

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Ekologie



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Studium fyziologie a hledání proteomických nástrojů pro supresi a detekci

Varroa destructor

Study of physiology and searching of proteomic tools useful in
suppression and detection of *Varroa destructor*

Bc. Martina Holenková

Vedoucí práce: Mgr. Tomáš Erban

Prohlášení

Prohlašuji, že předkládanou diplomovou prací na téma „Studium fyziologie a hledání proteomických nástrojů pro supresi a detekci *Varroa destructor*“ jsem vypracovala samostatně pod vedením uvedených školitelů. Veškerá použitá literatura a další zdroje, z nichž jsem citovala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

V Praze dne

.....

Poděkování

Ráda bych touto cestou vyjádřila své poděkování Mgr. Tomáši Erbanovi z Výzkumného ústavu rostlinné výroby v Ruzyni jako svému školiteli za odborné vedení, neocenitelné rady a ochotu při zpracování této diplomové práce.

Dále bych ráda poděkovala Mgr. Janu Hubertovi, PhD., z Výzkumného ústavu rostlinné výroby v Ruzyni za jeho odborné vedení v laboratoři. Jako mému internímu konzultantovi bych ráda poděkovala prof. RNDr. Vojtěchu Jarošíkovi, CSc., z Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Za dodání vzorků bych ráda poděkovala Ing. Daliboru Titěrovi, CSc., z Výzkumného ústavu včelařského v Dole a v neposlední řadě bych ráda poděkovala Mgr. Petru Jedelskému z laboratoře hmotnostní spektrometrie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze za analýzu vzorků pomocí MALDI TOF/TOF.

Abstrakt

Tato práce je zaměřena na studium fyziologie a proteomu roztoče *Varroa destructor* a jeho porovnání se včelou medonosnou *Apis mellifera*. Roztoč *Varroa* je v současné době hlavním problémem včelařství, jelikož napadá většinu včelstev. Možnosti kontroly roztoče se neobejdou bez reziduí jak v úlu, tak například v medu a jiných surovinách využívaných člověkem. Dalším problémem může být také současně diskutovaná otázka spojitosti roztoče se syndromem zhroucení včelstev (Colony Collapse Disorder).

Pro zorientování v orgánech *V. destructor* byla studována vnitřní anatomie roztoče pomocí parafínové histologie. Na histologických řezech barvených hematoxylinem a PAS reakcí bylo možné pozorovat trávicí soustavu roztoče, ale také vajíčko, vaječníky nebo mozek.

Cílem práce byla především identifikace proteinů roztoče *V. destructor* a včely *A. mellifera* jako jejího hostitele. Pro elektroforetické dělení proteinů byla použita dvourozměrná elektroforéza, kde druhý rozměr separace proteinů probíhal pomocí 12% a 15% SDS-PAGE. Z reprezentativních gelů byly vybrány nejabundantnější spoty, které byly analyzovány hmotnostním spektrometrem MALDI TOF/TOF. Nejabundantnější protein identifikovaný ve vzorcích *V. destructor* byl hexamerin, arginin kináza či hemelipoglycoprotein precursor. Hexameriny byly také hlavními identifikovanými proteiny v analyzovaných vzorcích kukly. Hlavní proteiny identifikované ve vzorcích larvy byly naopak major royal jelly proteiny.

Jedním z dílčích cílů byla enzymová analýza za použití zymogramové analýzy. Zjištěná trypsinová a chitinázová aktivita ve stádiu kukly korespondovala s metamorfózou. Hlavní enzymová aktivita v larválním stádiu byla α -glukosidázová a chymotrypsinová. Tyto aktivity byly podobné také kukle. U *V. destructor* byly prokázány β -glukosidázové a cathepsin D aktivity, které ve vzorcích *A. mellifera* pozorovány nebyly.

Výsledky této diplomové práce obohatily naše znalosti o biologii *V. destructor* a *A. mellifera*. Zároveň nám pomohly zorientovat se ve vnitřní struktuře roztoče, proteomu a enzymech včely i roztoče. Výsledky mohou být v budoucnu využity i pro boj s parazitem a určení příčiny kolapsu včelstev.

Abstract

This work is focused on the study of physiology and proteome of the mite *Varroa destructor* and on comparison with the honeybee *Apis mellifera*. *Varroa* is currently a major problem for beekeeping, because it infects most of the colonies. The control of the mite can not be done without residues both in the hive and for example in the honey or other resources used by the man. Another problem can also be the simultaneously discussed issue of the connection with the Colony Collapse Disorder.

The internal anatomy of *V. destructor* was studied by using paraffin histology. On histological sections stained using hematoxylin and PAS it was possible to observe the mite digestive system, but also egg, ovaries or brain.

The primary aim of this study was to identify the proteins of mite *V. destructor* and bee *A. mellifera* as a host of this parasite. For the electrophoretic separation was used two-dimensional gel electrophoresis, where the second dimension was carried out using 12% and 15% SDS-PAGE. The most abundant spots were selected for analysis using MALDI TOF/TOF mass spectrometry. The most abundant protein identified in samples of *V. destructor* was hexamerin, arginine kinase or hemelipoglycoprotein precursor. Hexamerins were also identified as the major proteins in the pupae samples. On the contrary the main proteins identified in the larvae samples were major royal jelly proteins.

One of the partial aims was enzymatic analysis using zymographic technique. Determined trypsin and chitinases activity in the pupal stage well corresponded to metamorphosis. The major enzymatic activity in larva was α -glucosidase and chymotrypsin; these activities were similar in pupa. However larval stage as well as *Varroa* lacked these activities. The mite samples exhibited β -glucosidase and cathepsin D activities, which were absent in *A. mellifera* samples.

The results of this thesis contributed to our understanding of the biology of *V. destructor* and *A. mellifera*. At the same time helped us to orientate in the internal anatomy of the mite, proteome and enzymes both mites and bees. The results can be used in the future to deal with the parasite and to determine the causes of bee colonies collapse.

Obsah:

1.	Úvod	7
2.	Včela medonosná (<i>Apis mellifera</i>)	8
2.1.	Význam včel	8
2.2.	Biologie včel	8
2.2.1.	Taxonomické zařazení	8
2.2.2.	Životní cyklus	9
2.2.3.	Včela medonosná (<i>Apis mellifera</i>) a její výživa	11
2.2.4.	Proteiny hemolymfy	12
2.3.	Patologie včel	15
2.3.1.	Poškození včely na individuální úrovni	15
2.3.1.1.	Virus deformovaných křídel (<i>Deformed Wing Virus (DWV)</i>)	16
2.3.1.2.	Virus černání matečnicků (<i>Black Queen Cell Virus (BQCV)</i>)	17
2.3.1.3.	Virus akutní paralýzy včel (<i>Acute Bee Paralysis Virus (ABPV)</i>)	18
2.3.1.4.	Virus chronické paralýzy včel (<i>Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV)</i>)	18
2.3.1.5.	Kašmírský virus (<i>Kashmir Bee Virus (KBV)</i>)	19
2.3.1.6.	Israeli acute paralysis virus (<i>IAPV</i>)	19
2.3.2.	Poškození včely na úrovni kolonií	20
3.	<i>Varroa destructor</i>	22
3.1.	Význam <i>Varroa destructor</i>	22
3.2.	Taxonomické zařazení <i>Varroa</i>	24
3.3.	Biologie <i>Varroa</i>	24
3.3.1.	Morfologie	24
3.3.2.	Životní cyklus	30
3.3.3.	Reprodukce	31
3.3.4.	Populační dynamika	32
3.4.	Současné možnosti detekce a kontroly varroázy	34
4.	Experimentální část	40
4.1.	Materiál	40
4.1.1.	Charakteristika testovaných vzorků	40
4.2.	Metodika	40
4.2.1.	Parafinová histologie roztoče <i>Varroa destructor</i>	40
4.2.2.	Příprava homogenátů	42
4.2.3.	Elektroforetické dělení proteinů	43
4.2.3.1.	1. rozměr: Izoelektrická fokusace (IEF)	43
4.2.3.2.	2. rozměr: SDS-PAGE)	44
4.2.4.	Identifikace proteinů hmotnostní spektrometrií	44
4.2.5.	Nativní elektroforéza	44
4.3.	Výsledky	47
4.3.1.	Výsledky parafinové histologie	47
4.3.2.	Výsledky dvourozměrné (2D) elektroforézy a identifikace proteinů hmotnostním spektrometrem	57
4.3.3.	Zymogramy	74
4.4.	Diskuze	79
5.	Závěr	83
6.	Literatura	84
7.	Přílohy	90
7.1.	Seznam zkratk	90
7.2.	Seznam přístrojů	91
7.3.	Seznam tabulek, obrázků a schémat.....	92

1. Úvod

Včela medonosná (*Apis mellifera*) je klíčovým opylovačem a produkce potravin závisí z velké části na opylení včelami. Současným ekologickým problémem je ektoparazitický roztoč kleštík zhoubný (*Varroa destructor*), který včely napadá. Většina včelařů již v dnešní době bojuje s varroázou, a i přesto se nedaří tento problém vyřešit. Roztoč parazituje na plodu včel, zejména na stádiu kukly. U larvy zavičkované v plástu probíhá metamorfóza z kukly na dospělce. V tuto dobu roztoč sají hemolymfu kukly a reprodukuje se. Používání akaricidů a jiné chemické kontroly se neobejde bez reziduí ve včelařských produktech. Nejen tato rezidua jsou při používání akaricidů problémem. Včely samotné poškozují používání akaricidů a může vést až ke špatnému vývoji včel či jejich smrti. Roztoč svého hostitele poškozují jak na individuální úrovni přenášením mnoha virů a jiných onemocnění, tak na úrovni koloniální, kde se můžeme setkat se syndromem zhroucení včelstev (Colony Collapse Disorder).

Předkládaná diplomová práce se zaměřuje na studium fyziologie roztoče *V. destructor* a stádia kukly a larvy *A. mellifera* pomocí proteomiky a enzymatiky. Je studována i anatomie roztoče pomocí parafinové histologie. Cílem diplomové práce bylo získat nové informace o fyziologii *V. destructor* a *A. mellifera*, porovnat výsledky proteomiky a enzymatiky *V. destructor* a *A. mellifera* a pokusit se najít proteiny, které by se mohly stát cílem pro boj s *Varroa*.

2. Včela medonosná (*Apis mellifera*)

2.1. Význam včel

Včely jsou nejdůležitější komerční opylovači plodin, jejichž reprodukce závisí na živočišném opylení. Tyto plodiny tvoří až 35 % globální produkce potravin, a proto jsou včely důležité pro ekonomické a udržitelné zemědělství. Navíc také včely opylují velké množství divokých rostlin a přispívají tak k biodiverzitě mnoha ekosystémů. Až 90 % komerčních opylovačů tvoří obhospodařované včelstva. Bez včel by byla lidská strava velmi ochuzena (Genersch, 2010).

Současné snižování počtu včel ve světě se stává vzhledem k důležitosti včelstev významnou hrozbou. Včela je jako opylovač důležitým organismem pro zemědělství. V USA jsou včely primárním opylovačem a jejich vliv na kvalitu a výnos zemědělských plodin byl v roce 2000 odhadován na 14,6 miliard dolarů. Včely mají také medicínální vliv (Bogaerts *et al.*, 2009).

2.2. Biologie včel

2.2.1. Taxonomické zařazení

Rod *Apis* lze rozdělit do 3 podrodů *Apis*, *Megapis* a *Micrapis*. Včela medonosná (*A. mellifera*) patří do rodu *Apis*. Do tohoto rodu patří kromě včely *A. mellifera* také včela *A. cerana*, *A. koschevnikovi* a *A. nigrocincta* (Engel, 1999).

Klasifikace podle Engel (1999):

Třída: hmyz (*Insecta*)

Řád: blanokřídlí (*Hymenoptera*)

Čeleď: včelovití (*Apidae*)

Rod: včela (*Apis*)

Druh: včela medonosná (*Apis mellifera*)

Existuje také několik poddruhů neboli ekotypů včely medonosné. Každá populace se vyvinula za určitých ekologických podmínek. Tyto poddruhy jsou v současné době často promíchány a je složité je od sebe oddělit (Capinera, 2008). Podle výzkumu genomu včely je *A. mellifera mellifera* více příbuzná africkým včelám, které zastupuje *A. mellifera scutellata* než ke geograficky bližšímu evropskému poddruhu *A. mellifera carnica* nebo *A. mellifera ligustica* (Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006).

Evropské poddruhy podle Capinera (2008):

Apis mellifera mellifera

Apis mellifera ligustica

Apis mellifera carnica

Apis mellifera caucasica

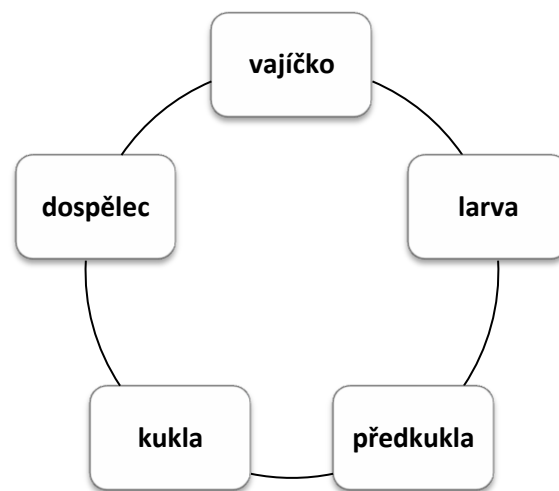
2.2.2. Životní cyklus

Včela medonosná (*A. mellifera*) je sociální hmyz žijící v koloniích. Každá kolonie obsahuje dvě samičí kasty: matku a dělnice, jejichž počet na kolonii se pohybuje od 20 000 do 50 000. Život v kolonii je řízen mnoha feromony, vydávanými převážně včelí matkou. Kolonie obsahuje také samčí kastu nazývanou trubci. Tito jedinci slouží hlavně k oplození matky během snubních letů (Sammataro *et al.*, 2000).

Včely v průběhu života prochází proměnou dokonalou (holometabolii). Stupni jejich vývoje je vajíčko, několik stádií larvy, předkukla, kukla a nakonec dospělá včela (viz schéma č.1). Včelí larva, která se vylíhne z vajíčka je dělnicemi kojičkami krmena mateří kašičkou vytvořenou v hypofaryngálních žlázách. Tyto žlázy jsou párové žlázy umístěné na hlavě včely, produkující proteinový sekret, kterým jsou krmeny larvy, královna, dělnice a trubci (Amdam & Omholt, 2002). Hypofaryngální žlázy dělnic hrají důležitou roli ve výživě včel a v diferenciaci kast. Žlázy jsou tvořeny lalůčky obsahujícími sekreční buňky. Jakmile jsou dělnice kojičkami, velikost lalůček je největší a klesá, jakmile začínají vylétávat z hnízda za potravou. Velikost lalůček je tedy největší kolem 6. dne a začíná klesat od 15. dne (Feng & Li, 2009). Starší larvy již mateří kašičku nedostávají, protože pokud by ji konzumovaly dále, vyvinula by se z nich matka. Jestli se z larvy vyvine dělnice nebo matka nezávisí na genetických rozdílech, ale pouze na délce krmení mateří kašičkou a na jejím složení. Pokud je podíl cukrů v mateří kašičce 35 %, vyvine se matka a pokud 10 %, vede to k vývoji dělnice.

Podle Kamakuro (2011) vyvolává změnu dělnice na matku protein royalactin, který se nachází v mateří kašičce. Tento protein má vliv na velikost těla a vývoj vaječnicků a snižuje dobu vývoje u včel (Kamakuro, 2011). Ve vývoji matek, dělnic a trubců jsou značné rozdíly. Všechny kasty prochází pěti stádií larvy, ale larvální stádium trvá u každé kasty různě dlouho. Nejdéle se vyvíjejí trubci a nejkratší dobu matky. V posledním stádiu larvy je buňka zavíčkovaná a uvnitř probíhá přeměna v kuklu a poté v dospělou včelu (Tautz, 2010).

Schéma č.1: Vývoj včely medonosné:



Mladé dělnice v kolonii pečují o matku a potomstvo, zatímco starší dělnice vylétají pro pyl, nektar, vodu a ochraňují kolonii. Rovnováha v úlu je zajišťována dělnicemi, které navzdory okolním podmínkám udržují téměř konstantní teplotu a vlhkost v úlu. Celkový vývoj matky trvá 16 dní, dělnice 21 dní a trubce 24 dní. Matka dokáže přežít několik let, zatímco dělnice a trubci žijí pouze několik týdnů (Sammataro *et al.*, 2000).

U dělnic včely medonosné se v mírném pásmu vyskytuje zřetelné rozdělení v délce života. Podle Amdam & Omholt (2002) můžeme včely rozdělit na krátce žijící letní (krátkověké) včely a dlouho žijící zimní včely (dlouhověké). Včely líhnoucí se od jara do půlky léta mají průměrnou délku života od 25 do 35 dní, zatímco zimní včely běžně žijí 6 až 8 měsíců. Zimní včely se líhnou během omezené doby v pozdním létě a liší se od letních včel také fyziologicky (Amdam & Omholt, 2002).

2.2.3. Včela medonosná (*Apis mellifera*) a její výživa

Včely medonosné žijí v koloniích a materiál pro stavbu hnízda si vytváří samy. Vosk pro tvorbu plástů vzniká ve žlázových polích, kterých má včela na zadečku 4 páry. Jakmile vosk vystoupí z těla včely na povrch žlázy, ztuhne a šupinu včela použije na stavbu hnízda. Nejprve ho v ústech prohněte se sekretem kusadlových žláz. Jakmile vosk získá správnou konzistenci, mohou s ním včely pracovat a tvořit plásty (Tautz, 2010).

Uvnitř úlu je přítomna jak potrava bohatá na proteiny (pyl), tak potrava bohatá na sacharidy (med) (Sammataro *et al.*, 2000). Pyl jako zdroj proteinů, aminokyselin a lipidů je u včel nezbytný pro jejich fyziologický vývoj a odolnost proti parazitům. Vliv pylu na zdraví včely byl zkoumán u včelstev napadených roztočem *Varroa*. Pyl měl pozitivní vliv na geny ovlivňující dlouhověkost včel, ale nezmírnil škodlivý vliv roztoče na včelu (Alaux *et al.*, 2011).

Po tom, co se larva vylíhne, je krmena mateří kašičkou od dělnic krmiček. Později jsou larvy krmeny směsí kašičky, medu a pylu, která obsahuje méně proteinů a více sacharidů. Proteinové zastoupení v potravě nezávisí pouze na stáří larvy, ale také na sezónním období. Krátce po vzniku začínají mladé včely konzumovat med a pyl uložený v plástu nedaleko jejich plodového hnízda. Pyl uložený v plástu je pyl, který byl posbíráván dělnicemi vylétávajícími za snůškou, které ho připraví pro uložení do plástu. Je smíchán spolu se sekrety včel a obsahuje množství mikroorganismů. Pyl skladovaný tímto způsobem má vyšší nutriční hodnotu než laboratorně skladovaný pyl. Pyl je pro včely přírodním zdrojem proteinů. Konzumace pylu dělnicemi roste až do doby, než se z nich stanou včely kojičky. Od této doby konzumace pylu klesá. Během zimy, kdy není dostupná potrava mimo úl, včely konzumují uloženou potravu, což znamená med a pyl uložený v plástu. Jiným možným způsobem zajištění proteinové stravy je kanibalismus, kdy dělnice mohou jíst vajíčka nebo potomstvo (Crailsheim, 1990).

Pro růst včely je podstatných 10 aminokyselin: arginin, histidin, lysin, tryptofan, fenylalanin, metionin, treonin, leucin, isoleucin a valin. Nutriční hodnota pylu je pro včely definována primárně absolutním a relativním obsahem esenciálních aminokyselin. Pyl z různých rostlin má různou nutriční hodnotu pro včely (Crailsheim, 1990).

Pyl je přijímán buď čerstvý, nebo z plástu. Slinné a hypofaryngální žlázy včel neprodukují proteolytické enzymy. Zrníčka pylu jsou transportovány přes česlo do žaludku a při vstupu do žaludku je pyl rozštěpen díky osmotickému tlaku a proteolytickým enzymům.

Proteolytické enzymy se vyskytují pouze v omezené míře v zažívacím traktu v posledním stádiu kukly a u líhnoucí se včely. Největší proteolytická aktivita se vyskytuje u včel kojiček (Crailsheim, 1990).

2.2.4. Proteiny hemolymfy

Včela *A. mellifera* je pro lidstvo natolik důležitá, že byla mezi prvním hmyzem, který byl sekvenován (Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006).

Každá včelí kasta má různé energetické a metabolické požadavky. Hemolymfa distribuuje živiny po těle včely a spolu se složkami imunitního systému vyskytujícími se v hemolymfě tvoří obranu proti parazitům a mikroorganismům. Klíčovými proteiny hemolymfy jsou transportní a skladovací protein transferin, který přenáší železo, apolipoprotein, který přenáší tuky a vitellogenin, hlavní skladovací protein u samic (Chan *et al.*, 2006). Transferin je také důležitým proteinem v těle včel, jelikož hraje roli v centrálním nervovém systému a jako růstový faktor, který může regulovat ostatní proteiny (Kucharski & Maleszka, 2003). Apolipoprotein se vyskytuje u všech kast v relativně stejných množstvích (Chan *et al.*, 2006). Aktin se u včely vyskytuje jako strukturální protein (Kucharski & Maleszka, 2003). *V. destructor* má podle studie Colin *et al.* (2001) také chitinázy a proteázy, které mohou pomáhat roztoči k proniknutí přes kutikulu včely. Viry, které roztoč přenáší, se mohou díky proniknutí roztoče přes kutikulu snadno dostat do hemolymfy včely, a proto je výskyt virových onemocnění u parazitovaných kolonií vyšší. Navíc mají chitinázy u roztoče také výživovou funkci (Colin *et al.*, 2001).

Převážnou část hemolymfy však tvoří hexameriny (Chan *et al.*, 2006). Hexameriny jsou proteiny, které ztratily svou schopnost vázat měďnaté ionty a transportovat kyslík, a proto slouží v těle včely jako skladovací proteiny (Martins, 2010). Hexamerin je proteinem, který se u včely vyskytuje nejvíce v pozdním larválním stádiu a na začátku stádia kukly (Bogaerts *et al.*, 2009). Hexameriny jsou syntetizovány tukovým tělesem včely. Hemolymfa včely obsahuje 4 typy hexamerinů: hex 70a, hex 70b, hex 70c a hex 110, které se liší ve struktuře. U dělnic je exprese všech 4 genů nejvyšší. Transkripce hex 110, hex 70a a hex 70b byla objevena v gonádách larvy i kukly obou pohlaví, a proto pravděpodobně hexameriny slouží jako skladovací proteiny při vývoji vajíčka. Exprese hex 70a je nižší u matek než u dělnic (Martins, 2010).

Enzymy jsou nejhojnější skupinou proteinů v hemolymfě dělnice. Nejčastěji se vyskytují proteiny účastníci se štěpení cukrů, proteázy či peptidázy. Další hojnou skupinou jsou strukturální proteiny, např. aktin a tubulin. Mezi transportní a skladovací proteiny dělnice patří hexamerin či transferin. Pachy a feromony jsou přenášeny pomocí proteinů OBP (odorant binding proteins). Součástí hemolymfy dělnice je také skupina proteinů major royal jelly (MRJP), které jsou hlavní součástí mateří kašičky, kde mají hlavně výživovou funkci (Schmitzová *et al.*, 1998). V hemolymfě dělnice byly nalezeny obranné proteiny, ale také virové proteiny. Mezi ostatní identifikované proteiny byl zařazen heat shock protein a vitellogenin (Bogaerts *et al.*, 2009). Heat shock proteiny, které se v hemolymfě včely vyskytují, jsou syntetizovány, jestliže jsou buňky vystaveny vysoké teplotě. Tyto proteiny se uplatňují například v době letu včely, kdy teplota kolem létacích svalů může dorůst až 47 °C nebo během zahřívání kolonie v zimním období, kdy může teplota opět vzrůst (Chacon-Almeida *et al.*, 2000).

U stádia larvy včely bylo objeveno 5 zásobních proteinů: hexamerin 70a, 70b, 70c, polypeptid s vysokým obsahem kyseliny glutamové a vitellogenin. Pouze hexamerin 70a se vyskytuje u dospělých dělnic, ale informace o jeho syntéze nejsou známy. (Amdam & Omholt, 2002). Jedinou kastou, která si udrží expresi hexamerinu 70b v dospělosti v množstvích jako u larvy je matka (Chan *et al.*, 2006). V larválním stádiu je rozdílná exprese proteinů mezi larvou dělnice a matky již po 3 dnech. Třídenní a pětidenní larvy mají rozdílné profily proteinů a různé biologické požadavky na ně, což vede k jejich diferenciaci na matku a dělnici. U larvy dělnice byla prokázána exprese ATP syntázy, aldehyddehydrogenázy nebo 14-3-3 proteinu, které se u královny nevyskytovaly (Li *et al.*, 2010).

Tukové těleso hraje hlavní roli v životě hmyzu. Jednou z funkcí je skladovat a uvolňovat energii potřebnou k životu hmyzu s proměnou dokonalou, který musí naakumulovat minimální množství živin v larválním stádiu, aby později přežil období metamorfózy. Buňky tukového tělesa nejenže řídí syntézu a použití energetických rezerv, ale také syntetizují většinu proteinů hemolymfy. Velká část významných proteinů jako skladovacích, lipoporinů zodpovědných za transport lipidů či vitellogeninu je vylučováno tukovým tělesem (Arrese & Soulages, 2009). Tukové těleso je u včel vytvořeno během prvních dní jejich života jako dospělce. V letní sezóně je uvnitř tukového tělesa maximum proteinů. Během zimy množství proteinů v tukovém tělese klesá. Vysoké koncentrace skladovacích proteinů se u včely vyskytují hlavně na konci larválního stádia, které se použijí na vytvoření tkání během metamorfózy (Amdam & Omholt, 2002).

Z hlediska tvorby proteinů jsou důležité také hypofaryngální žlázy, produkující mateří kašičku. Žlázy vylučují specifický protein major royal jelly protein 3 u včel kojiček. Včely létavky mohou pomocí žláz produkovat α -glukosidázy, nebo jiné enzymy jako galaktosidázy, esterázy nebo lipázy (Feng & Li, 2009). Složení mateří kašičky se geograficky liší a odvíjí se od klimatických podmínek. Obsah vlhkosti je 60-70 %, hrubých proteinů 12-15 %, sacharidů 10-16 %, lipidů 3-6 % a 2-3 % nízkomolekulárních látek (vitamíny, soli, apod.). Mateří kašička se skládá z 46-89 % ve vodě rozpustných proteinových frakcí (Albert *et al.*, 1999). Hlavními proteiny jsou major royal jelly proteiny (MRJP), které tvoří hlavní složku larvální stravy (Albert & Schmitz, 2002).

Hemolymfa včely obsahuje mnoho proteinů, nicméně vitellogenin je jedním z nejvíce dominantních. Vitellogenin je prekursorem proteinů vitellinu, který je skladovacím proteinem důležitým pro vývoj vajíčka u mnoha organismů. Vitellogenin je syntetizován jako cca 600 kDa precursor v tukovém tělese včel (Tufail & Takeda, 2008). Vitellogenin je syntetizován ve vysokých množstvích u včelích matek a je také abundantní u zimních dlouho žijících včel (Erban *et al.*, 2012). Podle Seehuus *et al.* (2006) vitellogenin chrání dělnice před oxidačním stresem. U obou kast se vitellogenin vyskytuje během jejich stádia kukly. U matek je to dříve než u dělnic, kde se v hemolymfě vyskytuje se zpožděním. Podle Barchuk *et al.* (2002) načasování vitellogeninu v hemolymfě obou kast ovlivňuje juvenilní hormon. Vitellogenin slouží v těle včely také jako přenašeč zinku, a tedy stav zinku koreluje s hladinami vitellogeninu v hemolymfě včely. Zinek je pro včelu důležitý jako katalytický, strukturní či regulační ion (Amdam & Omholt, 2002).

Proteinové zastoupení se zdá být také určujícím faktorem délky života včel. Dělnice a matka se vyvinuly se stejného genomu, ale délka života matky je 10krát větší. Matky kladou až 2 000 vajíček za den a žijí 1-3 roky. Na rozdíl od matky žijí dělnice 3-6 týdnů během léta. Včelí matky jsou dlouhověké a plodné, zatímco dělnice se stejným genomem, jsou relativně krátkověké a sterilní. U většiny živočichů je dlouhověkosti dosaženo na úkor snížené plodnosti. Vitellogenin funguje v těle matky jako antioxidant na podporu dlouhověkosti. Matky lépe odolávají oxidačnímu stresu. Expresi vitellogeninu byla u matek vyšší než u dělnic. To by potvrdzovalo hypotézu, že za dlouhověkostí matky stojí právě rozdíly v expresi vitellogeninu, které jsou mezi kastami různé (Corona *et al.*, 2007).

Vitellogenin zřejmě hraje roli také v tom, jestli se vyvine letní nebo zimní typ včely. Podle Amdam & Omholt (2002) závisí typ včel na teplotních podmínkách na podzim či zásobách pylu v kolonii. Jestliže je teplota nízká, syntéza vitellogeninu není dostatečná, aby

se u včel vyvinuly vlastnosti zimních včel. Pokud je dostatečná zásoba pylu a tím i proteinů, může syntéza vitellogeninu probíhat (Amdam & Omholt, 2002).

Zatímco podle Amdam & Omholt (2002) je vitellogenin specificky samičím proteinem hemolymfy, který je spotřebováván vyvíjejícím se oocytem, podle Guidugli *et al.*, (2005) produkují larvy obou pohlaví vitellogenin ve významných množstvích, což může sloužit pro jiné funkce než jen růst oocytu. U dělnic je pro transkripci vitellogeninu důležitý juvenilní hormon, avšak jeho vysoké dávky mohou syntézu vitellogeninu inhibovat (Amdam & Omholt, 2002). Vitellogenin byl zjištěn ve vaječnicích královen, zatímco ve vaječnicích dělnic ne. U čerstvě vylíhnutých včelích matek se vitellogenin hromadí v hemolymfě a po 3 dnech může tvořit až 70 % proteinů hemolymfy. Takto vysoká hladina bývá udržována po zbytek života matky (Guidugli *et al.*, 2005).

2.3. Patologie včel

2.3.1. Poškození včely na individuální úrovni

Virové nákazy včel

Napadení včelstev viry zřejmě záleží také na druhu včel. Nejvíce převládající virus byl u včel *A. mellifera* v Číně virus deformovaných křídel (DWV), zatímco u včel *A. cerana* to byl virus pytlíčkovitého plodu (SBV). Vysoký výskyt viru deformovaných křídel byl popsán i v mnoha evropských zemích. Virus pytlíčkovitého plodu byl převládající také v Dánsku, Francii či Rakousku. Zatímco se kašmírský virus (KBV) u čínských včel nevyskytoval, v mnoha evropských zemích, Austrálii či USA je tento vir velmi rozšířen. Často lze pozorovat napadení různými druhy virů společně. U druhu *A. cerana* v Číně převládala koinfekce viru DWV a SBV, zatímco u včel *A. mellifera* nejvíce převládala koinfekce DWV s virem černání matečnicků (BQCV) (Ai *et al.*, 2012).

Hladiny mnoha virů korelují s hladinami roztoče, zejména ABPV, SPV (Slow paralysis virus), BQCV či DWV (Chen *et al.*, 2004). Bylo zjištěno, že mnoho virů (DWV, ABPV, CBPV, SPV, BQCV, KBV, SBV) souvisí s nákazou roztočem *V. destructor*. *Varroa* umožňuje horizontální přenos viru DWV, SBV, APV, IAPV a KBV z včel krmiček do larev

přes jejich potravu a přes potomstvo pak do dospělých včel. Vertikální přenos je možný napadenými vajíčky královny nebo semeny trubců. Několik virů je schopno replikace uvnitř roztoče, což potvrzuje aktivní přenos virů roztočem (Le Conte *et al.*, 2010).

2.3.1.1. Virus deformovaných křídel (*Deformed Wing Virus (DWV)*)

Virus deformovaných křídel je jeden z mnoha virů napadajících včely. Patří do skupiny *Iflaviridae* a je tvořen pozitivní jednovláknovou RNA. Dříve byl označován za egyptský virus včel (EBV), který byl izolován v Egyptě v roce 1977 z dospělých včel. Později byl izolován virus ze včel s deformovanými křídly v Japonsku, kde se ukázalo, že se jedná o stejný virus a podle symptomů pak byl virus přejmenován. Dnes je virus rozšířen všude tam, kde je rozšířen roztoč *V. destructor*. Právě roztoč *V. destructor* pomáhá horizontálnímu přenosu viru. Virus se může přenášet také vertikálně z rodičů na potomstvo pomocí vajíček a spermií (Shah *et al.*, 2009). Napadení virem DWV je značně vyšší u kolonií, kde parazituje *V. destructor* než u kolonií bez roztoče (Gregorc *et al.*, 2012). *V. destructor* a DWV jsou podle studie Dainat *et al.* (2012a) silným markerem ztrát včel během zimy. Virus byl nalezen také u včel *A. cerana*. To vyvolává otázku, jestli virus, stejně jako *Varroa*, má svůj původ v jihovýchodní Asii a jeho hostiteli včele *A. cerana*, nebo je to původní virus včely *A. mellifera* (de Miranda & Genersch, 2010).

Nákaza může probíhat u hostitele skrytě nebo otevřeně. DWV se může vyskytovat u všech vývojových stádií, od vajíček po dospělé včely. I přesto, že se roztoč v kolonii nevyskytuje, může se projevit nákaza, která probíhá skrytě. Skryté nákazy dělíme na latentní a trvalé. U latentní formy je genom viru integrován do buněčného genomu hostitele. Tento typ se u včelích nákaz zřejmě nevyskytuje. Trvalá forma je charakterizována konstantní nízkou produkcí virových částic. Trvalá forma také nebyla popsána, i když skryté nákazy jsou popsány jako forma nákazy DWV, ale také BQCV, ABPV, CBPV, KBV a SBV. Při otevřené naze jsou zjevné symptomy a dochází k vyšší produkci virových částic. Tento typ nákazy se přenáší nejčastěji horizontálně. Nezbytným předpokladem je přenos viru do kukly roztočem *V. destructor*, ale rozhodující je replikace viru uvnitř roztoče před samotným přenosem. Virus DWV byl ale nalezen pouze v lumen střeva roztoče *V. destructor* a nebyl nalezen žádný důkaz, že by se vir uvnitř roztoče replikoval (Santillán-Galicia *et al.*, 2008). Shah *et al.* (2009) detekovali virus v mozku dělnic, což poukazuje na aktivní replikaci uvnitř

včel. Napadené oblasti v mozku jsou zodpovědné za zrak a čich a lze tedy předpokládat, že napadené včely mají potíže s těmito vjemy. DWV může zřejmě způsobovat také chronické nákazy, které se projevují dlouhodobou produkcí virových částic po celou dobu životnosti hostitele. Mezi symptomy poukazující na otevřenou nákazu patří deformace křídel včel, zkrácené a nafouklé bříška a ztráta barvy. Skrytá nákaza je charakteristická absencí symptomů nákazy i přes přítomnost virových částic (de Miranda & Genersch, 2010).

DWV virus hraje roli také v syndromu zvaném „parasitic mite syndrome“. Tento syndrom popisuje klinické symptomy při propuknutí na koloniální úrovni. Když kolonie na jaře roste, kompenzace ztrát jedinců díky otevřené nákaze virem DWV je snazší, než když se chov na podzim utlumuje a množství roztočů dosahuje maxima. Virus se začíná šířit a dochází k nadměrnému úbytku dělnic, což způsobuje rychlý úbytek samotné kolonie až její zánik. Takový kolaps může být pozorován na velkém množství mrtvých a umírajících včel se scvrklými křídly před úlem (de Miranda & Genersch, 2010).

V. destructor působí jako mechanický vektor viru, ale také indukuje imunosupresi parazitované kukly. Není přesně známo, jak roztoč ovlivňuje imunitní odpověď včel. Shah *et al.* (2009) tvrdí, že vysoký výskyt roztoče v kolonii potlačuje imunitní funkce včel a může vést až k úhynu kolonie. Virus deformovaných křídel může oslabit kolonii a dopomoci tak kolapsu kolonie způsobeného napadením roztoče *V. destructor*. Virus DWV patří do méně virulentních virů, což je paradoxně vysvětlení kolapsu kolonie, jelikož více virulentní viry zabijí kukly a tím i roztoče, předtím než jsou schopni dokončit svou reprodukci a přenést tak vir do dalších jedinců (de Miranda & Genersch, 2010).

2.3.1.2. Virus černání matečniců (*Black Queen Cell Virus (BQCV)*)

Virus černání matečniců se v současné době vyskytuje asi u 30 % kolonií v centrální Evropě, což ho činí o to významnější. Samotný virus kolonie neničí, ale vyskytuje se spolu s infekcí hmyzomorky *Nosemy apis*, a to má na kolonie negativní efekt. Tento vir napadá hlavně dospělé včely, stejně jako hmyzomorka (Moritz *et al.*, 2010).

2.3.1.3. Virus akutní paralýzy včel (*Acute Bee Paralysis Virus (ABPV)*)

Virus akutní paralýzy včel byl znám ještě před příchodem roztoče *Varroa*, ačkoliv většinou nezpůsobil úhyn kolonie. Po příchodu roztoče vzrostl výskyt viru ABPV a bylo potvrzeno, že hraje roli jako vektor viru. Nebylo prokázáno, že by se vir uvnitř roztoče replikoval, nicméně je pro včelu kombinace napadení virem ABPV a roztočem *Varroa* více smrtelná (van Engelsdorp & Meixner, 2010).

Tento virus zabíjí jak dospělé, tak včelí plod, obzvláště v koloniích v Evropě a USA. K množení viru dochází, jakmile se roztoč krmí na napadené včele. Včely, které krmí potomstvo mohou vir přenášet pomocí jídla do larev nebo do ostatních dospělých včel. Díky tomu se vir může rychle přenášet (Sammataro *et al.*, 2000).

2.3.1.4. Virus chronické paralýzy včel (*Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV)*)

Virus chronické paralýzy včel je v současné době klasifikován jako RNA virus. CBPV jinak nazývané jako paralýza je infekční a nakažlivé napadení včelstev. Již v roce 1906 byla objevena choroba pojmenována jako „Isle of Wight“ podle ostrova, kde se vyskytla. Později se zjistilo, že za touto záhadnou nemocí stála kombinace CBPV a environmentálních podmínek (Neumann & Carreck, 2010). Mezi symptomy onemocnění patří abnormální chvění křídel a těl včel. Napadené včely nejsou téměř schopny letu a pouze se plazí kolem úlu. Často mívají nafouklý zadeček a vykloubená křídla. Dalším symptomem jsou včely, které sice mohou létat, ale postupně jim opadávají chlupy. Jejich těla jsou lesklá a tmavší, což je dělá menšími a ostatní včely je napadají. Po několika dnech se stávají nelétavými, chvějí se a brzy hynou (Ribière *et al.*, 2010).

Při větším počtu úlu, které jsou vystaveny stejným environmentálním podmínkám, bývají napadeny pouze některé úly stejně jako u viru IAPV. Často jsou napadenými koloniemi právě silnější včelstva, před kterými se začnou objevovat mrtvé včely. I přesto, že

mnoho virů je přenášeno roztočem *V. destructor*, u tohoto viru je známa pouze jedna studie, kdy byl zaznamenán přenos CBPV. Je možné, že roztoč díky sání hemolymfy přenáší i toto vysoce nakažlivé onemocnění (Ribière *et al.*, 2010).

2.3.1.5. Kašmírský virus (*Kashmir Bee Virus* (KBV))

Kašmírský virus je RNA vir z čeledi *Dicistroviridae*. V laboratorních podmínkách je tento virus považován za jeden z nejvirulentnějších. Je možné, že roztoč *V. destructor* působí i v případě tohoto viru jako jeho vektor. Chen *et al.* (2004) potvrdili experimentálně přenos KBV do včelího hostitele. Roztoč, který není nosičem viru, jej může získat pouhým sdílením buňky uvnitř úlu s napadenými roztoči. Lze také předpokládat, že k přenosu viru do roztoče může dojít při sání hemolymfy napadené včely (Chen *et al.*, 2004).

2.3.1.6. Israeli acute paralysis virus (IAPV)

Virus IAPV vzbudil velký zájem hlavně v souvislosti s možným činitelem CCD. Jeho přítomnost koreluje s vyšším rizikem kolapsu kolonie. Interakce *Varroa* a IAPV dosud nebyla zmíněna. Nedávné data naznačují, že by viry ABPV, KBV a IAPV nemusely reprezentovat různé druhy, ale komplex blízkce příbuzných druhů. Vzhledem k jejich blízké genetické příbuznosti bývají KBV a IAPV často zaměňovány (van Engelsdorp & Meixner, 2010).

Bylo prokázáno, že sekvence tohoto viru přetrvávají ve formě DNA integrované do genomu včely. To indikuje možnost genetického přenosu z RNA viru do včelích buněk (de Miranda & Genersch, 2010).

2.3.2. Poškození včely na úrovni kolonií

Mimo poškození na individuální úrovni ovlivňuje roztoč také koloniální úroveň. Včelstva trpí sníženou reprodukční schopností až syndromem zhroucení včelstev. Roztoč redukuje reprodukční kapacitu ve dvou směrech. Jednak trubci, kteří jsou napadeni v době jejich vývoje, mají významně nižší šanci reprodukce a pak napadené kolonie produkují menší roje (Rosenkranz *et al.*, 2010).

Ze včelařského úhlu pohledu existuje určitý práh, po kterém nastávají ekonomické škody a nevratné poškození kolonie. Při nízké míře napadení nejsou klinické symptomy viditelné a napadení tak zůstává včelařům skryto. Při středním napadení mohou být symptomy stále skryté, ale napadení již může redukovat růst populace. Kroky k nevratnému poškození včelstva jsou malé, obzvláště v průběhu podzimu, kdy populace roztoče narůstá, zatímco populace hostitele klesá. Finální stádium je pak spojováno s „parasitic mite syndrom“ a jeho symptomy jako rozptýlené potomstvo, ochromené, plazící se včely či nevysvětlené úbytky včelí populace. Prah poškození nesouvisí s fixním počtem roztočů. Je variabilní a závisí na populaci včel a potomstva, sezóně a přítomnosti včelích virů v kolonii (Rosenkranz *et al.*, 2010).

2.3.2.1 Negativní vliv na včelu

Opakované sání hemolymfy včely roztočem způsobuje fyzické zranění včely, snížení obsahu proteinů, redukcí váhy a ovlivňuje vývoj orgánů. Roztoč a viry, které přenáší, přispívají k morfologickým deformacím, které redukují délku života, schopnost letu a orientaci včely. Dospělé včely vznikající z buněk napadených roztočem jsou lehčí než jejich nenapadené sestry (Calderón *et al.*, 2010). Roztoč oslabuje imunitní systém včely, potlačuje expresi genů souvisejících s imunitou a snižuje tak celkové fitness kolonie. Neléčené kolonie napadené roztočem hynou za 6 měsíců až dva roky od napadení (Le Conte *et al.*, 2010).

2.3.2.2. Syndrom zhroucení včelstev (*Colony collapse disorder (CCD)*)

V průběhu několika posledních let dochází k zatím nevysvětleným úhynům včelstev. Tento jev byl pozorován v USA a byl pojmenován jako syndrom zhroucení včelstev (CCD). Mezi lety 2006-2007 v USA stálo podle včelařů za 25 % kolapsů jejich kolonii právě CCD (Underwood & van Engelsdorp, 2007). Výskyt CCD ale nebyl lokalizován pouze v USA. Dainat *et al.* (2012b) publikovali první případovou studii výskytu CCD v Evropě, konkrétně ve Švýcarsku. Hlavním symptomem CCD je obrovský úhyn včelích dělnic, což vytvoří značný rozdíl mezi množstvím potomstva a dělnic, kterých je málo. V takto zhroucených koloniích zůstává jen málo včel, ale mnoho potravy. Tyto zásoby potravy zůstávají nedotčené včelami zlodějkami nebo škůdci i několik týdnů od kolapsu (Underwood & van Engelsdorp, 2007). Dalším symptomem, který se však projeví s jistým zpožděním je nárůst škůdců v úle a kleptoparazitismus včelami z okolních úlů (van Engelsdorp, *et al.* 2009).

Zvýšené populace roztoče *V. destructor*, mikrosporidie *Nosema* nebo roztoče *Acarapis* mají negativní vliv na včelí kolonie a mohou tedy přispívat k syndromu zhroucení včelstev. Podle Dainat *et al.* (2012b) však kolaps kolonie nemá zničující vliv na roztoče *Varroa* nebo mikrosporidii *Nosema*. I mnoho dalších patogenů, virů, bakterií či hub mohou přispívat k tomuto syndromu (Dainat *et al.*, 2012b). Používání akaricidů pro hubení roztoče *V. destructor* a jiných škůdců, může zanechávat rezidua v úle a není vyloučeno, že je to jedna z příčin CCD. Chronické vystavování včelstev pesticidům může oslabovat jejich imunitní systém a bere jim tak možnost bránit se případné infekci. Když byly kolonie umístěny poblíž slunečnicových polí, které byly ošetřovány imidaclopridem, bylo vylétání za snůškou značně omezeno a dělnice měly problémy s návratem do úlu (Underwood & van Engelsdorp, 2007). Pesticidy tedy mohou způsobovat poruchy ve včelích tancích či v orientaci dělnic. Navíc pesticidy snižují také délku života včel. Kolonie se syndromem zhroucení včelstev mají obecně vyšší množství obsažených virů a jiných původců chorob. To může být dáno buď vyšší expozicí patogenům nebo sníženou obranou včelstev (van Engelsdorp *et al.*, 2009).

Virus IAPV má zřejmě také souvislost s CCD, jelikož je alespoň zčásti zodpovědný za popsané symptomy a mortalitu během CCD. Vyskytuje se nejčastěji na Blízkém východě, Austrálii a USA, ale méně v Evropě. To by mohlo vysvětlovat, proč se IAPV podílí na úbytku včelstev v USA, zatímco v Evropě ne (Genersch, 2010).

Vzhledem k tomu, že africké a afrikanizované včely přežívají bez použití léčby proti roztoči a *V. destructor* se prozatím nenachází v Austrálii, podporuje to podle Neumanna & Carreca (2010) roli roztoče v současných ztrátách kolonií. Obecně ale nelze říct jednu samotnou příčinu, která by stála za celým tímto komplikovaným syndromem (van Engelsdorp *et al.*, 2009).

3. *Varroa destructor*

3.1. Význam *Varroa destructor*

V současné době je největší včelařskou hrozbou roztoč *V. destructor*. Žádný jiný patogen nemá srovnatelný dopad na včelařství a včelařský výzkum v dlouhé historii včelařství. Existuje několik důvodů, proč je vliv roztoče natolik unikátní. Včelaři nemají dlouhodobé zkušenosti s tímto roztočem, vzhledem k tomu, že je *V. destructor* relativně novým parazitem. Roztoč se rozšířil velmi rychle po celém světě a je obtížné najít kolonii, která se s roztočem nesečkala. Jak již bylo zmíněno, mnoho kolonií je napadených viry, se kterými *Varroa* souvisí (DWV, ABPV, CBPV, SPV, BQCV, KBV, SBV, viz kap. 2.3.) a umožňuje jejich horizontální přenos (DWV, SBV, APV, IAPV a KBV) (Le Conte *et al.*, 2010). *V. destructor* je také klíčový ve ztrátách včelstev během zimy. DWV, mikrosporidie *Nosema ceranae*, roztoč *V. destructor* či protein vitellogenin mohou být markery zimních ztrát včelstev (Dainat *et al.*, 2012a). Bez pravidelné léčby by většina kolonií zahynula. Tato léčba je ovšem pro včelařství nákladná a existuje zde riziko chemických reziduí v medu a jiných produktech. Roztoč je rozhodujícím faktorem poklesu počtu včelařů a včelích kolonií v Evropě, spolu s celosvětovým poklesem přírodních opylovačů (Rosenkranz *et al.*, 2010).

Morfotypy *Varroa*:

Roztoči *Varroa* jsou původem z Asie, kde parazitují na včele *A. cerana*. Díky tomu, že má tato včela přirozenou ochranu proti tomuto roztoči, ohrožuje ji tento roztoč velmi málo (Capinera, 2008). Rod *Varroa* reprezentují 4 specifické druhy (Rosenkranz *et al.*, 2010):

- *V. jacobsoni* (Oudemans) byl poprvé popsán jako přirozený roztoč východní včely *A. cerana* na Jávě. Je rozšířen na této včele po celé Asii a na včele *A. nigrocincta* v Indonésii.
- *V. underwoodi* byl poprvé popsán na včele *A. cerana* v Nepálu.
- *V. rindereri* byl popsán na včele *A. koschevnikovi* na Borneu.
- *V. destructor* byl popsán na včele *A. cerana*, což je původní hostitel a také na včele *A. mellifera*, což je nový hostitel.

V. underwoodi je značně menší než *V. destructor*. Tělo roztoče je elipsoidní s dlouhými štětinami na bocích těla. Na včele *A. mellifera* nebyla zaznamenána reprodukce. *V. rindereri* jako parazit *A. koschevnikovi* je větší než *V. jacobsoni* z Indonésie. Množství štětín a pórů na jeho těle je nižší (de Guzman & Rinderer, 1999). Maggi *et al.* (2009) testovali možnost, že existují různé morfotypy roztoče *V. destructor* z různých geografických oblastí Argentiny. Analýza prokázala přítomnost různých morfotypů roztoče *V. destructor*.

Komplex druhů *Varroa* napadající včelu *A. cerana* obsahuje osmnáct haplotypů (Anderson, 2000). Pouze dva haplotypy se staly celosvětovými škůdci včely *A. mellifera*. Oba tyto haplotypy patří roztoči *V. destructor* (Anderson, 2000). U druhu *V. destructor* bylo popsáno celkem 7 haplotypů. Z těchto 7 haplotypů jsou významné právě ony dva haplotypy: korejský a japonsko/thajský haplotyp. Oba haplotypy se dnes v USA vyskytují sympatricky (Anderson, 2000). Roztoč korejského haplotypu tak byl pojmenován, protože parazituje na včele *A. cerana* v Jižní Koreji. Parazituje celosvětově na včele *A. mellifera* a je významně větší a reprodukčně izolovaný od haplotypů druhu *V. jacobsoni*. Zatímco korejský haplotyp je rozšířen celosvětově, japonsko/thajský haplotyp (pojmenován opět podle místa nálezu) je popsán na koloniích včely *A. mellifera* v Japonsku, Thajsku a Severní a Jižní Americe (Rosenkranz *et al.*, 2010).

Přesun roztoče *V. destructor* ze včely *A. cerana* na *A. mellifera* je nejasný. Pravděpodobně proběhl přesun, když byly kolonie včely *A. mellifera* transportovány do východního Ruska nebo na Dálný východ v první polovině minulého století, což umožnilo roztoči napadnout nového hostitele. Roztoč *V. destructor* byl postupně nalezen na východním

pobřeží bývalého SSSR (1952), v Pákistánu (1955), Japonsku (1958), Číně (1959), Bulharsku (1967), Jižní Americe (Paraguay-1971), Německu (1977) a USA (1987). Dnes je *V. destructor* téměř kosmopolitní. Nebyl zatím nalezen v Austrálii (Rosenkranz *et al.*, 2010).

3.2. Taxonomické zařazení *Varroa*

V. destructor z podtřídy roztočů (*Acari*) má český název kleštík zhoubný a patří do čeledi kleštíkovití (*Varroidae*) (viz klasifikace podle Kůrky, 2005). Původně se předpokládalo, že druh *V. jacobsoni* (kleštík včelí) napadá včely *A. mellifera*. Později bylo zjištěno, že *V. jacobsoni* je komplexem dvou druhů. Zatímco roztoč *V. jacobsoni* napadá včelu *A. cerana* v oblasti Malajsie a Indonésie, nové jméno *V. destructor* bylo dáno roztoči, který napadá včelu *A. cerana* na pevninské části Asie. Roztoč *V. jacobsoni* ztratil schopnost reprodukce na včele *A. mellifera* a jeho sekvence genu mitochondriální DNA cytochrom oxidázy I se liší o 6,7 % od roztoče *V. destructor*, který se rozmnožuje na této včele v Evropě. (Anderson & Trueman, 2000).

Klasifikace podle Kůrky (2005):

Třída: pavoukovci (*Arachnida*)

Podtřída: roztoči (*Acari*)

Řád: čmelíkovci (*Mesostigmata*)

Čeleď: kleštíkovití (*Varroidae*)

kleštík zhoubný - *Varroa destructor* (Anderson & Trueman, 2000)

3.3. Biologie *Varroa*

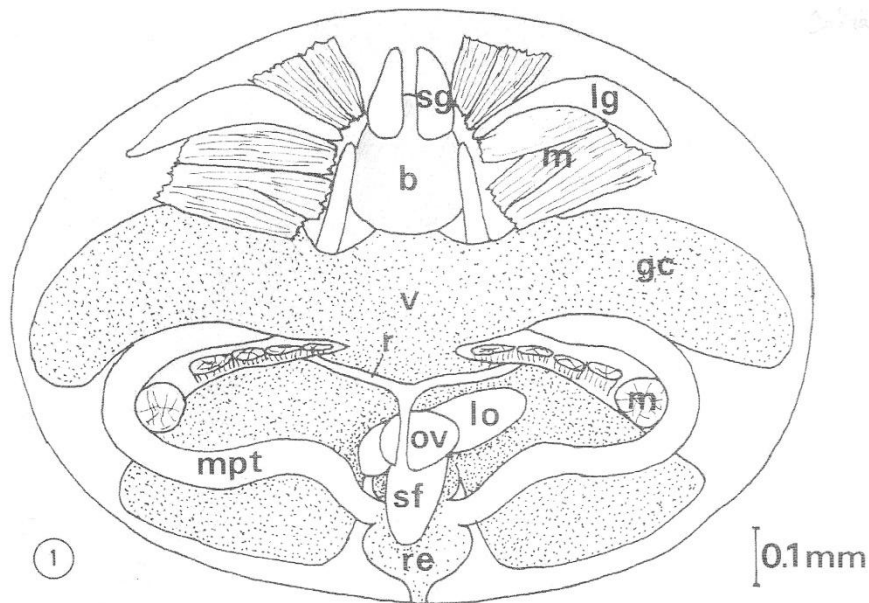
3.3.1. Morfologie

U roztoče *V. destructor* je patrný značný sexuální dimorfismus s mnoha morfologickými adaptacemi na hostitele. Dospělé samice roztoče *V. destructor* jsou významně větší a tvarově méně kulaté než samice druhu *V. jacobsoni* (Anderson & Trueman,

2000). Oba tyto druhy jsou od sebe také reprodukčně izolovány. Samice druhu *V. jacobsoni*, které napadají včely druhu *A. cerana* jsou menší než ty, které napadají včely druhu *A. mellifera* (Anderson & Trueman, 2000). Charakteristika, která je stejná pro obě pohlaví, je rozdělení těla na dvě části: gnathosoma a idiosoma. Idiosoma zahrnuje větší část a jeden hřbetní štít a různé břišní štíty. Samičí idiosoma je širší než delší, zploštělá a elipsoidní. Končetiny samice jsou krátké a silné a existují na nich struktury, díky nimž lépe přilnou k hostiteli. Hřbetní a břišní štíty jsou sklerotizované s červeno-hnědou barvou. Flexibilní membrány mezi štíty dovolují roztoči se roztáhnout při krmení nebo tvorbě vajec. Samec je pouze málo sklerotizován, což většinou přítomno na končetinách a hřbetním štítu. Samci jsou menší než samice ve všech vývojových stádiích. Vzhledem k tělu jsou nohy samce delší než nohy samice. Gnathosoma formuje ústní část skládající se z makadel (pedipalp) a dvou klepítek (chelicerae). Poslední článek klepítek je u samic pohyblivý a nese dva malé zuby. U samců je tento článek přeměněn ve spermatodactyl, který slouží k přenosu spermií do samice (Rosenkranz *et al.*, 2010).

Pár slinných žláz obsahuje buňky o velikosti 12 μ m. Svalstvo je převážně dorzoventrální. Nervový systém je tvořen gangliem, koncentrovaným kolem oesophagu. Ganglium je dlouhé 0,13 μ m a široké 0,12 μ m. Buňky kůry (cortex) jsou velké asi 4 μ m (Ruijter & Kaas, 1983).

Schéma č.2: Vnitřní anatomie roztoče *V. jacobsoni* (Ruijter & Kaas, 1983):



Legenda: b - mozek, gc – caeca, lg - laterální žlázy, lo – lyriformní orgány, mpt - malphigická trubice, m - svaly, ov - vaječníky, r – ramus, re – rectum, sf - sacculus foeminus, sg – slinné žlázy, v – ventriculus.

Trávicí trakt obsahuje také 3 páry caeca, jejichž buňky měří 20 μ m. Buňky střeva a recta měří 14 μ m. Exkreční systém je tvořen párem malphigických trubic, jejichž buňky měří 21 μ m).

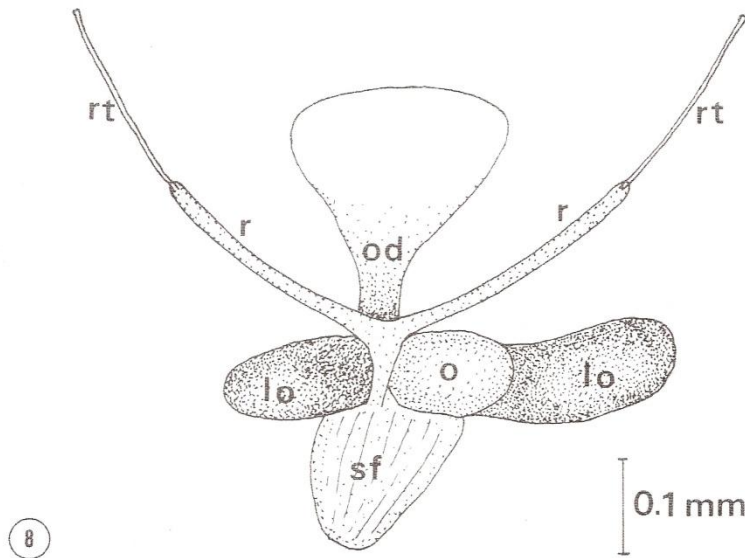
Trávicí trakt roztoče druhu *Varroa* se skládá podle Ruijter & Kaas (1983) (viz schéma č.2):

1. Gnathosoma
2. Pharynx
3. Oesophagus (prochází mozkem)
4. Ventriculus (caeca)
5. Intestine
6. Rectum
7. Anus

Samičí pohlavní orgán tvoří vaječníky (ovaria), dělohou, pochvou, sacculus foeminus, oviduct, ramus, prstencové tubuly (ringed tubules) a lyriformní orgány (lyrate/lyriform organ) (viz schéma č.3). Buňky vaječnicků jsou velké 10 μ m (Ruijter & Kaas, 1983). Jakmile se

uvnitř vaječnicků vyvine oocyt, mají lyriformní orgány výživovou funkci. Genitální otvor je umístěn mezi druhým párem končetin (Rosenkranz *et al.*, 2010).

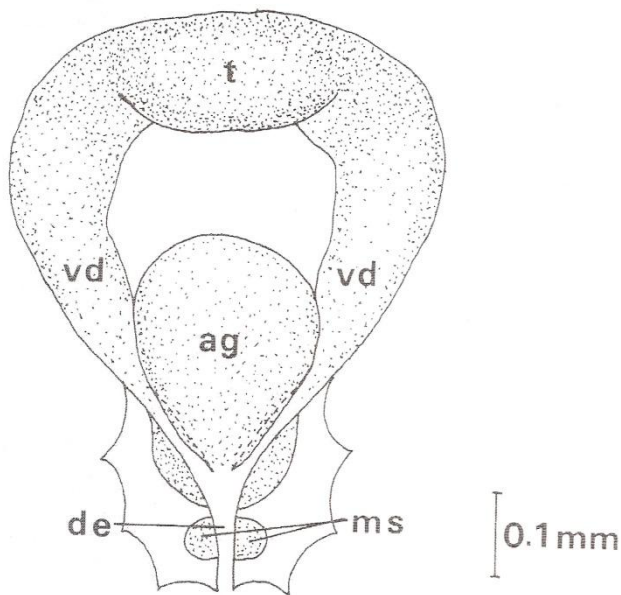
Schéma č.3: Samičí pohlavní orgán (Ruijter & Kaas, 1983):



Legenda: lo – lyriformní orgány, m - svaly, mpt - malphigická trubice, o - vaječníky, od – oviduct, r – ramus, rt – prstencové tubuly, sf - sacculus foeminus.

Samčí pohlavní orgán je tvořen varlaty umístěnými v zadní části těla, z kterých vychází dva kanály – vasa deferentia a vedou do ductus ejaculatorius (viz schéma č.4). Samčí varlata mají v průměru 60 μm (Ruijter & Kaas, 1983). Spermie prochází osmi stádii zrání. Šest uvnitř těla samce a dvě po rozmnožení v oplodněné samici (Rosenkranz *et al.*, 2010).

Schéma č.4: Samčí pohlavní orgán (Ruijter & Kaas, 1983):



Legenda: ag - přídatné žlázy, de – ductus ejaculatorius, ms – samčí pohlavní žlázy, sc – spermatocty, t – varlata, vd – vasa deferentia.

Celé tělo, včetně nohou a ústní části, je pokryto různými typy chlupů. Některé mají mechanoreceptivní a chemoreceptivní funkci. Přední nohy jsou výjimečně používány pro pohyb. Mnohem častěji jsou zvednuty ve vzduchu a mají podobnou funkci jako tykadlo u hmyzu. Na článku přední nohy je jamkový orgán, který se skládá z 9 vnitřních sensil s 9 delšími sensilami obklopujícími orgán, který je podobný Hallerově orgánu u klíšťat. Sensily obklopující jámu patří do dvou skupin. První skupina jsou chemoreceptory poukazující na chuťovou funkci. Druhá skupina obsahuje struktury podobné sensile, které u členovců mají chemoreceptivní funkci s možnou přídatnou termoreceptivní funkcí. Menší chloupky na noze mohou mít čichovou funkci (Rosenkranz *et al.*, 2010).

Kromě období rojení a při disperzi roztoče, tráví *Varroa* většinu času uvnitř tmavého hnízda. I přesto je roztoč schopen vnímat světlo a také vibrace. Neexistují ovšem žádné informace, že by tyto smysly používal k orientaci a k nalezení hostitele. Roztoč *Varroa* preferuje teplotu mezi 26 a 33 °C. Tato teplota je významně nižší, než je průměrná teplota v úlu. Ta se pohybuje mezi 34,5 a 35 °C. Je možné, že právě kvůli tomuto rozdílu teplot *Varroa* napadá buňky potomstva, které se nacházejí na okrajích úlu (Rosenkranz *et al.*, 2010).

Chemická orientace roztoče hraje mnohem významnější roli. V obou fázích životního cyklu se roztoč nachází na jiném stádiu včely. Proto je potřeba, aby se orientoval chemicky a našel příslušné stádium včely. Dospělá včela, která přenáší roztoče do buněk potomstva a pátý instar larvy, krátce před zavíčováním. Roztoč je zřejmě schopen také rozpoznat věk a funkci včely. Včely kojičky středního věku jsou nejvíce napadanou skupinou v kolonii. Tato skutečnost může být adaptivní strategií roztoče a může zvyšovat jeho reprodukční úspěch. Roztoč rozlišuje také mezi trubčím a dělničím plodem. Trubčí plod je napadán 8 až 10krát více než plod dělničí. Dělničí plod je napadán 15 až 20 hodin před zavíčováním, zatímco trubčí až 50 hodin. Nejen to, ale také tendence včely ošetřovat častěji trubčí plod může vést k vyšší míře napadení právě tohoto plodu. Bylo zjištěno mnoha biotesty, že *Varroa* přitahuje několik frakcí z extraktu kutikuly larvy. Mezi tyto látky patří například kairomony, které trubčí potomstvo produkuje ve vyšší míře, což opět vysvětluje jeho vyšší míru napadení. Nejen extrakt z larvy, ale také látky ze zámotku či krmné kašičky jsou pro *Varroa* atraktivní. Naopak larva královny přitahuje *Varroa* méně a mateří kašička má dokonce repelentní účinek. To by mělo vysvětlovat nižší míru napadení matečnicků (Rosenkranz *et al.*, 2010).

Existuje mnoho nechemickým faktorů, které ovlivňují míru napadení roztočem. Období po zavíčování včely trvá u evropských včel asi 12 dní a u afrikanizovaných včel o něco méně (Calderón *et al.*, 2010). Afrikanizované včely mají díky tomu nižší míru napadení, protože roztoč nemá tolik času na vývoj (Calderón *et al.*, 2010). U těchto včel byl také objeven v larválním stádiu dodatečný pohyb. Protože larva tlačí roztoče proti stěně buňky, mohlo by toto chování být obranným mechanismem včely. Tento jev nebyl pozorován u nenapadených buněk (Calderón *et al.*, 2009). Velký vliv má stáří, výška a velikost buněk potomstva. Uměle protáhlé buňky jsou napadány méně než běžné, kratší buňky. Tvar buňky zřejmě přispívá k preferenci roztoče pro trubčí potomstvo. Typ buňky také hraje roli. Až 74 % roztočů, kteří se nereprodukovali v buňkách dělnic, se po přenesení do trubčích buněk reprodukovalo (Calderón *et al.*, 2010). Také velikost buněk a relativní velikost larvy k buňce hraje roli. Buňky potomstva evropských včel jsou napadány více než menší buňky afrikanizovaných včel stejné kolonie. Starší buňky obsahující zámotky z předchozích cyklů, jsou více napadány než nově postavené buňky (Rosenkranz *et al.*, 2010).

3.3.2. Životní cyklus

V laboratorních podmínkách může roztoč vykonat až 7 reprodukčních cyklů. V přírodě jsou to ovšem 2 až 3 reprodukční cykly. U včely *A. cerana* probíhá reprodukce pouze u trubčího plodu, zatímco u včely *A. mellifera* i u plodu dělnic. Určité procento samic roztoče ovšem nenaklade vajíčka. Toto procento je variabilní a záleží například na druhu či poddruhu hostitele nebo klimatických podmínkách. U evropských včel je 5 až 20 % roztočů neplodných. Není znám důvod neplodnosti samic. Stejně tak v 11-21 % buněk potomstva chybí samec. Produkce dcer závisí na přítomnosti samce. Mortalita potomstva je hlavním faktorem rozdílů v míře reprodukce (Rosenkranz *et al.*, 2010).

Hlavní obětí parazitování roztoče *Varroa* je stádium kukly. *Varroa* napadá častěji trubčí populace, a to během jejich fáze kukly a snižuje tak jejich očekávanou délku života a schopnost letu. Díky tomu má napadení roztočem *Varroa* negativní efekt na fitness samců v kolonii. Míra napadení roztočem negativně koreluje s velikostí kolonie, s počtem dospělých trubců, s úspěchem páření samce a počtem potomků na páření (Büchler *et al.*, 2010).

Když je kolonie málo napadená, roztoči nenapadají matečnický. Při větším zamoření kolonie, která neobsahuje potomstvo dělnic a trubců, napadají roztoči i matečnický. Pro roztoče není žádná evoluční výhoda rozmnožovat se v matečnicích, jelikož v nich mají méně dní pro vývoj než v trubčím plodu (Harizanis, 1991).

Reprodukční úspěch samice je definován jako množství dospělých, životaschopných a reprodukcí se dcer vyprodukovaných během reprodukčního cyklu uvnitř včelí buňky. Reprodukční úspěch závisí na množství samičího potomstva, které je schopno se úspěšně rozmnožit před líhnutím plodu. Proto je pro vývoj roztoče limitujícím faktorem délka vývoje potomstva. To vytváří selekční tlak na reprodukci roztoče, zejména na zrychlení oogeneze (Rosenkranz *et al.*, 2010).

3.3.3. Reprodukce

V. destructor je pseudo-haplo-diploidní parazitní roztoč, jehož reprodukce probíhá hlavně mezi sourozenci, což umožňuje rychlou fixaci nových mutací (Le Conte *et al.*, 2010). Existují dvě odlišné fáze životního cyklu roztoče. Foretická fáze na dospělých včelách a reprodukční fáze uvnitř zavíčkovaného plodu dělnic a trubců. Dospělé včely přenášejí samice roztoče do buněk potomstva nebo je rozšiřují v průběhu shánění potravy a rojení. *Varroa* se na dospělé včele schovává pod sternity a vysává nezanedbatelnou část její hemolymfy (Rosenkranz *et al.*, 2010).

Samice roztoče se dostane do buňky s larvou ve stádiu pátého instaru. Uvnitř buňky se přesune na její dno a v tomto místě je ucpána krmnou kašičkou. Asi za pět hodin po zavíčkování, larva spotřebuje všechnu potravu a roztoč začíná sát její hemolymfu. Pár hodin poté začíná oogeneze a následuje vitelogeneze. Asi 70 hodin po zavíčkování roztoč klade první vajíčko. První vajíčko je běžně neoplozené a vyvíjí se z něj haploidní samec. Samičí vajíčka jsou oplozena a nakladena v 30-ti hodinových intervalech. Vajíčka jsou kladena po jednom, většinou na stěnu buňky (Calderón *et al.*, 2010). Za normální je považováno až 5 vajíček v potomstvu dělnic a až 6 vajíček v trubčím potomstvu. Během prvních hodin po naklazení se ve vajíčku tvoří larva. Od naklazení po dospělce prochází roztoč stádiem protonymfy a deutonymfy. Samicím trvá vývoj průměrně 5,8 dní, zatímco samecům 6,6 dní. Obě nymfální stádia jsou rozděleny na mobilní a imobilní fázi těsně před svlečením. Roztoč prochází v průběhu života následujícími instary: vajíčko-larva, mobilní protonymfa, imobilní protonymfa, mobilní deutonymfa, imobilní deutonymfa a dospělec (Calderón *et al.*, 2010). Imobilní fáze se nazývají protochrysalis a deutochrysalis. Ve fázi nazývané deutochrysalis již roztoč má finální tvar těla. V této fázi zbarvení u samice začíná po krajích a po svlečení se mění v hnědou. Oproti tomu samec roztoče má i po svlečení světle žlutou barvu (Rosenkranz *et al.*, 2010).

Matka vytvoří díru v kutikule kukly, aby se nymfy nakrmily. Tato jediná díra se nachází většinou na pátém článku kukly (Rosenkranz *et al.*, 2010). Měkké chelicery nymfy by nebyly schopny prokousnout kutikulu kukly. Po nakrmení se roztoči přesunou na místo, kde jsou akumulovány jejich výkaly (Rosenkranz *et al.*, 2010). Aby se minimalizovala vzdálenost, kterou roztoč ujde je místo pro krmení poblíž místa na výkaly (Calderón *et al.*, 2009). Místo

na krmení se u stádia kukly nachází nejčastěji na druhém břišním segmentu (Calderón *et al.*, 2009).

Po posledním svlečení jsou roztoči sexuálně vyspělí. Samci dospívají dříve než samice a čekají asi 20 hodin, než ony dospějí. Jelikož samci nepřežijí mimo včelí buňku, probíhá reprodukce uvnitř buňky (Calderón *et al.*, 2010). Rozmnožování pak probíhá mezi sourozenci (Calderón *et al.*, 2010). Před kopulací si samec očistí chelicery. Poté přenese spermatofor do gonoporu samice. Vícenásobné páření je běžné, dokud není dospělá další samice. Ty, se mohou rozmnožovat pouze hned po posledním svlečení (Calderón *et al.*, 2010). Samci jsou přitahováni díky sexuálními feromonům samice. Mladé samice jsou pro samce více atraktivní než starší samice díky těmto těkavým feromonům (Rosenkranz *et al.*, 2010).

Jakmile včela opouští buňku, zanechává v úlu zbylé vajíčka, samce, protonymfy a deutonymfy. Pouze původní matka s nově dospělými samicemi opouští buňku spolu s ní. Zbylí roztoči v buňce umírají nebo jsou odstraněni včelami kojičkami. Samice zůstávají na včele po různě dlouhou dobu (dny až týdny) (Calderón *et al.*, 2010).

Během foretické fáze roztoč obsahuje oocyt, který se později vyvine ve vajíčko a je tak připraven na reprodukci. Jakmile se dostane do včelí buňky, dochází k aktivaci oogeneze díky těkavým látkám hostitelské larvy. V laboratorních podmínkách se *Varroa* přesouvala z jedné včelí buňky do druhé bez foretické fáze. V nepříznivých podmínkách může mít foretická fáze dokonce negativní vliv na reprodukci roztoče. Při dlouhé foretické fázi bylo množství neplodných roztočů 2 až 3 krát vyšší než u kontrolních roztočů. Důležitost této fáze proto není přesně známa (Rosenkranz *et al.*, 2010).

3.3.4. Populační dynamika

Populační dynamika roztoče se liší region od regionu. V mírných podmínkách hynou neošetřované kolonie za 3 až 4 roky od prvního napadení. Jsou však významné rozdíly mezi populacemi v mírném a tropickém či subtropickém klimatu s jasným sklonem k nižšímu populačnímu růstu roztoče v tropických podmínkách. Tento nižší populační růst je zvláštní, vzhledem k tomu, že v těchto podmínkách je potomstvo přítomno během celého roku a reprodukce roztoče proto není přerušena, jako je tomu v zimě v mírném klimatu. V tropických

oblastech je období odchovu dělnic a reprodukce roztoče během celého roku a proto můžeme předpokládat, že zde bude mít napadení roztoče větší dopad na včelstva (Calderón *et al.*, 2010). V mírném klimatu se poškození na koloniální úrovni objevuje hlavně na podzim a v zimě, když populace hostitele klesá, zatímco populace roztoče roste (Rosenkranz *et al.*, 2010).

Od prvního napadení včely roztočem, jsou do několika let roztoči schopni vytvořit obrovskou populaci. Vlastnosti roztoče, které ovlivňují populační růst, jsou reprodukční kapacita v průběhu života roztoče a délka života. Vlastnosti hostitele, které ovlivňují populační růst, jsou dostupnost potomstva, přítomnost trubčího potomstva, rojení a úroveň obranného chování (Rosenkranz *et al.*, 2010).

Čím delší období výchovy potomstva tím dramatičtěji roste populace roztoče. Větší množství buněk trubčího plodu vede také k vyššímu populačnímu růstu roztoče (Calis *et al.*, 1999) Také typ roztoče ovlivňuje míru tolerance včelí populace. Korejský haplotyp převládá v nevyvážených včelstvech, jako například v Evropě. Místo toho japonský haplotyp převládá ve stabilních včelstvech, které můžeme najít v Brazílii (Calderón *et al.*, 2010).

Faktory jako počasí, delší doba odchovu potomstva a větší množství trubčího plodu může rapidně zvýšit množství roztočů v úlech. Globální oteplování způsobuje delší období jara a podzimu. V těchto obdobích naroste počet trubčího plodu a na konci roku lze pozorovat větší populaci roztoče v úlu (Le Conte, *et al.* 2010).

Problémem je, že existuje významný rozdíl mezi divokými včelami a včelami chovanými v úlech. V oblastech s vysokou hustotou včelích kolonií, je populační dynamika ovlivněna permanentní výměnou roztočů, když létavky nebo trubci navštíví okolní kolonie nebo při loupení. Při tomto opětovném napadení některé kolonie roztoče ztratí a některé je získají. Včely zlodějky tak získají roztoče z kolonií, které jsou často již oslabeny přítomností roztoče (Rosenkranz *et al.*, 2010).

3.4. Současné možnosti detekce a kontroly varroázy

3.4.1. Detekce

Roztoč *V. destructor* může být detekován různými způsoby. Jedním z nich je pozorování plodu. Dalším způsobem je technika „ether roll“. Kdy se do sklenice vloží 100-200 včel a startovací roztok. Poté se se sklenicí třese a válí. Roztoči zůstanou na sklenici a mohou se snadno spočítat. Poslední a nejvíce efektivní metodou jsou lepkavé destičky. Ty se vloží na dno úlu, který se vykouří dýmkovým tabákem. Úl je po dobu dvaceti minut uzavřen a poté se destička vyjma a spočítá se množství roztočů, kteří na ní ulpěli. Alternativně se může destička pouze ponechat 1-3 dny v úlu (Sammataro *et al.*, 2000).

3.4.2. Kontrola

3.4.2.1. Chemická kontrola

V současné době je nejrozšířenějším způsobem boje s roztočem *V. destructor* právě chemická kontrola. Dnes již běžně se používá velké spektrum akaricidů. Mezi další látky, které se dnes používají, patří organické kyseliny. Jiným přístupem je používání esenciálních olejů. Tyto látky jsou schopny bojovat s roztočem stejně jako s mnoha nemocemi včel. I přesto, že se zdá tato metoda přírodní, jsou esenciální oleje komplexem látek, který může mít vedlejší účinek na včely a může kontaminovat med (Sammataro *et al.*, 2000).

Pro zefektivnění léčby varroázy se doporučuje střídat chemoterapii s nechemickými metodami, stejně jako používat různé typy akaricidů v různou dobu roku (Milani, 1999). Podle Dietemann *et al.* (2011) však v současné době neexistuje přípravek, který by narušil orientaci roztoče. K tomu nepomohl ani výzkum na feromonech a hormonech *Varroa*, které by měly narušit jak orientaci, tak fyziologii roztoče (Dietemann *et al.*, 2011).

Akaricidy

Akaricidy můžeme rozdělit na ve vodě rozpustné, v tucích rozpustné stabilní a těkavé nebo nestabilní. Ve vodě rozpustné akaricidy ovlivňují kvalitu medu vzhledem k tomu, že se v něm lehce rozpustí. Postupem času se jejich množství ve skladované stravě snižuje a nemají negativní dlouhodobý efekt na kvalitu včelího vosku a medu. Současné používané akaricidy mohou také zvýšit svou toxicitu v kombinaci s pesticidy, které včela sbírá v pylu a donáší do úlu (Le Conte *et al.*, 2010). Van Dooremalen *et al.* (2012) testovali, jak ovlivňuje použití akaricidů přežívání kolonií a délku života včel. U kolonií ošetřovaných dříve v průběhu sezóny, byla míra napadení během vývoje zimních včel nižší. To vedlo k delší životnosti včel a většímu přežívání kolonií. Podle výzkumu genomu včela má včela *A. mellifera* ve srovnání s jinými rody (*Anopheles*, *Drosophila*) o 30-50 % méně genů kódujících karboxylesterázu, cytochrom P450 a enzymy glutathion S-transferázy, které jsou důležité pro metabolismus pesticidů. Malé množství detoxifikačních genů pravděpodobně způsobuje vyšší citlivost včely k určitým pesticidům (Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006). Používání akaricidů v koloniích zanechává rezidua v mnoha včelích produktech. Tyto produkty jsou běžně používány. Med jako jídlo, včelí vosk v kosmetickém průmyslu či propolis v lékařství (Wallner, 1999).

Mezi běžně detekované akaricidy ve včelím medu a vosku patří bromopropylate, coumaphos a τ -fluvalinát. Tyto chemikálie jsou rozpustné v tucích a netěkavé a proto se akumulují jako rezidua ve včelím vosku ještě roky po použití. Pomocí difúze migrují tyto látky z vosku do medu. Také včely je roznášejí po úlu pomocí svých těl a nohou. Coumaphos byl nalezen v německém medu ve 28 %, bromopropylate v 11% a τ -fluvalinát v 1 %. Těkavé akaricidy rozpustné v tucích mohou snížit svou koncentraci ve vosku, jelikož obsahují polotěkavé látky jako například esenciální oleje. Během aplikace se pouze část dostane do vosku, většina látek vyprchá díky teplotě v úlu. Nedochozí proto k akumulaci reziduí. Nestabilní, v tucích rozpustný akaricid Amitraz, je téměř kompletně degradován v medu po 3-4 týdnech. Vysokou afinitu k akaricidům rozpustným v tucích má také propolis (Wallner, 1999).

Postupem času se tedy přechází na akaricidy rozpustné ve vodě, hlavně organické kyseliny, které nezanechávají rezidua ve vosku. Mělo by být minimalizováno používání akaricidů rozpustných v tucích a raději se zaměřit na akaricidy rozpustné ve vodě a esenciální oleje. Nedoporučuje se ani recyklace starých pláství, které mohou obsahovat rezidua pro

výrobu nových mezistěn. Pro tento případ by se měl používat panenský vosk či vosková víčka (Wallner, 1999).

Organické kyseliny a éterické oleje jsou často nazývány mírnými akaricidy a mají řadu výhod a nevýhod. Jak již bylo zmíněno, velkou výhodou je nízká akumulace ve včelích produktech. Kyselina mravenčí je také jediným akaricidem, který je schopen zabít roztoče uvnitř zavíčkovaného plodu. Nevýhodou použití kyseliny mléčné a šťavelové je, že je lze použít pouze u kolonie ve stavu bez plodu (Rosenkranz *et al.*, 2010).

Problémem pro současné včelařství je rezistence roztoče vůči používaným akaricidům. Jsou známy případy sníženého účinku nebo úplné nefunkčnosti některých akaricidů (amitraz, bromopropylate, chlordimeform, coumaphos, τ -fluvalinát). Rezistence na τ -fluvalinát způsobovala hlavně v Itálii a později i v jiných zemích velké škody ve včelařství (Milani, 1999). Používání akaricidů může ovlivňovat také expresi některých genů včely (Gregorc *et al.*, 2012).

3.4.2.2. Biologická kontrola

Mimo chemické metody lze v boji s roztočem použít také biologickou kontrolu. Včelaři se dnes snaží bojovat s roztočem například použitím tabákového kouře, nebo kouře z jiných rostlin, které způsobují úhyn roztoče. Protože roztoč preferuje trubčí plod, další z možností je použít trubčí plod jako past. Trubčí plod tak může být spolu s roztoči vyříznut z rámečku. Selektivní odchov včel tolerantních k roztoči *V. destructor* je možnost, by mohla být další možnost k dlouhodobému řešení varoázy (Rosenkranz *et al.*, 2010). Přírodním nepřítelem roztoče v přírodě je houba rodu *Beauveria*, o které je to v současné době jen málo známo, a proto chybí efektivní přípravek či aplikační metoda (Dietemann *et al.*, 2011). Nejen včelaři, ale i včely samy mají obranné mechanismy, jako je hygienické chování a grooming, které by měly zabránit roztoči v šíření (Sammataro *et al.*, 2000).

Napadení roztočem *Varroa* způsobuje změny v expresi genů zodpovědných za embryonální vývoj, metabolismus či imunitu. U včel tolerantních k roztoči dochází ke změnám v expresi genů zodpovědných za vývoj nervů či čichu. Změnu v čichu včely mohou být zodpovědné za toleranci včely k roztoči a mohou zvyšovat hygienické chování či grooming (Navajas *et al.*, 2008).

Hygienické chování a grooming

Včely vyvinuly mnoho obranných mechanismů jak se ochránit proti patogenům a parazitům, kteří je napadají. Jednou z možností je změna chitinové kutikuly, která slouží jako bariéra mezi vnitřním a vnějším prostředím. Obrana na buněčné a hormonální úrovni pak může ochránit včelu před infekcemi. Další z možností je hygienické chování a grooming. Právě hygienické chování je hlavním mechanismem boje včely proti zvápenatění plodu a moru plodu. Hygienické chování může velmi ovlivňovat populační růst roztoče, protože při odstraňování napadené kukly jsou zabiti dospělí roztoči (Spivak, 1996). Grooming umožňuje včelám ze sebe odstranit prach, pyl, parazity a naopak po sobě rozptýlit feromony (Boecking & Spivak, 1999).

Hygienické chování závisí na environmentálních podmínkách. Například v době nedostatku nektaru, nebo když je kolonie oslabena, neprojevuje takovou odpověď na napadení roztočem. Je znám případ včelstev, které byly odchovány pro své hygienické chování. Tyto včely obsahovaly po roce bez léčby méně roztočů než komerčně chované včely bez selekce na hygienické chování (Boecking & Spivak, 1999).

Odstraňování napadených larev a kukel je také součástí hygienického chování. Včely detekují napadenou buňku, odvíčkují ji a odstraní napadenou kuklu z buňky. Odstranění napadené kukly přerušuje reprodukci roztoče uvnitř zavíčkovaného plodu a snižuje tak průměrné množství potomstva na roztočí matku. U kolonií, kde byla prokázána vysoká míra odstraňování napadeného potomstva, nebyl nutně dobře rozvinut grooming (Boecking & Spivak, 1999). Není známo, jak včely rozpoznávají napadenou larvu či kuklu (Spivak, 1996).

Při groomingu dospělá včela detekuje a odstraní nesoucího se roztoče ze sebe (auto-grooming) nebo z ostatních včel (allo-grooming). Při tomto procesu nejčastěji dochází k odtržení končetin roztoče nebo porušení kutikuly kusadly včely. Grooming, stejně jako hygienické chování, je znám jak u včely *A. cerana* tak u *A. mellifera*, ovšem v menší míře (Spivak, 1996).

Stejně jako u včely *A. cerana* i u *A. mellifera* si roztoč vybírá speciální místo na těle včely. Nejčastěji je to mezi třetím a čtvrtým tergitem na zadečku. Lze pozorovat také častější umístění na levé straně těla hostitele. Stejně jako hygienické chování závisí na

environmentálních podmínkách, je tomu i u groomingu. Například v březnu bylo pozorováno méně mrtvých roztočů než v červnu, kdy byl grooming vyšší (Boecking & Spivak, 1999).

Obranné mechanismy včel může být jedna z věcí, na kterou je potřeba se zaměřit v chovných programech včel zaměřených na boj s roztočem. Vzhledem k tomu, že používání chemikálií má své úskalí, selektivní odchov včel odolných proti roztoči může být řešením (Boecking & Spivak, 1999).

3.4.3. Rezistence a šlechtění

V současné době není žádný způsob léčby kolonie proti roztoči *V. destructor*, který by byl stoprocentně účinný. Jedinci, kteří nejsou citliví k používaným sloučeninám, tak zůstávají v úle a produkují nové potomstvo. Po čase může být takový typ populace značně rezistentní (Le Conte *et al.*, 2010).

Šlechtění na rezistenci včel proti roztoči *V. destructor* je pro včelařství zajímavou možností jak snížit množství chemikálií v koloniích. Jsou známy populace, které byly v přírodě rezistentní proti *Varroa*. Tyto populace jsou převážně jen v Jižní Americe a severní Africe. Tolerance evropských včel byla popsána v Uruguayi či Brazílii. Jsou státy, kde včely přežívají bez programů na kontrolu roztoče. Nicméně data v Brazílii naznačují, že populace roztoče v Brazílii je méně virulentní než ve zbytku světa (Harbo & Harris, 1999). Mnoho studií popisuje také toleranci afrikanizovaných včel k roztoči v severní Argentině a od Brazílie po Mexiko. Později bylo objeveno také pár divokých kolonií včel v USA. V Evropě první populace včel odolných proti roztoči objevena v roce 1994 ve Francii (Büchler *et al.*, 2010). Byla evidována také rezistence včel ve východním Rusku (Le Conte *et al.*, 2007).

Le Conte *et al.* (2007) dokumentovali schopnost včel přežít napadení roztočem *V. destructor*. Porovnávali úmrtnost včel, které přežily napadení *Varroa* s včelami léčenými akaricidy. Včely, které přežily napadení ani později nepodlehly napadení roztočem a některé kolonie přežily i více než 11 let bez léčby. Produkce medu byla významně vyšší u léčených včel než u neléčených.

V jiné studii (Fries & Bommarco, 2007) byl porovnáván populační růst roztoče v kolonii včel *A. mellifera*, které přežily napadení roztočem (VSB) po dobu sedmi let bez léčby s kontrolními koloniemi. Celkový populační růst roztoče byl o 82 % nižší u kolonií bez léčení než u kontrolních kolonií. Také Büchler *et al.* (2010) popisuje, že počet roztočů

sesbíraných ve VSB koloniích u včel ve Francii byl třikrát nižší než v kontrolních koloniích. Snížený populační růst roztoče může být částečně vysvětlen sníženou produkcí plodu dělnic a trubců u VSB kolonií. Redukovaná produkce potomstva pak může být interpretována jako adaptace na tlak roztoče (Fries & Bommarco, 2007). Podle Büchler *et al.* (2010) může za nižší počet roztočů u VSB kolonií fyziologická rezistence včel proti roztoči. Bylo také prokázáno, že VSB kolonie mají lepší schopnost detekce roztoče než kontrolní kolonie. VSB kolonie mohou lépe bojovat s roztoči také díky groomingu jako včely *A. cerana* a nebo pomocí odstraňování napadených kukel (Büchler *et al.*, 2010),

V programech zaměřených na šlechtění včel je dnes rezistence vůči *Varroa* hlavním kritériem. Většina programů je dnes zaměřena hlavně na ochranu a zlepšení vlastností lokálních populací. Vysoká míra přežívání v některých lokálních populacích a významná variabilita v úrovni napadení prokazuje přítomnost *Varroa* rezistentních populací. Preference kratší doby odchovu potomstva, dočasné pauzy v odchovu a kompletní odstranění potomstva jednou za sezónu mohou být pro včelaře nástroje pro snížení populačního růstu roztoče a tím i použití akaricidů (Büchler *et al.*, 2010).

4. Experimentální část

4.1. Materiál

4.1.1. Charakteristika testovaných vzorků

K výzkumu v diplomové práci byly použity vzorky roztoče *V. destructor*, které pocházely z Výzkumného včelařského ústavu v Dole (VÚVč). Roztoči byli nasbíráni pracovníky ústavu z napadených včelstev. Dále byly používány larvy a kukly druhu *A. mellifera mellifera* (Linnaeus, 1758), které byly dodány taktéž VÚVč v Dole. Larvy byly ve stádiu krmeném mateří kašičkou a pylem, kdy se jejich hmotnost pohybovala kolem 100mg. Stádium kukly bylo těsně po zavíčkování. Včely byly vyjmuty z plástu pomocí entomologické pinzety a dále použity pro proteomickou analýzu.

Vzorky *Varroa* byly použity pro parafínovou histologii a proteomickou analýzu. Pro parafínovou histologii byli ještě živí roztoči umístěni do Bouinovy fixační tekutiny (kyselina pikrová, formaldehyd a kyselina octová ledová v poměru 15:5:1).

4.2. Metodika

4.2.1. Parafínová histologie roztoče *Varroa destructor*

Pro parafínovou histologii byl roztoč vyjmut z Bouinovy fixační tekutiny a vložen na 8 hodin do 70% alkoholu. Po 8 hodinách byl roztoč vložen do čistého alkoholu a tento postup byl po 8 hodinách znovu zopakován. Následně byl roztoč přenesen do 96% alkoholu na 8 hodin, což bylo 2x zopakováno. Z 96% alkoholu byl přenesen na hodinu do směsi alkoholu s methylbenzoátem v poměru 1:1. Poté byl vložen do čistého methylbenzoátu na 6 hodin a tento postup byl 2x zopakován. Následovalo přenesení na 10 minut do benzenu, které bylo 1x zopakováno. Po benzenu byl roztoč vložen na 1 hodinu při teplotě 45 °C do směsi benzenu s parafínem. Ze směsi byl přenesen pouze do parafínu na 4 až 6 hodin a tento postup byl 1x zopakován. Na závěr byl roztoč zalit do paraplastu parafínem na zalévání.

Po zafixování a odvodnění byl roztoč krájen na mikrotomu. Řezy o tloušťce 4 a 6µm byly lepeny na podložní sklíčka. Sklíčka byla nejprve potřena směsí glycerínu s vaječným

bílkem a před položením řezu potřeny destilovanou vodou. Poté byly řezy umístěny na plotýnku, kde byly sušeny přes noc při teplotě 45 °C. Vysušená sklíčka byla umístěna do skleněných kyvet bez náplně a uskladněna v lednici do doby, než bylo přistoupeno k odparafinování.

Odparafinování histologických řezů probíhalo při pokojové teplotě v kyvetách. Nejprve byla kyveta se sklíčky naplněna xylénem. Po 5 minutách byl xylén nahrazen čistým xylénem. Po dalších 5 minutách byl xylén nahrazen 96% etanolem a postup se 1x opakoval. Poté byl 96% alkohol nahrazen 70% etanolem a postup se 1x opakoval. Na závěr se řezy máčely 5 minut v destilované vodě.

Řezy byly barveny dvěma metodami. První metoda byla barvení Weigertovým hematoxylinem, ponceau a na závěr světlou zelení, která obsahovala také oranž G. Pro průkaz polysacharidů byla jako druhá metoda vybrána PAS reakce.

U první metody se nejprve začalo barvením hematoxylinem po dobu 3 až 5 minut, který se nalil do kyvet. Poté byl hematoxylin vypláchnut ve vodě. Zabarvení řezů bylo následně diferencováno kyselým alkoholem (96% etanol s 3 až 5 kapkami kyseliny chlorovodíkové). Po diferenciaci byly řezy vráceny do kyvety s destilovanou vodou, aby dále neprobíhala kyselá reakce. Poté byly řezy barveny 3 až 5 minut ponceau. Aby se zabránilo barvení, byly řezy propláchnuty ve vodě. Následovalo barvení světlou zelení s oranží G. Nejprve byly řezy opláchnuty 1% roztokem kyseliny octové ledové. Barvení světlou zelení poté probíhalo 3 až 5 minut. Po barvení byly řezy 3x propláchnuty v 1% kyselině octové ledové.

U druhé metody byly odparafinované řezy opláchnuty v 70% etanolu. Poté byly 5 minut oxidovány kyselinou jodistou a opět opláchnuty 70% etanolem. Následovalo redukování 1 minutu v redukční lázni a poté opláchnutí v 70% etanolu. Na 20 minut byly řezy přeneseny do Schiffova reagens. Poté byly 10minut proplachovány v tekoucí vodě a barveny hematoxylinem jako u první metody.

Po obou metodách barvení probíhalo odvodnění, projasnění a zamontování řezů stejným způsobem. Řezy byly 2x odvodněny v isopropanolu po 10 minutách. Projasnění probíhalo opět 2x stejnou dobu v xylenu. Řezy byly zamontovány kápnutím kanadského balzámu na vzorek a překrytím krycím sklíčkem. Poté řezy schly průměrně 4 dny. Následně proběhla vizualizace řezů v programu Axio Vision.

4.2.2. Příprava homogenátů

Ze vzorků *Varroa* byly připraveny proteinové extrakty pro proteomickou analýzu. Jedna část vzorků byla homogenizována za použití extrakčního pufru 2-D Protein Extraction Buffer-III (GE Healthcare, 28-9444-65) a inhibitorů Protease Inhibitor Mix (GE Healthcare, 80-6501-23). K 0,293g vzorku *Varroa* bylo přidáno 3ml ddH₂O a poté 30μl inhibitoru. Vše bylo homogenizováno 2 minuty na ledu v homogenizátoru Potter-Elvehjem s teflonovým pístem. Po 2 dalších minutách, kdy byly vzorky na ledu, proběhlo stočení 1minutu na centrifuze. Homogenát byl následně rozdělen v objemu 1ml do mikrozkušavek typu eppendorf a opět centrifugován 15 minut při 20000 otáčkách, 4 °C. Po stočení byl z mikrozkušavek odebrán supernatant, který byl znovu stočen. Ze znovu stočeného supernatantu byl pipetou odebrán čistý supernatant. Vzorky byly dále naředěny ddH₂O v poměru 1:20.

Část vzorku byla použita pro stanovení množství proteinů dle Bradford reagens (Sigma Aldrich, B6916). Vzorek byl vložen do mikrodestiček a přidáno 40μl Bradford reagens. Po 10 minutách byl změřen obsah proteinů v Elisa readeru (Thermo Scientific), což činilo 300μg pro 81μl vzorku.

Druhá část vzorku *Varroa*, spolu se vzorky včelích kukel a larev byla homogenizována jen s ddH₂O. K 0,223g vzorku *Varroa* bylo přidáno 2,28ml ddH₂O. K 1,17g vzorku kukly bylo přidáno 12ml ddH₂O. K 0,37g vzorku larvy bylo přidáno 3,8ml ddH₂O. Poté byly všechny vzorky mixovány a byl odebrán supernatant stejně jako u první homogenizace. Po stanovení množství obsahu proteinů byly vzorky *Varroa* i včelí kukly a larvy rozpipetovány do flakónu tak, aby uvnitř bylo 300μg proteinů a poté zlyofylizovány v lyofylizátoru Power Dry LL3000 (Thermo Elektron).

Část proteinových extraktů *Varroa* s inhibitory byla přečištěna 2D Clean-up kit (GE healthcare 80-6484-51) podle návodu. Byly použity vzorky o objemu 81μl a obsahu proteinů 300μg. Ke vzorkům bylo přidáno 900μl precipitantu a vše se vortexovalo na vortexu minishaker ika (IKA RCT). Poté byly vzorky inkubovány na ledu po dobu 15-ti minut. Následně bylo přidáno 900μl co-precipitantu. Vše bylo zamícháno a centrifugováno 5minut/12 tis. g na centrifuze MR 23 i (Trigon-plus). Z centrifugovaných vzorků byl nad peletkami odstraněn supernatant. Vzorky byly znovu stočeny a opět odstraněn supernatant. Na vzniklé peletky bylo přidáno 120μl co-precipitantu a vše bylo inkubováno na ledu po dobu 5-ti minut. Po inkubaci byly vzorky opět centrifugovány 5minut/12tis.g. Poté bylo přidáno

75 μ l destilované vody. Po krátkém vortexování bylo přidáno 3ml chilled wash buffer a 15 μ l wash additive. Následně byl vzorek vortexován každých 10minut po dobu 20-30-ti sekund. Po 30-ti minutách (3 vortexování) byl vzorek centrifugován 5minut/12tis.g. Ze vzorku byl odstraněn supernatant. Pelety následně 5 minut schly. Proschlé pelety byly na závěr resuspendovány v rehydratačním roztoku DE streak rehydratation solution (GE healthcare, 17-6003-19) a použity pro dvojrozměrnou elektroforézu.

4.2.3. Elektroforetické dělení proteinů

4.2.3.1. 1. rozměr: Izoelektrická fokusace (IEF)

Pro elektroforetické dělení proteinů byla použita 12% a 15% tris-glycinová dvojrozměrná elektroforéza. Zlyofylizované vzorky o obsahu proteinů 150 a 300 μ g byly resuspendovány v DE streak rehydratation solution (GE healthcare, 17-6003-19) a aplikovány pipetou do keramických holderů (GE healthcare, 80-6417-25). Po vložení stripu o rozsahu pH 3-10 byly vzorky převrstveny minerálním olejem (GE healthcare, 17-1335-01). Aktivní rehydratace probíhala v přístroji ETTAN IPGPhor3 (GE healthcare) podle nastavení uvedeného v tabulce č. 1. Po ukončení byly vyseparované vzorky nejprve ekvilibrovány 15 minut při pokojové teplotě v ekvilibračním roztoku (6 M urea, 2% SDS, 0,05 M Tris-HCl pH 8,8, 20% glycerol) s DL-Dithiothreitolu (Sigma Aldrich, 43817) na třepačce ELMi DTS2 (Elmi, Ltd). Následovala 15-ti minutová ekvilibrace ve stejném ekvilibračním roztoku s iodoacetamidem (Fluka, 57670) na stejné třepačce. Ekvilibrované stripy byly poté opláchnuty destilovanou vodou a vloženy do horní části připraveného polyakrylamidového gelu (Acrylamide/bis-Acrylamide 30% sol., Sigma Aldrich, 060M6045), kde byly zafixovány 1% agarózou (Sigma Aldrich, A7431). Poté probíhal druhý rozměr separace.

Tabulka č. 1: Nastavení přístroje ETTAN IPGPhor3 pro IEF

Nastavení	Napětí (V)	Čas (h, Vh)
Step 1	30 V	12 h
Step 2	500 V	500 Vh
Step 3	1 000 V	800 Vh
Step 4	8 000 V	11 300 Vh
Step 5	8 000 V	4 400 Vh

4.2.3.2. 2. rozměr: SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulphate polycrylamide gel electrophoresis)

Druhý rozměr separace proteinů probíhal pomocí 12% a 15% tris-glycinové SDS-PAGE elektroforézy. Gely byly vloženy do elektroforézy SE 600 Ruby (GE healthcare) a zality tris-glycinovým pufrem (Sigma Aldrich, T7777-1L). Elektroforéza byla puštěna na 100V. Později byl výkon zvýšen na 350V. Po dojetí elektroforézy byly gely fixovány ve fixačním roztoku složeném z kyseliny octové, metanolu a destilované vody v poměru 1:4:5. Gely byly barveny 0,02% Coomassie (Fluka, 27815) a znovu fixovány fixačním roztokem. Takto nabarvené řezy byly foceny na scanneru Canoscan 8800F (Canon).

4.2.4. Identifikace proteinů hmotnostní spektrometrií

Z nabarvených a zafixovaných gelů larvy, kukly a *V. destructor* byly vybrány nejvhodnější gely, které byly použity na identifikaci proteinů. Z jednotlivých gelů byly vybrány nejabundantnější proteiny, které byly servisně analyzovány Mgr. Petrem Jedelským v laboratoři hmotnostní spektrometrie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Analýza probíhala na tandemovém hmotnostním spektrometru 4800 Plus MALDI TOF/TOF (AB SCIEX).

4.2.5. Nativní elektroforéza

Pro enzymatickou analýzu pomocí zymogramů byla použita nativní SDS-PAGE. Zlyofylizované vzorky byly rozpuštěny v ½ ddH₂O a ½ vzorkového pufru (4% SDS; 0,125M

tris; pH 6,8; 20% glycin). Vzorky byly separovány v SDS-PAGE gelu v Mini- Protean Tetra Systemu (BIORAD, Francie). Pro elektroforézu byl připraven 12% polyakrylamidový (Acrylamide/bis-Acrylamide 30% sol., Sigma Aldrich, 060M6045) separating gel a 3% stacking gel, do kterého byl vložen hřeben s jamkami o šířce 1,5mm. Do vzniklých jamek byly v objemu 15 μ l a obsahu proteinů 30 μ g pipetovány vzorky larvy, kukly a *Varroa*. Elektroforéza byla puštěna na 77V a později byl výkon zvýšen na 300V. Po skončení elektroforézy byly gely vloženy do tris-glycinového pufru (Sigma Aldrich, T7777-1L) a před excitací polity příslušnými substráty, případně inhibitory. Excitace byla pozorována pomocí transluminátoru (Syngene) s filtrem o vlnové délce 440nm. Byly použity následující substráty: N α -Benzoyl-L-arginine-7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride BAAMC (Sigma Aldrich, B7260), Ala-Ala-Phe-7-amido-4-methylcoumarin AAPAMC (Sigma Aldrich, A3401), Z-Arg-Arg-7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride ZRRAMC (Sigma Aldrich, C5429), L-Arginine-7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride ArgAMC (Sigma Aldrich, A2027), N-p-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone TPCK (Sigma Aldrich, T4376), N α -Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride TLCK (Sigma Aldrich, T7254), N-Acetyl-Arg-Gly-Phe-Phe-Pro-7-amido-4-trifluoromethylcoumarin AGPPPAMC (Sigma Aldrich, C6983), 4-Methylumbelliferyl β -D-N,N',N''-triacetylchitotrioside (Sigma Aldrich, M5639), 4-Methylumbelliferyl α -D-glucoopyranoside (Sigma Aldrich, M9766), 4-Methylumbelliferyl β -D-glucoopyranoside MUD (Sigma Aldrich, M3633), 4-Methylumbelliferyl β -D-galactopyranoside MUGA (Sigma Aldrich, M1633).

Inhibitory chymotrypsinu (T4376) a trypsinu (T7254) byly použity s příslušným substrátem (B7260 a A3401). Byly použity vždy dva gely, přičemž jeden byl nejprve polit inhibítorem a poté byly oba polity substrátem. Pokud by inhibitor účinkoval na příslušný substrát, měl by se fluorescenčně zobrazit band na gelu obsahující pouze substrát.

Tabulka č. 2: Přehled substrátů a jejich rozpouštědel.

označení	rozpouštědlo	substrát/inhibitor
B7260	DMSO:Metanol (1:1)	substrát pro trypsin, papain
A3401	Etanol	substrát pro chymotrypsin
C5429	Metanol	substrát pro cathepsin B, trypsin
A2027	Kys. octová:H ₂ O (1:1); DMSO	substrát pro cathepsin H, amidopeptidázy
C6983	DMSO	substrát pro Cathepsin D
M5639	DMF:H ₂ O (1:1); pyridine:H ₂ O (1:1)	substrát pro lysozym, endochitinázy
M9766	DMSO	substrát pro alfa-glukosidázy
M3633	DMF	substrát Pro β-glukosidázy
M1633	DMSO	substrát Pro β-galaktosidázy
T4376	Metanol	inhibitor chymotrypsinu
T7254	H ₂ O	inhibitor trypsinu

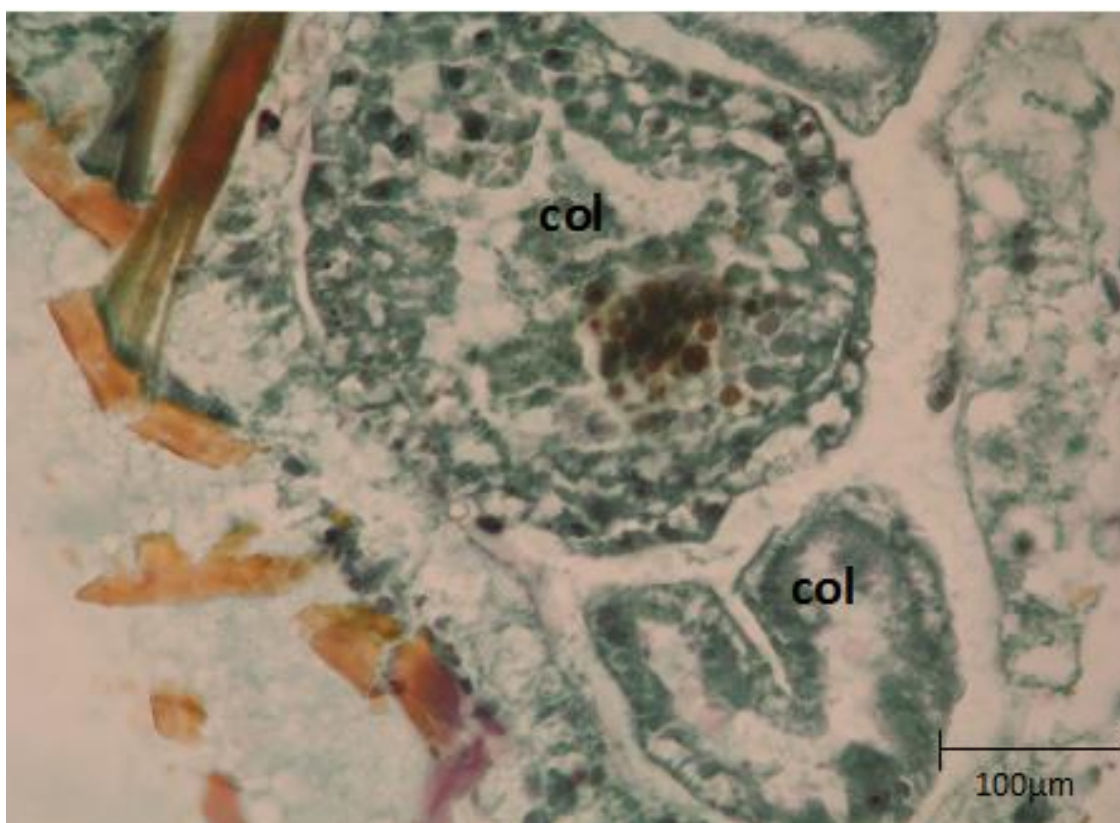
4.3. Výsledky

4.3.1. Výsledky parafínové histologie

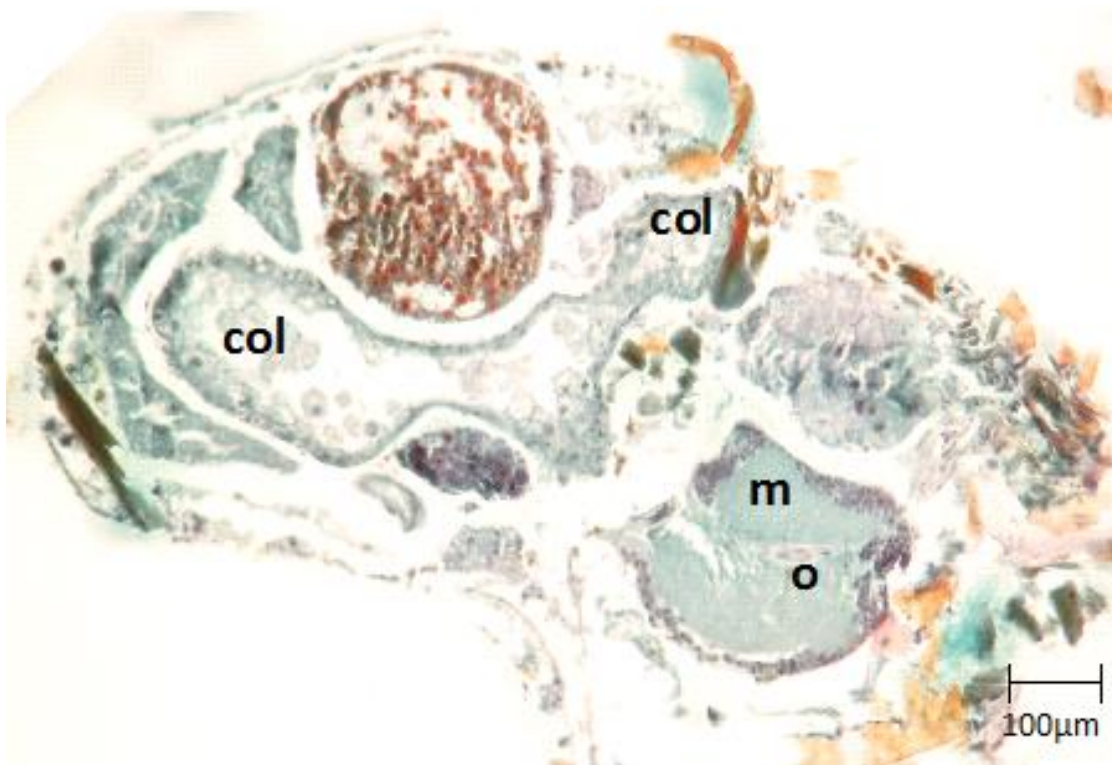
Vnitřní anatomie roztoče *V. destructor* byla studována prostřednictvím parafínové histologie. Ze získaných řezů byly vybrány snímky, na nichž byla patrná vnitřní anatomie, a bylo možno rozeznat různé typy tkání.

Na řezech bylo možno pozorovat střevo roztoče (col) (Obr. č.1), malphigickou trubici (mpt), svaly (s), vaječníky (o). U oboru typů barvení bylo možné pozorovat jak oesophagus (o) prochází mozkem (m) roztoče (Obr. č. 2, 15 a 17). U PAS reakce (Obr. č. 3-18) bylo možné dokonce pozorovat na řezech vajíčko (v) (Obr. č. 3).

Barvení: A. Hematoxylin+ světlá zeleň (s oranží G)

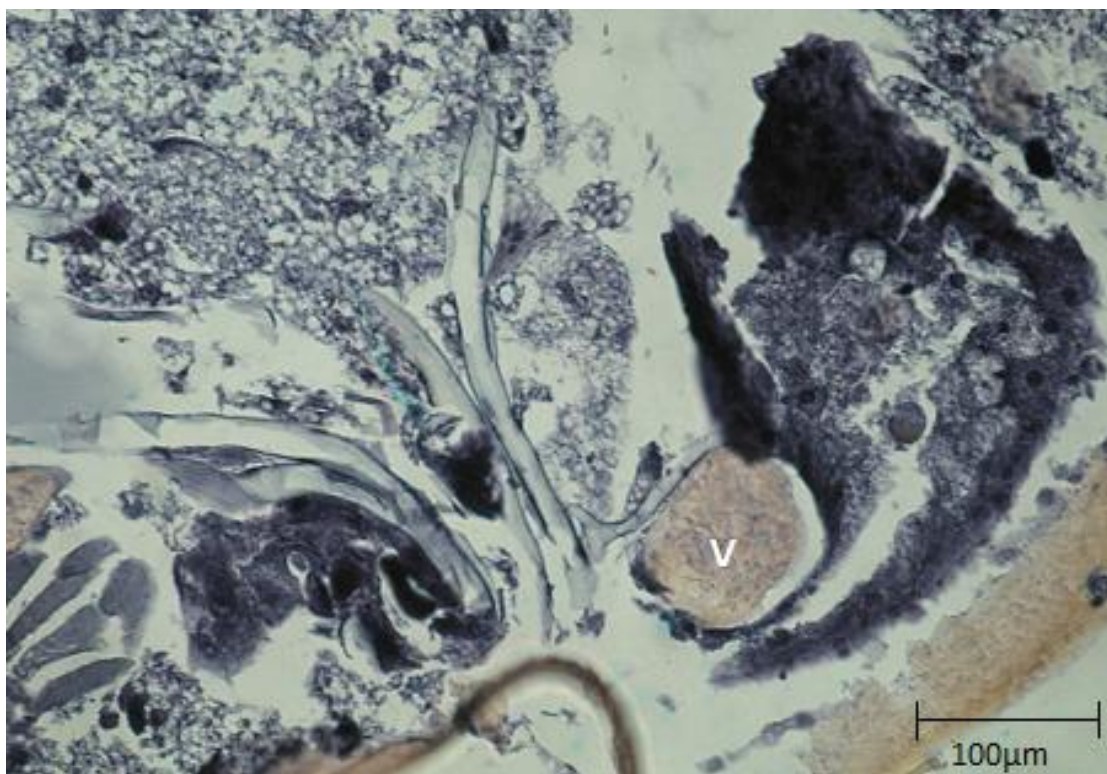


Obrázek č. 1: Detail střeva (col) (řez 6 μ m)



Obrázek č. 2: Řez celým roztočem: střevo (col), oesophagus (o) a mozek (m) (řez 6µm)

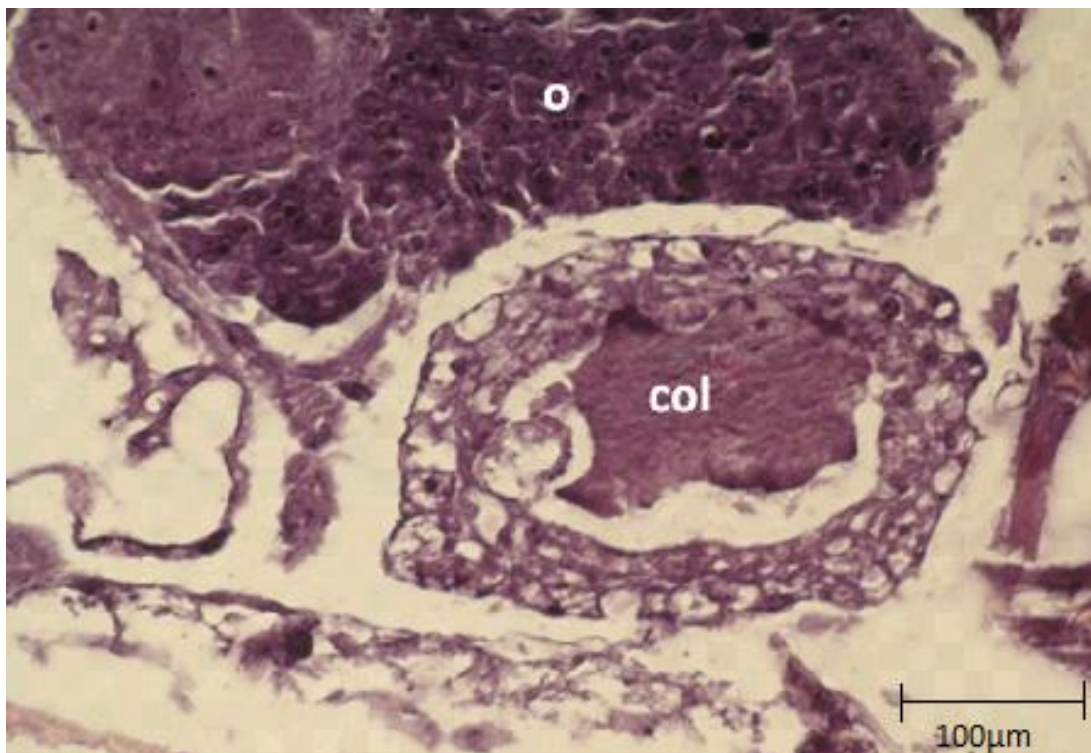
B. PAS reakce (polysacharidy a oligosacharidy)



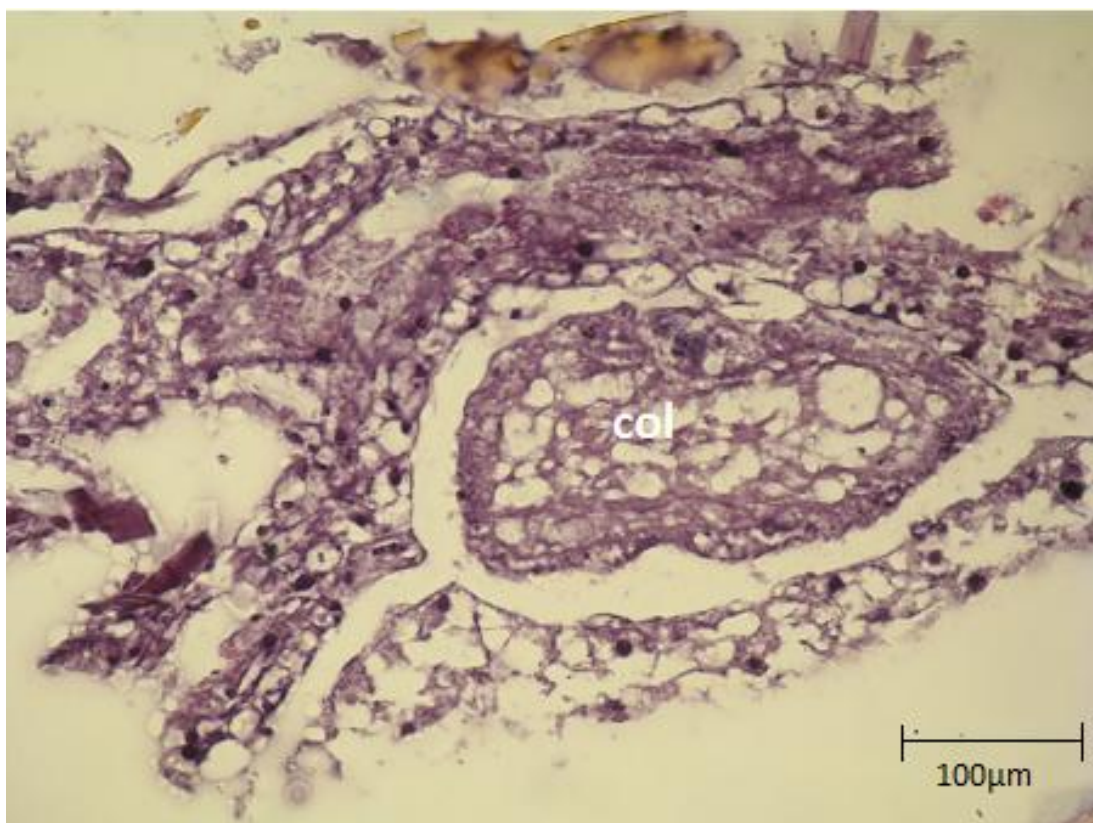
Obrázek č. 3: Vajíčko (V) (řez 4µm)



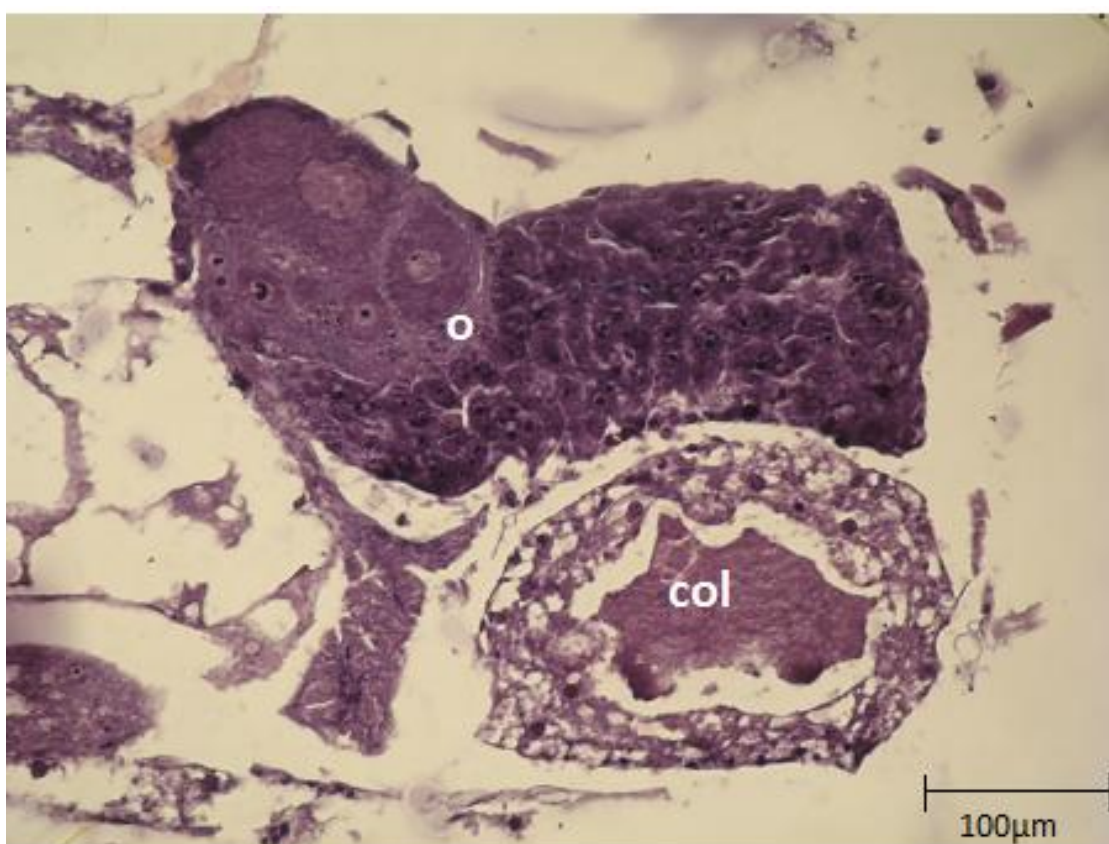
Obrázek č. 4: Detail střeva (col) (řez 4µm)



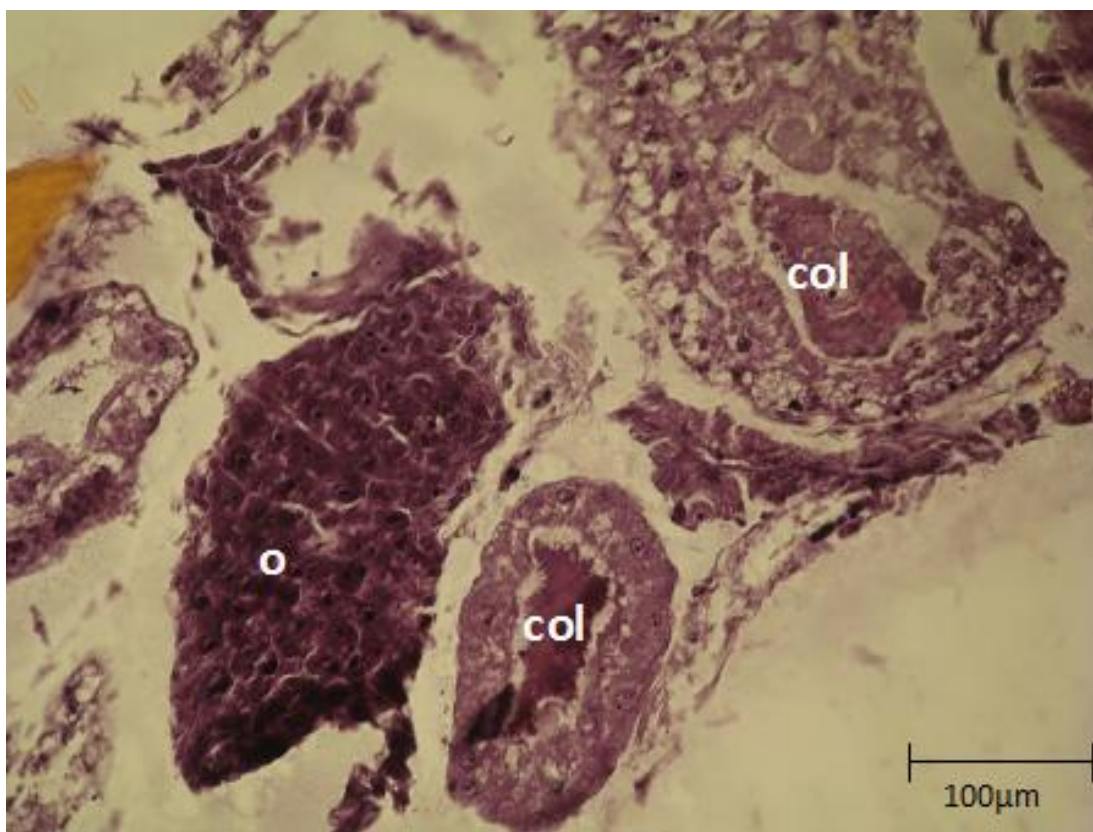
Obrázek č. 5: Detail střeva (col) a vaječnicků (o) (řez 4µm)



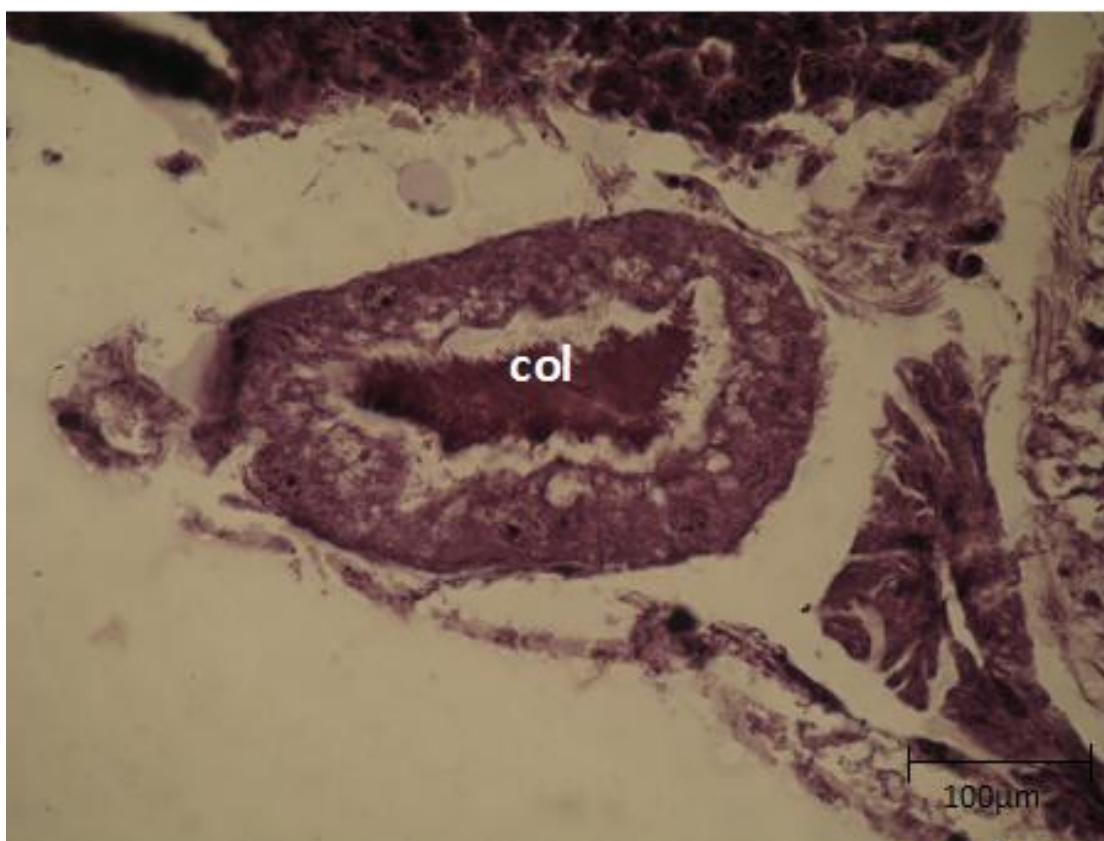
Obrázek č. 6: Detail střeva (col) (řez 4µm)



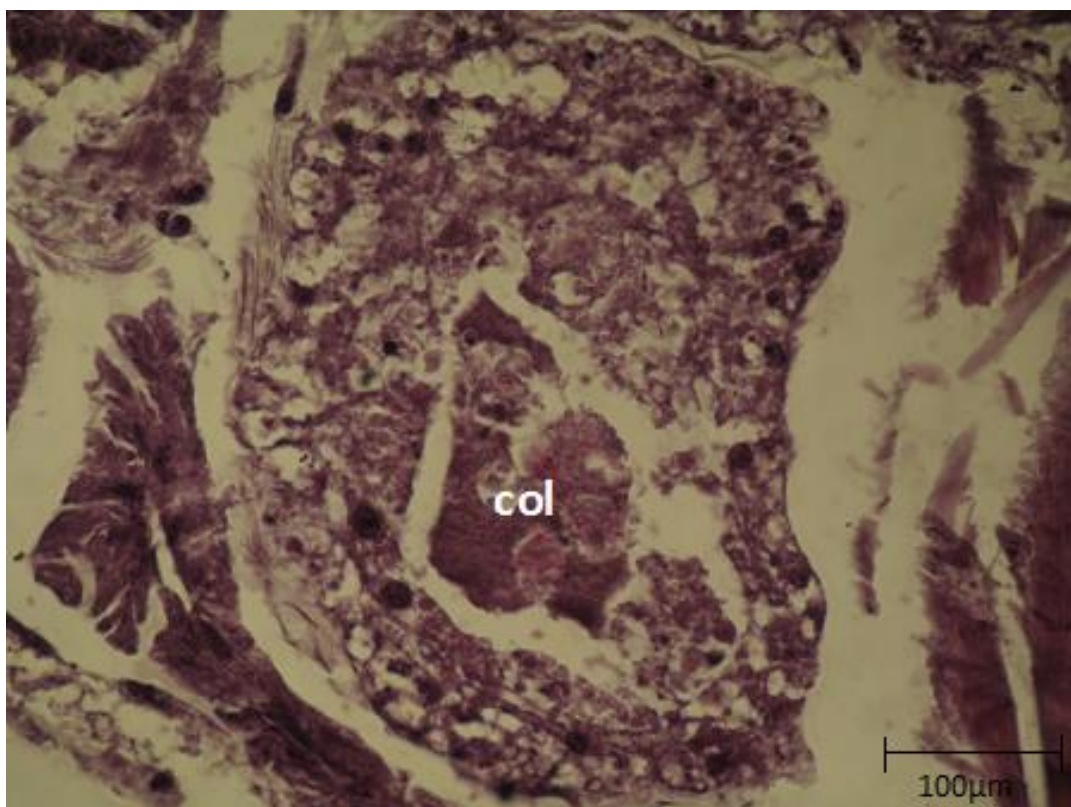
Obrázek č. 7: Detail střeva (col) a vaječnicků (o) (řez 4µm)



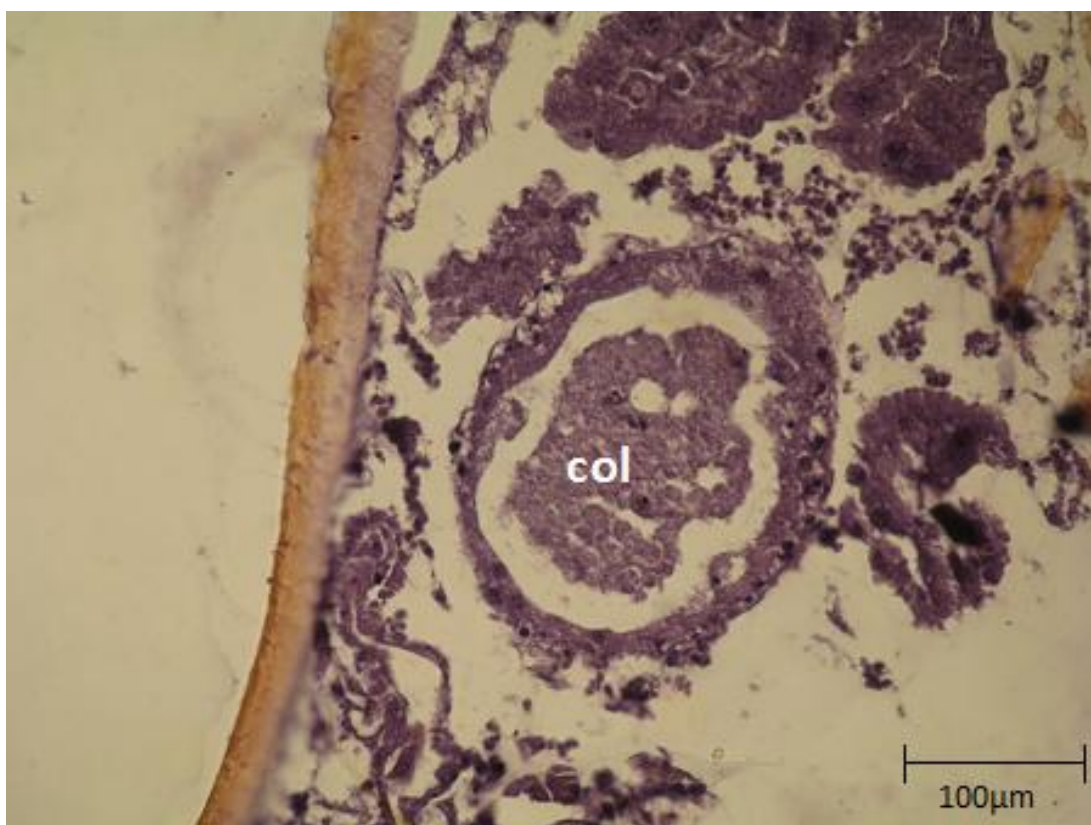
Obrázek č. 8: Detail střeva (col) a vaječníků (o) (řez 4µm)



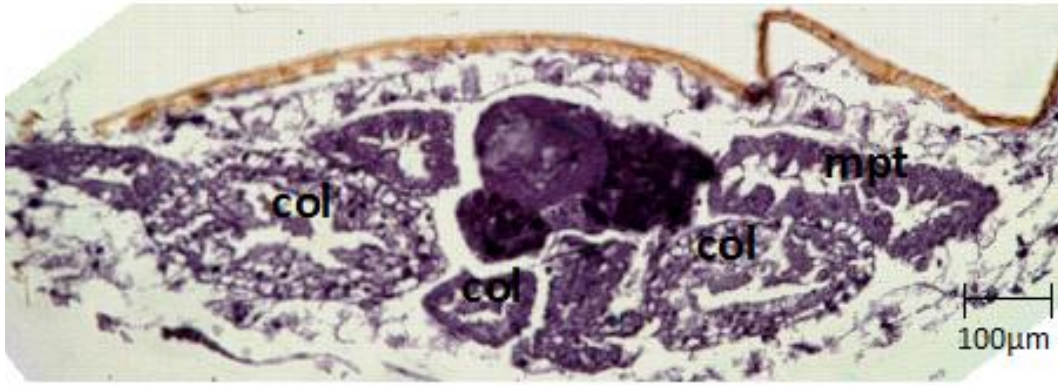
Obrázek č. 9: Detail střeva (col) (řez 4µm)



Obrázek č. 10: Detail střeva (col) (řez 4µm)



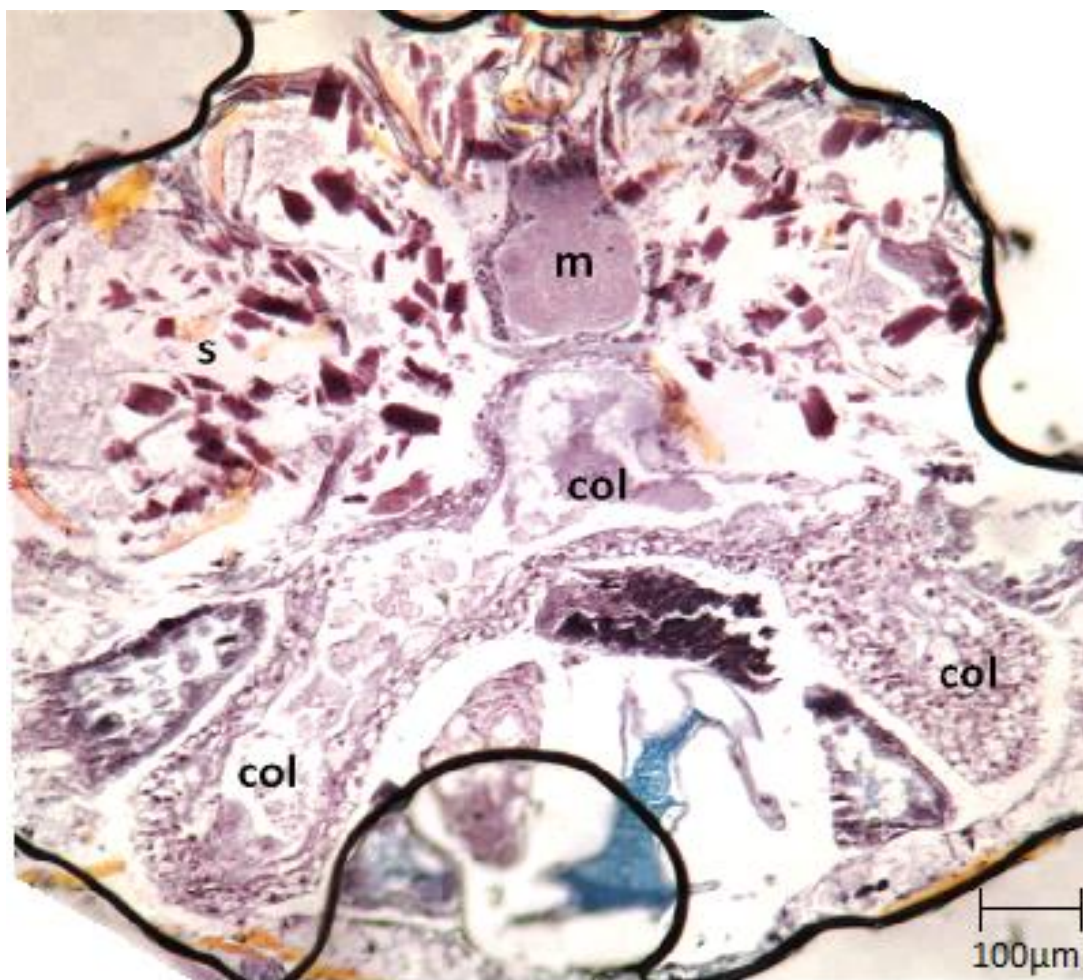
Obrázek č. 11: Detail střeva (col) (řez 4µm)



Obrázek č. 12: Řez celým roztočem: střevo (col), malphigická trubice (mpt) (řez 4 μ m)



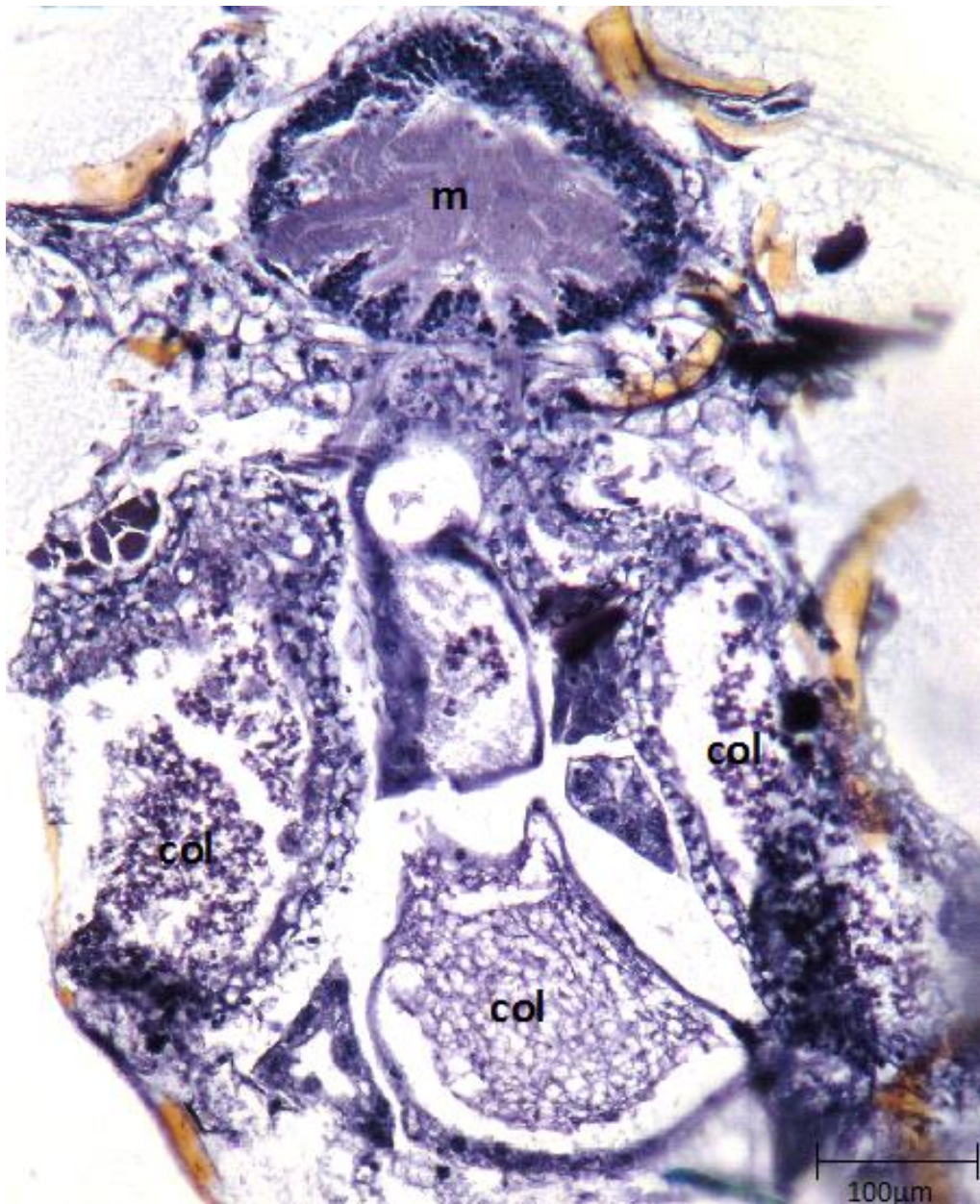
Obrázek č. 13: Malphigická trubice (mpt), svaly (s), mozek (m) (řez 6 μ m)



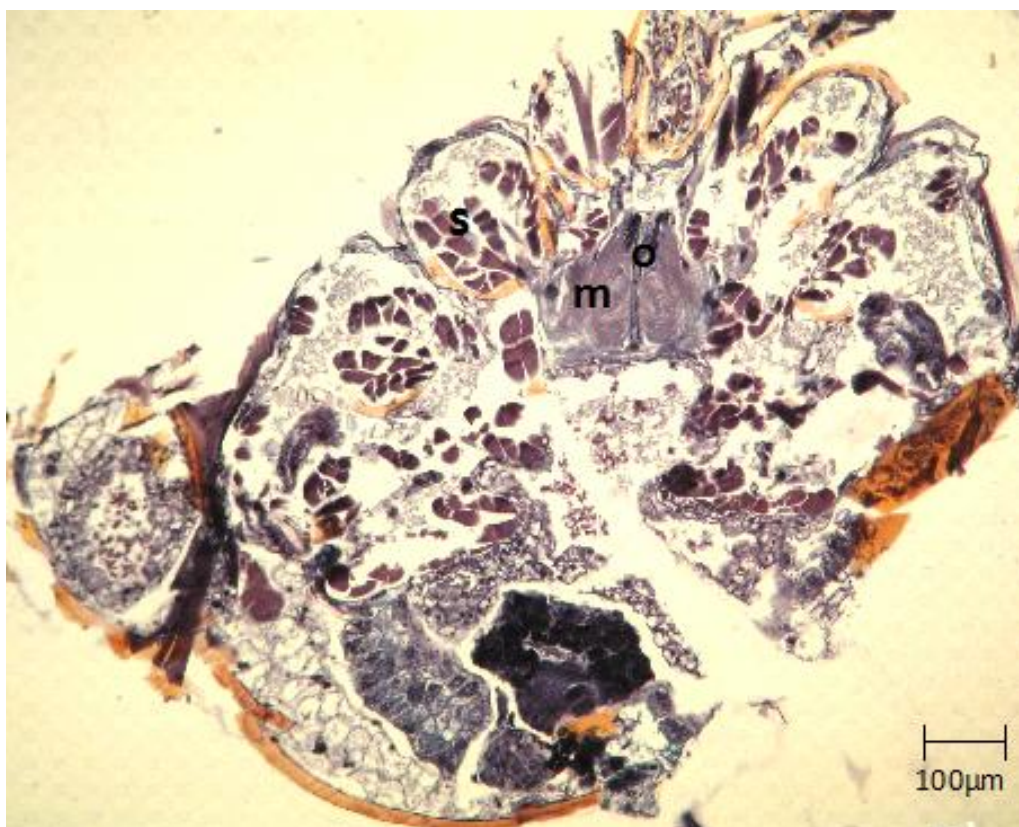
Obrázek č. 14: Řez celým roztočem: střevo (col), svaly (s), mozek (m) (řez 6μm)



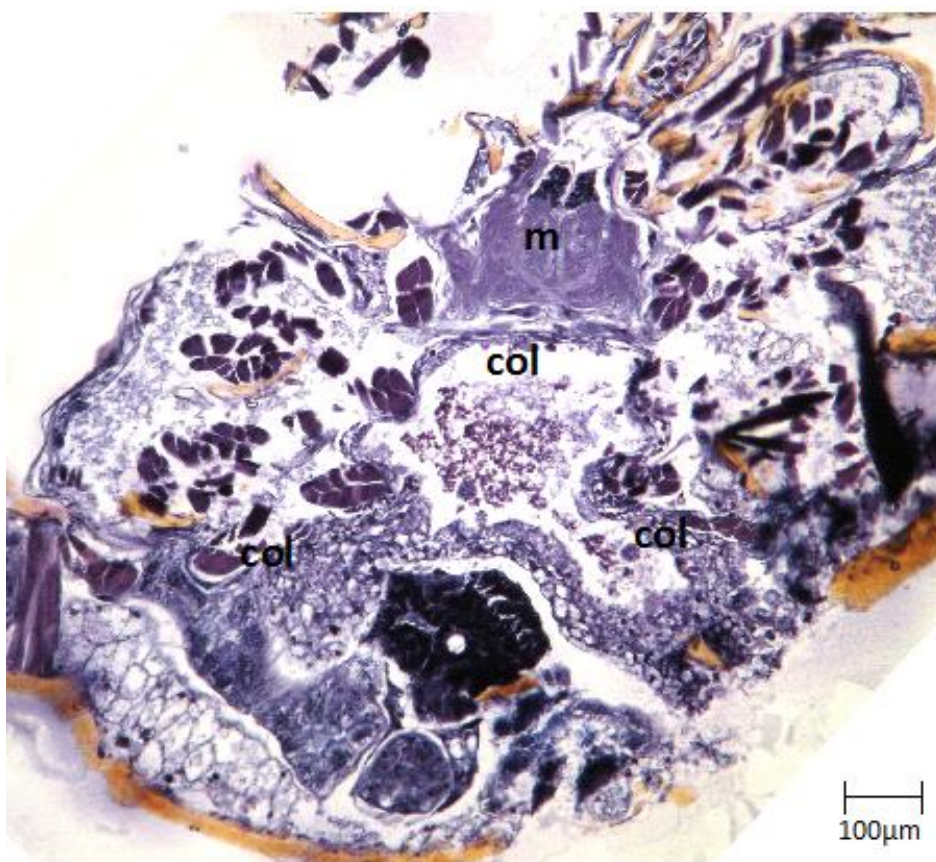
Obrázek č. 15: Mozek (m) s oesophagem (o) (řez 6μm)



Obrázek č. 16: Řez celým roztočem: střevo (col) a mozek (m) (řez 6μm)



Obrázek č. 17: Mozek (m) s oesophagem (o), svaly (s) (řez 6μm)



Obrázek č. 18: Řez celým roztočem: střevo (col) a mozek (m) (řez 6μm)

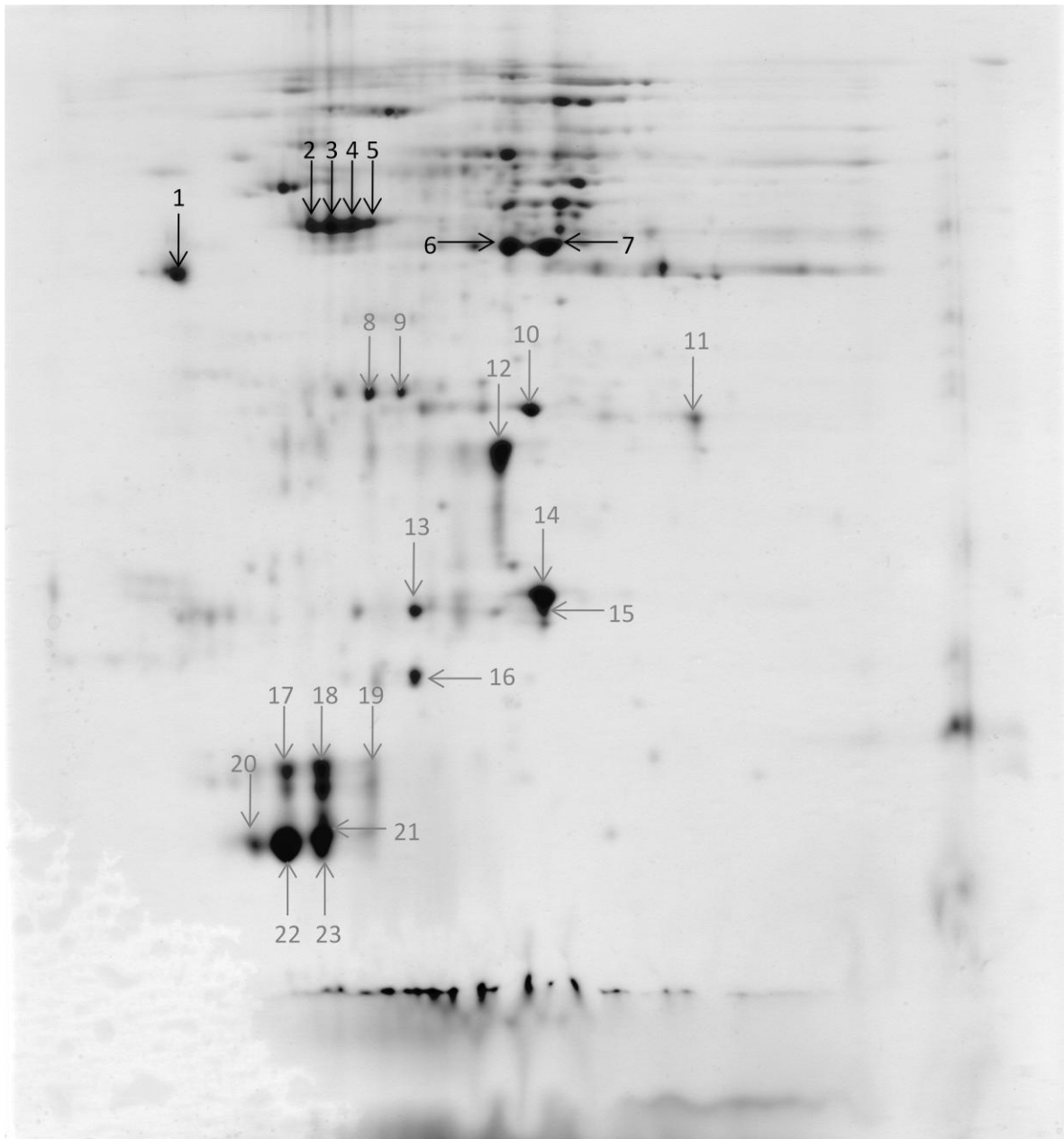
4.3.2. Výsledky dvourozměrné (2D) elektroforézy a identifikace proteinů hmotnostním spektrometrem

Pro elektroforetické dělení proteinů *Varroa*, včelí kukly a larvy byla použita dvourozměrná elektroforéza. Z vybraných gelů byly vybrány nejabundantnější spoty, které byly analyzovány hmotnostním spektrometrem MALDI TOF/TOF. Tyto spoty byly u jednotlivých gelů označeny.

U *Varroa* byly analyzovány 3 gely, dva s nečištěnými a jeden s čištěnými proteiny. Ze všech analyzovaných proteinů bylo nejvíce spotů signifikantně identifikováno jako hexamerin 70a, arginin kináza, hemelipoglycoprotein precursor či aktin. U 15% gelu *Varroa* (Obr. č. 19) s čištěnými proteiny byl nejabundantnějším proteinem aktin 5C. Dále byly identifikovány proteiny tropomyosin a arginin kináza. V případě čištěného vzorku *Varroa* byl proteinový obraz odlišný od nečištěného a výsledných proteinů bylo v gelu méně než u nečištěných proteinů. Toto indikuje, že během čistícího kroku docházelo ke ztrátám proteinů. 12% elektroforéza dělila lépe proteiny o vyšší molekulové hmotnosti, nebyly však rozděleny proteiny o malé molekulové hmotnosti, které byly naopak dobře separovány 15% elektroforézou. Hmotnostní spektrometrií byly u 12% (Obr. č. 20) i 15% (Obr. č. 21) separace s nečištěnými proteiny identifikovány hemelipoglycoprotein precursor, hexamerin, arginin kináza a aktin, které patřily k nejabundantnějším proteinům. Řada proteinů však nebyla hmotnostní spektrometrií identifikována.

U včely byly vybrány reprezentativní gely s proteiny kukly a larvy, které byly dále analyzovány podobně jako u *Varroa*. Výsledky identifikace byly mnohem úspěšnější a většina výsledků byla identifikována taxonomicky k *A. mellifera*. Většina spotů ve vzorku larvy *A. mellifera* (Obr. č. 22) byla identifikována jako major royal jelly protein. U stádia larvy byly dále identifikovány hexameriny, heat shock proteiny, arginin kináza či α -glukosidáza. Vzorek kukly *A. mellifera* (Obr. č. 23) obsahoval zejména proteiny hexamerin, heat shock protein a aktin. U stádia kukly se hexameriny vyskytovaly mnohem častěji než u stádia larvy. Stejně jako u stádia larvy, také u stádia kukly se vyskytovaly typy hexamerinů hex 110 a hex 70b. Navíc se u kukly vyskytoval typ hexamerinu hex 70a, který se také jako jediný vyskytoval u *Varroa*. Kromě zmíněných nejabundantnějších proteinů se u obou stádií včely vyskytovaly také jiné proteiny, převážně enzymy (viz tab. č. 6 a 7), ovšem v menší míře.

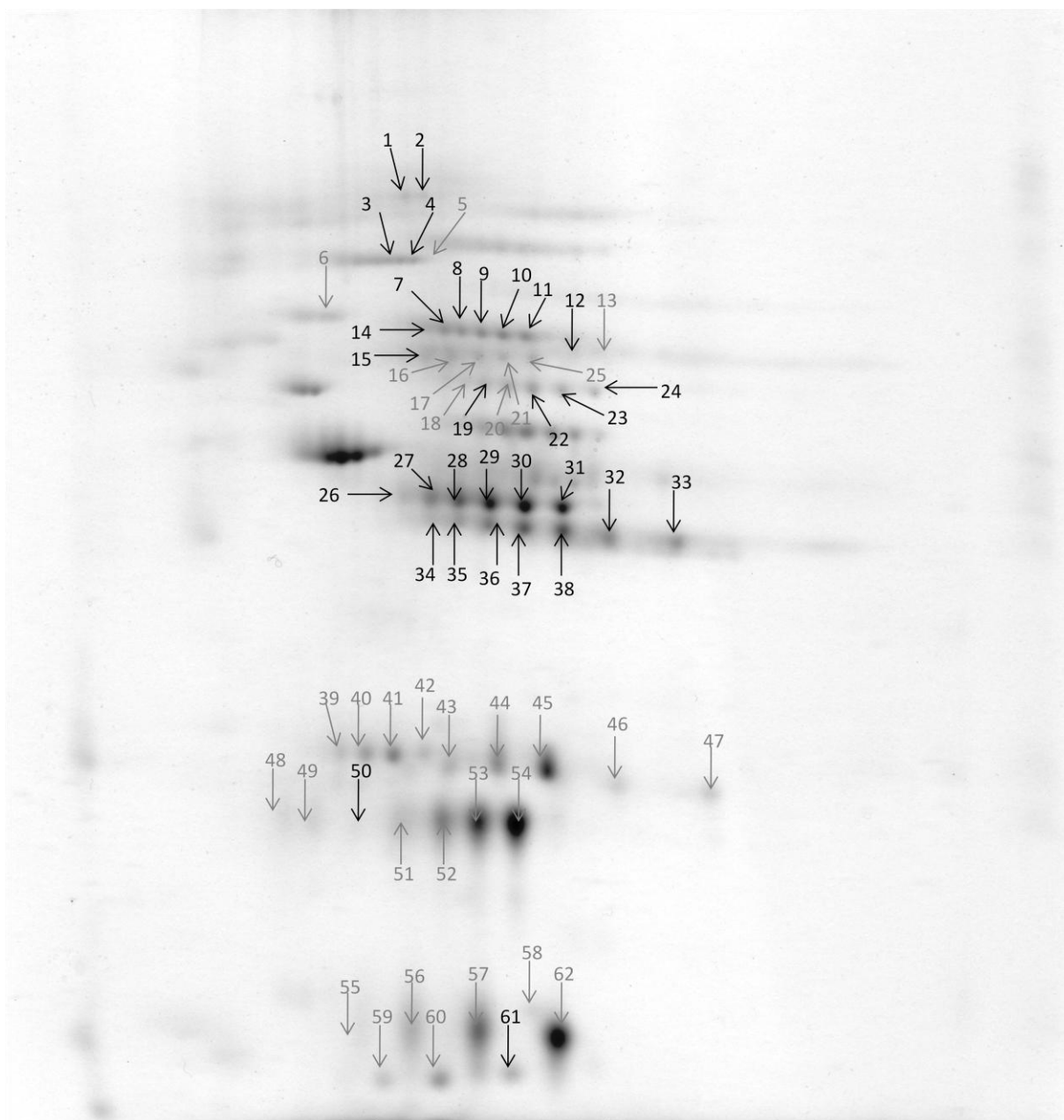
4.3.2.1. *Varroa destructor*



Obrázek č. 19: Reprezentativní 15% dvourozměrná elektroforéza čištěných proteinů *V. destructor*. Legenda: černě – signifikantní proteiny, šedě – nesignifikantní proteiny.

Tabulka č. 3: Přehled identifikovaných signifikantních proteinů *Varroa* u 15% polyakrylamidového 2D-gelu

Spot	Skóre	Molekulová hmotnost	Identifikační číslo	Popis proteinu
1	515	32654	gi 83308265	tropomyosin [<i>Dermanyssus gallinae</i>]
2	225	42236	gi 161661023	actin 5C [<i>Lycosa singoriensis</i>]
3	312	42236	gi 161661023	actin 5C [<i>Lycosa singoriensis</i>]
4	312	42236	gi 161661023	actin 5C [<i>Lycosa singoriensis</i>]
5	281	42236	gi 161661023	actin 5C [<i>Lycosa singoriensis</i>]
6	145	40560	gi 25453078	RecName: Full=Arginine kinase; Short=AK
7	125	40092	gi 158294498	AGAP005627-PD [<i>Anopheles gambiae</i> str. PEST]



Obrázek č. 20: Reprezentativní 12% dvourozměrná elektroforéza nečištěných proteinů *V. destructor*. Legenda: černě – signifikantní proteiny, šedě – nesignifikantní proteiny.

Tabulka č. 4: Přehled identifikovaných signifikantních proteinů *Varroa* u 12% polyakrylamidového 2D-gelu

Spot	Skóre	Molekulová hmotnost	Identifikační číslo	Popis proteinu
1	99	180147	gi 255689632	hemelipoglycoprotein precursor [<i>Varroa destructor</i>]
2	96	180147	gi 255689632	hemelipoglycoprotein precursor [<i>Varroa destructor</i>]
3	158	70824	gi 126309575	PREDICTED: hypothetical protein [<i>Monodelphis domestica</i>]
4	170	66488	gi 219882323	70 kDa heat shock protein form 2 [<i>Rimicaris exoculata</i>]
7	364	81522	gi 160425209	hexamerin 70a [<i>Apis mellifera</i>]
8	361	81522	gi 160425209	hexamerin 70a [<i>Apis mellifera</i>]
9	359	81522	gi 160425209	hexamerin 70a [<i>Apis mellifera</i>]
10	430	81522	gi 160425209	hexamerin 70a [<i>Apis mellifera</i>]
11	425	81549	gi 149939403	hexamerin [<i>Apis mellifera</i>]
12	87	57092	gi 112982683	catalase [<i>Bombyx mori</i>]
14	365	81522	gi 160425209	hexamerin 70a [<i>Apis mellifera</i>]
15	81	54288	gi 291222393	PREDICTED: aldehyde dehydrogenase 1A1-like [<i>Saccoglossus kowalevskii</i>]
19	94	40757	gi 254934261	putative enolase [<i>Alucita</i> sp. JCR-2009]
22	97	41923	gi 55741585	beta-actin-like [<i>Canis lupus familiaris</i>]
23	83	40757	gi 254934261	putative enolase [<i>Alucita</i> sp. JCR-2009]
24	81	39773	gi 41394389	2-phospho-D-glycerate hydrolase [<i>Diplopoda</i> sp. SBH266145]
26	93	26441	gi 56199432	unknown [<i>Culicoides sonorensis</i>]
27	97	40697	gi 156938897	arginine kinase [<i>Dermatophagoides farinae</i>]
28	135	40697	gi 156938897	arginine kinase [<i>Dermatophagoides farinae</i>]
29	176	40697	gi 156938897	arginine kinase [<i>Dermatophagoides farinae</i>]
30	199	40697	gi 156938897	arginine kinase [<i>Dermatophagoides farinae</i>]
31	152	40322	gi 157830286	Chain A, Transition State Structure Of Arginine Kinase
32	178	35830	gi 40887061	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [<i>Cherax quadricarinatus</i>]
33	163	36174	gi 210038269	glycerol 3-phosphate dehydrogenase [<i>Suberites domuncula</i>]
34	83	40322	gi 157830286	Chain A, Transition State Structure Of Arginine Kinase
35	108	40697	gi 156938897	arginine kinase [<i>Dermatophagoides farinae</i>]
36	155	40697	gi 156938897	arginine kinase [<i>Dermatophagoides farinae</i>]
37	155	22800	gi 197261179	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [<i>Cherax preissii</i>]
38	134	36052	gi 190014502	putative glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [<i>Gammarus locusta</i>]
50	88	42236	gi 161661023	actin 5C [<i>Lycosa singoriensis</i>]
61	94	14904	gi 1019906	Cu,Zn superoxide dismutase [<i>Drosophila saltans</i>]



Obrázek č. 21: Reprezentativní 15% dvourozměrná elektroforéza nečištěných proteinů *Varroa destructor*. Legenda: černě – signifikantní proteiny, šedě – nesignifikantní proteiny.

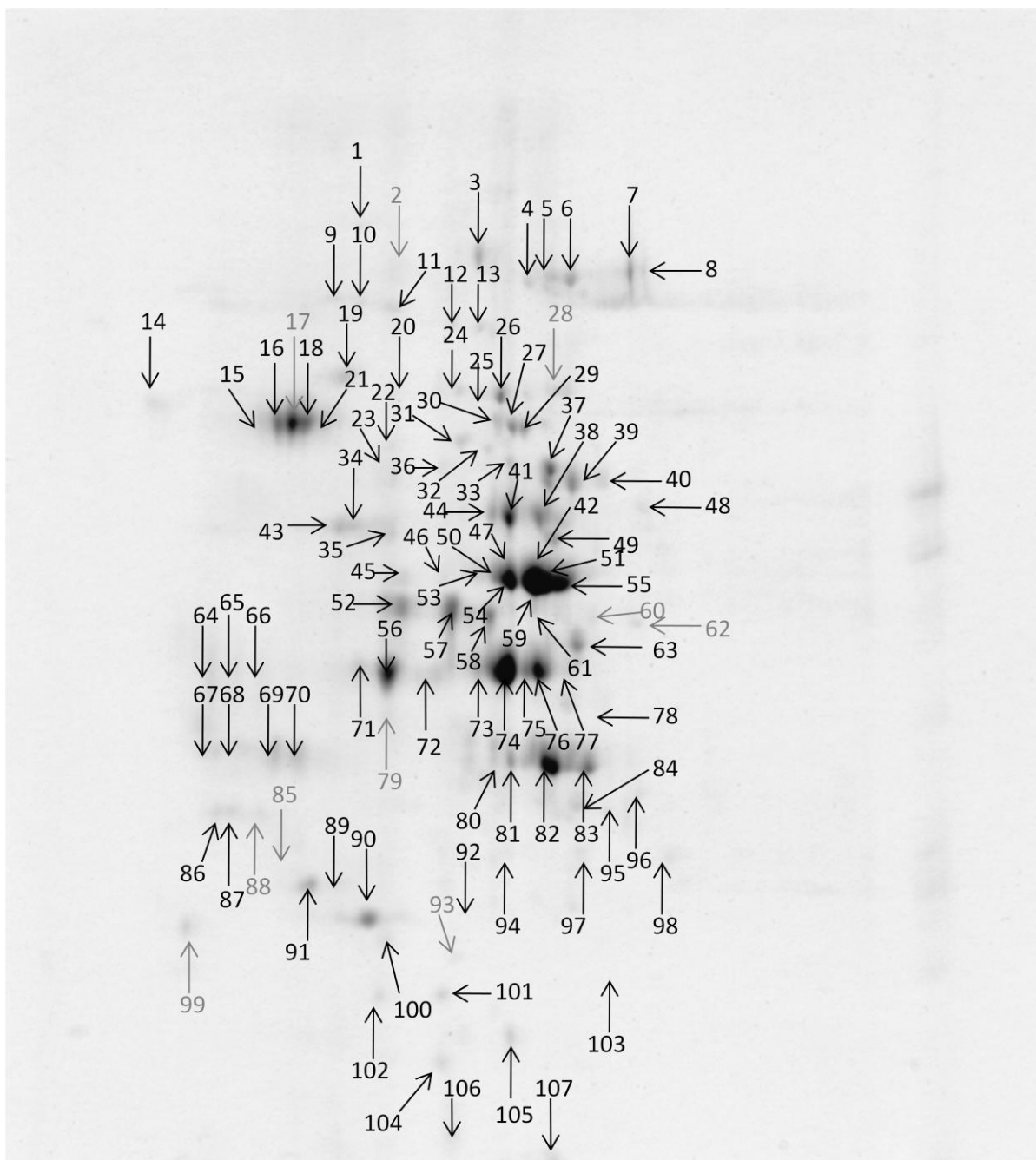
Tabulka č. 5: Přehled identifikovaných signifikantních proteinů *Varroa* u 15% polyakrylamidového 2D-gelu

Spot	Skóre	Molekulová hmotnost	Identifikační číslo	Popis proteinu
1	99	180147	gij 255689632	hemelipoglycoprotein precursor [<i>Varroa destructor</i>]
2	96	180147	gij 255689632	hemelipoglycoprotein precursor [<i>Varroa destructor</i>]
3	97	180147	gij 255689632	hemelipoglycoprotein precursor [<i>Varroa destructor</i>]
4	184	180147	gij 255689632	hemelipoglycoprotein precursor [<i>Varroa destructor</i>]
5	122	180147	gij 255689632	hemelipoglycoprotein precursor [<i>Varroa destructor</i>]
6	166	180147	gij 255689632	hemelipoglycoprotein precursor [<i>Varroa destructor</i>]
7	156	180147	gij 255689632	hemelipoglycoprotein precursor [<i>Varroa destructor</i>]
8	230	180147	gij 255689632	hemelipoglycoprotein precursor [<i>Varroa destructor</i>]
9	90	180147	gij 255689632	hemelipoglycoprotein precursor [<i>Varroa destructor</i>]
11	170	66488	gij 219882323	70 kDa heat shock protein form 2 [<i>Rimicaris exoculata</i>]
13	194	81522	gij 160425209	hexamerin 70a [<i>Apis mellifera</i>]
14	129	81522	gij 160425209	hexamerin 70a [<i>Apis mellifera</i>]
15	146	81522	gij 160425209	hexamerin 70a [<i>Apis mellifera</i>]
16	249	81522	gij 160425209	hexamerin 70a [<i>Apis mellifera</i>]
17	280	81522	gij 160425209	hexamerin 70a [<i>Apis mellifera</i>]
20	365	81522	gij 160425209	hexamerin 70a [<i>Apis mellifera</i>]
21	364	81522	gij 160425209	hexamerin 70a [<i>Apis mellifera</i>]
22	361	81522	gij 160425209	hexamerin 70a [<i>Apis mellifera</i>]
23	359	81522	gij 160425209	hexamerin 70a [<i>Apis mellifera</i>]
24	430	81522	gij 160425209	hexamerin 70a [<i>Apis mellifera</i>]
25	425	81549	gij 149939403	hexamerin [<i>Apis mellifera</i>]
26	87	57092	gij 112982683	catalase [<i>Bombyx mori</i>]
27	610	46089	gij 158524732	mitochondrial ATP synthase beta subunit [<i>Novocrania anomala</i>]
28	625	46089	gij 158524732	mitochondrial ATP synthase beta subunit [<i>Novocrania anomala</i>]
29	81	54288	gij 291222393	PREDICTED: aldehyde dehydrogenase 1A1-like [<i>Saccoglossus kowalevskii</i>]
31	419	42236	gij 161661023	actin 5C [<i>Lycosa singoriensis</i>]
32	346	42236	gij 161661023	actin 5C [<i>Lycosa singoriensis</i>]
33	323	42236	gij 161661023	actin 5C [<i>Lycosa singoriensis</i>]
34	381	42236	gij 161661023	actin 5C [<i>Lycosa singoriensis</i>]
35	94	40757	gij 254934261	putative enolase [<i>Alucita</i> sp. JCR-2009]
36	97	41923	gij 55741585	beta-actin-like [<i>Canis lupus familiaris</i>]
37	83	40757	gij 254934261	putative enolase [<i>Alucita</i> sp. JCR-2009]
38	81	39773	gij 41394389	2-phospho-D-glycerate hydrolase [<i>Diplopoda</i> sp. SBH266145]
41	97	40697	gij 156938897	arginine kinase [<i>Dermatophagoides farinae</i>]
42	135	40697	gij 156938897	arginine kinase [<i>Dermatophagoides farinae</i>]
47	176	40697	gij 156938897	arginine kinase [<i>Dermatophagoides farinae</i>]
48	199	40697	gij 156938897	arginine kinase [<i>Dermatophagoides farinae</i>]
49	152	40322	gij 157830286	Chain A, Transition State Structure Of Arginine Kinase
50	93	26441	gij 56199432	unknown [<i>Culicoides sonorensis</i>]

Pokračování tabulky č. 5: Přehled identifikovaných signifikantních proteinů *Varroa* u 15% polyakrylamidového 2D-gelu

Spot	Skóre	Molekulová hmotnost	Identifikační číslo	Popis proteinu
51	83	40322	gi 157830286	Chain A, Transition State Structure Of Arginine Kinase
52	108	40697	gi 156938897	arginine kinase [<i>Dermatophagoides farinae</i>]
53	155	40697	gi 156938897	arginine kinase [<i>Dermatophagoides farinae</i>]
54	155	22800	gi 197261179	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [<i>Cherax preissii</i>]
55	134	36052	gi 190014502	putative glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [<i>Gammarus locusta</i>]
56	178	35830	gi 40887061	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [<i>Cherax quadricarinatus</i>]
57	163	36174	gi 210038269	glycerol 3-phosphate dehydrogenase [<i>Suberites domuncula</i>]
72	88	42236	gi 161661023	actin 5C [<i>Lycosa singoriensis</i>]
84	94	14904	gi 1019906	Cu,Zn superoxide dismutase [<i>Drosophila saltans</i>]
85	195	17922	gi 260805156	hypothetical protein BRAFLDRAFT_122621 [<i>Branchiostoma floridae</i>]
96	367	17214	gi 26353460	unnamed protein product [<i>Mus musculus</i>]
99	77	25341	gi 281345655	hypothetical protein PANDA_006586 [<i>Ailuropoda melanoleuca</i>]

4.3.2.2. Larva



Obrázek č. 22: Reprezentativní dvourozměrná elektroforéza proteinů larvy. Legenda: černě – signifikantní proteiny, šedě – nesignifikantní proteiny.

Tabulka č. 6: Přehled identifikovaných signifikantních proteinů larvy u polyakrylamidového 2D-gelu

Spot	Skóre	Molekulová hmotnost	Identifikační číslo	Popis proteinu
1	348	98840	gi 66499419	PREDICTED: similar to Puromycin sensitive aminopeptidase CG1009-PC, isoform C isoform 1 [<i>Apis mellifera</i>]
3	294	66754	gi 94400901	alpha-glucosidase [<i>Apis mellifera</i>]
4	355	111862	gi 290883065	hexamerin 110 [<i>Apis mellifera</i>]
5	336	111862	gi 290883065	hexamerin 110 [<i>Apis mellifera</i>]
6	498	111862	gi 290883065	hexamerin 110 [<i>Apis mellifera</i>]
7	541	79535	gi 58585148	hexamerin 70b [<i>Apis mellifera</i>]
8	488	79535	gi 58585148	hexamerin 70b [<i>Apis mellifera</i>]
9	272	79535	gi 58585148	hexamerin 70b [<i>Apis mellifera</i>]
10	262	71383	gi 229892210	heat shock protein cognate 4 [<i>Apis mellifera</i>]
11	250	71383	gi 229892210	heat shock protein cognate 4 [<i>Apis mellifera</i>]
12	244	75642	gi 229892203	heat shock protein cognate 5 [<i>Apis mellifera</i>]
13	448	75642	gi 229892203	heat shock protein cognate 5 [<i>Apis mellifera</i>]
14	307	47487	gi 66545506	PREDICTED: similar to Calreticulin CG9429-PA isoform 1 [<i>Apis mellifera</i>]
15	250	49311	gi 58585098	major royal jelly protein 1 [<i>Apis mellifera</i>]
16	294	49311	gi 58585098	major royal jelly protein 1 [<i>Apis mellifera</i>]
18	307	49311	gi 58585098	major royal jelly protein 1 [<i>Apis mellifera</i>]
19	270	60546	gi 66547450	PREDICTED: similar to 60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor (Hsp60) (60 kDa chaperonin
20	291	51441	gi 58585108	major royal jelly protein 2 precursor [<i>Apis mellifera</i>]
21	291	49311	gi 58585098	major royal jelly protein 1 [<i>Apis mellifera</i>]
22	109	45664	gi 66526635	PREDICTED: similar to CG31075-PA [<i>Apis mellifera</i>]
23	435	62006	gi 288872651	major royal jelly protein [<i>Apis mellifera</i>]
24	78	62148	gi 66561330	PREDICTED: similar to Phosphogluconate mutase CG5165-PA [<i>Apis mellifera</i>]
25	222	81549	gi 149939403	hexamerin [<i>Apis mellifera</i>]
26	363	81549	gi 149939403	hexamerin [<i>Apis mellifera</i>]
27	303	111862	gi 290883065	hexamerin 110 [<i>Apis mellifera</i>]
29	269	111862	gi 290883065	hexamerin 110 [<i>Apis mellifera</i>]
30	224	111862	gi 290883065	hexamerin 110 [<i>Apis mellifera</i>]
31	145	111862	gi 290883065	hexamerin 110 [<i>Apis mellifera</i>]
32	125	111862	gi 290883065	hexamerin 110 [<i>Apis mellifera</i>]
33	197	40181	gi 110761968	PREDICTED: similar to Enolase CG17654-PA, isoform A, partial [<i>Apis mellifera</i>]
34	177	62006	gi 288872651	major royal jelly protein [<i>Apis mellifera</i>]
35	381	62006	gi 288872651	major royal jelly protein [<i>Apis mellifera</i>]
36	198	62006	gi 288872651	major royal jelly protein [<i>Apis mellifera</i>]

Pokračování tabulky č. 6: Přehled identifikovaných signifikantních proteinů larvy u polyakrylamidového 2D-gelu

Spot	Skóre	Molekulová hmotnost	Identifikační číslo	Popis proteinu
37	270	40181	gj 110761968	PREDICTED: similar to Enolase CG17654-PA, isoform A, partial [<i>Apis mellifera</i>]
38	366	51441	gj 58585108	major royal jelly protein 2 precursor [<i>Apis mellifera</i>]
39	418	51441	gj 58585108	major royal jelly protein 2 precursor [<i>Apis mellifera</i>]
40	344	51441	gj 58585108	major royal jelly protein 2 precursor [<i>Apis mellifera</i>]
41	371	51441	gj 58585108	major royal jelly protein 2 precursor [<i>Apis mellifera</i>]
42	385	51441	gj 58585108	major royal jelly protein 2 precursor [<i>Apis mellifera</i>]
43	163	41913	gj 215882295	actin isoform 1 [<i>Holothuria glaberrima</i>]
44	315	51441	gj 58585108	major royal jelly protein 2 precursor [<i>Apis mellifera</i>]
45	333	40325	gj 58585146	arginine kinase [<i>Apis mellifera</i>]
46	157	51441	gj 58585108	major royal jelly protein 2 precursor [<i>Apis mellifera</i>]
47	381	51441	gj 58585108	major royal jelly protein 2 precursor [<i>Apis mellifera</i>]
48	87	13786	gj 66551272	PREDICTED: similar to alcohol dehydrogenase, iron containing, 1, partial [<i>Apis mellifera</i>]
49	240	71383	gj 229892210	heat shock protein cognate 4 [<i>Apis mellifera</i>]
50	327	51441	gj 58585108	major royal jelly protein 2 precursor [<i>Apis mellifera</i>]
51	408	51441	gj 58585108	major royal jelly protein 2 precursor [<i>Apis mellifera</i>]
52	357	62006	gj 288872651	major royal jelly protein [<i>Apis mellifera</i>]
53	309	51441	gj 58585108	major royal jelly protein 2 precursor [<i>Apis mellifera</i>]
54	344	51441	gj 58585108	major royal jelly protein 2 precursor [<i>Apis mellifera</i>]
55	365	51441	gj 58585108	major royal jelly protein 2 precursor [<i>Apis mellifera</i>]
56	372	66055	gj 56422035	major royal jelly protein 3 [<i>Apis mellifera carnica</i>]
57	466	62006	gj 288872651	major royal jelly protein [<i>Apis mellifera</i>]
58	320	62006	gj 288872651	major royal jelly protein [<i>Apis mellifera</i>]
59	410	51441	gj 58585108	major royal jelly protein 2 precursor [<i>Apis mellifera</i>]
61	366	51441	gj 58585108	major royal jelly protein 2 precursor [<i>Apis mellifera</i>]
63	313	36009	gj 209180477	lambda crystallin-like protein [<i>Apis mellifera</i>]
64	206	49311	gj 58585098	major royal jelly protein 1 [<i>Apis mellifera</i>]
65	157	22867	gj 110776423	PREDICTED: similar to yellow-h CG1629-PA, partial [<i>Apis mellifera</i>]
66	162	22867	gj 110776423	PREDICTED: similar to yellow-h CG1629-PA, partial [<i>Apis mellifera</i>]
67	162	28340	gj 226446417	heat shock protein 90 [<i>Apis mellifera</i>]
68	242	62006	gj 288872651	major royal jelly protein [<i>Apis mellifera</i>]
69	253	62006	gj 288872651	major royal jelly protein [<i>Apis mellifera</i>]
70	223	66055	gj 56422035	major royal jelly protein 3 [<i>Apis mellifera carnica</i>]
71	378	62006	gj 288872651	major royal jelly protein [<i>Apis mellifera</i>]
72	348	62006	gj 288872651	major royal jelly protein [<i>Apis mellifera</i>]

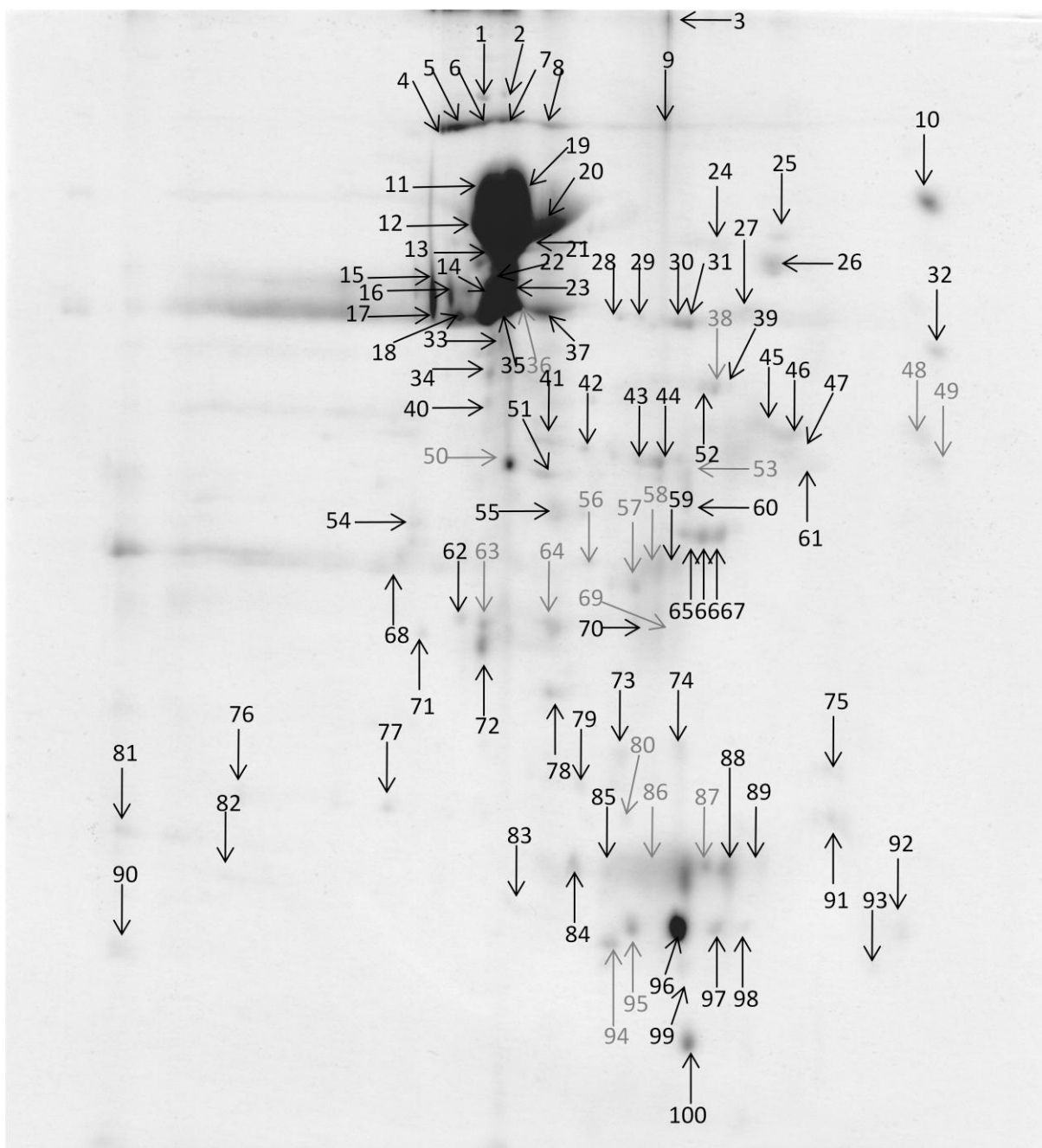
Pokračování tabulky č. 6: Přehled identifikovaných signifikantních proteinů larvy u polyakrylamidového 2D-gelu

Spot	Skóre	Molekulová hmotnost	Identifikační číslo	Popis proteinu
73	296	51441	gj 58585108	major royal jelly protein 2 precursor [<i>Apis mellifera</i>]
74	411	51441	gj 58585108	major royal jelly protein 2 precursor [<i>Apis mellifera</i>]
75	272	51441	gj 58585108	major royal jelly protein 2 precursor [<i>Apis mellifera</i>]
76	386	51441	gj 58585108	major royal jelly protein 2 precursor [<i>Apis mellifera</i>]
77	310	51441	gj 58585108	major royal jelly protein 2 precursor [<i>Apis mellifera</i>]
78	237	51441	gj 58585108	major royal jelly protein 2 precursor [<i>Apis mellifera</i>]
80	170	59486	gj 66544702	PREDICTED: similar to CG8258-PA [<i>Apis mellifera</i>]
81	242	51441	gj 58585108	major royal jelly protein 2 precursor [<i>Apis mellifera</i>]
82	329	51441	gj 58585108	major royal jelly protein 2 precursor [<i>Apis mellifera</i>]
83	385	51441	gj 58585108	major royal jelly protein 2 precursor [<i>Apis mellifera</i>]
84	368	51441	gj 58585108	major royal jelly protein 2 precursor [<i>Apis mellifera</i>]
86	188	28173	gj 48097086	PREDICTED: similar to 14-3-3-like protein (Leonardo protein) (14-3-3 zeta) isoform 1 [<i>Apis mellifera</i>]
87	83	28171	gj 66517155	PREDICTED: similar to 14-3-3 CG17870-PA, isoform A isoform 2 [<i>Apis mellifera</i>]
89	155	49311	gj 58585098	major royal jelly protein 1 [<i>Apis mellifera</i>]
90	194	17689	gj 66534655	PREDICTED: similar to Glutathione S transferase S1 CG8938-PA, isoform A, partial [<i>Apis mellifera</i>]
91	153	49311	gj 58585098	major royal jelly protein 1 [<i>Apis mellifera</i>]
92	107	28934	gj 48100320	PREDICTED: similar to Proteasome subunit beta type 4 precursor (Proteasome beta chain) (Macropain b)
94	178	58444	gj 110767398	PREDICTED: similar to Proteasome subunit alpha type 4 (Proteasome component C9) (Macropain subunit)
95	133	35396	gj 66550890	PREDICTED: similar to Phosphoglyceromutase CG1721-PA, isoform A [<i>Apis mellifera</i>]
96	124	111862	gj 290883065	hexamerin 110 [<i>Apis mellifera</i>]
97	81	58322	gj 66533395	PREDICTED: similar to CG7033-PA, isoform A isoform 1 [<i>Apis mellifera</i>]
98	170	42361	gj 226446429	heat shock protein 90 [<i>Apis mellifera</i>]
100	84	49311	gj 58585098	major royal jelly protein 1 [<i>Apis mellifera</i>]
101	223	21944	gj 66548188	PREDICTED: similar to thioredoxin peroxidase 1 CG1633-PA, isoform A isoform 1 [<i>Apis mellifera</i>]
102	199	21944	gj 66548188	PREDICTED: similar to thioredoxin peroxidase 1 CG1633-PA, isoform A isoform 1 [<i>Apis mellifera</i>]
103	98	49240	gj 110761214	PREDICTED: similar to translation elongation factor 1-gamma isoform 2 [<i>Apis mellifera</i>]

Pokračování tabulky č. 6: Přehled identifikovaných signifikantních proteinů larvy u polyakrylamidového 2D-gelu

Spot	Skóre	Molekulová hmotnost	Identifikační číslo	Popis proteinu
104	116	21944	gi 66548188	PREDICTED: similar to thioredoxin peroxidase 1 CG1633-PA, isoform A isoform 1 [<i>Apis mellifera</i>]
105	170	42361	gi 226446429	heat shock protein 90 [<i>Apis mellifera</i>]
106	171	17049	gi 110751158	PREDICTED: similar to Cofilin/actin-depolymerizing factor homolog (Protein D61) (Protein twinstar) [<i>Apis mellifera</i>]
107	194	15795	gi 295849268	superoxide dismutase 1 [<i>Apis mellifera</i>]

4.3.2.3. Kukla



Obrázek č. 23: Reprezentativní dvourozměrná elektroforéza proteinů kukly. Legenda: černě – signifikantní proteiny, šedě – nesignifikantní proteiny.

Tabulka č. 7: Přehled identifikovaných signifikantních proteinů kukly u polyakrylamidového 2D-gelu

Spot	Skóre	Molekulová hmotnost	Identifikační číslo	Popis proteinu
1	207	39975	gi 110748949	PREDICTED: similar to Aldolase CG6058-PF, isoform F [<i>Apis mellifera</i>]
2	524	79535	gi 58585148	hexamerin 70b [<i>Apis mellifera</i>]
3	497	79535	gi 58585148	hexamerin 70b [<i>Apis mellifera</i>]
4	269	81549	gi 149939403	hexamerin [<i>Apis mellifera</i>]
5	221	111862	gi 290883065	hexamerin 110 [<i>Apis mellifera</i>]
6	190	111862	gi 290883065	hexamerin 110 [<i>Apis mellifera</i>]
7	310	79535	gi 58585148	hexamerin 70b [<i>Apis mellifera</i>]
8	222	111862	gi 290883065	hexamerin 110 [<i>Apis mellifera</i>]
9	459	79535	gi 58585148	hexamerin 70b [<i>Apis mellifera</i>]
10	315	176717	gi 110762106	PREDICTED: hypothetical protein [<i>Apis mellifera</i>]
11	407	79535	gi 58585148	hexamerin 70b [<i>Apis mellifera</i>]
12	103	176717	gi 110762106	PREDICTED: hypothetical protein [<i>Apis mellifera</i>]
13	281	176717	gi 110762106	PREDICTED: hypothetical protein [<i>Apis mellifera</i>]
14	411	79535	gi 58585148	hexamerin 70b [<i>Apis mellifera</i>]
15	215	176717	gi 110762106	PREDICTED: hypothetical protein [<i>Apis mellifera</i>]
16	239	111862	gi 290883065	hexamerin 110 [<i>Apis mellifera</i>]
17	242	111862	gi 290883065	hexamerin 110 [<i>Apis mellifera</i>]
18	296	111862	gi 290883065	hexamerin 110 [<i>Apis mellifera</i>]
19	219	79535	gi 58585148	hexamerin 70b [<i>Apis mellifera</i>]
20	320	81549	gi 149939403	hexamerin [<i>Apis mellifera</i>]
21	302	81549	gi 149939403	hexamerin [<i>Apis mellifera</i>]
22	120	45664	gi 66526635	PREDICTED: similar to CG31075-PA [<i>Apis mellifera</i>]
23	175	81549	gi 149939403	hexamerin [<i>Apis mellifera</i>]
24	85	45664	gi 66526635	PREDICTED: similar to CG31075-PA [<i>Apis mellifera</i>]
25	207	89467	gi 66534286	PREDICTED: similar to TER94 CG2331-PA, isoform A isoform 1 [<i>Apis mellifera</i>]
26	119	75642	gi 229892203	heat shock protein cognate 5 [<i>Apis mellifera</i>]
27	92	81522	gi 160425209	hexamerin 70a [<i>Apis mellifera</i>]
28	230	176717	gi 110762106	PREDICTED: hypothetical protein [<i>Apis mellifera</i>]
29	159	75642	gi 229892203	heat shock protein cognate 5 [<i>Apis mellifera</i>]
30	130	71383	gi 229892210	heat shock protein cognate 4 [<i>Apis mellifera</i>]
31	262	79535	gi 58585148	hexamerin 70b [<i>Apis mellifera</i>]
32	243	71383	gi 229892210	heat shock protein cognate 4 [<i>Apis mellifera</i>]
33	213	79535	gi 58585148	hexamerin 70b [<i>Apis mellifera</i>]
34	132	79535	gi 58585148	hexamerin 70b [<i>Apis mellifera</i>]
35	186	111862	gi 290883065	hexamerin 110 [<i>Apis mellifera</i>]
37	82	10109	gi 27450108	heat shock protein 90 [<i>Pratylenchus teres vandenbergae</i>]
39	174	60546	gi 66547450	PREDICTED: similar to 60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor (Hsp60)

Pokračování tabulky č. 7: Přehled identifikovaných signifikantních proteinů kukly u polyakrylamidového 2D-gelu

Spot	Skóre	Molekulová hmotnost	Identifikační číslo	Popis proteinu
40	184	49416	gi 110763974	PREDICTED: similar to CG31075-PA isoform 1 [<i>Apis mellifera</i>]
41	277	49416	gi 110763974	PREDICTED: similar to CG31075-PA isoform 1 [<i>Apis mellifera</i>]
42	454	60546	gi 66547450	PREDICTED: similar to 60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor (Hsp60)
43	147	60546	gi 66547450	PREDICTED: similar to 60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor (Hsp60)
44	210	40181	gi 110761968	PREDICTED: similar to Enolase CG17654-PA, isoform A, partial [<i>Apis mellifera</i>]
45	247	50617	gi 66521545	PREDICTED: similar to Tubulin alpha-1 chain [<i>Apis mellifera</i>]
46	430	50599	gi 48095525	PREDICTED: similar to -Tubulin at 56D CG9277-PB, isoform B [<i>Apis mellifera</i>]
47	425	50599	gi 48095525	PREDICTED: similar to -Tubulin at 56D CG9277-PB, isoform B [<i>Apis mellifera</i>]
51	167	49416	gi 110763974	PREDICTED: similar to CG31075-PA isoform 1 [<i>Apis mellifera</i>]
52	83	27631	gi 58585184	short-chain dehydrogenase/reductase [<i>Apis mellifera</i>]
54	195	40181	gi 110761968	PREDICTED: similar to Enolase CG17654-PA, isoform A, partial [<i>Apis mellifera</i>]
55	191	40272	gi 66550553	PREDICTED: similar to CG18473-PA [<i>Apis mellifera</i>]
60	246	55936	gi 66530423	PREDICTED: similar to Aldehyde dehydrogenase CG3752-PA isoform 1 [<i>Apis mellifera</i>]
61	206	42082	gi 164451511	actin [<i>Culex nigripalpus</i>]
62	155	37217	gi 66530373	PREDICTED: similar to CG3609-PA isoform 2 [<i>Apis mellifera</i>]
65	282	42010	gi 284027006	beta actin [<i>Liposcelis bostrychophila</i>]
66	289	42082	gi 164451511	actin [<i>Culex nigripalpus</i>]
67	98	36193	gi 66506786	PREDICTED: similar to CG5362-PA isoform 1 [<i>Apis mellifera</i>]
68	239	36873	gi 110763386	PREDICTED: similar to CG10638-PA, isoform A isoform 1 [<i>Apis mellifera</i>]
70	158	40325	gi 58585146	arginine kinase [<i>Apis mellifera</i>]
71	152	25607	gi 110757651	PREDICTED: similar to CG14207-PB, isoform B isoform 1 [<i>Apis mellifera</i>]
72	162	27631	gi 58585184	short-chain dehydrogenase/reductase [<i>Apis mellifera</i>]
73	282	32875	gi 110762382	PREDICTED: similar to spermidine synthase [<i>Apis mellifera</i>]

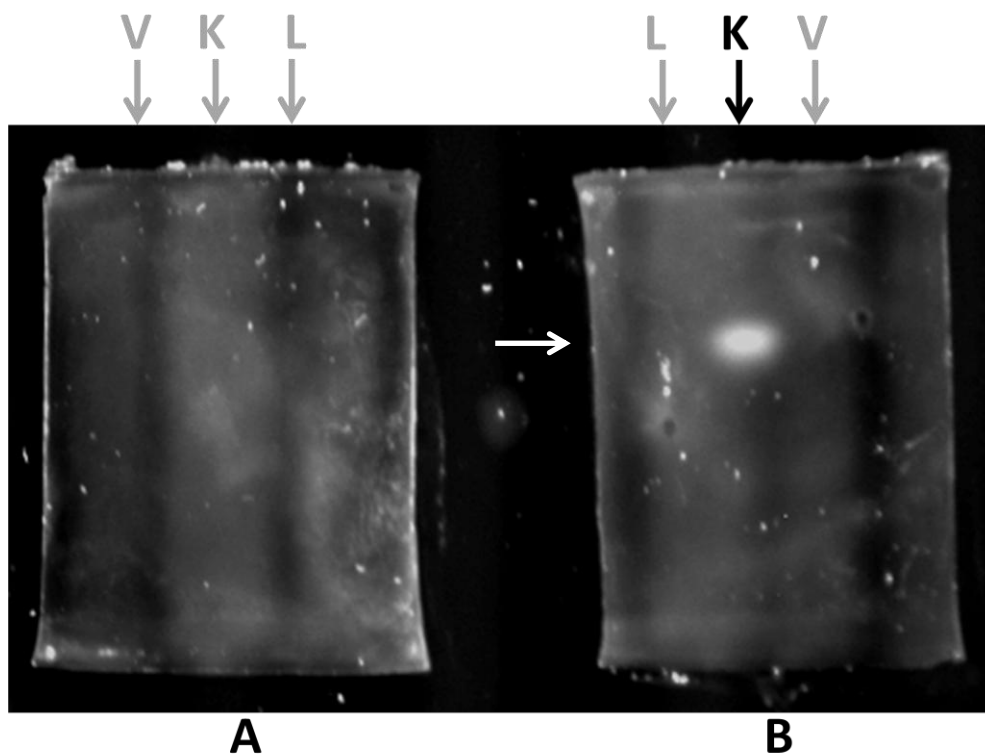
Pokračování tabulky č. 7: Přehled identifikovaných signifikantních proteinů kukly u polyakrylamidového 2D-gelu

Spot	Skóre	Molekulová hmotnost	Identifikační číslo	Popis proteinu
74	353	42706	gi 48097100	PREDICTED: similar to yippee interacting protein 2 CG4600-PA [<i>Apis mellifera</i>]
75	165	36459	gi 66525576	PREDICTED: similar to CG6084-PA, isoform A isoform 1 [<i>Apis mellifera</i>]
76	160	35668	gi 48099074	PREDICTED: similar to CG9119-PA [<i>Apis mellifera</i>]
77	109	31952	gi 66517490	PREDICTED: similar to Putative deoxyribose-phosphate aldolase (Phosphodeoxyriboaldolase)
78	160	25232	gi 283436152	peroxiredoxin-like protein [<i>Apis mellifera</i>]
79	141	25232	gi 283436152	peroxiredoxin-like protein [<i>Apis mellifera</i>]
81	162	27631	gi 58585184	short-chain dehydrogenase/reductase [<i>Apis mellifera</i>]
82	110	29422	gi 58585222	take-out-like carrier protein [<i>Apis mellifera</i>]
83	240	26939	gi 148224276	triosephosphate isomerase [<i>Apis mellifera</i>]
84	151	29157	gi 66518230	PREDICTED: similar to 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase [<i>Apis mellifera</i>]
85	201	23687	gi 110763671	PREDICTED: similar to CG6180-PA isoform 2 [<i>Apis mellifera</i>]
88	149	29264	gi 48096523	PREDICTED: similar to 14-3-3 CG31196-PC, isoform C isoform 1 [<i>Apis mellifera</i>]
89	93	27631	gi 58585184	short-chain dehydrogenase/reductase [<i>Apis mellifera</i>]
90	213	27631	gi 58585184	short-chain dehydrogenase/reductase [<i>Apis mellifera</i>]
91	273	35396	gi 66550890	PREDICTED: similar to Phosphoglyceromutase CG1721-PA, isoform A [<i>Apis mellifera</i>]
92	209	21944	gi 66548188	PREDICTED: similar to thioredoxin peroxidase 1 CG1633-PA, isoform A isoform 1 [<i>Apis mellifera</i>]
93	143	17689	gi 66534655	PREDICTED: similar to Glutathione S transferase S1 CG8938-PA, isoform A, partial [<i>Apis mellifera</i>]
96	524	21335	gi 166795901	apolipoporphin-III-like protein [<i>Apis mellifera</i>]
97	124	17689	gi 66534655	PREDICTED: similar to Glutathione S transferase S1 CG8938-PA, isoform A, partial [<i>Apis mellifera</i>]
98	92	17689	gi 66534655	PREDICTED: similar to Glutathione S transferase S1 CG8938-PA, isoform A, partial [<i>Apis mellifera</i>]
99	134	17689	gi 66534655	PREDICTED: similar to Glutathione S transferase S1 CG8938-PA, isoform A, partial [<i>Apis mellifera</i>]
100	156	17216	gi 66510528	PREDICTED: similar to Fkbp13 CG9847-PA, isoform A, partial [<i>Apis mellifera</i>]

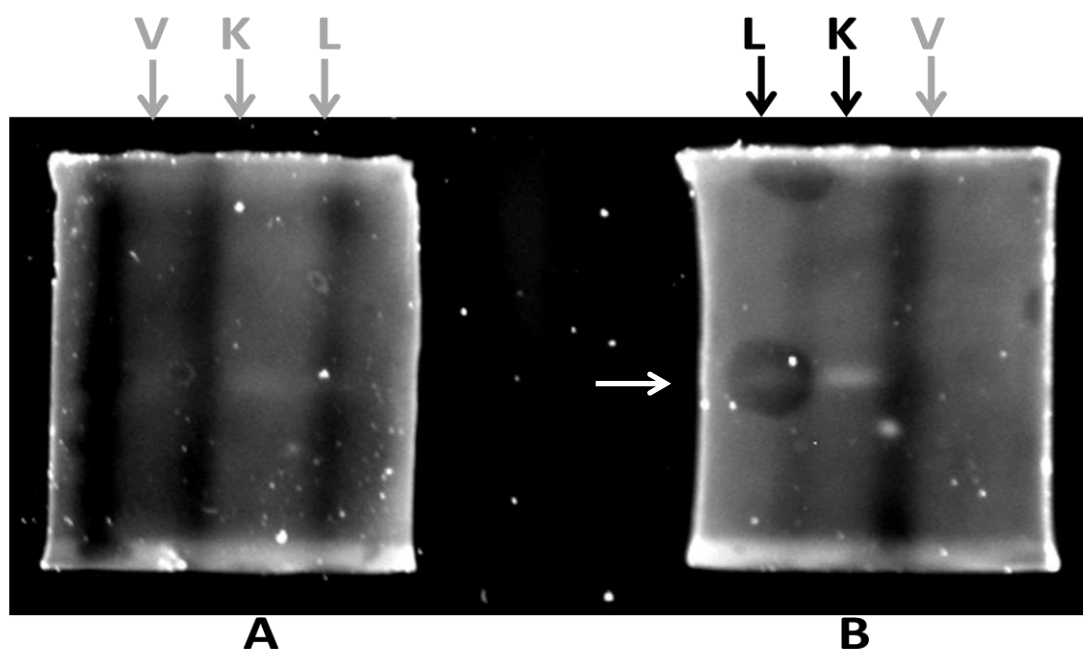
4.3.3. Zymogramy

Pro analýzu proteinů z homogenátů *Varroa*, včelí kukly a larvy byly použity fluorescenční substráty. Přehled výsledků je uveden v tabulce č. 8. Pro prokázání specifity některých enzymů vůči substrátům byly použity jejich inhibitory, konkrétně pro trypsin a chymotrypsin. Trypsinový inhibitor (T7254) prokázal specifitu trypsinu u kukly a chymotrypsinový inhibitor (T4376) prokázal specifitu chymotrypsinu u kukly a larvy.

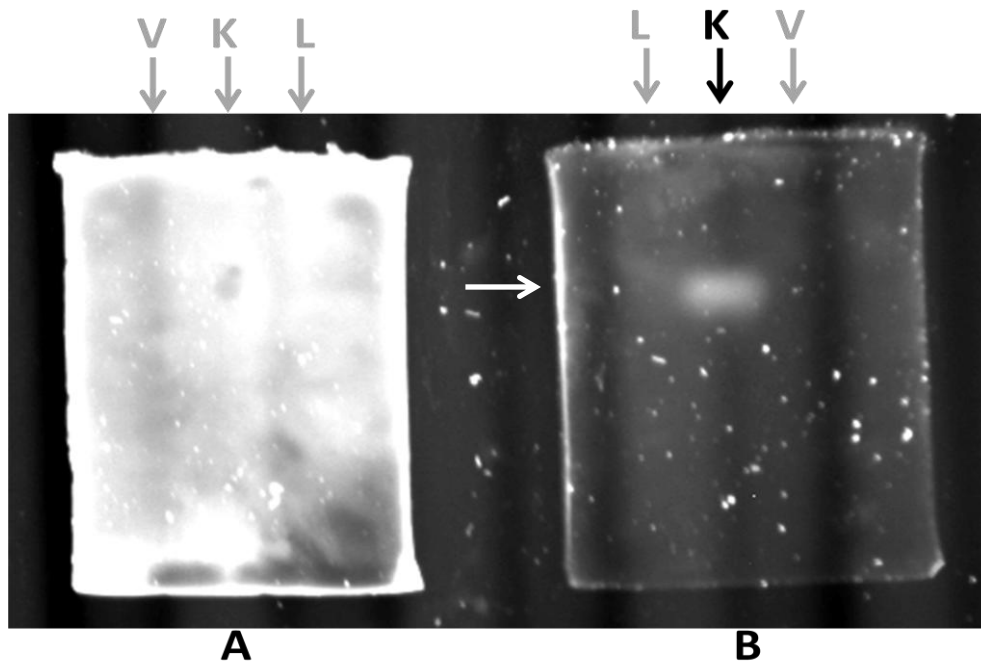
V analyzovaném vzorku *Varroa* byla z testovaných substrátů zjištěna aktivita pro β -glukosidázový substrát (M3633) (Obr. č. 29) a pro cathepsin D substrát (C6983) Obr. č 27). Pro cathepsin D bylo možno rozeznat 5 bandů u *Varroa*. U včelí kukly byla v zymogramech detekována aktivita pro trypsin (Obr. č. 24), chymotrypsin (Obr. č. 25), cathepsin B (Obr. č. 26), lysozym (endochitinázy) (Obr. č. 27) a α -glukosidázy (Obr. č. 28). Lysozymový substrát (M5639) lze použít pro analýzu lysozymu, ale i endochitináz. Vzhledem k tomu, že lysozym má obecně molekulovou hmotnost kolem 14kDa a pozice detekované aktivity v zymogramu odpovídala cca 100 kDa, je pravděpodobné, že v zymogramu byly detekovány endochitinázy. Ve stádiu kukly byla slabá aktivita sledována také pro cathepsin D (Obr. č 27). U včelí larvy byla v zymogramech prokázána aktivita pouze u substrátu pro chymotrypsin (Obr. č. 25) a α -glukosidázy (Obr. č. 28), které zároveň ukázaly podobnost s enzymovou aktivitou ve stadiu kukly.



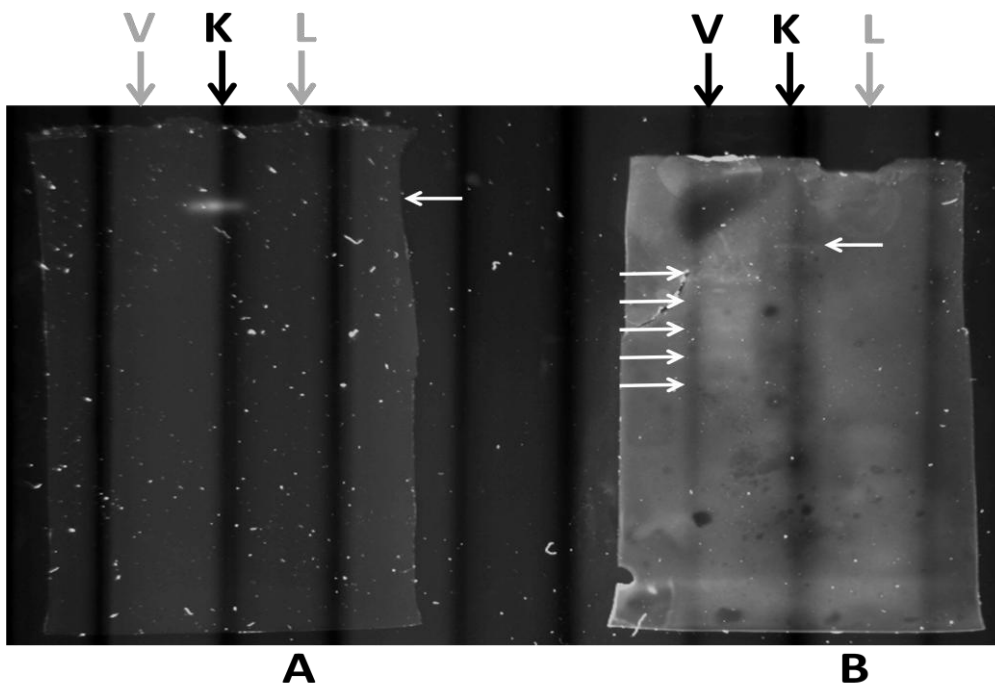
Obrázek č. 24: Identifikace trypsinové aktivity fluorescenčním substrátem B7260 u *Varroa* (V), kukly (K), larvy (L) za použití inhibitoru trypsinu T7254 (A) a bez inhibitoru (B).



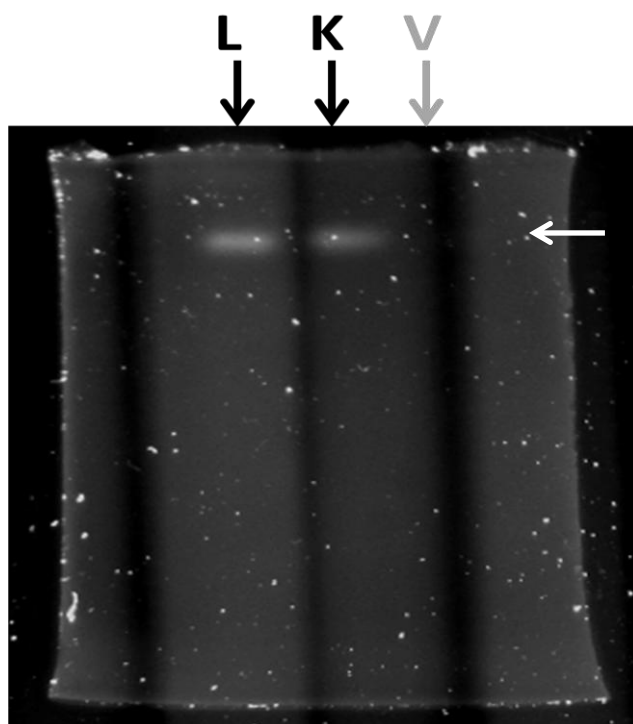
Obrázek č. 25: Identifikace chymotrypsinové aktivity fluorescenčním substrátem A3401 u *Varroa* (V), kukly (K), larvy (L) za použití inhibitoru chymotrypsinu T4376 (A) a bez inhibitoru (B).



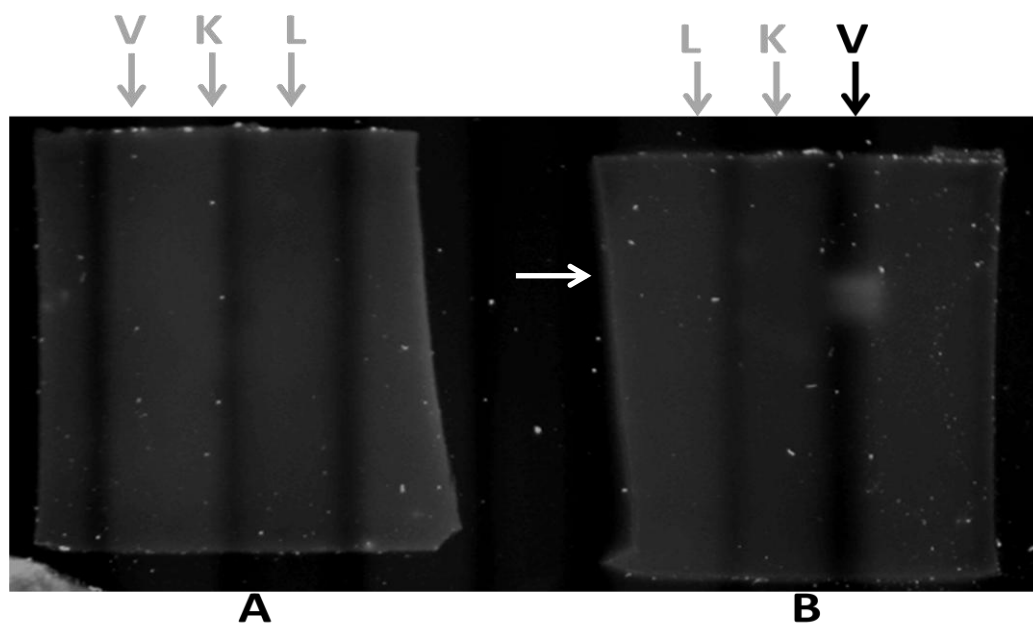
Obrázek č. 26: Identifikace aktivity cathepsinu H fluorescenčním substrátem A2027 (**A**). Bez aktivity. Identifikace aktivity cathepsinu B fluorescenčním substrátem C5429 (**B**) u *Varroa* (V), kukly (K), larvy (L).



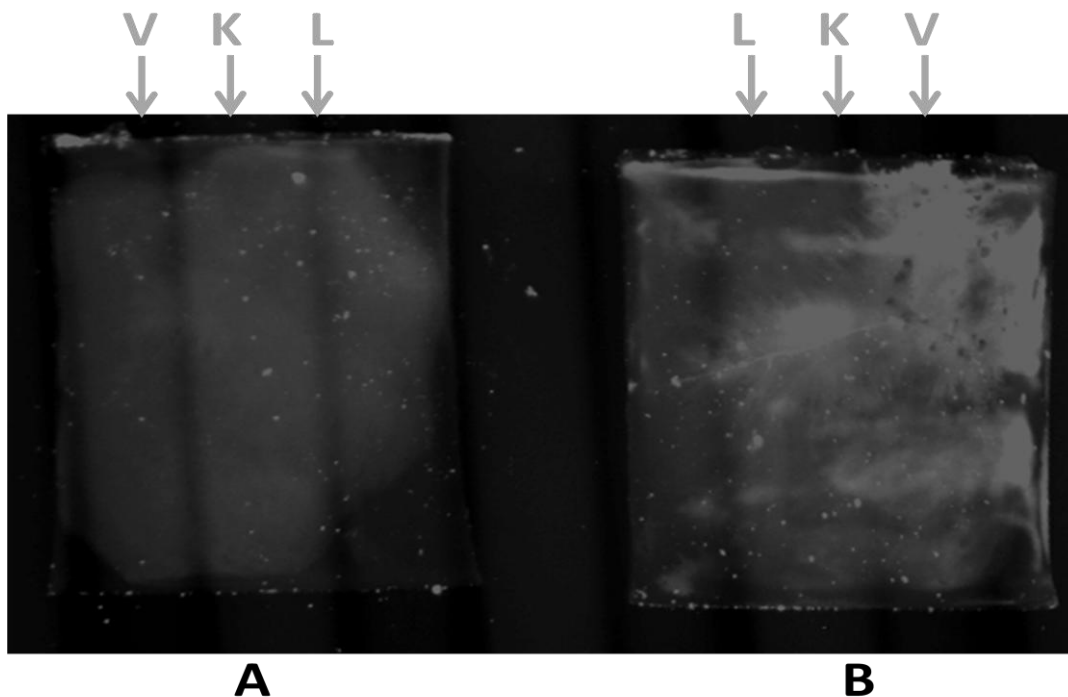
Obrázek č. 27: Identifikace lysozymové aktivity fluorescenčním substrátem M5639 (**A**) u *Varroa* (V), kukly (K), larvy (L). Identifikace aktivity cathepsinu D fluorescenčním substrátem C6983 (**B**) u *Varroa* (V), kukly (K), larvy (L).



Obrázek č. 28: Identifikace aktivity α -glukosidáz fluorescenčním substrátem M9766 u *Varroa* (V), kukly (K), larvy (L).



Obrázek č. 29: Identifikace aktivity β -galaktosidáz fluorescenčním substrátem M1633 (A) u *Varroa* (V), kukly (K), larvy (L). Bez aktivity. Identifikace aktivity β -glukosidáz fluorescenčním substrátem M3633 (B) u *Varroa* (V), kukly (K), larvy (L).



Obrázek č. 30: Identifikace aktivity cathepsinu B fluorescenčním substrátem C5429 za použití inhibitoru trypsinu T7254 (**A, B**) u *Varroa* (V), kukly (K), larvy (L). Bez aktivity.

Tabulka č. 8: Přehled výsledků enzymatické analýzy

	substrát/inhibitor	<i>Varroa</i>	kukla	larva	čas
B7260	sub. pro trypsin, papain	N	*	N	35min
A3401	sub. pro chymotrypsin	N	*	*	45min
C5429	sub. pro cathepsin B, trypsin	N	*	N	30min
A2027	sub. pro cathepsin H, amidopeptidázy	N	N	N	30min
A3401+T4376	sub. pro chymotrypsin+inh. chymotr.	N	N	N	45min
B7260+T7254	sub. pro trypsin+ inh. trypsinu	N	N	N	35min
C6983	sub. pro Cathepsin D	*	*	N	30min
M5639	sub. pro lysozym, endochitinázy	N	*	N	15min
M9766	sub. pro α -glukosidázy	N	*	*	15min
M3633	sub. Pro β -glukosidázy	*	N	N	30min.
M1633	sub. Pro β -galaktosidázy	N	N	N	30min.
C5429+ T7254	sub. Pro cathepsin B + inh. Trypsinu	N	N	N	30min.

4.4. Diskuze

Hlavním cílem této práce bylo studium fyziologie roztoče *V. destructor* a vývojových stádií *A. mellifera*, na kterých nejvíce parazituje. Pro studium bylo využito proteomického přístupu, enzymatiky a histologie.

Anatomie roztoče byla studována pomocí parafinové histologie. Histologické řezy byly barveny hematoxylinem, který se používá pro barvení jader buněk (Avwioro, 2011). Pro průkaz polysacharidů se používala PAS reakce (Vacek, 1988). U obou těchto barvení bylo na řezech patrné střevo roztoče a mozek, kterým procházel oesophagus. Mozek zároveň zaujímal velkou část těla roztoče. Velkou část roztoče zabírá rozvětvená trávicí soustava, jež je typická pro *Mesostigmata* (Alberti & Coons, 1999). U PAS reakce bylo na řezu možno rozpoznat také vajíčko, vaječníky, svaly a malphigická trubice. Dříve byla popsána anatomie *V. jacobsoni* (Ruijter & Kaas, 1983), jehož anatomii byly naše výsledky podobné. Výsledky histologie jsou využitelné pro zorientování se ve vnitřní struktuře ektoparazitického roztoče *Varroa* a mohou být v budoucnu využity například pro lokalizaci proteinů nebo entomopatogenů (viry, bakterie).

Výsledky proteomické analýzy a jejich porovnání mezi roztočem a dvěma vývojovými stádií včely se značně lišily. Řadu proteinů roztoče se nepodařilo identifikovat. Naopak velmi uspokojivý výsledek byl získán z proteomické analýzy včely. Toto je způsobeno tím, že genom *Varroa* (Evans, 2010) není uspokojivě anotován. Anotovaný genom by v budoucnu měl jednoznačně napomoci k lepší identifikaci proteinů roztoče. K tomuto účelu bude možno využít získaná spektra z analýzy hmotnostní spektrometrií. Osekvenování a anotace genomu včely (Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006), které v minulosti proběhlo, pomohlo k úspěšné identifikaci v této práci. U roztoče převažovaly proteiny hemelipoglycoprotein precursor, arginin kináza, aktin, tropomyozin a včelí hexamerin 70a. Naproti tomu u včely převažovaly proteiny hexamerin, heat shock protein či major royal jelly protein. Hexamerin, který se vyskytoval u roztoče *Varroa* pocházel ze včely *A. mellifera*. Vzhledem k tomu, že se arginin kináza hojně vyskytovala v analýze proteinů *Varroa* a ve vzorcích včely ne, mohly by například tyto proteiny v budoucnu využít pro cílení akaricidů právě proti těmto proteinům. Arginin kinázy byly například identifikovány i u prachových roztočů a jsou zkoumány v souvislosti s alergiemi, s nimiž vykazaly tyto proteiny *Varroa* strukturní shodu (Hales *et al.*, 2006). Hemelipoglycoprotein precursor, který se vyskytoval u roztoče *Varroa*, slouží ke skladování a vázání hemu, a také se pravděpodobně účastní procesů

spojených s vrozenou imunitou stejně jako tomu je u klíštěte *Dermacentor marginatus* (Dupejova *et al.*, 2011).

U včely se výsledné proteiny lišily podle vzorku stádia. U vzorku kukly bylo identifikováno odlišné spektrum proteinů než u larvy. Nejmarkantnější byl rozdíl ve výskytu MRJP proteinů, které tvořily velkou část identifikovaných proteinů larvy, zatímco u stádia kukly se nevyskytovaly. Heat shock proteiny se u larvy vyskytovaly také mnohem více. Většinu proteinů u stádia kukly pak tvořily hexameriny. Tyto rozdíly jsou pravděpodobně způsobeny rozdílným způsobem života. Zatímco larva přijímá potravu během svého života, kukla je bez potravy, energii čerpá ze zásob a metamorfuje. Podle Chan & Foster (2008) je hlavním typem chování v larválním stádiu krmení, a tím i příprava na budoucí stádium kukly bez potravy. V tomto období je také nejmarkantnější syntéza hexamerinů a jejich vysoká přítomnost na konci vývojového stádia (Chan & Foster, 2008). Hexamerin byl jedním z nejabundantnějších proteinů larvy při analýze hmotnostním spektrometrem. Ve studii Bogaerts *et al.* (2009) byla vytvořena proteomická mapa včely, ovšem poddruhem *A. mellifera carnica*. V této studii byly nejabundantnějšími proteiny enzymy a poté transportní a skladovací proteiny. Nepřehlédnutelným faktem ovšem je, že nezanedbatelné množství tvořily proteiny virového (Bogaerts *et al.*, 2009).

Hexameriny jsou proteiny, které u hmyzu ztratily svou schopnost vázat měďnaté ionty a transportovat kyslík a u včel plní funkci zásobních proteinů (Martins, 2010). Hexamerin je klíčovým proteinem, který se u včely vyskytuje nejvíce v pozdním larválním stádiu a na začátku stádia kukly. Ve stádiu kukly dochází k postupnému poklesu obsahu hexamerinů. Pokles syntézy hexamerinů je dán zastavením přísunu potravy a metamorfózou hmyzu (Cunha *et al.*, 2005). V našich výsledcích byla potvrzena přítomnost hexamerinu jak u stádia larvy, tak u stádia kukly. Zejména vysoký obsah hexamerinu v kukle dokumentuje jejich kumulaci v souvislosti s metamorfózou. Nejčastěji se vyskytovaly formy hexamerinu 70b a 110. Hexamerin 70b byl mnohem častěji identifikován u stádia kukly, než u stádia larvy. Oproti tomu hexamerin 110 byl hlavním hexamerinem ve stádiu larvy. Identifikované formy hexamerinů u stádia larvy (70b a 110) jsou typické pro toto stádium, spolu s hexameriny typu 70a a 70c (Martins, 2010). Hexamerin 70a se u stádia larvy v našich výsledcích identifikován nebyl, byl však identifikován u kukly a také ve vzorku *Varroa*. Hexamerin 70a se běžně vyskytuje u všech stádií včely (Danty *et al.*, 1998). Ze všech čtyř typů hexamerinů chyběl jediný hexamerin 70c, který se nevyskytoval jak u roztoče, tak u obou stádií včely. Vysvětlení

proč byl ve *Varroa* identifikován hexamerin včely je v tom, že se živí její hemolymfou, ve které je hexamerin zastoupen. Vzorky *Varroa* použité pro studii byly sbírány v listopadu, kdy jsou v úlu dlouhověké včely, které mají v hemolymfě dominantní hexamerin 70a (Erban *et al.*, 2012). Toto vysvětluje, proč byl ve vzorku *Varroa* nalezen pouze hexamerin 70a.

Major royal jelly proteiny (MRJP) se vyskytují v mateří kašičce, která slouží jako výhradní potrava larev v prvních instarech, později je tato potrava larev nahrazena pylem (Schmitzová *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2008). V našem vzorku larvy byl dle očekávání ve velké kvantitě identifikován MJRP, což koresponduje s tím, že se jednalo o rané stadium larvy. U stádia kukly se MRJP nevyskytovaly, protože jsou stejně jako pyl spotřebovány při růstu larvy a přeměněny na zásobní proteiny.

Heat shock protein je proteinem, jehož funkce se v organismu včely projeví, jakmile je včela vystavena vyšším teplotám (Chacon-Almeida *et al.*, 2000). Heat shock proteiny se podílí také na stimulaci vrozeného a adaptivního imunitního systému (Javid *et al.*, 2007). Tyto proteiny se v našich výsledcích vyskytovaly u obou stádií včely, nesrovnatelně více však u stádia larvy. Aktin identifikovaný u kukly i larvy se u včely vyskytuje jako strukturální protein (Kucharski & Maleszka, 2003). Byly identifikovány také proteiny související s oxidativním stresem jako glutathion S-transferáza (GST), superoxid dismutáza a thioredoxin peroxidáza (TPX). Všechny tyto enzymy mají v těle včely funkci antioxidantů (Corona & Robinson, 2006). Superoxid dismutáza se vyskytovala pouze u stádia larvy, zatímco jak TPX tak proteiny podobné GST se vyskytovaly u obou stádií včely. GST je proteinem důležitým pro metabolismus cizorodých látek a v ochraně proti oxidačnímu poškození (Corona & Robinson, 2006).

Zajímavým výsledkem je, že u *Varroa* byly identifikovány v zymogramech β -glukosidázy, zatímco u stádií včely detekovány nebyly. Podle Pontoh & Low (2001) jsou β -glukosidázy třeba u včely pravděpodobně produkovány v hltanových žlázách (Pontoh & Low, 2001). Trypsin, podobně jako chymotrypsin, je trávicí enzym patřící do skupiny serinových proteáz (Barrett & Rawlings, 1994). U substrátu pro trypsin byla fluorescence pozorována pouze u stádia kukly, která může využívat trypsin jako trávicího enzymu ke štěpení uložených proteinových zásob potravy. Oproti tomu u substrátu pro chymotrypsin byla fluorescence pozorována u obou stádií, což znamená, že tento enzym hraje roli ve štěpení proteinů v potravě larvy i při metamorfóze. Pro průkaz chitinolytické aktivity byl použit substrát, který lze použít pro analýzu lysozymu a endochitináz. Vzhledem k pozici bandu na zymogramu

byly v analýze pravděpodobně detekovány chitinázy, a to pouze u stádia kukly. Chitin je důležitý pro růst hmyzu, jelikož je hlavní složkou kutikuly hmyzu a jeho syntéza je při metamorfóze velmi důležitá (Merzendorfer & Zimoch, 2003). Zjištěná chitinolytická aktivita potvrzuje důležitou roli chitináz v metamorfóze. Stejně jako u výsledků dvourozměrné elektroforézy byly v enzymatické analýze identifikovány α -glukosidázy, které jsou jedny z nejdůležitějších enzymů štěpících cukry (Truscheit *et al.*, 1981). Fluorescence u substrátu pro α -glukosidázy byla pozorována jak u stádia kukly, tak u stádia larvy, zatímco hmotnostní spektrometrií se α -glukosidázu podařilo identifikovat pouze u larvy. Zatímco u zymogramů roztoče a včely byla enzymová reakce pozorována pro různé enzymy, u identifikovaných proteinů z hmotnostního spektrometru se tyto enzymy neobjevily. I když tyto enzymy nebyly identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie, tak se mohou ve vzorcích vyskytovat, jejich zastoupení však může být nesrovnatelně nižší, než zastoupení nejabundantnějších proteinů, které jejich identifikaci ztíží nebo dokonce znemožní. Výsledky enzymové analýzy neprokázaly aktivitu některých substrátů, což ovšem neznamená, že by se enzym ve vzorku nemohl vyskytovat. Znamená to, že mohou být pod detekčním limitem dané metody.

5. Závěr

- Hlavním cílem této práce bylo studium fyziologie roztoče *V. destructor* a vývojových stádií *A. mellifera* na kterých nejvíce parazituje.
- Pomocí parafinové histologie byla studována anatomie roztoče, což poslouží pro zorientování se ve vnitřní struktuře ektoparazitického roztoče *Varroa*. Z histologických řezů byl patrný mozek roztoče s oesophagem, svaly, střevo roztoče, vaječníky, vajíčko nebo malphigická trubice.
- Byla získána 2D proteinová mapa převážně trávicího traktu *Varroa*, kde hlavními proteiny byl hemelipoglycoprotein precursor, arginin kináza, aktin a tropomyosin a včelí hexamerin 70a.
- Byla získána 2D proteinová mapa stádia larvy krmeného mateří kašičkou a pylem a stádia kukly krátce po zavíčkování. Hlavními proteiny u stádia larvy byly major royal jelly proteiny a u stádia kukly hexameriny.
- Pomocí zymogramů byla u roztoče prokázána aktivita pro β -glukosidázy a cathepsin D.
- Kukla využívá při metamorfóze pro štěpení zásobních proteinů trypsin a chymotrypsin, chitinázy využívá v metabolismu chitinu a α -glukosidázy pro získání glukózy. U stádia larvy scházela trypsinová a chitinázová aktivita.
- Výsledky obohatily naše znalosti o biologii včely medonosné a jejího parazita *V. destructor*. Proteomická a enzymatická analýza nám pomohla se zorientovat v proteomu a enzimech roztoče a včely. Výsledky mohou být v budoucnu využity i pro boj s parazitem a určení kolapsu včelstev.

6. Literatura

1. Ai, H., Yan, X., Han, R.: Occurrence and prevalence of seven bee viruses in *Apis mellifera* and *Apis cerana* apiaries in China. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2012, vol. 109, s. 160-164.
2. Alaux, C., Dantec, Ch., Parrinello, H., Le Conte, Y.: Nutrigenomics in honey bees: Digital gene expression analysis of pollen's nutritive effects on healthy and *varroa*-parasitized bees. *BMC Genomics*, 2011, vol. 12, s. 24.
3. Albert, S., Bhattacharya, D., Klaudiny, J., Schmitzová, J., Simúth, J.: The family of major royal jelly proteins and its evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 1999, vol. 49, s. 290-297.
4. Albert, S., Schmitz, J.: Characterization of major royal jelly protein-like DNA sequences in *Apis dorsata*. *Journal of Apicultural Research*, 2002, vol. 41, s. 75-82.
5. Alberti, G., Coons, L. B.: Acari: Mites. In *Chelicerate Arthropoda*. New York: Willey - Liss, 1999, s. 515-876.
6. Amdam, G. V., Omholt, S. W.: The regulatory anatomy of honeybee lifespan. *Journal of Theoretical Biology*, 2002, vol. 216, s. 209-228.
7. Anderson, D. L.: Variation in the parasitic bee mite *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, 2000, vol. 31, s. 281-292.
8. Anderson, D. I., Trueman, J. W. H.: *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology*, 2000, vol. 24, s. 165-189.
9. Arrese, E. L., Soulages, J. L.: Insect fat body: Energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology*, 2010, vol. 55, s. 207-225.
10. Avwiro, G.: Histochemical uses of haematoxylin – a review. *JPCS*, 2011, vol. 1, s. 24-34.
11. Barchuk, A. R., Bitondi, M. M. G., Simoes, Z. L. P.: Effects of juvenile hormone and ecdysone on the timing of vitellogenin appearance in hemolymph of queen and worker pupae of *Apis mellifera*. *Journal of Insect Science*, 2002, vol. 2, s. 8.
12. Barrett, A. J., Rawlings, N. D.: Families and clans of serine peptidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1995, vol. 318, s. 247-250.
13. Boecking, O., Spivak, M.: Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, 1999, vol. 30, s. 141-158.
14. Bogaerts, A., Baggerman, G., Vierstraete, E., Schoofs, L., Verleyen, P.: The hemolymph proteome of the honeybee: Gel-based or gel-free? *Proteomics*, 2009, vol. 9, s. 3201-3208.

15. Büchler, R., Berg, S., Le Conte, Y.: Breeding for resistance to *Varroa destructor* in Europe. *Apidologie*, 2010, vol. 41, s. 393-408.
16. Calis, J. N. M., Fries, I., Ryrie, S. C.: Population modelling of *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, 1999, vol. 30, s. 111-124.
17. Capinera, J. L.: *Encyclopedia of entomology*. Dordrecht: Springer, 2008, s. 4346.
18. Colin, M., Tchamitchian, M., Bonmatin, J. M., Di Pasquale, S.: Presence of chitinase in adult *Varroa destructor*, an ectoparasitic mite of *Apis mellifera*. *Experimental and Applied Acarology*, 2001, vol. 25, s. 947-955.
19. Corona, M., Robinson, G. E.: Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny. *Insect Molecular Biology*, 2006, vol. 15, iss. 5, s.687-701.
20. Corona, M., Velarde, R. A., Remolina, S., Moran-Lauter, A., Wang, Y., Hughes, K. A., Robinson, G. E.: Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signalling, and queen honey bee longevity. *PNAS*, 2007, vol. 104, s. 7128-7133.
21. Crailsheim, K.: The protein balance of the honey bee worker. *Apidologie*, 1990, vol. 21, s. 417-429.
22. Cunha, A. D., Nascimento, A. M., Guidugi, K. R., Simoes, Z. L. P., Bitondi, M. M. G.: Molecular cloning and expression of a hexamerin cDNA from the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology*, 2005, vol. 51, s. 1135-1147.
23. Dainat, B., Evans, J. D., Chen, Y. P., Gauthier, L., Neumann, P.: Predictive markers of honey bee colony collapse. *PloS ONE*, 2012 (a), vol. 7, iss. 2, s. 9.
24. Dainat, B., van Engelsdorp, D., Neumann, P.: Colony collapse disorder in Europe. *Environmental Microbiology Reports*, 2012 (b), vol. 4, s. 123-125.
25. Danty, E., Arnold, G., Burmester, T., Huet, J.-C., Huet, D., Pernollet, J.-C., Masson, C.: Identification and developmental profiles of hexamerins in antenna and hemolymph of the honeybee, *Apis mellifera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1998, vol. 28, s. 387-397.
26. De Guzman, L. I., Rinderer, T. E.: Identification and comparison of *Varroa* species infesting honey bees. *Apidologie*, 1999, vol. 30, s. 85-95.
27. De Miranda, J. R., Genersch, E.: Deformed wing virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2010, vol. 103, s. 48-61.
28. Dietemann, V., Pflugfelder, J., Anderson, D., Charrière, J. D., Chejanovsky, N., Dainat, B., de Miranda, J., Delaplane, K., Dillier, F. X., Fuch, S., Gallmann, P., Gauthier, L., Imdorf, A., Koeniger, N., Kralj, J., Meikle, W., Pettis, J., Rosenkranz, P., Sammataro, D.,

- Smith, D., Yanez, O., Neumann, P.: *Varroa destructor*: research avenues towards sustainable control. *Journal of Apicultural Research*, 2012, vol. 51, iss. 1, s. 125-132.
29. Dupejova, J., Sterba, J., Vancova, M., Grubhoffer, L.: Hemelipoglycoprotein from the ornate sheep tick, *Dermacentor marginatus*: structural and functional characterization. *Parasites & Vectors*, 2011, vol. 4, s. 4.
30. Engel, M. S.: The taxonomy of recent and fossil honey bees (*Hymenoptera: Apidae; Apis*). *Journal of Hymenoptera Research*, 1999, vol. 8, s. 165-196.
31. Erban, T., Jedelský, P., Titěra, D.: Two-dimensional proteomic analysis of *Apis mellifera* longlived winter honeybee worker hemolymph. *Proteomics* (2012 submitted).
32. Evans, J. D.: *Varroa* Genome Sequencing Consortium. *Varroa* Genome Project, 2010, s. 5.
33. Feng, M., Fang, Y., Li, J.: Proteomic analysis of honeybee worker (*Apis mellifera*) hypopharyngeal gland development. *BMC Genomics*, 2009, vol. 10, s. 645.
34. Fries, I., Bommarco, R.: Possible host-parasite adaptations in honey bees infested by *Varroa destructor* mites. *Apidologie*, 2007, vol. 38, s. 525-533.
35. Genersch, E.: Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, vol. 87, s. 87-97.
36. Gregorc, A., Evans, J. D., Scharf, M., Ellis, J. D.: Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and *Varroa* mites (*Varroa destructor*). *Journal of Insect Physiology*, 2012, vol. 58, s. 1042-1049.
37. Guidugli, K. R., Piulachs, M. D., Bellés, X., Lourenço, A. P., Simões, Z. L. P.: Vitellogenin expression in queen ovaries and in larvae of both sexes of *Apis mellifera*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2005, vol. 59, s. 211-218.
38. Hales, B. J., Martin, A. C., Pearce, L. J., Laing, I. A., Hayden, C. M., Goldblatt, J., Le Souef, P. N., Thomas, W. R.: IgE and IgG anti-house dust mite specificities in allergic disease. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2006, vol. 118, iss. 2, s. 361-367.
39. Harbo, J. R., Harris, J. W.: Selecting honey bees for resistance to *Varroa jacobsoni*. *Apidologie*, 1999, vol. 30, s. 183-196.
40. Harizanis, P. C.: Infestation of queen cells by the mite *Varroa jacobsoni*. *Apidologie*, 1991, vol. 22, s. 533-538.
41. Honeybee Genome Sequencing Consortium: Insight into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 2006, vol. 443, s. 931-949.

42. Chacon-Almeida, V. M. L., Simoes, Z. L. P., Bitondi, M. M. G.: Induction of heat shock proteins in the larval fat body of *Apis mellifera* L. bees. *Apidologie*, 2000, vol. 31, s. 487-501.
43. Chan, Q. W. T., Foster, L. J.: Changes in protein expression during honey bee larval development. *Genome Biology*, 2008, vol. 9, iss.10, s. 14.
44. Chan, Q. W. T., Howes, Ch. G., Foster, L. J.: Quantitative comparison of caste differences in honeybee hemolymph. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2006, vol. 5, s. 2252-2262.
45. Chan, S. J., Segundo, B. S., McCormick, M. B., Steiner, D. F.: Nucleotide and predicted amino acid sequences of cloned human and mouse preprocathepsin B cDNAs. *PNAS*, 1986, vol. 83, s. 7721-7725.
46. Chen, Y., Pettis, J. S., Evans, J. D., Kramer, M., Feldlaufer, M. F.: Transmission of Kashmir bee virus by the ectoparasitic mite *Varroa destructor*. *Apidologie*, 2004, vol. 35, s. 441-448.
47. Javid, B., MacAry, P. A., Lehner, P. J.: Structure and function: Heat shock proteins and adaptive immunity. *The Journal of Immunology*, 2007, vol. 179, s. 2034-2040.
48. Kamakura, M.: Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature*, 2011, vol. 473, s. 478-483.
49. Kucharski, R., Maleszka, R.: Transcriptional profiling reveals multifunctional roles for transferrin in the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of Insect Science*, 2003, vol. 3, s. 27.
50. Kůrka, A.: České názvy živočichů VI. Praha: Národní muzeum, 2005, s. 207.
51. Le Conte, Y., de Vaublanc, G., Crauser, D., Jeanne, F., Rouselle, J. C., Bécard, J. M.: Honey bee colonies that have survived *Varroa destructor*. *Apidologie*, 2007, vol. 38, s. 566-572.
52. Le Conte, Y., Ellis, M., Ritter, W.: *Varroa* mites and honey bee health: can *Varroa* explain part of the colony losses? *Apidologie*, 2010, vol. 41, s. 353-363.
53. Li, J., Feng, M., Zhang, L., Zhang, Z., Pan, Y.: Proteomics analysis of major royal jelly protein changes under different storage conditions. *Journal of Proteome Research*, 2008, vol. 7, s. 3339-3353.
54. Li, J., Wu, J., Rundassa, D. B., Song, F., Zheng, A., Fang, Y.: Differential protein expression in honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae: underlying caste differentiation. *PloS ONE*, 2010, vol. 5, iss. 10, s. 11.

55. Maggi, M. D., Sardella, N. H., Ruffinengo, S. R., Eguaras, M. J.: Morphotypes of *Varroa destructor* collected in *Apis mellifera* colonies from different geographic locations of Argentina. *Parasitology Research*, 2009, vol. 105, s. 1629-1636.
56. Martins. J. R., Nunes, F. M. F., Cristino, A. S., Simoes, Z. L. P., Bitondi, M. M. G.: The four hexamerin genes in the honey bee: structure, molecular evolution and function deduced from expression patterns in queens, workers and drones. *Molecular Biology*, 2010, vol. 11, s. 23.
57. Merzendorfer, H., Zimoch, L.: Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *The Journal of Experimental Biology*, 2003, vol. 206, s. 4393-4412.
58. Milani, N.: The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to acaricides. *Apidologie*, 1999, vol. 30, s. 229-234.
59. Moritz, R. F. A., de Miranda, J., Fries, I., Le Conte, Y., Neumann, P., Paxton, R. J.: Research strategies to improve honeybee health in Europe. *Apidologie*, 2010, vol. 41, s. 227-242.
60. Navajas, M., Migeon, A., Alaux, C., Martin-Magniette, M. L., Robinson, G. E., Evans, J. D., Cros-Arteil, S., Crauser, D., Le Conte, Y.: Differential gene expression of the honey bee *Apis mellifera* associated with *Varroa destructor* infection. *BMC Genomics*, 2008, vol. 9, s. 11.
61. Nemann, P., Carreck, N. L.: Honey bee colony losses. *Journal of Apicultural Research*, vol. 49, s. 1-6.
62. Pontoh, J., Low, N. H.: Purification and characterization of β -glucosidase from honey bees (*Apis mellifera*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, vol. 32, s. 679-690.
63. Ribière, M., Olivier, V., Blanchard, P.: Chronic bee paralysis: A disease and virus like no other? *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 103, s. 120-131.
64. Rosenkranz, P., Aumeier, P., Ziegelmann, B.: Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2010, vol. 103, s. 96-119.
65. Ruijter, A. D., Kaas, J. P.: The anatomy of *varroa* mite. Rotterdam: Balkema, 1983, s. 47.
66. Sammartaro, D., Gerson, U., Needham, G.: Parasitic mites of honey bees: Life, history, implications and impact. *Annual Review of Entomology*, 2000, vol. 45, s. 519-548.
67. Santillán-Galicia, M. T., Carzaniga, R., Ball, B. V., Alderson, P. G.: Immunolocalization of deformed wing virus particles within the mite *Varroa destructor*. *Journal of General Virology*, 2008, vol. 89, s. 1685-1689.

68. Seehuus, S., Norberg, K., Gimsa, U., Krekling, T., Amdam, G. V.: Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *PNAS*, 2006, vol. 103, s. 962-967.
69. Shah, K. S., Evans, E. C., Pizzorno, M. C.: Localization of deformed wing virus (DWV) in the brains of the honeybee, *Apis mellifera* Linnaeus. *Virology Journal*, 2009, vol. 6, s. 7.
70. Schmitzová, J., Klauđiny, J., Albert, S., Schröder, W., Schreckengost, W., Hanes, J., Júdová, J., Simúth, J.: A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L.. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1998, vol. 54, s. 1020-1030.
71. Spivak, M.: Honey bee hygienic behavior and defense against *Varroa jacobsoni*. *Apidologie*, 1996, vol. 27, s. 245-260.
72. Tautz, J.: Fenomenální včely. Praha: Brázda, 2010, s. 286.
73. Truscheit, E., Frommer, W., Junge, B., Müller, L., Schmidt, D. D., Wingender, W.: Chemistry and biochemistry of microbial α -glucosidase inhibitors. *Angewandte Chemie*, 1981, vol. 20, iss. 9, s. 744-761.
74. Tufail, M., Takeda, M.: Molecular characteristic of insect vitellogenins. *Journal of Insect Physiology*, 2008, vol. 54, s. 1447-1458.
75. Underwood, R. M., van Engelsdorp, D.: Colony collapse disorder: Have we seen this before? *Bee Culture*, 2007, vol. 135, iss. 7, s. 13-18.
76. Vacek: Histologie a histologická technika. Praha : Avicenum, 1988, s. 495.
77. Van Dooremalen, C., Gerritsen, L., Conelissen, B., Van der Steen, J. J. M., Van Langevelde, F., Blacquièrè, T.: Winter survival of individual honey bees and honey bee colonies depends on level of *Varroa destructor* infestation. *PloS ONE*, 2012, vol. 7, iss. 4, s. 8.
78. Van Engelsdorp, D., Evans, J. D., Saegerman, C., Mullin, Ch., Haubruge, E., Nguyen, B. K., Frazier, J., Cox-Foster, D., Yanping, Ch., Underwood, R., Tarpy, D., R., Pettis, J. S.: Colony collapse disorder: A descriptive study. *PloS ONE*, 2009, vol. 4, iss.8, s. 17.
79. Van Engelsdorp, D., Meixner, M. D.: A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2010, vol. 103, s. 80-95.
80. Wallner, K.: Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie*, 1999, vol. 30, s. 235-248.

7. Přílohy

7.1. Seznam zkratk

Zkratka	Plný název
ABPV	Virus akutní paralýzy včel
ATP	Adenosintrifosfát
BQCV	Virus černání matečnicků
CBPV	Virus chronické paralýzy včel
CCD	Syndrom zhroucení včelstev
ddH₂O	Redestilovaná voda
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DWV	Virus deformovaných křídel
GST	Glutathion S-transferáza
HCl	Kyselina chlorovodíková
hex	Hexamerin
IAPV	Israeli acute paralysis virus
IEF	Izoelektrická fokusace
KBV	Kašmírský virus
kD	KiloDalton
MRJP	Major royal jelly protein
OBP	Odorant binding proteins
PAS	Průkaz polysacharidů
RNA	Ribonukleová kyselina
SBV	Virus pytlíčkovitého plodu
SDS	Sodiumdodecylsulfát
TPX	Thioredoxin peroxidáza

7.2. Seznam přístrojů

Přístroj	Typ	Výrobce
Analytické váhy		KERN
Centrifuga	MR 23 i	Trigon-plus
Elektroforéza	Mini- Protean Tetra Systém	BIORAD
Elektroforéza	SE 600 Ruby	GE Healthcaare
Elisa-reader		Thermo Scientific
IEF	ETTAN IPGPhor 3	GE Healthcare
Lyofylizátor	Power Dry LL3000	Thermo Elektron
Scanner	Canoscan 8800F	Canon
Třepačka	ELMI DTS2	Elmi, Ltd
Vortex	Minishaker IKA	IKA RCT

7.3. Seznam tabulek, obrázků a schémat

Tabulka č. 1: Nastavení přístroje ETTAN IPGPhor3 pro IEF.....	44
Tabulka č. 2: Přehled substrátů a jejich rozpouštědel.....	46
Tabulka č. 3: Přehled identifikovaných signifikantních proteinů <i>Varroa</i> u 15% polyakrylamidového 2D-gelu.....	59
Tabulka č. 4: Přehled identifikovaných signifikantních proteinů <i>Varroa</i> u 12% polyakrylamidového 2D-gelu.....	61
Tabulka č. 5: Přehled identifikovaných signifikantních proteinů <i>Varroa</i> u 15% polyakrylamidového 2D-gelu.....	63
Tabulka č. 6: Přehled identifikovaných signifikantních proteinů larvy u polyakrylamidového 2D-gelu.....	66
Tabulka č. 7: Přehled identifikovaných signifikantních proteinů kukly u polyakrylamidového 2D-gelu.....	71
Tabulka č. 8: Přehled výsledků enzymatické analýzy.....	78
Obrázek č. 1: Detail střeva (col) (řez 6 μ m).....	47
Obrázek č. 2: Řez celým roztočem: střevo (col), oesophagus (o) a mozek (m) (řez 6 μ m)..	48
Obrázek č. 3: Vajíčko (V) (řez 4 μ m).....	48
Obrázek č. 4: Detail střeva (col) (řez 4 μ m).....	49
Obrázek č. 5: Detail střeva (col) a vaječnicků (o) (řez 4 μ m).....	49
Obrázek č. 6: Detail střeva (col) (řez 4 μ m).....	50
Obrázek č. 7: Detail střeva (col) a vaječnicků (o) (řez 4 μ m).....	50
Obrázek č. 8: Detail střeva (col) a vaječnicků (o) (řez 4 μ m).....	51
Obrázek č. 9: Detail střeva (col) (řez 4 μ m).....	51
Obrázek č. 10: Detail střeva (col) (řez 4 μ m).....	52
Obrázek č. 11: Detail střeva (col) (řez 4 μ m).....	52
Obrázek č. 12: Řez celým roztočem: střevo (col), malphigická trubice (mpt) (řez 4 μ m)....	53
Obrázek č. 13: Malphigická trubice (mpt), svaly (s), mozek (m) (řez 6 μ m).....	53
Obrázek č. 14: Řez celým roztočem: střevo (col), svaly (s), mozek (m) (řez 6 μ m).....	54
Obrázek č. 15: Mozek (m) s oesophagem (o) (řez 6 μ m).....	54
Obrázek č. 16: Řez celým roztočem: střevo (col) a mozek (m) (řez 6 μ m).....	55
Obrázek č. 17: Mozek (m) s oesophagem (o), svaly (s) (řez 6 μ m).....	56

Obrázek č. 18: Řez celým roztočem: střevo (col) a mozek (m) (řez 6µm).....	56
Obrázek č. 19: Reprezentativní 15% dvourozměrná elektroforéza čištěných proteinů V. destructor.....	58
Obrázek č. 20: Reprezentativní 12% dvourozměrná elektroforéza nečištěných proteinů V. destructor.....	60
Obrázek č. 21: Reprezentativní 15% dvourozměrná elektroforéza nečištěných proteinů V. destructor.....	62
Obrázek č. 22: Reprezentativní dvourozměrná elektroforéza proteinů larvy.....	65
Obrázek č. 23: Reprezentativní dvourozměrná elektroforéza proteinů kukly.....	70
Obrázek č. 24: Identifikace trypsinové aktivity fluorescenčním substrátem B7260 u Varroa (V), kukly (K), larvy (L) za použití inhibitoru trypsinu T7254 (A) a bez inhibitoru (B).....	75
Obrázek č. 25: Identifikace chymotrypsinové aktivity fluorescenčním substrátem A3401 u Varroa (V), kukly (K), larvy (L) za použití inhibitoru chymotrypsinu T4376 (A) a bez inhibitoru (B).....	75
Obrázek č. 26: Identifikace aktivity cathepsinu H fluorescenčním substrátem A2027 (A). Bez aktivity. Identifikace aktivity cathepsinu B fluorescenčním substrátem C5429 (B) u Varroa (V), kukly (K), larvy (L).....	76
Obrázek č. 27: Identifikace lysozymové aktivity fluorescenčním substrátem M5639 (A) u Varroa (V), kukly (K), larvy (L). Identifikace aktivity cathepsinu D fluorescenčním substrátem C6983 (B) u Varroa (V), kukly (K), larvy (L).....	76
Obrázek č. 28: Identifikace aktivity α -glukosidáz fluorescenčním substrátem M9766 u Varroa (V), kukly (K), larvy (L).....	77
Obrázek č. 29: Identifikace aktivity β -galaktosidáz fluorescenčním substrátem M1633 (A) u Varroa (V), kukly (K), larvy (L). Bez aktivity. Identifikace aktivity β -glukosidáz fluorescenčním substrátem M3633 (B) u Varroa (V), kukly (K), larvy (L).....	77
Obrázek č. 30: Identifikace aktivity cathepsinu B fluorescenčním substrátem C5429 za použití inhibitoru trypsinu T7254 (A, B) u Varroa (V), kukly (K), larvy (L). Bez aktivity.....	78
Schéma č. 1: Vývoj včely medonosné.....	10
Schéma č.2: Vnitřní anatomie roztoče V. jacobsoni (Ruijter & Kaas, 1983).....	26
Schéma č.3: Samičí pohlavní orgán (Ruijter & Kaas, 1983).....	27
Schéma č.4: Samčí pohlavní orgán (Ruijter & Kaas, 1983).....	28