



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH **ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

Katedra Genetiky a zemědělských biotechnologií

Diplomová práce

Monitoring výskytu virů DWV, BQCV a CBPV ve včelstvech na území
ČR

Autor práce: Bc. Václav Zahradník

Vedoucí práce: Ing. Irena Hoštičková, PhD.

České Budějovice
2021

Prohlášení

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

V Českých Budějovicích dne

.....
Podpis

Abstrakt

Diplomová práce se zabývá zjištěním míry nákazy vybranými onemocněními mezi včelstvy na území České republiky. V literární rešerši jsou zmíněné virové onemocnění, problematika a způsoby izolace total RNA ze vzorku včel. Metodika je dále zaměřena na izolaci total RNA, amplifikaci virové RNA ve vzorku pomocí RT-PCR se specifickými primery. Hodnocení výsledků je provedeno pomocí elektroforézy a následným osekvenováním pozitivního vzorku a porovnáním sekvence v databázi NCBI.

Klíčová slova: Včelstvo, RNA izolace, RT-PCR metoda, virová nákaza, sekvenování

Abstract

This diploma thesis deals with the determination of the degree of infection by selected diseases among hives in Czech republic. The literature search mentions viral diseases, problems and methods of isolating total RNA from a sample of bees. The methodology is further focused on the isolation of total RNA, amplification of viral RNA in the sample by RT-PCR with specific primers. Evaluation of the results is performed by electrophoresis and subsequent sequencing of the positive sample and sequence comparison in the NCBI database.

Keywords: hives, RNA isolation, RT-PCR method, viral infection, sequencing

Poděkování

Rád bych tímto poděkoval Ing. Ireně Hoštičkové PhD., za podporu a pomoc při psaní této diplomové práce a za její cenné rady, jak v oblasti úpravy této práce, tak v oblasti práce v laboratoři. Další velké poděkování patří mým kolegům a spolužákům: Bc. Kateřině Haškové, Bc. Petře Javůrkové, Bc. Markétě Joskové, Bc. Petru Štoidlvi, Bc. Anetě Bláhové a Bc. Haně Žákové. Děkuji za podporu, cenné rady a hlavně přátelství, které jsme za ty dva roky měli. Dále bych chtěl poděkovat Biotechnologickému centru Zemědělské fakulty JU, za poskytnutí laboratoří pro provedení této diplomové práce a jejím zaměstnancům, kteří byli vždy ochotni s čímkoliv poradit.

Obsah

1	Úvod.....	6
2	Literární rešerše.....	7
2.1	Včela medonosná	7
2.2	RNA viry	14
2.3	RNA.....	15
2.4	RT-PCR	21
3	Hypotézy a cíl práce.....	22
3.1	Hypotézy	22
3.2	Cíle práce.....	22
4	Materiál a metody	23
4.1	Lokalita a použitý materiál.....	23
4.2	Metoda izolace RNA	23
4.3	Spektrofotometrické stanovení množství a kvality vyizolované RNA	24
4.4	Vyhotovení směsných vzorků	25
4.5	Vlastní přepis RNA do cDNA – reverzní transkripce.....	25
4.6	PCR	25
4.7	Elektroforéza	26
4.8	Kontrolní sekvenování	27
5	Výsledky	29
5.1	Elektroforetické snímky pro virus deformovaných křídel (DWV)	29
5.2	Elektroforetické snímky pro virus černání matečnicků (BQCV).....	32
5.3	Elektroforetické snímky pro virus chronické paralýzy včel (CBPV).....	35
6	Diskuze.....	40
7	Závěr	42

1 Úvod

Využívání včelstva je s člověkem spjato již od nepaměti, ve formě například získávání medu, či například propolisu pro jeho léčivé účinky. Potřeba včelstva má však i stránku, kterou běžný zákazník nevidí a to je opylení zemědělských plodin. Bez opylení by civilizace přišla o mnoho plodin, bez který je jen těžké si představit dnešní moderní svět. Bohužel počet včelstev rapidně ubývá, jak z důvodu zmenšování jejich přirozených lokalit, tak kvůli velké chemizaci polí, vysazování plodin, které jsou chudé na nektar a kvůli onemocněním. Moje práce se soustředí právě na vybraná onemocnění postihující včelstva a zjišťuje míru nákazy ve vybraných reprezentativních včelstvech.

2 Literární rešerše

2.1 Včela medonosná

Patří do řádu blanokřídlých a jedná se o jeden z nejznámějších zástupců společenského hmyzu. Oblast, kde byla včela původně rozšířena, zahrnovala Afriku, Blízký východ a Evropu. Včela svá hnízda staví na chráněných místech, přičemž jsou jednotlivé plásty umístěny vedle sebe (Veselý V. 2003).

2.1.1 Stavba těla

Včelu řadíme do kmene Členovců, její tělo se skládá ze tří částí a to hlavy, hrudi a zadečku (Norman, 2019).

Hlava

Díky tenkému zúžení spojující hlavu a hrud' je umožněn včele pohyb hlavy. Včela má dvě složené oči, které se nachází po boku temene hlavy a tři jednoduché oči, které nalezneme na vrcholu temene. Jednoduché oči jsou rozmístěné do tvaru trojúhelníku, jehož vrchol směřuje dolů. Na hlavě se nacházejí dvě článkovitá ústrojí, která nazýváme tykadla. Tykadla slouží jako smyslový orgán, díky čemuž může včela vnímat čich a hmat. Tvar hlavy se mění dle příslušnosti do kasty, matka má srdcový, dělnice trojúhelníkový a trubec kruhový tvar (Norman, 2019).

Hrud'

Její hlavní funkce je nést orgány pohybu tj. křídla a nohy. V larvárním vývojovém stádiu je hrud' tvořena třemi články, dospělá včela má hrud' již tvořenou čtyřmi články, které nazýváme předohrud', středohrud', zadohrud' a přesunutý kroužek (Snodgrass, 2018).

Nohy

Včela má 3 páry nohou. Funkce nohou jsou například předávání voskových šupinek, pohyb, vytváření řetízků, nesou též chemické a mechanické receptory, ale zejména sběr a ukládání pylu, k čemuž slouží třetí pár nohou, které obsahují důležitý orgán zvaný košíčky (Snodgrass, 2018).

Křídla

Na každém boku hrudní části můžeme nalézt jeden pár blanitých křídel. Přední křídla jsou větší než zadní. Včelaři na křídlech vypočítávají podle délky dvou specifických žilek takzvaný loketní index, podle kterého poznají, o jaké geografické plemeno včely se jedná. Včela dokáže mávnout křídly přibližně 230x za sekundu pod úhlem 90°.

Zajímavé je, že pokud včela nese pyl, tak pohyb křídel nezrychlí, ale pouze zvětší úhel mávnutí. Synchronizace předního a zadního křídla je zajištěna speciálními háčky, které vyrůstají na předním okraji zadních křídel a zapadají při letu do zadního žlábků předních křídel (Norman, 2019).

Zadeček

V zadečku nalezneme zažívací ústrojí, medový vacek, jedovou žlázu, vzdušné vaky a žihadlo. Na žihadle se nacházejí zpětné háčky, které po bodnutí znemožňují zpětné vytažení, díky čemuž po bodnutí dojde k vytržení žihadla s jedovým vácem a tím dochází k úmrtí včely (Norman, 2019).

2.1.2 Vývoj včely

Vývoj včel má 5 stádií, které nazýváme vajíčko, larva, předkukla, kukla a dospělec (Herrod, 2012).

Vajíčko

Život každé včely začíná jako vajíčko, které je nakladené královnou do hexagonální buňky. Vajíčka mají bílou barvu a jsou velmi drobná. Pro začínající včelaře se tedy doporučuje použít černé rámy, kde se bílá vajíčka snadněji hledají (Johnson, Johnson 2019).

Larva

V průběhu pár dní, se vyklube z vajíčka larva. Larva má kulatý tvar a bílé zbarvení. Larvy jsou tři dny krmičkami krmené tzv. královským želé, díky kterému velmi rychle rostou. Po třech dnech larva přejde na dietu ve formě medu a pylu. Pokud se jedná o úl, kde došlo ke ztrátě matky, tak se potrava nemění a larvy jsou krmené královským želé. Po přibližně šesti dne, dochází k zapečetění buňky s larvou (Shaara, 2013).

Kukla

Tato fáze vývoje nastupuje po zapečetění buňky s larvou. Nejdůležitější část tohoto stádia je metamorfóza, která probíhá přibližně po dobu dvou týdnů, kdy se z larvy stává dospělá včela, tj. je zahájen růst končetin, křídel, vývoj očí, zbarvení atd. Metamorfóza trvá různě dlouhou dobu, pokud se larva vyvine v královnou, trvá přibližně deset dní, pokud v dělnici, tak přibližně dvanáct dnů (Hempsall, 2012).

2.1.3 Včelstvo

Včely jsou společenské, skupinu včel nazýváme včelstvo, které je založené na kastrovní hierarchii (matka, trubec, dělnice). V jednom včelstvu se většinou nachází jedna matka, mnoho dělnic a určité množství trubců, které závisí na síle včelstva, dostupnosti potravy a roční době. Jednotliví členové jsou na sobě závislí a jeden bez druhého nepřežije, z toho také vyplývá, že mezi včelami funguje dokonalá dělba práce (Langstroth, 2015).

Matka

Od ostatních včel se liší většími rozměry a jako jediná má vyvinuté pohlavní orgány. Jako jediná včela se nepodílí na pracích v úlu a nedokáže sbírat pyl, jelikož má zakrnělé sběrné orgány. Žihadlo neobsahuje zpětné háčky, je tedy uzpůsobené k boji v případě konfliktu s jinou matkou, dále žihadlo obsahuje důležitý orgán a to kladělo. O matku se neustále starají dělnice, které jí krmí mateří kašičkou (Langstroth, 2015).

Dělnice

Ve včelstvu se jedná o nejvíce zastoupenou kastu. Jedná se o samičky, které mají zakrnělé pohlavní orgány. Líhnou se z dělničích buněk. V době hlavní snůšky v úlu nalezneme až 50 000 dělnic. V průběhu svého života dělnice projde několika fázemi, při kterých dělá zcela odlišnou práci. Po vylíhnutí dělnici označujeme čističkou a provádí čištění buněk. Kolem 4. dne se jedná o krmičku a provádí zásobování larev potravou. Kolem 6. dne se jedná o kojičku a provádí krmení matky mateří kašičkou. Po 12. dnu se jedná o stavitelku a provádí stavění včelího díla. Po 18. dnu se jedná o strážkyni česla a střeží vchod do úlu. Po 21. dnu se ze včely stává létavka a podílí se na sběru pylu. Toto rozdělení však není striktně závazné, činnost včely se řídí dle aktuální potřeby. Před zimou se líhnou tzv. dlouhověkové včely, jejichž úkol je přečkat zimu (Langstroth, 2015).

Trubec

Jedná se o včelí samečky, kteří se líhnou z neoplozených vajíček z trubčích buněk. Trubci nemají žihadlo. Trubci žijí většinou pouze v letních měsících. Průměrný počet v jednom úlu je přibližně 500. Dělnice trubce na konci léta vyženou z úlu, jelikož je přerušena snůška nepříznivým počasím, z toho důvodu se v úlu v zimě trubci nacházejí velmi zřídka (Langstroth, 2015).

2.1.4 Potrava a produkty

Med

Med je jedním z hlavních produktů včel. Vzniká sběrem nektaru (z květin), nebo medovice (z listnatých a jehličnatých stromů). Tento sběr obstarávají včely létavky, které sebráný nektar, nebo medovici přinášejí do úlu, a předávají ho úlovým včelám, které díky šťávám vylučovaným pomocí hltanových žláz a odpařováním vody substance přemění na med. Hlavní rozdíl mezi medem z nektaru a medovice je barva, kdy med z nektaru je světlý a z medovice tmavý. V medu se nacházejí hlavně jednoduché, dobře stravitelné cukry (fruktóza, glukóza). Pro včelstvo, je med zásobou energeticky bohaté potravy (ZO ČSV České Budějovice, 2020). Včely krmičky a kojičky z doneseného nektaru v úlu vytvářejí pomocí slin potravu pro larvy a královnu. V některých případech včely takto vytvořenou potravu před podáním částečně natráví (Titěra, 2013).

Propolis

Jedná se o mimořádně lepkavý materiál, který včely používají k vyztužování úlu, oprav prasklin a dalším stavebním pracím. V neobvyklých případech, kdy se v úlu nachází například úlomek skla, včely tento úlomek pokryjí vrstvou propolisu, aby eliminovaly odraz světla. Jako další výjimečný příklad použití je v případě, že se v úlu nachází mrtvý vetřelec, kterého včely nedokáží odstranit, tak aby zabránily hnilobě, je vetřelec pokryt silnou vrstvou právě propolisu. Barva propolisu je dle stáří od světle žluté až po temně hnědou. Surovinu pro produkci této látky včely sbírají z rostlin, které produkují pryskyřičné látky. Sběr je uskutečňován většinou kolem poledních hodin a je také řízen zvýšenou teplotou vzduchu, kdy jsou pryskyřice nejvíce tekuté (Harris, 2008).

Včelí vosk

Včelí vosk je složen z medu, který prošel metabolickou přestavbou v těle včely. Jedná se o produkt voskových zrcátek na spodní straně 3.-6. článku zadečku. Schopnost produkovat včelí vosk mají pouze včely dělnice. Z chemického hlediska je vosk složen z uhlíku, kyslíku a vodíku a jak již bylo zmíněno medu. K tvorbě je zapotřebí i pyl, který se však do vosku nepřidává, slouží pouze jako zdroj energie pro tvorbu vosku. Spotřeba medu pro tvorbu vosku je velmi vysoká, udává se, že až 20 násobek hmotnosti vosku. Vosk je produkován ve formě malinkých šupinek, které jsou sbírány a dále zpracovávány kusadly, kde jsou přidávány sliny a díky tomu vznikne vláč-

ná bílá hmota, která již může být využita ke stavbě včelího díla. Vosk neslouží pouze jako stavební materiál, ale slouží i jako jakýsi udržovatel teploty v úlu, bez vosku by včely v zimních měsících potřebovaly mnohem více zásob potravy pro udržení přijatelné teploty uvnitř úlu. Nový vosk má poloprůhlednou bílou barvu, která se postupem času stává žlutou, poté hnědou a nejstarší vosk je černý. Vosk nachází využití například jako přírodní leštadlo nábytku, na výrobu svíček atd. S objevem parafinu však využití kleslo (Harris, 2008).

2.1.5 Virová onemocnění včel

Virus deformovaných křídel (DWV)

Virus deformovaných křídel byl poprvé izolovaný z dospělých včel v Japonsku v roce 1991. Rozšíření tohoto viru je celosvětové. Příznaky viru na včelách jsou snadno definované a viditelné. Jedná se například o menší vzrůst, žádné zbarvení těla dospělých včel, deformovaná křídla apod.



Obrázek 2.1 - Klinické příznaky nákazy virem. Vlevo zdravá dělnice, uprostřed dělnice s výrazně deformovanými křídly a menším vzrůstem a v pravo mladuška bezkřídla s výraznou deformací zadečku (Výzkumný ústav včelařský, 2021).

(Obr. 2.1). Virus můžeme nalézt ve všech vývojových stádiích včely. Deformity a poško-

zení, se však projevují pouze, pokud je virus přítomný ve včele od začátku vývoje. Pokud je nakažená již dospělá včela, k deformitám nedochází a je pouze redukována její doba života. Virus deformovaných křídel je jeden z nejvíce rozšířených virů včelstva (Maramorosch, 2007). Nakažená včelstva můžeme rozdělit do dvou skupin, a to skupinu bez parazita Kleštíka zhoubného a skupinu s parazitem. Hlavní rozdíl mezi skupinami je v tom, že pokud budeme mít včelstvo, které se nějakým způsobem nakazilo virem deformovaných křídel, ale nenalezneme u něj parazita, budou nakažené pouze dospělé včely bez deformit. Pokud však k nákaze došlo pomocí přenašeče Kleštíka zhoubného, budou nakažené i larvy, které buďto uhynou, nebo se vyvinou v dospělou včelu, u které nalezneme více popsané deformity (Seeley, 2016). Hlavní účinky viru na včelstvo jsou v tom, že kvůli deformovaným křídům přichází

včelstvo o většinu včel létavek, které zajišťují přísun potravy do úlu. Ve včelstvu při nakažení zůstává většinou pouze matka a pár krmiček. Takto postižené včelstvo nemá šanci přezimovat, jelikož nemá žádnou možnost shánět nezbytnou potravu (Roossinck, 2020). Léčba tohoto onemocnění je zatím ve formě výzkumu a testování. Zatím nejslibnější se zdá podávat včelám výluhy z dvou hub a to Troadnatce a Lesklokoroky. Ve výzkumu se jednalo o jednoprocenní směs výluhů ve vodném roztoku cukru, který byl nakaženým včelám podáván. Po 12 dnech této léčby, byl titr protilátek proti viru snížen až 79x oproti titru na začátku pokusu (Stamets et al., 2018). Tento virus můžeme nalézt i u jiných druhů hmyzu například Čmeláka zemiho, nemoc zde však nepropukne (Roossinck, 2020).

Virus černání matečnicků (BQCV)

Virus obsahuje jednovláknovou molekulu RNA s pozitivním nábojem o velikosti přibližně 8550 nukleotidů včetně polyA konce (Sammataro, Yoder, 2011). Virus černání matečnicků byl poprvé izolovaný z mrtvé mateřské larvy, která se nacházela v mateční buňce, jejíchž stěny měly tmavě hnědou až černou barvu. Na nemocné larvě můžeme zpočátku sledovat



Obrázek 2.2 - Zčernalá larva (Snyder, 2009)

bledě žluté zbarvení a tuhou kůži podobnou vaku. Po krátké době však larvy začnou velmi rychle tmavnout (Obr. 2.2) a umírat. V některých případech dojde ještě k zčernání celé mateční buňky, což je specifický symptom právě tohoto onemocnění. Jako většina virů včelstev se jedná o celosvětově rozšířený vir a přetrvává ve včelstvech v asymptomatické formě na včelách dělnicích. Zvláštností je, že již dospělá včela, vyžaduje k nákaze parazita Hmyzomorku včelí, která funguje jako přenašeč onemocnění a zároveň dospělou včelu oslabí do té míry, aby mohl virus propuknout. Takto nemocná včela, která je napadená Hmyzomorkou a i u ní propukl virus má výrazně kratší život, než včela napadená pouze parazitem. U onemocnění můžeme sledovat sezónní výkyvy s velkým nárůstem na jaře, kdy se nakažené asymptomatické kojičky nejvíce starají o matku. Vir lze detekovat v ovariích zdravé matky a přibližně v 25% jejích larev, díky tomu můžeme říct, že je u viru možný i vertikální přenos. Vir můžeme detekovat i u parazita Kleštíka včelího, ten však není s virem

v takovém vztahu, že by fungoval jako účinný přenašeč. Při napadení včelstva je nutné ihned včelstvo převést do desinfikovaného úlu, vyměnit matku, plásty přetavit a případně včelstvo posílit zavíčkovaným plodem (Bailey, Ball, 2013).

Virus chronické paralýzy včel (CBPV)

Virový původce onemocnění byl poprvé izolovaný v roce 1963 ve Velké Británii. V minulosti mělo toto onemocnění mnoho jmen například „Černý syndrom bez srsti“, „Little black“, „Černý zloděj“. Názvy vznikaly podle specifických projevů onemocnění. Struktura viru je odlišná od struktur ostatních virových onemocnění včel. Jedná se o fragmentovanou jednovláknovou RNA s pozitivním nábojem, která obsahuje dva major fragmenty. Jako většina virových onemocnění včel, se vir nachází na všech kontinentech, onemocnění má však celkově nízkou prevalence¹. Onemocnění se objevuje sporadicky s menším nárůstem na jaře a v létě. Pokud ve včelstvu probíhá asymptomatická forma onemocnění, virus detekujeme pouze u včel dělnic, pokud však probíhá symptomatická forma onemocnění, tak virus detekujeme v medu, vajíčkách, larvách a létavkách. Ve včelstvu se virus velmi snadno od nakažené včely rozšíří kontaktem se zdravými včelami, a pokud se jedná o velmi početné včelstvo, kde dochází k většímu a těsnému tělesnému kontaktu, při kterém je polámáno ochlupení na těle včely, dochází k šíření viru mnohem rychleji. Virus je možné přenést i vertikální cestou. Včela začne vykazovat příznaky onemocnění přibližně 6 dnů po vystavení infekci. Existují dvě formy projevujících se příznaků. První forma se projevuje chvěním nohou a částečně vykloubenými křídly. Takto postižené včely jsou paralyzované a ztrácí schopnost létat. Takto postižené včely většinou najdeme ve shluku s ostatními postiženými včelami. Tato forma je nebezpečná z důvodu velké ztráty létavek, které obstarávají potravu pro včelstvo a to díky tomu přestává prosperovat. Druhá forma onemocnění se projevuje prakticky úplnou ztrátou chloupků, ztmavnutím až zčernáním včely (Obr. 2.3) a nafouknutí břicha. Díky tomu, se jeví vůči ostatním menší a většinou nejsou vpouštěny do úlu. Takto „jiné“ včely mohou být ještě okusovány ostatními včelami (Obr. 2.4), čímž dojde k dalšímu šíření onemocnění. Schopnost letu je zasažena až několik dní po plném projevu těchto příznaků. Výsledek je stejný jako u první fáze, včelstvo nakonec také přichází o létavky. Vir můžeme u infikované včely nalézt v mozku, hrudníku, břišní nervové uzlině a hypofaryngeální a mandibulární žláze (Kane, Faux, 2021).

¹ Podíl počtu nemocných k počtu všech jedinců ve sledované populaci



Obrázek 2.3 - Typické příznaky druhé formy onemocnění (Kane, Faux, 2021)



Obrázek 2.4 - Okusování nakažené včely ostatními včelami v úlu (Kane, Faux, 2021)

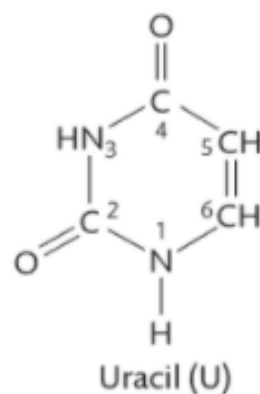
2.2 RNA viry

V roce 1960 biolog Peter Medawar poprvé definoval vir jako kousek nukleové kyseliny obklopené špatnými zprávami. Viry mají schopnost proniknout, do jakékoliv buňky od rostlin, zvířat, bakterií, hub až po prvoky (Oldstone, 2020). Jelikož je virus prakticky pouze nukleová kyselina v proteinovém kapsidu a neobsahuje žádné funkční orgány, je pro jeho množení nutné, aby infikoval živící buňku, kterou využije pro produkci sebe sama (Jackson, Swanson, 2014). Virus při průniku do buňky může vstoupit do dvou fází a to lytické, nebo lysogenní (Sankaran, 2021). Při lytické fázi, je virová informace transkribována a přepsána do virových proteinů pomocí RNA polymerázy a ribozomu buňky. Pomocí DNA polymerázy je poté replikován virový genom, který je zabalen do nového virového kapsidu. Jako poslední krok následuje lýza buňky pomocí virových enzymů a vypuštění namnoženého viru, který může nakazit další zdravé buňky (Morvillo, Schmidt, 2021). Při lysogenní fázi virus po proniknutí do hostitelské buňky na rozdíl od lytické fáze není ihned transkribován, přepsán a replikován, ale začlení se do hostitelského genomu, kde zůstává ve spící

formě. Kdykoliv takto nakažená buňka projde dělicím cyklem, při kterém musí replikovat svůj genom, replikuje i skrytý virový genom. Virus může ve spící formě vydržet i mnoho let, k probuzení viru je nutné hostitelskou buňku vystavit nějakému stresu, což může být například nějaké onemocnění. Po probuzení viru nastupuje lytická fáze (Wright, 2013). Pro průkaz virového onemocnění, je nejvhodnější získat vzorek tkáně, kde je předpokládán výskyt viru a ze vzorku izolovat total RNA, v které můžeme virus prokázat například RT-PCR se specifickými primery. Jelikož je RNA náchylnější na degradaci při práci a při izolaci, tak problematikou, stručným popisem RNA a způsoby izolace, se budeme zabývat níže.

2.3 RNA

Jedná se o ribonukleovou kyselinu, která se skládá z ribonukleotidů. Její funkce je například přenos informací z úrovně nukleových kyselin do proteinů a v případě některých virů, je přímo nositelem genetické informace. Hlavní rozdíly DNA od RNA jsou přítomnost ribózy namísto deoxyribózy a místo thyminu využívá jako nukleovou bázi uracil (Obr. 2.5). Díky větší reaktivitě, RNA může zastávat mnoho prostorových konformací, mnoho funkcí a je obvykle pouze jednovláknová. Jsou však případy, kdy můžeme u virů nalézt i dvouvláknovou strukturu s typickou A-formou (Elliott, Ladomery, 2011).



Obrázek 2.5 – Uracil (Elliott, Ladomery, 2011)

Primární struktura

Říká nám jednotlivé zastoupení nukleotidů, jak jdou v molekule RNA reálně za sebou (Morvillo, Schmidt, 2021).

Sekundární struktura

Popisuje nám schopnost RNA vytvářet šroubovici. Na rozdíl od DNA je RNA schopna vytvořit pouze A-formu (Obr. 2.6) šroubovice. Díky větší reaktivitě RNA, mů-



Obrázek 2.6 - A forma RNA (Elliott, Ladomery, 2016)

žeme najít několik specifických strukturních motivů, jako jsou například vlásky, pseudouzly, “kissing loops” (Elliott, Ladomery, 2016).

Terciální struktura

Popisuje velmi složité kompaktní struktury RNA. Přičemž jedna molekula stejné RNA může obsahovat i více složitých struktur (Elliott, Ladomery, 2016).

2.3.1 Typy RNA

Virová RNA

Jedná se o molekulu RNA, která u virů slouží jako nositelka genetické informace místo DNA. Virovou RNA rozdělujeme na několik typů (Viry, 2008).

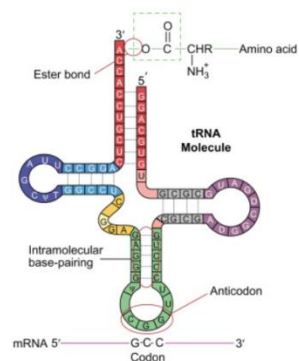
- a) Dvouvláknovou RNA (dsRNA), která je poměrně neobvyklá a vzniká spárováním antisense a sense řetězců. Tuto RNA nalezneme například u Birnaviridae, Cystoviridae a Reoviridae (Viry, 2008).
- b) Jednovláknovou RNA (ssRNA), kterou rozdělujeme ještě na pozitivní (+) a negativní (-). Hlavní rozdíl je v tom, že pozitivní vlákno RNA má „sense“ charakter, tudíž může být rovnou transkribováno (Hepatitida C, MERS, SARS), přičemž negativní vlákno má „antisense“ charakter a musí být nejdříve přeloženo do mRNA (ebola, chřipka, vztekliny) (Viry, 2008).

mRNA

Tento typ RNA vzniká během transkripce DNA. Jedná se o jednovláknovou molekulu a její hlavní funkce je přepis informace z DNA do funkčního proteinu (Patton, 2015). Před mRNA vzniká nejdříve pre-mRNA, která musí být nejdříve upravena. Mezi hlavní úpravy patří přidání poly-A konce (50-200 bází adeninu) a 5'-čepičky na druhém konci molekuly. Jako další úprava následuje vystřihnutí nekódujících částí (intronů) (Stamm et al. 2012). Díky alternativnímu sestřihu nám tak z jednoho genu může vzniknout několik různých proteinů. Takto upravená molekula mRNA je poté již dopravena k rybozomu, kde probíhá přepis do proteinů (Patton, 2015).

tRNA

tRNA je malá molekula RNA skládající se přibližně z 80 nukleotidů s konformací jetelového listu. V buňce je přibližně 20 druhů této molekuly. Každá molekula



Obrázek 2.7 - Schéma tRNA se specifickými vazebnými místy (Pelley, 2011)

tRNA je specifická pouze k jedné aminokyselině, kterou přináší k rybozómu (Colville, Bassert, 2015). Každá tRNA obsahuje specifické pořadí tří nukleotidů, které se nazývají “anticodon” (Obr. 2.7), kterým se váže na právě se přepisující mRNA (Alberts, 2008).

rRNA

Tento typ RNA tvoří základní stavební složku ribozomálních podjednotek. Rozeznáváme 4 velikostně odlišné typy rRNA (5S rRNA, 18S rRNA, 28S rRNA a 5,8S rRNA). 18S rRNA spolu s přibližně 30 proteiny tvoří malou podjednotku ribozómu. Zbylé tři typy se spojí s přibližně 50 proteiny a vytváří velkou podjednotku ribozómu (Patton, 2015).

snRNA

Přibližná délka snRNA se pohybuje od 100 do 300 nukleotidů. Nachází se v jádru buňky ve spliceozómu se specifickými proteiny, kde je katalyticky aktivní a podílí se na alternativním sestřihu mRNA. Nachází se také v enzymu telomeráza, který je zodpovědný za vytváření telomer na konci chromosomů (Thiemann et al., 2014).

snoRNA

Tato molekula RNA se podílí hlavně na modifikaci rRNA. Nachází se také v komplexu se specifickými proteiny snoRNP (Thiemann et al., 2014).

microRNA

Hlavní úkol této molekuly je genová exprese, kterou provádí díky tomu, že je komplementární k určitým úsekům mRNA a tím reguluje jejich translaci. Na rozdíl od siRNA je vždy endogenního původu (Thiemann et al., 2014).

piRNA

Jedná se o malou molekulu RNA, která má podobnou funkci jako siRNA s rozdílem, že cílem umlčení jsou přímo proteiny většinou z rodiny PIWI. Celý komplex piRNA a proteinu poté nazýváme pi-RISC (Wilhelm, Bernard, 2015).

siRNA

Jedná se o poměrně malou dvoušroubovicovou molekulu RNA složenou z přibližně 19 až 23 nukleotidů se dvěma nukleotidy vyčnívajícími na každém konci. Vzniká štěpením velké molekuly RNA, která může být jak endogenního tak exogenního původu (Thiemann et al., 2014). siRNA hraje u eukaryot zásadní roli při interferenci RNA (Tekade, 2020).

lncRNA

Jedná se o molekulu RNA, která je větší než 200 nukleotidů a není přepisována do proteinů, z toho důvodu ji nazýváme „dlouhá nekódující RNA“. U savců se vyskytuje veliké množství molekul (až několik desítek tisíc), skutečný biologický účinek má však pouze zlomek z nich. Funkce této molekuly zatím není zcela prokázána, ale víme, že nějakým způsobem zasahuje například do transkripce, translace, sestřihu a epigenetické regulace. Nejznámější lncRNA je gen XIST, který se uplatňuje v procesu umlčování chromozomu X (Ahmad, Ganai, 2020).

2.3.2 Izolace RNA

Izolace RNA a zacházení s ní je z technického hlediska mnohem náročnější, než izolace DNA jak z důvodu přítomnosti reaktivní 2'-OH skupiny, tak přítomnosti stabilních RNáz, které musíme při izolaci co nejlépe odstranit (Farrell, 2017). Právě rychlá inaktivace RNáz, které se uvolní při lýze buněk je nezbytně důležitá pro izolaci RNA ve vysoké kvalitě. Všechny extrakční pufrы pro RNA tedy musí obsahovat silné inaktivátory (detergenty, soli guanidinu) (Cseke, Kirakosyan, 2016).

Metoda s Guanidin thiokyanátem

Tato metoda je využívána pro získání kvalitního vzorku RNA, díky velké chaotropní schopnosti použitého lyzačního pufru, který se řadí mezi chemikálie nejlépe denaturující proteiny (Green, Sambrook, 2012). Metoda se využívá při izolaci z celotkáňových vzorků (Farrell, 2017). Při izolaci jsou vzorky zamraženy na -70°C tekutým dusíkem a rozdrceny. Ke vzorku je poté přidán RNA extrakční pufr Guanidin thiokyanát, 3M octan sodný (pH 4), fenol a chloroform:isoamyalkohol (24:1). Směs se poté centrifuguje při 4°C a ve vzniklé vodné fázi, se nachází extrahovaná RNA. K vodné fázi se poté přidá isopropanol a RNA se nechá precipitovat při -20°C . Následuje další centrifugace, rozpuštění přidáním guanidin thiokyanátu a další precipitace isopropanolem. Po další centrifugaci následuje promytí 70% ethanolem, usušení peletu a následné rozpuštění v RNase-free H_2O . Nevýhoda metody je jak časová náročnost kvůli precipitaci při -20°C , tak v použití nebezpečných látek jako je guanidin thiokyanát a fenol (Cseke, Kirakosyan, 2016).

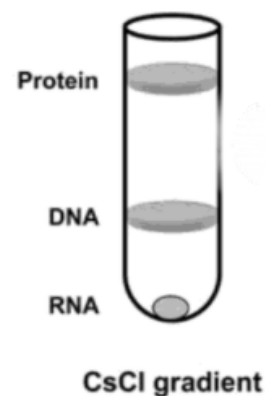
Metoda s chloridem lithným/močovinou

Tato metoda je založená na schopnosti chloridu lithného srážet RNA. Většinou se nepoužívá na celotkáňové vzorky. Postup přípravy vzorku je více méně stejný, akorát se použije RNA extrakční pufr LiCl/Urea a vzorek se poté nechá ležet na ledu něko-

lik hodin, po kterých následuje centrifugace při nižších otáčkách (cca 3000 rpm) (Russell, Sambrook, 2001). Následuje odstranění supernatantu a rozpuštění peletu v ledovém LiCl/Urea pufru. Tyto kroky se několikrát opakují. Poté následuje dekantace supernatantu a rozpuštění peletu v LiCl/Urea pufru. Pro odstranění proteinů a dalších nečistot je do směsi přidán fenol:chloroform:isoamylalkohol (25:24:1), následuje centrifugace, a přenesení vodné horní fáze s RNA do nové zkumavky. Poté je přidán 3M octan sodný a ledový 100% ethanol. Vzorek se nechá precipitovat při -20°C , poté následuje centrifugace, promytí peletu 70% ethanolem, sušení pomocí vakua a rozpuštění peletu v RNase-free H_2O (Cseke, Kirakosyan, 2016).

Guanidin thiokyanát-chlorid cesný gradient

Tato metoda využívá chloridu cesného jako látku, která je schopna vytvořit gradient (RNA, DNA, nečistoty) při použití ultracentrifugy. Ke vzorku tkání se přidá RNA extrakční pufr Guanidin thiokyanát a následuje klasická centrifugace, po které je supernatant velmi opatrně přemístěn na směs chloridu cesného/EDTA v ultracentrifugační zkumavce. Rozhraní supernatantu a CsCl/EDTA se nesmí porušit. Následuje ultracentrifugace a odstranění DNA pruhu, který by měl být v dolní třetině zkumavky a poté následuje odstranění CsCl/EDTA horní vrstvy



Obrázek 2.8 - Vzniklý gradient po ultracentrifugaci (Farrell, 2017)

(viz Obr. 2.8). Poté se pomocí Kimwipes™ odstraní všechny zbylé tekutiny. Následuje přečištění 70% ethanolem a usušení peletu. Pelet se rozpustí v RNase-free H_2O a přelije do eppendorf zkumavky. Ultracentrifugační zkumavka se ještě vypláchne RNase-free H_2O , která se smíchá se vzorkem, do kterého se přidá 3M octan sodný a ledový 100% ethanol. Poté následuje inkubace při -20°C , centrifugace, přečištění 70% ethanolem, usušení peletu a rozpuštění v RNase-free H_2O . Metoda je náročná jak v technickém provedení laborantem, tak vyžaduje použití ultracentrifugy (Cseke, Kirakosyan, 2016).

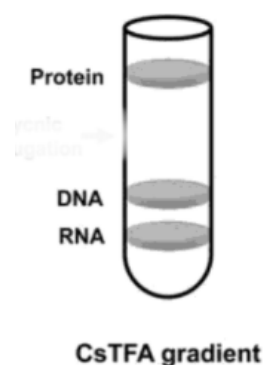
Fenol-chloroform/LiCl metoda

Tato metoda je vhodná zejména k izolaci RNA z oocytů nebo vajíček. Vzorky čerstvých oocytů, nebo fertilizovaných vajíček se 2x promyjí pomocí serum-free media (PBS pufr), přemístí se do nové zkumavky a vyčká se, než materiál v pufru klesne.

Přidá se homogenizační pufr a provede se homogenizace na ledu a inkubace při 37°C, po inkubaci se přidá směs fenol:chloroformu (1:1) a následuje centrifugace, po které je vodná fáze přemístěna do nové zkumavky. Krok se směsí fenol:chloroformu se několikrát opakuje. Poté je RNA vysrážena pomocí 3M octanu sodného a ledového 100% ethanolu. Následuje centrifugace, odstranění supernatantu, usušení peletu a rozpuštění v RNase-free H₂O. Do vzorku se přidá 8M LiCl, který pomáhá v odstranění glykoproteinů. Následuje několikahodinové srážení RNA, centrifugace, promytí 70% ethanolem, sušení peletu a rozpuštění v RNase-free H₂O (Cseke, Kirakosyan, 2016).

Guanidin thiokyanát-trifluoracetát cesný gradient

Tato metoda je pro provedení stejná jako metoda guanidin thiokyanát-chlorid cesný gradient (viz. Guanidin thiokyanát-chlorid cesný gradient) s tím rozdílem, že místo chloridu cesného, je použit trifluoracetát cesný (CsTFA), který způsobí, že RNA nevytvoří po ultracentrifugaci klasický pelet, ale vytvoří svůj vlastní band (viz. Obr 2.9) (Cseke, Kirakosyan, 2016).



Obrázek 2.9 - Vzniklý gradient po ultracentrifugaci (Farrell, 2017).

Metoda Alkalický TRIS/Sarkosyl

Tato metoda je vhodná hlavně pro izolaci RNA z rostlin. Jako extrakční pufr využívá směs TRIS/Sarkosyl extrakčního pufru, pufrovaného fenolu, chloroform:isoamylalkoholu (24:1) a β-mercaptoethanolu. Vzorek rostliny je zamražen tekutým dusíkem a zhomogenizovaný, poté je k němu přidána směs výše uvedených chemikálií a následuje inkubace směsi. Přidá se 3M octan sodný a následuje další inkubace. Po inkubaci následuje centrifugace a přenesení vodné fáze s RNA do nové zkumavky, do které je přidán isopropanol a poté následuje inkubace při -70°C, centrifugace, přečištění peletu 70% ethanolem a usušení peletu. Pelet je následně rozpuštěn v RNase-free H₂O a je přidán 8M LiCl v takovém množství, aby výsledná koncentrace byla 2M LiCl. Následuje vysrážení RNA při 4°C, centrifugace, promytí 70% ethanolem, usušení peletu a rozpuštění v RNase-free H₂O (Cseke, Kirakosyan, 2016).

Metoda CTAB

Tato metoda je další metoda v pořadí, která se využívá pro izolaci RNA zejména ze vzorků rostlin (Rapley, 2008). K zhomogenizovanému vzorku se přidá CTAB extrakční pufr přehřátý na 60°C a 2% (v/v) β-mercaptoethanol. Vzorek se zvortexuje a přidá se směs chloroform:isoamylalkohol (24:1) s následnou centrifugací. Vzniklá vodná fáze s RNA se přenesse do nové zkumavky a přidá se 8M LiCl. RNA se nechá srážet při 4°C s následnou centrifugací, odstraněním supernatantu a rozpuštění v RNase-free H₂O. Kroky s chloroform:isoamylalkoholem a 8M LiCl se opakují do doby, než z peletu nezmizí veškeré nerozpustné nečistoty. Vyčištěný pelet se poté rozpustí v 3M NaOAc (pH 5,0) a 100% ethanolem, následuje inkubace při -80°C, centrifugace, přečištění 70% ethanolem, usušení peletu a rozpuštění v RNase-free H₂O (Cseke, Kirakosyan, 2016).

Komerční RNA extrakční kity

Na trhu existuje velká škála extrakčních kitů pro RNA jak z celotkáňových vzorků, tak pro speciální využití. Kity kombinují více uvedené postupy, či jsou založené na kolonkovém způsobu extrakce, kdy se RNA váže na speciální kolonky, přičemž ostatní nečistoty kolonkou projdou. Hlavní výhodou těchto kitů je zejména v nenáročném provedení a nevyžaduje speciální chemikálie a přístroje, veškeré potřebné chemikálie jsou obsažené v kitu. Nevýhodou může být cena kitu (Cseke, Kirakosyan, 2016).

2.4 RT-PCR

RT-PCR je velmi užitečná a využívaná modifikace standardní PCR. Hlavní změna je v možnosti amplifikace specifické mRNA, z velmi malého biologického vzorku, bez nutnosti přesné extrakce mRNA spojené s purifikací pro tradiční klonovací účely. První krok této metody, je smíchání RNA templátu s dNTPs, puftrem, Taq polymerázou, oligonukleotidovými primery a reverzní transkriptázou. Směs je dále zahřáta na 37°C, při kterých může reverzní transkriptáza RNA amplifikovat do cDNA, která je již poté použita jako templát pro PCR (Walker, 2009).

3 Hypotézy a cíl práce

Tato práce se zabývá průkazem tří virových onemocnění u medonosných včel pomocí izolace RNA následované reverzní transkripcí a průkazem cDNA viru pomocí polymerázové řetězové reakce a elektroforézy. Pro kontrolu specifity primerů, byly vybrané vzorky sekvenovány.

3.1 Hypotézy

Na území České republiky se mohou ve včelstvech vyskytovat tato virová onemocnění:

- a) virus deformovaných křídel (DWV)
- b) virus chronické paralýzy včel (CBPV)
- c) virus černání matečnic (BQCV)

Pomocí metody reverse transcription PCR, lze detekovat nákazu včelstev těmito RNA viry.

3.2 Cíle práce

- 1) Vyizolovat total RNA ze vzorků včel získaných ze včelstev chovaných na různých místech ČR.
- 2) Přepsat RNA do cDNA.
- 3) Detekovat vybrané viry ve vzorcích pomocí PCR.
- 4) Získané výsledky vyhodnotit a shrnout nákazovou situaci v ČR.

4 Materiál a metody

4.1 Lokalita a použitý materiál

Pro izolaci RNA bylo celkem použito 206 vzorků včel zimní generace, které byly odebrány během října 2019 na území pěti velkých měst (České Budějovice, Praha, Plzeň, Ostrava a Brno), dále pěti zemědělsky intenzivně využívaných oblastí v okolí těchto měst a nakonec z území méně dotčené zemědělskou a průmyslovou činností. Z každé z 11 oblastí bylo vybráno 2 až 5 včelařských lokalit a z pěti náhodně vybraných úlů na lokalitách, bylo odebráno cca 50 včel, ze kterých byl udělán směsný vzorek stanoviště. Včely byly ometeny z plodového rámmku přímo do vzorkovnice a vloženy do boxu se suchým ledem, kde došlo k okamžitému usmrcení. Vzorky byly následně důsledně označeny a uchovávány při teplotě -80°C . Ze všech vzorků bylo po izolaci zhotoveno 50 směsných vzorků. Každý směsný vzorek byl zhotoven smícháním včelstev z jednoho stanoviště (viz. Tab 7.1). Všechny vzorky včel byly po celou dobu uchovávány při teplotě -80°C .

4.2 Metoda izolace RNA

Z každého vzorku jsem extrahoval RNA pomocí následující metody

- Modifikovaná metoda extrakce DNA/RNA pomocí trizolu – modifikace pro včely

4.2.1 Izolace RNA pomocí trizolu – modifikace pro včely

Jedná se o klasickou metodu založenou na fázové separaci díky vodou nasycenému fenolu, chloroformu a GITC. Po centrifugaci vzorku dostaneme fázově oddělenou vodnou vrstvu, ve které je přítomna žádaná RNA. Pod vodnou fází se nachází interfáze, kde nalezneme DNA a proteiny. Pod interfází se nachází dolní organická fáze. Po odebrání vodné fáze s RNA, je provedena precipitace pomocí 2-propanolu, nebo ethanolu, RNA je následně vysušena a rozpuštěna v pufru. Jako velká výhoda této metody je cena. Jako největší nevýhody jsou používání organických rozpouštědel (nebezpečné chemikálie), podmínka manuální zručnosti a časová náročnost (citace)

4.2.1.1 Příprava vzorků pro izolaci

Jako vzorek jsem použil celé včely uchovávané při -80°C . Bylo tudíž nejdříve důležité včely homogenizovat. Homogenizaci jsem provedl pomocí kapalného dusíku. Vzorek včel byl přemístěn do třecí misky předchlazené na -20°C naplněné kapalným

dušíkem. Včely jsem poté ručně homogenizoval tloučkem, důležitá byla rychlost provedení homogenizace, aby včely nezačaly tát, poté by již homogenizace nebyla možná a účinná. Zároveň byla důležitá důkladná homogenizace, aby bylo zaručeno zachycení virové RNA ze všech potenciálně infikovaných včel ve včelstvu.

4.2.1.2 Vlastní izolace RNA

Do Eppendorf zkumavky jsem přemístil přibližně 100mg zhomogenizovaných včel a přidal 1ml TriReagentu. Tuto směs jsem inkuboval při pokojové teplotě 5 minut. Ke vzorku jsem poté přidal 200 μ l chloroformu a vzorek jsem promíchal přibližně 15 sekund. Poté následovala zase inkubace při pokojové teplotě 3 minuty. Po inkubaci jsem vzorky centrifugoval při 14 000rpm po dobu 15 minut při 4°C. Po centrifugaci jsem opatrně odebral horní vodnou fázi do nové Eppendorf zkumavky.

K vodné fázi jsem přidal 500 μ l isopropanolu a vzorek jsem několikrát převrátil (promíchal). Po promíchání jsem vzorky inkuboval po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci, jsem vzorky centrifugoval při 14 000rpm po dobu 10 minut při 4°C. Poté jsem odstranil supernatant a přidal jsem 1ml 75% ethanolu a všechny vzorky zvortexoval. Vzorky jsem poté znovu centrifugoval při 14 000rpm po dobu 5 minut při 4°C. Znovu jsem odstranil supernatant a poté jsem usušil vzniklý pelet na dně zkumavky. Usušený pelet jsem poté rozpustil ve 100 μ l DEPC vody při 60°C přibližně 10 minut. Vzorky jsem poté ihned umístil na led kvůli zabránění degradaci. Vzorky jsem poté spektrofotometricky změřil na kvalitu získané RNA. Vzorky jsem dále uchovával při -80°C.

4.3 Spektrofotometrické stanovení množství a kvality vyizolované RNA

Každý vzorek jsem po izolaci podrobil testování na přístroji Shimadzu BioSpec-nano UV-VIS spektrofotometru, který dokáže změřit koncentraci RNA ve vzorku a vypočítat OD 260/280 a OD 260/230, což vypovídá o výskytu znečišťujících látek, či degradaci získané RNA.

4.3.1 Vlastní měření

Před každým měřením jsem musel do přístroje vložit negativní (blank) vzorek, což byla DEPC voda. Po správném nastavení přístroje na blank vzorek jsem pipetoval 1 μ l, každého vzorku na příslušné vyznačené místo v přístroji. Po každém vzorku si přístroj sám otřel čidlo a mohl měřit další vzorek, problémy s kontaminací jsou v rámci přístroje teoreticky nulové.

4.4 Vyhotovení směsných vzorků

Od každého včelaře byl zhotoven jeden směsný vzorek obsahující 20 μ l z jednotlivých včelstev. Tyto směsné vzorky jsem poté použil pro přepis do cDNA.

4.5 Vlastní přepis RNA do cDNA – reverzní transkripce

Celou práci jsem prováděl na ledě, abych zabránil co nejmenší degradaci RNA. Z každého získaného směsného vzorku jsem odebral 3 μ l, které jsem přemístil do nové Eppendorf zkumavky. Do každé Eppendorf zkumavky jsem přidal 1 μ l nukleaze free H₂O a 1 μ l oligo (dT) 15 primer. Tuto směs jsem inkuboval 5 minut při 70°C. Po inkubaci jsem vzorky přemístil na led a do každého vzorku jsem přidal směs pro reverzní transkripci, která obsahovala 6,6 μ l nucleaze free H₂O, 1 μ l dNTP, 4 μ l 5x RxN Buffer a 2,4 μ l MgCl₂. Jako poslední jsem do vzorku přidal 1 μ l RT enzymu. Z důvodu, že enzym je na teple nestabilní a podléhá degradaci. Vzorky jsem poté inkuboval 5 minut při 25°C a 60 minut při 42°C. K takto získaným vzorkům cDNA jsem napipetoval 20 μ l nucleaze free H₂O a uchovával při 4°C.

4.6 PCR

Po vyizolování jsem sadu vzorků cDNA získanou reverzní transkripcí z RNA podrobil PCR. Při PCR reakci jsem amplifikoval specifické sekvence cDNA virů, pomocí specifických primerů. Pro PCR jsem potřeboval následující primery:

- Forward primer DWV 5'-GCGAGCCAAATCAGGGCAAACCTG-3'
- Reverse primer DWV 5'-GGCGCGACCAAATCCACTCGACTGT-3'
- Forward primer CBPV 5'-TAYGAGYGATTTYTTGRGATCGAYTTCGCT-3'
- Reverse primer CBPV 5'-TGTAATCGRCCTGATTRACGACRTTAGC-3'
- Forward primer BQCV 5'-GTGGCGGAGATGTATGCGCTTTATC-3'
- Reverse primer BQCV 5'-CTGACTCTACACACGGTTCGATTAG-3'

Do každé zkumavky jsem napipetoval směs sestávající z 5 μ l Master mixu, 2 μ l PCR Ultra H₂O, 1 μ l forward a reverse primeru, vždy od stejného onemocnění, které jsem chtěl PCR reakcí prokázat a 1 μ l vzorku cDNA. Směs jsem důkladně zvortexoval. Ke každé sadě vzorků jsem vždy zhotovil i blank vzorek, do kterého jsem nepřidal žádnou cDNA, tudíž vzorek slouží jako indikátor v případě kontaminace směsi pro PCR. Mikrozukmavky jsem vložil do thermocycleru na specifický program dle virového onemocnění, které jsem chtěl prokázat.

Program pro amplifikaci DNA

PCR reakce detekující DWV proběhla podle následujícího cyklu:

- a) úvodní denaturace 5 minut při 95°C
- b) denaturace 45 sekund při 95°C
- c) annealing 30 sekund při 55°C
- d) elongace 1 minutu při 72°C
- e) závěrečná elongace 10 minut při 72°C
- f) udržovací fáze při 4°C

S kroky b až d proběhlo 35 cyklů opakování.

PCR reakce detekující CBPV proběhla podle následujícího cyklu:

- a) úvodní denaturace 5 minut při 95°C
- b) denaturace 45 sekund při 95°C
- c) annealing 30 sekund při 48°C
- d) elongace 1 minutu při 72°C
- e) závěrečná elongace 10 minut při 72°C
- f) udržovací fáze při 4°C

S kroky b až d proběhlo 35 cyklů opakování.

PCR reakce detekující BQCV proběhla podle následujícího cyklu:

- a) úvodní denaturace 5 minut při 95°C
- b) denaturace 45 sekund při 95°C
- c) annealing 30 sekund při 48°C
- d) elongace 1 minutu při 72°C
- e) závěrečná elongace 10 minut při 72°C
- f) udržovací fáze při 4°C

S kroky b až d proběhlo 35 cyklů opakování.

4.7 Elektroforéza

Po provedení PCR reakce byla vždy sada vzorků a negativní kontrola (reakční směs bez cDNA) použity pro elektroforézu.

4.7.1 Příprava agarosového gelu

Na elektroforézu jsem použil 1,5% agarosový gel, který obsahoval Ethidium bromid.

Pro přípravu 1,5% gelu jsem si do Erlenmeyerovy baňky navážil přesně 1,5g agarózy a pomocí odměrného válce smíchal s 100ml TBE pufru. Při nalévání pufru jsem se snažil spláchnout všechnu případnou agarózu ze stěn baňky. Baňku jsem vložil do mikrovlnné trouby a za použití 100% výkonu rozehtával, dokud se všechna agaróza nerozpustila. Při ohřívání jsem baňku neustále kontroloval a několikrát promíchal, aby nedošlo ke zbytečnému varu gelu a případnému vytečení z baňky. Po dokonalém rozpuštění jsem baňku ochladil pod tekoucí studenou vodou přibližně na 60°C. Do takto zchlazeného gelu jsem pipetoval 6μl ethidium bromidu a důkladně, ale lehce promíchal. Připravený gel jsem nalil do formičky. Po vyplnění celé formičky bylo nutné zkontrolovat bubliny, které mohly při přelívání vzniknout. Všechny případné bubliny jsem odstranil špičkou k mikropipetě. Bylo důležité odstranit opravdu všechny bubliny i u hřebínků, případný výskyt by mohl negativně ovlivnit průběh celé elektroforézy.

4.7.2 Vlastní provedení elektroforézy

Do vany pro elektroforézu jsem umístil formu již bez těsnění s připraveným gelem. Zkontroloval jsem hladinu TBE pufru a případně doplnil tak, aby byl gel zcela potopený. Pro pipetování vzorků jsem použil mikropipetu s objemem 7,0μl. Do první jamky jsem vždy pipetoval hmotnostní standard 100bp DNA Ladder. Do dalších jamek jsem pipetoval získanou sadu vzorků z PCR a jako poslední jsem pipetoval negativní vzorek. Při pipetování bylo důležité nepoškodit gel, či nekontaminovat vzorky mezi sebou. Na elektrickém zdroji k elektroforéze jsem nastavil 120V po dobu 45 minut. Vizualizaci jsem provedl pomocí přístroje Syngene InGenius3.

4.8 Kontrolní sekvenování

Pro důkaz, že se jedná opravdu o zkoumané virové onemocnění, jsem od každého onemocnění vybral dva pozitivní vzorky, které jsem zaslal do firmy SEQme s.r.o., která provedla sekvenování pomocí Sangerovi metody.

4.8.1 Příprava vzorků pro sekvenování

Vyřezání vzorků

Po provedení elektroforézy, jsem si podle získaných bandů vybral pozitivní vzorek, který jsem vyřezal pomocí skalpelu a přemístil do Eppendorf zkumavky. Při řezání bandu, jsem se snažil o co nejpřesnější řez, aby u vzorku bylo co nejméně přebyteč-

ného gelu. Mezi vzorky, jsem skalpel vyčistil denaturovaným lihem, abych zabránil případné kontaminaci.

Přečištění vzorku

Přečištění vzorku jsem provedl pomocí kitu NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up®. Pro přečištění jsem použil vyříznuté bandy z předchozího kroku, ke kterým jsem přidal 400µl NTI pufru a 7,5 minuty jsem zkumavky inkuboval při 50°C. Každé 2 minuty jsem vzorky důkladně zvortexoval, což pomohlo lepšímu rozpuštění gelu v roztoku. Po rozpuštění jsem vzniklý roztok převedl do filtrační zkumavky, která byla přiložená v kitu, a tu jsem umístil do sběrné zkumavky. Vzorky jsem umístil do centrifugy a centrifugoval 30 sekund při 14 000rpm. Proteklou tekutinu ze sběrné baňky jsem odstranil a na sběrnou baňku znovu umístil filtrační zkumavku se vzorkem. Do filtrační zkumavky jsem napipetoval 700µl Buffer NT3 a znovu vzorky centrifugoval 30 sekund při 14 000rpm. Proteklou tekutinu jsem znovu odstranil a pro účinnější odstranění veškerého Buffer NT3 jsem vzorky centrifugoval znovu 60 sekund při 14 000rpm. Filtrační zkumavky jsem nyní umístil na Eppendorf zkumavky, na filtr jsem napipetoval 20µl Buffer NE a vzorky jsem inkuboval 60 sekund při pokojové teplotě. Poté jsem vzorky centrifugoval 60 sekund při 14 000rpm.

Následující PCR

Se vzorky z předchozího kroku jsem provedl PCR (4.6)

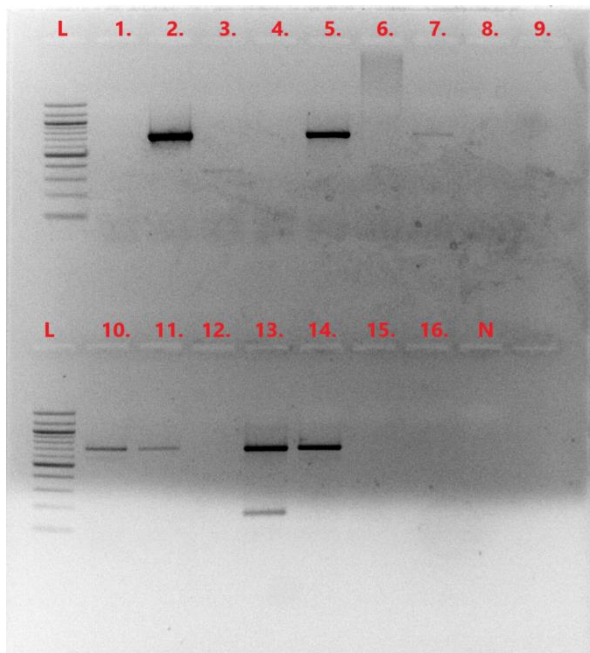
Závěrečná úprava vzorku před odesláním na sekvenování

Vzorky z PCR reakce jsem umístil do vychlazeného stojanu na -20°C a ke každému jsem přidal 2µl exosap roztoku. Vzorky jsem poté dal inkubovat na 15 minut při 37°C a 15 minut při 80°C. Ke každému vzorku jsem poté napipetoval 5µl Forward primeru podle testovaného onemocnění. Vzorky jsem označil přibližnou velikostí produktu a takto připravené odeslal na sekvenování do firmy SEQme.

5 Výsledky

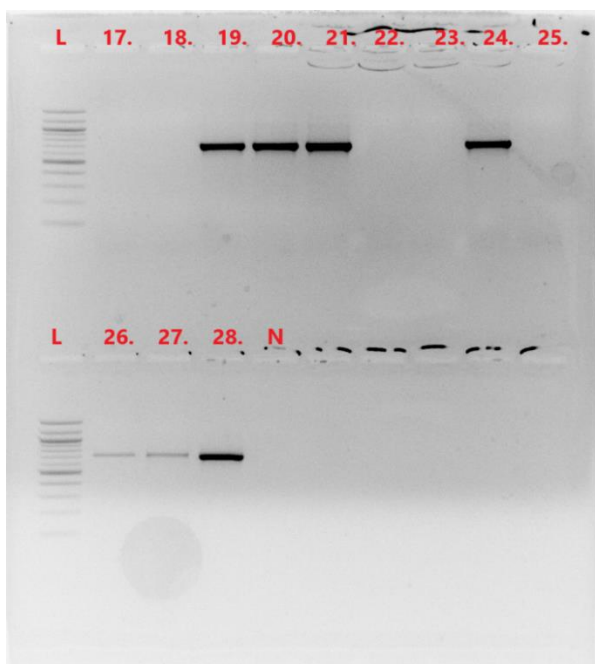
Pro zpracování konečných výsledků byly důležité dvě analytické metody. Z elektroforézy jsem zjistil přítomnost virové cDNA, kterou jsem poté ještě potvrdil, či vyvrátil pomocí kontrolního sekvenování provedeného firmou SEQme.

5.1 Elektroforetické snímky pro virus deformovaných křídel (DWV)



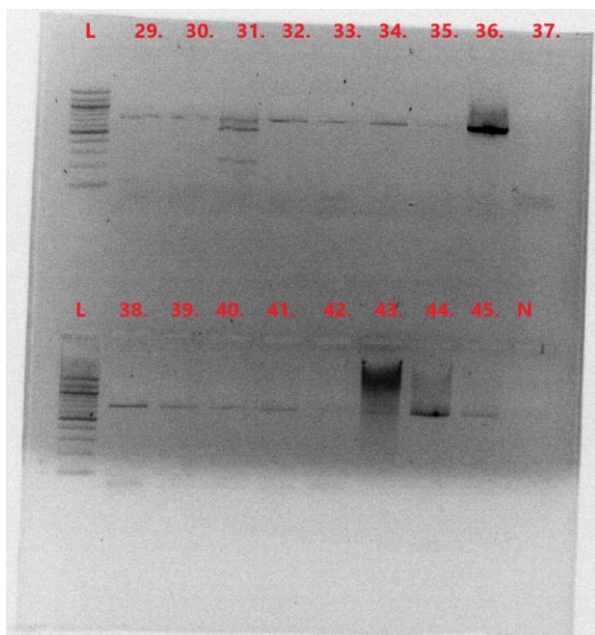
Obrázek 5.1 - Výsledky vyšetření včel na onemocnění DWV s pořadím vzorků: 100bp ladder, Vzorek č. 1, Vzorek č. 2, Vzorek č. 3, Vzorek č. 4, Vzorek č. 5, Vzorek č. 6, Vzorek č. 7, Vzorek č. 8, Vzorek č. 9, 100bp ladder, Vzorek č. 10, Vzorek č. 11, Vzorek č. 12, Vzorek č. 13, Vzorek č. 14, Vzorek č. 15, Vzorek č. 16, Negativní kontrola

Z elektroforetického snímku (Obr. 5.1), na kterém jsem testoval vzorky 1 až 16, můžeme výsledky hodnotit jako vzorky číslo 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 pozitivní. Velikost fragmentu by měla být 702bp, což odpovídá mým výsledkům. Vzorek 6 nelze hodnotit. U vzorků 3 a 13 došlo k nespecifické amplifikaci. Negativní kontrola vyšla negativně.



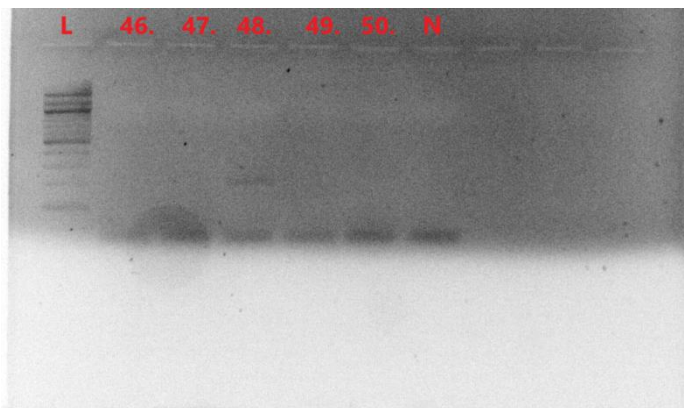
Obrázek 5.2 - Výsledky vyšetření včel na onemocnění DWV s pořadím vzorků: 100bp ladder, Vzorek č. 17, Vzorek č. 18, Vzorek č. 19, Vzorek č. 20, Vzorek č. 21, Vzorek č. 22, Vzorek č. 23, Vzorek č. 24, Vzorek č. 25, 100bp ladder, Vzorek č. 26, Vzorek č. 27, Vzorek č. 28, Negativní kontrola

Z elektroforetického snímku (Obr. 5.2) na kterém jsem testoval vzorky 17 až 28, můžeme výsledky hodnotit jako vzorky číslo 19, 20, 21, 24, 26, 27, 28 pozitivní. Velikost fragmentu by měla být 702bp, což odpovídá mým výsledkům. Negativní kontrola vyšla negativně.



Obrázek 5.3 - Výsledky vyšetření včel na onemocnění DWV s pořadím vzorků: 100bp ladder, Vzorek č. 29, Vzorek č. 30, Vzorek č. 31, Vzorek č. 32, Vzorek č. 33, Vzorek č. 34, Vzorek č. 35, Vzorek č. 36, Vzorek č. 37, 100bp ladder, Vzorek č. 38, Vzorek č. 39, Vzorek č. 40, Vzorek č. 41, Vzorek č. 42, Vzorek č. 43, Vzorek č. 44, Vzorek č. 45, Negativní kontrola

Z elektroforetického snímku (Obr. 5.3) na kterém jsem testoval vzorky 29 až 45, můžeme výsledky hodnotit jako vzorky číslo 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 38, 39, 40, 41, 42, 44, 45 pozitivní. Velikost fragmentu by měla být 702bp, což odpovídá mým výsledkům. Vzorek 43 nelze hodnotit. U vzorků 31 a 38, došlo k nespecifické amplifikaci. Negativní kontrola vyšla negativně.

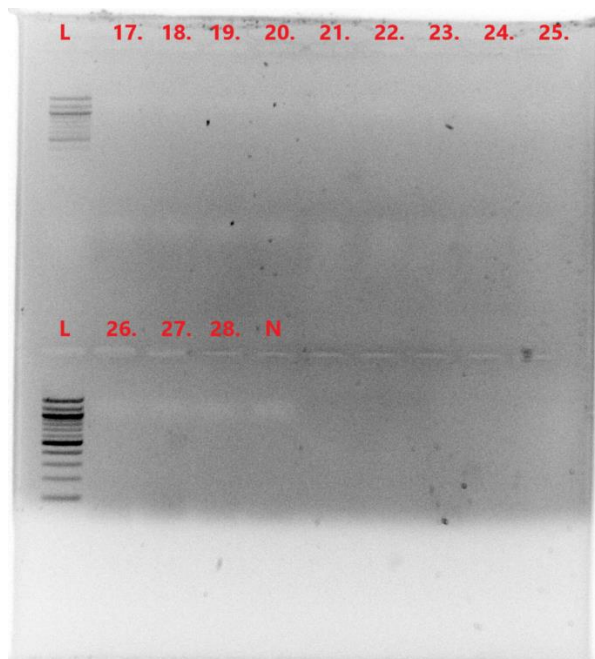


Obrázek 5.4 - Výsledky vyšetření včel na onemocnění DWV s pořadím vzorků: 100bp ladder, Vzorek č. 46, Vzorek č. 47, Vzorek č. 48, Vzorek č. 49, Vzorek č. 50, Negativní kontrola

Z elektroforetického snímku (Obr. 5.4) na kterém jsem testoval vzorky 46 až 50, můžeme výsledky hodnotit jako vzorek číslo 48 pozitivní. Velikost fragmentu by měla být 702bp, což odpovídá mým výsledkům. Negativní kontrola vyšla negativně.

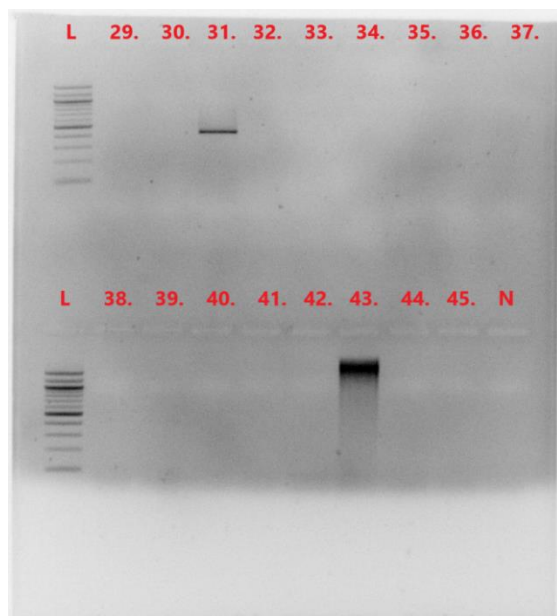
5.1.1 Sekvenování

Pro ověření specifity primerů použitých pro detekci viru DWV jsem použil vzorek číslo 20. Výsledek tohoto sekvenování je znázorněn na obrázku (viz Obr. 5.5). Sekvenci se podařilo přečíst dostatečně kvalitně. Výslednou sekvenci jsem porovnal s databází NCBI (Benson et al., 2018) pomocí nástroje BLAST (Madden et al., 1996) a shoda s virem DWV je na 96,33%.



Obrázek 5.7 - Výsledky vyšetření včel na onemocnění BQCV s pořadím vzorků: 100bp ladder, Vzorek č. 17, Vzorek č. 18, Vzorek č. 19, Vzorek č. 20, Vzorek č. 21, Vzorek č. 22, Vzorek č. 23, Vzorek č. 24, Vzorek č. 25, 100bp ladder, Vzorek č. 26, Vzorek č. 27, Vzorek č. 28, Negativní kontrola

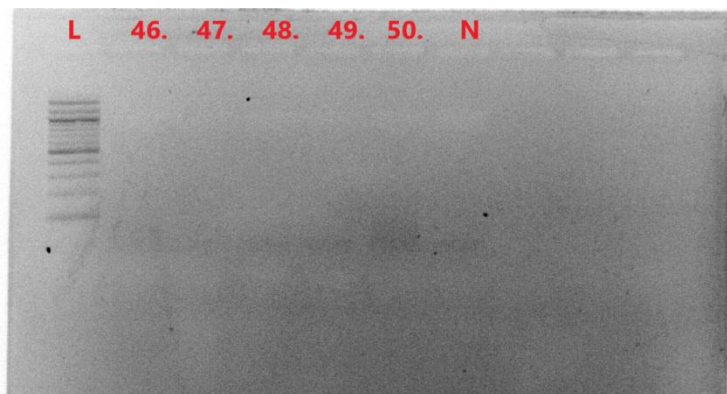
Z elektroforetického snímku (Obr. 5.7) na kterém jsem testoval vzorky 17 až 28, můžeme výsledky hodnotit jako všechny vzorky negativní. Negativní kontrola vyšla negativně.



Obrázek 5.8 - Výsledky vyšetření včel na onemocnění BQCV s pořadím vzorků: 100bp ladder, Vzorek č. 29, Vzorek č. 30, Vzorek č. 31, Vzorek č. 32, Vzorek č. 33, Vzorek č. 34, Vzorek č. 35, Vzorek č. 36, Vzorek č. 37, 100bp ladder, Vzorek č. 38, Vzorek č. 39, Vzorek č. 40, Vzorek č. 41, Vzorek č. 42, Vzorek č. 43, Vzorek č. 44, Vzorek č. 45, Negativní kontrola

Z elektroforetického snímku (Obr. 5.8) na kterém jsem testoval vzorky 29 až 45, můžeme výsledky hodnotit jako vzorek číslo 31 pozitivní. Vzorek 43 nelze hodnotit.

Velikost fragmentu by měla být 424bp, což odpovídá mým výsledkům. Negativní kontrola vyšla negativně.

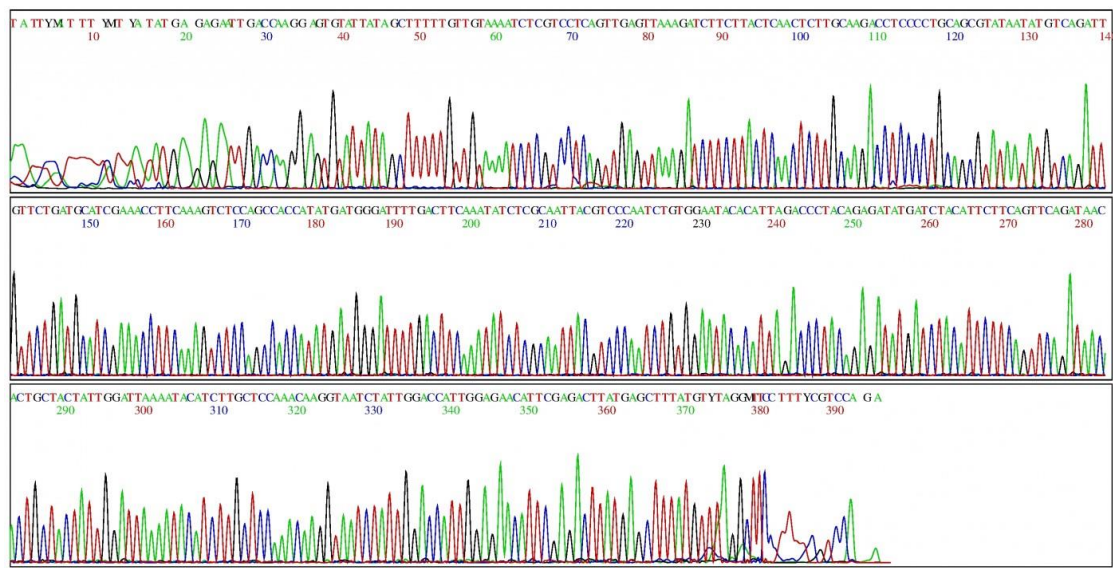


Obrázek 5.9 - Výsledky vyšetření včel na onemocnění BQCV s pořadím vzorků: 100bp ladder, Vzorek č. 46, Vzorek č. 47, Vzorek č. 48, Vzorek č. 49, Vzorek č. 50, Negativní kontrola

Z elektroforetického snímku (Obr. 5.9) na kterém jsem testoval vzorky 46 až 50, můžeme výsledky hodnotit jako všechny vzorky negativní. Negativní kontrola vyšla negativně.

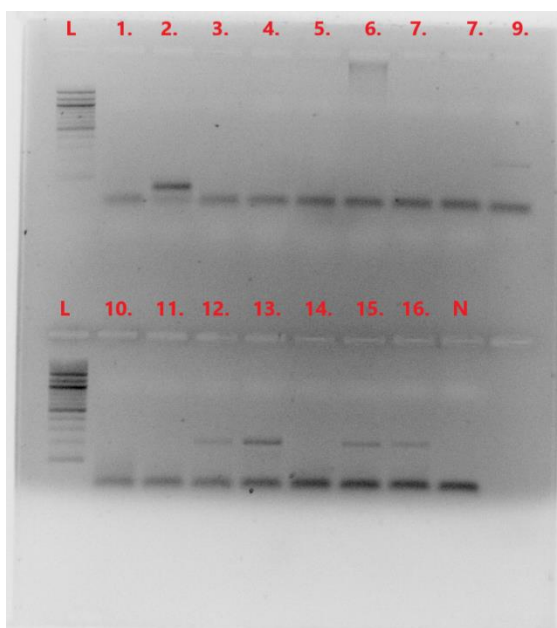
5.2.1 Sekvenování

Pro ověření specifity primerů použitých pro detekci viru BQCV jsem použil vzorek číslo 31. Výsledek tohoto sekvenování je znázorněn na obrázku (viz Obr. 5.10). Sekvenci se podařilo přečíst dostatečně kvalitně. Výslednou sekvenci jsem porovnal s databází NCBI (Benson et al., 2018) pomocí nástroje BLAST (Madden et al., 1996) a shoda s virem BQCV je na 98,01%.



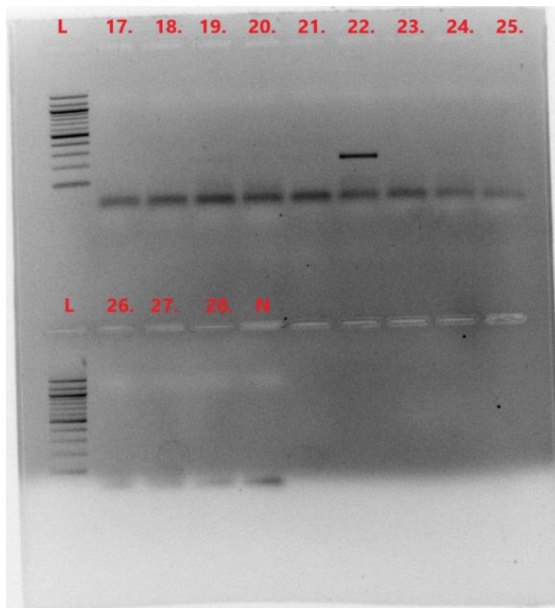
Obrázek 5.10 - Sekvence vzorku číslo 31 pro onemocnění BQCV

5.3 Elektroforetické snímky pro virus chronické paralýzy včel (CBPV)



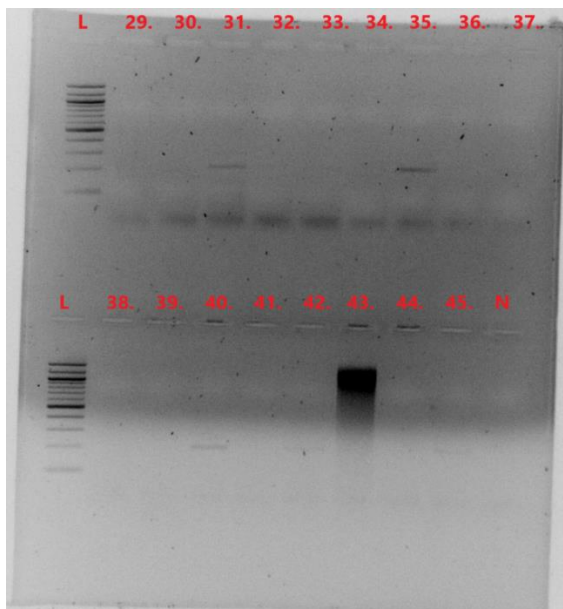
Obrázek 5.11 - Výsledky vyšetření včel na onemocnění CBPV s pořadím vzorků: 100bp ladder, Vzorek č. 1, Vzorek č. 2, Vzorek č. 3, Vzorek č. 4, Vzorek č. 5, Vzorek č. 6, Vzorek č. 7, Vzorek č. 8, Vzorek č. 9, 100bp ladder, Vzorek č. 10, Vzorek č. 11, Vzorek č. 12, Vzorek č. 13, Vzorek č. 14, Vzorek č. 15, Vzorek č. 16, Negativní kontrola

Z elektroforetického snímku (Obr. 5.11) na kterém jsem testoval vzorky 1 až 16, můžeme výsledky hodnotit jako všechny vzorky negativní s nespecifickou amplifikací, výsledný produkt má mít velikost 335bp, což nesplňuje žádný vzorek. Negativní kontrola vyšla negativně.



Obrázek 5.12 - Výsledky vyšetření včel na onemocnění CBPV s pořadím vzorků: 100bp ladder, Vzorek č. 17, Vzorek č. 18, Vzorek č. 19, Vzorek č. 20, Vzorek č. 21, Vzorek č. 22, Vzorek č. 23, Vzorek č. 24, Vzorek č. 25, 100bp ladder, Vzorek č. 26, Vzorek č. 27, Vzorek č. 28, Negativní kontrola

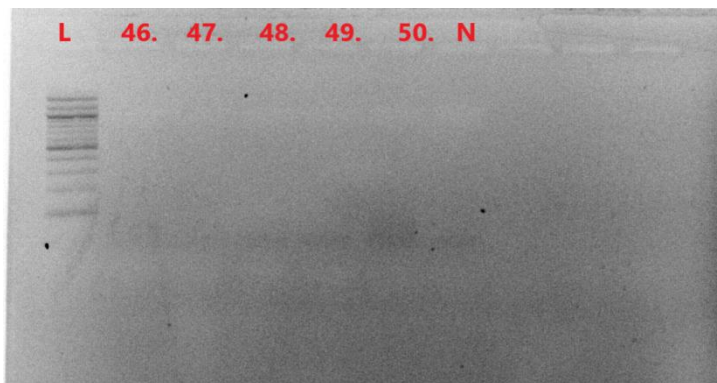
Z elektroforetického snímku (Obr. 5.12) na kterém jsem testoval vzorky 17 až 28, můžeme výsledky hodnotit jako všechny vzorky negativní s nescifickou amplifikací, výsledný produkt má mít velikost 335bp, což nesplňuje žádný vzorek. Negativní kontrola vyšla negativně.



Obrázek 5.13 - Výsledky vyšetření včel na onemocnění CBPV s pořadím vzorků: 100bp ladder, Vzorek č. 29, Vzorek č. 30, Vzorek č. 31, Vzorek č. 32, Vzorek č. 33, Vzorek č. 34, Vzorek č. 35, Vzorek č. 36, Vzorek č. 37, 100bp ladder, Vzorek č. 38, Vzorek č. 39, Vzorek č. 40, Vzorek č. 41, Vzorek č. 42, Vzorek č. 43, Vzorek č. 44, Vzorek č. 45, Negativní kontrola

Z elektroforetického snímku (Obr. 5.13) na kterém jsem testoval vzorky 29 až 45, můžeme výsledky hodnotit jako všechny vzorky negativní s nescifickou amplifi-

kací, výsledný produkt má mít velikost 335bp, což nesplňuje žádný vzorek. Vzorek 43 nelze hodnotit. Negativní kontrola vyšla negativně.

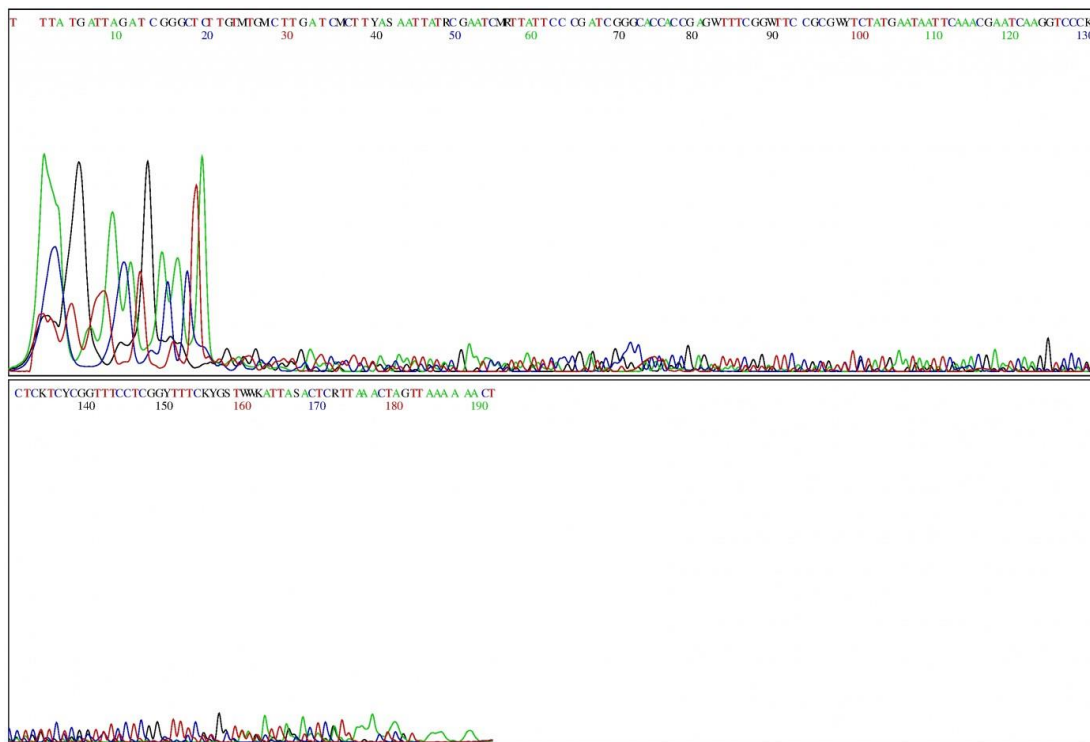


Obrázek 5.14 - Výsledky vyšetření včel na onemocnění CBPV s pořadím vzorků: 100bp ladder, Vzorek č. 46, Vzorek č. 47, Vzorek č. 48, Vzorek č. 49, Vzorek č. 50, Negativní kontrola

Z elektroforetického snímku (Obr. 5.14) na kterém jsem testoval vzorky 46 až 50, můžeme výsledky hodnotit jako všechny vzorky negativní. Negativní kontrola vyšla negativně.

5.3.1 Sekvenování

Pro ověření specifity primerů použitých pro detekci viru CBPV jsem použil vzorek číslo 22. Výsledek tohoto sekvenování je znázorněn na obrázku (viz Obr. 5.15). Sekvenci se nepodařilo přečíst dostatečně kvalitně pro následné porovnání s databází NCBI (Benson et al., 2018) pomocí nástroje BLAST (Madden et al., 1996).



Obrázek 5.15 - Sekvence vzorku číslo 22 pro onemocnění CBPV

V následující tabulce (viz Tab. 5.1), jsou přehledně shrnuty všechny mnou získané výsledky při průkazu zkoumaných tří virových onemocnění u včel.

Tabulka 5.1 - Tabulka výsledků včelstev z RT-PCR reakce u všech zkoumaných onemocnění

Číslo vzorku	Počet odebraných vzorků	Pozitivita RT-PCR reakce		
		DWV	CBPV	BQCV
České Budějovice				
1	5	NE	NE	NE
2	2	ANO	NE	NE
3	3	NE	NE	NE
4	5	NE	NE	NE
5	5	ANO	NE	NE
6	5	NE	NE	NE
7	5	ANO	NE	NE
8	5	NE	NE	NE
9	4	NE	NE	NE
10	4	ANO	NE	NE
Šumava				
11	5	ANO	NE	NE
12	5	NE	NE	NE
13	5	ANO	NE	ANO
14	5	ANO	NE	NE
15	5	NE	NE	NE
16	5	NE	NE	NE
Praha				
17	4	NE	NE	NE
18	5	NE	NE	NE
19	3	ANO	NE	NE
20	3	ANO	NE	NE
21	3	ANO	NE	NE
22	4	NE	NE	NE
23	2	NE	NE	NE
24	5	ANO	NE	NE
25	2	NE	NE	NE
26	5	ANO	NE	NE
27	5	ANO	NE	NE
28	3	ANO	NE	NE
Plzeň				
29	4	ANO	NE	NE
30	5	ANO	NE	NE
31	3	ANO	NE	ANO
32	4	ANO	NE	NE
33	4	ANO	NE	NE
34	5	ANO	NE	NE
Ostrava				
35	4	ANO	NE	NE
36	4	ANO	NE	NE
37	3	NE	NE	NE
38	5	ANO	NE	NE
39	5	ANO	NE	NE
40	4	ANO	NE	NE
41	5	ANO	NE	NE
42	5	ANO	NE	NE
43	5	NELZE HODNOTIT	NELZE HODNOTIT	NELZE HODNOTIT
44	5	ANO	NE	NE
45	2	ANO	NE	NE
Brno				
46	5	NE	NE	NE
47	5	NE	NE	NE
48	2	ANO	NE	NE
49	2	NE	NE	NE
50	3	NE	NE	NE

6 Diskuze

Průkaz onemocnění jsem hodnotil dle bandů na elektroforetických snímcích, které signalizovali pozitivní PCR reakci se specifickými primery daného onemocnění. Pro přesné ověření onemocnění, jsem ještě od daného onemocnění jeden pozitivní vzorek zaslal na sekvenování do laboratoří SEQme a získanou sekvenci, jsem porovnal v databázi NCBI (Benson et al., 2018) pomocí nástroje BLAST (Madden et al., 1996), zda se jedná opravdu o sekvenci ze zkoumaného viru a ne pouze o nespecifickou amplifikaci. Všechny získané výsledky jsem zpracoval do tabulky (viz Tab. 7.1.). Pokud se zaměříme na virus deformovaných křídel, zjištění míry nákazy je přesně podle předpokladu. Podle Foralové (2016) je míra nákazy tímto virem mezi včelstvy v České republice velmi vysoká a podílí se vysokou měrou na úhynu včelstev. Studie od Tsevegmida et al. (2016) zabývající se mírou virových nákaz mezi včelstvy v Asii, uvádí virus deformovaných křídel, jako velmi sporadický. Dle mých výsledků je na našem území tento virus však nejvíce rozšířen. Důvod bude nejspíše zejména původ viru, který je právě z našeho kontinentu. Pozitivita byla prokázána pomocí specifických primerů z publikace od Yanga et al. (2013), kde byl očekávaný produkt přibližně 820bp. Pro ověření onemocnění, jsem vybraný pozitivní vzorek zaslal na osekvenování pomocí Sangerovo metodou do laboratoře SEQme. Sekvenci vzorku se podařilo přečíst dostatečně kvalitně (viz Obr. 5.5) pro její analýzu pomocí nástroje BLAST (Madden et al., 1996). Následným porovnáním sekvencí v databázi NCBI (Benson et al., 2018), byla prokázána shoda s virem DWV v 96.33%. Jelikož použité primery nedetekují přímo typ viru, tak jako další postup u pozitivních včelstev bych doporučil otypování na známé typy DWV-A, DWV-B a DWV-C, jelikož podle Petereka (2021) ubývá typ DWV-A, a je na určitých územích vytlačován typem DWV-B, který je více infekční a míra úhynu včelstev tímto virem, je mnohem větší. Tento názor na typování zastává i De Souza et al. (2021), který ve své publikaci popisuje situaci ve Velké Británii, která by u nás v dohledné době mohla nastat a to vytlačení typu DWV-A, horším typem DWV-B. Podle Petereka (2021) nákaza virem deformovaných křídel jde společně s nákazou virem černání matečnicků, což dle mých výsledků potvrzují. Oba pozitivní vzorky na nemoc černání matečnicků, jsou pozitivní i na virus deformovaných křídel. Pro průkaz viru černání matečnicků, jsem použil specifické primery z publikace od Yanga et al. (2013), kde byl očekávaný produkt přibližně 511bp. Pro ověření onemocnění, jsem vybraný pozitivní vzorek

zaslal na osekvenování pomocí Sangerovo metodou do laboratoře SEQme. Sekvenci vzorku se podařilo přečíst dostatečně kvalitně (viz Obr. 5.10) pro její analýzu pomocí nástroje BLAST (Madden et al., 1996). Následným porovnáním sekvencí v databázi NCBI (Benson et al., 2018), byla prokázána shoda s virem BQCV v 98.01%. Dle studie od Dinga (2016) zabývající se výskytem viru černání matečníků v Číně a studie od Muz, Muz (2017) která zkoumá výskyt v Turecku, je tento virus jeden z nejvíce celosvětově rozšířených virů, já ale toto tvrzení nezastávám, dle mých výsledků, je výskyt tohoto viru v České republice velice sporadický a dle studií provedených v česku Rybou et al. (2012) a Foralovou (2016), které tento nízký výskyt potvrzují, je trend výskytu spíše klesající. Pro detekci posledního virového onemocnění způsobující chronickou paralýzu včel, jsem použil specifické primery z publikace od Yanga et al. (2013), kde měl být očekávaný produkt přibližně 335bp. Podle elektroforetických snímků (viz Obr. 5.11), (viz Obr. 5.12), (viz Obr. 5.13) a (viz. Obr. 5.14) při RT-PCR proběhla nespecifická amplifikace s přibližnou velikostí 200bp. Nespecifickou amplifikaci jsem zaslat na osekvenování pomocí Sangerovo metodou do laboratoře SEQme. Sekvenci vzorku se bohužel nepodařilo přečíst dostatečně kvalitně (viz Obr. 5.15) pro analýzu nástrojem BLAST (Madden et al., 1996) a následným porovnáním sekvencí v databázi NCBI (Benson et al., 2018). Bohužel z časových důvodů, nebylo možné v rámci této diplomové práce provádět nové osekvenování nespecifických produktů. Na analýze neznámé sekvence se v laboratoři bude dále pracovat. Jako další možné kroky doporučuji důslednější přečištění vzorku a kvalitnější přípravu vzorku pro sekvenování. V případě dalších neúspěchů je možné vzorky ještě zaklonovat a osekvenovat. Je možné, že nespecifická amplifikace patří zkoumanému viru a průkazným osekvenováním, tím vyvrátíme výsledky z publikace od Yanga et al (2013), kde byly použity stejné primery s výsledným produktem 355bp. Já se však přikláním k tomu, že se jedná o nespecifickou amplifikaci. Pokud se podíváme na práci od Čukanové et al. (2020) a Petereka (2021) tak vidíme, že výskyt tohoto virového onemocnění, je na území České republiky zcela minimální, bylo by tedy dle mého názoru velmi zvláštní, aby se tento rok vir rozšířil mezi včelstvy.

7 Závěr

Na základě všech získaných výsledků, jsem zhodnotil míru rozšíření nákaz u onemocnění viru deformovaných křídel, viru černání matečnicků a viru chronické paralýzy. Je zřejmé, že v České republice je nejvíce rozšířena nákaza onemocnění způsobené virem deformovaných křídel (DWV). Nákaza je rozšířena zejména na Plzeňsku, kde jsou pozitivní všechny odebrané vzorky a Ostravsku, kde je negativní pouze jeden vzorek. Částečně v Praze, Českých Budějovicích a Šumavě, kde je pozitivní alespoň polovina odebraných vzorků. Na Brněnsku z výsledků onemocnění mezi včelstvy nepropuklo, pozitivní je pouze jedno včelstvo. Pokud se podíváme na virové onemocnění černání matečnicků (BQCV), tak vidíme velký rozdíl oproti DWV, kdy se toto onemocnění objevuje pouze velmi sporadicky a nemůžeme zde hovořit o propuknutí nákazy. Pozitivní vzorky jsou pouze dva a to jeden na Šumavě a jeden na Plzeňsku. Když se zaměříme na poslední virové onemocnění a to chronickou paralýzu včel (CBPV), tak můžu z výsledků říct, že toto onemocnění se alespoň mezi vybranými včelstvy pro testování nenachází. Je tedy možné, že toto onemocnění se v Česku vůbec nenachází, či nedošlo žádným způsobem, k jeho většímu propuknutí mezi včelstvy.

Seznam použité literatury

1. Ahmad, S. M. a Ganai, N. A. (2020). *Long Non-Coding RNA: From Disease Biomarkers to Targeted Therapeutics*. United Kingdom, Cambridge Scholars Publishing. ISBN 1527559106.
2. Alberts, B. (2008). *Molecular biology of the cell*. 5th ed. New York, Garland Science. ISBN 9780815341055.
3. Bailey, L. a Ball, V. B. (2013). *Honey Bee Pathology*. 2nd edition. Amsterdam, Elsevier. ISBN 1483288099.
4. Benson, D. A. et al. (2018). GenBank. Nucleic Acids Res. 46, D41–D47.
5. Colville, T. P. a M. Basseret J. M. (2015). *Clinical Anatomy and Physiology for Veterinary Technicians*. 3rd edition. Amsterdam, Elsevier Health Sciences. ISBN 9780323356206.
6. Cseke, L. J. a Kirakosyan, A. (2016). *Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine*. 3rd edition. USA, CRC Press. ISBN 9781439881958.
7. Čukanová E. et al. (2020). Virové paralýzy včely medonosné (*Apis mellifera*). 70(6):376-382.
8. De Souza, F. S. et al. (2021). Deformed wing virus prevalence and load in honeybees in South Africa. *Archives of Virology*. 166(1), 237-241.
9. Ding, G. (2016). *Prevalence of honeybee viruses in different regions of China and Argentina*. DOI:10.20506/rst.35.3.2572.
10. Elliot, D. a Lodomery, M. (2011). *Molecular Biology of RNA*. United Kingdom, OUP Oxford. ISBN 0199288372.
11. Elliott, D. a Lodomery M. (2016). *Molecular biology of RNA*. Second edition. Oxford, Oxford University Press. ISBN 9780199671397.
12. Farrell, R. E. (2017). *RNA methodologies: laboratory guide for isolation and characterization*. Fifth edition. London, Academic Press, an imprint of Elsevier. ISBN 9780128046791.
13. Foralová, A. (2016). *Vývoj diagnostických metod pro detekci vybraných původců virových onemocnění včely medonosné*. Diplomová práce, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta.
14. Green, M. R. a Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 4th ed. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 9781936113422.
15. Harris, W. (2008). *The Honey-bee Gardening in America Series*. USA, Applewood Books. ISBN 9781429013581.
16. Herrod, W. (2012). *The Anatomy, Physiology and Natural History of the Honey Bee*. United Kingdom, Read Books. ISBN 9781447464358.
17. Hemsall, W. H. (2012). *The Anatomy, Physiology and Natural History of the Honey Bee*. United Kingdom, Read Books. ISBN 9781447464358.
18. Jackson, W. T. a Swanson, M. S. (2014). *Autophagy, Infection, and the Immune Response*. USA, John Wiley. ISBN 9781118677735.
19. Johnson, S. a Johnson, D. (2019). *The Beginner's Guide to Beekeeping: Everything You Need to Know*. 2nd edition. United Kingdom, Voyageur Press. ISBN 9780760364093.
20. Kane, T. R. a Fau, M. C. (2021). *Honey Bee Medicine for the Veterinary Practitioner*. New Jersey, John Wiley. ISBN 9781119583233.

-
21. Langstroth, L. L. (2015). *Langstroth on the Hive and the Honey-Bee: A Bee Keeper's Manual*. Scotts Valley, CreateSpace Independent Publishing Platform. ISBN 9781514682265.
 22. Maaden, T. L. et al. (1996). *Applications of network BLAST server*. *Meth. Enzymol.* 266:131-141
 23. Maramorosch, K. a Shatkin A. J. (2007). *Advances in Virus Research*. United Kingdom, Elsevier. ISBN 0080552218.
 24. Morvillo, N. a Schmidt, M. (2021). *The MCAT Biology Book*. United Kingdom, Nova Press. ISBN 9781889057446.
 25. Muz, D. a Muz, M. N. (2017). *A molecular epidemiological study of black queen cell virus in honeybees (*Apis mellifera*) of Turkey: the first genetic characterization and phylogenetic analysis of field viruses*. 89–100.
 26. Norman, G. (2019). *Honey bee hobbyist*. 2nd edition. Mount Joy, Fox Chapel Publishers International. ISBN 9781620083154.
 27. Oldstone, M. B. A. (2020). *Viruses, Plagues, and History: Past, Present, and Future*. United Kingdom, Oxford University Press. ISBN 9780190056780.
 28. Patton, K. T. (2015). *Anatomy and Physiology*. 9th ed. Amsterdam, Elsevier Health Sciences. ISBN 9780323316873.
 29. Pelley, J. (2011). *Elsevier's Integrated Review Biochemistry*. 2nd edition. USA, Saunders. ISBN 9780323074469.
 30. Peterek, J. (2021). *DWV-B jakožto virus způsobující velké kolapsy včelstev* [online]. [cit. 2021-04-15]. Dostupné z: <https://posledniprocento.cz/2021/01/14/dwv-b-jakozto-virus-zpusobujici-velke-kolapsy-vcelstev/>.
 31. Peterek, J. (2021). *Jaké bude včelaření s virem DWV-B?* [online]. [cit. 2021-04-15]. Dostupné z: <https://posledniprocento.cz/2021/01/15/jake-bude-vcelareni-s-virem-dwv-b/>.
 32. Rapley, R. (2008). *The Nucleic Acid Protocols Handbook*. New Jersey, Springer Science & Business Media. ISBN 9781592590384.
 33. Roossinck, M. (2020). *Virus: 101 Incredible Microbes from Coronavirus to Zika*. United Kingdom, Ivy Press. ISBN 0711260923.
 34. Russell, D. W. a Sambrook, J. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edition. Cold Spring Harbor, CSHL Press. ISBN 9780879695767.
 35. Ryba, S. et al. (2012). Prevalence of honeybee viruses in the Czech Republic and coinfections with other honeybee disease. *Biologia.* 67(3), 590-595.
 36. Sammataro, D. a Yoder, J. A. (2011). *Honey Bee Colony Health: Challenges and Sustainable Solutions*. Cleveland, CRC Press. ISBN 1439879419.
 37. Sankaran, N. (2021). *A Tale of Two Viruses: Parallels in the Research Trajectories of Tumor and Bacterial Viruses*. Pittsburgh, University of Pittsburgh Press. ISBN 9780822987710.
 38. Seeley, T. (2016). *Following the Wild Bees: The Craft and Science of Bee Hunting*. New Jersey, Princeton University Press. ISBN 0691170266.
 39. Shaara, H. A. (2013). *Rearing of Honey Bee Larvae in the Laboratory*. USA, Lulu Press. ISBN 9781304142719.
 40. Snodgrass, R. E. (2018). *The Anatomy of the Honey Bee*. United Kingdom, Pickle Partners Publishing. ISBN 1789120144.
 41. Snyder, R. (2013). *BQCV (BLACK QUEEN CELL VIRUS)* [online]. [cit. 2021-03-06]. Dostupné z: <https://beeinformed.org/2013/12/04/bqcv-black-queen-cell-virus/>

-
42. Stamets, P. et al. (2018) Extracts of Polypore Mushroom Mycelia Reduce Viruses in Honey Bees, *Scientific Reports*. DOI: 10.1038/s41598-018-32194-8
 43. Stamm, S. et al. (2012). *Alternative pre-mRNA Splicing: Theory and Protocols*. New Jersey, John Wiley. ISBN 9783527647989.
 44. Tekade, R. K. (2020). *The Future of Pharmaceutical Product Development and Research*. Amsterdam, Elsevier. ISBN 9780128144558.
 45. Thiemann, F. et al. (2014). *Molekulare Diagnostik: Grundlagen der Molekularbiologie, Genetik und Analytik*. 2nd edition. New Jersey, John Wiley. ISBN 9783527688067.
 46. Titěra, D. (2013). *Včelí produkty mýtů zbavené: med, vosk, pyl, mateří kašička, propolis, včelí jed*. Vyd. 2., Praha, Brázda. ISBN 9788020903983.
 47. Tsevegmid, K. et al. (2016). The Honey Bee Pathosphere of Mongolia: European Viruses in Central Asia. *PLOS ONE*. 11(3). ISSN 19326203.
 48. Veselý, V. (2003). *Včelařství*. Praha, Brázda. ISBN 8020903208.
 49. *Viry (Vira)* (2008). [online]. Česká republika [cit. 2021-03-16]. Dostupné z: www.vysokeskoly.cz
 50. Výzkumný ústav včelařský, (2019). *Virus deformovaných křídel*. [online] [cit. 2021-02-28]. Dostupné z: <https://www.beedol.cz/nemoci/virozy/>
 51. Walker, J. M. a Rapley R. (2009). *Molecular Biology and Biotechnology*. Cambridge, The Royal Society of Chemistry. ISBN 9780854041251.
 52. Wilhelm, D. a Bernard, P. (2015). *Non-coding RNA and the Reproductive System*. New York, Springer. ISBN 9789401774178.
 53. Wright, J. (2013). *Cracking the SAT*. New York, Penguin Random House. ISBN 978-0-307-94552-5.
 54. Yang, B. et al. (2013). Molecular and phylogenetic characterization of honey bee viruses, *Nosema* microsporidia, protozoan parasites, and parasitic mites in China. *Ecology and Evolution*. 3(2), 298-311.
 55. ZO ČSV České Budějovice, (2020). *Včely, včelaři a příroda v souvislostech* [online] [cit. 2021-02-28]. Dostupné z: <http://www.vcelar.info/zajimavosti/cesky-med/>

Seznam obrázků

Obrázek 2.1 - Klinické příznaky nákazy virem. Vlevo zdravá dělnice, uprostřed dělnice s výrazně deformovanými křídly a menším vzrůstem a v pravo mladuška bezkřídla s výraznou deformací zadečku (Výzkumný ústav včelařský, 2021)	11
Obrázek 2.2 – Zčernalá larva (Snyder, 2009)	12
Obrázek 2.3 – Typické příznaky druhé formy onemocnění (Kane, Faux, 2021)	14
Obrázek 2.4 – Okusování nakažené včely ostatními včelami v úlu (Kane, Faux, 2021)	14
Obrázek 2.5 – Uracil (Elliott, Lodomery, 2011)	15
Obrázek 2.6 – A forma RNA (Elliott, Lodomery, 2016)	15
Obrázek 2.7 – Schéma tRNA se specifickými vazebnými místy (Pelley, 2011)	16
Obrázek 2.8 – Vzniklý gradient po ultracentrifugaci (Farrell, 2017)	19
Obrázek 2.9 - Vzniklý gradient po ultracentrifugaci (Farrell, 2017)	20
Obrázek 5.1 - Výsledky vyšetření včel na onemocnění DWV	29
Obrázek 5.2 - Výsledky vyšetření včel na onemocnění DWV	30
Obrázek 5.3 - Výsledky vyšetření včel na onemocnění DWV	30
Obrázek 5.4 - Výsledky vyšetření včel na onemocnění DWV	31
Obrázek 5.5 - Sekvence vzorku číslo 20 pro onemocnění DWV	32
Obrázek 5.6 - Výsledky vyšetření včel na onemocnění BQCV	32
Obrázek 5.7 - Výsledky vyšetření včel na onemocnění BQCV	33
Obrázek 5.8 - Výsledky vyšetření včel na onemocnění BQCV	33
Obrázek 5.9 - Výsledky vyšetření včel na onemocnění BQCV.....	34
Obrázek 5.10 - Sekvence vzorku číslo 31 pro onemocnění BQCV.....	35
Obrázek 5.11 - Výsledky vyšetření včel na onemocnění CBPV	35
Obrázek 5.12 - Výsledky vyšetření včel na onemocnění CBPV	37
Obrázek 5.13 - Výsledky vyšetření včel na onemocnění CBPV	36
Obrázek 5.14 - Výsledky vyšetření včel na onemocnění CBPV	37
Obrázek 5.15 - Sekvence vzorku číslo 22 pro onemocnění CBPV.....	38

Seznam tabulek

Tabulka 7.1 - Tabulka výsledků včelstev z RT-PCR reakce u všech zkoumaných onemocnění	39
---	----
