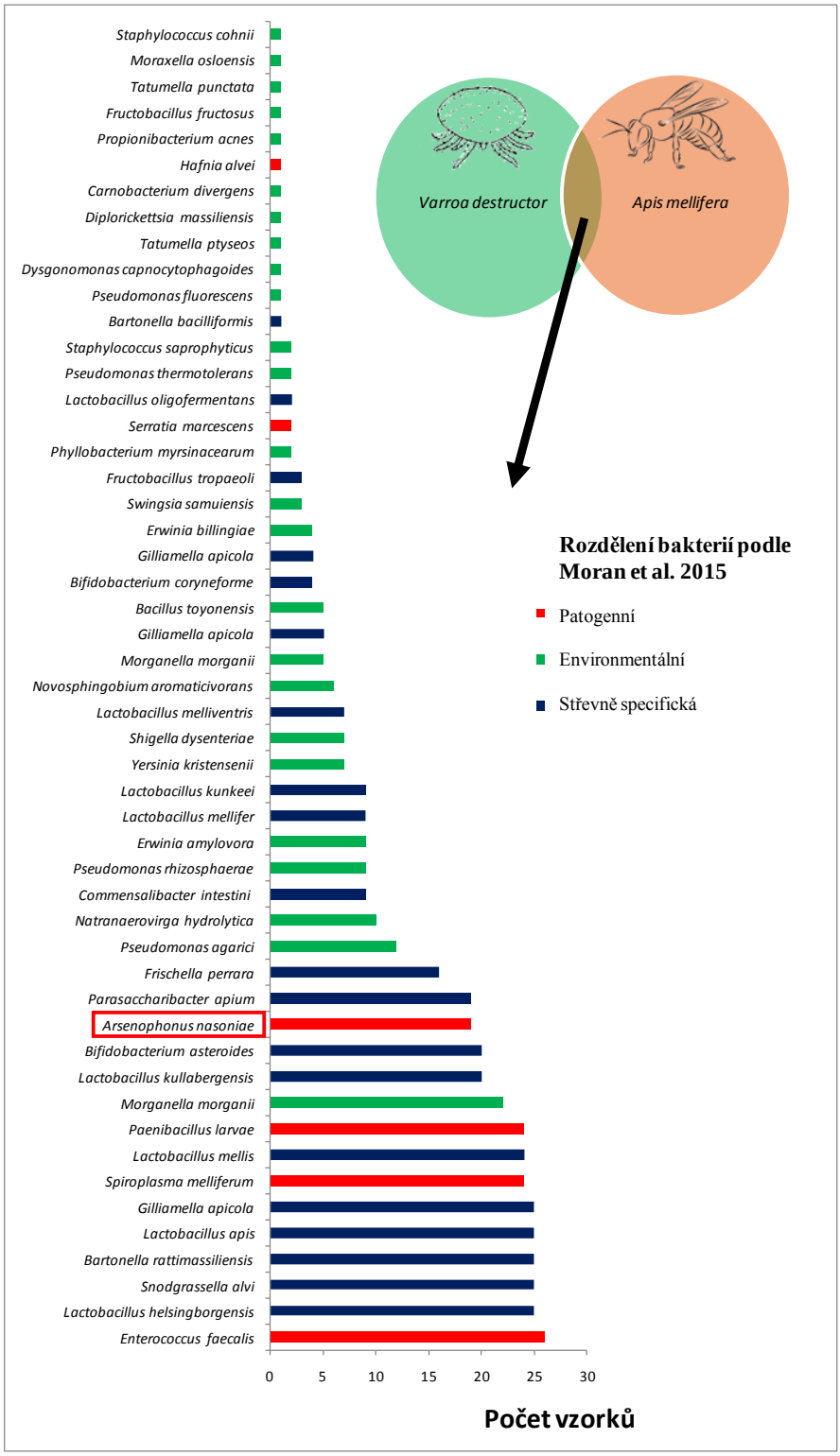
P8B, P14B). Na mikrobiomu včely se bakterie *Arsenophonus* významně nepodílela na žádném ze stanovišť (Obr. P2A-P27A).

Vennovy diagramy znázorňují poměr sdílených a unikátních bakteriálních taxonů párových vzorků včel a roztočů *Varroa destructor*. Bakterie *Arsenophonus* OTU 2 byla sdíleným taxonem na 19/26 stanovištích (Obr. P2C-P27C). Na 5/26 stanovištích se jednalo o unikátní bakteriální taxon roztoče *Varroa destructor* (Obr. P9C, P12C, P13C, P20C, P22C). V případě 2/26 stanovišť byla bakterie *Arsenophonus* unikátním taxonem včely medonosné (Obr. P16C, P18C). Frekvenci společného výskytu bakterie *Arsenophonus* u včely medonosné a roztoče *Varroa destructor* ukazuje Obr. 3, kde je srovnání s ostatními sdílenými OTU bakterií.

Obr. 2 – Výskyt bakterie *Arsenophonus* ve vzorcích včel medonosných a roztočů *Varroa destructor* z jednoho úlu na základě nové generace sekvenování. Na ose x jsou vyneseny jednotlivé úly, jejich popis je uveden v Tabulce 3. Počty sekvencí udávají hodnoty pro jednotlivé vzorky v podvzorku analyzovaných sekvencí.



Obr. 3 – Počet včelstev a frekvence výskytu jednotlivých bakteriálních taxonů sdílených jak u roztoče, tak u včely medonosné vycházející z Vennových diagramů

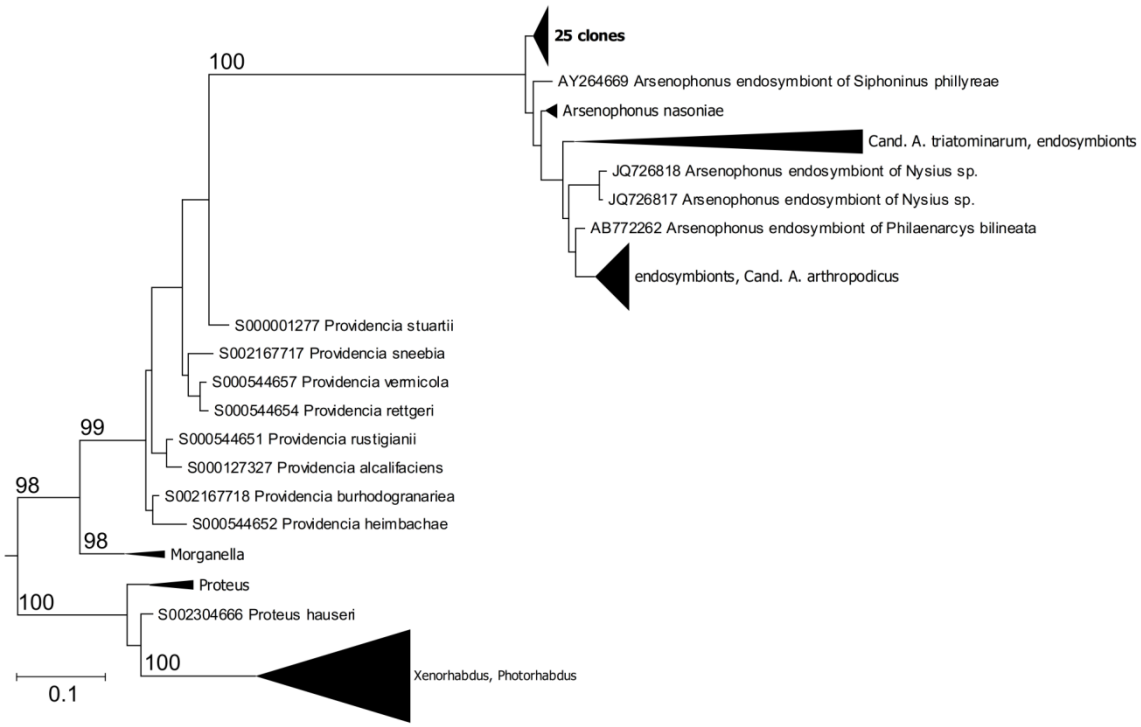


.

3.5. Fylogeneze

Přítomnost bakterie *Arsenophonus* ve vzorcích odchycených roztočů a roztočů ze zimní měli byla potvrzena i fylogenetickou analýzou (Obr. 4). Pro analýzu byl použit fragment 16S rRNA o velikosti 1107 bp. Fylogenie klonů 16SrRNA bakterie *Arsenophonus* proběhla Bayesovskou analýzou. Délky větví získaného fylogenetického stromu odpovídají posteriorním odhadům evolučních vzdáleností s měřítkem 0_1. U jednotlivých větví jsou uvedeny Bayesovské posteriorní pravděpodobnosti a hodnoty bootstrap z maximální pravděpodobobnosti (ML). Jako outgroup pro tento fylogram byly použity taxony z čeledi Enterobacteriaceae.

Obr. 4 – Fylogenetická analýza klonů 16S rRNA bakterie *Arsenophonus* ze vzorků roztočů *Varroa destructor* ze zimní měli s referenčními sekvencemi dostupnými v databázích.



4. Diskuze

4.1. Výskyt

Výskyt bakterie *Arsenophonus* byl do této doby zaznamenán u hmyzu (Nováková *et al.*, 2009), klíšťat (Clay *et al.*, 2008; Dergousoff & Chilton, 2010; Grindle *et al.*, 2003) a křižáka obecného (*Araneus diadematus*) Clerck, 1757 (Duron *et al.*, 2008).

V této práci se podařilo nově prokázat přítomnost bakterie jak v roztočích *Varroa destructor*, tak ve včelách medonosných. Detekce této bakterie u *Varroa destructor* je unikátním objevem (Hubert *et al.*, 2015). Potvrzení přítomnosti bakterie *Arsenophonus* u včel medonosných se shoduje s výsledky Nováková *et al.*(2009) a Gerth *et al.* (2015). Výskyt bakterie *Arsenophonus* byl prokázán i na povrchu těla a v trávicím ústrojí včel (Aizenberg-Gershtein *et al.*, 2013; Babendreier *et al.*, 2007). Dominantním taxonem včel medonosných byla bakterie *Arsenophonus* v případě výzkumu Aizenberg-Gershtein *et al.* (2013), kde tvořily sekvence bakterie *Arsenophonus* 43-88 % z celkové bakteriální komunity včel. Současně Aizenberg-Gershtein *et al.*(2013) detekovali bakterii *Arsenophonus* i v nektaru rostlin mandloně obecné (*Amygdalus comminis*) a citroníku rajském (*Citrus paradisi*). Podle Aizenberg-Gershtein *et al.*(2013) včely ovlivňují bakteriální složení nektaru, kterým se krmí, a zároveň přijímají bakterie společně s nektarem. Mohou tedy fungovat jako přenašeči bakterií mezi různými rostlinami. Bakteriální složení nektaru nevystaveného včelám se signifikantně lišilo od nektaru, který byl v kontaktu se včelami (Aizenberg-Gershtein *et al.*, 2013). Oproti tomu bakteriální složení nektaru vystaveného včelám se nelišilo od bakteriálního složení získaného z povrchu a ústního ústrojí včel. Bakterie *Arsenophonus* byla dále nalezena v pylu rostlin a v pylu z košíčků ve včelí kolonii (Corby-Harris *et al.*, 2014). Zvýšený výskyt bakterií *Arsenophonus* byl zaznamenán v jednom případě včelstev postižených CCD (Cornman *et al.*, 2012).

Dosažené výsledky vyvolávají otázku, zda bakterie *Arsenophonus* pochází z roztoče *Varroa destructor*, ze včely medonosné nebo se jedná o společného symbionta. Možným vysvětlením by byla i přítomnost dvou odlišných taxonů bakterie *Arsenophonus*, což je analyzováno dále.

4.2. Taxonomie

Z výsledků této diplomové práce dále vyplývá bližší taxonomické určení bakterie rodu *Arsenophonus* v obou studovaných hostitelských taxonech. Díky srovnání sekvencí klonů získaných z roztočů ze vzorků zimní měli pomocí Sangerovského sekvenování se sekvencemi v GenBank byla zjištěna vysoká sekvenční identita (99 %) s bakterií *Arsenophonus nasoniae* detekovanou ve vosičce *Nasonia vitripennis* (FN545250: Wilkes *et al.*, 2010) a v bodavce dobytčí *Glossina morsitans* subsp. *morsitans* (Wiedemann, 1850) (Diptera, Glossinidae) (FN542641: Liu *et al.*, 2010, nepublikováno). Tato skutečnost byla ověřena fylogenetickým stromem zachycujícím vysokou míru příbuznosti získaných klonů k *Arsenophonus nasoniae*. Potvrzení přítomnosti bakterie *Arsenophonus* v roztočích *Varroa destructor* a ve včelách medonosných bylo dále prokázáno i analýzou mikrobiomu párových vzorků roztočů a včel odebraných ze stejného úlu pomocí NGS sekvenování, které taktéž potvrdilo vysokou míru podobnosti (98 %) k bakterii *Arsenophonus nasoniae* získané z vosičky *Nasonia vitripennis* (NR_042811: (Gherna *et al.*, 1991; Thao & Baumann, 2004)). Stejné taxonomické určení bakterie *Arsenophonus nasoniae* ve včelách medonosných zaznamenala i Nováková *et al.* (2009). Taxonomická identifikace bakterie *Arsenophonus* u *Varroa destructor* do této doby nebyla popsána.

Bakterie *Arsenophonus* byla detekována jak u roztoče *Varroa destructor*, tak u včely medonosné. U roztoče *Varroa destructor* byla prokázána přítomnost bakterie *Arsenophonus* z klonů získaných z roztočů ze vzorků zimní měli pomocí primerů *yaeT* (473 bp), *fbaA* (659 bp) a Arsph_1 (1107 bp). Nebyl však nalezen amplikon odpovídající velikosti při použití *ftsK* (445 bp), *zapA* (594 bp) a *aprA* (513 bp) primerů. U klonů získaných ze vzorků včel došlo k negativnímu výsledku v případě primerů *zapA* (594 bp) a *aprA* (513 bp), kdy nebyl nalezen amplikon odpovídající velikosti. Možným vysvětlením se jeví nízká koncentrace DNA vzorků. Podobným problémem se zabývali Saeed & White (2015) a Saeed (2014). Pyrosekvenováním prokázali vysokou prevalenci (88 %) bakterie *Arsenophonus* u samotářské včely *Lasioglossum pilosum* (Smith, 1853) (Hymenoptera, Halictidae), ale úspěšnost PCR detekce pomocí taxonově specifických primerů byla mnohem nižší (11 %) (Saeed & White, 2015). V případě dalšího druhu samotářské včely *Halictus ligatus* Say, 1837 (Hymenoptera, Halictidae), kdy dosahovala prevalence bakterie *Arsenophonus* 1 % pomocí pyrosekvenování, nebyla primery specifickými pro bakterii *Arsenophonus* prokázána přítomnost v žádném ze vzorků. Pro PCR detekci bakterie

Arsenophonus je v současné době zapotřebí výrazně vyšší počet pokusných objektů. Při nízkém počtu vzorků hrozí, že bakterie *Arsenophonus* nebude vůbec detekována (Saeed, 2014). Ve srovnání s bakterií *Wolbachia*, která u stejných druhů samotářských včel vykazovala nízkou prevalenci (2 %) pomocí pyrosekvenování, byla bakterie *Wolbachia* detekována se 100% úspěšností (Saeed & White, 2015).

U klonů získaných ze vzorků včel pomocí primerů *yaeT* (473 bp), *fbaA* (659 bp), *ftsK* (445 bp) a Arsph_1 (1107 bp) byl sice získán amplikon odpovídající velikosti, ale analyzované sekvence neodpovídaly srovnáním se sekvencemi v GenBank bakterii *Arsenophonus*. Bylo dosaženo nespecifického výsledku, což lze vysvětlit ziskem náhodného produktu.

Pomocí Neighbor Joining metody byly porovnány sekvence bakterie náležící do rodu *Arsenophonus* získané z nektaru mandloně obecné (Aizenberg-Gershtein *et al.*, 2013) se sekvencemi bakterie *Arsenophonus nasoniae* z našich vzorků včely medonosné. Sekvence se klastrovaly odlišně a jejich identita činila pouze 93 %. Proto se domníváme, že v případě bakterie *Arsenophonus* nalezené v nektaru mandloně obecné se nejedná o bakterii *Arsenophonus nasoniae*.

Bylo prokázáno, že bakterie získaná pomocí taxon specifických primerů z roztočů *Varroa destructor* a včel medonosných skutečně náleží do rodu *Arsenophonus*. Dále bylo zjištěno, že jak u roztoče *Varroa destructor*, tak u včely medonosné, se jedná o stejný bakteriální taxon, tj. bakterii *Arsenophonus nasoniae.*

4.3. Teorie příčiny výskytu bakterie *Arsenophonus*

Bakterie *Arsenophonus* byla detekována jak v roztočích *Varroa destructor*, tak ve včelách medonosných. Původ bakterie ze vzorků DNA z homogenátu povrchově čištěných roztočů může být: (i) autochtonní z těla roztoče a (ii) allochtonní z hemolymfy včel. Roztoči byli ošetřeni povrchovou sterilizací, čímž bylo zamezeno kontaminaci bakterií z povrchu roztoče (Kopecký *et al.*, 2014). Kontaminaci při PCR bylo zabráněno použitím negativní kontroly (Fenollar & Raoult, 2004).

Při srovnání společného výskytu bakterií ve vzorcích včely a roztoče z jednoho úlu bylo zjištěno, že oba druhy sdílí vysoký počet bakteriálních taxonů. V rámci těchto taxonů jsou jednak symbiotické taxony ze střeva včely dle Moran (2015) (dále „střevně specifické“) a dále taxony bakterií, o kterých se předpokládá, že pocházejí z okolního prostředí dle Corby-

Harris *et al.* (2014) (dále „environmentální“). V těchto studiích však nebyly řešeny parazitické nebo patogenní bakterie (shrnuto v Alippi, 1999), které se u včel vyskytují také. Čtvrtým nejpočetnějším sdíleným potencionálně patogenním taxonem byla bakterie *Arsenophonus nasoniae*, což indikuje přenos bakterie *Arsenophonus* mezi taxony.

Vzhledem k nedostatku vzorků matek s doprovodem nelze určit, zda se bakterie vyskytuje spíše u matek nebo u doprovodu. Výsledek by mohl objasnit možnost vertikálního přenosu bakterie *Arsenophonus* z matek na potomky. Vyhodnocení ztěžuje i vzácnost detekce, kdy byla bakterie *Arsenophonus* detekována pouze u 3 doprovodů ze 46 vzorků, což koresponduje s již zmíněnou obtížností detekce bakterie *Arsenophonus* u samotářských včel zkoumanou Saeed & White (2015).

Z výsledků METASTAT analýzy byl prokázán signifikantně vyšší četnost výskytu bakterie *Arsenophonus* u roztočů *Varroa destructor* oproti nízké četnosti výskytu u včel medonosných.

4.4. Horizontální přenos

U bakterie *Arsenophonus* je znám vertikální, ale i horizontální přenos. Horizontální přenos prokázal Skinner (1985) u superparasitismu, kdy různé vosičky *Nasonia vitripennis* parazitovaly na stejném hostiteli. Nakaženým samicím byl poskytnut hostitel, který byl poté odebrán a ponechán nenakaženým samicím. Potomstvo původně nenakažených samic bylo infikováno bakterií *Arsenophonus*, která se do dalších generací přenášela vertikálně s 97% účinností přenosu. K infekci vosiček došlo při parazitaci a sáním hemolymfy ze společného hostitele byli nakaženi i potomci (Skinner, 1985; Werren *et al.*, 1986).

Podobným způsobem by mohl přenos probíhat i v případě přenosu této bakterie z roztoče *Varroa destructor* na včelu medonosnou. Tuto hypotézu podporuje i druhý nejpočetnější patogenní taxon, jenž je sdílen roztočem *Varroa destructor* a včelou medonosnou, *Spiroplasma melliferum*. Tato parazitická bakterie je přenášena parazitickým roztočem *Macrocheles subbadius* (Berlese, 1904) (Mesostigmata, Macrochelidae) na různé druhy hostitelů *Drosophila* spp. (Jaenike *et al.*, 2007). Při vystavení neinfikovaných roztočů infikované *Drosophila nebulosa* Sturtevant, 1916 (Diptera, Drosophilidae) došlo k nákaze 82 % roztočů. Následně byli roztočům poskytnuti neinfikovaní hostitelé *Drosophila nebulosa* a *Drosophila willistoni* Sturtevant, 1916. Výsledkem byla 28% účinnost přenosu v případě *Drosophila nebulosa* a 21% účinnost přenosu v případě *Drosophila willistoni*. Tento způsob

přenosu bývá označován jako „dirty needle“, protože při parazitaci dochází k nasátí hemolymfy roztočem *Macrocheles* a následnému přenosu parazitických bakterií jako je *Spiroplasma* do dalších hostitelů (Jaenike *et al.,* 2007).

Z důvodu tzv. „dirty needle“ přenosu byla pravděpodobně detekována bakterie *Arsenophonus* jak u roztoče *Varroa destructor*, tak u včely medonosné. V této interakci může roztoč sloužit jako vektor nebo je možné, že se bakterie *Arsenophonus* nachází trvale jak v roztoči *Varroa destructor*, tak ve včele medonosné.

K hypotéze horizontálního přenosu bakterie *Arsenophonus* mezi roztočem *Varroa destructor* a včelou medonosnou přispívá i teorie Dale *et al.*(2006), podle níž se blízce příbuzní symbionti rodu *Arsenophonus* často nachází u vzdáleně příbuzných hostitelů právě z důvodu horizontálního přenosu. Roztoče *Varroa destructor* patřícího do třídy pavoukovců a včelu medonosnou náležící do třídy hmyzu rozhodně můžeme jako vzdáleně příbuzné taxony označit.

Pro ujasnění otázky horizontálního přenosu bakterie *Arsenophonus* je zapotřebí dalšího výzkumu párových dvojic vzorků roztoče *Varroa destructor* a včely medonosné. Řešením by také mohla být fluorescenční in situ hybridizace, která by bakterii *Arsenophonus* lokalizovala v hemolymfě včel v některé z budoucích studií.

4.5. *Son killing*?

V současné době není dostatečně prozkoumán vliv bakterie *Arsenophonus* na roztoče *Varroa destructor* ani na včelu medonosnou. Není známo, jestli bakterie *Arsenophonus* těmto hostitelům škodí a ani jakým způsobem k tomu dochází.

Roztoči *Varroa destructor* a včely medonosné mají haplodiploidní určení pohlaví stejně jako vosičky *Nasonia.* Tím vyvstává otázka, zda by nemohla bakterie *Arsenophonus* manipulovat s potomstvem včel medonosných či roztočů *Varroa destructor* stejně jako u vosiček *Nasonia*. V případě výzkumu molice bavlníkové *Bemisia tabaci* (Raina *et al.*, 2015), která má taktéž haplodiploidní určení pohlaví, byl však projev jevu *son killing* vyvrácen.

Bakterie *Arsenophonus* dále ovlivňuje u molice bavlníkové počet nakladených vajíček, počet vylíhlých larev a délku vývoje (Raina *et al.,* 2015). Snižuje plodnost, líhnivost a zapříčiňuje kratší délku života molice skleníkové. Pro zjištění souvislosti těchto vlivů na fitness s včelou medonosnou je klíčový výzkum bakterie *Arsenophonus* u včelích královen.

Včelí matka infikovaná bakterií *Arsenophonus*, která by způsobovala sníženou plodnost a líhnivost, by mohla mít nedozírné následky na životaschopnost celého včelstva, k čemuž by dozajisté přispěla i kratší délka života potomstva. Naopak u roztoče *Varroa destructor* by jakýkoliv negativní vliv na jejich fitness způsobený bakterií *Arsenophonus* mohl být využit a hrát podstatnou roli v biologické kontrole. Není však zatím známo, zda se bakterie *Arsenophonus* u samců vyskytuje či zda je tato bakterie přítomná ve vajíčkách roztoče.

Bakterie *Arsenophonus* by mohla hrát klíčovou úlohu u obou taxonů. Pro zjištění vlivu bakterie *Arsenophonus* na hostitele *Varroa destructor* a včelu medonosnou je však zapotřebí dalšího výzkumu.

4.6. Biologický boj

Velký potenciál má v současné době využití mikroorganismů proti škůdcům formou biologického boje (Zchori-Fein *et al.*, 2007). Použití mikroorganismů jako biologickou kontrolu škůdců je možné dvěma způsoby. Jednou možností je odstranění mikroorganismů, kteří jsou škůdci prospěšní. Druhou variantou je infikování škůdců parazitickými mikroorganismy (Douglas, 2007).

Použití reprodukčního parazita bakterie *Wolbachia* v biologické kontrole škůdců uvažují Zabalou *et al.* (2004) a Apostolaki *et al.* (2011). Zabalou *et al.* (2004) infikovali samce škůdce vrtule velkohlavé *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera, Tephritidae) bakterií *Wolbachia*. To vedlo k indukci cytoplazmatické inkompatibility, kdy při křížení infikovaného samce s neinfikovanou samicí dojde ke snížení počtu potomků doprovázeného dominancí samčích potomků, nebo je způsobena úplná sterilita samice (Hoffmann *et al.*, 1986). Apostolaki *et al.* (2011) podobným způsobem infikovali vrtuli olivovníkovou *Bactrocera oleae*(Gmelin, 1788) (Diptera, Tephritidae) bakterií *Wolbachia*, která také vedla cytoplazmatické inkompatibilitě hostitelského škůdce.

Výzkum bakterie *Arsenophonus* může mít důležitou úlohu v biologické kontrole škůdců *Varroa destructor*. Kdyby byla bakterie *Arsenophonus* schopná jevu *son killing* u *Varroa destructor*, bylo by možné manipulovat s jeho reprodukcí a omezit výskyt tohoto škůdce. Usmrcování samčích embryí a změna poměru pohlaví ve prospěch samičího by umožnily snížení výskytu samců, což by vedlo k nemožnosti reprodukce daného taxonu a omezení vlivu varroázy.

5. Souhrn

Výsledky této diplomové práce můžeme shrnout do následujících bodů.

1) U roztočů *Varroa destructor*a včel medonosných byla detekována a taxonomicky charakterizována bakterie *Arsenophonus nasoniae* pomocí analýzy genu 16S rRNA.

2) V dvojicích roztoč a včela odebraných z jednoho úlu byl prokázán signifikantně vyšší četnost výskytu bakterie *Arsenophonus nasoniae* u roztočů *Varroa destructor* oproti nízké četnosti výskytu u včel medonosných. Na základě našich poznatků tedy předpokládáme autochtonní původ bakterie *Arsenophonus nasoniae* z roztoče *Varroa destructor*, kdy se do včely medonosné bakterie *Arsenophonus nasoniae* dostává horizontálním přenosem.

3) Vzhledem k nedostatku vzorků včelích matek s doprovodem nelze vyhodnotit výskyt bakterie *Arsenophonus* v matkách a jejich doprovodu.

6. Seznam použité literatury

* označené sekundární citace

Aizenberg-Gershtein, Y., Izhaki, I. and Halpern, M. (2013). Do honeybees shape the bacterial community composition in floral nectar? *PLoS One* **8**, 1-9.

Akratanakul, P. (1975). Biology and systematics of bee mites of the family Varroidae (Acari: Mesostigmata). Master's thesis, Oregon State University, Corvallis.

*** Alippi, A. M.** (1999). *Bacterial diseases*. In: Colin M.E., Ball B.V., Kilani M.: Bee disease diagnosis 25. Ciheam, Zagarosa, 31-59.

Allen, J. M., Reed, D. L., Perotti, M. A. and Braig, H. R. (2007). Evolutionary relationships of "Candidatus *Riesia* spp.," endosymbiotic Enterobacteriaceae living within hematophagous primate lice. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 1659–1664.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402.

Apostolaki, A., Livadaras, I., Saridaki, A., Chrysargyris, A., Savakis, C. and Bourtzis, K. (2011). Transinfection of the olive fruit fly Bactrocera oleae with *Wolbachia*: towards a symbiont-based population control strategy. *J. Appl. Entomol.* **135**, 546–553.

Ashelford, K. E., Chuzhanova, N. A., Fry, J. C., Jones, A. J. and Weightman, A. J. (2005). At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 7724–7736.

Ashelford, K. E., Chuzhanova, N. A., Fry, J. C., Jones, A. J. and Weightman, A. J. (2006). New screening software shows that most recent large 16S rRNA gene clone libraries contain chimeras. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 5734–5741.

Babendreier, D., Joller, D., Romeis, J., Bigler, F. and Widmer, F. (2007). Bacterial community structures in honeybee intestines and their response to two insecticidal proteins. *FEMS Microbiol. Ecol.* **59**, 600–610.

Balas, M. T., Lee, M. H. and Werren, J. H. (1996). Distribution and fitness effects of the son-killer bacterium in *Nasonia*. *Evol. Ecol.* **10**, 593–607.

Bilofsky, H. S., Burks, C., Fickett, J. W., Goad, W. B., Lewitter, F. I., Rindone, W. P., Swindell, C. D. and Tung, C.-S. (1986). The GenBank genetic sequence databank. *Nucleic Acids Res.* **14**, 1–4.

Bressan, A., Sémétey, O., Arneodo, J., Lherminier, J. and Boudon-Padieu, E. (2009). Vector transmission of a plant-pathogenic bacterium in the *Arsenophonus* clade sharing ecological traits with facultative insect endosymbionts. *Phytopathology* **99**, 1289–1296.

Bressan, A., Terlizzi, F. and Credi, R. (2012). Independent origins of vectored plant pathogenic bacteria from arthropod-associated *Arsenophonus* endosymbionts. *Microb. Ecol.* **63**, 628–638.

Byrne, F. J. and Devonshire, A. L. (1996). Biochemical evidence of haplodiploidy in the whitefly *Bemisia tabaci*. *Biochem. Genet.* **34**, 93–107.

Clay, K., Klyachko, O., Grindle, N., Civitello, D., Oleske, D. and Fuqua, C. (2008). Microbial communities and interactions in the lone star tick, Amblyomma americanum. *Mol. Ecol.* **17**, 4371–4381.

Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., Brown, C. T., Porras-Alfaro, A.,

Kuske, C. R. and Tiedje, J. M. (2013). Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 1-10.

Corby-Harris, V., Maes, P. and Anderson, K. E. (2014). The bacterial communities associated with honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *PLoS One* **9**, 1-13.

Cornman, R. S., Tarpy, D. R., Chen, Y., Jeffreys, L., Lopez, D., Pettis, J. S. and Evans, J. D. (2012). Pathogen webs in collapsing honey bee colonies. *PLoS One* **7**, 1-15.

Dale, C., Beeton, M., Harbison, C., Jones, T. and Pontes, M. (2006). Isolation, pure culture, and characterization of "Candidatus *Arsenophonus* arthropodicus," an intracellular secondary endosymbiont from the hippoboscid louse fly Pseudolynchia canariensis. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 2997–3004.

Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. and Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* **9**, 772.

Delfinado, M. D. and Baker, E. W. (1974). Varroidae, a new family of mites on honey bees (Mesostigmata: Acarina). *J. Washingt. Acad. Sci.* **64**, 4–10.

Dergousoff, S. J. and Chilton, N. B. (2010). Detection of a new *Arsenophonus*-type bacterium in Canadian populations of the Rocky Mountain wood tick, *Dermacentor andersoni*. *Exp. Appl. Acarol.* **52**, 85–91.

Dobson, S. L., Marsland, E. J., Veneti, Z., Bourtzis, K. and O'Neill, S. L. (2002). Characterization of *Wolbachia* host cell range via the in vitro establishment of infections. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 656–660.

Donze, G., Herrmann, M., Bachofen, B. and GUERIN, P. A. T. R. M. (1996). Effect of mating frequency and brood cell infestation rate on the reproductive success of the honeybee parasite Varroa jacobsoni. *Ecol. Entomol.* **21**, 17–26.

Douglas, A. E. (2007). Symbiotic microorganisms: untapped resources for insect pest control. *Trends Biotechnol.* **25**, 338–342.

Dunn, A. K. and Stabb, E. V (2005). Culture-independent characterization of the microbiota of the ant lion *Myrmeleon mobilis* (Neuroptera: Myrmeleontidae). *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8784–8794.

Duron, O., Bouchon, D., Boutin, S., Bellamy, L., Zhou, L., Engelstädter, J. and Hurst, G. D. (2008). The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone. *Bmc Biol.* **6**, 1-12.

Duron, O., Wilkes, T. E. and Hurst, G. D. D. (2010). Interspecific transmission of a male-killing bacterium on an ecological timescale. *Ecol. Lett.* **13**, 1139–1148.

Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**, 2460–2461.

Edgar, R. C. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat. Methods* **10**, 996–998.

Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C. and Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* **27**, 2194–2200.

Evans, J. D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B. K., Frazier, M., Frazier, J., Cox-Foster, D., Chen, Y. and Underwood, R. (2009). Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS One* **4**, 1-17.

Fenollar, F. and Raoult, D. (2004). Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms. *Apmis* **112**, 785–807.

Ferree, P. M., Avery, A., Azpurua, J., Wilkes, T. and Werren, J. H. (2008). A bacterium targets maternally inherited centrosomes to kill males in *Nasonia*. *Curr. Biol.* **18**, 1409–1414.

Gerth, M., Saeed, A., White, J. A. and Bleidorn, C. (2015). Extensive screen for bacterial endosymbionts reveals taxon-specific distribution patterns among bees (Hymenoptera, Anthophila). *FEMS Microbiol. Ecol.* **91**, 1-12.

Gherna, R. L., Werren, J. H., Weisburg, W., Cote, R., Woese, C. R., Mandelco, L. and Brenner, D. J. (1991). NOTES: *Arsenophonus nasoniae* gen. nov., sp. nov., the Causative Agent of the Son-Killer Trait in the Parasitic Wasp *Nasonia vitripennis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**, 563–565.

Gottlieb, Y., Ghanim, M., Gueguen, G., Kontsedalov, S., Vavre, F., Fleury, F. and Zchori-Fein, E. (2008). Inherited intracellular ecosystem: symbiotic bacteria share bacteriocytes in whiteflies. *FASEB J.* **22**, 2591–2599.

Grindle, N., Tyner, J. J., Clay, K. and Fuqua, C. (2003). Identification of *Arsenophonus*-type bacteria from the dog tick *Dermacentor variabilis*. *J. Invertebr. Pathol.* **83**, 264–266.

Guindon, S. and Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* **52**, 696–704.

Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W. and Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* **59**, 307–321.

Hamilton, W. D. (1967). Extraordinary sex ratios. *Science (80-.).* **156**, 477–488.

Hertig, M. (1936). The rickettsia, *Wolbachia pipientis* (gen. et sp. n.) and associated inclusions of the mosquito, Culex pipiens. *Parasitology* **28**, 453–486.

Hoffmann, A. A. and Turelli, M. (1988). Unidirectional incompatibility in *Drosophila simulans*: inheritance, geographic variation and fitness effects. *Genetics* **119**, 435–444.

Hoffmann, A. A., Turelli, M. and Simmons, G. M. (1986). Unidirectional incompatibility between populations of *Drosophila simulans*. *Evolution (N. Y).* 692–701.

Hoy, M., Jeyaprakash, A., Alvarez, J. and Allsopp, M. (2003). *Wolbachia* is present in *Apis mellifera capensis*, *A. m. scutellata*, and their hybrid in Southern Africa. *Apidologie* **34**, 53–60.

Hubert, J., Erban, T., Kamler, M., Kopecky, J., Nesvorna, M., Hejdankova, S., Titera, D., Tyl, J. and Zurek, L. (2015). Bacteria detected in the honeybee parasitic mite *Varroa destructor* collected from beehive winter debris. *J. Appl. Microbiol.* **119**, 640–654.

Huger, A. M., Skinner, S. W. and Werren, J. H. (1985). Bacterial infections associated with the son-killer trait in the parasitoid wasp *Nasonia (= Mormoniella) vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae). *J. Invertebr. Pathol.* **46**, 272–280.

Hypša, V. and Dale, C. (1997). In vitro culture and phylogenetic analysis of "Candidatus *Arsenophonus triatominarum*," an intracellular bacterium from the triatomine bug, *Triatoma infestans*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 1140–1144.

Jaenike, J., Polak, M., Fiskin, A., Helou, M. and Minhas, M. (2007). Interspecific transmission of endosymbiotic *Spiroplasma* by mites. *Biol. Lett.* **3**, 23–25.

Jeyaprakash, A., Hoy, M. A. and Allsopp, M. H. (2009). Multiple *Wolbachia* strains in *Apis mellifera capensis* from South Africa. *Apidologie* **40**, 178–183.

Kopecký, J., Nesvorná, M. and Hubert, J. (2014). *Bartonella*-like bacteria carried by domestic mite species. *Exp. Appl. Acarol.* **64**, 21–32.

Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K. and Schloss, P. D. (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq

Illumina sequencing platform. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 5112–5120.

Lartillot, N., Lepage, T. and Blanquart, S. (2009). PhyloBayes 3: a Bayesian software package for phylogenetic reconstruction and molecular dating. *Bioinformatics* **25**, 2286–2288.

Liu, R., Lehane, S., He, X., Lehane, M., Hertz-Fowler, C., Berriman, M., Pickett, J. A., Field, L. M. and Zhou, J.-J. (2010). Characterisations of odorant-binding proteins in the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans*. *Cell. Mol. life Sci.* **67**, 919–929.

Martin, S. J. (1994). Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in worker brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions. *Exp. Appl. Acarol.* **18**, 87–100.

Martin, S. J. (2001). The role of Varroa and viral pathogens in the collapse of honeybee colonies: a modelling approach. *J. Appl. Ecol.* **38**, 1082–1093.

Marubayashi, J. M., Kliot, A., Yuki, V. A., Rezende, J. A. M., Krause-Sakate, R., Pavan, M. A. and Ghanim, M. (2014). Diversity and Localization of Bacterial Endosymbionts from Whitefly Species Collected in Brazil. *PloS one*. **9**, 1-10.

*** Matthews, R. W., González, J. M., Matthews, J. R. and Deyrup, L. D.** (2009). Biology of the parasitoid *Melittobia* (Hymenoptera: Eulophidae). *Annu. Rev. Entomol.* **54**, 251-266.

Mediannikov, O., Subramanian, G., Sekeyova, Z., Bell-Sakyi, L. and Raoult, D. (2012). Isolation of *Arsenophonus nasoniae* from *Ixodes ricinus* ticks in Slovakia. *Ticks Tick. Borne. Dis.* **3**, 367–370.

Moran, N. A. (2015). Genomics of the honey bee microbiome. *Curr. Opin. insect Sci.* **10**, 22–28.

Nováková, E., Hypša, V. and Moran, N. A. (2009). *Arsenophonus*, an emerging clade of intracellular symbionts with a broad host distribution. *Bmc Microbiol.* **9**, 143.

Nur, U., Werren, J. H., Eickbush, D. G., Burke, W. D. and Eickbush, T. H. (1988). A" selfish" B chromosome that enhances its transmission by eliminating the paternal genome. *Science (80-.).* **240**, 512–514.

Ondov, B. D., Bergman, N. H. and Phillippy, A. M. (2011). Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics* **12**, 1.

Oudemans, A. C. (1904). Note VIII. *On a new genus species parasic Acari*, 216–222.

Pattabhiramaiah, M., Brückner, D. and Reddy, M. S. (2011). Horizontal transmission of *Wolbachia* in the honeybee subspecies *Apis mellifera carnica* and its ectoparasite *Varroa destructor*. *Int. J. Environ. Sci.* **2**, 526-535.

*** Pham-Delegue, M. H., Trouiller, J., Caillaud, C. M., Roger, B. and Masson, C.** (1993). Effect of queen pheromone on worker bees of different ages: behavioural and electrophysiological responses. *Apidologie* **24**, 267.

Pruesse, E., Peplies, J. and Glöckner, F. O. (2012). SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics* **28**, 1823–1829.

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J. and Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **41**, 590–596.

Raina, H. S., Rawal, V., Singh, S., Daimei, G., Shakarad, M. and Rajagopal, R. (2015). Elimination of *Arsenophonus* and decrease in the bacterial symbionts diversity by antibiotic treatment leads to increase in fitness of whitefly, *Bemisia tabaci*. *Infect. Genet. Evol.* 224–230.

Rana, V. S., Singh, S. T., Priya, N. G., Kumar, J. and Rajagopal, R. (2012). *Arsenophonus* GroEL interacts

with CLCuV and is localized in midgut and salivary gland of whitefly B. tabaci. *PLoS One* **7**, 1-13.

Raychoudhury, R., Baldo, L., Oliveira, D. C. S. G. and Werren, J. H. (2009). Modes of acquisition of *Wolbachia*: horizontal transfer, hybrid introgression, and codivergence in the *Nasonia* species complex. *Evolution (N. Y).* **63**, 165–183.

Rehm, S. M. and Ritter, W. (1989). Sequence of the sexes in the offspring of *Varroa jacobsoni* and the resulting consequences for the calculation of the developmental period. *Apidologie* **20**, 339–343.

Ritter, W. (2008). Varroosis of honey bees. *Man. Diagnostic Tests Vaccines Terr. Anim. (Mammals, Birds, Bees)* **130**, 424–429.

*** Rosenkranz, P., Aumeier, P. and Ziegelmann, B.** (2010). Biology and control of *Varroa destructor*. *J. Invertebr. Pathol.* **103**, 96–119.

Russell, J. A., Latorre, A., Sabater-Muñoz, B., Moya, A. and Moran, N. A. (2003). Side-stepping secondary symbionts: widespread horizontal transfer across and beyond the Aphidoidea. *Mol. Ecol.* **12**, 1061–1075.

Saeed, A. (2014). Characterizing the Maternally Inherited Endosymbionts of Solitary Bees. Master's Thesis, University of Kentucky, Lexington.

Saeed, A. and White, J. A. (2015). Surveys for maternally-inherited endosymbionts reveal novel and variable infections within solitary bee species. *J. Invertebr. Pathol.* **132**, 111–114.

Salar, P., Sémétey, O., Danet, J.-L., Boudon-Padieu, E. and Foissac, X. (2010). "Candidatus *Phlomobacter fragariae*"and the proteobacterium associated with the low sugar content syndrome of sugar beet are related to bacteria of the *Arsenophonus* clade detected in hemipteran insects. *Eur. J. plant Pathol.* **126**, 123–127.

*** Sammataro, D., Gerson, U. and Needham, G.** (2000). Parasitic mites of honey bees: life history, implications, and impact. *Annu. Rev. Entomol.* **45**, 519–548.

Sasaki-Fukatsu, K., Koga, R., Nikoh, N., Yoshizawa, K., Kasai, S., Mihara, M., Kobayashi, M., Tomita, T. and Fukatsu, T. (2006). Symbiotic bacteria associated with stomach discs of human lice. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 7349–7352.

Sémétey, O., Gatineau, F., Bressan, A. and Boudon-Padieu, E. (2007). Characterization of a γ-3 proteobacteria responsible for the syndrome "basses richesses" of sugar beet transmitted by *Pentastiridius* sp. (Hemiptera, Cixiidae). *Phytopathology* **97**, 72–78.

Sevilla, V. J. (1963) citováno podle **Akratanakul, P.** (1975). Biology and systematics of bee mites of the family Varroidae (Acari: Mesostigmata). Master's thesis, Oregon State University, Corvallis.

Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H. and Robinson, C. J. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 7537–7541.

Skaljac, M., Zanic, K., Ban, S. G., Kontsedalov, S. and Ghanim, M. (2010). Co-infection and localization of secondary symbionts in two whitefly species. *BMC Microbiol.* **10**, 142-157.

Skaljac, M., Zanic, K., Hrncic, S., Radonjic, S., Perovic, T. and Ghanim, M. (2013). Diversity and localization of bacterial symbionts in three whitefly species (Hemiptera: Aleyrodidae) from the east coast of the Adriatic Sea. *Bull. Entomol. Res.* **103**, 48–59.

Skinner, S. W. (1985). Son-killer: a third extrachromosomal factor affecting the sex ratio in the parasitoid wasp, *Nasonia (= Mormoniella) vitripennis*. *Genetics* **109**, 745–759.

Spaulding, A. W. and von Dohlen, C. D. (2001). Psyllid endosymbionts exhibit patterns of co-speciation with

hosts and destabilizing substitutions in ribosomal RNA. *Insect Mol. Biol.* **10**, 57–67.

Subandiyah, S., Nikoh, N., Tsuyumu, S., Somowiyarjo, S. and Fukatsu, T. (2000). Complex endosymbiotic microbiota of the citrus psyllid *Diaphorina citri* (Homoptera: Psylloidea). *Zoolog. Sci.* **17**, 983–989.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**, 1596–1599.

Tanaka, M., Nao, M. and Usugi, T. (2006). Occurrence of strawberry marginal chlorosis caused by "Candidatus *Phlomobacter fragariae*" in Japan. *J. Gen. Plant Pathol.* **72**, 374–377.

Terlizzi, F., Babini, A. R., Lanzoni, C., Pisi, A., Credi, R., Foissac, X. and Salar, P. (2007). First Report of a γ 3-Proteobacterium Associated with Diseased Strawberries in Italy. *Plant Dis.* **91**, 1688-1688.

Thao, M. L. and Baumann, P. (2004). Evidence for multiple acquisition of *Arsenophonus* by whitefly species (Sternorrhyncha: Aleyrodidae). *Curr. Microbiol.* **48**, 140–144.

Trowbridge, R. E., Dittmar, K. and Whiting, M. F. (2006). Identification and phylogenetic analysis of *Arsenophonus*-and *Photorhabdus*-type bacteria from adult Hippoboscidae and Streblidae (Hippoboscoidea). *J. Invertebr. Pathol.* **91**, 64–68.

Vieira, J. and Messing, J. (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**, 259–268.

Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M. and Cole, J. R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 5261–5267.

Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. and Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**, 697–703.

Werren, J. H. (1980). Sex ratio adaptations to local mate competition in a parasitic wasp. *Science (80-.).* **208**, 1157–1159.

Werren, J. H. (1983). Sex ratio evolution under local mate competition in a parasitic wasp. *Evolution (N. Y).* 116–124.

Werren, J. H. (1987). The coevolution of autosomal and cytoplasmic sex ratio factors. *J. Theor. Biol.* **124**, 317–334.

Werren, J. H. and van den Assem, J. (1986). Experimental analysis of a paternally inherited extrachromosomal factor. *Genetics* **114**, 217–233.

Werren, J. H., Skinner, S. W. and Charnov, E. L. (1981). Paternal inheritance of a daughterless sex ratio factor. *Nature* **293**, 467–468.

Werren, J. H., Skinner, S. W. and Huger, A. M. (1986). Male-killing bacteria in a parasitic wasp. *Science (80-.).* **231**, 990–992.

White, J. R., Nagarajan, N. and Pop, M. (2009). Statistical methods for detecting differentially abundant features in clinical metagenomic samples. *PLoS Comput Biol* **5**, 1-11.

***Whiting, A. R.** (1967). The biology of the parasitic wasp *Mormoniella vitripennis [= Nasonia brevicornis]*(Walker). *Q. Rev. Biol.* **42**, 333–406.

Wilkes, T. E., Darby, A. C., Choi, J., Colbourne, J. K., Werren, J. H. and Hurst, G. D. D. (2010). The draft genome sequence of *Arsenophonus nasoniae*, son-killer bacterium of *Nasonia vitripennis*, reveals genes associated with virulence and symbiosis. *Insect Mol. Biol.* **19**, 59–73.

Wilkes, T. E., Duron, O., Darby, A. C., Hypsa, V., Novakova, E. and Hurst, G. D. D. (2011). The genus *Arsenophonus*. Zchori-Fein, E. and Bourtzis, K. (eds.) Manipulative Tenants: Bacteria Associated with Arthropods. CRC Press, Boca Raton-London-New York, 225–244.

Zabalou, S., Riegler, M., Theodorakopoulou, M., Stauffer, C., Savakis, C. and Bourtzis, K. (2004). *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 15042–15045.

Zchori-Fein, E., Gottlieb, Y., Kelly, S. E., Brown, J. K., Wilson, J. M., Karr, T. L. and Hunter, M. S. (2001). A newly discovered bacterium associated with parthenogenesis and a change in host selection behavior in parasitoid wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 12555–12560.

Zchori-Fein, E., Enigl, M., Schusberger, P., Mozes-Daube, N., Gottlieb, Y., Hanuny, T. and Palevsky, E. (2007). Symbionts in mites and their relevance for pest control. *IOBC WPRS Bull.* **30**, 147.

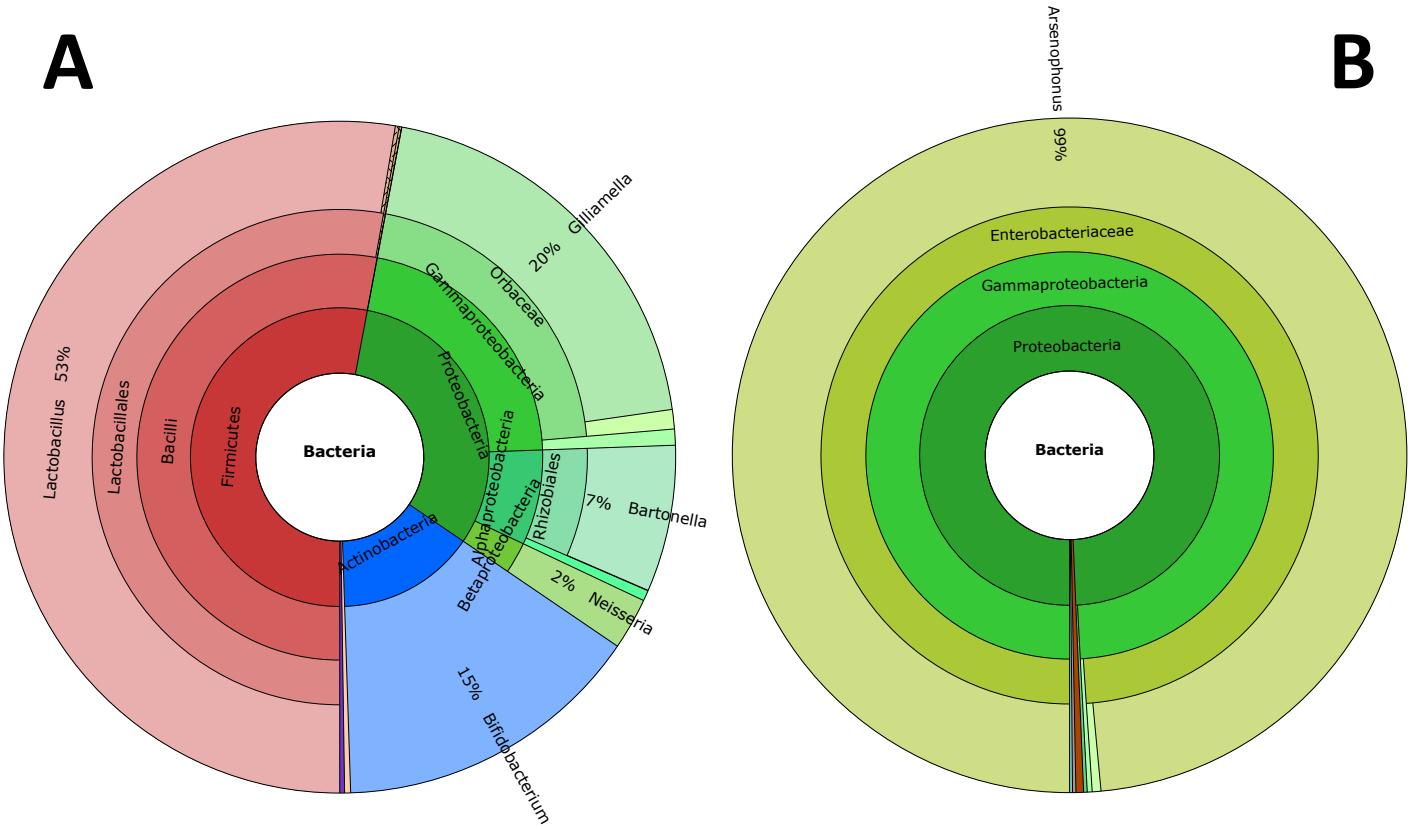
Zreik, L., Bove, J. M. and Garnier, M. (1998). Phylogenetic characterization of the bacterium-like organism associated with marginal chlorosis of strawberry and proposition of a Candidatus taxon for the organism,"Candidatus *Phlomobacter fragariae*." *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 257–261.

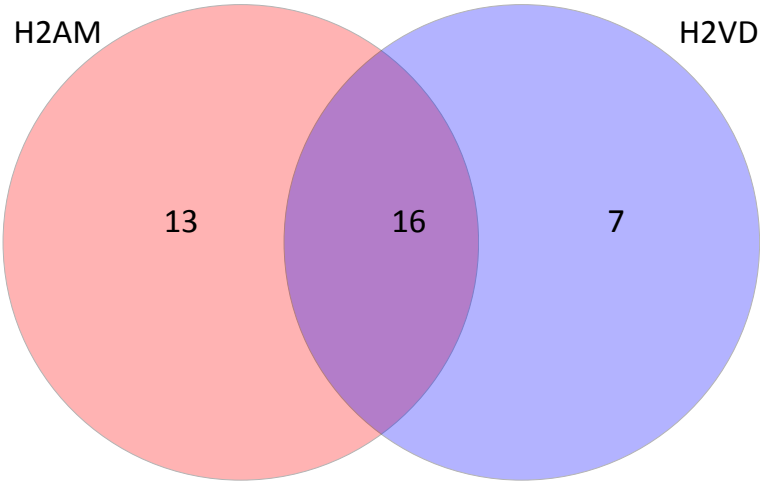
7. Přílohy

Příloha 1 – PCR detekce bakterie *Arsenophonus* u včelích matek a jejich doprovodu

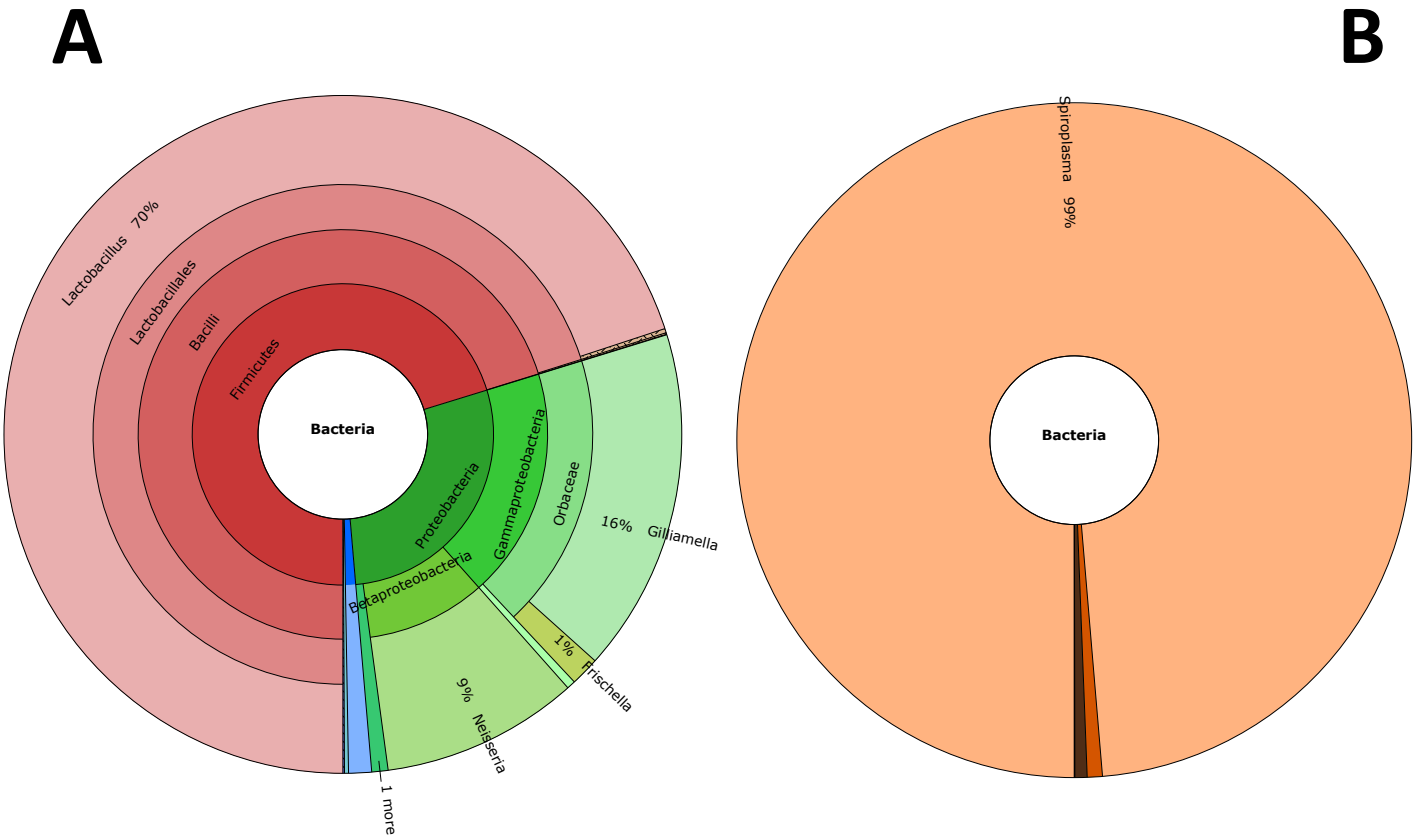
Včelstvo		**Matka/Doprovod**	***Arsenophonus***
Horní Lhota	1	M	
		D	+
Máslovice Dol	2	M	
		D	+
	3	M	
		D	
	4	M	
		D	
	5	M	
		D	
	6	M	
		D	
	7	M	
		D	
	8	M	
		D	
	9	M	
		D	
	10	M	
		D	
	11	M	
		D	
	12	M	
		D	
	13	M	
		D	
	14	M	
		D	
	15	M	
		D	
	16	M	
		D	
	17	M	
		D	+
	18	M	
		D	
	19	M	
		D	
	20	M	
		D	
	21	M	
		D	
	22	M	

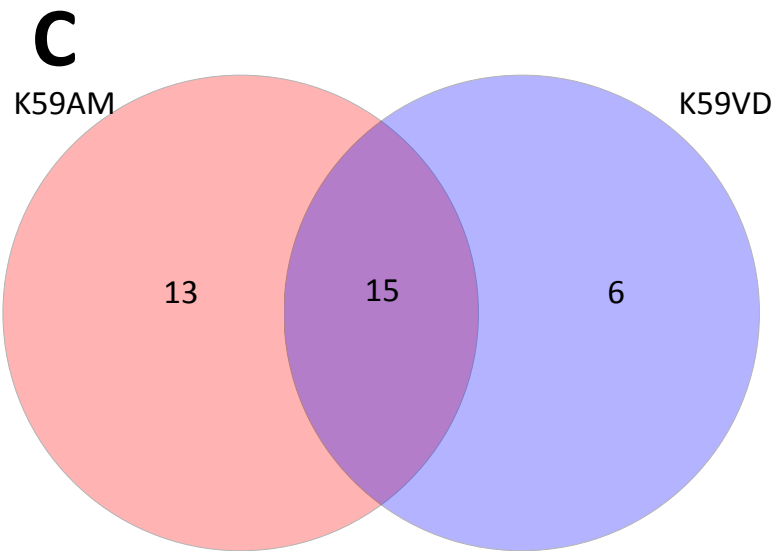
		D	
	23	M	
		D	



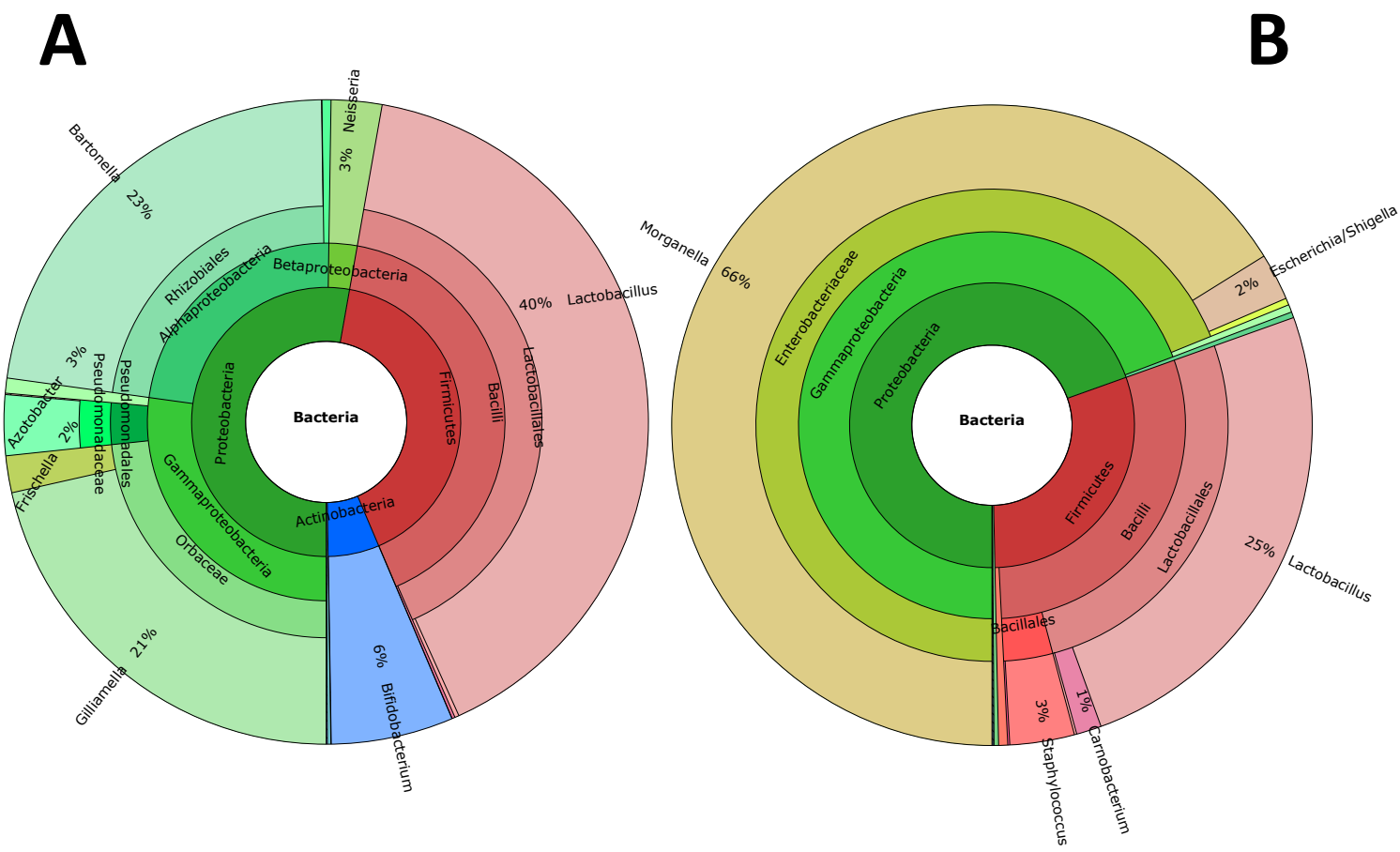


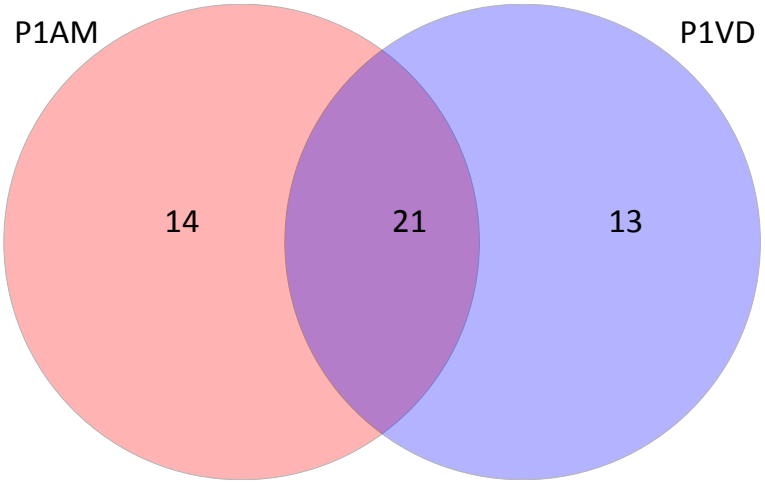
Obr. P2 - Stanoviště Horní Lhota: AB - Krona zobrazení mikrobiomu v párových vzorcích včel medonosných (A) a roztočů *Varroa destructor* (B) pro jednotlivé taxony identifikované pomocí Ribosomal database project; C - Vennův diagram podobnosti pro párové vzorky z tohoto stanoviště



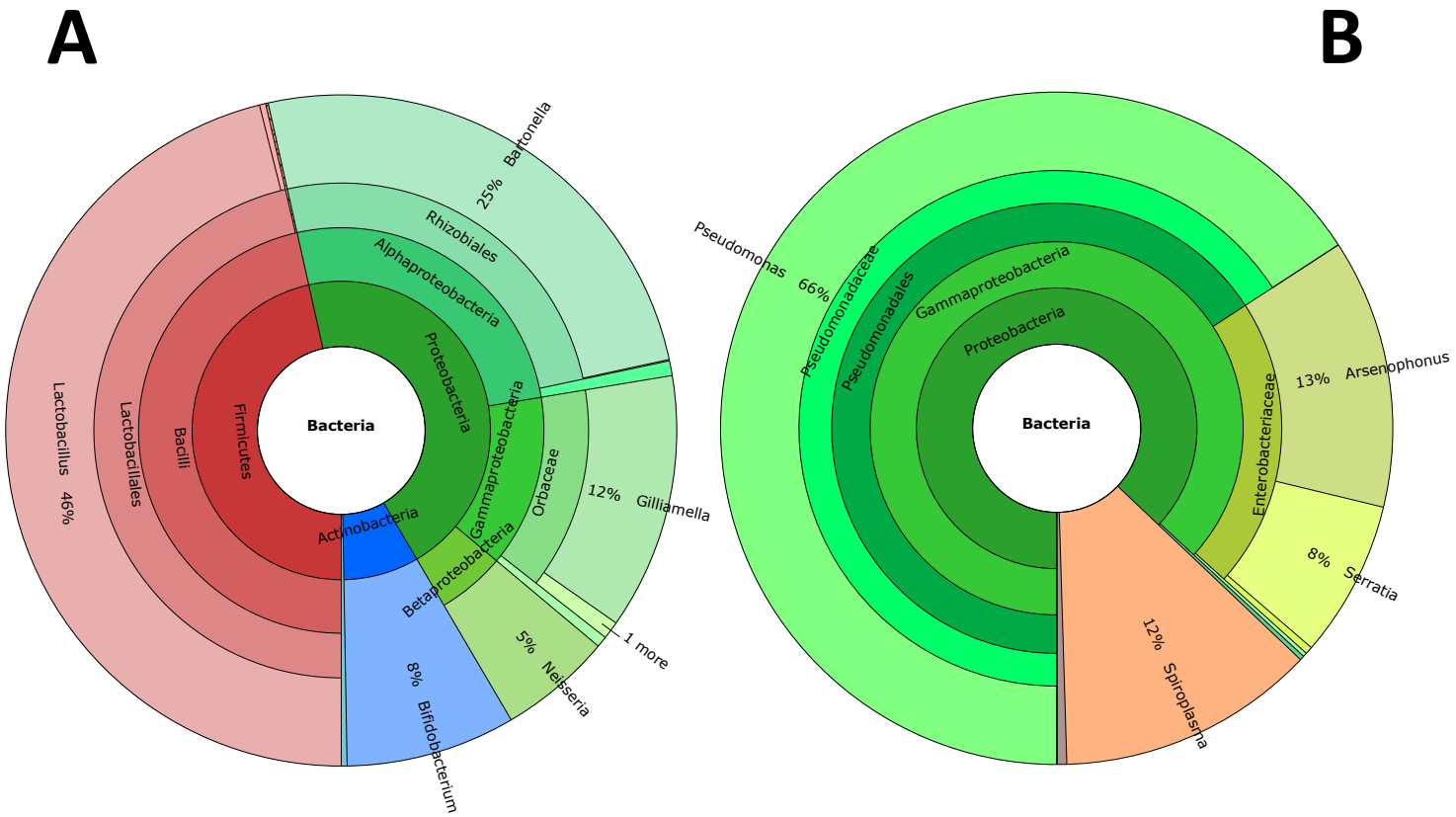


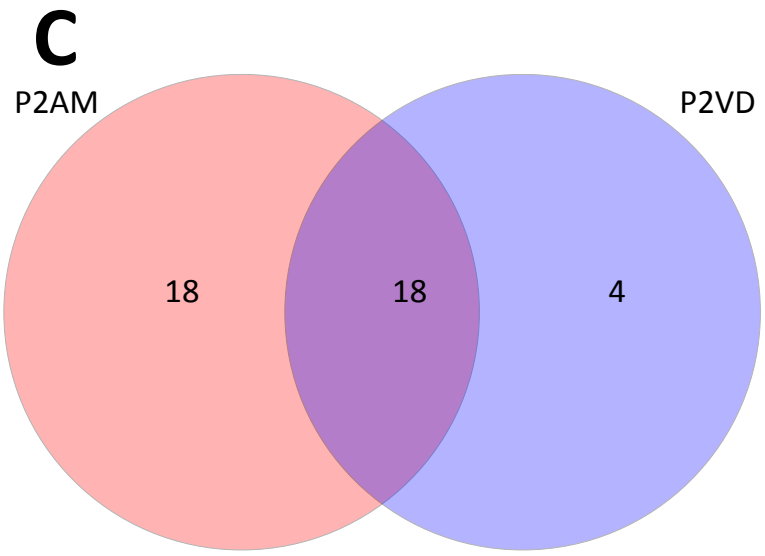
Obr. P3 - Stanoviště Kývalka: AB - Krona zobrazení mikrobiomu v párových vzorcích včel medonosných (A) a roztočů *Varroa destructor* (B) pro jednotlivé taxony identifikované pomocí Ribosomal database project; C - Vennův diagram podobnosti pro párové vzorky z tohoto stanoviště



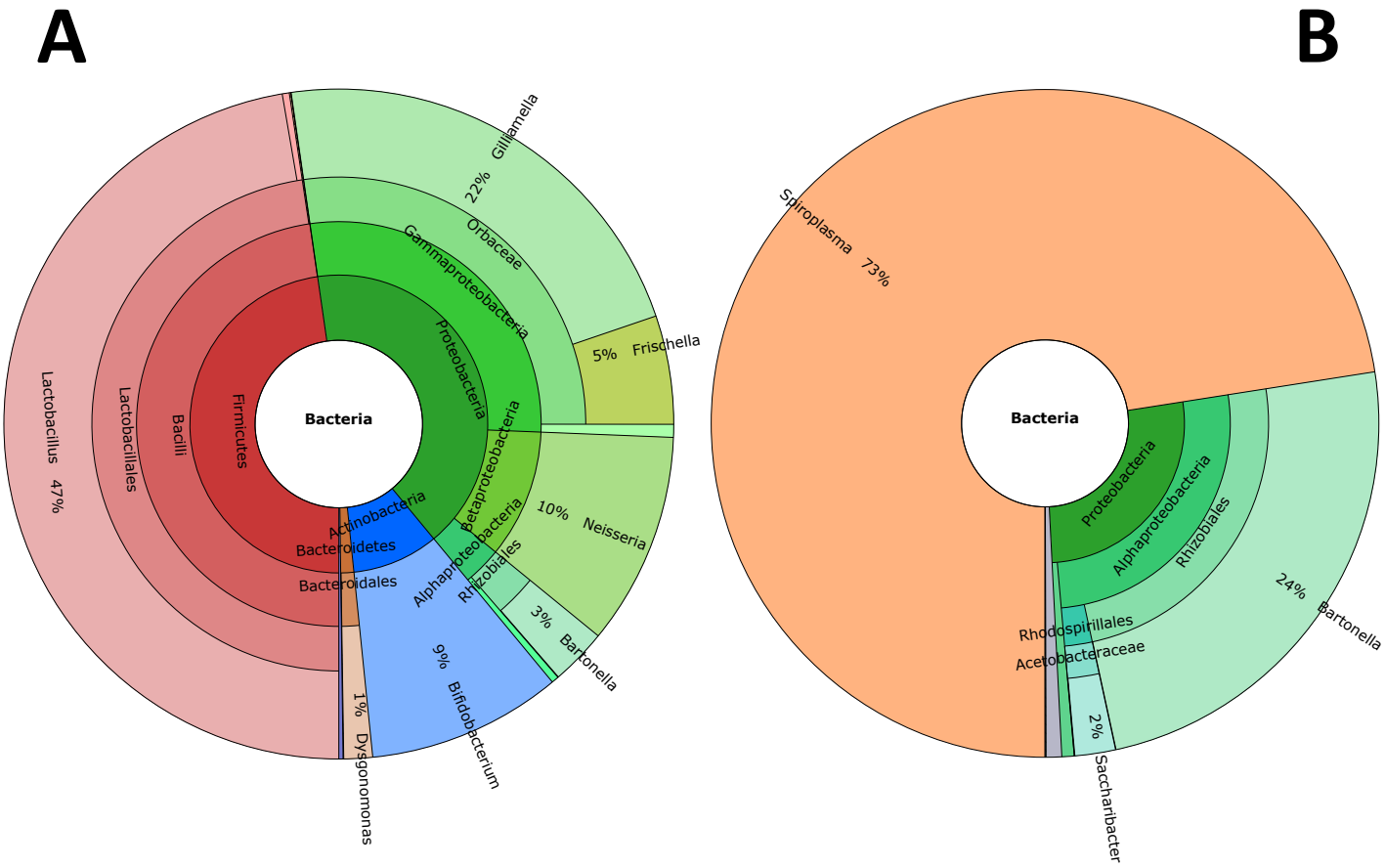


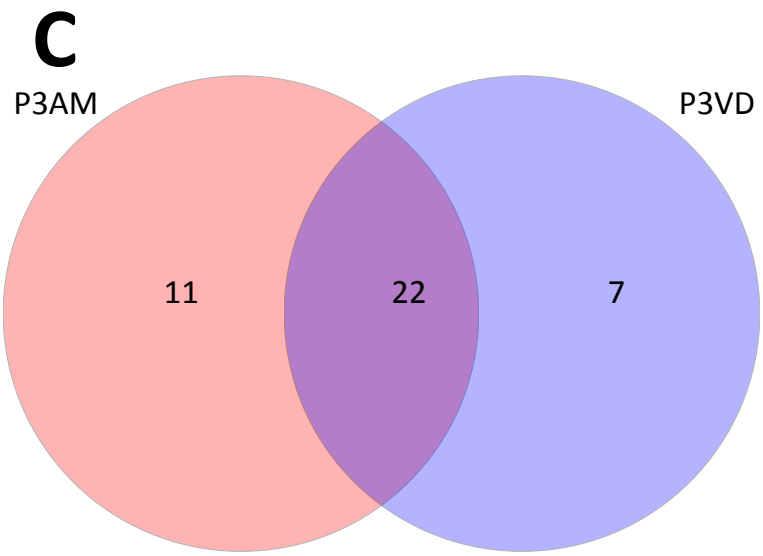
Obr. P4 - Stanoviště Postřižín 1: AB - Krona zobrazení mikrobiomu v párových vzorcích včel medonosných (A) a roztočů *Varroa destructor* (B) pro jednotlivé taxony identifikované pomocí Ribosomal database project; C - Vennův diagram podobnosti pro párové vzorky z tohoto stanoviště



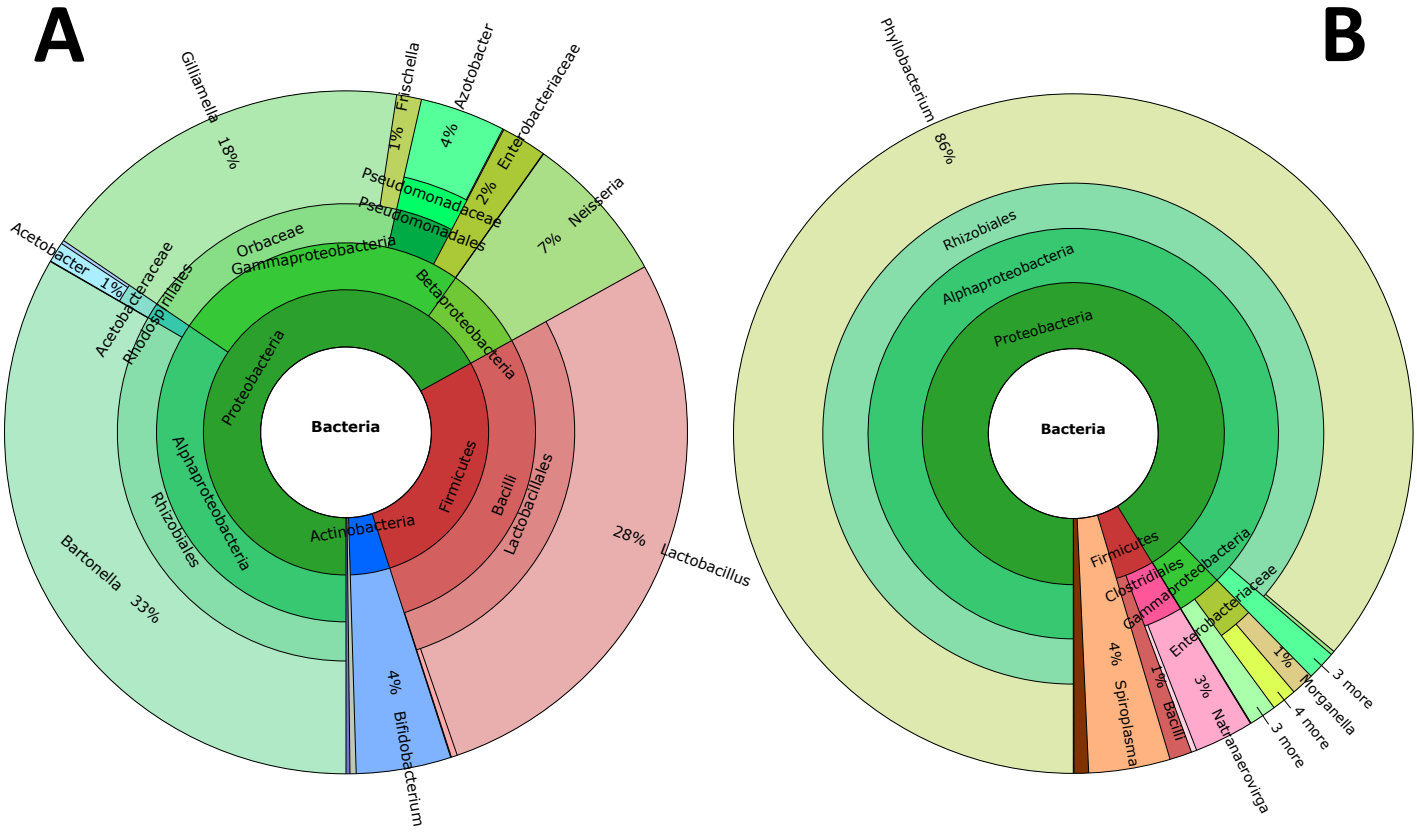


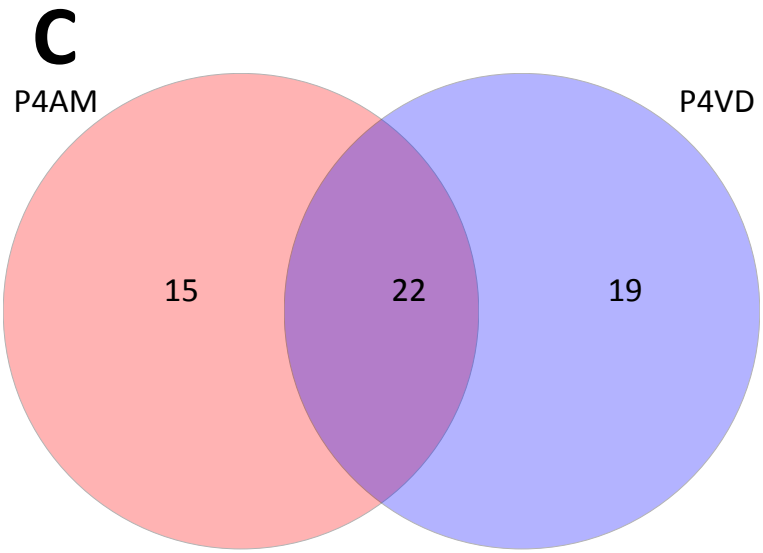
Obr. P5 - Stanoviště Postřižín 2: AB - Krona zobrazení mikrobiomu v párových vzorcích včel medonosných (A) a roztočů *Varroa destructor* (B) pro jednotlivé taxony identifikované pomocí Ribosomal database project; C - Vennův diagram podobnosti pro párové vzorky z tohoto stanoviště



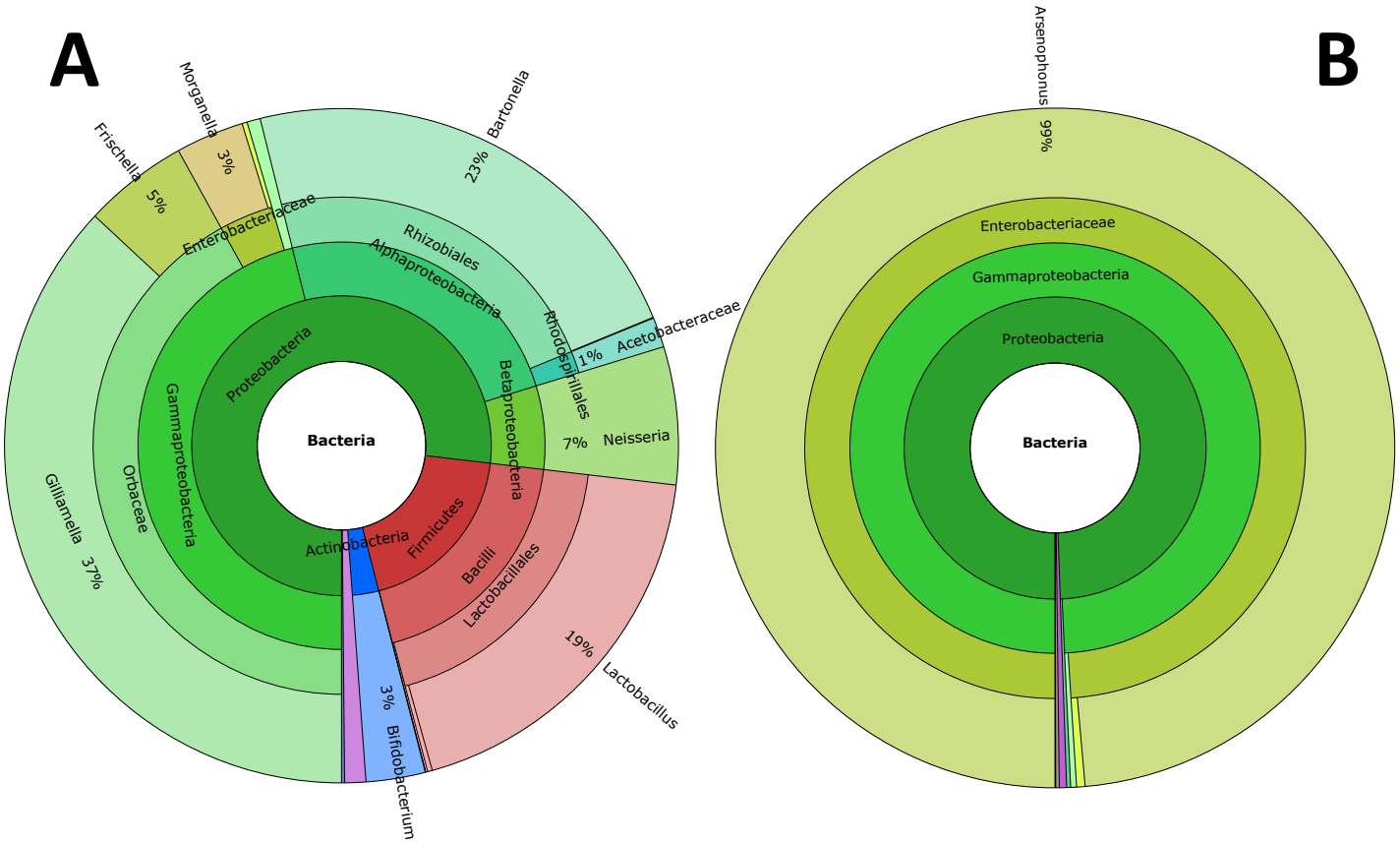


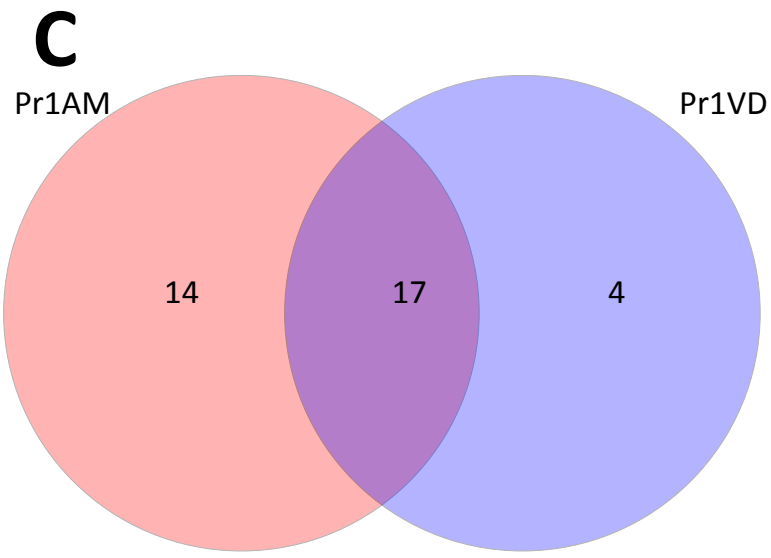
Obr. P6 - Stanoviště Postřižín 3: AB - Krona zobrazení mikrobiomu v párových vzorcích včel medonosných (A) a roztočů *Varroa destructor* (B) pro jednotlivé taxony identifikované pomocí Ribosomal database project; C - Vennův diagram podobnosti pro párové vzorky z tohoto stanoviště



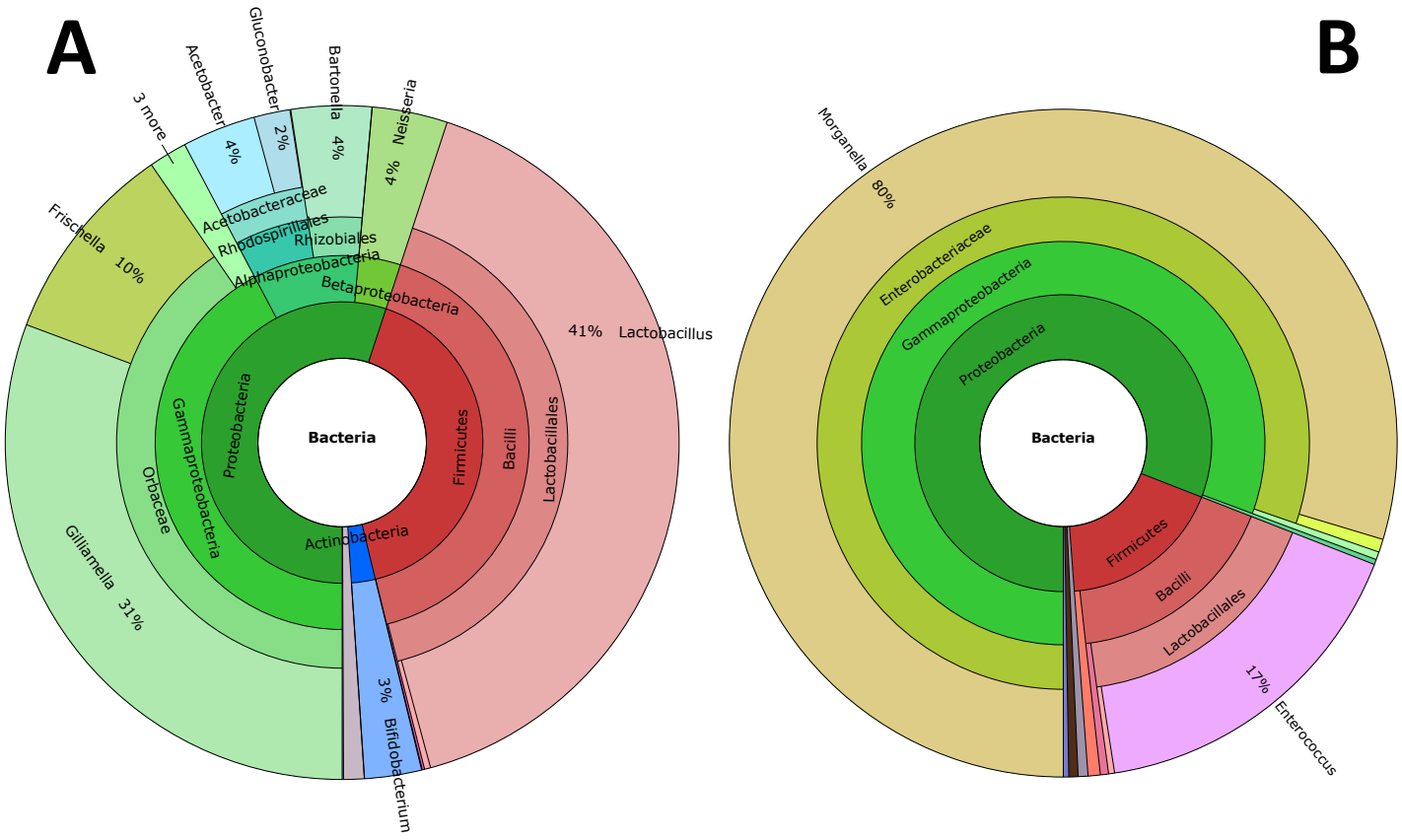


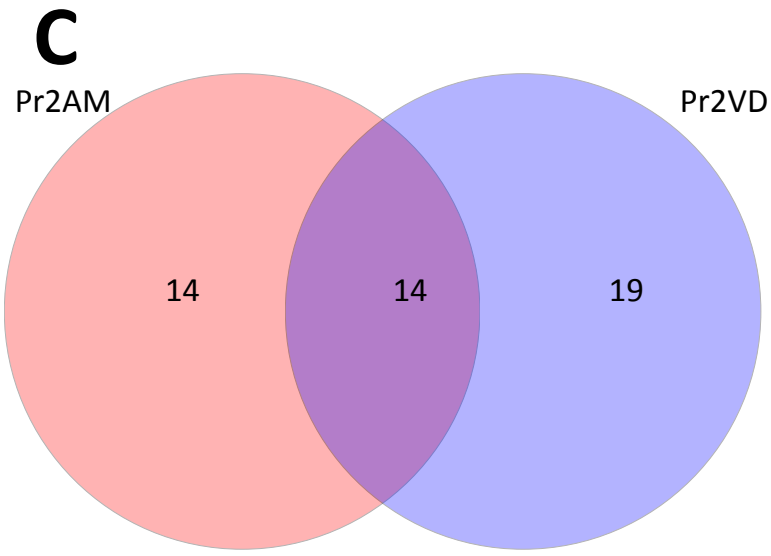
Obr. P7 - Stanoviště Postřižín 4: AB - Krona zobrazení mikrobiomu v párových vzorcích včel medonosných (A) a roztočů *Varroa destructor* (B) pro jednotlivé taxony identifikované pomocí Ribosomal database project; C - Vennův diagram podobnosti pro párové vzorky z tohoto stanoviště





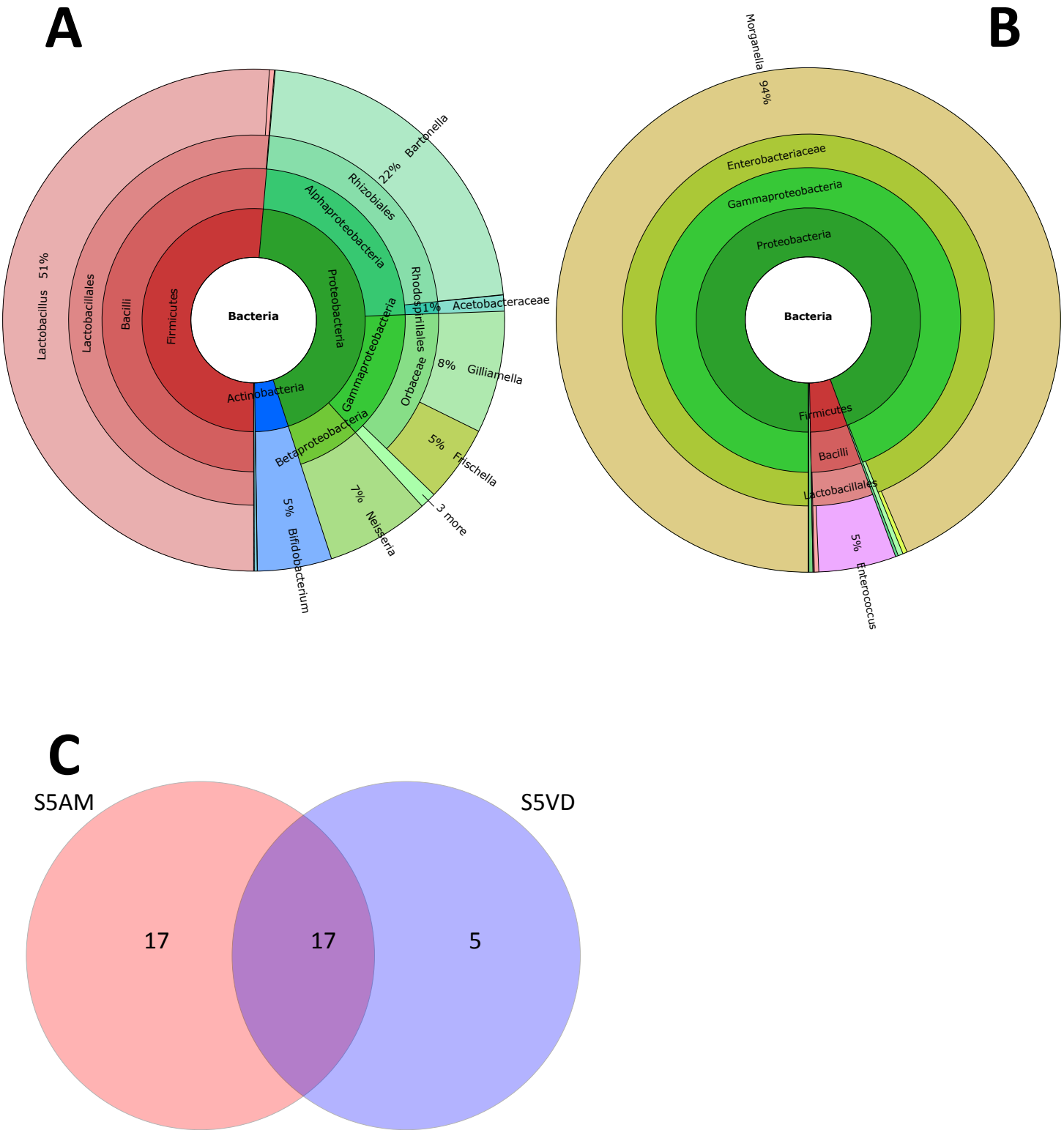
Obr. P8 - Stanoviště Přelovice 1: AB - Krona zobrazení mikrobiomu v párových vzorcích včel medonosných (A) a roztočů *Varroa destructor* (B) pro jednotlivé taxony identifikované pomocí Ribosomal database project; C - Vennův diagram podobnosti pro párové vzorky z tohoto stanoviště



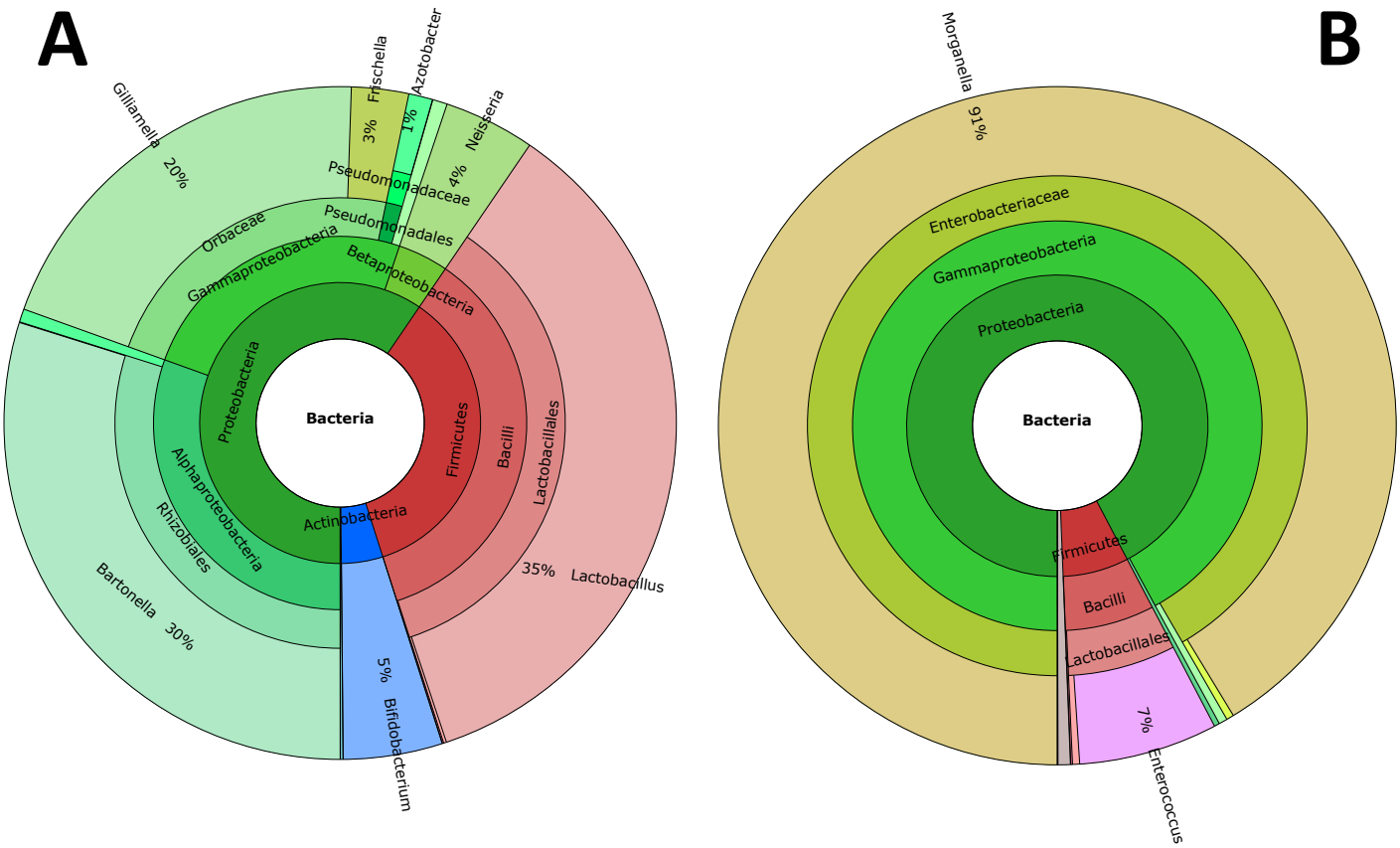


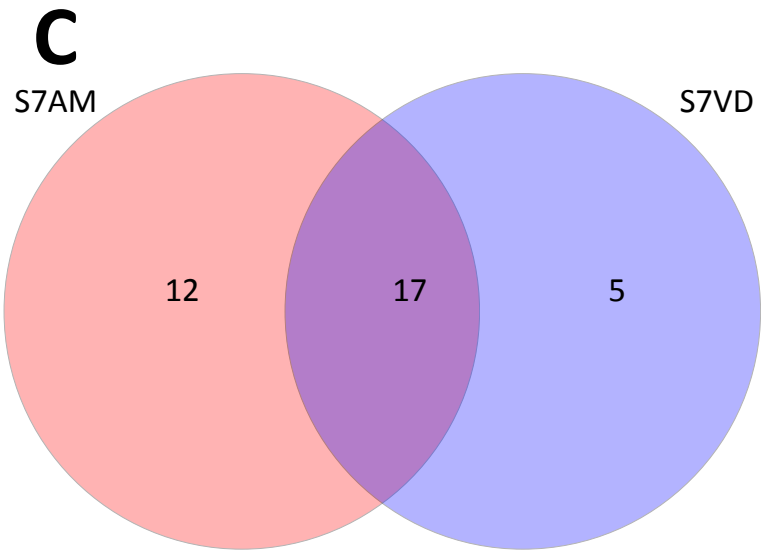
Obr. P9 - Stanoviště Přelovice 2: AB - Krona zobrazení mikrobiomu v párových vzorcích včel medonosných (A) a roztočů *Varroa destructor* (B) pro jednotlivé taxony identifikované pomocí Ribosomal database project; C - Vennův diagram podobnosti pro párové vzorky z tohoto stanoviště

x

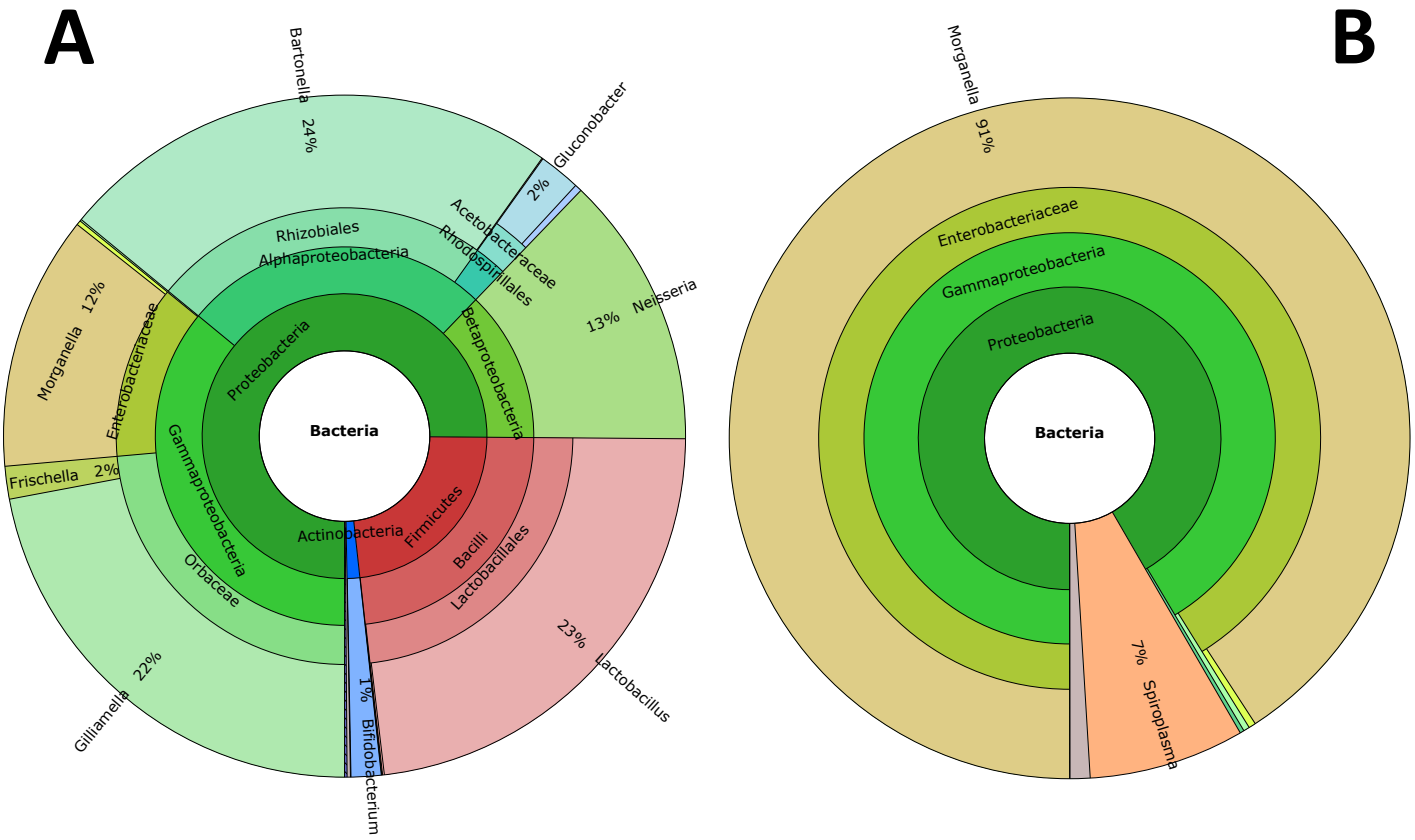


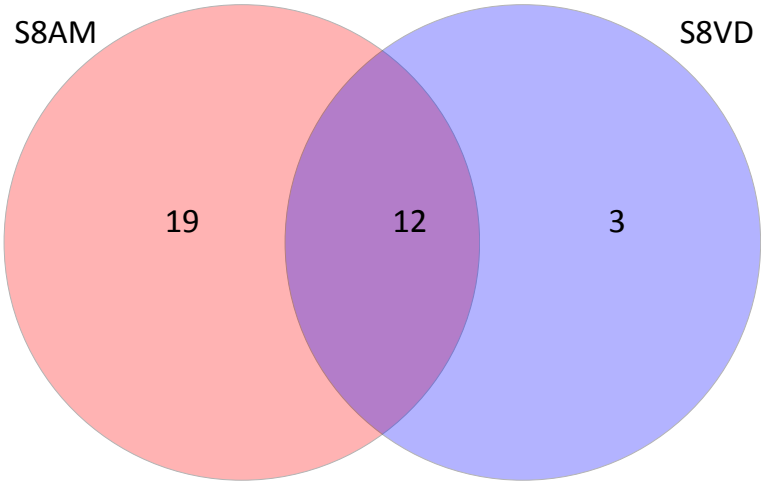
Obr. P10 - Stanoviště Hole S5: AB - Krona zobrazení mikrobiomu v párových vzorcích včel medonosných (A) a roztočů *Varroa destructor* (B) pro jednotlivé taxony identifikované pomocí Ribosomal database project; C - Vennův diagram podobnosti pro párové vzorky z tohoto stanoviště



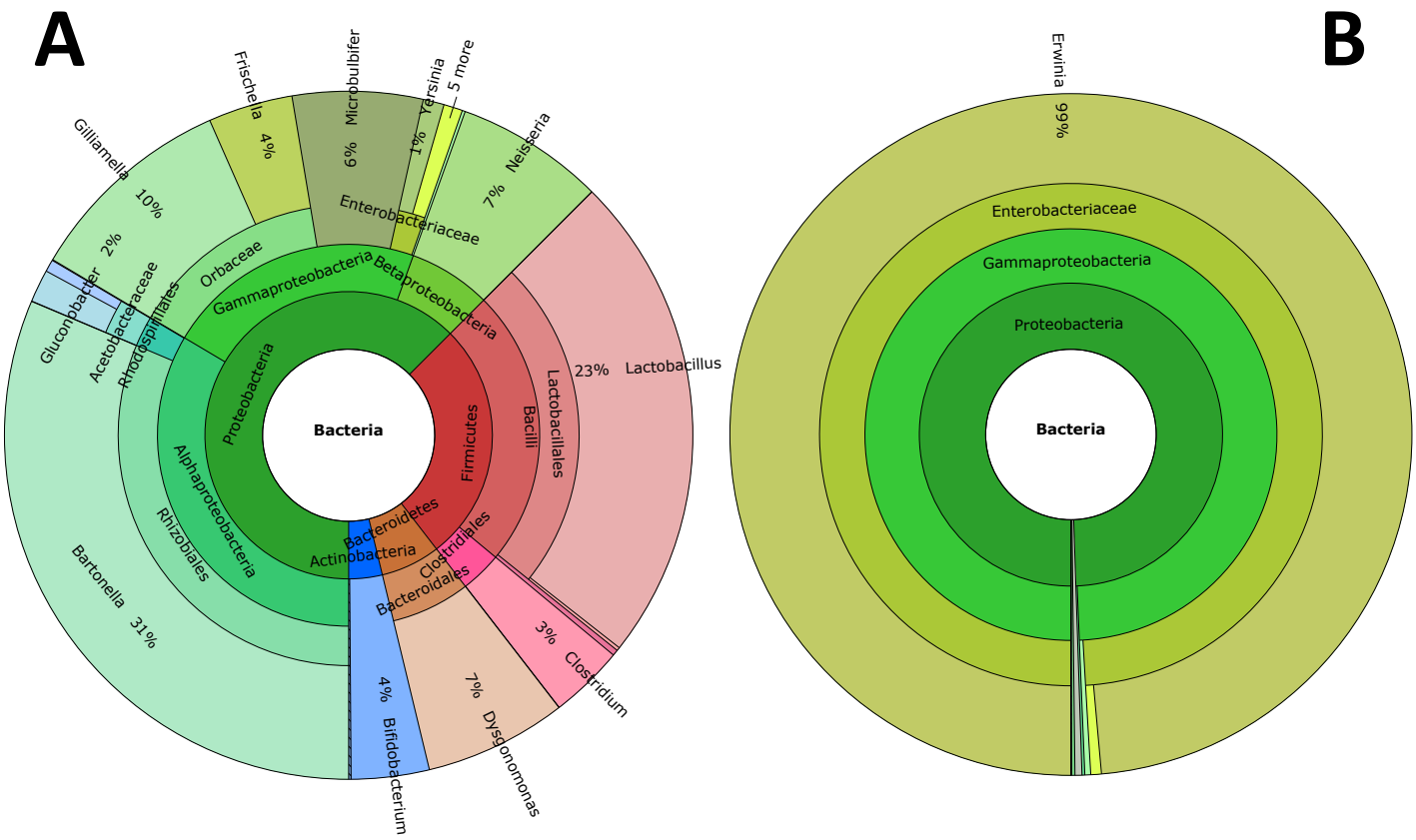


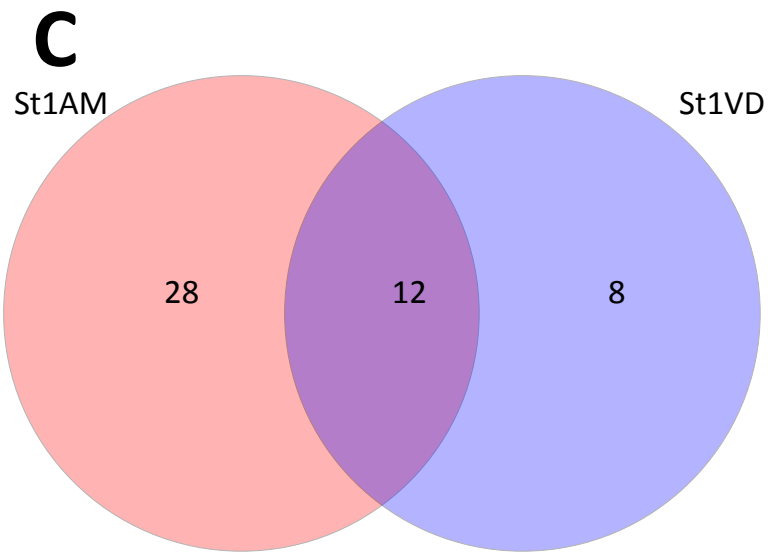
Obr. P11 - Stanoviště Hole S7: AB - Krona zobrazení mikrobiomu v párových vzorcích včel medonosných (A) a roztočů *Varroa destructor* (B) pro jednotlivé taxony identifikované pomocí Ribosomal database project; C - Vennův diagram podobnosti pro párové vzorky z tohoto stanoviště



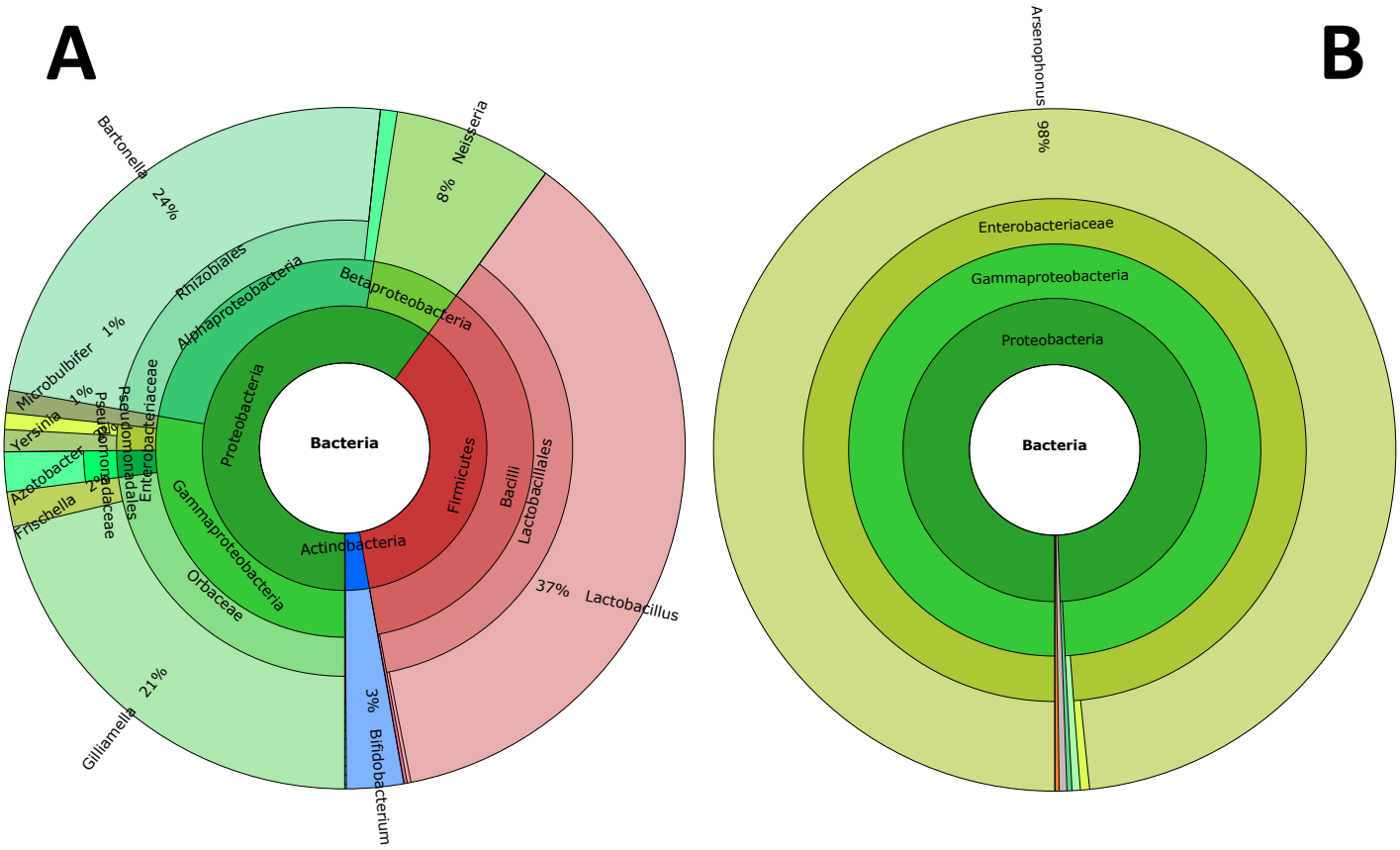


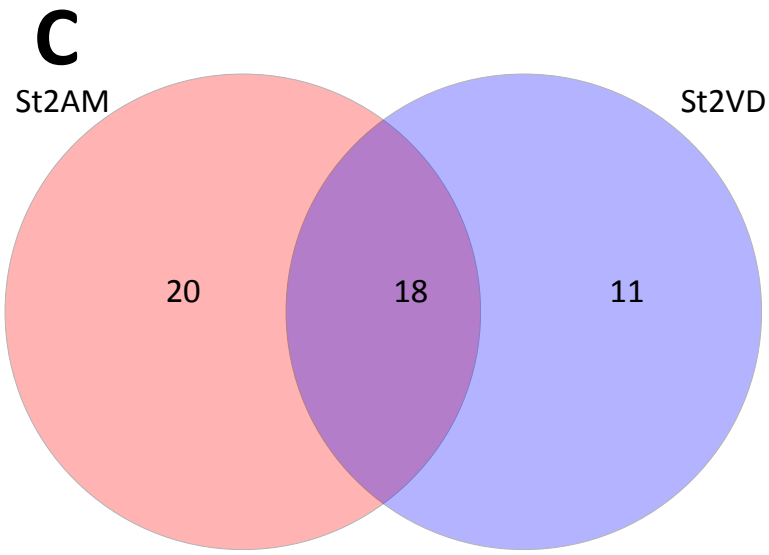
Obr. P12 - Stanoviště Hole S8: AB - Krona zobrazení mikrobiomu v párových vzorcích včel medonosných (A) a roztočů *Varroa destructor* (B) pro jednotlivé taxony identifikované pomocí Ribosomal database project; C - Vennův diagram podobnosti pro párové vzorky z tohoto stanoviště



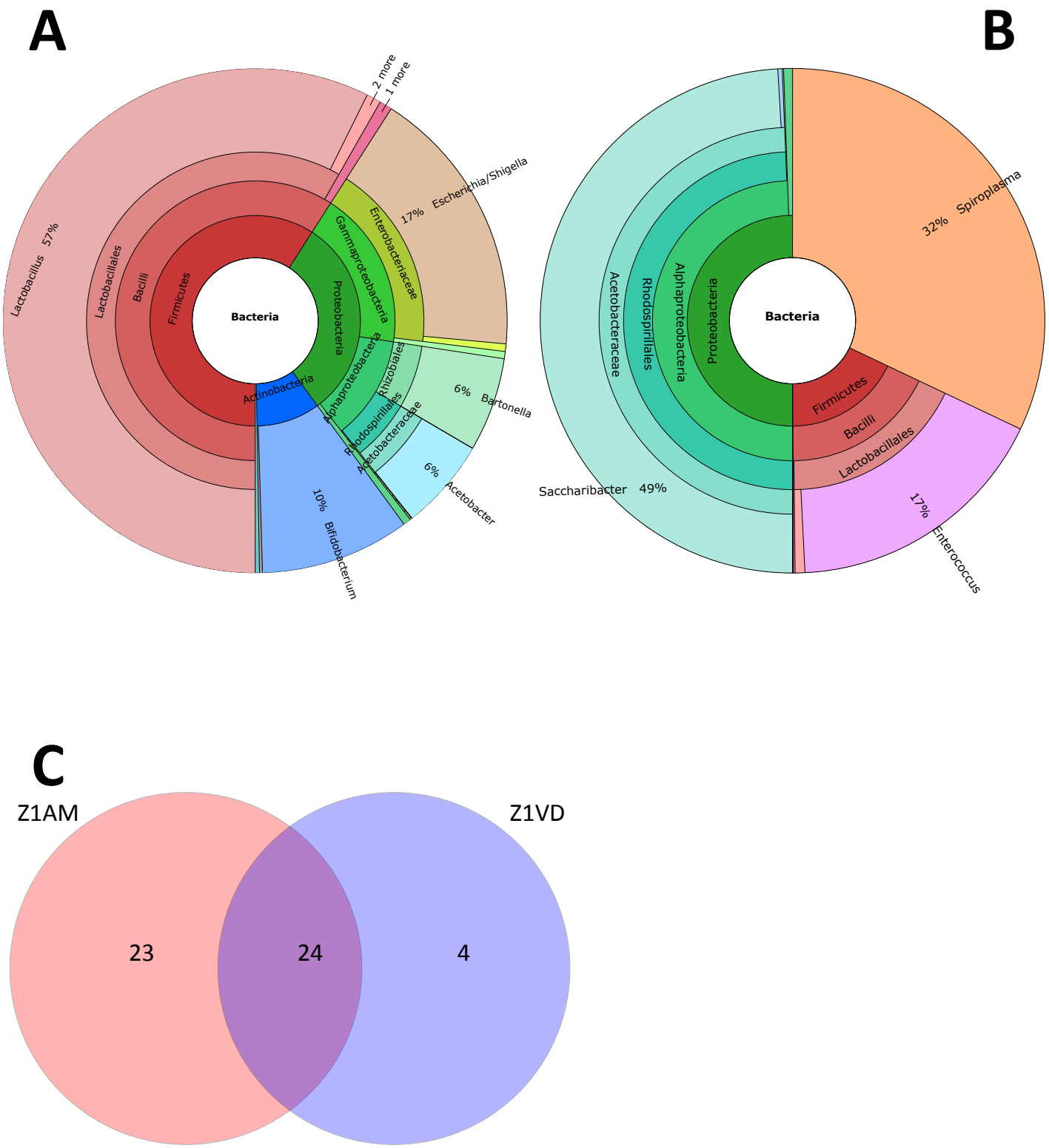


Obr. P13 - Stanoviště Střeleč 1: AB - Krona zobrazení mikrobiomu v párových vzorcích včel medonosných (A) a roztočů *Varroa destructor* (B) pro jednotlivé taxony identifikované pomocí Ribosomal database project; C - Vennův diagram podobnosti pro párové vzorky z tohoto stanoviště

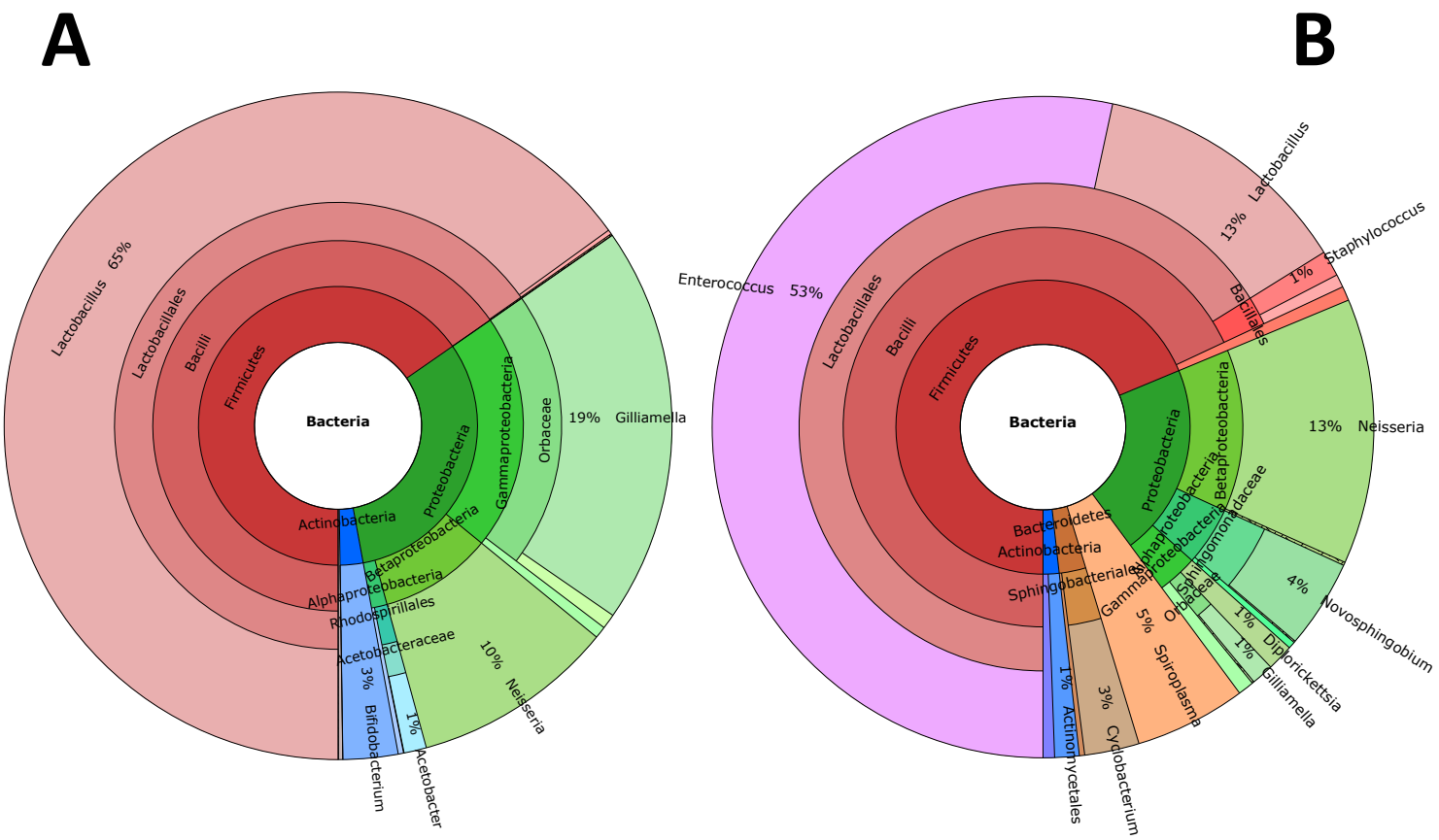


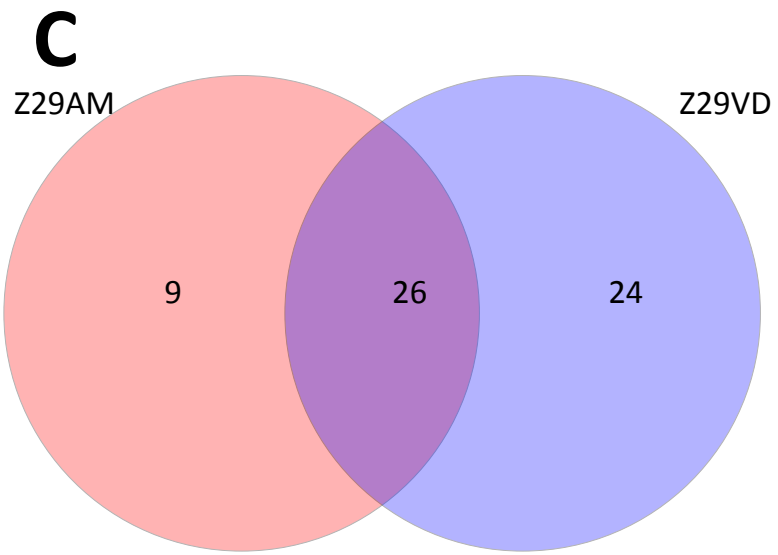


Obr. P14 - Stanoviště Střeleč 2: AB - Krona zobrazení mikrobiomu v párových vzorcích včel medonosných (A) a roztočů *Varroa destructor* (B) pro jednotlivé taxony identifikované pomocí Ribosomal database project; C - Vennův diagram podobnosti pro párové vzorky z tohoto stanoviště

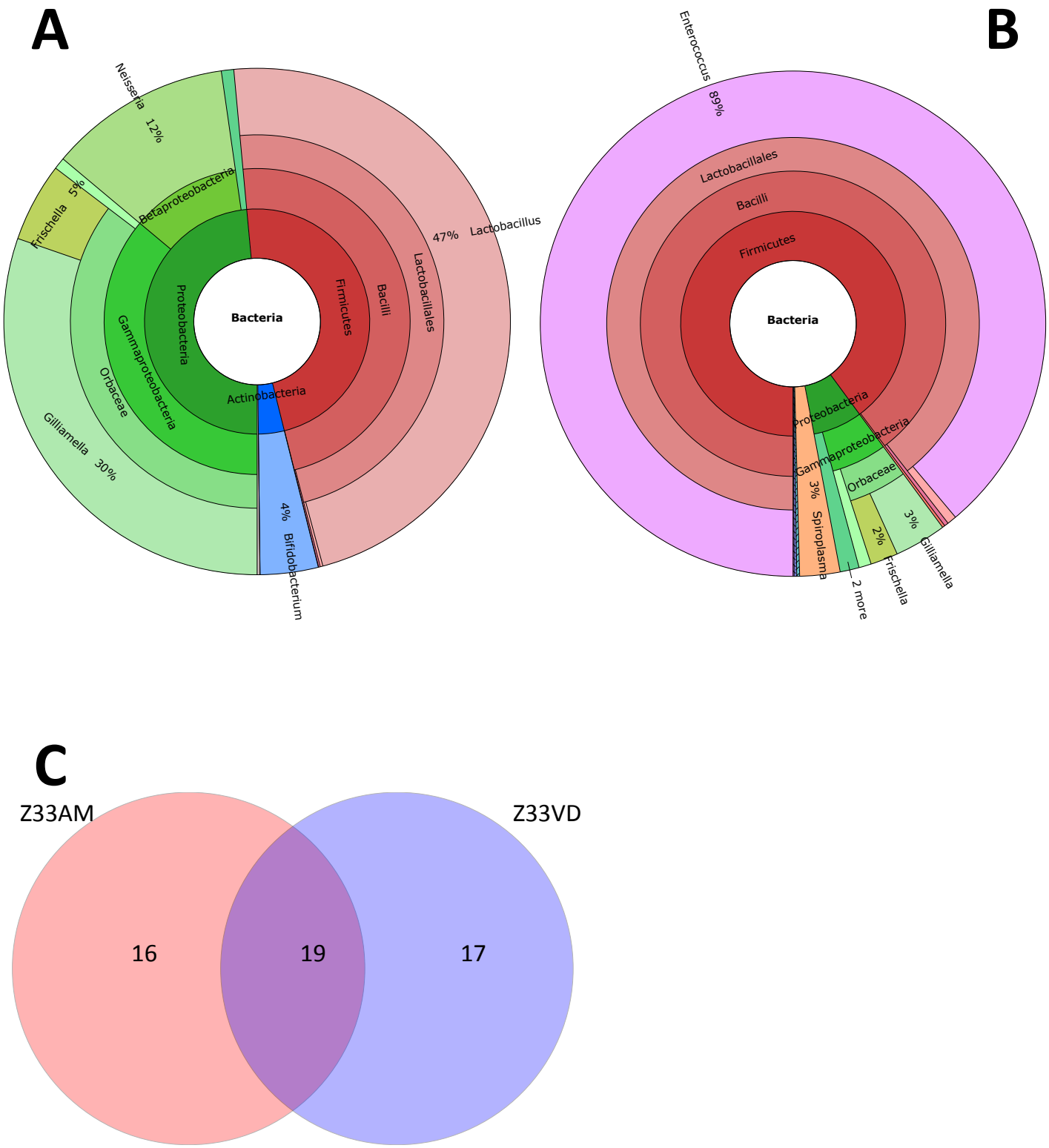


Obr. P15 - Stanoviště Štoky-Skřivánek Z1: AB - Krona zobrazení mikrobiomu v párových vzorcích včel medonosných (A) a roztočů *Varroa destructor* (B) pro jednotlivé taxony identifikované pomocí Ribosomal database project; C - Vennův diagram podobnosti pro párové vzorky z tohoto stanoviště

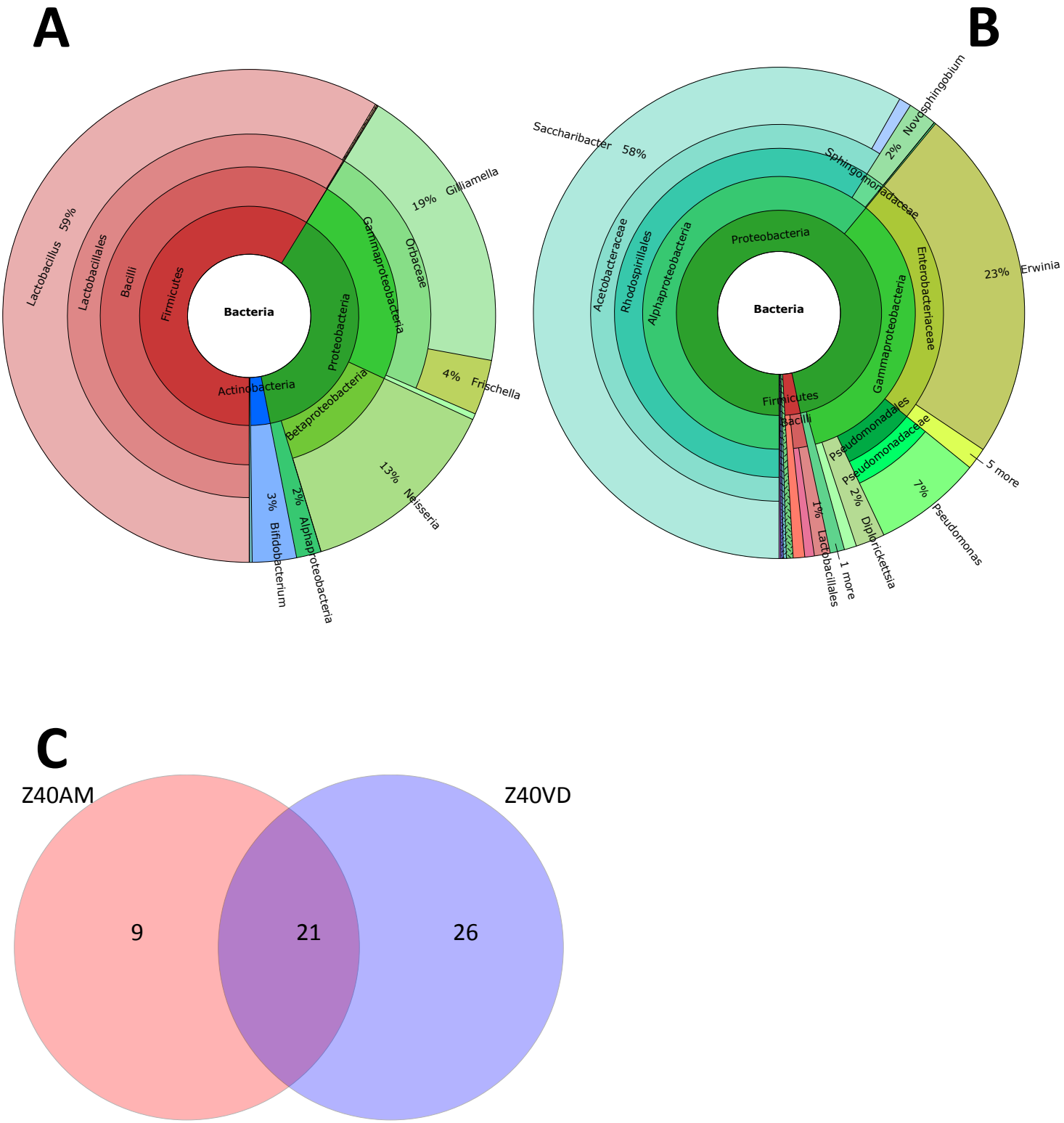




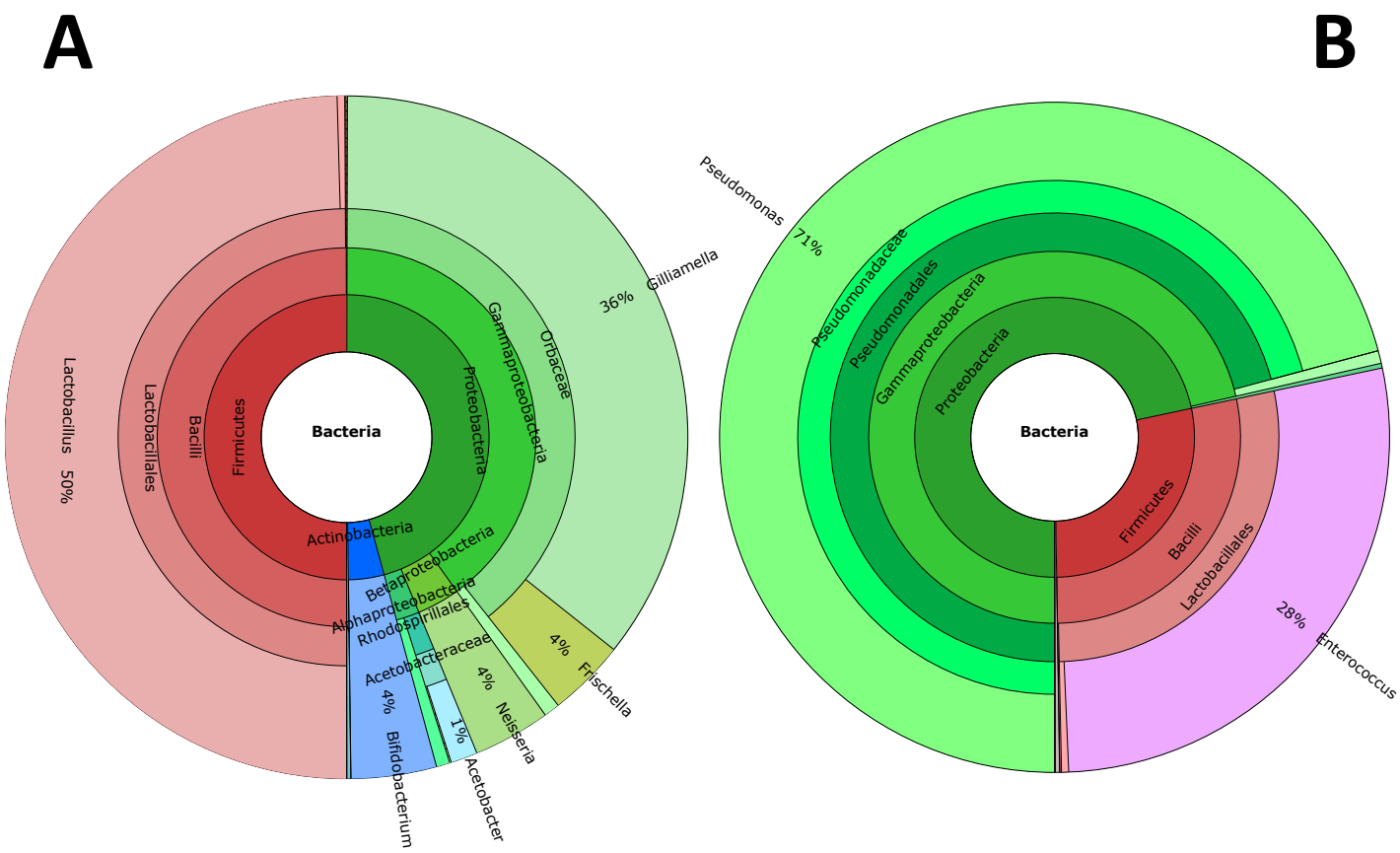
Obr. P16 - Stanoviště Štoky-Skřivánek Z29: AB - Krona zobrazení mikrobiomu v párových vzorcích včel medonosných (A) a roztočů *Varroa destructor* (B) pro jednotlivé taxony identifikované pomocí Ribosomal database project; C - Vennův diagram podobnosti pro párové vzorky z tohoto stanoviště

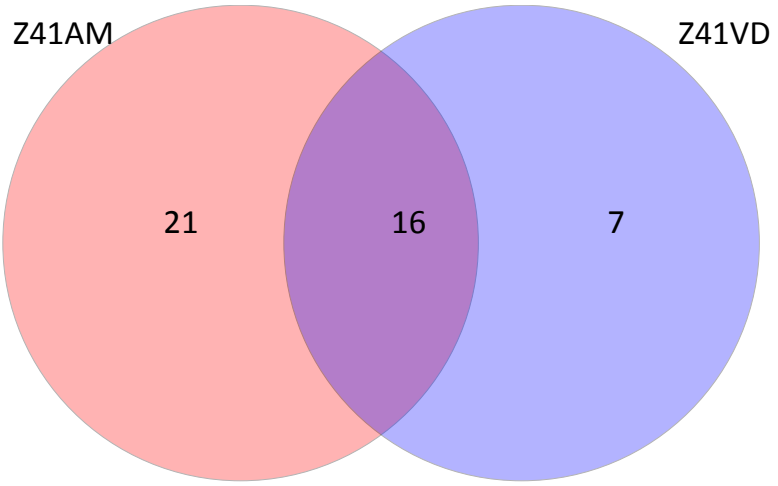


Obr. P17 - Stanoviště Štoky-Skřivánek Z33: AB - Krona zobrazení mikrobiomu v párových vzorcích včel medonosných (A) a roztočů *Varroa destructor* (B) pro jednotlivé taxony identifikované pomocí Ribosomal database project; C - Vennův diagram podobnosti pro párové vzorky z tohoto stanoviště

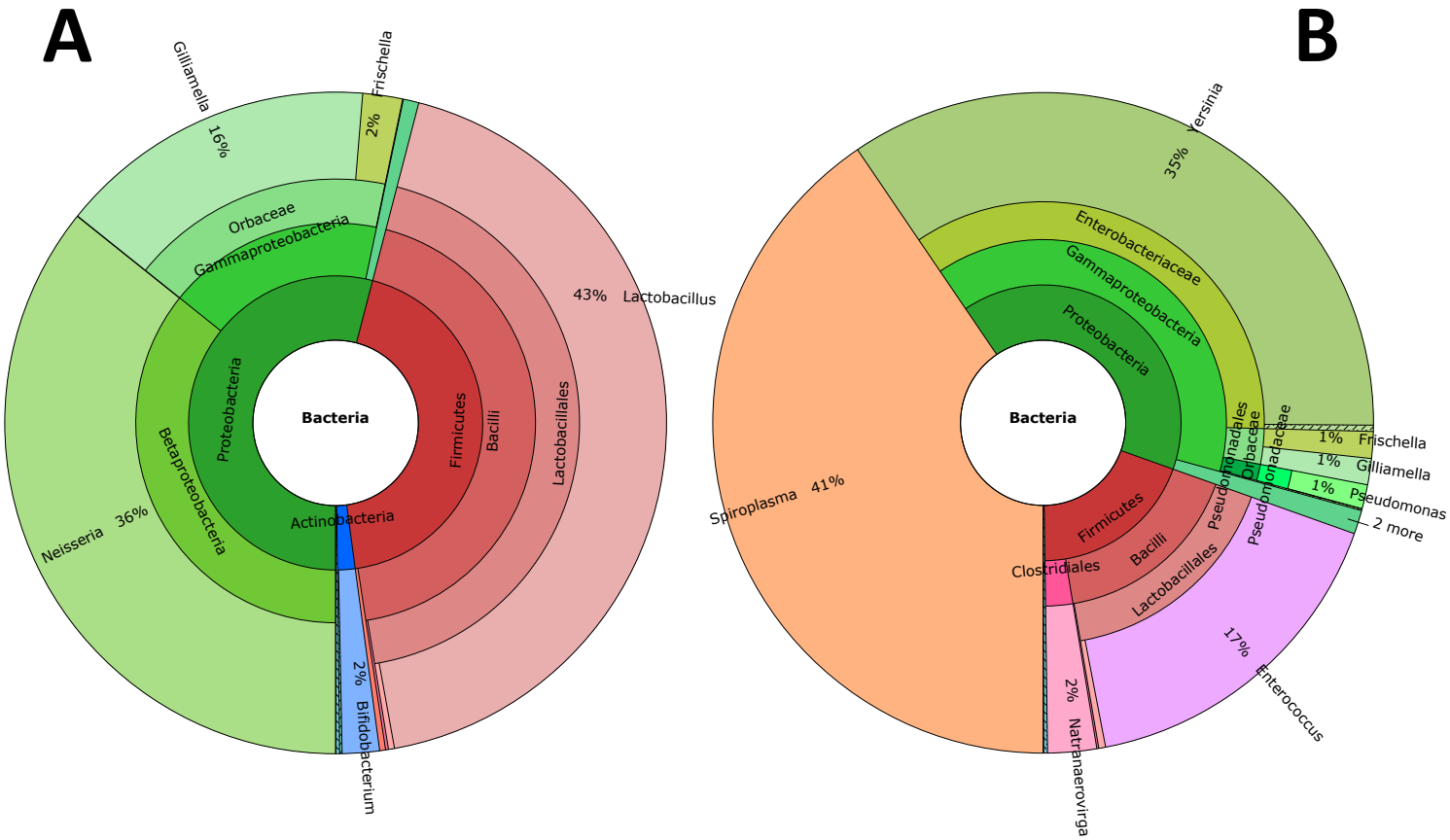


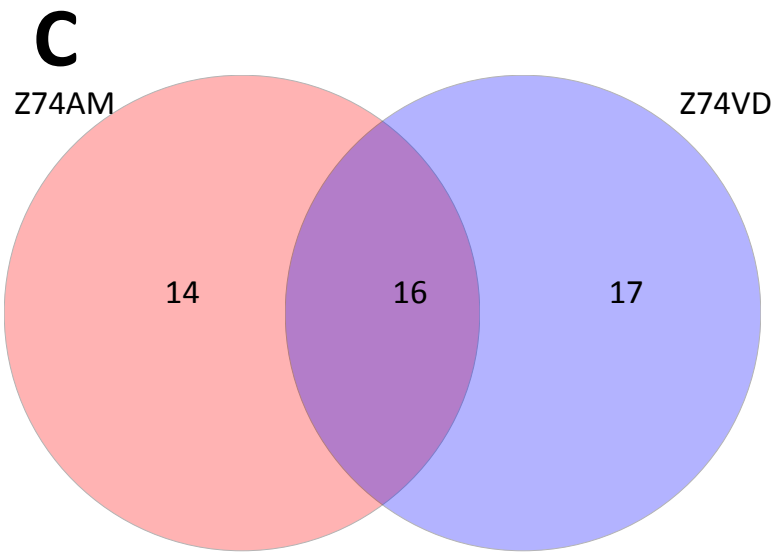
Obr. P18 - Stanoviště Štoky-Skřivánek Z40: AB - Krona zobrazení mikrobiomu v párových vzorcích včel medonosných (A) a roztočů *Varroa destructor* (B) pro jednotlivé taxony identifikované pomocí Ribosomal database project; C - Vennův diagram podobnosti pro párové vzorky z tohoto stanoviště



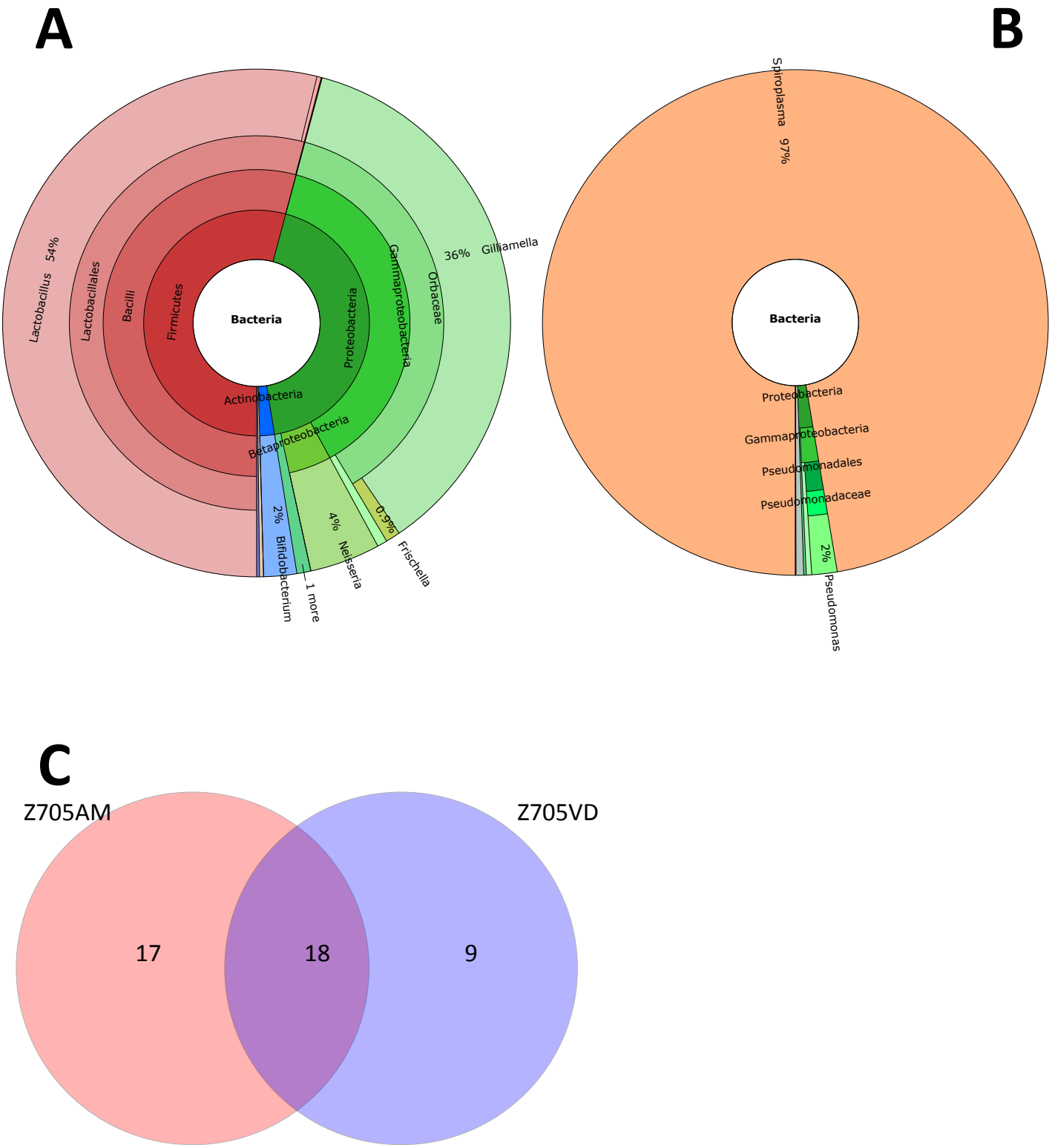


Obr. P19 - Stanoviště Štoky-Skřivánek Z41: AB - Krona zobrazení mikrobiomu v párových vzorcích včel medonosných (A) a roztočů *Varroa destructor* (B) pro jednotlivé taxony identifikované pomocí Ribosomal database project; C - Vennův diagram podobnosti pro párové vzorky z tohoto stanoviště

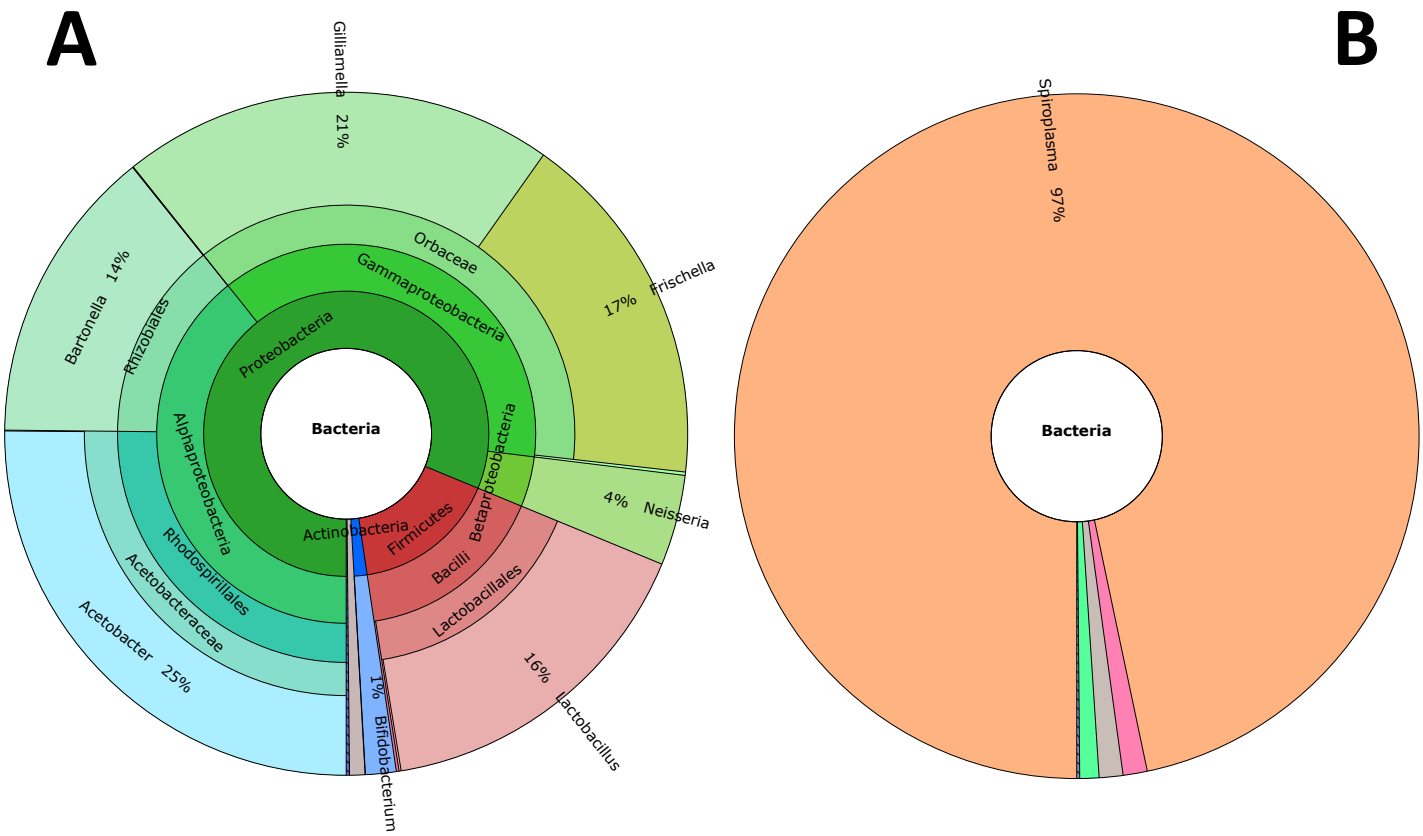


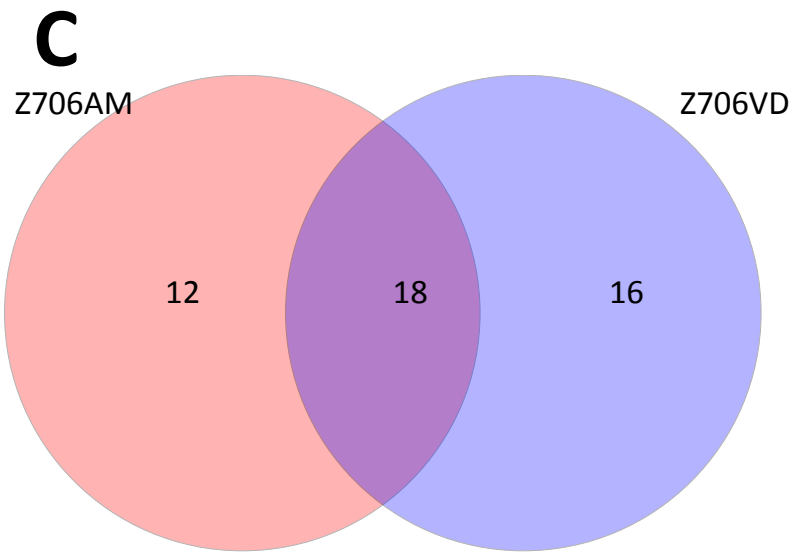


Obr. P20 - Stanoviště Štoky-Skřivánek Z74: AB - Krona zobrazení mikrobiomu v párových vzorcích včel medonosných (A) a roztočů *Varroa destructor* (B) pro jednotlivé taxony identifikované pomocí Ribosomal database project; C - Vennův diagram podobnosti pro párové vzorky z tohoto stanoviště

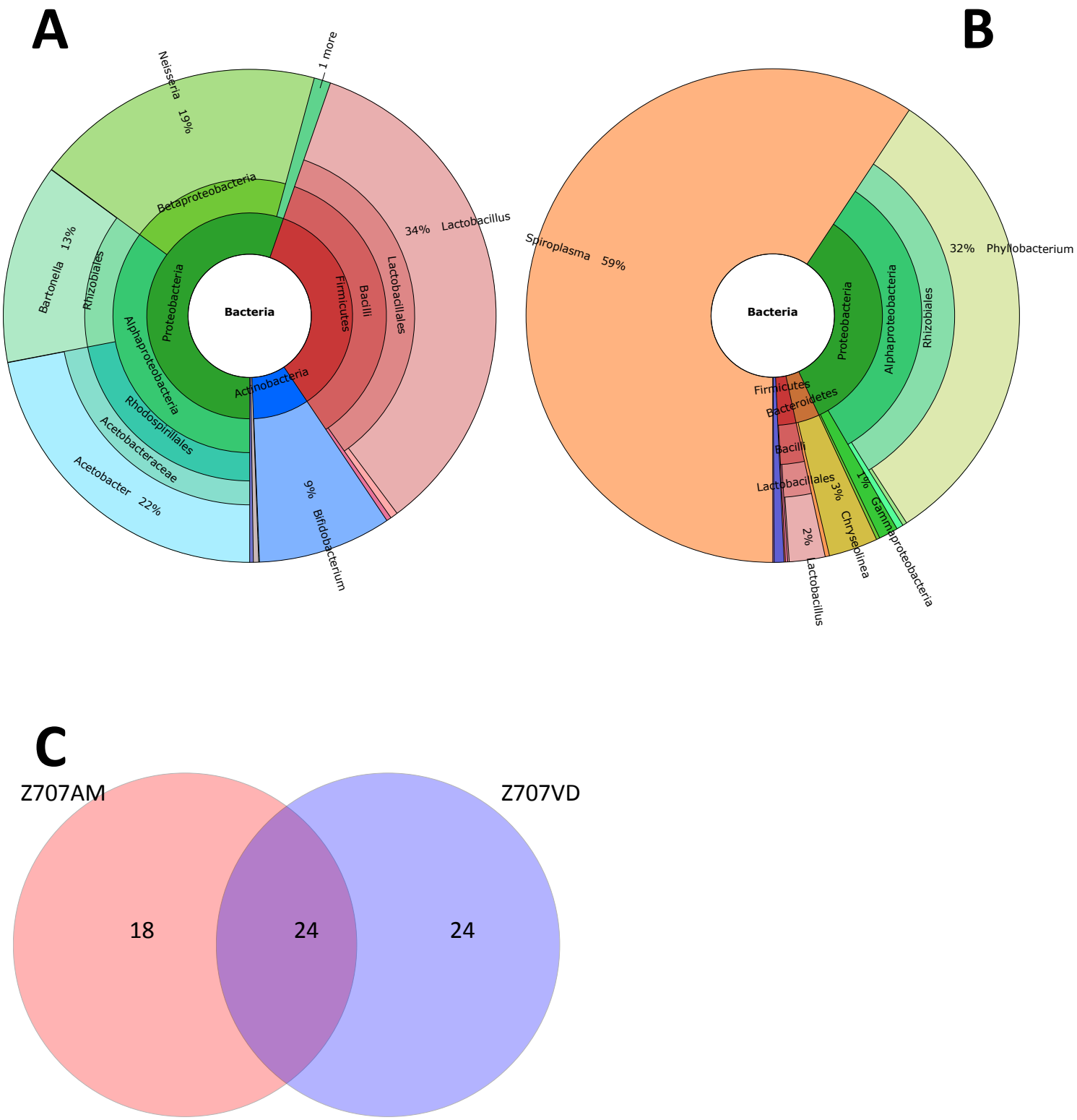


Obr. P21 - Stanoviště Štoky-Skřivánek Z705: AB - Krona zobrazení mikrobiomu v párových vzorcích včel medonosných (A) a roztočů *Varroa destructor* (B) pro jednotlivé taxony identifikované pomocí Ribosomal database project; C - Vennův diagram podobnosti pro párové vzorky z tohoto stanoviště

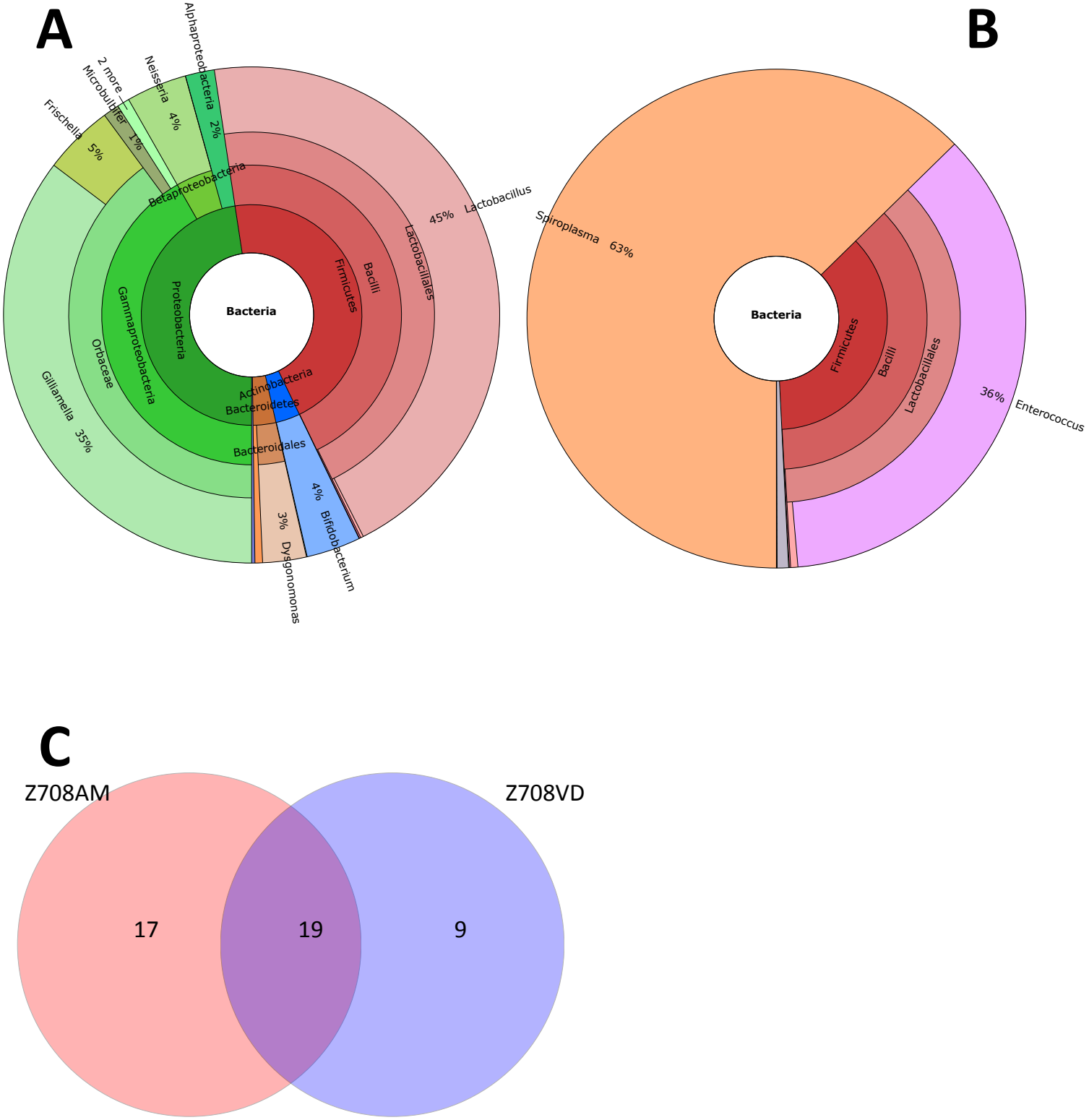




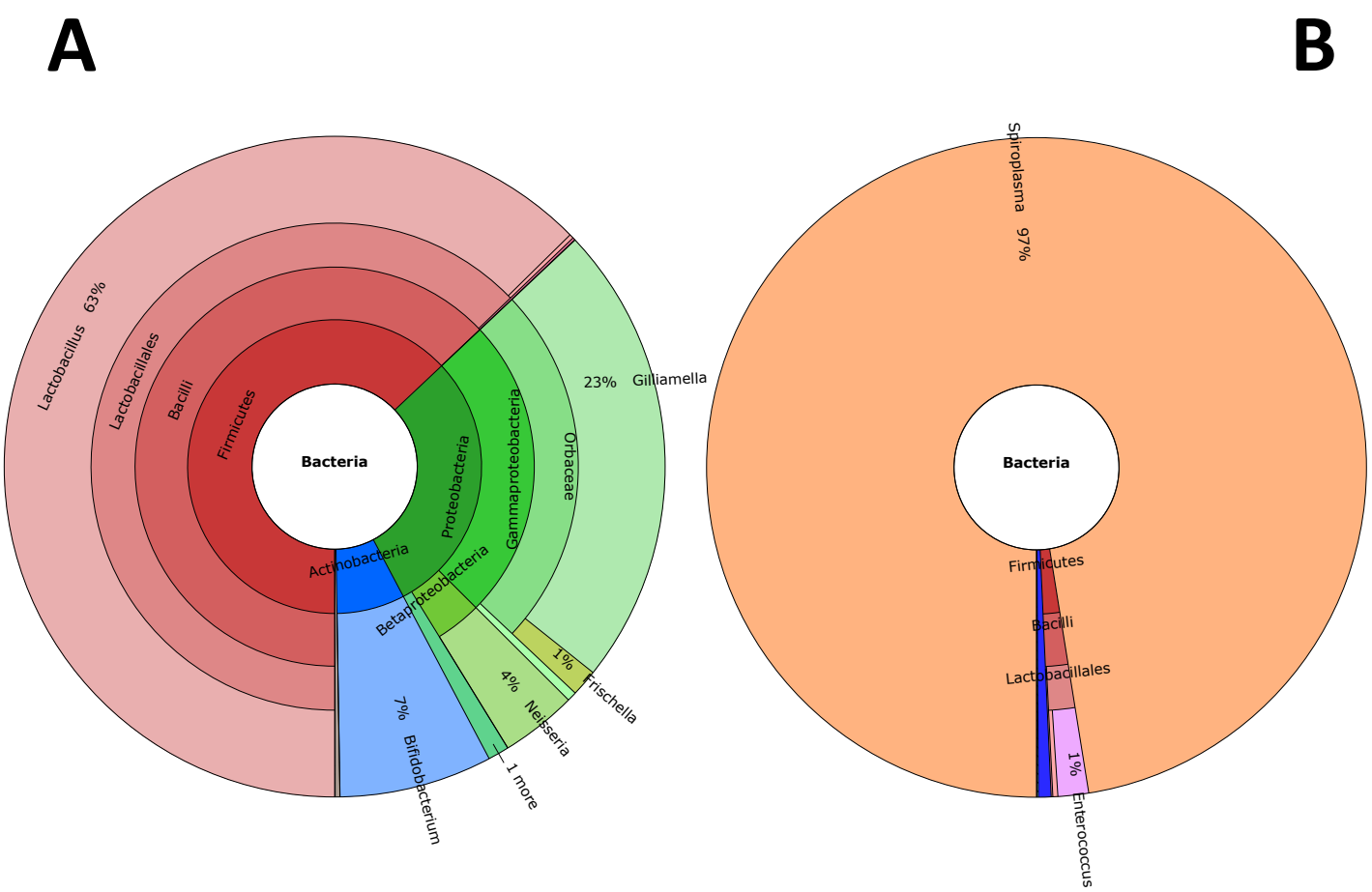
Obr. P22 - Stanoviště Štoky-Skřivánek Z706: AB - Krona zobrazení mikrobiomu v párových vzorcích včel medonosných (A) a roztočů *Varroa destructor* (B) pro jednotlivé taxony identifikované pomocí Ribosomal database project; C - Vennův diagram podobnosti pro párové vzorky z tohoto stanoviště

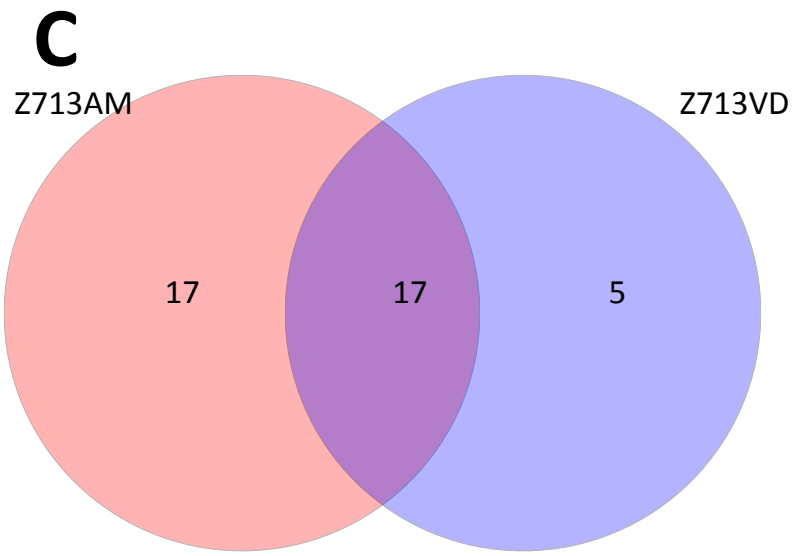


Obr. P23 - Stanoviště Štoky-Skřivánek Z707: AB - Krona zobrazení mikrobiomu v párových vzorcích včel medonosných (A) a roztočů *Varroa destructor* (B) pro jednotlivé taxony identifikované pomocí Ribosomal database project; C - Vennův diagram podobnosti pro párové vzorky z tohoto stanoviště

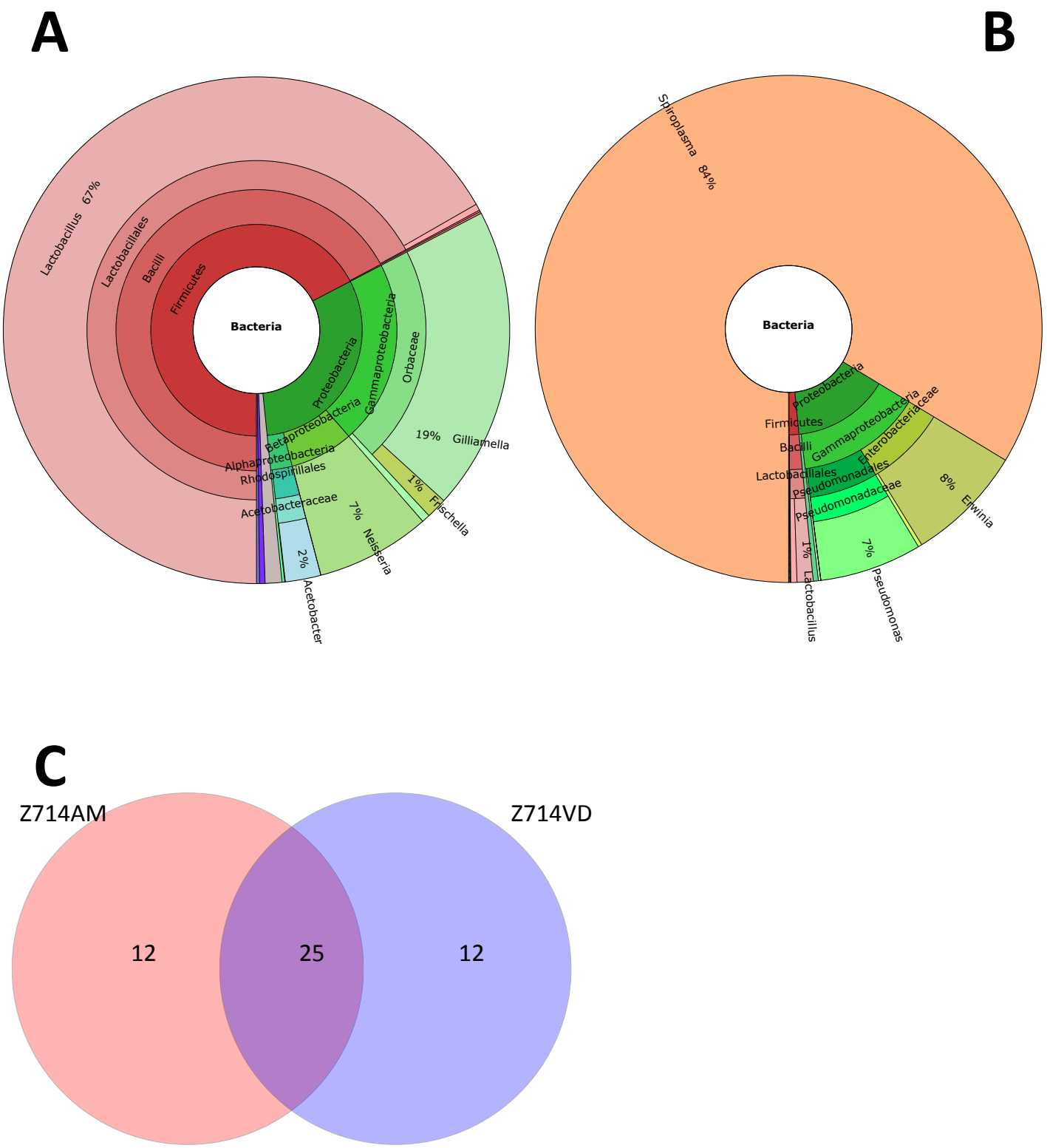


Obr. P24 - Stanoviště Štoky-Skřivánek Z708: AB - Krona zobrazení mikrobiomu v párových vzorcích včel medonosných (A) a roztočů *Varroa destructor* (B) pro jednotlivé taxony identifikované pomocí Ribosomal database project; C - Vennův diagram podobnosti pro párové vzorky z tohoto stanoviště

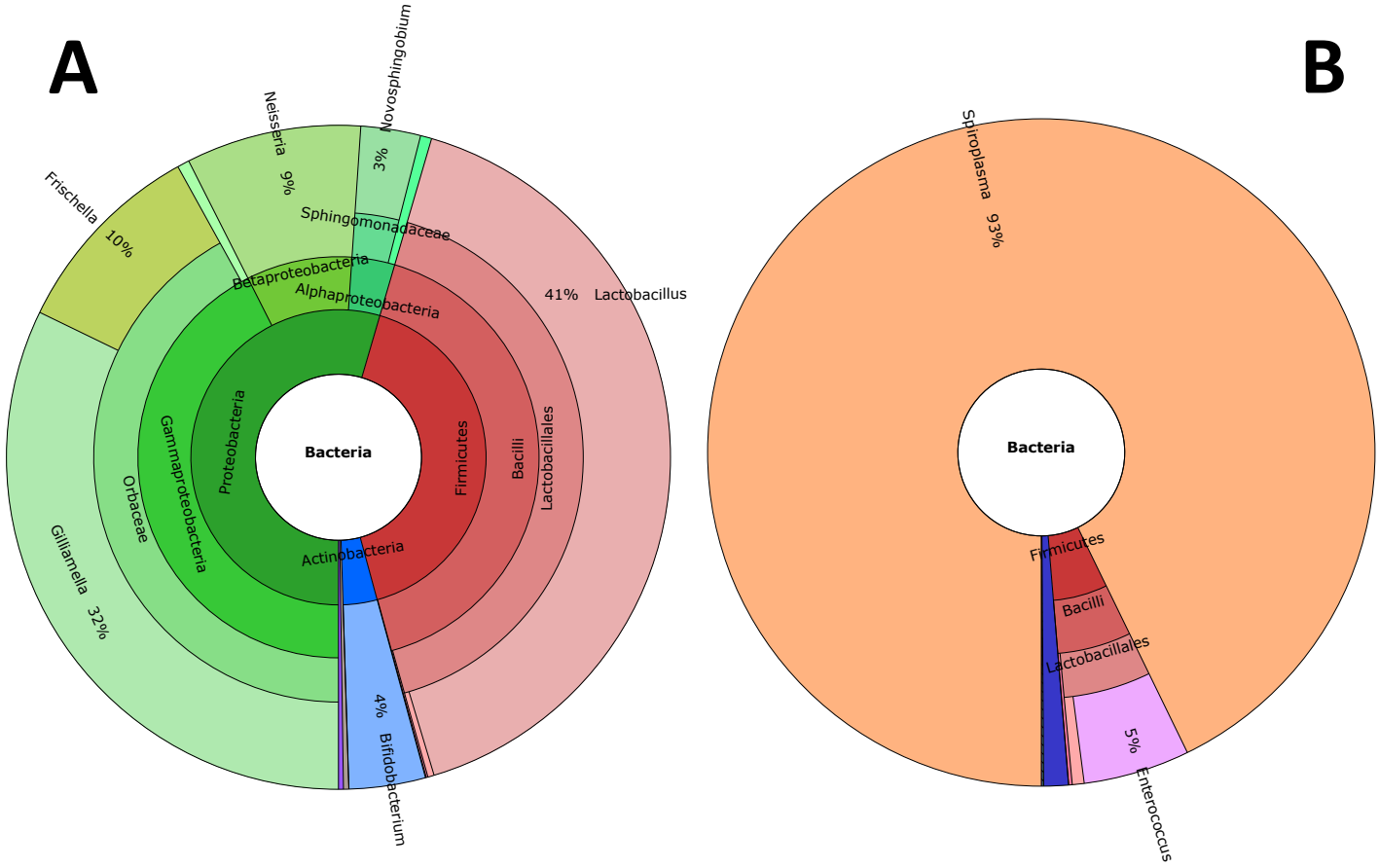


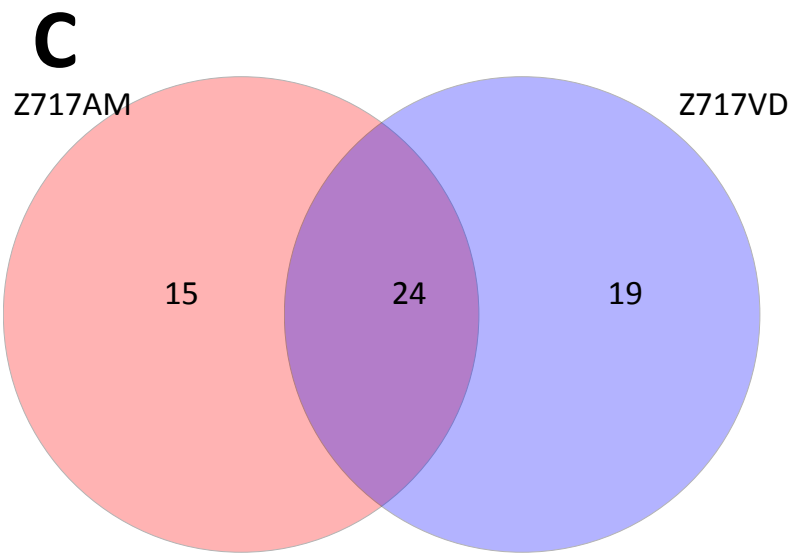


Obr. P25 - Stanoviště Štoky-Skřivánek Z713: AB - Krona zobrazení mikrobiomu v párových vzorcích včel medonosných (A) a roztočů *Varroa destructor* (B) pro jednotlivé taxony identifikované pomocí Ribosomal database project; C - Vennův diagram podobnosti pro párové vzorky z tohoto stanoviště



Obr. P26 - Stanoviště Štoky-Skřivánek Z714: AB - Krona zobrazení mikrobiomu v párových vzorcích včel medonosných (A) a roztočů *Varroa destructor* (B) pro jednotlivé taxony identifikované pomocí Ribosomal database project; C - Vennův diagram podobnosti pro párové vzorky z tohoto stanoviště





Obr. P27 - Stanoviště Štoky-Skřivánek Z717: AB - Krona zobrazení mikrobiomu v párových vzorcích včel medonosných (A) a roztočů *Varroa destructor* (B) pro jednotlivé taxony identifikované pomocí Ribosomal database project; C - Vennův diagram podobnosti pro párové vzorky z tohoto stanoviště

Journal of Applied Microbiology

Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072

ORIGINAL ARTICLE

Bacteria detected in the honeybee parasitic mite *Varroa destructor* collected from beehive winter debris

J. Hubert[1], T. Erban[1], M. Kamler[2], J. Kopecky[1], M. Nesvorna[1], S. Hejdankova[1,3], D. Titera[2], J. Tyl[2] and L. Zurek[4]

1 Crop Research Institute, Prague, Czechia
2 Bee Research Institute at Dol, Libcice nad Vltavou, Czechia
3 Department of Ecology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague,Czechia
4 Department of Diagnostic Medicine and Pathobiology, Kansas State University, Manhattan, KS, USA

Keywords
Apis mellifera, *Arsenophonus*, bacteria feeding, diagnostics, pathogen, pathogen detection, *Spiroplasma*, *Varroa destructor*, winter wax debris.

Correspondence
Jan Hubert, Crop Research Institute, Biologically Active Substances in Crop Protection, Drnovska 507/73, Praha 6-Ruzyne, CZ-16106, Czechia.
E-mail: hubert@vurv.cz

2015/0743: received 17 April 2015, revised 13 June 2015 and accepted 2 July 2015

doi:10.1111/jam.12899

Abstract

Aims: The winter beehive debris containing bodies of honeybee parasitic mite *Varroa destructor* is used for veterinary diagnostics. The *Varroa* sucking honeybee haemolymph serves as a reservoir of pathogens including bacteria. Worker bees can pick up pathogens from the debris during cleaning activities and spread the infection to healthy bees within the colony. The aim of this study was to detect entomopathogenic bacteria in the *Varroa* collected from the winter beehive debris.

Methods and Results: Culture-independent approach was used to analyse the mite-associated bacterial community. Total DNA was extracted from the samples of 10 *Varroa* female individuals sampled from 27 different sites in Czechia. The 16S rRNA gene was amplified using universal bacterial primers, cloned and sequenced, resulting in a set of 596 sequences representing 29 operational taxonomic units (OTU_{97}). To confirm the presence of bacteria in *Varroa*, histological sections of the mites were observed. Undetermined bacteria were observed in the mite gut and fat tissue.

Conclusion: *Morganella* sp. was the most frequently detected taxon, followed by *Enterococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Rahnella* sp., *Erwinia* sp., and *Arsenophonus* sp. The honeybee putative pathogen *Spiroplasma* sp. was detected at one site and *Bartonella*-like bacteria were found at four sites. PCR-based analysis using genus-specific primers enabled detection of the following taxa: *Enterococcus*, *Bartonella*-like bacteria, *Arsenophonus* and *Spiroplasma*.

Significance and Impact of the Study: We found potentially pathogenic (*Spiroplasma*) and parasitic bacteria (*Arsenophonus*) in mites from winter beehive debris. The mites can be reservoirs of the pathogenic bacteria in the apicultures.

Introduction

In temperate regions, honeybee colonies produce either short-lived summer worker bees, which have a lifespan between 15 and 48 days, or long-lived winter worker bees, which emerge in late summer and live up to 8 months (Fluri 1990). The maintenance of honeybee longevity is critical for the survival of the honeybee colony during winter because in the temperate regions, there are major honeybee colony losses during this season (Dainat *et al.* 2012a; van Dooremalen *et al.* 2012; Erban *et al.* 2013).

In beekeeping practice, beehive debris is the most important matrix for surveying beehive health during winter. The bottom-board in apiculture is cleaned after winter acaricide treatment against *Varroa*. Thirty days after cleaning, the beehive debris on the bottom-board is collected. The collected beehive debris is screened for the most

important honeybee pathogens in veterinary laboratories under the conditions of Czechia: The pathogens included American foulbrood (AFB) (*Paenibacillus larvae*), *Nosema* spp. and *Varroa* mites (Ritter 2008; Copley *et al.* 2012; Dietemann *et al.* 2012; Alippi 2014). The beekeepers collect and deliver the beehive debris samples for investigation of the above mentioned pathogens to the accredited veterinary laboratories in Czechia according the Veterinary Law No. 166/1999.

The cosmopolitan parasitic mite *Varroa destructor*, previously classified as *Varroa jacobsoni* (Anderson and Trueman 2000), is one of the major factors responsible for the decline of the Western honeybee, *Apis mellifera* Linnaeus 1758, during winter (Amdam *et al.* 2004; vanEngelsdorp *et al.* 2009; Rosenkranz *et al.* 2010; Dietemann *et al.* 2012). Parasitic mites decrease the fitness, body weight, nutrient content and immunity of honeybees (Glinski and Jarosz 1992; Genersch and Aubert 2010; Dainat *et al.* 2012a,b). *Varro*a reproduces in the capped brood cells and sucks on the haemolymph of larvae, pupae and adult bees (Amdam *et al.* 2004; Rosenkranz *et al.* 2010). The honeybee haemolymph is composed mainly of water, inorganic salts, carbohydrates, proteins, hormones, lipids, free amino acids and macrophage-like cells (haemocytes), and offers *Varroa* a complete food source (Erban *et al.* 2014). The sucked haemolymph is stored in the mite digestive tract, including two pairs of caeca (De Ruijter and Kaas 1983). It has been shown that viruses and bacteria present in the mite digestive tract can be introduced to the honeybee haemolymph during mite feeding (Rosenkranz *et al.* 2010). The *Varroa*-honeybee virus transmission has been documented (Shen *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2007; Gisder *et al.* 2009; Ryabov *et al.* 2014), while the transmission of bacteria is believed to be of minor importance (Rosenkranz *et al.* 2010).

Little is known about the bacterial community of *Varroa*. *Enterobacteriaceae* were found in 50–88% of the mites from the honeybee brood and workers in Poland (Glinski and Jarosz 1990). An unidentified *Rickettsia*-like organism was found in the rectum of *Varroa* using transmission microscopy (Liu and Ritter 1988). The cultured micro-organism from *V. destructor* included *Enterobacter cloacae* and *Staphylococcus albus* (Hrabak 2003). High numbers of actinobacterial genes were found in the total genomic DNA isolated from *Varroa*, while *Enterobacteriace* were not detected (Cornman *et al.* 2010). Glinski and Jarosz (1992) artificially inoculated *Varroa* mites with *Serratia marcescens* and the mites were able to transmit these bacteria into the haemolymph of drones and caused septicaemia. The most significant pathogenic bacteria in apiaries are *P. larvae* causing AFB and *Melissococcus plutonius* causing European foulbrood (EFB) (Genersch 2010). The *Varroa* mites from apiaries with high AFB infections contain the spores of *P. larvae* (De Rycke *et al.* 2002). It has been proposed that mites transmit AFB from the infected to healthy bee colonies; however, Alippi *et al.* (1995) could not demonstrate the infection of the bee colonies with *P. larvae* spores that were introduced on the body surface of *Varroa* mites. These observations open the question if there are entomopathogenic bacteria in *Varroa*.

In this study, we screened *Varroa* in the winter beehive debris for the presence of bacteria with particularly entomopathogen importance. The particular aims of this study were the following: (i) to describe the bacterial community in mites isolated from the winter beehive wax debris by culture-independent method; (ii) to prove the presence of bacteria in *Varroa* tissues by paraffin sectioning, staining and light microscopy; (iii) to collect evidence whether *Varroa* in the winter debris on the bottom-board is a possible source of entomopathogenic bacteria.

Material and methods

Mites in beehive winter wax debris

Samples of the winter hive debris were examined by a flotation technique in the accredited laboratory of the Bee Research Institute at Dol according Ritter (2008). After the examination of the samples, *Varroa* mites were collected in 96% pure ethanol. *Varroa* mites originated from the winter beehive wax debris collected at 27 sites in Czechia in December 2010 and January 2011 (Table 1). Every site represents a population of *Varroa* mites in one apiary.

DNA extraction from *Varroa* samples

Each sample contained 10 adult *Varroa* females. Before DNA extraction, 96% ethanol in each sample was replaced by phosphate buffered saline with the detergent Tween® 20 (PBST) composed of 3·2 mmol l^{-1} Na_2HPO_4, 0·5 mmol l^{-1} KH_2PO_4, 1·3 mmol l^{-1} KCl, 135 mmol l^{-1} NaCl, 0·05% Tween® 20 (cat. No. P9416, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO). Each sample was then washed three times with PBST and homogenized in 500 μl PBST using the Radnoti tissue grinder (cat No. 440613, Monrovia, CA). The total DNA was extracted with the Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions. The extracted DNA was stored in −20°C until further analysis.

Amplification, cloning and sequencing

PCR amplification of 16S rRNA gene fragments was used to characterize the bacterial community (Barbieri *et al.*

Table 1 Sites where the samples of *Varroa destructor* were taken. All samples are from Czechia from the winter 2010–2011

No.	Site	District	County	Coordinates	
1	Trhanov	Domazlice	Plzensky	49°25′7″	12°50′40″
2	Horni Bojanovice	Breclav	Jihomoravsky	48°57′20″	16°47′41″
3	Bulhary	Breclav	Jihomoravsky	48°49′22″	16°43′55″
4	Myslin	Pisek	Jihocesky	49°32′7″	14°1′36″
5	Pribice	Brno—venkov	Jihomoravsky	48°57′33″	16°34′40″
6	Kurdejov	Breclav	Jihomoravsky	48°57′12″	16°46′5″
7	Brod nad Dyji	Breclav	Jihomoravsky	48°52′38″	16°31′38″
8	Moravska Nova Ves	Breclav	Jihomoravsky	48°48′26″	17°0′55″
9	Hlohovec	Breclav	Jihomoravsky	48°46′21″	16°46′16″
10	Kdyně	Domazlice	Plzensky	49°23′35″	13°3′39″
11	Omice	Brno—venkov	Jihomoravsky	49°11′19″	16°27′4″
12	České Velenice	Jindrichuv Hradec	Jihocesky	48°46′47″	14°56′11″
13	Radejov	Hodonin	Jihomoravsky	48°51′56″	17°20′7″
14	Horenice	Nachod	Kralovehradecky	50°22′12″	15°54′48″
15	Klasterec nad Ohri	Chomutov	Ustecky	50°24′5″	13°10′53″
16	Obora	Jicin	Kralovehradecky	50°21′56″	15°30′47″
17	Hermanova Hut	Plzen—sever	Plzensky	49°42′37″	13°4′39″
18	Ujezdec	Jindrichuv Hradec	Jihocesky	49°12′16″	14°47′7″
19	Klenov	Jindrichuv Hradec	Jihocesky	49°11′40″	14°53′22″
20	Lom u Tachova	Tachov	Plzensky	49°49′14″	12°40′41″
21	Kruh	Semily	Liberecky	50°33′51″	15°29′33″
22	Majdalena	Jindrichuv Hradec	Jihocesky	48°57′33″	14°51′19″
23	Pravcice	Kromeriz	Zlinsky	49°19′33″	17°29′34″
24	Zeleznice	Jicin	Kralovehradecky	50°28′43″	15°22′48″
25	Kadan	Chomutov	Ustecky	50°23′9″	13°15′16″
26	Strelec	Jicin	Kralovehradecky	50°28′56″	15°15′37″
27	Kyvalka	Brno—venkov	Jihomoravsky	49°11′24″	16°26′57″

Table 2 The list of primers and reaction conditions used in the study.

Specificity	Target	Name	Primer 5′–3′	Tm (°C)	Lengt (bp)	Author
Bacteria	16S rRNA	UF	AGAGTTTGATYMTGGC	50	1400	Romero *et al.* (2006)
		UR	GYTACCTTGTTACGACTT			
Cardinium	16S rRNA	Card6	CTTAACGCTAGAACTGCGA	52	900	Kopecky *et al.* (2013)
		Card8	TCA AGCTCTACCAACTCC			
Enterococcus faecalis	*dll*	EfeF	TCAAGTACAGTTAGTCTTTATTAG	54	941	Macovei and Zurek (2006)
		EfeR	ACGATTCAAAGCTAACTGAATCAGT			
Wolbachia	16S rRNA	WpF	TTGTAGCCTGCTATGGTATAACT	52	900	O'Neill *et al.* (1992)
		WpR	GAATAGGTATGATTTTCATGT			
Bartonella-like	16S rRNA	Bart 1F	TGTCWCCGAYCCAGCCK	63	920	Kopecky *et al.* (2014)
		Bart 2R	TGT CTC CGA CCC AGC CT			
Arsenophonus	16S rRNA	ArsF	GGGTTGTAAAGTACTTTCAGTCGT	52	804	Wilkes *et al.* (2012)
/Morganella		ArsR2	GTAGCCCTRCTCGTAAGGGCC			
Arsenophonus	16S rRNA	Arsph_1F	TTGGGCCTCACACCTTC	57	1107	This study
		Arsph_1R	AGACTCCAATCCGGACTTC			
	fbaA	fbaAf	GCYGCYAAAGTTCRTTCTCC	52	659	Wilkes *et al.* (2012)
		fbaAr	CCWGAACCDCCRTGGAAAACAAAA			
	yaeT	yaeTf	GCATACGGTTCAGACGGGTTTG	52	473	
		yaeTr	GCCGAAACGCCTTCAGAAAAG			
Spiroplasma	16SRNA	BS1	AAGTCGAACGGGGTGCTT	57	975	Meeus *et al.* (2012)
		BS976	TGCACCACCTGTCTCAATGT			
Paenibacillus larvae	16S rRNA	AFB-F	CTTGTGTTTCTTTCGGGAGACGCCA	55	1106	De Graaf *et al.* (2013)
		AFB-R	TCTTAGAGTGCCCACCTCTGCG			
Melissococcus plutonius	16S rRNA	EFB-F	GAAGAGGAGTTAAAAGGCGC	55	812	Govan *et al.* (1998)
		EFB-R	TTATCTCTAAGGCGTTCAAAGG			

2001). The presence of *Cardinium*, *Wolbachia*, *Spiroplasma*, *Bartonella*-like bacteria, *Arsenophonus*, *Morganella*, *P. larvae*, *M. plutonius* and *Enterococcus faecalis* was tested using taxon-specific primers (Table 2). As a positive control, we used DNA from samples with previous positive identification based on the 16S rRNA gene (Kopecky *et al.* 2013, 2014) and the DNA extracted from *P. larvae* and *M. plutonius* obtained from the Bee Research Institute at Dol. The negative control was the double distilled water used for master mix preparation.

A total volume of 25-μl PCR reaction mixture contained 200 μmol l^{-1} dNTPs, 3 mmol l^{-1} $MgCl_2$; forward and reverse primers (100 nmol l^{-1} each), 0·5 unit *Taq* polymerase (all Promega) and 50–300 ng of the template DNA. The primers, annealing temperature and reference to amplification conditions are shown in Table 2. Amplifications were performed using the C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA). The selected amplicons were purified with the Wizard® SV Gel and PCR product clean-up system kit (Promega). The PCR products from universal bacterial primers were cloned using pGEM®-T Easy Vector (Promega). Selected clones, roughly 28 per sample, were sequenced by Macrogen (Seoul, Korea). In addition, the products of taxon-specific primers were sequenced for validation. The obtained forward and reverse sequences were assembled with the CODONCODE ALIGNER, ver. 1.5.2 (CodonCode Corporation, Dedham, MA). The sequences were checked for chimaeras using MALLARD 1.02 (Ashelford *et al.* 2006) and PINTAIL 1.1 (Ashelford *et al.* 2005) prior to 16S rDNA library construction.

16S rRNA library

The library was formed from 596 partial 16S rRNA gene sequences (Table 3). The sequences were analysed and assigned the operational taxonomic units (OTU) defined at distance level 0·03 in MOTHUR v1.32.0 software (Schloss *et al.* 2009). The sequences were assigned to the bacterial taxa using the Ribosomal database project (RDP) naive Bayesian rRNA classifier (Wang *et al.* 2007). The consensus sequences of individual $OTUs_{97}$ were compared to the sequences in the GenBank using BLAST.

Phylogenetic analysis

The phylogenetic analysis was applied to *Bartonella*-like, *Spiroplasma* and *Arsenophonus* 16S rRNA sequences. Alignments of partial 16S rRNA gene sequences were performed using SILVA INCREMENTAL ALIGNER v.1.2.11 (Pruesse *et al.* 2012). For analysis of phylogenetic relationships, the best-fit model of nucleotide substitution was selected using JMODELTEST v.2.1.7 (Guindon and Gascuel 2003; Darriba *et al.* 2012). Based on the selection, model GTR with a proportion of invariable sites (+I), and gamma distribution with four rate categories (+G), was employed to infer phylogeny by Bayesian analysis using PHYLOBAYES-MPI, v.1.4e (Lartillot *et al.* 2009) and maximum-likelihood analysis in PHYML v.3.0 (Guindon *et al.* 2010). The resulting phylograms were finalized using MEGA 6 (Tamura *et al.* 2007).

Microanatomical sections of Varroa

For the histological study, *Varroa* mites were collected from the infested honeybee colony at the Bee Research Institute at Dol (50°12′13″N, 14°22′1″E) in the municipality of Maslovice. Mites were transferred from the honeybee pupae by a brush into Eppendorf tubes and fixed in the modified Bouin-Dubosque-Brazil fixation for 72 h (Smrz 1989). Mites were then transferred to paraffin and sectioned in 4–6 μm sections (Hubert *et al.* 1999). Sections were stained by (i) Masson's stain with periodic acid and Schiff agent (PAS) and (ii) Mann-Dominici staining. The histological sections were observed under a compound microscope Axioskop using AXIOVISON software (Carl Zeiss, Jena, Germany) and a Powershot A620 digital camera (Canon, Tokyo, Japan).

Results

Microbial community in *Varroa* from winter beehive wax debris

The 16S rDNA library contained 596 sequences (GenBank Acession Numbers KT029152–KT029747) that represented 29 OTU_{97}. The number of individual OTU_{97} ranged from 1 to 7 indicating low bacterial richness (Table 3). The sequences represented Actinobacteria: *Bifidobacterium;* Bacteroidetes: *Pedobacter*; Alphaproteobacteria: *Bartonella*-like bacteria; Firmicutes: *Enterococcus*; Gammaproteo-bacteria: *Morganella*, *Enhydrobacter*, *Pseudomonas*, *Arsenophonus* and *Erwinia*; Molicutes: *Spiroplasma*. OTU_{97} classified as *Morganella* were the most abundantly followed by *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Erwinia* and *Arsenophonus*. *Arsenophonus* was detected at the Strelec site only (Table 3). A potential honeybee pathogen *Spiroplasma* was detected solely at the Kadan site.

PCR with the specific primers confirmed the presence of *Spiroplasma* in one sample with a 99% similarity to *Spiroplasma apis* (NR121708). Similarly, the cloned *Spiroplasma* 16S rDNA fragment showed a high similarity (99%) to *S. apis*. It also confirmed the phylogenetic analysis of the sequences obtained in RDP (Fig. 1).

Table 3 The identified bacterial taxa in the *Varroa destructor* females from the winter wax debris collected at 27 different sites in Czechia. The sequences were identified using the Ribosomal database project (RDP) naïve Bayesian rRNA classifier (Wang *et al.* 2007). The contingency for operational taxonomic units $(OTUs)_{97}$ were Blasted in GenBank and the matches are presented

RDP-identification				GenBank-match						
Taxon			id %	Matched sequences	Acces. No.	id%	OTU_{97}	N	1	2
Actino-bacteria	Bifidobacteriales	*Bifidobacterium*	100	*Bifidobacterium indicum*	CP006018.1	99	12	7		
	Actinomycetales	*Microbacterium*	100	*Microbacterium oxydans*	KF150504.1	99	22	1		
Alphaproteo-bacteria	Rhizobiales	*Bartonella*	43–67	*Bartonella*-like	HM108389.1	99	9	15		
		Methylobacterium	100	*Methylobacterium adhaesivum*	AB698723.1	99	27	1		
	Sphingomonadales	*Sphingomonas*	100	*Sphingomonas faeni*	KC987002.1	99	20	1		
Bacilli	Lactobacillales	*Enterococcus*	100	*Enterococcus faecalis*	FJ378665.1	99	2	100		
		Lactobacillus	92–93	*Lactobacillus* sp.	HM046580.1	95	18	2		
	Bacillales	*Staphylococcus*	100	*Staphylococcus nepalensis*	JQ970476.1	99	29	1		
Betaproteo-bacteria	Burkholderiales	*Burkholderia*	100	*Burkholderia cepacia*	AB695353.1	99	24	1		
		Janthinobacterium	100	*Janthinobacterium lividum*	EU275366.1	99	19	2		
		Massilia	100	*Massilia* sp.	FM955855.1	99	17	2		
		Undibacterium	100	*Undibacterium oligocarboniphilum*	NR 117348.1	99	26	1		
Gammaproteo-bacteria	Oceanospirillales	*Carnimonas*	100	*Carnimonas nigrificans*	NR_029342.1	98	14	4		
	Pasteurellales	*Haemophilus*	100	*Haemophilus parainfluenzae*	FQ312002.1	99	25	1		
	Xanthomonadales	*Luteibacter*	100	*Luteibacter* sp.	FR714940.1	99	11	6		
	Enterobacteriales	*Morganella*	100	*Morganella* sp.	HM133591.1	99	1	264	21*	21*
		Pantoea	100	*Pantoea agglomerans*	EU047555.1	99	15	4		
		Enhydrobacter	100	*Moraxella osloensis*	NR 104936.1	99	9	19		
		Pseudomonas	100	*Pseudomonas* sp1.	AY131218.1	99	3	60		
				Pseudomonas syringae	AB001449.1	99	8	17		
				Pseudomonas lutea	NR_029103.1	99	4	4		
				Pseudomonas sp.2	AF098465.1	95	21	1		
				Pseudomonas aeruginosa	AP014622.1	99	23	1		
		Psychrobacter	100	*Psychrobacter* sp.	JX310264.1	99	28	1		
	Enterobacteriales	*Arsenophonus*	100	*Arsenophonus nasoniae*	FN545282.1	100	6	21		
		Erwinia	90–100	*Erwinia billingiae*	NR_102820.1	100	5	24		
		Serratia	69–95	*Rahnella* sp.	GU299866.1	100	4	25		
Mollicutes	Entomoplasmatales	*Spiroplasma*	100	*Spiroplasma apis*	NR_121708.1	99	10	6		
Sphingo-bacteria	Sphingobacteriales	*Pedobacter*	100	*Pedobacter cryoconitis*	NR_025534.1	99	13	4		
Total number								596	21	21

Ide, identity %.

*Indicates the confirmation of the bacterial taxa by specific primers. Detailed description of sample sites in Table 1.

Bartonella-like bacteria were confirmed at the Hlohovec and Klenov sites but not in Ujezd site. In addition, *Bartonella*-like amplicons were obtained at the Zeleznice and Kyvalka sites (Table 3). *Bartonella*-like bacteria clustered to those previously reported from honeybees (Fig. 2).

The *Arsenophonus*-specific primers ArsF and ArsR2 (Table 2) were not specific for *Arsenophonus*, and the 16S rDNA sequences were highly similar (99%) to *Morganella* sp. (KF754866), with the exception of the Strelec site, where the sequences related to *Arsenophonus nasoniae* were

Sampled site																										
3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27		
															4	3										
																								1		
						1*							1		1	13*					*			*		
													1													
																		1								
											23*	20*	18	22	16					1						
																2										
																					1					
													1													
																					2					
																		1			1					
						1																				
																								4		
													1													
																			6							
22*	20*	18*	14	20*	28*	22*	27*	20*	26*	5									*	*			*		*	
														2					2							
																								19		
										1						7	3	2	5	15	15	11		1		
																		17								
																		2	2							
																		1								
																	1									
													1													
																							21			
										7							4		11						2	
										5							16		1	2	1					
																						6				
																		1			3					
22	20	18	14	20	28	24	27	20	26	18	23	20	22	24	21	25	24	25	27	18	23	17	21	27		

detected. To confirm the presence of *Arsenophonus,* the new primer set (*Arsph* 1F and *Arsph* 1R), for identification based on 16S rDNA, was designed (Table 2) and tested altogether with the primers for amplification of genes coding for outer membrane protein (*yaeT*) and fructose-bisphosphate aldolase class II (*fbaA*) (Wilkes *et al.* 2012). At the Strelec site, the *Arsph* 1F and *Arsph* 1R primers amplified the fragment of 16S rDNA of 1107 bp with a high similarity (99%) to *A. nasoniae* (NR042811) as confirmed by the phylogenetic analysis (Fig. 3). The products of the correct size, *yaeT* 473 bp and *fbaA* 659 bp were obtained, and the sequencing confirmed their high similarity (99%) to

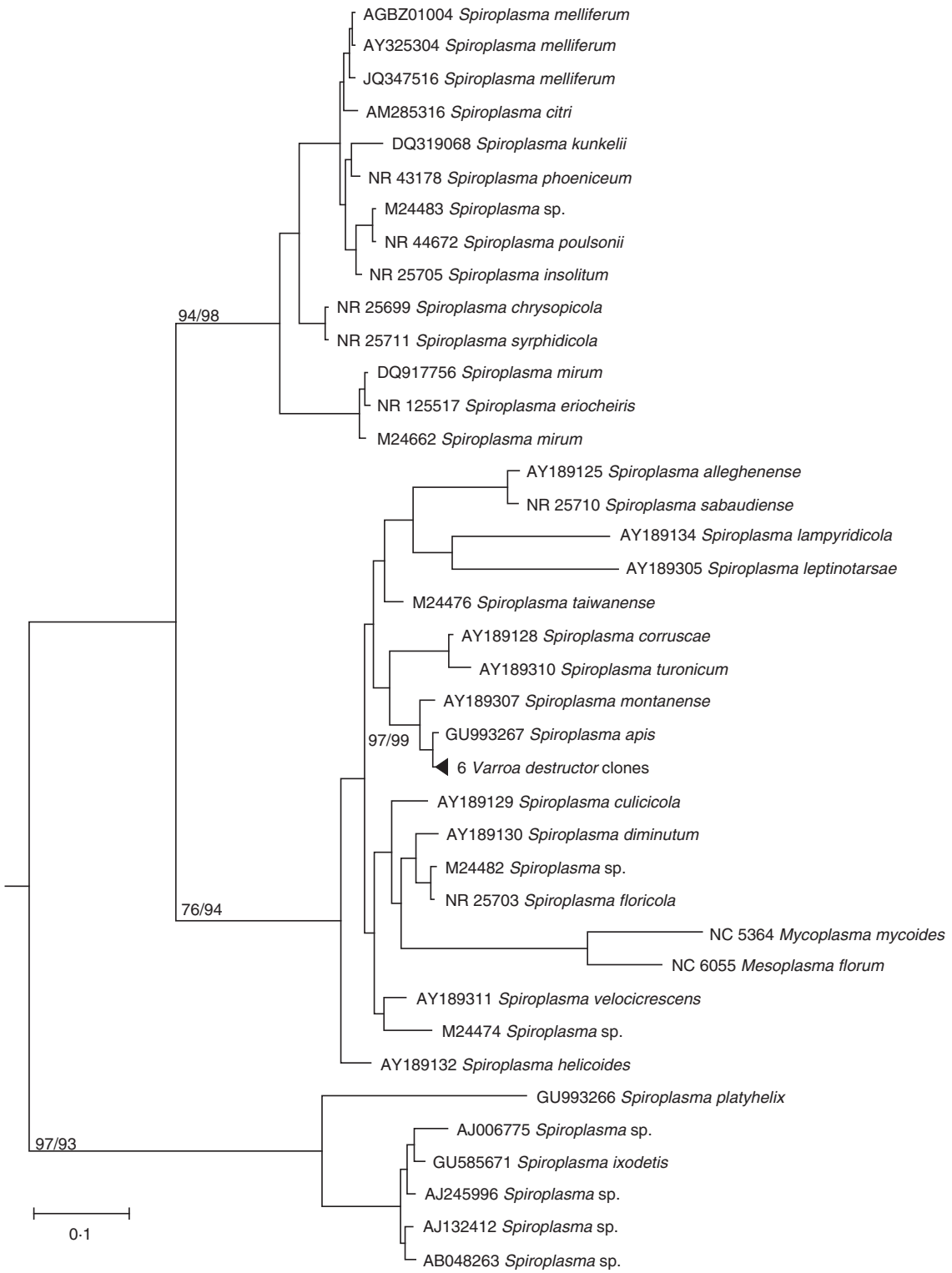


Figure 1 Phylogenetic analysis of nearly full-length 16S rRNA clones of Spiroplasma from *Varroa destructor* females collected from the winter beehive wax debris with the reference sequences available in databases. Phylogeny was inferred by Bayesian analysis. Branch lengths correspond to mean posterior estimates of evolutionary distances (scale bar, 0·1). Branch labels at selected branches indicate the Bayesian posterior probability and supporting bootstrap values from maximum-likelihood and neighbour-joining analyses. The phylograms were outgrouped using the Anaeroplasma varium 16S rRNA gene sequence NR_044663.

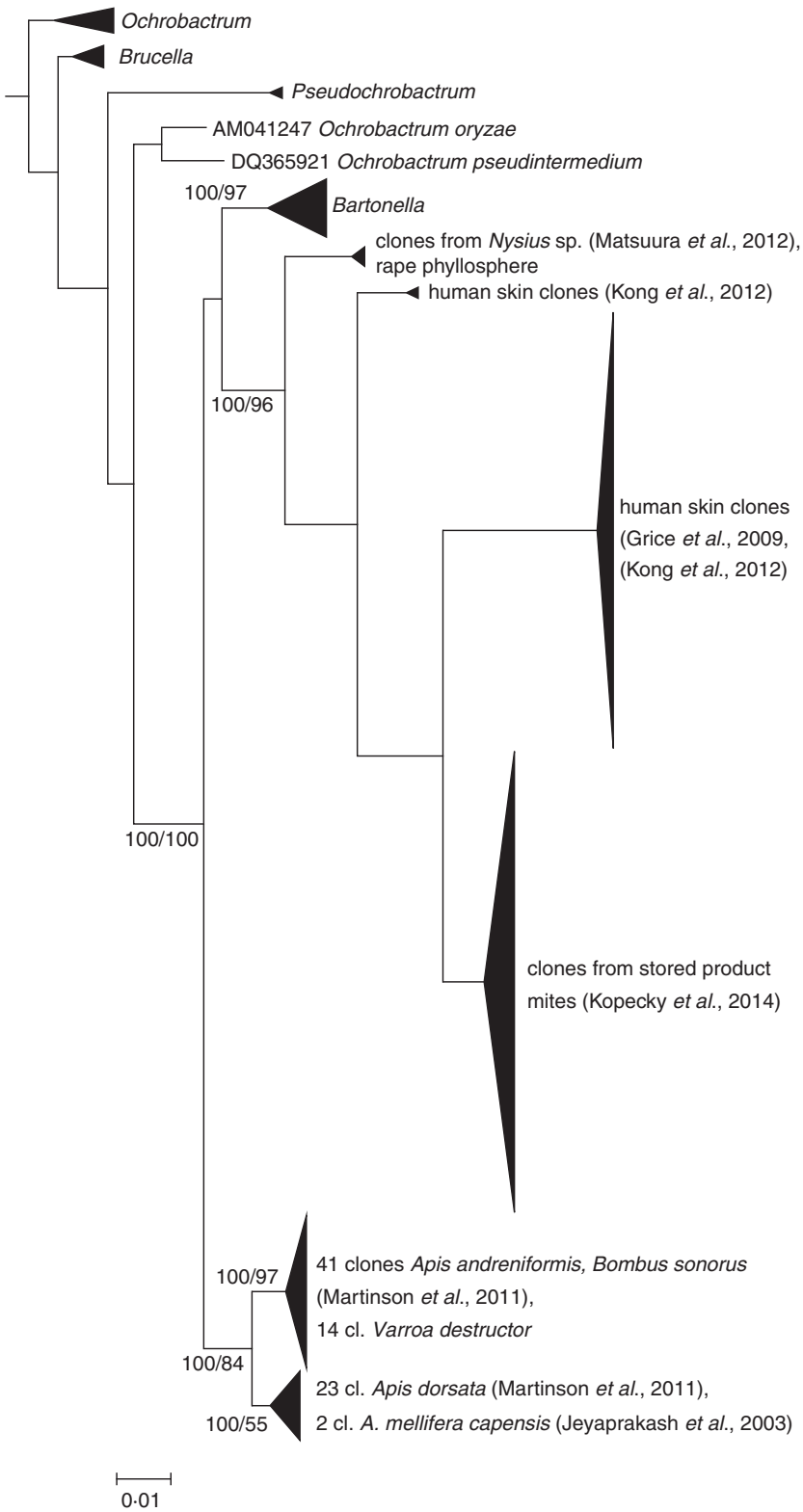


Figure 2 Phylogenetic analysis of nearly full-length 16S rRNA clones described as Bartonella-like sequences from *Varroa destructor* females from the winter wax debris with the reference sequences available in databases. Phylogeny was inferred by Bayesian analysis. Branch lengths correspond to mean posterior estimates of evolutionary distances (scale bar, 0·1). Branch labels at selected branches indicate the Bayesian posterior probability and supporting bootstrap values from maximum-likelihood and neighbour-joining analyses. The phylograms were outgrouped using the *Escherichia coli* sequence U00096.

A. nasoniae FN545250 and FN542641 respectively. *Arsenophonus* was not detected on other localities by either set of specific primers (*Arsph, yaeT, fbaA*).

The presence of *Enterococcus* was confirmed by specific primers for the amplification of the fragment of D-alanine ligase-related protein (*ddl*) (Macovei and Zurek 2006),

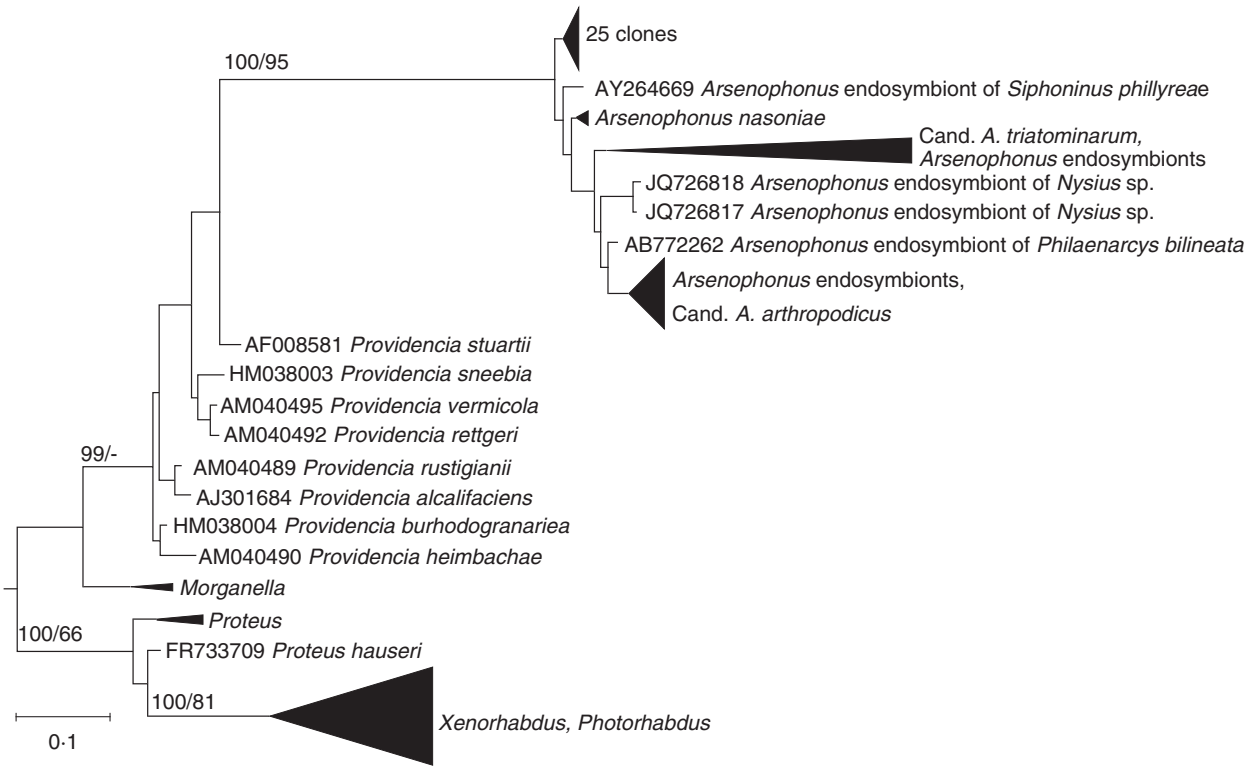


Figure 3 Phylogenetic analysis of nearly full-length 16S rRNA clones of Arsenophonus from *Varroa destructor* females from the winter beehive wax debris with the reference sequences available in databases. The phylogeny was inferred by Bayesian analysis of 16S rRNA gene sequence alignment. Branch lengths correspond to mean posterior estimates of evolutionary distances (scale bar, 0·1). Branch labels indicate the Bayesian posterior probability and supporting bootstrap values from maximum-likelihood analysis. The phylogram was outgrouped using the type strains of the remaining Enterobacteriaceae genera.

the obtained product had high similarity (99%) to *Enterococcus faecalis* (AB186032). Using the universal set or specific primers, *P. larvae*, *M. plutonius*, *Cardinium* spp. and *Wolbachia* spp. were not detected in the examined *Varroa* samples.

Histological observation of *Varroa* females

The gut of *Varroa* contained the ingested haemolymph of honeybees that formed a dark substance in the mesodeum, including caeca (Fig. 4a–c). The substances formed a compact mass which were utilized in the gut (Fig. 4b). Some particles in the gut carried coccoid bacteria, either as single cells or in small clusters (Fig. 4d). Some bacteria were also localized in the fat tissue (Fig. 5a) where they formed groups of 10–50 bacterial cells (Fig. 5b,c).

Discussion

In this study, we described the bacteria associated with *V. destructor* collected from winter beehive wax debris by the culture-independent approach. We confirmed the presence of bacteria in the gut and fat tissue. The origin of bacteria in *Varroa* can be (i) autochthonous symbiotic/parasitic bacteria in the fat body; (ii) autochthonous gut bacteria; (iii) allochtonous bacteria either from honeybee haemolymph or bee surface; (iv) contamination from the debris and/or bottom-boards. We compared the 16S rDNA sequences obtained from *Varroa* in this study to that of near full-length 16S rDNA sequences of bacteria from *A. mellifera* available in the GenBank (2584 sequences) at 97% identity level. We obtained 86 bacterial OTUs unique for *A. mellifera*, 16 OTUs shared between the two species and 6 OTUs specific for *Varroa* (Fig. 6). The rest of the OTUs were formed by single sequences, i.e. 7 for *Varroa* and 97 for *A. mellifera*. This again indicated that the bacteria in *Varroa* likely originated from *A. mellifera*. However, the used approach with 22 clones per sample cannot cover all the bacteria from the mite sample. To distinguish which bacterial taxa are allochthonous or autochthonous, a further study is necessary. The assay used here is based on the surface sterilization and cleaning of mites. We consider the sur-

face sterilization as efficiently removing the surface contamination as previously validated for stored product mites (Kopecky *et al.* 2014). The contamination of PCR should be minimized due to the presence of negative PCR control (Fenollar and Raoult 2004).

In this study, we found that *Varroa* mites were a possible reservoir of *Spiroplasma* and *Bartonella*-like bacteria. *Spiroplasma melliferum* and *S. apis* have been considered as the causative agents of neurological diseases of honeybees but also as facultative (secondary) symbionts with 33 and 54% prevalence in colonies in the USA and Brazil respectively (Schwarz *et al.* 2014). Ravoet *et al.* (2013) did not observe a correlation between the *S. melliferum* and *S. apis* and winter losses of honeybees. Flowers were suggested as the main reservoir of *Spiroplasma* and honeybees get infected in the spring and summer season (Clark 1978; Davis 1978; Mouches *et al.* 1984). It has been reported that the prevalence of *S. melliferum* in the samples from honeybee colony increased from 5% in February to 68% in May and then decreased to 25% in June and 22% in July (Zheng and Chen 2014). The sequences obtained here were highly similar to *S. apis*, but not *S. melliferum*. A possible participation of mites in spreading *Spiroplasma* to honeybees in the spring remains to be investigated.

Bartonella-like bacteria were detected in honeybees previously (Jeyaprakash *et al.* 2003; Ahn *et al.* 2012; Martinson *et al.* 2012). The related sequences were recently found in the fall and spring bees and the environment was suggested as the main source of these bacteria (Corby-Harris *et al.* 2014). In our study, the sequences of *Bartonella*-like bacteria from *Varroa* clearly clustered with those from honeybees (Fig. 4) and these bacteria likely originated from honeybees. The significance of *Bartonella*-like bacteria in *Varroa* physiology and health

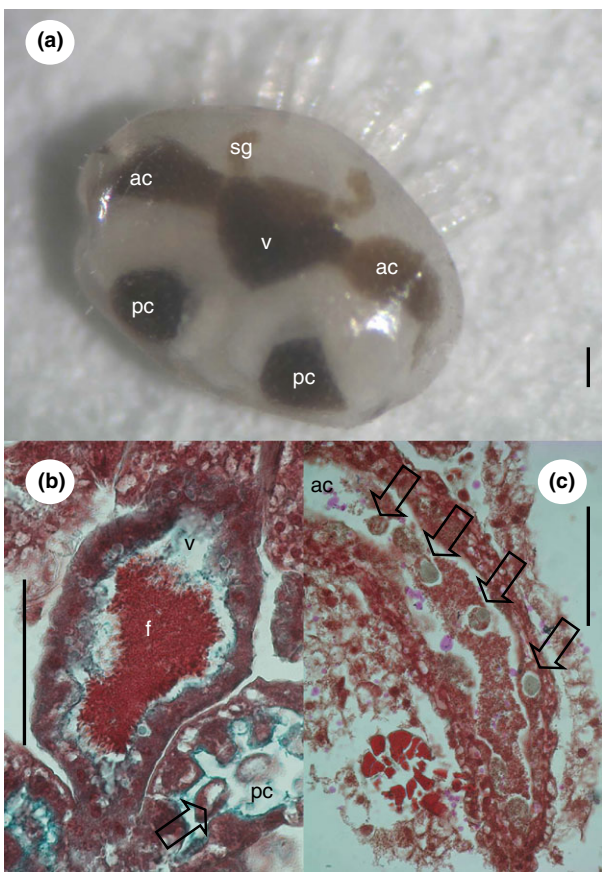


Figure 4 Digestive tract of female *Varroa destructor*; (a) overall view of the young female; (b) horizontal section of the female; arrow points to apocrine secretion in the posterior gastric caecum; (c) saggital section of the female, arrows point to secretion of the digestive enzymes in the anterior gastric caecum; Scale (a–c) 100 μm; Staining: (b, c) Masson triple stain and Periodic acid–Schiff (PAS); ac, anterior caecum; f, ingested food; v, ventriculus; pc, posterior caecum; sg, salivary gland; r, rectum.

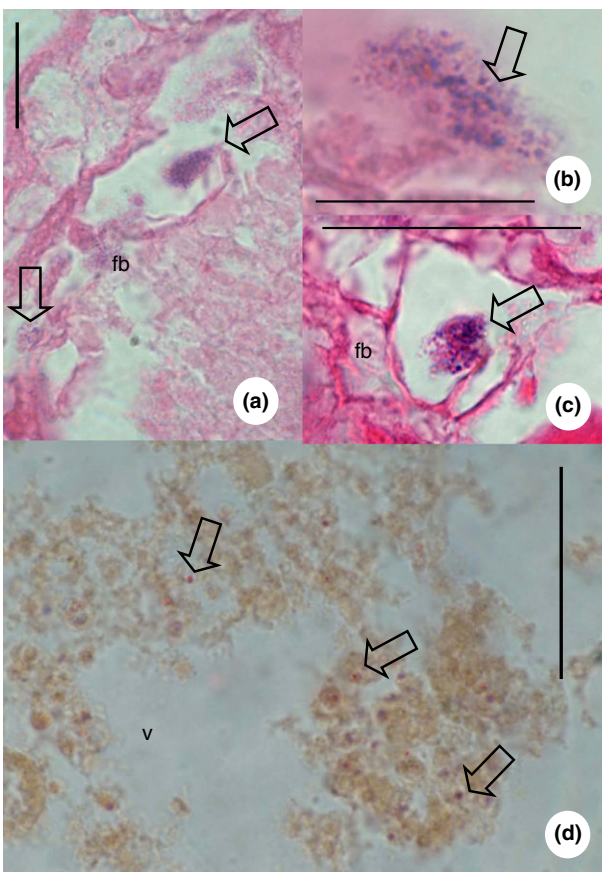


Figure 5 Identification of bacteria in the fat tissue and the digestive tract of female *Varroa destructor*; (a) overall view of the fat body with the groups of bacteria pointed by arrows; (b, c) detail of previous bacterial groups pointed by arrows; (d) bacteria (arrows) in the ingested food in the ventriculus; Scale: (a, c, d) 25 μm; (b) 10 μm; Staining: Mann-Dominici

(Kopecky *et al.* 2014) as well as the role of these mites in transmission of bacteria to bees is unknown.

In our study, we also found a high prevalence of *Ent. faecalis* in the *Varroa* gut. Enterococci are an important reservoir of antibiotic resistance traits and frequently acquire antibiotic resistance genes by horizontal gene transfer (Arias and Murray 2008). The high prevalence of *E. faecalis* in *Varroa* may have important health implications for honeybees and people. We also detected enteric bacteria *Erwinia* and *Serratia,* and these were also reported from honeybees (Babendreier *et al.* 2007; Disayathanoowat *et al.* 2012; Aizenberg-Gershtein *et al.* 2013). *Enterobacteriaceae* were commonly (up to 88%) detected in *V. destructor* (Glinski and Jarosz 1990) as well as in the digestive tract of honeybees (Anderson *et al.* 2013).

Another interesting finding in our study was the presence of *Arsenophonus* in mites from one site. *Arsenophonus* is an endosymbiont of insects (Novakova *et al.* 2009; Wilkes *et al.* 2012), but it was detected also on the body surface and in the digestive tract of honeybees (Babendreier *et al.* 2007; Aizenberg-Gershtein *et al.* 2013). In a recent study (Aizenberg-Gershtein *et al.* 2013), *Arsenophonus* sequences represented 43 and 88% of the total bacterial community in the bees captured on almond (*Amygdalus communis*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) flowers respectively. *Arsenophonus* was also found in the crop and corbicular pollen in a honeybee colony Corby-Harris *et al.* (2014). Analyses of the microbial community of bees with the colony collapse disorder demonstrated increased numbers of bacteria related to *Arsenophonus* (Cornman *et al.* 2012) but the significance of this finding is not clear.

The most frequent sequences obtained from *Varroa* were related to *Morganella morganii*. *Morganella* was reported as most abundant in the hibernating bees (Lyapunov *et al.* 2008) but also from the spring and summer bees (Aizenberg-Gershtein *et al.* 2013). The mites likely obtained *M. morganii* during feeding on bees, especially during fall and winter.

Some bacteria are known to have a negative effect on *Varroa*. For example, *Bacillus* spp. and members of *Miccrococaceae* caused up to 54% mite mortality (Tsagou

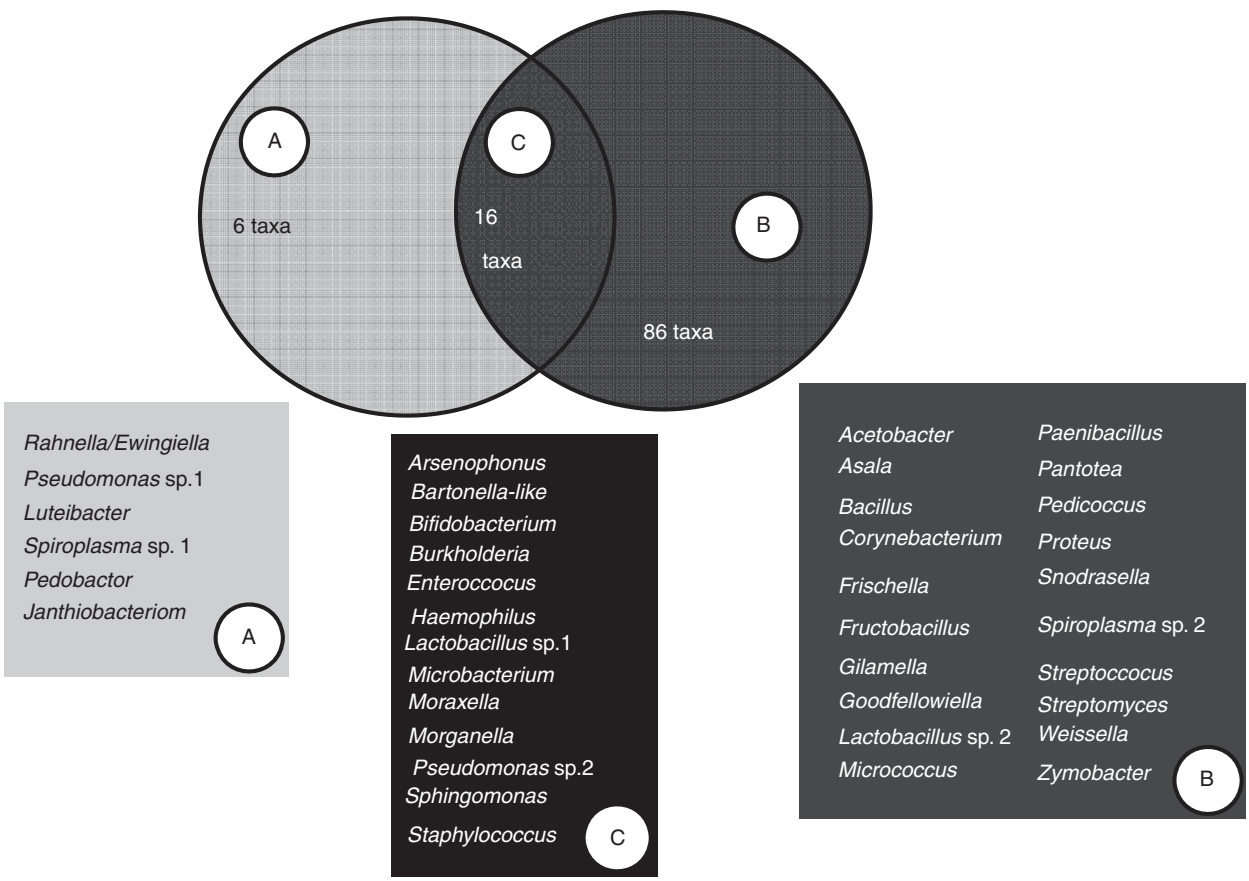


Figure 6 Venn diagram showing bacterial 16S rDNA sequences cloned from *Varroa destructor* females from the beehive winter wax debris (596 sequences) and sequences from *Apis mellifera* obtained from GenBank (2584). The operational taxonomic units (OTUs) were defined at 97% identity level. The OTUs with single sequences, 8 from *V. destructor* and 97 from *A. mellifera*, were not included in the diagram.

et al. 2004). These two groups of acaropathogenic bacteria were not detected in *Varroa* from winter beehive wax debris in our study; however, we found *Pseudomonas* as another putative acaropathogenic bacterium. *Pseudomonas putida* was used in the laboratory experiments to control the spider mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). Spraying with bacteria resulted in increased egg mortality and reduction in egg hatching (Aksoy *et al.* 2008). *Pseudomonas* bacteria were also found in the gut of fall and spring honeybees (Corby-Harris *et al.* 2014). Ahn *et al.* (2012) detected *Pseudomonas* in adults but not in the larvae of honeybees.

Our study indicated the presence of entomopathogenic bacteria in *Varroa*. Although we did not prove the transmission of bacteria due to the experimental design, the results indicated that *Varroa* mites are likely reservoirs of bacteria such as *Spiroplasma*, *Arsenophonus* and *Bartonella*-like. The demonstrated detection of entomopathogenic bacteria in the mites collected from beehive winter debris is useful to identify the entomopathogens in honeybees in future. The results are relevant to honeybee health, because wintering honeybees can pick up pathogens from the beehive debris during cleaning activities, and spread the infection to healthy bees within the colony.

Acknowledgement

TE, MK, JT, JH and DT were supported by the project QJ1310085 and JK, TE, JH and MN by RO0415 of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic. JH, MN, TE, SH and LZ by the bilateral project LH14060 KONTAKT of Czechia and the USA funded by the Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interests.

References

Ahn, J.-H., Hong, I.-P., Bok, J.-I., Kim, B.-Y., Song, J. and Weon, H.-Y. (2012) Pyrosequencing analysis of the bacterial communities in the guts of honey bees *Apis cerana* and *Apis mellifera* in Korea. *J Microbiol* **50**, 735–745.

Aizenberg-Gershtein, Y., Izhaki, I. and Halpern, M. (2013) Do honeybees shape the bacterial community composition in floral nectar? *PLoS One* **8**, e67556.

Aksoy, H.M., Ozman-Sullivan, S.K., Ocal, H., Celik, N. and Sullivan, G.T. (2008) The effects of *Pseudomonas putida* biotype B on *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Exp Appl Acarol* **46**, 223–230.

Alippi, A. (2014) American foulbrood of honey bees (Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2014). In Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2014. Organisation for Animal Health (OIE). 1–15 p. Available at: http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/ (accessed 21 May 2015).

Alippi, A.M., Albo, G.N., Marcangeli, J., Leniz, D. and Noriega, A. (1995) The mite *Varroa jacobsoni* does not transmit American foulbrood from infected to healthy colonies. *Exp Appl Acarol* **19**, 607–613.

Amdam, G.V., Hartfelder, K., Norberg, K., Hagen, A. and Omholt, S.W. (2004) Altered physiology in worker honey bees (Hymenoptera: Apidae) infested with the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae): a factor in colony loss during overwintering? *J Econ Entomol* **97**, 741–747.

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

Anderson, K.E., Sheehan, T.H., Mott, B.M., Maes, P., Snyder, L., Schwan, M.R., Walton, A., Jones, B.M. *et al.* (2013) Microbial ecology of the hive and pollination landscape: bacterial associates from floral nectar, the alimentary tract and stored food of honey bees (*Apis mellifera*). *PLoS One* **8**, e83125.

Arias, C.A. and Murray, B.E. (2008) Emergence and management of drug-resistant enterococcal infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* **6**, 637–655.

Ashelford, K.E., Chuzhanova, N.A., Fry, J.C., Jones, A.J. and Weightman, A.J. (2005) At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. *Appl Environ Microbiol* **71**, 7724–7736.

Ashelford, K.E., Chuzhanova, N.A., Fry, J.C., Jones, A.J. and Weightman, A.J. (2006) New screening software shows that most recent large 16S rRNA gene clone libraries contain chimeras. *Appl Environ Microbiol* **72**, 5734–5741.

Babendreier, D., Joller, D., Romeis, J., Bigler, F. and Widmer, F. (2007) Bacterial community structures in honeybee intestines and their response to two insecticidal proteins. *FEMS Microbiol Ecol* **59**, 600–610.

Barbieri, E., Paster, B.J., Hughes, D., Zurek, L., Moser, D.P., Teske, A. and Sogin, M.L. (2001) Phylogenetic characterization of epibiotic bacteria in the accessory nidamental gland and egg capsules of the squid *Loligo pealei* (Cephalopoda: Loliginidae). *Environ Microbiol* **3**, 151–167.

Clark, T.B. (1978) Honey bee spiroplasmosis, a new problem for beekeepers. *Am Bee J* **118**, 18–19.

Copley, T.R., Giovenazzo, P. and Jabaji, S.H. (2012) Detection of *Nosema apis* and *N. ceranae* in honeybee bottom scraps and frass in naturally infected hives. *Apidologie* **43**, 753–760.

Corby-Harris, V., Maes, P. and Anderson, K.E. (2014) The bacterial communities associated with honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *PLoS One* **9**, e95056.

Cornman, R.S., Schatz, M.C., Johnston, S.J., Chen, Y.P., Pettis, J., Hunt, G., Bourgeois, L., Elsik, C. *et al.* (2010) Genomic survey of the ectoparasitic mite *Varroa destructor*, a major pest of the honey bee *Apis mellifera*. *BMC Genom* **11**, 602.

Cornman, R.S., Tarpy, D.R., Chen, Y., Jeffreys, L., Lopez, D., Pettis, J.S., vanEngelsdorp, D. and Evans, J.D. (2012) Pathogen webs in collapsing honey bee colonies. *PLoS One* **7**, e43562.

Dainat, B., Evans, J.D., Chen, Y.P., Gauthier, L. and Neumann, P. (2012a) Dead or alive: deformed wing virus and *Varroa destructor* reduce the life span of winter honeybees. *Appl Environ Microbiol* **78**, 981–987.

Dainat, B., Evans, J.D., Chen, Y.P., Gauthier, L. and Neumann, P. (2012b) Predictive markers of honey bee colony collapse. *PLoS One* **7**, e32151.

Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R. and Posada, D. (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* **9**, 772.

Davis, R.E. (1978) *Spiroplasma* associated with flowers of the tulip tree (*Liriodendron tulipifera* L.). *Can J Microbiol* **24**, 954–959.

De Graaf, D.C., Alippi, A.M., Antunez, K., Aronstein, K.A., Budge, G., Dekoker, D., De Smet, L., Dingman, D.W. *et al.* (2013) Standard methods for American foulbrood research. *J Apic Res* **52**, 1–28.

De Ruijter, A. and Kaas, J.P. (1983) The anatomy of the *Varroa*-mite. In *Varroa jacobsoni Oud. Affecting Honey Bees: Present Status and Needs*. Proceedings of a Meeting of the EC Experts' Group/Wageningen, 7–9 February 1983 ed. Cavalloro, R. pp. 45–47. Rotterdam: A.A.Balkema.

De Rycke, P.H., Joubert, J.J., Hosseinian, S.H. and Jacobs, F.J. (2002) The possible role of *Varroa destructor* in the spreading of American foulbrood among apiaries. *Exp Appl Acarol* **27**, 313–318.

Dietemann, V., Pflugfelder, J., Anderson, D., Charriere, J.-D., Chejanovsky, N., Dainat, B., de Miranda, J., Delaplane, K. *et al.* (2012) *Varroa destructor*: research avenues towards sustainable control. *J Apic Res* **51**, 125–132.

Disayathanoowat, T., Young, J.P.W., Helgason, T. and Chantawannakul, P. (2012) T-RFLP analysis of bacterial communities in the midguts of *Apis mellifera* and *Apis cerana* honey bees in Thailand. *FEMS Microbiol Ecol* **79**, 273–281.

van Dooremalen, C., Gerritsen, L., Cornelissen, B., van der Steen, J.J., van Langevelde, F. and Blacquiere, T. (2012) Winter survival of individual honey bees and honey bee colonies depends on level of *Varroa destructor* infestation. *PLoS One* **7**, e36285.

vanEngelsdorp, D., Evans, J.D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B.K., Frazier, M., Frazier, J. *et al.* (2009) Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS One* **4**, e6481.

Erban, T., Jedelsky, P.L. and Titera, D. (2013) Two-dimensional proteomic analysis of honeybee, *Apis mellifera*, winter worker hemolymph. *Apidologie* **44**, 404–418.

Erban, T., Petrova, D., Harant, K., Jedelsky, P.L. and Titera, D. (2014) Two-dimensional gel proteome analysis of honeybee, *Apis mellifera*, worker red-eye pupa hemolymph. *Apidologie* **45**, 53–72.

Fenollar, F. and Raoult, D. (2004) Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms. *APMIS* **112**, 785–807.

Fluri, P. (1990) How long do worker honeybees live? *Schweiz Bienen-Ztg* **113**, 620–625 [in German].

Genersch, E. (2010) Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**, 87–97.

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

Gisder, S., Aumeier, P. and Genersch, E. (2009) Deformed wing virus: replication and viral load in mites (*Varroa destructor*). *J Gen Virol* **90**, 463–467.

Glinski, Z. and Jarosz, J. (1990) Micro-organisms associated fortuitously with *Varroa jacobsoni*. *Microbios* **62**, 59–68.

Glinski, Z. and Jarosz, J. (1992) *Varroa jacobsoni* as a carrier of bacterial infections to a recipient bee host. *Apidologie* **23**, 25–31.

Govan, V.A., Brözel, V., Allsopp, M.H. and Davison, S. (1998) A PCR detection method for rapid identification of *Melissococcus pluton* in honeybee larvae. *Appl Environ Microbiol* **64**, 1983–1985.

Grice, E.A., Kong, H.H., Conlan, S., Deming, C.B., Davis, J., Young, A.C., Comparative Sequencing Program, N.I.S.C., Bouffard, G.G. *et al.* (2009) Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science* **29**, 1190–1192.

Guindon, S. and Gascuel, O. (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* **52**, 696–704.

Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W. and Gascuel, O. (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* **59**, 307–321.

Hrabak, J. (2003) The microorganisms isolated from the mites *Varroa destructor* and the verification of their pathogenity. In *37th Apimondia International Apicultural Congress, Ljubljana, Slovenia, August 24–29 2003, Standing commission of bee pathology*. 6 p. Available at: http://www.apimondiafoundation.org/foundation/files/090.pdf (accessed 21 May 2015).

Hubert, J., Sustr, V. and Smrz, J. (1999) Feeding of the oribatid mite *Scheloribates laevigatus* (Acari: Oribatida) in laboratory experiments. *Pedobiologia* **43**, 328–339.

Jeyaprakash, A., Hoy, M.A. and Allsopp, M.H. (2003) Bacterial diversity in worker adults of *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata* (Insecta: Hymenoptera) assessed using 16S rRNA sequences. *J Invertebr Pathol* **84**, 96–103.

Kong, H.H., Oh, J., Deming, C., Conlan, S., Grice, E.A., Beatson, M.A., Nomicos, E., Polley, E.C. *et al.*, NISC

Comparative Sequence Program (2012) Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. *Genome Res* **22**, 850–859.

Kopecky, J., Perotti, M.A., Nesvorna, M., Erban, T. and Hubert, J. (2013) *Cardinium* endosymbionts are widespread in synanthropic mite species (Acari: Astigmata). *J Invertebr Pathol* **112**, 20–23.

Kopecky, J., Nesvorna, M. and Hubert, J. (2014) *Bartonella*-like bacteria carried by domestic mite species. *Exp Appl Acarol* **64**, 21–32.

Lartillot, N., Lepage, T. and Blanquart, S. (2009) PhyloBayes 3: a Bayesian software package for phylogenetic reconstruction and molecular dating. *Bioinformatics* **25**, 2286–2288.

Liu, T.P., Ritter, W. (1988) Morphology of some microorganisms associated with the female mite *Varroa jacobsoni*, a survey by electron microscopy. In *Africanized Honeybees and Bee Mites* ed. Needham, G.R. *et al.* pp 467–474. Chichester: Ellis Horwood.

Lyapunov, Y.E., Kuzyaev, R.Z., Khismatullin, R.G. and Bezgodova, O.A. (2008) Intestinal enterobacteria of the hibernating *Apis mellifera mellifera* L. bees. *Microbiology* **77**, 373–379.

Macovei, L. and Zurek, L. (2006) Ecology of antibiotic resistance genes: characterization of enterococci from houseflies collected in food settings. *Appl Environ Microbiol* **72**, 4028–4035.

Martinson, V.G., Danforth, B.N., Minckley, R.L., Rueppell, O., Tingek, S. and Moran, N.A. (2011) A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Mol Ecol* **20**, 619–628.

Martinson, V.G., Moy, J. and Moran, N.A. (2012) Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. *Appl Environ Microbiol* **78**, 2830–2840.

Matsuura, Y., Kikuchi, Y., Meng, X.Y., Koga, R. and Fukatsu, T. (2012) Novel clade of alphaproteobacterial endosymbionts associated with stinkbugs and other arthropods. *Appl Environ Microbiol* **78**, 4149–4156.

Meeus, I., Vercruysse, V. and Smagghe, G. (2012) Molecular detection of *Spiroplasma apis* and *Spiroplasma melliferum* in bees. *J Invertebr Pathol* **109**, 172–174.

Mouches, C., Bove, J.M. and Albisetti, J. (1984) Pathogenicity of *Spiroplasma apis* and other spiroplasmas for honey-bees in southwestern France. *Ann Microbiol (Inst Pasteur)* **135A**, 151–155.

Novakova, E., Hypsa, V. and Moran, N.A. (2009) *Arsenophonus*, an emerging clade of intracellular symbionts with a broad host distribution. *BMC Microbiol* **9**, 143.

O'Neill, S.L., Giordano, R., Colbert, A.M., Karr, T.L. and Robertson, H.M. (1992) 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 2699–2702.

Pruesse, E., Peplies, J. and Glöckner, F.O. (2012) SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics* **28**, 1823–1829.

Ravoet, J., Maharramov, J., Meeus, I., De Smet, L., Wenseleers, T., Smagghe, G. and de Graaf, D.C. (2013) Comprehensive bee pathogen screening in Belgium reveals *Crithidia mellificae* as a new contributory factor to winter mortality. *PLoS One* **8**, e72443.

Ritter, W. (2008) Varroosis of honey bees. In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds, and Bees)*, 6th edn, Vol. 1. pp. 424–429. Paris: World Organisation for Animal Health (OIE). Available at: http://www.oie.int/doc/ged/D7710.pdf (accessed 21 May 2015).

Romero, A., Broce, A. and Zurek, L. (2006) Role of bacteria in the oviposition behaviour and larval development of stable flies. *Med Vet Entomol* **20**, 115–121.

Rosenkranz, P., Aumeier, P. and Ziegelmann, B. (2010) Biology and control of *Varroa destructor*. *J Invertebr Pathol* **103**, S96–S119.

Ryabov, E.V., Wood, G.R., Fannon, J.M., Moore, J.D., Bull, J.C., Chandler, D., Mead, A., Burroughs, N. *et al.* (2014) A virulent strain of deformed wing virus (DWV) of honeybees (*Apis mellifera*) prevails after *Varroa destructor*-mediated, or *in vitro*, transmission. *PLoS Pathog* **10**, e1004230.

Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B. *et al.* (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* **75**, 7537–7541.

Schwarz, R.S., Teixeira, E.W., Tauber, J.P., Birke, J.M., Martins, M.F., Fonseca, I. and Evans, J.D. (2014) Honey bee colonies act as reservoirs for two *Spiroplasma* facultative symbionts and incur complex, multiyear infection dynamics. *Microbiologyopen* **3**, 341–355.

Shen, M., Yang, X., Cox-Foster, D. and Cui, L. (2005) The role of varroa mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWV) in honey bees. *Virology* **342**, 141–149.

Smrz, J. (1989) Internal anatomy of *Hypochthonius rufulus* (Acari: Oribatida). *J Morphol* **200**, 215–230.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**, 1596–1599.

Tsagou, V., Lianou, A., Lazarakis, D., Emmanouel, N. and Aggelis, G. (2004) Newly isolated bacterial strains belonging to Bacillaceae (*Bacillus* sp.) and Micrococcaceae accelerate death of the honey bee mite, *Varroa destructor* (*V. jacobsoni*), in laboratory assays. *Biotechnol Lett* **26**, 529–532.

Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M. and Cole, J.R. (2007) Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* **73**, 5261–5267.

Wilkes, T.E., Duron, O., Darby, A.C., Hypsa, V., Novakova, E. and Hurst, G.D.D. (2012) The genus *Arsenophonus*. In *Manipulative Tenants: Bacteria Associated with Arthropods* ed. Zchori-Fein, E. and Bourtzis, K. pp 225–244. Boca Raton: CRC Press.

Zhang, Q., Ongus, J.R., Boot, W.J., Calis, J., Bonmatin, J.-M., Bengsch, E. and Peters, D. (2007) Detection and localisation of picorna-like virus particles in tissues of *Varroa destructor,* an ectoparasite of the honey bee, *Apis mellifera*. *J Invertebr Pathol* **96**, 97–105.

Zheng, H.-Q. and Chen, Y.P. (2014) Detection of *Spiroplasma melliferum* in honey bee colonies in the US. *J Invertebr Pathol* **119**, 47–49.