



Aleš Knoll, Martin Šotek, Petra Bartoňová,
Antonín Přidal, Tomáš Urban

**METODIKA HODNOCENÍ DIVERZITY
JEDNONUKLEOTIDOVÝCH POLYMORFISMŮ (SNP)
V KANDIDÁTNÍCH GENECH REZISTENCE
VŮČI INFEKČNÍM ONEMOCNĚNÍM U VČELY MEDONOSNÉ**

CERTIFIKOVANÁ METODIKA
č. QK22020324_CM2



- MENDELU
- Agronomická
- fakulta
-

Mendelova univerzita v Brně

**Aleš Knoll, Martin Šotek, Petra Bartoňová, Antonín Přidal,
Tomáš Urban**


**Metodika hodnocení diverzity
jednonukleotidových polymorfismů (SNP)
v kandidátních genech rezistence vůči
infekčním onemocněním u včely medonosné**

CERTIFIKOVANÁ METODIKA
č. QK22020324_CM2

2024



Autorský tým (podíly na realizaci):

Aleš Knoll^{1*} (40 %),  <https://orcid.org/0000-0002-4230-8535>

Martin Šotek¹ (35 %)

Petra Bartoňová¹ (5 %)

Antonín Přidal¹ (10 %)

Tomáš Urban¹ (10 %)

¹ Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Zemědělská 1, 613 00 Brno

* Korespondenční autor: prof. RNDr. Aleš Knoll, Ph.D.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4230-8535>

Email: knoll@mendelu.cz

Oponent

Prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.

¹ Katedra genetiky a biotechnologií, FZT Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,
Na Sádkách 1780, 370 05 České Budějovice

Email: citek@fzt.jcu.cz

Certifikace

Č.j. MZE-83310/2024-16232

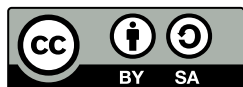
Financování

Tato certifikovaná metodika „Metodika hodnocení diverzity jednonukleotidových polymorfismů (SNP) v kandidátních genech rezistence vůči infekčním onemocněním u včely medonosné“ je řešena za podpory projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum (NAZV) č. QK22020324 – Hodnocení genomické diverzity včely medonosné ve vztahu ke zdravotnímu stavu jejich populací v ČR.

© Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

ISBN 978-80-7701-016-0 (online ; pdf)

<https://doi.org/10.11118/978-80-7701-016-0>



Open Access: *Publikace Metodika hodnocení diverzity jednonukleotidových polymorfismů (SNP) v kandidátních genech rezistence vůči infekčním onemocněním u včely medonosné* podléhá licenci CC BY-SA 4.0
(<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/deed.cs>)

Abstrakt

Certifikovaná metodika obsahuje detailní popis laboratorní analýzy založené na molekulárně-genetickém přístupu využívajícím panel jednonukleotidových polymorfizmů (SNP) u genů kandidátních pro rezistenci a imunitní odpověď za účelem vyhodnocení genetické variability v těchto genech včely medonosné v České republice. Byl sestaven panel 13 validních, polymorfních lokusů vhodných pro rutinní testování metodou sekvenování za primerem, tzv. SNaPshot, která je spojena fluorescenční kapilární elektroforézou a amplifikací genů pomocí multiplexní polymerázové řetězové reakce (PCR).

Klíčová slova

Metodika, diverzita, SNP, včela medonosná, infekční onemocnění

Abstract

The certified methodology contains a detailed description of a laboratory analysis based on a molecular genetic approach using a panel of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in candidate genes for resistance and immune response to evaluate genetic variability in these genes in honey bees in the Czech Republic. A panel of 13 valid, polymorphic loci suitable for routine testing was assembled using a primer sequencing method (SNaPshot), which is coupled with fluorescence capillary electrophoresis and gene amplification by multiplex polymerase chain reaction (PCR).

Keywords

Methodology, diversity, SNP, honey bee, infectious diseases

1 Cíl

Cílem předkládané metodiky je detailní popis laboratorní analýzy založené na molekulárně-genetickém přístupu využívajícím panel jednonukleotidových polymorfismů (SNP) u genů kandidátních pro rezistenci a imunitní odpověď za účelem vyhodnocení genetické variability v těchto genech včely medonosné v České republice. Bude sestaven panel 13 validních, polymorfních lokusů vhodných pro rutinní testování metodou sekvenování za primerem, tzv. SNaPshot, spojenou s fluorescenční kapilární elektroforézou a amplifikací genů pomocí multiplexní polymerázové řetězové reakce (PCR).

2 Úvod

Globální zemědělství dnes z velké části závisí na činnosti hmyzích opylovačů, z nichž nejvýznamnější je včela medonosná (*Apis mellifera*). Současné zvyšující se úhyny včel medonosných proto představují čím dál větší problém pro celosvětovou zemědělskou produkci. Pokud dosáhnou kritické míry, mohou ohrozit produkci potravin na celém světě. Příčin těchto úhynů je s největší pravděpodobností více a jejich vzájemné působení stojí za čím dál tím vyšším tlakem na včelstva, kterému pak mnohdy nejsou schopny čelit, a i přes zásahy včelařů hynou. Mezi nejvýznamnější faktory negativně ovlivňující přežití včel patří změna klimatu, omezování přirozených opylovacích ploch a nižší diverzita pěstovaných plodin, dále nadměrné používání pesticidů a působení infekčních onemocnění a parazitů.

Infekční a parazitární onemocnění včel dnes představují mnohem závažnější problém než dříve. Stojí za tím vliv výše zmíněných environmentálních a antropogenních faktorů, ale také zejména zavlečení nemocí a parazitů ze zahraničí, proti kterým nejsou lokální populace odolné a vyšlechtění neagresivních linií včel s vysokou produkcí medu, které jsou ale citlivé zejména vůči parazitům. Svou roli pak hraje i vyšší intenzita chovu včel, díky které se mohou parazité a patogeny snáze a rychleji šířit.

Proti patogenům a parazitům mají včely vyvinuty imunitní a fyziologické mechanismy nejen na individuální úrovni, ale i celého včelstva (tzv. sociální imunita). U včel byly stejně jako u jiných živočichů včetně člověka zjištěny genetické polymorfismy, které mohou pozitivně ovlivnit imunitní a fyziologickou odpověď a přinést zvýšenou odolnost nebo úplnou rezistenci vůči onemocněním a parazitům. Cílem šlechtění včel s těmito přínosnými genetickými variantami je vytvořit odolné linie, které mohou lépe obstát v současných podmínkách a přispět tím ke snížení úhynů včel.

V ČR zatím nebyl výskyt těchto polymorfismů dostatečně zmapován. Proto navrhované certifikované metodice předcházelo mapování výskytu vybraných polymorfismů v kandidátních genech v reprezentativním výběru z českých populací včely. K tomuto účelu byla vybrána metoda Sangerova sekvenování. Získaná data byla vyhodnocena a použita k výběru nejvýznamnějších a nejvhodnějších SNP do této certifikované metodiky.

2.1 Včela medonosná

Včela medonosná (*Apis mellifera*) patří k řádu blanokřídlých (*Hymenoptera*). Je to nejdokonalejší druh čeledi včelovitých (*Apidae*) i rodu včela (*Apis*). V současné době je rozšířena po celém světě. Jednotlivé poddruhy včel se mezi sebou geneticky liší. Tento rozdíl je způsoben zejména rozdílnými přírodními podmínkami (nadmořskou výškou, vzdáleností od vodních ploch, případně i výskytem pouští).

V roce 2006 byl přečten genom včely medonosné. Tento genom je rozdělen na dvě hlavní části. Jaderná DNA nese genetickou informaci, je uspořádána do chromozomů (32 chromozomů u dělnic, 16 chromozomů u trubců). Mitochondriální genom je lokalizován mimo buněčné jádro a jeho studium napomáhá porozumění evoluci včely medonosné.

2.2 Onemocnění včely medonosné

Dospělé včely a včelí plod napadá široká škála virových, bakteriálních a fungálních patogenů a jednobuněčných i mnohobuněčných parazitů. Onemocnění včel se liší svou závažností pro jednotlivce i pro celé včelstvo. Je to často kombinace několika onemocnění a parazitů, v kombinaci s environmentálními faktory, co způsobí úplný kolaps včelstva (Steinhauer et al. 2018).

U včel můžeme rozlišit 4 typy zdroje onemocnění: virová, bakteriální, fungální a parazitární.

2.2.1 Virová onemocnění

Uvádíme nejvýznamnější zástupce virů způsobující onemocnění u včel (Chen et al. 2007, Gisder et al. 2017, McMahan et al. 2018, Procházková et al. 2020).

Virus: virus deformovaných křídel (deformed wing virus, DWW)

Klasifikace: Čeleď *Iflaviridae* (řád *Picornavirales*). Neobalený, +ssRNA, průměr 30-40 nm, ikosahedrální symetrie

Popis: Virus se rozděluje do několika kmenů, nejvýznamnější jsou DWW-1 a DWW2. Globální výskyt (s výjimkou Oceánie). Typické symptomy – zmenšená, pomačkaná křídla, menší vzrůst a depigmentace. Významně snižuje délku života dospělých včel. Postihuje i plod. Virus využívá roztoče *V. destructor* jako vektor, a v přítomnosti kleštíka má virus významně zvýšenou virulenci, ale může se šířit i bez něj (horizontálně i vertikálně).

Virus: virus pytlíčkovitého plodu (sacbrood virus, SBV)

Klasifikace: Čeleď *Iflaviridae* (řád *Picornavirales*). Neobalený, +ssRNA, průměr 30-40 nm, ikosahedrální symetrie

Popis: Celosvětový výskyt. Nakažená dělnice přenáší virus potravou na plod. Larva se nezvládne zakuklit a získává bledý, nažloutlý a pytlíčkovitý vzhled. Dělnice se následně nakazí při odstraňování plodu z buňky. Výskyt SBV byl vyšší u včelstev napadených varroázou, ale *V. destructor* zatím nebyl potvrzen jako vektor.

Virus: virus akutní paralýzy včel (acute bee paralysis virus, ABPV)

Klasifikace: Čeleď *Dicistroviridae* (řád *Picornavirales*). Neobalený, +ssRNA, průměr 30-40 nm, ikosahedrální symetrie

Popis: Virus je široce rozšířený, vyskytuje se i v Evropě. Napadá dospělé i plod. Přenos přes slinné žlázy nakažených včel. Infikované včely, u kterých se projeví paralýza, nejsou schopny letu a po krátké době hynou. Mortalita larev je vysoká, buď hynou před zavíčkováním, nebo se mění ve zdánlivě zdravé infikované dospělé. Kolonie jsou na první pohled zdravé. V kombinaci s *V. destructor* může ABPV způsobit náhlý kolaps včelstva. ABPV tvoří komplex s dvěma blízké příbuznými viry – virem izraelské akutní paralýzy včel (IAPV) a kašmírským virem (KBV).

Virus: virus černání matečnicků (black queen cell virus, BQCV)

Klasifikace: Čeleď *Dicistroviridae* (řád *Picornavirales*). Neobalený, +ssRNA, průměr 30-40 nm, ikosahedrální symetrie

Popis: Jeden z nejvíce rozšířených virů včel. Napadá zejména larvy a kukly královen, ale i dospělé dělnice, které jej následně přenáší svými sekrety. Napadené larvy získávají bledě žlutou barvu a pytlíčkovitý charakter, podobně jako u nákazy SBV. Infikované kukly tmavnou a rychle hynou, charakteristickým symptomem je zčernání matečnicku. Zvýšená virulence BQCV je asociovaná s nosemozou (zvyšuje náchylnost k nákaze). Spekuluje se o roli *V. destructor* coby vektoru.

Virus: virus chronické paralýzy včel (chronic bee paralysis virus, CBPV)

Klasifikace: Nejasná klasifikace (příbuzný s čeleděmi *Nodaviridae* a *Tombusviridae*). Obalený, dvě +ssRNA molekuly.

Popis: S výjimkou J. Ameriky výskyt po celém světě. CBPV napadá dospělé včely. Přenos blízkým kontaktem. Infikované včely hynou několik dnů po projevení příznaků. CBPV způsobuje dvě formy paralýzy, obě mohou být přítomny v napadené populaci. První a nejběžnější je charakterizována třesem, ataxií, neschopností letu, nafouklým zadečkem a vymknutými křídly. Pro druhou formu je typické to, že postižené včely jsou lysé, tmavého zbarvení a jsou schopny letu.

Mezi další viry napadající včely se řadí Kakugo virus (*Iflaviridae*, příbuzný s DWW), virus pomalé paralýzy včel (slow bee paralysis virus, SBPV, *Iflaviridae*), Lake Sinai virus (LSV, *Secoviridae*) a cloudy wing virus (nejasné zařazení, *Picornavirales*) (Chen et al. 2007, Gisder et al. 2017, McMahon et al. 2018).

2.2.2 Bakteriální onemocnění

Nejvýznamnější bakteriální onemocnění včel uvádíme níže (Forsgren 2010, Ebeling 2016, Applegate 2016).

Onemocnění: mor včelího plodu (American foulbrood)

Původce: *Paenibacillus larvae*

Popis: *Paenibacillus larvae* je G+ bičíkatá sporulující tyčinka a vysoce specializovaný patogen, který napadá pouze včelí plod. Způsobuje střevní onemocnění zvané mor včelího plodu. Toto onemocnění je celosvětově rozšířené. Pouze spory *P. larvae* jsou infekční. Ty šíří dělnice přes kontaminovanou potravu. Spory germinují ve střevech, kde se bakterie rozmnožují, následně pronikají do hemolymfy a celého těla a larva hyne. Bakteriální proteázy poté rozloží a rozpustí larvu a vzniká usychající páchnoucí příškvár plný infekčních spor. Nákaza morem včelího plodu je velmi vážná a může vést až ke kolapsu včelstva.

Onemocnění: hniloba včelího plodu (European foulbrood)

Původce: *Melissococcus plutonius*

Popis: Široce rozšířené bakteriální onemocnění hniloba včelího plodu je primárně způsobeno infekcí G+ nesporulující bakterie *M. plutonius*, která stejně jako *P. larvae* napadá včelí plod. Sekundárními původci mohou být *Achromobacter euridice*, *Enterococcus faecalis* a *Paenibacillus alvei*. Přenos a infekce probíhají podobně jako u moru včelího plodu. Napadené larvy jsou často deformované a ve zkroucené pozici a po rozložení vytvoří páchnoucí příškvár podobající se moru včelího plodu. *M. plutonius* ne vždy vyvolává infekci, často se vyskytuje u zdravých včelstev a v larvách může přežít bez vyvolání symptomů. Kolapsy včelstev jsou vzácné, infekce většinou vypukne pod vlivem různých stresorů v kolonii (podvýživa, další infekce).

2.2.3 Fungální onemocnění

Významné fungální nákazy včel (Evison et al. 2018, Asif-Azis et al. 2024):

Onemocnění: zvápenatění plodu (chalkbrood)

Původce: *Ascosphaera apis*

Popis: Askosferóza neboli zvápenatění plodu je invazivní mykóza napadající plod, způsobená široce rozšířenou plísní *A. apis*. Spory se šíří kontaminovanou potravou a germinují ve střevech larvy, kde mají ideální podmínky (vysoká koncentrace CO₂). Hyfy poté prorostou larvou a následně ji zahubí. Na kutikule se vytvoří spory obsahující sporocysty schopné přežít až 15 let. Usmrcené larvy se postupně scvrknou a následně dochází k mumifikaci s charakteristickou křídovitou strukturou.

Onemocnění: zkamenění plodu/aspergilóza včel (stonebrood)

Původce: *Aspergillus* spp.: *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. nomenis*, *A. oryzae*, *A. phoenicis*

Popis: Způsob šíření a průběh infekce se u aspergilózy velmi podobají těm, které se vyskytují u zvápenatění plodu. Na rozdíl od *Ascosphaera apis* jsou ale zástupci rodu *Aspergillus* pouze oportunistickými patogeny a primárně jsou to saprofyty. Dalším významným rozdílem je to, že kromě plodu bývají aspergilózou infikovány i dospělé včely. Infekce *A. spp.* jsou pouze sporadické, napadají oslabená včelstva.

Onemocnění: nose móza

Původce: *Nosema apis*, *Nosema ceranae*

Popis: *Nosema spp.* jsou jednobuněční obligátní intracelulární parazité ze skupiny mikrosporidií (dnes řazeny mezi *Fungi*). Nosemóza je střevní onemocnění dospělých včel, které významně narušuje jejich trávicí systém. Nosemóza se dělí na dva typy. Infekce nosemózou A (*N. apis*) vede k zánětu, průjmům a/nebo zácpě, problémům s přijímáním potravy a narušení metabolismu proteinů. Infekční spory se šíří výkaly. Nosemóza C (*N. ceranae*) se projevuje zejména asymptomaticky a významně narušuje imunitní systém, metabolismus a chování. Dříve se objevuje chování typické pro starší včely, včely častěji opouští úl a více vykazují zvýšenou míru riskantního/rizikového chování, je snižena péče o plod, a méně zásob v úlu. U včel je také výrazně zkrácena délka života.

2.2.4 Parazitární onemocnění

Významní parazité včely medonosné (Garrido-Bailón et al. 2012, Goblirsch et al. 2018, Applegate et al. 2020, Traynor et al. 2020, Asif-Azis et al. 2024):

Onemocnění: varroáza

Původce: kleštík zhoubný (*Varroa destructor*), v menší míře kleštík Jakobsonův (*Varroa jacobsoni*)

Popis: *Varroa* je ektoparazit napadající plod i dospělce, živící se tukovým tělískem (fat body – ekvivalent jater). Životní cyklus kleštíka má dvě fáze. Během foretické fáze jsou samičky přichycené na dospělých včelách, což jim umožňuje se šířit v rámci včelstva i mezi včelstvy. Při vhodné příležitosti se včely pustí a vnikne do plodové buňky s larvou. Reprodukční fáze probíhá uvnitř zavíčkované buňky, kdy samička naklade 5-6 vajíček – nejprve 1 haploidní samčí vajíčko a poté každých zhruba 30 hodin samičí vajíčko. Po vylíhnutí a několika svlékáních jsou mladí roztoči pohlavně zralí a páří se mezi sebou. Samečci následně umírají, oplodněné samičky vylézají z buňky spolu s dospělou včelou a dokončují tím vývojový cyklus. Celosvětově dnes varroáza představuje hlavní riziko pro zdraví včel. Bez ošetření včelstvo napadené varroázou během několika let kolabuje – vlivem celkového oslabení včelstva, menším počtem včel na začátku zimy a vlivem kleštíkem přenášených virů. Na ochranu před varroázou se používají postřiky přírodních i syntetických akaricidů. Dalším opatřením proti *V. destructor* je vyřezávání trubčího plodu, který je varroázou napadán nejčastěji.

Onemocnění: akarapidóza

Původce: roztočík včelí/tracheal mite (*Acarapis woodi*)

Popis: *A. woodi* je obligátní vnitřní parazit respiračního systému včel. Živí se hemolymfou a je vektorem pro včelí viry. Dopad akarapidózy závisí na počtu trachejí. Roztoč způsobuje mechanické poškození vzdušnic a léze, obstruuje dýchací cesty a oslabuje včelu sáním hemolymfy. Akarapidóza má globální výskyt a významně zvyšuje mortalitu včel, zejména v zimním období.

2.3 Geny a SNP spojené s odolností vůči infekcím a parazitům

2.3.1 Genetický výzkum odolnosti u včely medonosné

Z dosavadních studií vyplývá, že odolnost včel vůči infekčním onemocněním a parazitům determinují a ovlivňují geny, které hrají roli v imunitním systému, hygienickém chování a fyziologických mechanismech, které mohou regulovat přítomnost a rozmnožování patogenů a parazitů. Při hledání kandidátních genů a jejich polymorfismů proto byla zaměřena pozornost právě na geny pro výše uvedené znaky. Kandidátní geny jsou geny, u kterých se na základě vědeckých poznatků z fyziologické a biochemické funkce, zjištění u jiných druhů zvířat a/nebo poznatků o diferenciální expresi předpokládá, že mohou ovlivňovat zkoumané znaky. Není ale zatím prokázáno, že tomu tak opravdu je, a jsou proto předmětem detailního výzkumu.

Ve vědecké literatuře již existuje několik publikací popisujících SNP ve včelím genomu potenciálně spjaté s odolností vůči nemocem a parazitům. Úroveň asociace mezi daným polymorfismem a fenotypovým projevem (zvýšenou odolností/rezistencí) se mezi provedenými studiemi lišila na základě zvoleného postupu a metodiky. Největší spolehlivost by měly mít ty SNP, u kterých byla souvislost prokázána pomocí asociační studie – při srovnání odolných a citlivých jedinců by pouze odolní jedinci měli být nositeli daného polymorfismu/mutace. Tuto metodu použilo několik studií, které zjišťovaly a srovnávaly polymorfismus v menším počtu genů mezi larvami nebo dospělci s citlivým nebo odolným fenotypem vůči dané chorobě/parazitovi (Haddad et al. 2016, Liu et al. 2016, Spötter et al. 2016, Broeck et al. 2019, Conlon et al. 2019, Kim et al. 2019, Teixeira et al. 2021, Sepehri et al. 2023). Takto identifikovaná SNP by měla vykazovat velkou míru spolehlivosti, co se týče asociace se zkoumaným znakem a jsou tedy potenciálně vhodné pro sekvenační analýzy, zjištění frekvence v české populaci a k případnému zařazení do finální metody pro genotypizaci. Spolehlivost a věrohodnost SNP lze zvýšit, pokud se zároveň provede i zjištění úrovně genové exprese (Conlon et al. 2019, Lefebre et al. 2024a, Teixeira et al. 2021). Dalším možným postupem použitým k nalezení kandidátních SNP je srovnání celogenomových dat a vytvoření metodiky pro analýzu několika desítek až stovek vybraných polymorfismů v mnoha genech. Tento přístup využili Henriques et al. (2021) ke zjištění diverzity v imunitních genech. Pomocí bioinformatických nástrojů analyzovali 35 782 SNP ze 123 genomů napříč hlavními evolučními liniemi včely medonosné a vyseletovali 91 (v 89 genech) s největším potenciálem pro navazující metodiku. Tato metoda náročná na bioinformatickou analýzu dokázala zjistit velký počet SNP v mnoha genech, ale jejich spojitost s odolností je nejistá, mohou být vybrány pro sekvenaci, ale s nižší prioritou. V budoucnu ale bude možné zjistit jejich vztah pomocí asociačních studií zkoumající genotyp nebo úroveň genové exprese. Problémem výběru kandidátních genů je však to, že zahraniční autoři použili pro své studium často jiné poddruhy včel než ten, který je převažující v České republice, tzn. *A.m.carnica* (Knoll et al. 2024).

2.3.2 Imunitní geny

SNP v genech zapojených do imunitního systému mohou mít pozitivní vliv na imunitní odpověď a tím zvýšit odolnost vůči infekčním onemocněním, což může vést k menší zátěži pro populaci včel. Doposud byly nalezeny kandidátní polymorfismy v několika imunitních genech, a to konkrétně v pracích Henriques et al. (2021) a Haddad et al. (2016). Do této skupiny kandidátních genů patří: *Dscam2*, *Abscam* (rodina *Dscam*), *Domeless* (transmembránový receptor v dráze JAK/STAT), *Fibrillin2/Eater-like*, *cact-2* (cactus-2, inhibitor TF v drahách Toll a Imd), *Bsk* (basket, kináza v JNK dráze), *Stat92E* (TF v dráze JAK/STAT), *PGRP-LC* (PRR v dráze Imd) *PGRP-S1/S2* (PRR v dráze Toll), *Dorsal-2* (pravděpodobně TF v dráze Toll), *Ago-2* (argonaut-2, RNAi), fosfolipáza *A2* (eikosanoidová signalizace, iniciace nodulace), *Nimrod C2* (fagocytóza), *Relish* (TF v dráze Imd) a několik zástupců genů kódující proteiny ze třídy Toll receptorů a serinových proteáz (Henriques et al. 2021, Haddad et al. 2016).

2.3.3 Geny asociované s hygienickým chováním

Transkriptomické studie zkoumající vztah mezi genovou expresí a hygienickým chováním v reakci na napadení varroázou (VSH – varroa specific hygiene) zjistily kandidátní geny s potenciálním vlivem na tento obranný mechanismus. Jedná se zejména o geny kódující proteiny zapojené do neurogeneze, axonálního růstu, tvorby synaptických spojení, citlivosti k senzoričným podnětům a navázání/detekce pachových molekul (Navajas et al. 2008, Le conte et al. 2011, Tsuruda et al. 2012, Mondet et al. 2015). Navazující výzkumy se poté soustředily na vyhledání polymorfismů s pozitivním vlivem na VSH u vybraných genů z této skupiny. Mezi tyto geny patří *Abscam* (má potenciální funkci i ve vývoji nervového systému), *Syn2* (*syntrophin 2*, nervová činnost, nervosvalová ploténka), *bent* (svalová činnost), *Pka-C1* (cAMP-dependentní protein kináza, výskyt v nervovém systému, *Norpa2* (potenciální čichový receptor), *beta-Spec* (beta podjednotka spektrinu – růst axonů), *gro* (*groucho*, inhibitor transkripce), *futsch* (protein asociovaný s mikrotubuly, role v neurogenezi), *Dhc64C* (těžký řetězec dyneinu, nervová činnost), *sidekick* (umožňuje buněčnou adhezi), *titin* (součást svalového vlákna), *elf3-s10* (podjednotka iniciátoru translace, *pug* (účast v syntéze folátů) a *ImpL3* (L-laktátová dehydrogenáza) (Spötter et al. 2012, Haddad et al. 2016, Kim et al. 2019, Teixeira et al. 2021, Sepelri et al. 2023).

2.3.4 Geny asociované s mechanismem potlačení reprodukce varroázy (SMR – suppressed mite reproduction)

Příkladem obranné fyziologické odpovědi u včely medonosné je plodem potlačená reprodukce roztočů varroázy (SMR – suppressed mite reproduction) pozorovaná Locke et al. (2012). Broeck et al. (2019) identifikovali 8 SNP spojených s tímto znakem u odolných včel z ostrova Gotland. Asociace s fenotypem u těchto polymorfismů byla potvrzena Lefebvre et al. 2024a a výskyt a alelové frekvence zmapovány Lefebvre 2024b). Některé z těchto polymorfismů se nachází v genech ovlivňující produkci plodových feromonů a detekci pachů. Ve své práci navrhli hypotézu, že potlačení reprodukce varroázy by mohlo být způsobeno nemožností samice roztoče detekovat plodové feromony díky jejich snížené produkci, což by vedlo k zabránění oogeneze. Detekce feromonů dělnicemi by zůstala zachována díky vyšší citlivosti na ně. Podobný mechanismus popisují i Conlon et al. (2019). U odolných kolonií v Toulouse se jim podařilo detekovat tři polymorfismy přímo spojené s potlačením reprodukce varroázy a to v genu *mbk-1*. Exprese tohoto genu je řízena ekdyzonem a spolu s ním se dostává do těla roztoče, kde potenciálně ovlivňuje jeho reprodukci (Conlon et al. 2019).

3 Vývoj metodiky

3.1 Získání dat pro výběr kandidátních genů

V první fázi bylo osekvenováno 51 SNP u testovací sady vzorků. Z tohoto souboru byly následně do metodiky podle kvality sekvencí, stupně asociace s fenotypem a alelové diverzity selektovány ty nejvhodnější. Původně bylo pro metodiku vybráno 15 SNP (Tab. 1), dva byly pro nízkou kvalitu amplifikace vyřazeny (FIBR2 a AMB5). Zbýlých 13 bylo pro PCR analýzu rozřazeno do tří multiplexů na základě vzájemné kompatibility (Tab. 2).

Tab. 1 Přehled genů a SNP analyzovaných při vývoji metodiky (autoři)

Označení NCBI	Název genu (zkratka)	Označení SNP v metodice	RefSNP	Chromozom	Pozice Amel_HAv3.1/Amel_4.5	SNP	Typ SNP	Pozitivní alela	Znak	Zdroj
GB46564/LOC409051	<i>Ankyrin-3 (Ank3)</i>	ANK3	rs45199156	LG4	9970541/9064698	T/C	synonymní	C	Imunitní systém	Haddad et al. 2016
GB49223/LOC725131	<i>microtubule-associated protein futsch</i>	FUTSCH	rs883050117	LG7	3779983/4351507	G/A	synonymní	A	Varroa sensitive hygiene (VSH)	Haddad et al. 2016
GB11211/GB47018/LOC724886	<i>uncharacterized protein LOC724886 isoform X2</i>	STK1	rs11807235	LG3	11807235/11110284	C/T	synonymní	C	Suppressed mite reproduction (SMR)	Broeck et al. 2019
LOC113218862	<i>uncharacterized LOC113218862</i>	AMB6	-	LG6	2816682/-	T/C	v lncRNA	C	Varroa sensitive hygiene (VSH)	Spötter et al. 2016
GB53340	<i>Spectrin beta chain isoform X1 (beta-Spec)</i>	BETAS1	rs7016398622	LG9	11461121/10138359	T/G	synonymní	T	Suppressed mite reproduction (SMR)	Broeck et al. 2019
GB49098	<i>Early gene at 23 (E23)</i>	AMB1	rs44529083	LG3	3646748/3219982	T/C	v exonu	C	Varroa sensitive hygiene (VSH)	Spötter et al. 2016
GB45248/LOC410154	<i>C-type lectin 2 (CTL2)</i>	CTL2	rs881621875	LG11	14820214/13081306	A/G	nesynonymní (Val/Lys)	neprokázána	Imunitní systém	Henriques et al. 2021
GB51019/LOC409177	<i>kinase D-interacting substrate of 220 kDa/Ankyrin repeat-rich membrane spanning (Arms)</i>	KIDINS	rs882879128	LG14(HAv3.1)/LG10(4.5)	5507078/11497759	G/A	synonymní	A	Varroa sensitive hygiene (VSH)	Haddad et al. 2016
GB45427	<i>kruppel homolog 1 (Kr-h1)</i>	KRH1	rs45205634	LG6	16506998/16702313	A/G	synonymní	G	Varroa sensitive hygiene (VSH)	Haddad et al. 2016
GB17622/LOC412088	<i>Mucin-12 isoform X1</i>	MUC1	rs884078745	LG1	24214744/26238077	A/G	synonymní	G	Suppressed mite reproduction (SMR)	Broeck et al. 2019
GB48382/LOC408302	<i>Solute carrier family 22 member 21</i>	SOLC	rs7017327617	LG10	6509050/6310327	G/A	synonymní	neprokázána	Suppressed mite reproduction (SMR)	Broeck et al. 2019
GB53345/LOC100578770	<i>Uncharacterized protein LOC100578770</i>	HRP1	rs882600476	LG9	11542136/10054755	A/G	nesynonymní (Met/Val)	A	Suppressed mite reproduction (SMR)	Broeck et al. 2019
GB55208/GB10622	<i>Major royal jelly protein 5 (Mrjp5)</i>	MRJP5	rs882017294	LG11	2292265/2587245	C/T	v intronu	C	Odolnost vůči <i>Ascosphaera apis</i> (zvápenatění plodu)	Liu et al. 2016
-	<i>AMB-01079196 (označení SNP v publikaci), vyřazen</i>	AMB5	rs7011986793	LG5	1036781/361830	A/G	intergenní	G	Varroa sensitive hygiene (VSH)	Spötter et al. 2016
GB50508/LOC724421	<i>fibrillin-2/eater-like, vyřazen</i>	FIBR2	rs44275915	LG15	5255693/5300115	A/G	nesynonymní (Gly/Asp)	neprokázána	Imunitní systém	Henriques et al. 2021

3.2 Charakteristika vybraných genů obsahujících kandidátní SNP

3.2.1. SNP spojené s imunitním systémem

Z vybraných SNP je s funkcí imunitního systému asociováno nesynonymní SNP v genu *CTL2* (A/G, Met/Lys) zjištěný Henriques et al. 2021 a synonymní polymorfismus v genu *Ank3* (T/C) popsány Haddad et al. 2016. U genu *CTL2* se předpokládá funkce rozeznávání patogenů – PRR a byla u něj zjištěna diferenciální exprese při infekci virem IAPV (Galbraith et al. 2015). Zmíněný SNP v tomto genu by mohl mít vliv na imunitní odpověď vůči tomuto viru, nicméně asociační studie nebyla provedena. Gen *Ank3* (podle publ. *Ank2*, v Genebank uvedený jako *Ank3*) se podílí na funkci imunitní dráhy NFκB a kandidátní SNP v tomto genu se vyskytuje u vůči patogenům a roztočům odolnějšího poddruhu *A.m.syriaca* (Haddad et al. 2016). Studium diverzity těchto polymorfismů má význam při zjišťování genetických rozdílů mezi včelami s různou mírou rezistence vůči infekčním onemocněním často přenášenými *Varroa destructor*.

3.2.2 SNP spojené s hygienickým chováním

Do metodiky bylo vybráno 5 SNP spojených s hygienickým chováním vůči varroáze (VSH), funkce těchto genů souvisí s vývojem a správnou funkcí nervového systému a smyslových orgánů. Polymorfismy v genech *futsch* (C/T, synonymní), *arms* (G/A, synonymní) a *Kr-h1* (synonymní, A/G) byly zjištěny u odolného poddruhu *A.m.syriaca* (Haddad et al. 2016). Dále byly na základě výsledků sekvenace zvoleny 2 SNP zkoumané Spötter et al. 2016. U těchto dvou polymorfismů byla v asociační studii zjištěna silná spjitost s fenotypem. Jedná se o SNP označované AMB-00457689 (AMB1, T/C podle Genebank v exonu genu *E23*, není znám čtecí rámeček) a AMB-00745078 (AMB6, T/C, podle Genebank v lokusu pro lncRNA *LOC113218862*). Analýza těchto SNP může poskytnout cenné poznatky výskytu alel spojených s hygienickým chováním podmíněnou odolností vůči varroáze a pomoci při šlechtění odolných populací včely medonosné.

3.2.3 SNP spojené s potlačením reprodukce varroázy

Z osmi kandidátních SNP určených Broeck et al. 2019 pomocí asociační studie celoexomových dat bylo do metodiky zvoleno pět, konkrétně polymorfismy v genech *LOC724886* (C/T, synonymní), *beta-Spec* (T/G, synonymní), *LOC100578770* (A/G, nesynonymní, Met/Val), *mucin12* (A/G, synonymní), a *solute carrier family 22 member 21* (G/A, synonymní). U těchto SNP byla potvrzena spjitost s mechanismem odolnosti vůči varroáze potlačením reprodukce roztoče (SMR), konkrétně vlivem působení trubčího plodu (Broeck et al. 2019, Lefebvre et al. 2024a). U genů obsahující tato SNP se předpokládá funkce v rozpoznávání pachových molekul a produkci kutikulárních feromonů plodu – snížené množství feromonů, na které je navázán reprodukční cyklus kleštíka + zvýšená citlivost dělnic

při rozeznávání těchto feromonů. Zjištěním přítomnosti těchto variant bude možné určit potenciál dané populace pro šlechtění odolných variant.

3.2.4 SNP v genu MRJP5 – odolnost proti zvápenatění plodu

Polymorfismus asociovaný se zvýšenou odolností vůči zvápenatění plodu (způsobené plísní *Ascosphaera apis*) popsali pomocí srovnání citlivých a odolných larev a sekvenace Liu et al. (2016). Jedná se o SNP v intronu genu *Mrjp5*, jehož výskyt je spojený s odolným fenotypem u napadeného plodu. Přesná funkce genu *Mrjp5* v souvislosti se zvápenatěním plodu není známá, vzhledem k funkcím příbuzných proteinů se spekuluje o stimulaci imunitní odpovědi nebo inhibici růstu patogenu (Liu et al. 2016).

3.3 Sekvenace genů a vyhledání SNP

Účelem sekvenací kandidátních SNP bylo posoudit jejich vhodnost pro navazující metodiku, zejména s ohledem na jejich výskyt v českých populacích včely medonosné. Nejdříve bylo osekvenováno pro každý SNP 12 vzorků a po prvním kole selekce bylo u vybraných polymorfismů osekvenováno dalších 8 vzorků. Z tohoto užšího výběru byly poté vybrány SNP pro metodiku. K sekvenaci byl použit sekvenátor a kapilární elektroforéza Applied Biosystems GA 3500.

Pro další analýzy jsme přednostně vybírali i vzorky, kde byly heterozygotní genotypy.

4 Vlastní popis metodiky

4.1 Sběr a uchování vzorků

Po samotném odběru mohou být včely krátkodobě skladovány v lednici a v co nejkratší době doručeny do laboratoře ke zpracování. Pro dlouhodobější skladování je vhodné včelu uchovat v etanolu při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, popřípadě jen při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Důležité je se vyvarovat uchování vzorků v prostředí s vyšší vlhkostí a teplotou.

4.2 Izolace DNA

4.2.1 Vzorky včel

Tělo včely medonosné je složeno z hlavy, hrudi, jednoho páru křídel, tří párů nohou a zadečku. Pro izolaci DNA byla použita hrud', končetiny a křídla. Hlava a zadeček byly z důvodu potenciální kontaminace včelí potravou odděleny a pro izolaci DNA nepoužity. Vybrané části těla včely byly vloženy do 1,5ml mikrozkušavky a použity pro analýzy DNA.

Pro získání DNA nejvyšší kvality a kvantity byla vyzkoušena řada izolačních technik, z nichž nejlepších výsledků dosahovala izolace DNA pomocí Genomic DNA mini kit (Tissue) od firmy Geneaid.

4.2.2 Izolace DNA pomocí chelexu

Extrakce DNA pomocí chelexu je velmi populární metodou ve forenzní genetice, kde se používá k izolaci DNA ze zaschlých krevních vzorků tkání, vlasů a kostí. Tato metoda je velmi rychlá a poměrně levná. Velkou výhodou je minimální riziko kontaminace vzorků, díky tomu, že celý proces probíhá pouze v jedné zkumavce.

Chelex je pryskyřice složená ze styren-divinylbenzen kopolymeru (makromolekulární látka, její molekuly jsou tvořeny nejméně ze dvou různých monomerů) s párovými iminodiacetátovými ionty. Tyto ionty působí jako chelátory, které vážou polyvalentní kovové ionty. Za alkalických podmínek zvyšuje chelex afinitu ke kationtům těžkých kovů (Ca^{2+} , Mn^{2+} a Mg^{2+}), což má při extrakci velký význam, protože tyto dvojmocné ionty mohou při vysoké teplotě ($95\text{-}100\text{ }^{\circ}\text{C}$) způsobit poškození DNA. Kromě toho chelatační Mg^{2+} ionty způsobují inaktivaci nukleázy (např. DNázy degradujících DNA), což je při izolaci DNA nezbytné, protože jsou Mg^{2+} ionty nezbytné pro jejich enzymatickou aktivitu.

Principem izolace je fyzická homogenizace a následná destrukce a degradace buněčných membrán, proteinů a denaturace DNA za alkalických podmínek a vysoké teploty ($95\text{-}100\text{ }^{\circ}\text{C}$). Dále se suspenze centrifuguje, tak aby se oddělila pryskyřice a zbytky buněčných komponent od supernatantu obsahujícího DNA. DNA se může přímo používat pro PCR amplifikaci, avšak je potřeba zamezit kontaktu pryskyřice s PCR reakcí, protože samotný chelex je inhibátorem PCR.

Použité přístroje a vybavení:

- sada automatických pipet, jednorázové špičky, 1,5ml mikrozkušavky, pinzeta, nůžky, vortex, centrifuga, termální bloky, mikropestle (plastový homogenizátor)

Chemikálie:

- 10 % roztok chelexu
- ddH₂O
- Proteináza K (c = 20 mg/ml)
- EtOH 96%

Pracovní postup:

- nahřátí termálních bloků na 56 °C a 95 °C
- do 1,5ml mikrozkušavky napipetovat 50μl 10% roztoku chelexu (použijeme špičku s ustřiženým koncem, kterou chelex před odpipetováním pomocí pipety promícháme) a přidat 50μl ddH₂O (výsledná koncentrace chelexu je tak 5 %)
- k připravenému 5 % roztoku chelexu přidat hrud' včely medonosné s křídly a končetinami a pomocí mikropeste zhomogenizovat
- ke zhomogenizovanému materiálu přidat 3μl Proteinázy K a vortexovat
- inkubovat 30 min. při 56 °C, každých 10 min protřepat
- po inkubaci vzorek 10–15 s vortexovat
- poté inkubovat 10 min. při 95 °C
- vortexovat 10–15 s
- vzorky centrifugovat 5 min na maximální rychlost centrifugy
- vzniklý supernatant přepipetovat do čisté 1,5ml mikrozkušavky
- skladovat v -20 °C

4.2.3 Izolace DNA pomocí NucleoSpin® Tissue od firmy Macherey-Nagel

K izolaci DNA byla vyvinuta řada metodik v různých modifikacích, např. proteinázová metoda, fenol-chloroformová extrakce, nebo tzv. kolonková metoda. Podstatou této metody je adsorpce DNA na silikátovou membránu, její promytí a následné uvolnění do zkumavky. Prvním krokem je příprava biologického materiálu, ze kterého bude DNA izolována, a jeho případná homogenizace. Dále za pomoci lyzačního pufru a proteinázy K dojde k vytvoření lyzátu, ve kterém je DNA uvolněna z buněčného jádra. Vzniklý lyzát je přepipetován na kolonu se silikátovou maticí. Při následné centrifugaci dojde k zachycení, navázání DNA na silikát. V dalších dvou krocích je DNA promývána a v posledním kroku je ze silikátové matrice uvolněna za pomoci elučního pufru. Takto izolovanou DNA použijeme pro další analýzy.

Použité přístroje a vybavení:

- sada automatických pipet, jednorázové špičky, 1,5ml mikrozkušavky, pinzeta, nůžky, skalpel, vortex, centrifuga, termální bloky nebo termostaty, mikropestle (plastový homogenizátor)

Chemikálie:

- souprava NucleoSpin® Tissue od firmy Macherey-Nagel – T1 lyzační pufr, B3 lyzační pufr, BW promývací pufr, B5 promývací pufr, BE eluční pufr, sběrné zkumavky, NucleoSpin® Filter zelené filtrační kolony, proteináza K, PB pufr k naředění proteinázy K
- 96 % ethanol

Pracovní postup:

- nahřátí termálních bloků na 56 °C a 70 °C

Příprava vzorku a lýze buněk

- do 1,5ml mikrozkušavky tělo včely bez hlavy a zadečku
- přidat 180 µl T1 pufru, pomocí homogenizační tyčinky rozmělnit
- ke zhomogenizovanému materiálu přidat 25µl Proteinázy K a vortexovat
- inkubovat 2 h při 56 °C, každých 10-15 min protřepat
- přidat 200 µl B3 pufru, vortexovat
- inkubovat 10 min při 70 °C
- přidat 210 µl 96 % ethanolu, vortexovat

Navázání DNA na membránu

- přemístit lyzát na NucleoSpin® Filter vložené do sběrné zkumavky
- centrifugovat 1 min/ 13 000 otáček při laboratorní teplotě

Promývání silikátové membrány

- umístit kolonu s navázanou DNA do čisté sběrné zkumavky
- přidat 500 µl BW pufru
- centrifugovat 1 min/ 13 000 otáček při laboratorní teplotě a vyprázdnit sběrnou zkumavku
- přidat 600 µl B5 pufru
- centrifugovat 1 min/ 13 000 otáček při laboratorní teplotě a vyprázdnit sběrnou zkumavku

Sušení silikátové membrány

- centrifugovat 1 min/ 13 000 otáček při laboratorní teplotě

Eluce

- kolonu přenést do čisté 1,5ml mikrozkušavky
- přidat 100 µl BE pufru předehřátého na 70 °C
- inkubovat 1 min při laboratorní teplotě
- centrifugovat 1 min/ 11 000 otáček při laboratorní teplotě
- kolonu odstranit

- izolát skladovat v -20 ° C

4.2.4 Izolace DNA pomocí Genomic DNA mini kit (Tissue) od firmy Geneaid

K izolaci DNA byla vyvinuta řada metodik v různých modifikacích, např. proteinázová metoda, fenol-chloroformová extrakce, nebo tzv. kolonková metoda. Podstatou této metody je adsorpce DNA na silikátovou membránu, její promytí a následné uvolnění do zkumavky. Prvním krokem je příprava biologického materiálu, ze kterého bude DNA izolována, a jeho případná homogenizace. Dále za pomoci lyzačního pufru a proteinázy K dojde k vytvoření lyzátu, ve kterém je DNA uvolněna z buněčného jádra. Vzniklý lyzát je přepipetován na kolonu se silikátovou maticí. Při následné centrifugaci dojde k zachycení, navázání DNA na silikát. V dalších dvou krocích je DNA promývána a v posledním kroku je ze silikátové matrice uvolněna za pomoci elučního pufru. Takto izolovanou DNA použijeme pro další analýzy.

Použité přístroje a vybavení:

- sada automatických pipet, jednorázové špičky, 1,5ml mikrozskumavky, pinzeta, nůžky, skalpel, vortex, centrifuga, termální blok nebo termostat, mikropestle (plastový homogenizátor)

Chemikálie:

- souprava Genomic DNA mini kit (Tissue) od firmy Geneaid – GT lyzační pufr, GBT lyzační pufr, W1 promývací pufr, WASH promývací pufr, eluční pufr, sběrné zkumavky, GS Columns filtrační kolony, proteináza K
- 96 % ethanol
- ddH₂O

Pracovní postup:

- nahřátí termálního bloku na 60 °C

Příprava vzorku a lýze buněk

- do 1,5ml mikrozskumavky tělo včely bez hlavy a zadečku
- přidat 200 µl GT pufru, pomocí homogenizační tyčinky rozmělnit
- ke zhomogenizovanému materiálu přidat 20µl Proteinázy K a vortexovat
- inkubovat 2 h při 60 °C, každých 10-15 min protřepat
- přidat 200 µl GBT pufru, vortexovat
- inkubovat 20 min při 60 °C
- přidat 200 µl 96 % ethanolu, vortexovat

Navázání DNA na membránu

- přemístit lyzát na GS Columns filtrační kolonu vloženou do sběrné zkumavky
- centrifugovat 2 min/ 13 000 otáček při laboratorní teplotě

Promývání silikátové membrány

- umístit kolonu s navázanou DNA do čisté sběrné zkumavky
- přidat 400 µl W1 pufru
- centrifugovat 1 min/ 13 000 otáček při laboratorní teplotě a vyprázdnit sběrnou zkumavku
- přidat 600 µl WASH pufru
- centrifugovat 1 min/ 13 000 otáček při laboratorní teplotě a vyprázdnit sběrnou zkumavku

Sušení silikátové membrány

- centrifugovat 3 min/ 13 000 otáček při laboratorní teplotě

Eluce

- kolonu přenést do čisté do čisté 1,5ml mikrozkušavky
- přidat 100 µl elučního pufru předehřátého na 60 °C
- inkubovat 5 min při laboratorní teplotě
- centrifugovat 1 min/ 13 000 otáček při laboratorní teplotě
- kolonu odstranit
- izolát skladovat v -20 ° C

4.3 Ověření kvality izolované DNA pomocí agarózové gelové elektroforézy

Gelová elektroforéza stále patří mezi nejpoužívanější techniky pro vizualizaci a kontrolu kvantity izolované DNA. Její princip spočívá v elektroforetické separaci nabitých molekul v elektrickém poli. Molekuly DNA (záporný náboj) putují v elektrickém poli k anodě (kladně nabitému pólu) a tím se rozdělují podle velikosti. Matricí pro gelovou elektroforézu je gel, prostorová síť polymerových vláken, která funguje jako molekulární síť. Při průchodu gelem dochází mezi molekulami nukleové kyseliny a sítí polymeru ke tření. Větší molekuly se pohybují gelem pomaleji, jelikož jejich tření je větší. Menší molekuly tedy putují rychleji. Takto se molekuly nejen separují, třídí, ale i vizualizují.

Vizualizace nukleových kyselin je možná díky přidanému vizualizačnímu barvivu, které se vmezeří (interkaluje) mezi sousední páry bází v DNA. Tím dojde k vytvoření komplexu, který po osvětlení UV zářením fluoreskuje.

Gel pro agarózovou gelovou elektroforézu je tvořen agarózou, přečištěným polysacharidem z mořských řas rodů *Gelidium* nebo *Gracilaria*. Tento gel je vhodný pro separaci molekul nukleových kyselin o velikosti 100 bp až 50 kb. Jedná se o horizontální typ elektroforézy.

Použité přístroje a vybavení:

- sada pipet + špičky
- vanička na gel + hřebínek (nejlépe na 14 jamek)
- Erlenmeyerova kádinka
- elektroforetická vana s anodou, katodou

- externí zdroj stejnosměrného napětí
- laboratorní váhy
- odměrný válec
- mikrovlnná trouba

Chemikálie:

- izolovaná DNA
- hmotnostní standard
- agaróza
- 1x TBE pufr
- vizualizační barvivo Good View II
- nanášecí pufr: 40% sacharóza, 0,25 % bromfenolová modř
- velikostní standard, zde např. 1kb Ladder (500-10,000 bp), Thermo Fischer Sc., k.č. SM0311

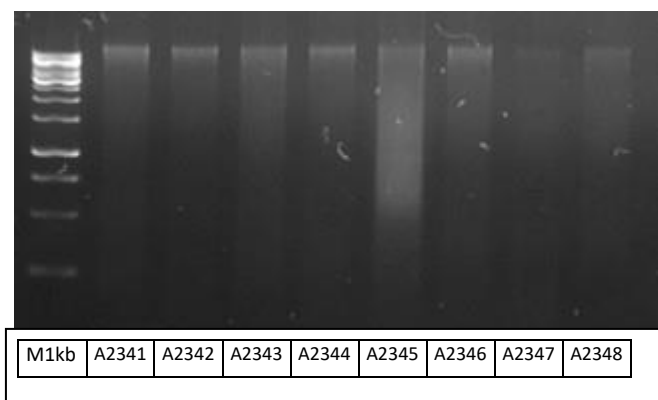
Pracovní postup:

- připravit 1,5 % agarózový gel:
 - do Erlemeyerovy baňky navážit 1,5 g agarózy
 - přidat 100ml 1x TBE pufru
 - vše rozvařit v mikrovlnné troubě, dokud není roztok čirý
 - přidat 2,8 µl vizualizačního barviva Good View II, řádně promíchat
 - nalít do připravené vaničky s hřebínkem
 - odstranit případné vzduchové bubliny
 - nechat ztuhnout při laboratorní teplotě
- vložit agarózový gel do elektroforetické vany naplněné 1x TBE puftrem
- do vzniklých jamek nanést 5 µl z každého izolátu DNA smíchaného s 1µl nanášecího pufru
- do první a poslední jamky napipetovat hmotnostní standard
- k elektroforetické vaně připojit zdroj elektrického napětí
- na zdroji nastavit napětí 130 V a dobu 30 min
- vyfotografovat gel pod UV světlem v dokumentačním zařízení

Při přípravě agarózového gelu s TBE puftrem je vhodné pracovat v digestoři a používat ochranné rukavice.

4.3.1 Výsledný elektroforetogram izolované DNA

Kvalita a kvantita DNA izolované pomocí Genomic DNA mini kit (Tissue) od firmy Geneaid byla ověřena pomocí agarózové gelové elektroforézy (Obr. 1).



Obr. 1 Výsledný elektroforetogram izolované DNA (2% gel; 130 V; 25 minut)

4.4 Multiplex PCR

Základní metodou molekulární biologie je PCR, polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction). Je to reakce, při níž pomocí cyklicky se opakujících kroků dochází k enzymatické amplifikaci dané zkoumané sekvence. Amplifikovanou sekvenci ohraničují specificky navržené oligonukleotidy, primery. Metoda PCR zahrnuje tři kroky, které se cyklicky opakují. Prvním z nich je denaturace, kdy je genomová DNA zahřáta na 96 °C a tím je dvoušroubovice rozpletena. V dalším kroku, annealingu, dochází k nasedání (hybridizaci) specifických oligonukleotidů, primerů, při snížení teploty na 50-60°C. Následuje elongace při 70-72 °C, kdy enzym DNA-polymeráza syntetizuje nové řetězce. Nově vzniklé řetězce DNA slouží jako templát v následujících cyklech, reakce je exponenciální. PCR probíhá *in vitro* v termocykleru.

Metoda PCR má široké využití a mnoho variant. Jednou z nich je mnohonásobná (multiplex) PCR. Tato varianta umožňuje amplifikovat několik úseků DNA současně během jedné reakce. Počet výsledných ampliconů závisí na počtu párů primerů přidaných do reakční směsi. Výhodou této varianty je zejména úspora času a nákladů na reakci.

Pro analýzu genetické variability bylo vybráno 13 SNP (viz. Tab. 2), u kterých byla prokázána dostatečná variabilita a významnost, zejména týkající se asociace s fenotypem.

Tab. 2 Základní charakteristika 13 vybraných SNP pro multiplex certifikované metodiky

Označení NCBI	Název genu	Označení SNP v metodice	RefSNP	Chromo-zom	Pozice Amel_HAv3.1/Amel_4.5	SNP	Typ SNP	Znak	Zdroj
GB46564/ LOC409051	<i>Ankyrin-3 (Ank3)</i>	ANK3	rs45199156	LG4	9970541/ 9064698	T/C	synonymní	Imunitní systém	Haddad et al. 2016
GB49223/ LOC725131	<i>microtubule-associated protein futsch</i>	FUTSCH	rs883050117	LG7	3779983/ 4351507	G/A	synonymní	Varroa sensitive hygiene (VSH)	Haddad et al. 2016
GB11211/ GB47018/ LOC724886	<i>uncharacterized protein LOC724886 isoform X2</i>	STK1	rs11807235	LG3	11807235/ 11110284	C/T	synonymní	Suppressed mite reproduction (SMR)	Broeck et al. 2019
LOC113218862	<i>uncharacterized LOC113218862</i>	AMB6	-	LG6	2816682/-	T/C	v lncRNA	Varroa sensitive hygiene (VSH)	Spötter et al. 2016
GB53340	<i>Spectrin beta chain isoform X1 (beta-Spec)</i>	BETAS1	rs7016398622	LG9	11461121/ 10138359	T/G	synonymní	Suppressed mite reproduction (SMR)	Broeck et al. 2019
GB49098	<i>Early gene at 23 (E23)</i>	AMB1	rs44529083	LG3	3646748/3219982	T/C	v exonu	Varroa sensitive hygiene (VSH)	Spötter et al. 2016
GB45248/ LOC410154	<i>C-type lectin 2 (CTL2)</i>	CTL2	rs881621875	LG11	14820214/ 13081306	A/G	nesynonymní (Val/Lys)	Imunitní systém	Henriques et al. 2021
GB51019/ LOC409177	<i>kinase D-interacting substrate of 220 kDa/Ankyrin repeat-rich membrane spanning (Arms)</i>	KIDINS	rs882879128	LG14(H Av3.1)/L G10(4.5)	5507078/ 11497759	G/A	synonymní	Varroa sensitive hygiene (VSH)	Haddad et al. 2016
GB45427	<i>kruppel homolog 1 (Kr-h1)</i>	KRH1	rs45205634	LG6	16506998/ 16702313	A/G	synonymní	Varroa sensitive hygiene (VSH)	Haddad et al. 2016
GB17622/ LOC412088	<i>Mucin-12 isoform X1</i>	MUC1	rs884078745	LG1	24214744/ 26238077	A/G	synonymní	Suppressed mite reproduction (SMR)	Broeck et al. 2019
GB48382/ LOC408302	<i>Solute carrier family 22 member 21</i>	SOLC	rs7017327617	LG10	6509050/ 6310327	G/A	synonymní	Suppressed mite reproduction (SMR)	Broeck et al. 2019
GB53345/ LOC100578770	<i>Uncharacterized protein LOC100578770</i>	HRP1	rs882600476	LG9	11542136/ 10054755	A/G	nesynonymní (Met/Val)	Suppressed mite reproduction (SMR)	Broeck et al. 2019
GB55208/ GB10622	<i>Major royal jelly protein 5 (Mrjp5)</i>	MRJP5	rs882017294	LG11	2292265/ 2587245	C/T	v intronu	Odolnost vůči <i>Ascosphaera apis</i> (zvápenatění plodu)	Liu et al. 2016

4.4.1 Materiál a přístroje

Chemikálie:

- izolovaná DNA
- PCR Ultra H₂O (Top-Bio s.r.o., Praha)
- Combi PPP Mix; obsahuje 150 mM Tris-HCl, pH 8,8 (25°C), 40 mM (NH₄)₂SO₄, 0,02 % Tween 20, 5 mM MgCl₂, 400 μM dATP, 400 μM dCTP, 400 μM dGTP, 400 μM dTTP, 100 U/ml Taq DNA polymerázy, monoklonální protilátka anti-Taq (38 nM), barvivo, stabilizátory a aditiva (Top-Bio s.r.o., Praha)
- Primery (IDT, dodavatel KRD), naředěné na koncentraci 10 pmol/μl
- Generuller 100 bp (Thermo Fischer Sc.), k.č. SM0241
- Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP, Thermo Fischer Sc) 1U/μl, k.č. 783901000UN.
- Exonukleáza1 (EXO1, Thermo Fischer Sc.) 10U/μl, k.č. 70073Z2500UN. 10

Použité přístroje a vybavení:

- sada pipet + špičky
- PCR zkušavky
- termální cykler Applied Biosystem Veriti Dx 96 – Well
- vortex
- centrifuga
- Shimadzu MCE-202 MultiNA

4.4.2 Pracovní postup

Jednotlivé komponenty reakční směsi byly napipetovány podle tabulky a vloženy do předehřátého termálního cyklu. Sekvence primerů uvádí Tab. 3. Směs se připravuje jako master mix na příslušné množství vzorků, objem reagentů na jeden vzorek uvádí Tab. 4a, 4b a 4c.

Tab. 3 PCR primery pro amplifikaci úseků obsahujících kandidátní SNP

SNP	Amplikon (bp)	sekvence primeru (5' → 3')	Délka primeru (bp)	T _m primeru (°C)
ANK3_F1	202	CGGAATCAAAGCAGGATTTACG	23	56,8
ANK3_R1		AAGCGGCGTGAGACCATTCTATA	23	55,8
FUTSCH_F1	294	GGCCTGTCAGCAATCACCAG	20	55,3
FUTSCH_R1		GCCGCCGACATTGCTATTATT	21	55,8
STK1_F1	343	CAAAGATCAAGATGGAAGAAACGAG	25	55,3
STK1_R1		CCGGATTCAAGAAGTTGTTGTTTC	24	55,8
AMB6_F1	411	GCCCTTTTTCCTTGTTCTTTG	22	55,9
AMB6_R1		GTCGTCATCCGTTTCAGACAAATC	24	56,4
BETAS(1)_F1	443	CCGCCAGGACGAGACTTAC	20	56,0
BETAS(1)_R1		CTCCGCCTGTTTGTCCAATC	21	56,0
AMB1_F1	320	CGGCAGATACGGTTGGAATG	20	55,3
AMB1_R1		CACGCTTACACGATACGAAAAAG	24	55,1
CTL2_F1	352	GCAAAATGCAGAAGAAGAGGAAATAA	26	56,4
CTL2_R1		ATGCGAATCTCTGGTAGGAATCTGT	25	56,3
KIDINS_F1	439	ACGGAGGATCAAACAATCAGAGAG	24	55,4
KIDINS_R1		AGATCCCGCGATTCTCGTTC	20	55,5
KRH1_F1	474	TTGCGCTCACACGGTAAAGAA	21	55,9
KRH1_R1		CCCACAAATGTCGCAAGTATA	21	55,2
MUC_F4	277	CGAGTTAAATTTAACTTTTAGTCAGAA	28	51,3
MUC_R3		GGGAAAGAAAGGCGAAGAAAGTAC	24	55,9
SOLC_F1	299	TTGGCGAATGGGAAACAGG	19	55,6
SOLC_R1		CAACAGCCGAGTAAGCATCACC	22	56,2
HRP1_F1	345	ATTCGCGCGTTTCATTGGTC	19	55,8
HRP1_R1		CGCCGATTTCTCCCTACGTT	20	55,7
MRJP5_F1	409	TGGCAAATTCGATGAACGTGA	21	56,3
MRJP5_R1		CCCACGACCAATCAGGATACG	21	56,5
AMB5_F1	522	TCATTGATATGATTGCGAACTTGTT	25	56,1
AMB5_R1		GGGTTGACTGGAATCGAGAGAG	22	55,2
FIBR2_F1	256	CGCGTACACTCGACTGCAATTAG	23	56,6
FIBR2_R2		TGTGAACGATACGATTGATTACGTG	25	55,7

Tab. 4a Složení PCR směsi multiplexu 1 (MP1)

Reagencie	1x (μl)
ddH ₂ O	3,3
Combi PPP Mix	5,0
ANK3-F1	0,2
ANK3-R1	0,2
FUTSCH-F1	0,1
FUTSCH-R1	0,1
STK1-F1	0,1
STK1-R1	0,1
AMB6-F1	0,1
AMB6-R1	0,1
BETAS1-F1	0,1
BETAS1-R1	0,1
Celkem	9,5
DNA	0,5

Tab. 4b Složení PCR směsi multiplexu 2 (MP2)

Reagencie	1x (μl)
ddH ₂ O	3,7
Combi PPP Mix	5,0
AMB1-F1	0,1
AMB1-R1	0,1
KIDINS-F1	0,1
KIDINS-R1	0,1
CTL2-F1	0,1
CTL2-R1	0,1
KRH1-F1	0,1
KRH1-R1	0,1
Celkem	9,5
DNA	0,5

Tab. 4c Složení PCR směsi multiplexu 3 (MP3)

Reagencie	1x (μl)
ddH ₂ O	3,7
Combi PPP Mix	5,0
HRP1-F1	0,1
HRP1-R1	0,1
MRJP5-F1	0,1
MRJP5-R1	0,1
MUC(1)-F4	0,1
MUC(1)-R3	0,1
SOLC-F1	0,1
SOLC-R1	0,1
Celkem	9,5
DNA	0,5

Po provedení PCR doporučujeme ověřit si její výsledek pomocí gelové elektroforézy (upravte parametry pro co největší rozlišovací schopnost), nebo lépe pomocí mikročipové elektroforézy (Obr. č. 3-5).

4.4.3 Teplotní profil reakce

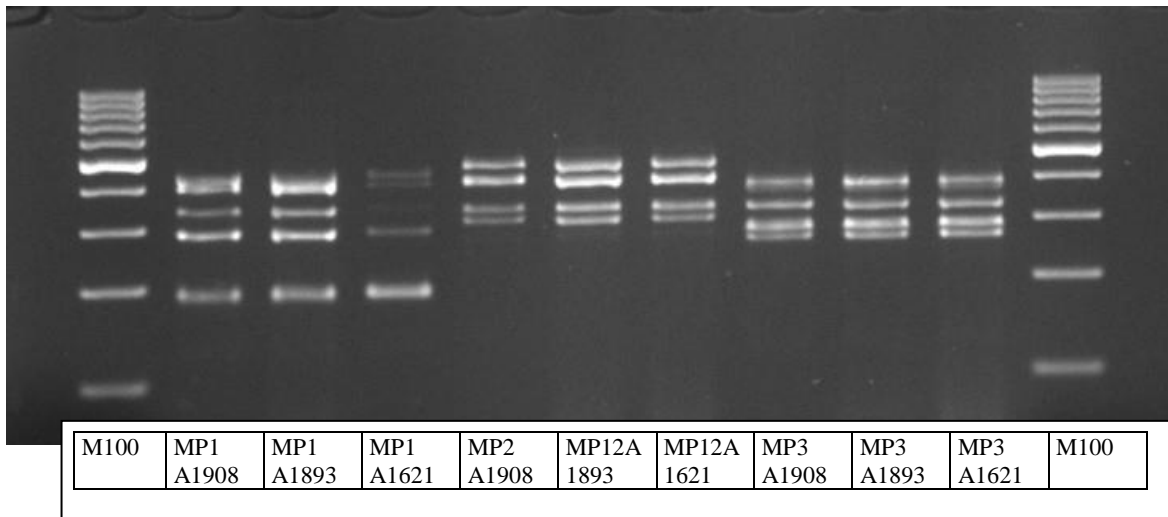
V následující tabulce (Tab. 5) jsou uvedeny jednotlivé kroky PCR reakce, jejich teplota a doba trvání.

Tab. 5 Teplotní profil PCR univerzální pro všechny 3 multiplexy

Název kroku	Teplota	Čas
Úvodní denaturace DNA	95 °C	2 min
Denaturace	95 °C	30 s
Cyklování 30x	58 °C	30 s
Elongace	72 °C	45 s
Závěrečná elongace	72 °C	10 min
Chlazení	4 °C	∞

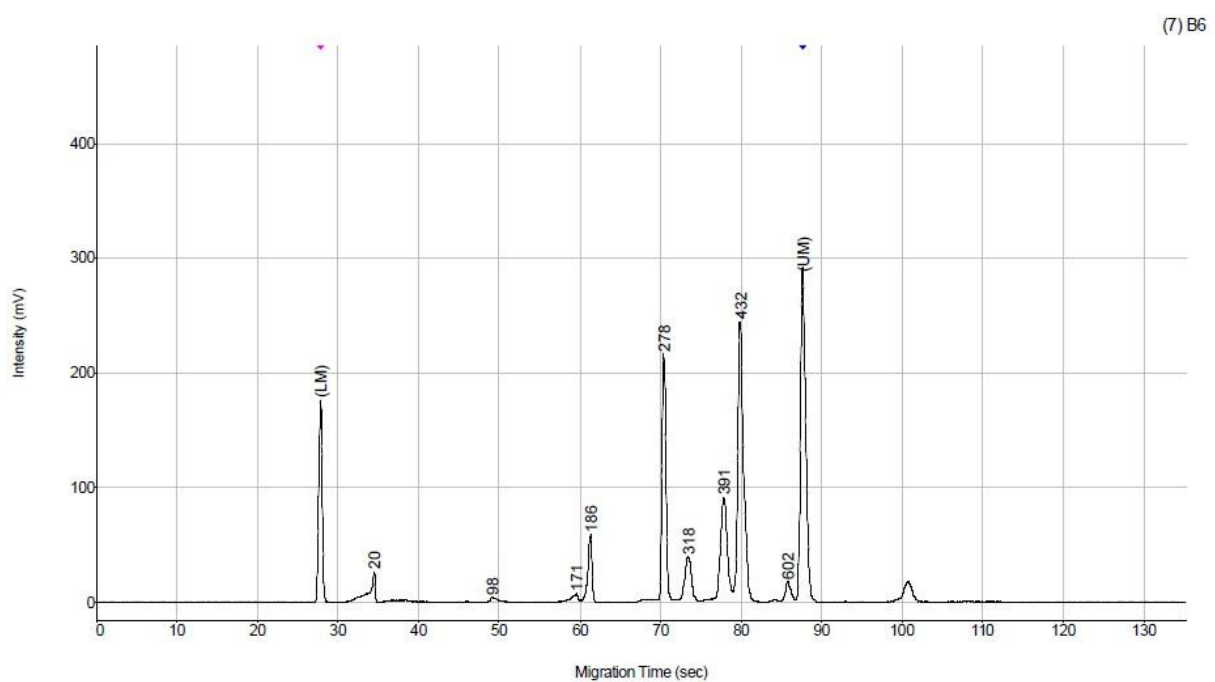
4.4.4 Ověření multiplex PCR pomocí horizontální agarózové gelové elektroforézy

Po ukončení reakce byla kvalita získaných amplikonů ověřena pomocí horizontální agarózové gelové elektroforézy (Obr. 2). Na gel bylo naneseno 3 μ l PCR produktu.



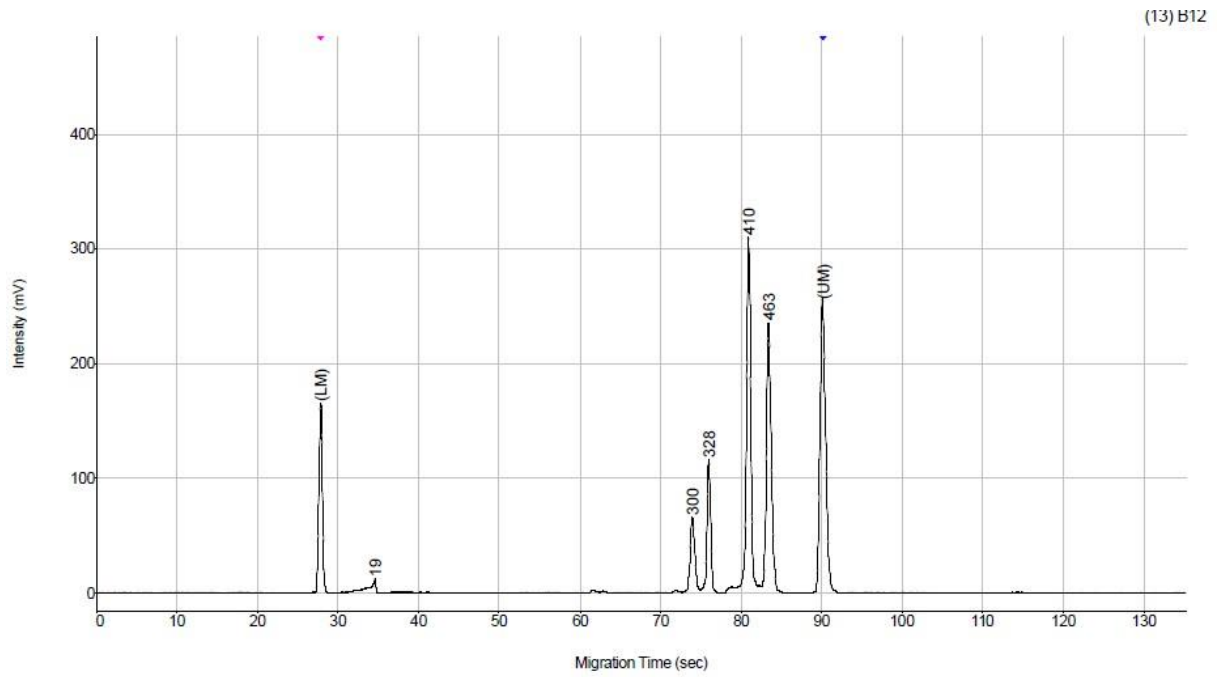
Obr. 2 Elektroforetogram jednotlivých multiplexních PCR (3% gel; 130 V; 30 minut, velikostní standard GeneRuler 100 bp)

4.4.5 Ověření multiplex PCR pomocí čipové elektroforézy



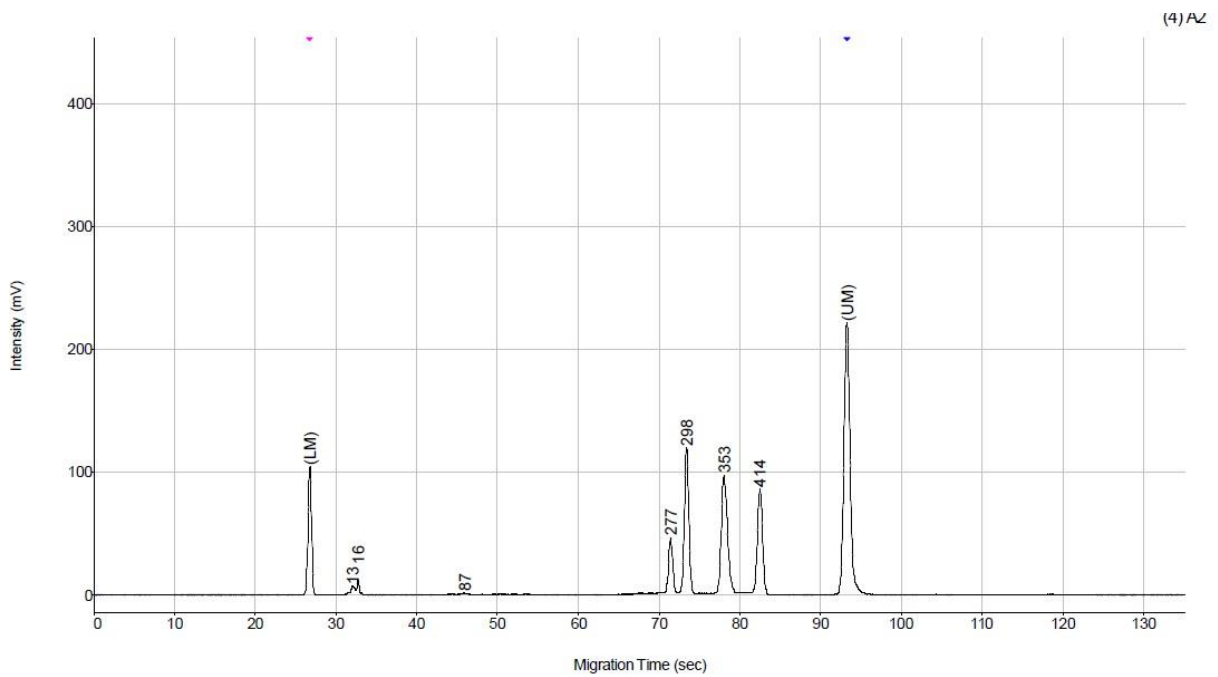
Obr. 3 Elektroforetogram čipové elektroforézy na přístroji MultiNA (MP1)

LM a UM: markery; 186:ANK3 ; 278:FUTSCH; 318:STK1 ; 391:AMB6 ; 432:BETAS1



Obr. 4 Elektroforetogram čipové elektroforézy na přístroji MultiNA (MP2)

LM a UM: markery; 300:AMB1 ; 328:CTL2; 410:KIDINS ; 463:KRH1



Obr. 5 Elektroforetogram čipové elektroforézy na přístroji MultiNA (MP3)

LM a UM: markery; 277:MUC1; 298:SOLC ; 353:HRP1 ; 414:MRJP5

4.5 Čištění PCR

K 5 μl PCR produktu přidejte 1,75 μl alkalické fosfatázy (SAP, 1 U/ μl , k odstranění fosfátových zbytků) a 0,1 μl Exonukleázy I (10 U/ μl , k degradaci nenavázaných primerů), vortexujte a dejte inkubovat - 37 °C /1hod, 75°C/15 min. Inkubaci můžete provést na cykleru. Vzorke poté dejte na 4 °C nebo na led.

4.6 SNaPShot

4.6.1 Materiál a přístroje

Chemikálie:

- izolovaná DNA
- PCR Ultra H₂O (Top-Bio s.r.o., Praha)
- SNaPshot™ Multiplex Kit (Applied Biosystems.), k.č. 4323159
- Exonukleáza1 (EXO1, Thermo Fischer Sc.) 10U/ μl , k.č. 70073Z2500UN. 10
- Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP, Thermo Fischer Sc) 1U/ μl , k.č. 783901000UN.
- Primery (Generi-Biotech, CZ), přečištěné HPLC, naředěné na koncentraci 10 pmol/ μl
- Sekvenační pufr Big Dye Terminator Sequencing buffer 5x (Thermo Fischer Sc), k.č. 4336697

Použité přístroje a vybavení:

- sada pipet + špičky
- PCR zkumavky
- termální cykler Applied Biosystem Veriti Dx 96 – Well
- vortex
- centrifuga

4.6.2 SNaPshot primery

Základem reakce jsou specifické primery, které detekují příslušný polymorfismus daného genu. Primer je vždy pouze jeden a lokalizován tak, aby ležel před SNP, přičemž může být lokalizován na obou vlákních (forward nebo revers). Ke specifické sekvenci primeru byla přidána neutrální sekvence GACT na 5'konec v počtu opakování tak, aby celková délka jednotlivých primerů se lišila o 4-5 nukleotidů. Sekvence SNaPshot primerů uvádí Tab. 6. U primerů delších než 35 nukleotidů je nutné čištění metodou HPLC za příplatek u výrobce.

Tab. 6 Charakteristika a sekvence SNaPshot primerů

Název/Gen	SNP *1	De- te kuje	Délka ampl.	MP	poz. SNP	nt celkem	Pozice/ délka	Tm	Sekvence specifické části (5'→3')	Kompletní sekvence (5'→3')
CTL2_SnR1	A/G	T/C	352	2	251	22	rv 252/18	48,5	GAGCGGTGTCATTCTCCA	GACTGAGCGGTGTCATTCTCCA
KIDINS_SnF1	G/A	G/A	439	2	301	22	fw 283/18	51,3	GAACGAACGTGAGAGGCG	GACTGAACGAACGTGAGAGGCG
AMB1_SnR1	T/C	A/G	320	2	251	32	rv 252/22	48,8	GAAAGGAAGATGGAAAGAGAGA	GACTGACTGAGAAAGGAAGATGGAAAGA GAGA
AMB6_SnF1	T/C	T/C	411	1	251	32	fw 229/22	48,7	TCAACCTTCTTTCTTCTTCTT	GACTGACTGATCAACCTTCTTTCTTCTT TCTT
ANK3_SnF2	T/C	T/C	202	1	301	43* ²	fw 283/18	46,2	TGCACAAGAAGGCCATAC	GACTGACTGACTGACTGACTGACTGTGC ACAAGAAGGCCATAC
FUTSCH_SnF2	C/T	C/T	294	1	300	38* ²	fw 282/18	49,8	TAACATGCTGGTCGACGG	GACTGACTGACTGACTGACTTAACATGC TGGTCGACGG
STK1_SnR2	C/T	G/A	343	1	300	58* ²	rv 301/20	48,7	GGTGGTGATATAATTTCCGG	GACTGACTGACTGACTGACTGACTGACT GACTGACTGAGGTGGTGATATAATTTCC GG
BETAS1_SnF1	T/G	T/G	443	1	300	48* ²	fw 282/18	58,1	CGACGCGAATCGGGAGGT	GACTGACTGACTGACTGACTGACTGACT GACGACGCGAATCGGGAGGT
KRH1_SnF2	A/G	A/G	474	2	301	53* ²	fw 283/18	50,9	AATTCATACCGGCGAACG	GACTGACTGACTGACTGACTGACTGACT GACTGACAATTCATACCGGCGAACG
HRP1_SnF2	A/G	A/G	345	4	301	38* ²	fw 283/18	49,0	ACGTTTCACTGACGGCG	GACTGACTGACTGACTGACTACGTTTCACT ACTGACGGCG
MRJP5c_SnR2	C/T	G/A	409	4	332	43* ²	rv 333/26	48,0	GTAACGAAATTGAATATTAAGT GAAT	GACTGACTGACTGACTGGTAACGAAATT GAATATTAAGTGAAT
MUC1_SnF1	A/G	A/G	277	4	301	63* ²	fw 280/21	49,4	GGATTTATCCAGCCTAGAAGC	GACTGACTGACTGACTGACTGACTGACT GACTGACTGACTGAGGATTTATCCAGCC TAGAAGC
SOLC_SnR1	G/A	C/T	299	4	301	53* ²	rv 302/20	49,1	ATTTGAAGCCCGTTTATACG	GACTGACTGACTGACTGACTGACTGACT GACTGATTTGAAGCCCGTTTATACG

*1 podle kódujího vlákna

*2 HPLC čištění nutné

4.6.3 Extenze

Při extenzní PCR dochází k nasednutí extenzního SNaPshot primeru na pozici vzdálenou 1 nt od SNP. Poté dochází k extenzi – navázání fluorescenčně značeného ddNTP na SNP pozici. Při fragmentační analýze budou jednotlivé sekvence v multiplexu od sebe odděleny a následně bude detektorem určena báze na pozici SNP. Složení směsi na extenzi je uvedeno v tab. 7 a 8.

Tab. 7 Složení směsi pro extenzní PCR

	Objem (μl)
SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix	1,25
Přečištěné PCR produkty (pooling všech 3 MP do extenzní směsi)	3 (1 μl od každého MP)
Sekvenační pufr 5x	2,2
SNaPshot primer (každý)	0,2
Deionizovaná voda	1
Celkem	10

Tab. 8 Složení směsi pro pozitivní a negativní kontrolu (není nutné při každé analýze)

	Poz. kontrola (μl)	Neg. kontrola (μl)
SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix	5	5
SNaPshot Multiplex Control Template	2	0
SNaPshot Multiplex Control Primer Mix	1	1
Deionizovaná voda	2	4
Celkem	10	10

Před extenzí je nutné vzorky vortexovat, stočit a dát na led.

Protokol pro extenzní reakci: 25x (96°C/10s, 55°C/5s, 60°C/30s)

Pokud se post-extenze neprovádí ihned po extenzi, je nutné dát produkty na led

4.6.4 Post-extense (přečištění)

Po extenzi k produktům přidejte 1 μ l SAP, vortexujte je a dejte inkubovat. Postup je stejný jako při prvním pročišťování - 37 °C /1hod, 75 °C/15 min. Poté uchovávat vzorky při 4 °C.

4.7 SNaPshot fragmentační analýza

Jedná se o kapilární elektroforézu s fluorescenční detekcí jednotlivých primerů specifických pro daný gen a SNP prodloužených o značený koncový terminátor. Primery se liší svou délkou a na základě toho je lze identifikovat, nukleotid na pozici za primerem lze detekovat fluorescenční barvou. Modrá odpovídá bázi G (guanin), zelená A (adenin), červená T (tymin) a černá C (cytozin).

4.7.1 Materiál a přístroje

Materiál:

- Formamid (Hi-Di™ Formamide 3500 Dx Series, Applied Biosystems); k.č. 4404307
- Hmotnostní standard – GeneScan™ – 120 LIZ™ Size Standard, Applied Biosystems; k.č. 4324287
- Analyzační plato – MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems; k.č. N8010560
- PCR multiplexní produkt

Přístroje:

- Kapilární elektroforéza a sekvenátor Applied Biosystems ABI PRISM 3500
- PCR cykler
- Vortex
- Laboratorní mikrocentrifuga

4.7.2 Příprava vzorku na SNaPshot fragmentační analýzu

Díky nižšímu množství reakční směsi v extenzi není nutné přečištěné produkty extenzní PCR dále ředit. Reakční směs se připravuje podle Tab. 9.

Tab. 9 Složení reakční směsi pro SNaPshot analýzu

Reagencie	1 x (μ l)
Hi-Di™ Formamide	9,0
LIZ® 120	0,05
Celkem	11,4
SNaPshot produkt	0,2 (možno navýšit na 0,5)

Pro SNaPshot analýzu byla využita kapilární elektroforéza (Applied Biosystems 3500), metoda SNaPshot_Assay.

4.7.3 Denaturace

Pro fragmentační analýzu je nutné vzorky denaturovat. Denaturace probíhá na PCR cykleru – 95 °C po dobu 5 minut. Po denuraci je nutné vzorek ihned zchladit na ledu.

4.7.4 Umístění vzorků

Nejprve je třeba sestavit držák plata pro umístění vzorků do genetického analyzátoru (Obr. 6, Obr. 7). Sestavené plato je vloženo do genetického analyzátoru dle manuálu výrobce.

Obr. 6 Rozložený držák plata



Obr. 7 Složený držák plata



4.7.5 Definování plata vzorků

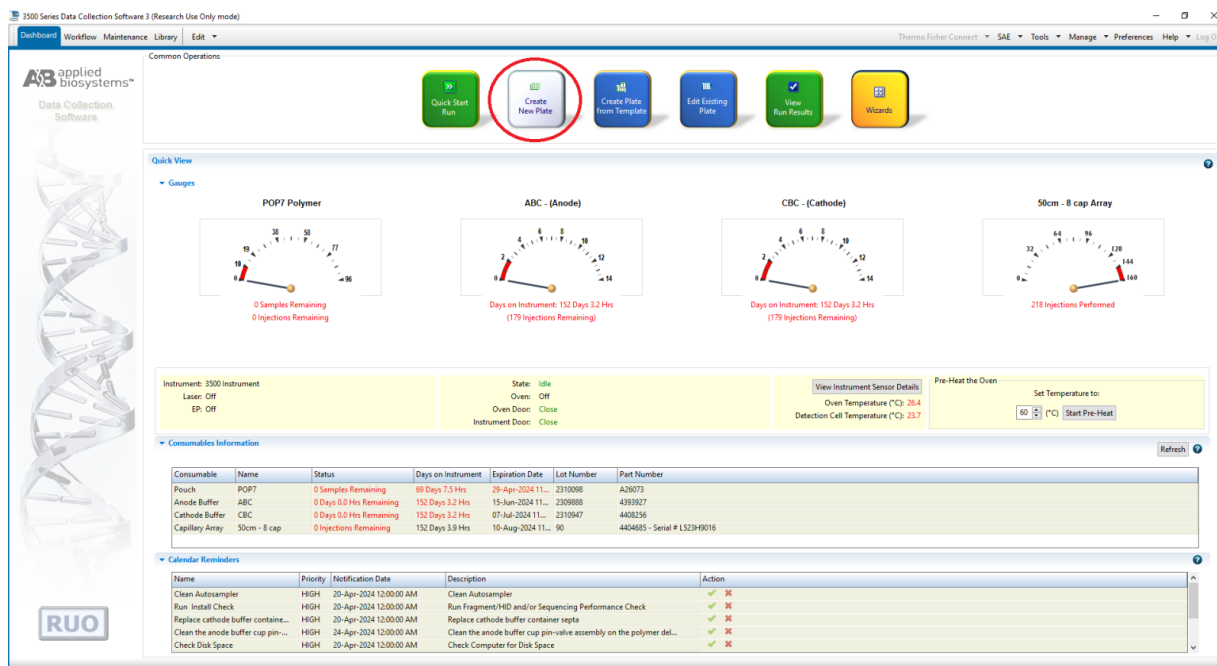
Pro plato určené na fragmentační analýzu je nutné nadefinovat parametry – metoda, protokol a adresář pro uložení výsledků analýzy. Uvedené příklady vycházejí ze software pro genetický analyzátor ABI PRISM 3500 a software 3500 Series Data Collection Software 3. Uživatelé jiných typů analyzátoru zvolí analogický software a nastavení dle svých uživatelských zkušeností.

a) Nejprve spusťte ovládací software genetického analyzátoru



b) Hlavní menu.

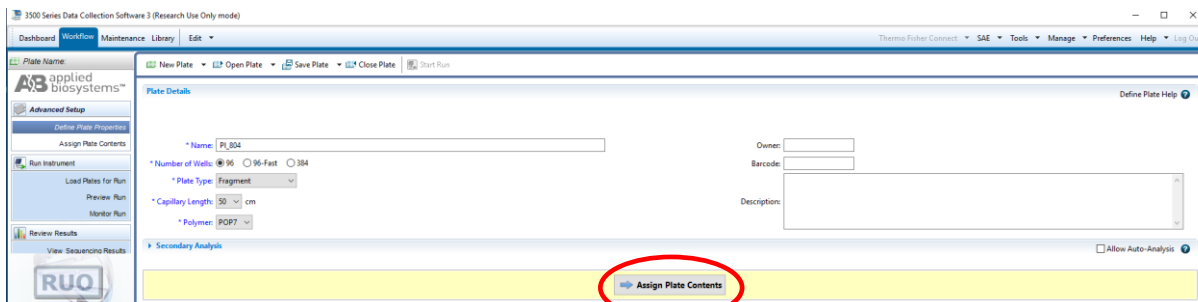
Pro vytvoření nového plata zvolte *Create new plate*. Pro definování již existujícího plata zvolte *Edit existing plate*, nebo klikněte na *Library*.



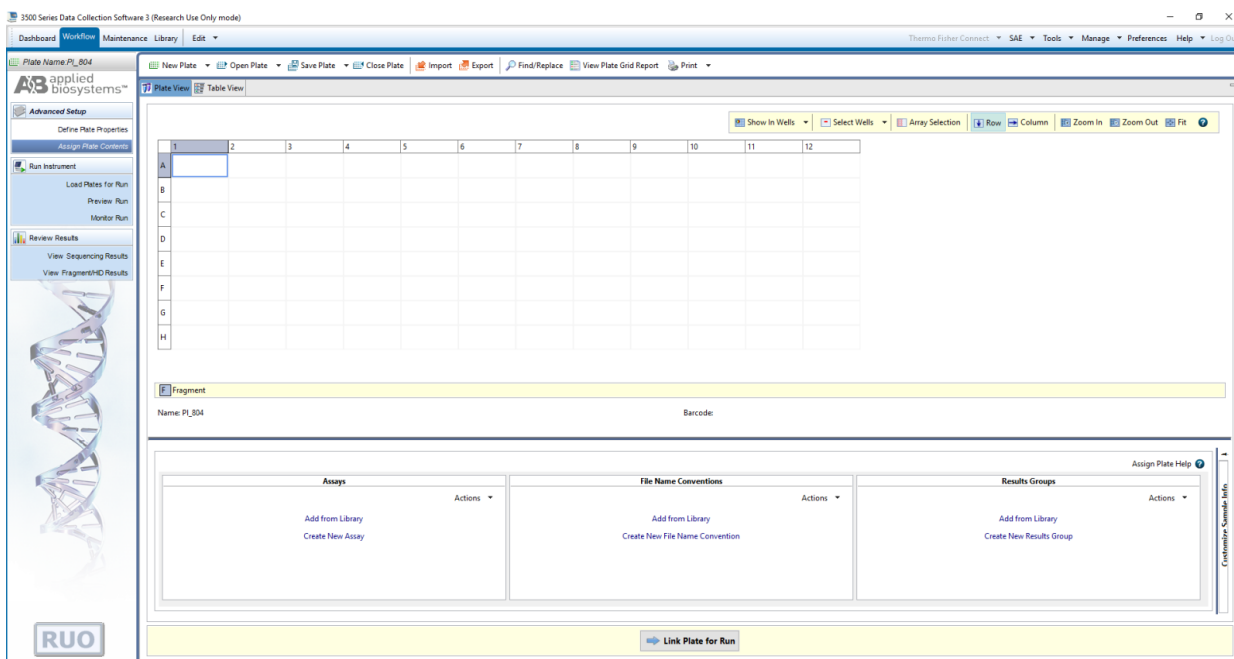
Consumable	Name	Status	Days on Instrument	Expiration Date	Lot Number	Part Number
Pouch	POP7	0 Samples Remaining	69 Days 7.5 Hrs	29-Apr-2024 11...	2310096	A26073
Anode Buffer	ABC	0 Days 0.0 Hrs Remaining	152 Days 3.2 Hrs	15-Jun-2024 11...	2309888	4393927
Cathode Buffer	CBC	0 Days 0.0 Hrs Remaining	152 Days 3.2 Hrs	07-Jul-2024 11...	2310947	4408256
Capillary Array	50cm - 8 cap	0 Injections Remaining	152 Days 3.9 Hrs	10-Aug-2024 11...	90	4404885 - Serial # L523H6016

Name	Priority	Notification Date	Description	Action
Clean Autosampler	HIGH	20-Apr-2024 12:00:00 AM	Clean Autosampler	✓ <input checked="" type="checkbox"/>
Run Install Check	HIGH	20-Apr-2024 12:00:00 AM	Run Fragment/HD and/or Sequencing Performance Check	✓ <input checked="" type="checkbox"/>
Replace cathode buffer containe...	HIGH	20-Apr-2024 12:00:00 AM	Replace cathode buffer container septa	✓ <input checked="" type="checkbox"/>
Clean the anode buffer cup pin...	HIGH	24-Apr-2024 12:00:00 AM	Clean the anode buffer cup pin-valve assembly on the polymer del...	✓ <input checked="" type="checkbox"/>
Check Disk Space	HIGH	20-Apr-2024 12:00:00 AM	Check Computer for Disk Space	✓ <input checked="" type="checkbox"/>

c) Při definování nového plata zadejte název plata, typ plata (fragmentační), délku kapiláry (50 cm) a typ polymeru (POP7), poté přejděte na definování obsahu plata.



d) Vložte název jednotlivých vzorků do příslušných pozic na platě. Vzorky do plata můžete vepsat manuálně, nebo můžete importovat vyplněnou šablonu ve formátu .xls.



4.7.6 Konfigurace parametrů analýzy

a) Po nadefinování vzorků zvolte příslušný protokol, způsob pojmenování výsledných souborů a jejich umístění.

The screenshot displays the 'Plate View' configuration window in the Applied Biosystems software. The main area is a 9x9 grid of wells. The wells are labeled with letters A-H and numbers 1-9. The contents of the wells are as follows:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	A011	A1065	A1185	H2O					
B	A025	A1095	A1206	A1614					
C	A054	A1113	A1221	A1827					
D	A071	A1119	A1230	A2649					
E	A074	A1128	A1233	A2676					
F	A447	A1152	A1366	A3224					
G	A1026	A1155	A1383	A1621					
H	A1044	A1176	A1398	H2O					

Below the grid, there are tabs for 'Sequencing' and 'Fragment'. The 'Name: PI_821' and 'Barcode:' fields are visible. At the bottom, there are three panels for configuration: 'Assays', 'File Name Conventions', and 'Results Groups'. Each panel has an 'Add from Library' button circled in red, and a 'Create New' option below it. A 'Link Plate for Run' button is located at the bottom center.

b) Vyberte protokol pro příslušný polymer a podle případných dalších parametrů (délka fragmentů, doba injektáže). Ve většině případů je dostatečné použít defaultní protokol.

The screenshot displays the 'Add Assay From Library' dialog box in the Applied Biosystems software. The dialog contains a table of assays with the following data:

Assay Name	Type	Instrument Protocol	Primary Analysis Protocol
6 SNaPshot_Assay	Fragment	SNaPshot50_POP7_E5	SNaPshot_PA_Protocol
7 FA_Assay_kratky_RUN	Fragment	FA50_POP7_G5_kratky_RUN	Fragment_Analysis_PA_Pi
8 Fragment_Analysis_Assay_xL-POP6	Fragment	FragmentAnalysis50_POP6xL_G5	Fragment_Analysis_PA_Pi
9 FA_Assay_16s	Fragment	FragmentAnalysis50_POP7_G5_16s	Fragment_Analysis_PA_Pi
10 SNaPshot_Assay_xL	Fragment	SNaPshot50_POP7xL_E5	SNaPshot_PA_Protocol
11 Long_Fragment_Analysis_Assay	Fragment	LongFragmentAnalysis50_POP7_G5	Long_Fragment_Analysis
12 Fragment_Analysis_Assay_36cm	Fragment	FragmentAnalysis36_POP7_G5	Fragment_Analysis_PA_Pi
13 Long_Fragment_Analysis_Assay_xL	Fragment	LongFragmentAnalysis50_POP7xL_G5	Long_Fragment_Analysis

The 'Add to Plate' button is circled in red. The background shows a plate grid with wells A011 to A1176 and a sidebar with 'Advanced Setup' and 'Run Instrument' options.

c) Zvolte způsob pojmenování výsledných souborů, lze uživatelsky modifikovat dle vlastních požadavků.

3500 Series Data Collection Software 3 (Research Use Only mode)

Dashboard Workflow Maintenance Library Edit Thermo Fisher Connect SAE Tools Manage Preferences Help Log Out

Plate Name: PI_821

Advanced Setup

Define Plate Properties

Assign Plate Contents

Run Instrument

Load Plates for Run

Preview Run

Monitor Run

Review Results

View Sequencing Results

View Fragment/HD Results

Plate View Table View

Show In Wells Select Wells Array Selection Row Column Zoom In Zoom Out Fit

Add File Name Convention From Library

Instructions:

Select rows from table and click on "Add To Plate" button.

Disable Filters Filter: All Search: All Go Clear

Name	File Name Convention
1 MicroSEQ.ID.FNC	<Sample Name> = <User Defined Field 1> _ <Well Position> - <Plate Name> _ <User Defin
2 My_FNC	<Sample Name> _ <Well Position> _ <Capillary Number> _ <Instrument Protocol>
3 Normalni jmeno	<Sample Name> _ <Plate Name> _ <Injection Number> _ <Well Position> _ <Date of Run>
4 Samplename_well_capillarynumber	<Sample Name> _ <Well Position> _ <Capillary Number>
5 Well_samplename_capillarynumber	<Well Position> _ <Sample Name> _ <Capillary Number>

Close Add to Plate

Assays Actions

File Name Conventions Actions

Results Groups Actions

Assign Plate Help

RUO

Link Plate for Run

d) Vyberte umístění pro výsledné soubory na paměťovém disku (uživatelsky nastavíte).

3500 Series Data Collection Software 3 (Research Use Only mode)

Thermo Fisher Connect SAE Tools Manage Preferences Help Log Out

Plate Name: PL_821

Advanced Setup

Define Plate Properties

Assign Plate Contents

Run Instrument

Load Plates for Run

Preview Run

Monitor Run

Review Results

View Sequencing Results

View Fragment/HD Results

Plate View Table View

Show In Wells Select Wells Array Selection Row Column Zoom In Zoom Out Fit

Add Results Group From Library

Instructions:

Select rows from table and click on "Add To Plate" button.

Disable Filters Filter: All Search: All Go Clear

Name	Results Group
1 Fragmentacka	<Results Group Name>
2 Identifier	<Results Group Name> <IP Name>
3 MicroSEQ_ID_3500 RG	<Plate Name>_<Results Group Name>
4 Minifier	<Results Group Name> <IP Name>
5 My_Fragment_Analysis_Results_Group	<Results Group Name>_<Injection Number>_<Plate Name>_<Start Instr
6 My_Sequencing_Results_Group	<Results Group Name>_<Injection Number>_<Plate Name>_<Start Instr
7 PN_IFassay_RG	<Plate Name>-<Assay Name>-<Results Group Name>
8 PN_Injfolder_RG	<Plate Name>-<Assay Name>-<Results Group Name>
9 PN_MFassay_RG	<Plate Name>-<Assav Name>-<Results Group Name>

Close

Add to Plate

Assign Plate Help

Assays

File Name Conventions

Results Groups

Add from Library

Create New Results Group

RUO

Link Plate for Run

4.7.7 Spuštění analýzy

a) Po zadání a uložení parametrů a po vložení plata se vzorky do sekvenátoru zvolte v programu *Link Plate for Run*.

The screenshot displays the software interface for the 3500 Series Data Collection Software 3 (Research Use Only mode). The main window shows a plate grid with 8 rows (A-H) and 9 columns (1-9). The plate name is PL_821. The 'Link Plate for Run' button is circled in red at the bottom of the interface.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	F A011	F A1065	F A1185	F H2O					
B	F A025	F A1095	F A1206	F A1614					
C	F A054	F A1113	F A1221	F A1827					
D	F A071	F A1119	F A1230	F A2649					
E	F A074	F A1128	F A1233	F A2676					
F	F A447	F A1152	F A1366	F A3224					
G	F A1026	F A1155	F A1383	F A1621					
H	F A1044	F A1176	F A1398	F H2O					

Assays: A8 SNaPshot_Assay

File Name Conventions: Normalni Jmeno

Results Groups: Fragmentacka

[Link Plate for Run](#)

b) Zkontrolujte, zda je plato ve správné pozici a že má přístroj dostatek reagensů. Poté zvolte *Create Injection List*.

The screenshot shows the software interface for the 3500 Series Data Collection Software 3 (Research Use Only mode). The interface is divided into several sections:

- Run Information:** Displays the Run Name as "Run 2024-10-24-10-45-917" and the Connection Status as "Connected".
- Plates on Instrument:** Shows details for Plate A (96 wells) and Plate B. Plate A is named "PI_821" and has a "Mixed" type. There are "Link Plate" and "Unlink" buttons for both plates. A barcode input field is present with a "Go" button.
- Recent Plates and Recent Runs:** A table listing recent plates and runs.
- Consumables Information:** A table showing the status of various consumables.
- Calibration Information - Capillary Array: L523H9016:** Details about the capillary array calibration, including spatial and spectral information.
- Buttons:** At the bottom, there are two buttons: "Create Injection List" (circled in red) and "Start Run".

Consumable	Name	Status	Days on Instrument	Expiration Date	Lot Number	Part Number
Pouch	POP7	0 Samples Remaining	41 Days 21.4 Hrs	11-Nov-2024 11...	2402102	A26073
Anode Buffer	ABC	0 Days 0.0 Hrs Remaining	93 Days 19.5 Hrs	15-Jun-2024 11...	2309888	4393927
Cathode Buffer	CBC	0 Days 0.0 Hrs Remaining	93 Days 19.5 Hrs	07-Jul-2024 11...	2310947	4408256
Capillary Array	50cm - 8 cap	0 Injections Remaining	328 Days 23.8 Hrs	10-Aug-2024 11...	90	4404685 - Serial # L523H9016

Dye Set	Chemistry Standard	Calibration Date	Run ID
G5	Matrix Standard	01-Dec-2023 09:02:45 AM	Run 2023-12-01-08-17-37-178
E5	Matrix Standard	15-Jul-2024 10:49:44 AM	Run 2024-07-15-10-16-45-632
Z	Sequencing Standard	08-Dec-2023 10:27:14 AM	Run 2023-12-08-09-35-06-729

c) Ověřte si, zda jsou na seznamu všechny vzorky, které chcete analyzovat. Zde také můžete měnit pořadí, ve kterém se budou jednotlivé sloupce na platu analyzovat. Spusťte analýzu příkazem *Start run*.

The screenshot shows the software interface for the 3500 Series. The 'Injection List' section displays 4 injections created in Plate A - 0 in Plate B. The 'Consumables Information' table lists various consumables and their status.

Consumable	Name	Status	Days on Instrument	Expiration Date	Lot Number	Part Number
Pouch	POP7	0 Samples Remaining	41 Days 21.4 Hrs	11-Nov-2024 11...	2402102	A26073
Anode Buffer	ABC	0 Days 0.0 Hrs Remaining	93 Days 19.5 Hrs	15-Jun-2024 11...	2309888	4393927
Cathode Buffer	CBC	0 Days 0.0 Hrs Remaining	93 Days 19.5 Hrs	07-Jul-2024 11...	2310947	4408256
Capillary Array	50cm - 8 cap	0 Injections Remaining	328 Days 23.8 Hrs	10-Aug-2024 11...	90	4404685 - Serial # L523H9016

The 'Start Run' button is highlighted with a red circle at the bottom center of the interface.

d) Kontrola probíhající analýzy

The screenshot shows the software interface during a run. The 'Injection List' section displays 4 injections created in Plate A - 0 in Plate B. The 'Instrument Run Views and Flags' section shows the current run status and flags for each injection.

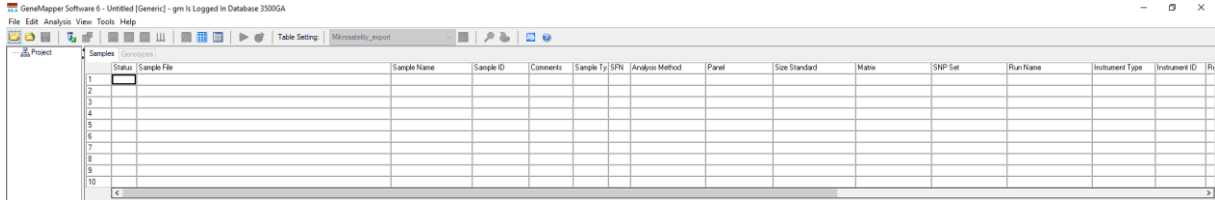
Injection	Type	Assay	Instrument Protocol	Plate	Results Groups	Analysis	Flags	Time Remain
1	SNaPshot_Assay	SNaPshot50_POP7_E5	PL_821	Fragmentacka				00:31:09
2	SNaPshot_Assay	SNaPshot50_POP7_E5	PL_821	Fragmentacka				00:31:28
3	SNaPshot_Assay	SNaPshot50_POP7_E5	PL_821	Fragmentacka				00:31:28
4	SNaPshot_Assay	SNaPshot50_POP7_E5	PL_821	Fragmentacka				00:31:28

The 'Review Results' button is highlighted at the bottom center of the interface.

4.8 Vyhodnocení

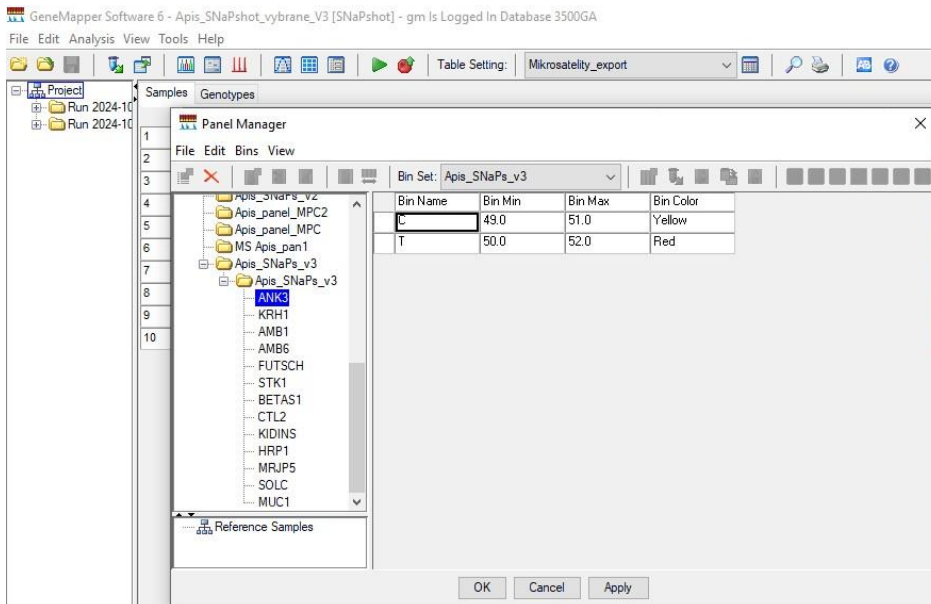
Vyhodnocení výsledků FA probíhá v programu GeneMapper 6.0

Po spuštění programu se nejprve otevře výchozí obrazovka programu.



4.8.1 Definování Panelu

Po spuštění softwaru GeneMapper 6 otevřete *Tools/Panel manager*, definujte nový binset a panel podle manuálu software výrobce s využitím údajů níže.



a) Binset

Binset definuje rozsahy a barvu píků, které mají být označeny příslušnou alelou. Zde uvedené alely odpovídají laboratorní analýze, nikoliv skutečným alelám na kódujícím vlákně a musí být převedeny, viz kap. 4.6.3.

Version GM v 4.1

Chemistry Kit	Apis_SNaPs_v3		
BinSet Name	Apis_SNaPs_v3		
Panel Name	Apis_SNaPs_v3		
Marker Name	ANK3		
ASR	49.0	52.0	
C	49.0	51.0	Yellow
T	50.0	52.0	Red
Marker Name	KRH1		
ASR	56.0	59.0	
G	56.0	58.0	Blue
A	57.5	59.0	Green
Marker Name	AMB1		
ASR	39.28	42.39	
G	39.279999999999994	41.37	Blue
A	40.34	42.39	Green
Marker Name	AMB6		
ASR	41.26	44.59	
C	41.26	43.0	Yellow
T	42.59	44.59	Red
Marker Name	FUTSCH		
ASR	45.31	49.26	
C	45.31	47.31	Yellow
T	47.26	49.26	Red
Marker Name	STK1		
ASR	62.84	66.17	
G	62.839999999999996	64.74	Blue
A	64.17	66.17	Green
Marker Name	BETAS1		
ASR	53.0	56.4	
G	53.0	55.0	Blue
T	55.0	56.400000000000006	Red
Marker Name	CTL2		
ASR	35.69	39.38	
C	35.690000000000005	37.940000000000005	Yellow
T	37.05	39.38	Red
Marker Name	KIDINS		
ASR	33.92	36.93	
G	33.92	35.92	Blue
A	35.029999999999994	36.93	Green
Marker Name	HRP1		
ASR	45.0	48.0	
G	45.0	47.0	Blue
A	46.0	48.0	Green
Marker Name	MRJP5		
ASR	48.0	51.0	
G	48.0	50.0	Blue
A	49.0	51.0	Green
Marker Name	SOLC		
ASR	58.0	61.0	
C	58.0	60.0	Yellow
T	59.0	61.0	Red
Marker Name	MUC1		

ASR	66.0	69.0	
G	66.0	68.0	Blue
A	67.0	69.0	Green

b) Panel:

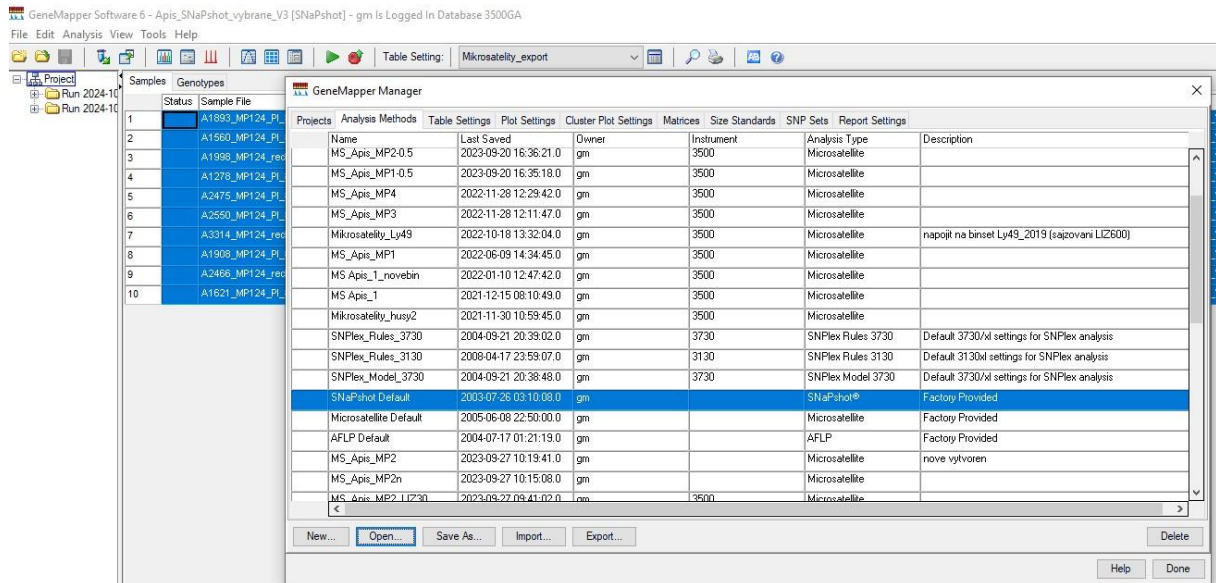
Nadefinujte panel dle obrázku a údajů níže. Panel obsahuje pouze data o použitých SNP markerech, tzn. názvy genů

```
Version GM v 4.1
Kit type:      SNP
Chemistry Kit Apis_SNaPs_v3      none
Panel  Apis_SNaPs_v3      none
ANK3 -      none  none  false
KRH1 -      none  none  false
AMB1 -      none  none  false
AMB6 -      none  none  false
FUTSCH      -      none  none  false
STK1 -      none  none  false
BETAS1      -      none  none  false
CTL2 -      none  none  false
KIDINS      -      none  none  false
HRP1 -      none  none  false
MRJP5 -      none  none  false
SOLC -      none  none  false
MUC1 -      none  none  false
```

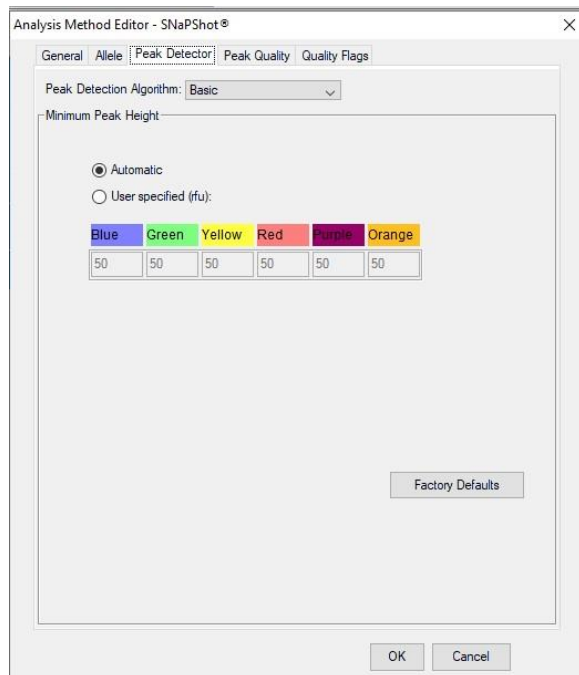
V případě, že Váš konkrétní přístroj má (obvykle drobnou) odchylku v separaci, je třeba jednotlivé biny uživatelsky upravit (posunout, obvykle vše jedním směrem). V případě, že potřebujete mít data srovnatelná s jinými laboratořemi, požádejte je nebo autory této metodiky o zaslání DNA kalibračních vzorků. Kalibraci je možné provést i po provedení analýz.

4.8.2 Definování Metody analýzy

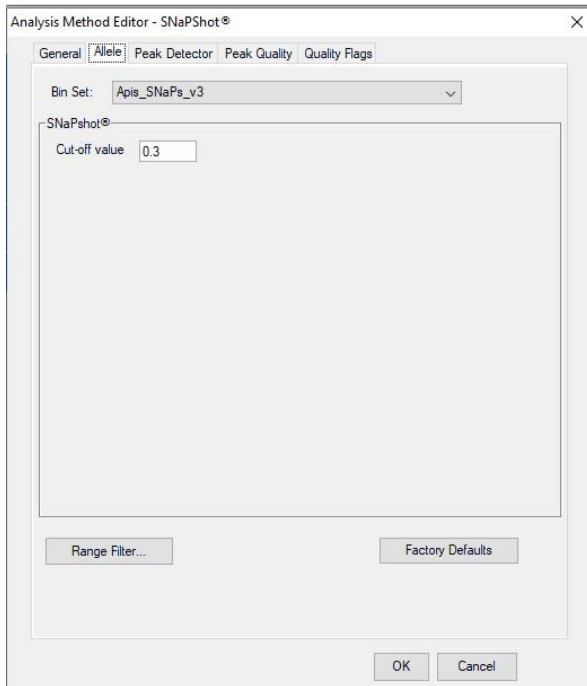
a) Otevřete *GeneMapper Manager*, okno *Analysis Method*, použijte metodu *SNaPshot Default*.



b) Zkontrolujte parametry detekce peaku (*Peak Detection*). Pokud není třeba parametry měnit, ponechejte automatické nastavení

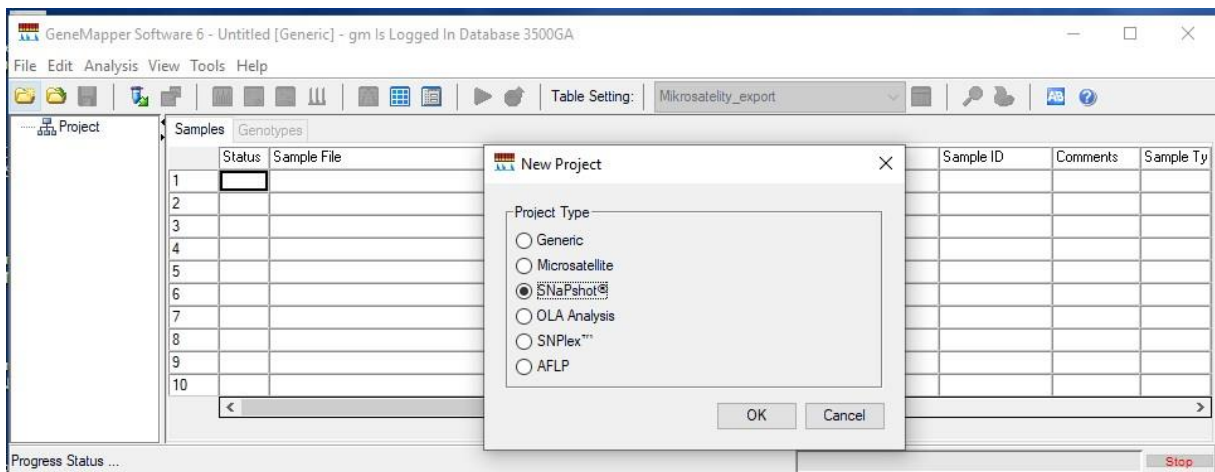


c) V okně Alele vyberte binset pro Vaši analýzu (Apis_Binset_MPC) a uložte do Analysis Method

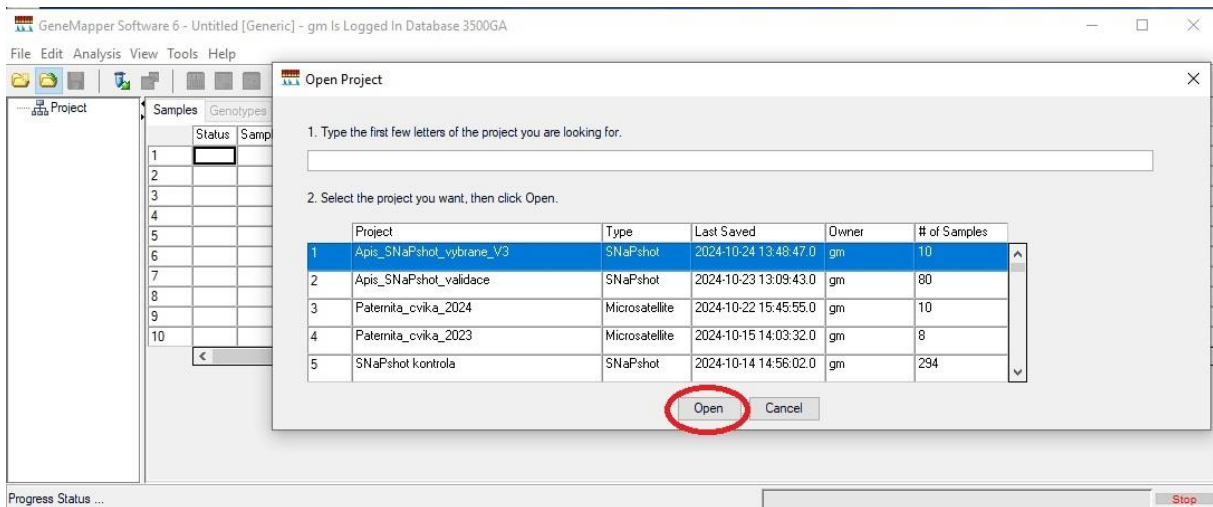


4.8.3 Analýza vzorků

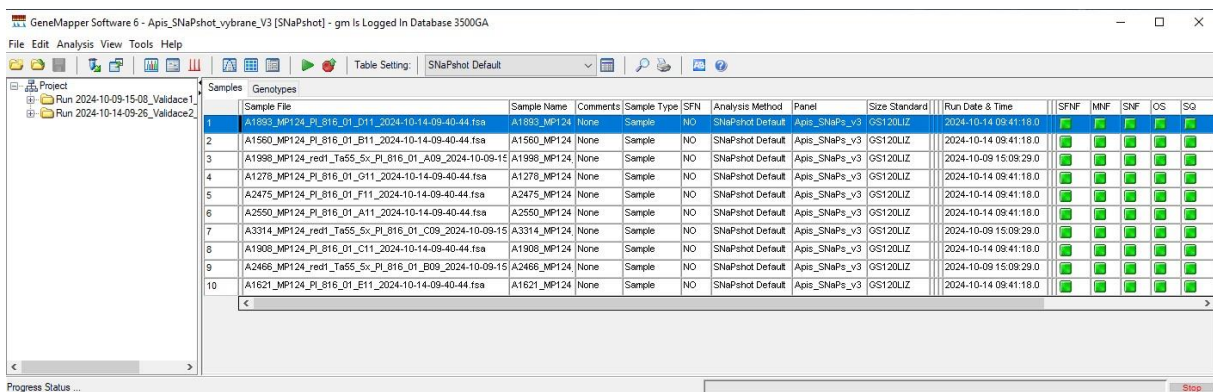
a) Vytvořte si nový projekt nebo otevřete stávající. Použijte šablonu SNaPshot.



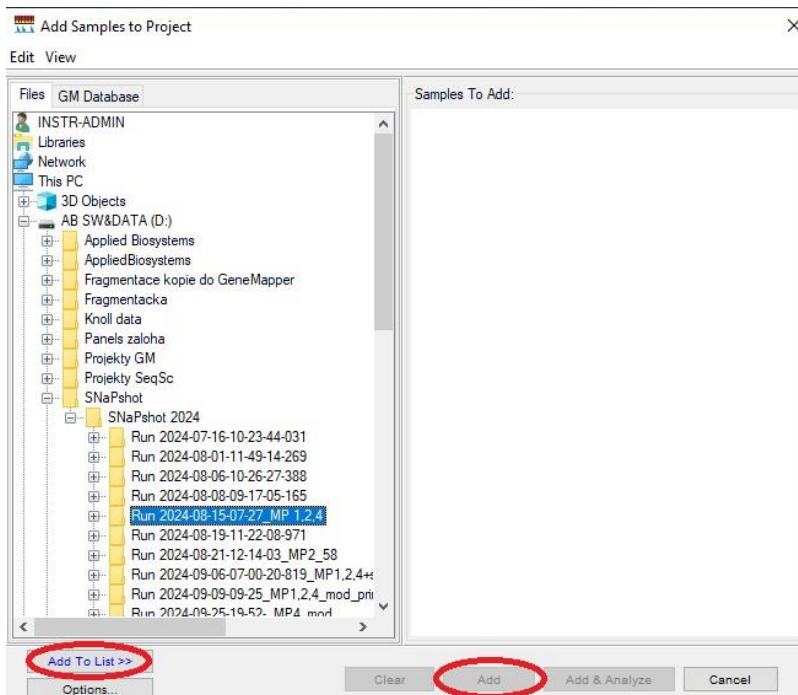
Zvolte projekt a otevřete ho (*Open*).



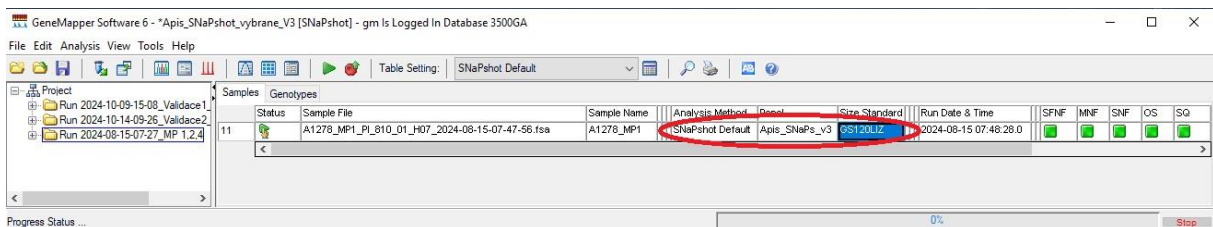
b) Po otevření projektu se zobrazí všechny vložené a analyzované vzorky. Pro přidání nových vzorků zadejte *Add Samples to Project*.



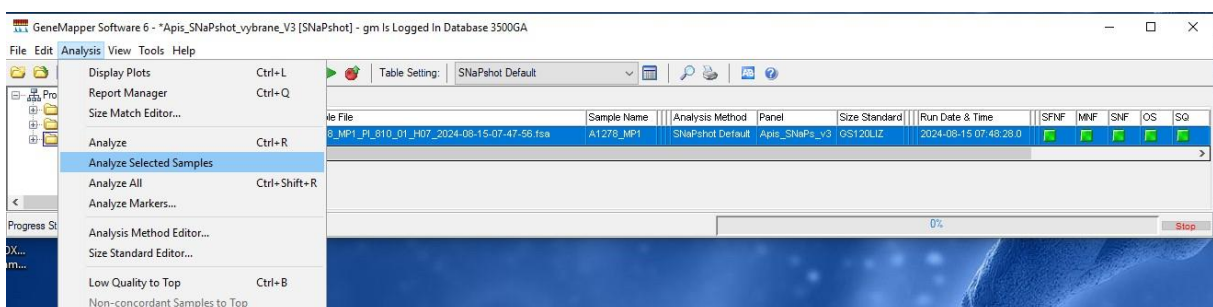
c) Vyberte cílový adresář se vzorky, které chcete přidat. Zvolte *Add To List* a poté *Add*.



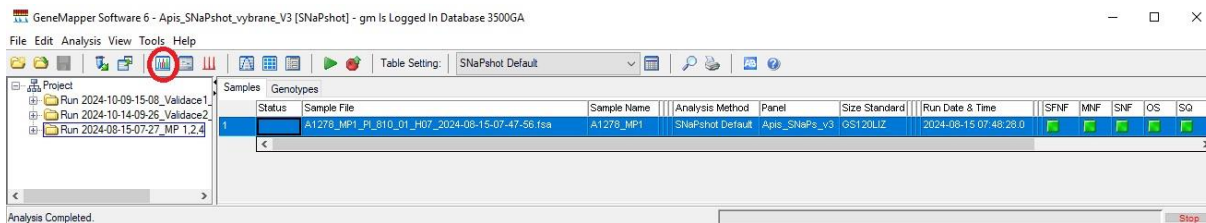
d) Po vložení vzorků zadejte parametry analýzy – analyzační metodu (SNaPshot Default), panel (Apis_SNaPshot_v3) a velikostní standard (GS120LIZ).



e) Označte vzorky a zadejte *Analyze Selected Samples* (pro případnou úpravu parametrů analýzy otevřete Analysis Method editor).

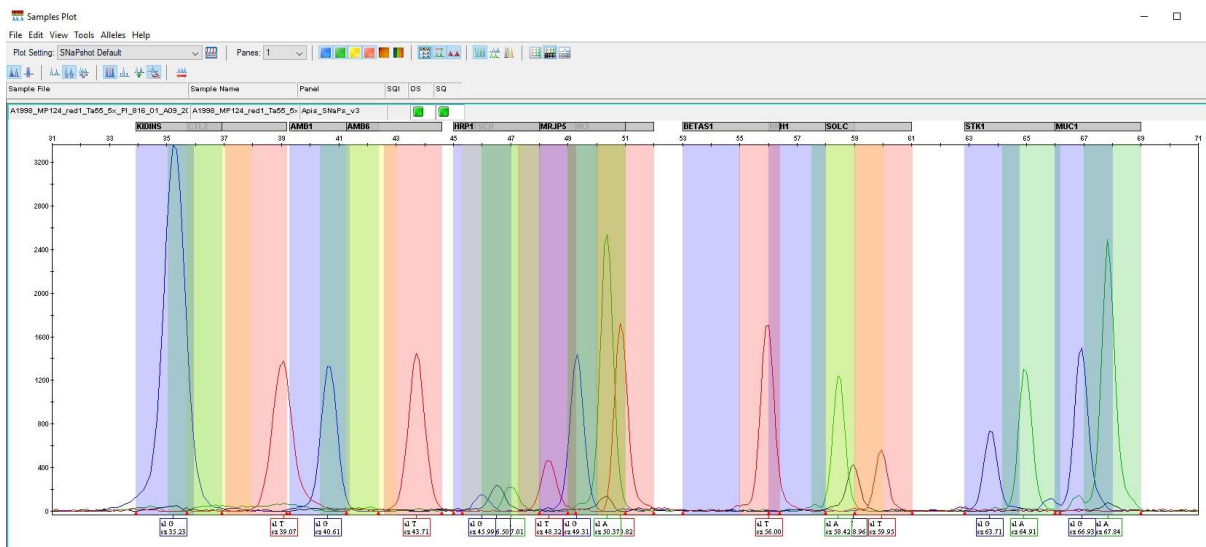


f) Po proběhnutí analýzy otevřete *Display Plots* pro grafické znázornění výsledků.

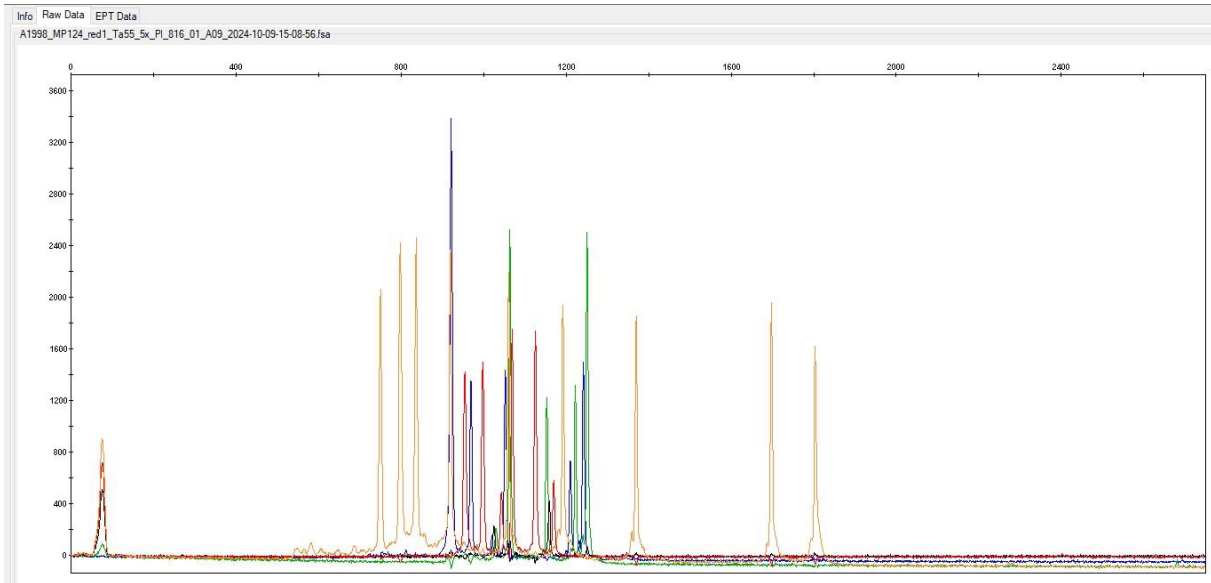


g) Elektroforetogram znázorňující výsledky FA.

Výsledný elektroforetogram je znázorněn na Obr. 10. Ke každému píku reprezentujícímu primer + bázi za primerem jsou přiřazeny biny, které charakterizují příslušné SNP i alelu podle detekované barvy. Elektroforetogram lze libovolně zvětšovat a detailně prohlížet. Metodika je navržena tak, že některé SNP se velikostně překrývají, ale software je dokáže rozlišit podle pozice a barvy (alely) definované v použitém binsetu (kap. 4.6.1). Prvotní informaci o kvalitě analýzy můžeme zjistit pomocí elektroforetogramu surových dat (Obr. 11), což je užitečné v případě problematického výsledku pro odhalení chyby, ke které došlo.

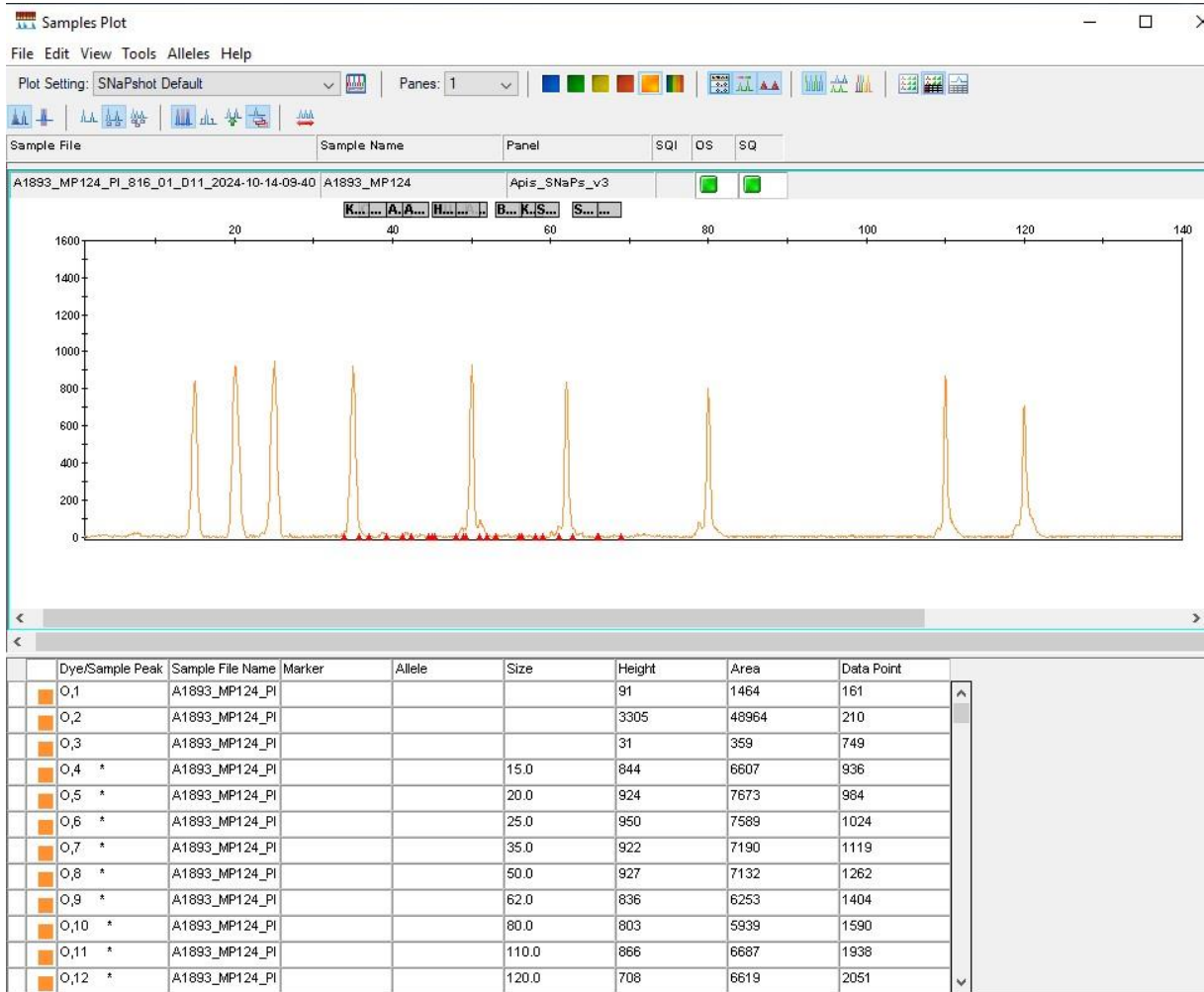


Obr. 10 Elektroforetogram s vyhodnocením



Obr. 11 Elektroforetogram surových dat

Kvalitu separace lze ověřit pomocí velikostního standardu značeného LIZ (oranžový), viz Obr. 12.



Obr. 12 Elektroforetogram velikostního standardu

h) Pro zobrazení genotypů zvolte záložku *Genotypes*

Sample	Sample File	Sample Name	Panel	Marker	Allele 1	Allele 2	Size 1	Size 2	Height 1	Height 2	Peak Area	Peak Area
1	A1278_MP124_PL	A1278_MP124	Apis_SNaPs_v3	AMB1	G	A	40.59	41.73	2249	2995	15865.0	21962.0
2	A1278_MP124_PL	A1278_MP124	Apis_SNaPs_v3	AMB6	T		43.79		849		6295.0	
3	A1278_MP124_PL	A1278_MP124	Apis_SNaPs_v3	ANK3	T		51.04		2525		17491.0	
4	A1278_MP124_PL	A1278_MP124	Apis_SNaPs_v3	BETAS1	T		56.09		1592		11106.0	
5	A1278_MP124_PL	A1278_MP124	Apis_SNaPs_v3	CTL2	T		38.9		988		9064.0	
6	A1278_MP124_PL	A1278_MP124	Apis_SNaPs_v3	FUTSCH	C	T	46.49	48.55	253	418	1847.0	2912.0
7	A1278_MP124_PL	A1278_MP124	Apis_SNaPs_v3	HRP1	G	A	46.2	47.18	86	130	623.0	871.0
8	A1278_MP124_PL	A1278_MP124	Apis_SNaPs_v3	KIDINS	G		34.69		3168		28542.0	
9	A1278_MP124_PL	A1278_MP124	Apis_SNaPs_v3	KRH1	G	A	56.43	58.63	98	290	706.0	2016.0
10	A1278_MP124_PL	A1278_MP124	Apis_SNaPs_v3	MRJP5	G	A	49.52	50.61	1723	2716	10759.0	17917.0
11	A1278_MP124_PL	A1278_MP124	Apis_SNaPs_v3	MUC1	G	A	67.0	68.06	2145	3801	13688.0	24018.0
12	A1278_MP124_PL	A1278_MP124	Apis_SNaPs_v3	SOLC	T		60.07		1211		7863.0	
13	A1278_MP124_PL	A1278_MP124	Apis_SNaPs_v3	STK1	G	A	64.01	65.26	1100	1832	6965.0	11585.0

4.8.4 Převod výsledků

Alely a genotypy získané metodou SNaPshot odpovídají bázím, které byly zapojeny do řetězce při extenzi. Protože pro extenzi se u některých genů použily reverzní primery (tzn. z nekódujícího vlákna), je třeba alely převést na reálné odpovídající kódujícímu (+) vláknu a to podle tabulky 10.

Tab. 10 Převod stanovených genotypů na reálné

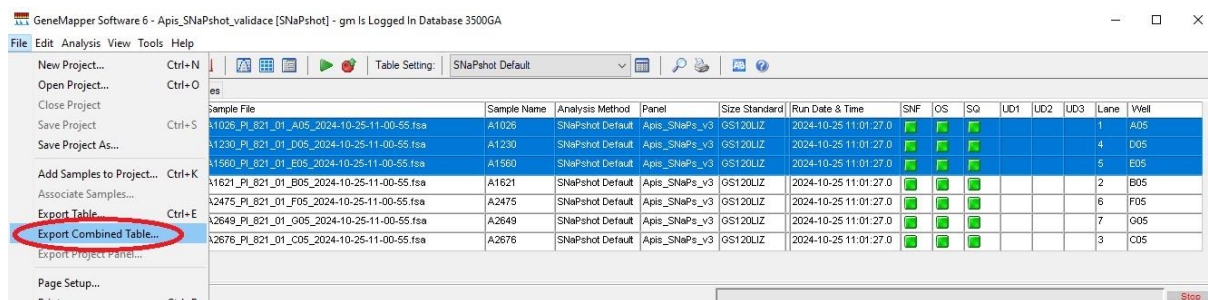
Název/Gen	SNP	Detekce SNaPshot
CTL2_SnR1	A/G	T/C
AMB1_SnR1	T/C	A/G
STK1_SnR2	C/T	G/A
MRJP5c_SnR2	C/T	G/A
SOLC_SnR1	G/A	C/T

Nepřevádí se:

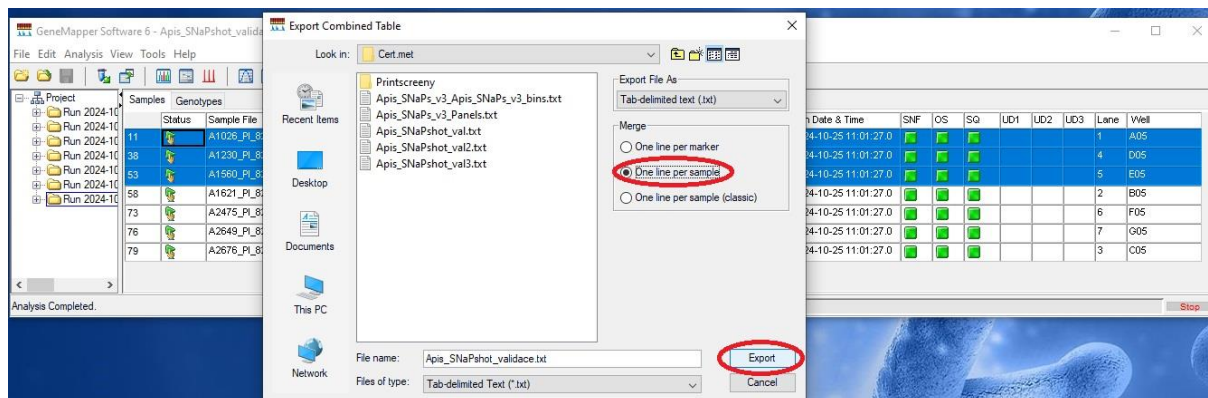
Název/Gen	SNP	Detekce SNaPshot
ANK3_SnF2	T/C	T/C
FUTSCH_SnF2	C/T	C/T
AMB6_SnF1	T/C	T/C
BETAS(1_SnF1)b	T/G	T/G
MUC1_SnF1	A/G	A/G
KRH1_SnF2	A/G	A/G
HRP1_SnF2	A/G	A/G
KIDINS_SnF1	G/A	G/A

4.8.5 Export výsledků

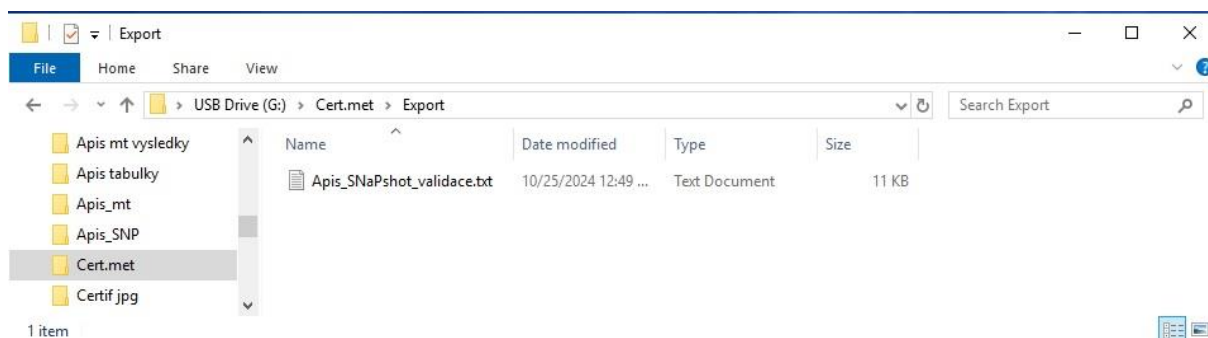
a) Označte vzorky, které chcete exportovat a zadejte *File/Export Combined Table*.



b) Zadejte cílový adresář, poté zaklikněte formát exportu *One line per sample* a zvolte *Export*.



c) Data ze vzniklého textového souboru je možné převést do MS Excel nebo podobného programu pro další úpravu a analýzu dat.



d) Ukázka vyexportovaného výsledku. Lze upravit do požadovaného formátu.

Sample File	Sample Name	Analysis Method	Panel	Size Standard	Run Date & Time	Marker	Allele 1	Allele 2	Marker	Allele 1	Allele 2	Marker	Allele 1	Allele 2
A1026_PL_821_01_A05_2024-10-25-11-00-55.fsa	A1026	SNaPshot Default	Apis_SNaPs_v3	GS120LIZ	25.10.2024 11:01	AMB1	A		AMB6	C	T	ANK3	T	
A1230_PL_821_01_D05_2024-10-25-11-00-55.fsa	A1230	SNaPshot Default	Apis_SNaPs_v3	GS120LIZ	25.10.2024 11:01	AMB1	A		AMB6	C	T	ANK3	T	
A1560_PL_821_01_E05_2024-10-25-11-00-55.fsa	A1560	SNaPshot Default	Apis_SNaPs_v3	GS120LIZ	25.10.2024 11:01	AMB1	A		AMB6	T		ANK3	C	T

4.9 Statistické zpracování výsledků

4.9.1 Statistický software

Pro vyhodnocení dat lze použít libovolný software, který je uživatel zvyklý používat. V rámci této metodiky doporučujeme GenAIEx, volně dostupný a jednoduchý na obsluhu, který ale poskytuje dostatečnou informativnost.

GenAIEx - *Genetic Analysis in Excel* (Peakall and Smouse 2006, 2012) je navržen jako uživatelsky přívětivý balík s intuitivním a konzistentním rozhraním, který uživatelům umožňuje analyzovat širokou škálu analýz populačních genetických dat v softwarovém prostředí MS Excel.

Software a podpůrná dokumentace jsou volně k dispozici na stránkách The Australian National University, Canberra, Austrálie na adrese URL <https://biology-assets.anu.edu.au/GenAIEx>. Na této adrese je k dispozici i podrobný manuál.

Ke stažení: <https://biology-assets.anu.edu.au/GenAIEx/Download.html>

4.9.2 Vstupní formát dat

Vstupní formát dat je specifický dle pokynů metodiky programu GenAIEx (genotyp SNP je ve dvou sloupcích a překódovaný na čísla: A=1, C=2, G=3, T=4). Soubor je tabulka v MS Excel (*.xlsx).

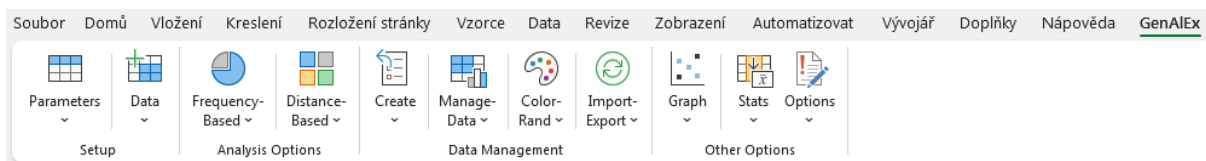
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1	13	39	1	39									
2	SNP včely			Pop1									
3	Sample	Pop	AMB6	FUTSCH		ANK3		BETAS1		STK1		KIDINS	
4	1	Pop1	2	4	2	2	4	4	3	4	2	4	3
5	2	Pop1	4	4	2	2	4	4	4	4	2	4	3
6	3	Pop1	4	4	2	4	2	4	3	3	2	2	3
7	4	Pop1	4	4	2	2	2	4	3	4	2	4	3
8	5	Pop1	4	4	2	2	4	4	3	3	2	4	3
9	6	Pop1	4	4	2	4	2	4	4	4	2	2	3
10	7	Pop1	2	4	2	4	4	4	3	4	2	4	3
11	8	Pop1	2	4	2	2	4	4	4	4	4	4	3
12	9	Pop1	4	4	2	2	4	4	3	4	4	4	3
13	10	Pop1	4	4	2	2	4	4	4	4	2	4	3
14	11	Pop1	4	4	2	2	4	4	3	3	2	2	3
15	12	Pop1	2	4	4	4	2	4	3	4	4	4	3
16	13	Pop1	4	4	4	4	4	4	4	4	2	2	3
17	14	Pop1	4	4	2	2	4	4	3	4	2	4	3
18	15	Pop1	4	4	2	2	4	4	4	4	2	2	3
19	16	Pop1	2	4	2	2	4	4	3	3	2	2	3
20	17	Pop1	4	4	2	2	2	4	3	4	2	2	3
21	18	Pop1	2	4	2	2	4	4	3	4	4	4	3
22	19	Pop1	4	4	2	4	4	4	3	4	2	2	3

Řádek 1: Buňka A1: počet lokusů; buňka B1: počet vzorků; buňka C1: počet populací; buňka D1: počet jedinců v populaci

Řádek 2: Buňka A2: libovolný název dat (např. SNP včely); buňka D2: název populace

Řádek 3: Buňka A3: označení sloupce číslo vzorku (Sample); buňka B2: označení sloupce název populace; Buňky C4 a dále: název SNP, genotyp je ve dvou sloupcích (označeno žlutě).

4.9.3 Programové rozhraní doplňku GenAIEx v MS Excel

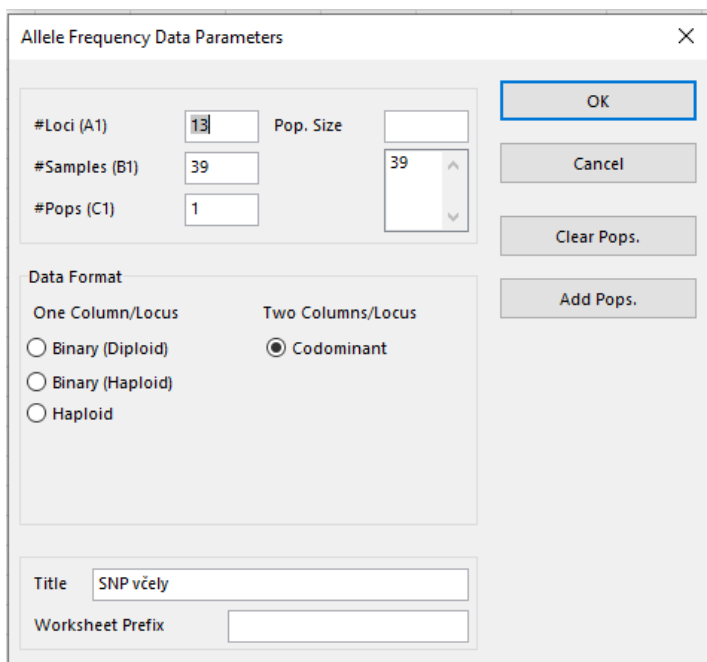
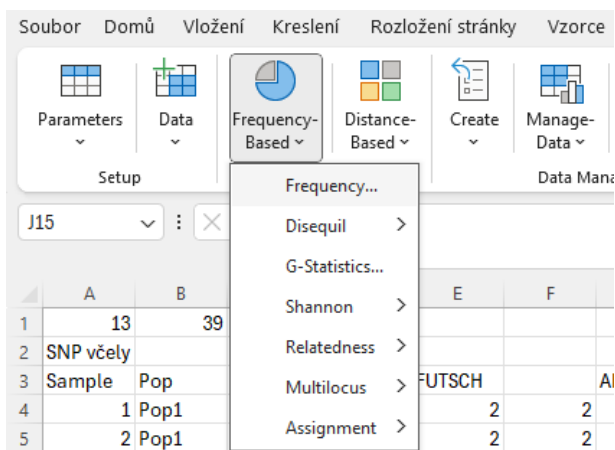


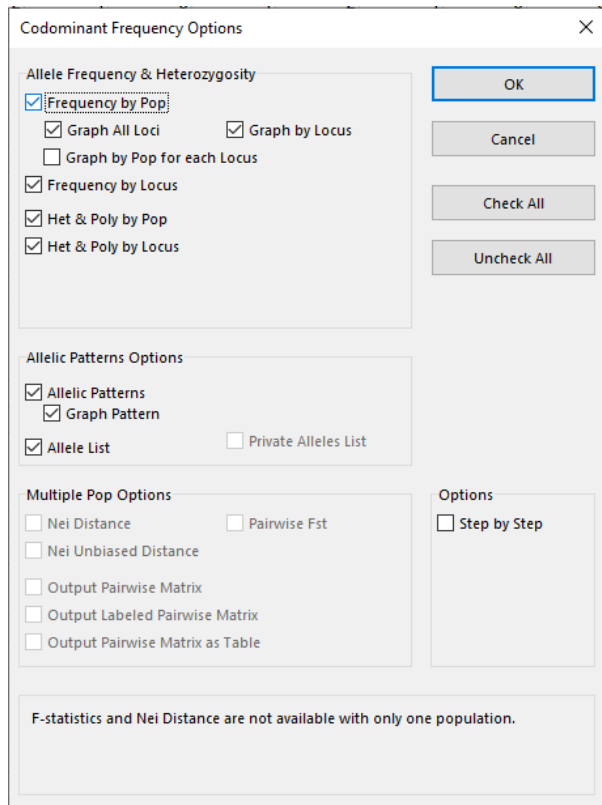
4.9.4 Import dat

Data není potřeba speciálně importovat. Je nutné mít otevřený list s daty SNP genotypů.

4.9.5 Použité ukazatele genetické diverzity

Postupujte v souladu s manuálem k software, zvolte požadovanou funkci (např. Frequency-Based pro výpočet parametrů diverzity dle Tab. 11. V Tab. 12 a 13 je uveden příklad vyhodnocení diverzity.





Tab. 11 Vysvětlení parametrů diverzity (GenAlEx 6.5)

Symbol	Význam	Funkce program	Výpočet
N	počet	No.	
H _o	zjištěná heterozygotnost	Observed Heterozygosity	No. of Hets / N
H _e	očekávaná heterozygotnost	Expected Heterozygosity	$H_E = 1 - \sum p_i^2$
uHe	nestranná očekávaná heterozygotnost	Unbiased Expected Heterozygosity	$(2N / (2N-1)) * H_e$
F	fixační index	Fixation Index	$F = \frac{H_E - H_o}{H_E}$

kde p_i je frekvence i-té alely v populaci

4.9.6 Diverzita zjištěná v modelové populaci včel

V Tab. 12 jsou uvedeny alely detekované u jednotlivých SNP markerů a jejich četnost, frekvence. U všech testovaných SNP byl prokázán polymorfismus.

Tab. 12 Zjištěné alely a jejich relativní frekvence ve validační populaci

Alela	AMB6	FUTSCH	ANK3	BETAS1	STK1	KIDINS	CTL2	AMB1	KRH1	HRP1	MRJP5	SOLC	MUC1
N	39	39	39	39	39	39	39	39	39	39	39	39	39
1 - A						0,064	0,821		0,885	0,449		0,744	0,603
2 - C	0,128	0,769	0,103		0,564			0,359			0,231		
3 - G				0,487		0,936	0,179		0,115	0,551		0,256	0,397
4 - T	0,872	0,231	0,897	0,513	0,436			0,641			0,769		

Tab. 13 Příklad vyhodnocení – výsledky diverzity souboru validace

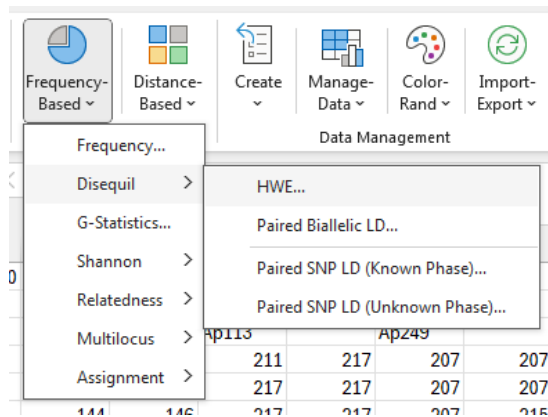
Locus	N	Na	Ne	I	Ho	He	uHe	F
AMB6	39	2,000	1,288	0,383	0,205	0,224	0,226	0,082
FUTSCH	39	2,000	1,550	0,540	0,308	0,355	0,360	0,133
ANK3	39	2,000	1,226	0,331	0,205	0,184	0,186	-0,114
BETAS1	39	2,000	1,999	0,693	0,462	0,500	0,506	0,076
STK1	39	2,000	1,968	0,685	0,462	0,492	0,498	0,061
KIDINS	39	2,000	1,136	0,238	0,077	0,120	0,122	0,359
CTL2	39	2,000	1,418	0,471	0,359	0,295	0,298	-0,219
AMB1	39	2,000	1,853	0,653	0,410	0,460	0,466	0,109
KRH1	39	2,000	1,257	0,358	0,179	0,204	0,207	0,121
HRP1	39	2,000	1,979	0,688	0,590	0,495	0,501	-0,192
MRJP5	39	2,000	1,550	0,540	0,359	0,355	0,360	-0,011
SOLC	39	2,000	1,616	0,569	0,410	0,381	0,386	-0,076
MUC1	39	2,000	1,919	0,672	0,538	0,479	0,485	-0,124
Mean	39,000	2,000	1,597	0,525	0,351	0,349	0,354	0,016
SE	0,000	0,000	0,088	0,043	0,042	0,037	0,038	0,044

Heterozygotnost je ukazatel hodnotící stav, kdy jedinec má dvě odlišné alely v daném lokusu umístěné na homologních chromozomech. Genetická rozmanitost v populaci se vyznačuje vyšší heterozygotností, nižší míra heterozygotnosti může signalizovat genetickou uniformitu. Hodnoty očekávané heterozygotnosti (H_e) se v našem souboru pro validaci pohybovaly v rozmezí 0,077 (KIDINS) až 0,590 (HRP1), průměrná hodnota $H_e = 0,349$. Zjištěná pozorovaná heterozygotnost (H_o) nabývala hodnot od 0,120 (KIDINS) do 0,495 (HRP1), s průměrnou hodnotou $H_o = 0,351$.

Hodnoty fixačního indexu F byly v rozmezí -0,219 (CTL2) až 0,359 (KIDINS), s průměrnou hodnotou $F = 0,016$. Kladné hodnoty vyjadřují snížení heterozygotnosti (může být způsobeno např.

vlivem inbreedingu), záporné hodnoty pak zvýšení heterozygotnosti než by se očekávalo za genetické rovnováhy.

Výpočet **Hardyho-Weinbergovy genetické rovnováhy (HWE)** lze provádět různými metodami a softwary. Doporučujeme využití software GenAIEx, kdy použijte volbu dle níže uvedeného obrázku. Výsledky testu u našeho validačního souboru viz. Tab. 14.



Tab. 14 Příklad – vypočtené hodnoty testu HWE pro soubor validace

Locus	DF	ChiSq	Prob	Signif
AMB6	1	0,264	0,607	ns
FUTSCH	1	0,693	0,405	ns
ANK3	1	0,509	0,475	ns
BETAS1	1	0,227	0,634	ns
STK1	1	0,147	0,701	ns
KIDINS	1	5,024	0,025	*
CTL2	1	1,866	0,172	ns
AMB1	1	0,460	0,498	ns
KRH1	1	0,569	0,451	ns
HRP1	1	1,438	0,230	ns
MRJP5	1	0,005	0,945	ns
SOLC	1	0,224	0,636	ns
MUC1	1	0,602	0,438	ns

Vysvětlivky: DF = stupně volnosti (degrees of freedom), ns= neprůkazné rozdíly (not significant), * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001

Pozn. S výjimkou lokusů KIDINS jsou všechny v genetické rovnováze.

5 Validace metodiky

5.1 Popis

Metodika byla vyvinuta na základě dat získaných z analýzy variability populace 39 náhodně vybraných včel v České republice, která sestává z 13 SNP lokusů analyzovaných ve 3 různých PCR multiplexech a v jedné SNaPshot reakci. Výsledky z této rozsáhlé analýzy byly srovnány s výsledky získanými Sangerovým sekvenováním stejných vzorků.

5.2 Výsledky validace

Výsledky srovnání genotypů u vybraných 39 vzorků včel v České republice jsou uvedeny v Tab.15a, 15b a 15c. Vyhodnocení frekvencí alel je uvedeno v Tab. 12. Základní charakteristiky diverzity jsou uvedeny v Tab. 13.

Tab. 15 Srovnání genotypů získaných pomocí metodiky 3 multiplexů a SNaPshot (sloupec vlevo) a pomocí Sangerova sekvenování jednotlivých PCR produktů (sloupec vpravo)

a) MP1

SNP	AMB6		AMB6		FUTSCH		FUTSCH		ANK3		ANK3		BETAS1		BETAS1		STK1		STK1	
	T/C		T/C		C/T		C/T		T/C		T/C		T/G		T/G		C/T		C/T	
	Alela 1	Alela 2	Alela 1	Alela 2	Alela 1	Alela 2	Alela 1	Alela 2	Alela 1	Alela 2	Alela 1	Alela 2	Alela 1	Alela 2	Alela 1	Alela 2	Alela 1	Alela 2	Alela 1	Alela 2
A011	C	T	C	T	C		C		T		T		G	T	G	T	C	T	C	T
A025	T		T		C		C		T		T		T		T		C	T	C	T
A054	T		T		C	T	C	T	C	T	C	T	G		G		C		C	
A071	T		T		C		C		C	T	C	T	G	T	G	T	C	T	C	T
A074	T		T		C		C		T		T		G		G		C	T	C	T
A447	T		T		C	T	C	T	C	T	C	T	T		T		C		C	
A1026	C	T	C	T	C	T	C	T	T		T		G	T	G	T	C	T	C	T
A1044	C	T	C	T	C		C		T		T		T		T		T		T	
A1065	T		T		C		C		T		T		G	T	G	T	T		T	
A1095	T		T		C		C		T		T		T		T		C	T	C	T
A1113	T		T		C		C		T		T		G		G		C		C	
A1119	C	T	C	T	T		T		C	T	C	T	G	T	G	T	T		T	
A1128	T		T		T		T		T		T		T		T		C		C	
A1152	T		T		C		C		T		T		G	T	G	T	C	T	C	T
A1155	T		T		C		C		T		T		T		T		C		C	
A1176	C	T	C	T	C		C		T		T		G		G		C		C	
A1185	T		T		C		C		C	T	C	T	G	T	G	T	C		C	
A1206	C	T	C	T	C		C		T		T		G	T	G	T	T		T	
A1221	T		T		C	T	C	T	T		T		G	T	G	T	C		C	
A1230	C	T	C	T	C		C		T		T		G		G		C	T	C	T
A1233	T		T		C	T	C	T	T		T		G	T	G	T	T		T	

A1278	T	T	C T	C T	T	T	T	T	C T	C T
A1366	T	T	C	C	C T	C T	T	T	C	C
A1383	T	T	C	C	T	T	G T	G T	C T	C T
A1398	T	T	C T	C T	T	T	G	G	C T	C T
A1560	T	T	C	C	C T	C T	G T	G T	C T	C T
A1614	T	T	C	C	T	T	G T	G T	C	C
A1621	C T	C T	T	T	T	T	T	T	C T	C T
A1827	T	T	C T	C T	T	T	T	T	T	T
A1893	T	T	C T	C T	T	T	G T	G T	C T	C T
A1908	T	T	C	C	T	T	G	G	C	C
A1998	T	T	C T	C T	T	T	T	T	C T	C T
A2466	C	C	C	C	T	T	G	G	C T	C T
A2475	T	T	C T	C T	T	T	G	G	C	C
A2550	T	T	C	C	T	T	G T	G T	C T	C T
A2649	T	T	C	C	T	T	G	G	T	T
A2676	T	T	C T	C T	C T	T	G T	G T	T	T
A3224	T	T	C	C	C T	C T	G T	G T	C	C
A3314	T	T	C	C	T	T	G T	G T	C T	C T

b) MP2

SNP	KIDINS		KIDINS		CTL2		CTL2		AMB1		AMB1		KRH1		KRH1	
	G/A		G/A		A/G		A/G		T/C		T/C		A/G		A/G	
	Alela 1	Alela 2	Alela 1	Alela 2	Alela 1	Alela 2	Alela 1	Alela 2	Alela 1	Alela 2	Alela 1	Alela 2	Alela 1	Alela 2	Alela 1	Alela 2
A011	G		G		A		A		T	C	C	T	A		A	
A025	G		G		G	A	G	A	T		T		A		A	
A054	G		G		A		A		T	C	C	T	A		A	
A071	G		G		A		A		T		T		A		A	
A074	G		G		A		A		C		C		A		A	
A447	G		G		G	A	G	A	C	T	C	T	A		A	
A1026	G		G		G	A	G	A	T		T		A		A	
A1044	G		G		G	A	G	A	C	T	C	T	A		A	
A1065	G		G		A		A		T		T		A		A	
A1095	G		G		A		A		T		T		A		A	
A1113	G		G		A		A		C		C		A		A	
A1119	G		G		G	A	G	A	C	T	C	T	A		A	
A1128	G		G		A		A		C	T	C	T	G	A	G	A
A1152	G		G		A		A		T		T		A		A	
A1155	G		G		A		A		C		C		A		A	
A1176	G		G		A		A		T		T		A		A	
A1185	G		G		A		A		C	T	C	T	A		A	
A1206	G		G		G	A	G	A	T		T		A		A	
A1221	G		G		G	A	G	A	C		C		G		G	
A1230	G		G		A		A		T		T		A		A	
A1233	G		G		A		A		T		T		A		A	
A1278	G		G		A		A		C	T	C	T	G	A	G	A
A1366	A		A		A		A		C		C		A		A	
A1383	G		G		G	A	G	A	T		T		G	A	G	A

A1398	G	G	A	A	C T	C T	A	A
A1560	G A	G A	G A	G A	T	T	A	A
A1614	G	G	A	A	C T	C T	A	A
A1621	G	G	A	A	C T	C T	G A	G A
A1827	G	G	A	A	T	T	A	A
A1893	G	G	A	A	C T	C T	A	A
A1908	G A	G A	G A	G A	C T	C T	A	A
A1998	G	G	A	A	C	C	A	A
A2466	G	G	G A	G A	C T	C T	A	A
A2475	G A	G A	G A	G A	C T	C T	G A	A G
A2550	G	G	G A	G A	C T	C T	A	A
A2649	G	G	A	A	T	T	A	A
A2676	G	G	A	A	T	T	G A	G A
A3224	G	G	G A	G A	T	T	A	A
A3314	G	G	A	A	T	T	G A	A G

c) MP3

SNP	HRP1		HRP1		MRJP5		MRJP5		SOLC		SOLC		MUC1		MUC1	
	A/G		A/G		C/T		C/T		G/A		G/A		A/G		A/G	
A	Alela 1	Alela 2	Alela 1	Alela 2	Alela 1	Alela 2	Alela 1	Alela 2	Alela 1	Alela 2	Alela 1	Alela 2	Alela 1	Alela 2	Alela 1	Alela 2
A011	A		A		T		T		G	A	G	A	A		A	
A025	G		G		C	T	C	T	G	A	G	A	G	A	G	A
A054	G		G		T		T		G	A	G	A	A		A	
A071	G		G		C	T	C	T	A		A		G	A	G	A
A074	G		G		T		T		A		A		A		A	
A447	G	A	G	A	C	T	C	T	G	A	G	A	G	A	G	A
A1026	G		G		C	T	C	T	G	A	G	A	G	A	G	A
A1044	G	A	G	A	T		T		A		A		G	A	G	A
A1065	G	A	G	A	T		T		G	A	G	A	A		A	
A1095	G	A	G	A	T		T		G	A	G	A	G		G	
A1113	G	A	G	A	T		T		A		A		A		A	
A1119	A		A		T		T		A		A		A		A	
A1128	G		G		T		T		G	A	G	A	G	A	G	A
A1152	G	A	G	A	T		T		A		A		G	A	G	A
A1155	G	A	G	A	T		T		A		A		G	A	G	A
A1176	G	A	G	A	T		T		G	A	G	A	A		A	
A1185	G		G		T		T		A		A		G		G	
A1206	A		A		C	T	C	T	A		A		G	A	G	A
A1221	G		G		T		T		G	A	G	A	G	A	G	A
A1230	G		G		C	T	C	T	A		A		A		A	
A1233	G	A	G	A	T		T		A		A		G	A	G	A
A1278	G	A	G	A	C	T	C	T	A		A		G	A	G	A
A1366	G	A	G	A	C	T	C	T	A		A		G	A	G	A
A1383	G	A	G	A	T		T		G	A	G	A	G	A	G	A

A1398	A	A	T	T	A	A	G	G
A1560	G A	G A	T	T	A	A	G	G
A1614	G A	G A	T	T	A	A	A	A
A1621	G A	G A	C T	C T	G A	G A	G A	G A
A1827	G A	G A	T	T	G	G	A	A
A1893	G A	G A	C	C	A	A	G A	G A
A1908	G A	G A	C T	C T	A	A	G A	G A
A1998	G A	G A	C T	C T	G A	G A	G A	G A
A2466	A	A	T	T	G A	G A	A	A
A2475	G A	G A	C	C	A	A	G	G
A2550	G A	G A	C T	C T	A	A	G A	G A
A2649	G	G	C T	C T	A	A	A	A
A2676	G A	G A	T	T	G A	G A	A	A
A3224	A	A	C T	C T	G A	G A	G A	G A
A3314	G A	G A	T	T	G	G	G A	G A

5.3 Závěr

Z celkového počtu 507 genotypů byla zjištěna nejednoznačnost učení u 10 (1,9 %) a pouze v 1 případě nesoulad s výsledkem sekvenace u MP1, genu ANK3 a vzorku A2676 (chybějící alela C). Po opakování analýzy byly nejednoznačné genotypy určeny jednoznačně a správně, nesoulad u jednoho genotypu ovšem zůstal.

Celkově se jedná o dobrý soulad výsledků mezi určením genotypů pomocí sekvenování a námi popsanou metodou založenou na analýze SNaPshot. Na základě těchto dat lze konstatovat, že předložená metodikou pro certifikaci tak má vysokou spolehlivost.

6 Novost postupu

Metodika pro hodnocení genetické variability včely medonosné zaměřená na variabilitu v kandidátních genech majících vztah k odolnosti vůči varroáze a infekčním nemocem včel chovaných v České republice doposud není k dispozici. Hledání a výběr kandidátních genů ve světě je ve středu pozornosti genetiků, aplikovaná metodika ale dosud vyvinuta nebyla. Výhodou této metodiky je to, že v případě objevení nových kandidátních genů (a SNP) je možno tuto metodiku relativně snadno doplnit nebo modifikovat, vyznačuje se totiž značnou měrou univerzálnosti.

7 Uplatnění metodiky

Metodika bude nabízena k použití včelařským svazům a šlechtitelům pro efektivní hodnocení variability uvnitř genů, které jsou kandidátní pro odolnost k varroáze a infekcím ve šlechtěných populacích a sledování genetické variability ve včelstvech u běžných chovatelů, kteří mají být cílem šlechtitelské činnosti. Zároveň si variabilitu mohou nechat otestovat i jednotliví chovatelé včel. Vlastní provedení musí být realizováno v laboratořích ovládajících základní technologie práce s DNA, tzn. izolaci DNA, amplifikaci DNA a fluorescenční fragmentační analýzu.

8 Ekonomické aspekty

Odhad nákladů (v tis. Kč) na zavedení postupů uvedených v metodice:

Předpokladem pro realizaci metodiky uživatelem je příslušné přístrojové vybavení uvedené v kapitolách 4.4.1, 4.6.1 a 4.7.1 této metodiky. Dále je třeba pořízení sady 26 standardních primerů pro multiplexní PCR a sady 4 standardně dlouhých primerů pro SNaPshot v celkové ceně 6 tis Kč vč. DPH. Dále je třeba pořídit sadu 9 dlouhých primerů pro SNaPshot čištěných HPLC v ceně 10 tis Kč vč. DPH. Vlastní provádění metodiky již vyžaduje pouze pokročilé odborné znalosti a zkušenosti personálu a dále náklady na laboratorní materiál. Ty zahrnují cenu DNA izolačního kitu, PCR polymerázový mix, SNaPshot kit, zkumavky a plasty, polymer POP-7, elektroforetické pufrы,

velikostní standard LIZ120. Vzhledem k tomu, že jsme optimalizovali metodiku na 4 násobné ředění oproti manuálu výrobce, dosáhli jsme snížení nákladů na nákup nejdražší položky – SnaPshot kitu ze standardních 200 Kč na reakci na příznivých 50 Kč na reakci.

Celkové materiální náklady na analýzu jednoho vzorku jsou tedy cca 200 Kč. Náklady lze snížit cca o 10-20 % v případě analýzy většího množství vzorků, v maximálním procentu při analýze celého plata (96 vzorků).

Odhad ekonomického přínosu pro uživatele a přínos z hlediska určení a případné ochrany diverzity je z hlediska finančního problematicky vyčíslitelný. Nicméně z hlediska biologického, ekologického a ekonomického je přínos vědecky podložen. Uchování genetické diverzity u včel, obzvláště v genech spojených s odolností, je totiž významné pro potenciální šlechtění obzvláště v nynější době zvýšeného tlaku patogenů na včelstva. Naše metodika umožňuje diverzitu hodnotit a sledovat. Neexistovala doposud žádná jednoduchá a relativně levná metodika pro hodnocení diverzity genů spojených s odolností vůči onemocnění u včel v ČR.

9 Seznam použité související literatury

- BROECKX, Bart J. G. et al. 2019. Honey bee predisposition of resistance to ubiquitous mite infestations. *Scientific Reports*. 9(1), 1-11. ISSN 2045-2322. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44254-8>
- BRUTSCHER, Laura M; DAUGHENBAUGH, Katie F; FLENNIKEN, Michelle L. 2015. Antiviral defense mechanisms in honey bees. *Current Opinion in Insect Science*. 10, 71-82. ISSN 22145745. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.04.016>
- CONLON, Benjamin H. et al. 2019. A gene for resistance to the Varroa mite (Acari) in honey bee (*Apis mellifera*) pupae. *Molecular Ecology*. 28(12), 2958-2966. ISSN 0962-1083. <https://doi.org/10.1111/mec.15080>
- GALBRAITH, David A. et al. 2015. Parallel Epigenomic and Transcriptomic Responses to Viral Infection in Honey Bees (*Apis mellifera*). *PLOS Pathogens*. 11(3). ISSN 1553-7374. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004713>
- HADDAD, Nizar et al. 2016. Next generation sequencing of *Apis mellifera syriaca* identifies genes for Varroa resistance and beneficial bee keeping traits. *Insect Science*. 23(4), 579-590. ISSN 1672-9609. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12205>
- HARBO, John R; HARRIS, Jeffrey W. 2005. Suppressed mite reproduction explained by the behaviour of adult bees. *Journal of Apicultural Research*. 44(1), 21-23. ISSN 0021-8839. <https://doi.org/10.1080/00218839.2005.11101141>
- HARBO, John R.; HARRIS, Jeffrey W. 2008. Responses to Varroa by honey bees with different levels of Varroa Sensitive Hygiene. *Journal of Apicultural Research*. 48(3), 156-161. ISSN 0021-8839. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.48.3.02>
- HENRIQUES, Dora et al. 2021. A SNP assay for assessing diversity in immune genes in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Scientific Reports*. 11(1), 1-12. ISSN 2045-2322. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94833-x>
- KENCE, Meral et al. 2013. Honey bee colonies from different races show variation in defenses against the varroa mite in a 'common garden'. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 149(1), 36-43. ISSN 0013-8703. <https://doi.org/10.1111/eea.12109>
- KIM, Jong Seok et al. 2019. Single-nucleotide polymorphism markers in mitochondrial genomes for identifying Varroa destructor -resistant and -susceptible strains of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Mitochondrial DNA Part A*. 30(3), 477-489. ISSN 2470-1394. <https://doi.org/10.1080/24701394.2018.1551385>
- KNOLL, Aleš et al. 2024. Haplotype Diversity in mtDNA of Honeybee in the Czech Republic Confirms Complete Replacement of Autochthonous Population with the C Lineage. *Insects*. 15(7). ISSN 2075-4450. <https://doi.org/10.3390/insects15070495>
- LARSEN, Alejandra; REYNALDI, Francisco José; GUZMÁN-NOVOA, Ernesto. 2019. Fundamentals of the honey bee (*Apis mellifera*) immune system. Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 10(3), 705-728. ISSN 2448-6698. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i3.4785>
- LE CONTE, Y. et al. 2011. Social immunity in honeybees (*Apis mellifera*): transcriptome analysis of varroa-hygienic behaviour. *Insect Molecular Biology*. 20(3), 399-408. ISSN 09621075. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2011.01074.x>

- LEFEBRE, Regis et al. 2024. Allele Frequencies of Genetic Variants Associated with Varroa Drone Brood Resistance (DBR) in Apis mellifera Subspecies across the European Continent. *Insects*. 15(6). ISSN 2075-4450. <https://doi.org/10.3390/insects15060419>
- LEFEBRE, Regis et al. 2024. Population-wide modelling reveals prospects of marker-assisted selection for parasitic mite resistance in honey bees. *Scientific Reports*. 14(1). ISSN 2045-2322. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-58596-5>
- LIU, Y. et al. 2016. Larva-mediated chalkbrood resistance-associated single nucleotide polymorphism markers in the honey bee *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*. 25(3), 239-250. ISSN 0962-1075. <https://doi.org/10.1111/imb.12216>
- LOCKE, Barbara et al. 2012. Host adaptations reduce the reproductive success of Varroa destructor in two distinct European honey bee populations. *Ecology and Evolution*. 2(6), 1144-1150. ISSN 2045-7758. <https://doi.org/10.1002/ece3.248>
- MCMENAMIN, Alexander et al. 2018. Honey Bee and Bumble Bee Antiviral Defense. *Viruses*. 10(8), 395-416. ISSN 1999-4915. <https://doi.org/10.3390/v10080395>
- MONDET, Fanny et al. 2015. Antennae hold a key to Varroa-sensitive hygiene behaviour in honey bees. *Scientific Reports*. 5(1), 5-16. ISSN 2045-2322. <https://doi.org/10.1038/srep10454>
- MONDET, Fanny et al. 2020. Honey bee survival mechanisms against the parasite Varroa destructor: a systematic review of phenotypic and genomic research efforts. *International Journal for Parasitology*. 50(6-7), 433-447. ISSN 00207519. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.03.005>
- NAVAJAS, M et al. 2008. Differential gene expression of the honey bee *Apis mellifera* associated with Varroa destructor infection. *BMC Genomics*. 9(1), 1-11. ISSN 1471-2164. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-301>
- NEGRI, Pedro et al. 2016. Cellular immunity in *Apis mellifera*: studying hemocytes brings light about bees skills to confront threats. *Apidologie*. 47(3), 379-388. ISSN 0044-8435. <https://doi.org/10.1007/s13592-015-0418-2>
- SCHÖNING, Caspar et al. 2012. Evidence for damage-dependent hygienic behaviour towards Varroa destructor-parasitised brood in the western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Experimental Biology*. 215(2), 264-271. ISSN 1477-9145. <https://doi.org/10.1242/jeb.062562>
- SEPEHRI Bitá et al. 2023. Molecular Screening of Varroa-Resistant Trait of Honey Bee Colonies based on NorpA2 Candidate Gene Polymorphism: A Genetic Case-Control Study. *Iranian Journal of Applied Animal Science*. 13(1):177-185. ISSN 2251631X.
- SPÖTTER, Andreas et al. 2016. Genome-Wide Association Study of a Varroa-Specific Defense Behavior in Honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Heredity*. 107(3), 220-227. ISSN 0022-1503. <https://doi.org/10.1093/jhered/esw005>
- RAMSEY, Samuel D. et al. 2019. Varroa destructor feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 116(5), 1792-1801. ISSN 0027-8424. <https://doi.org/10.1073/pnas.1818371116>
- TEIXEIRA, Érica Weinstein et al. 2021. Transcriptomic analysis suggests candidate genes for hygienic behavior in African-derived *Apis mellifera* honeybees. *Apidologie*. 52(2), 447-462. ISSN 0044-8435. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00834-6>

TSURUDA, Jennifer M. et al. 2012. High-Resolution Linkage Analyses to Identify Genes That Influence Varroa Sensitive Hygiene Behavior in Honey Bees. *PLoS ONE*. 7(11), 1-8. ISSN 1932-6203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048276>

YANG, Xiaolong; COX-FOSTER, Diana L; RBERENBAUM, May R. 2005. Impact of an Ectoparasite on the Immunity and Pathology of an Invertebrate: Evidence for Host Immunosuppression and Viral Amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102(21), 7470-7475. ISSN 00278424. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501860102>

10 Seznam publikací, které předcházely metodice

Publikace, které by předcházely uvedené metodice, nejsou k dispozici, neboť metodika byla vyvíjena jako nová pro účely řešení tohoto aplikovaného projektu. Očekáváme spíše vědecké práce, které budou následovat s využitím této metodiky.

Obsah

1 Cíl.....	4
2 Úvod.....	4
2.1 Včela medonosná	5
2.2 Onemocnění včely medonosné.....	5
2.2.1 Virová onemocnění.....	5
2.2.2 Bakteriální onemocnění.....	6
2.2.3 Fungální onemocnění	7
2.2.4 Parazitární onemocnění	8
2.3 Geny a SNP spojené s odolností vůči infekcím a parazitům	9
2.3.1. Genetický výzkum odolnosti u včely medonosné	9
2.3.2. Imunitní geny	10
2.3.3. Geny asociované s hygienickým chováním.....	10
2.3.4. Geny asociované s mechanismem potlačení reprodukce varroázy (SMR – suppressed mite reproduction)	11
3 Vývoj metodiky.....	12
3.1 Získání dat pro výběr kandidátních genů	12
3.2 Charakteristika vybraných genů obsahujících kandidátní SNP.....	14
3.2.1. SNP spojené s imunitním systémem.....	14
3.2.2. SNP spojené s hygienickým chováním.....	14
3.2.3. SNP spojené s potlačením reprodukce varroázy.....	14
3.2.4. SNP v genu MRJP5 – odolnost proti zvápenatění plodu.....	15
3.3 Sekvence genů a vyhledání SNP	16
4 Vlastní popis metodiky.....	17
4.1 Sběr a uchování vzorků	17
4.2 Izolace DNA.....	17
4.2.1 Vzorky včel	17
4.2.2 Izolace DNA pomocí chelexu.....	17
4.2.3 Izolace DNA pomocí NucleoSpin® Tissue od firmy Macherey-Nagel	18
4.2.4 Izolace DNA pomocí Genomic DNA mini kit (Tissue) od firmy Geneaid.....	20
4.3 Ověření kvality izolované DNA pomocí agarózové gelové elektroforézy.....	21
4.3.1 Výsledný elektroforetogram izolované DNA.....	23
4.4 Multiplex PCR.....	23
4.4.1 Materiál a přístroje	25

4.4.2 Pracovní postup	25
4.4.3 Teplotní profil reakce	28
4.4.4 Ověření multiplex PCR pomocí horizontální agarózové gelové elektroforézy	29
4.4.5 Ověření multiplex PCR pomocí čipové elektroforézy	29
4.5 Čištění PCR	31
4.6 SNaPshot	31
4.6.1 Materiál a přístroje	31
4.6.2. SNaPshot primery	31
4.6.3. Extenze	33
4.6.4. Post-extenze (přečištění)	34
4.7 SNaPshot fragmentační analýza	34
4.7.1 Materiál a přístroje	34
4.7.2 Příprava vzorku na SNaPshot fragmentační analýzu	34
4.7.3 Denaturace	35
4.7.4 Umístění vzorků	35
4.7.5 Definování plata vzorků	36
4.7.6 Konfigurace parametrů analýzy	38
4.7.7 Spuštění analýzy	42
4.8 Vyhodnocení	45
4.8.1 Definování Panelu	45
4.8.2 Definování Metody analýzy	48
4.8.3 Analýza vzorků	49
4.8.4 Převod výsledků	54
4.8.5 Export výsledků	55
4.9 Statistické zpracování výsledků	57
4.9.1 Statistický software	57
4.9.2 Vstupní formát dat	57
4.9.3 Programové rozhraní doplňku GenAlEx v MS Excel	58
4.9.4 Import dat	58
4.9.5 Použité ukazatele genetické diverzity	58
4.9.6 Diverzita zjištěná v modelové populaci včel	60
5 Validace metodiky	62
5.1 Popis	62
5.2 Výsledky validace	62
5.3 Závěr	69
6 Novost postupu	69
7 Uplatnění metodiky	69

8 Ekonomické aspekty.....	69
9 Seznam použité související literatury	71
10 Seznam publikací, které předcházely metodice.....	73
Obsah.....	74

Název: Metodika hodnocení diverzity jednonukleotidových polymorfismů (SNP) v kandidátních genech rezistence vůči infekčním onemocněním u včely medonosné

Autoři: Aleš Knoll, Martin Šotek, Petra Bartoňová, Antonín Přidal, Tomáš Urban

Vydala: Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

Vydání: první, 2024

ISBN 978-80-7701-016-0 (online ; pdf)

<https://doi.org/10.11118/978-80-7701-016-0>

