



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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

Metodický postup detekce exprese specifických genů významných pro detoxifikaci xenobiotických látek u včel

Metodika byla vypracována jako výstup projektu NAZV QK1910356 - Zlepšení zdravotního stavu včelstev pomocí indukce přirozených obranných mechanismů



Autoři: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D., Ing. Irena Hoštičková, Ph.D.,
Ing. Petr Mráz, Ing. Kateřina Vočadlova, Ing. Dagmar Stehlíková, Ph.D.,
Ing. Karel Beneš, Ph.D., doc. Ing. Michael Rost, Ph.D.

České Budějovice, 2021

**Metodický postup detekce exprese specifických genů významných pro
detoxifikaci xenobiotických látek u včel**

Metodika byla vypracována jako výstup projektu NAZV QK1910356 - Zlepšení zdravotního stavu včelstev pomocí indukce přirozených obranných mechanismů

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
Ing. Irena Hoštičková, Ph.D.
Ing. Petr Mráz
Ing. Kateřina Vočadlova
Ing. Dagmar Stehlíková, Ph.D.
Ing. Karel Beneš, Ph.D.
doc. Ing. Michael Rost, Ph.D.

Metodický postup detekce exprese specifických genů významných pro detoxifikaci xenobiotických látek u včel

Vladislav Čurn a kol., 2021
curn@zf.jcu.cz

Katedra genetiky a zemědělských biotechnologií, Biotechnologické centrum ZF JU
v Českých Budějovicích, České Budějovice 2021
www.zf.jcu.cz, <http://biocentrum.zf.jcu.cz>

Vypracováno za podpory projektu NAZV QK1910356 - Zlepšení zdravotního stavu včelstev pomocí indukce přirozených obranných mechanismů

Recenzenty metodiky byli:

Ing. Miroslav Kašparů, PhD.
Ing. Lenka Černíková, Ph.D.

Text: ©2021 Čurn V., Hoštičková I., Vočadlová K., Stehlíková D.
Vydáno bez jazykové úpravy
ISBN: 978-80-7394-894-8

Obsah

Uvedení problému a cíl metodiky	1
Vlastní popis metodiky	3
<i>Úvod</i>	3
<i>Postup hodnocení genové exprese u genů pro cytochromy P450</i>	4
Srovnání novosti postupů	15
Popis uplatnění metodiky	15
Ekonomické aspekty	16
Seznam publikací předcházející metodice	17
Seznam použité literatury	17

Uvedení problému a cíl metodiky

Včely patří mezi významné opylovatele planých rostlin i mnoha zemědělských plodin a poskytují tak nedocenitelné ekosystémové služby. V posledních letech se ale setkáváme s kritickou situací jak u včely medonosné tak i u dalších opylovatelů, jejichž populace se v EU i ve světě zmenšuje. Tento problém je ale mnohem závažnější a rozsáhlejší. Je zaznamenáván dramatický pokles výskytu či až vyhynutí a snížení rozmanitosti všech druhů volně žijících hmyzích opylovatelů v Evropě. To představuje závažný důvod k obavám, protože opylovatelé jsou nedílnou součástí zdravých ekosystémů a jejich úbytek může pak mít závažné nejen ekologické, ale i sociální a ekonomické důsledky. Odhaduje se totiž, že 5–8 % současné celosvětové rostlinné produkce je přímo závislé na opylovatelích a jen v EU závisí na opylovatelích přibližně 84 % druhů plodin a 78 % druhů planě rostoucích rostlin (Potts et al. 2010; Michener 2013; McMenamin 2018).

V současné době je značná pozornost věnována nejen studiu biologie včely (a dalších opylovatelů) a její roli v ekosystému, ale zejména studiu stresových faktorů, které na včelstvo působí. Mezi tyto stresory patří např. změny vyvolávané klimatickou změnou a intenzivní zemědělskou výrobou, ztráta přirozeného habitatu, nedostatečná výživa, tlak parazitů a patogenních mikroorganismů, vystavení včelstev působení pesticidů (Steinhauer et al. 2018). Řada studií poukazuje i na význam střevního mikrobiomu a mikroorganismů přítomných v přirozeném prostředí včel, potravě a včelích produktech (Evans a Lopez 2004; Paludo et al. 2018). Střevní mikrobiom hraje zřejmě nejen zásadní roli v ochraně včely před patogenními mikroorganismy (Vásquez et al 2012), ale také ovlivňuje expresi antimikrobiálních peptidů, které jsou klíčovou součástí vrozené imunity včel (Kwong et al. 2017).

Jedním z diskutovaných negativních vlivů na včelstva je jednostranná strava a význam přírodní stravy včel včetně významu fytochemikálií. Studie, porovnávající vliv medu a cukerné stravy na vitalitu včelstva, potvrzují význam přirozené stravy pro správnou funkci organismu včel (Brodschneider a Crailsheim 2010; Evans et al. 2018). Kromě základních živin totiž obsahuje přírodní strava také širokou škálu rostlinných látek, fytochemikálií. Fytochemikálie mohou být toxické, některé druhy hmyzu mají však vyvinuté detoxikační mechanismy, umožňující tolerovat tyto látky. Tolerance a odbourávání nejen fytochemikálií jsou umožněny především enzymy, které zprostředkovávají inaktivaci nebo rychlou eliminaci xenobiotik (Wink 2018). Detoxikace xenobiotik se ale netýká jen problematiky fytochemikálií, ale i odbourávání pesticidů resp. jejich reziduí. Včely při opylování přicházejí do styku s různými druhy insekticidů, fungicidů, a herbicidů, které si přinášejí do úlu, inkorporují je do medu, vosku a fermentovaného plástového pylu. Kontaminované produkty

jsou potravou pro celé včelstvo a pesticidům jsou tak vystaveny plod, matka i dospělé dělnice s trubci (Steinhauer et al. 2018; Prado et al. 2019). Expozice pesticidům a jejich reziduí může vést k okamžitému úhynu zasažené dělnice, avšak včelstvo je mnohdy dlouhodobě vystaveno tzv. subletální dávce více druhů pesticidů a jejich reziduí. Při analýze včelínů bylo identifikováno až 173 reziduí chemických látek (Sanchez-Bayo a Goka 2016). Interakce toxinů v koktejlů chemikálií, který na včelstvo působí, mohou vést k synergickému efektu a vyšší toxicitě. Některé fungicidy zvyšují toxicitu xenobiotik narušením funkce detoxikačních enzymů včel (Johnson 2013; Mao et al. 2017) a mohou redukovat prospěšné mikroorganismy ve fermentovaném plástovém pylu (Kakumanu et al. 2016; Yoder et al. 2013).

Detoxikace xenobiotik je složitý, enzymy zprostředkovaný proces. Hlavní skupiny enzymů, které zprostředkovávají odbourávání xenobiotik, jsou cytochromy P450, karboxyl/cholinesterázy, glutathion-S-transferázy a transportní proteiny (Berenbaum a Johnson 2015; Gong a Diao 2017). Přečtení genomu včely medonosné odhalilo značně redukované množství detoxikačních genů ve všech fázích detoxikace oproti jiným druhům hmyzu. Zatímco např. octomilka *Drosophila melanogaster* má ve své genetické výbavě 85 genů kódujících P450, 38 a 35 genů pro GST, respektive CCE, včela medonosná, *Apis mellifera* je vybavena pouze 46 geny pro P450, 10 pro GTS a 24 pro CCE. Navzdory redukovanému počtu detoxikačních genů není včela medonosná obecně výrazně citlivější k pesticidům v porovnání s jinými druhy hmyzu (Liao et al. 2017). Snížená diverzita detoxikačních genů, může být spojena s haplodiploidním systémem včel, ale také s jejich sociálním způsobem života, kterým udržují stabilní prostředí uvnitř úlu a snižují dopady environmentálních stresorů, jako jsou patogeny, paraziti a xenobiotika (Claudianos et al. 2006). Ve včelstvu mohou být rozlišeny detoxikační mechanismy na úrovni jedince, jak bylo popsáno výše, a na úrovni celého včelstva, podobně jako u imunitní reakce. Detoxikační mechanismy včelstva zahrnují soubor chování, jako je využívání široké škály rostlinných druhů ke sběru potravy nebo míchání pylu s nektarem. Zpracování nektaru a pylu zahrnuje enzymatické procesy snižující koncentraci toxinů, a bývá proto označováno jako nultá fáze detoxikačního procesu (Berenbaum a Johnson 2015).

Cílem metodiky je uvést přesný metodický návod pro odběr vzorků, izolaci RNA a provedení RT-qPCR analýzy a vyhodnocení míry genové exprese u genů pro cytochromy P450 u včely medonosné.

Vlastní popis metodiky

Úvod

Klíčovými enzymy, které se podílejí na odbourávání xenobiotik, jsou cytochromy P450. Cytochromy P450 jsou enzymy se širokou substrátovou specifikou, podílejí se na metabolismu přírodních i syntetických toxinů většiny aerobních organismů (Scott 2008). U hmyzu je popsáno asi 200 různých cytochromů P450, které jsou zařazeny do sedmi rodin CYP (Cytochrom P450), označených arabskými číslicemi a podrodin, označených velkými písmeny. Nejvyšší aktivita je obvykle v mesenteronu, tukových tělískách a malpighických trubicích. Míra exprese se může lišit v průběhu života, obvykle ji nelze detekovat ve vajíčkách a kuklách, v larválním stádiu stoupá a klesá v každém instaru, je nízká po vylíhnutí a zvyšuje se v průběhu života.

Odhaduje se, že asi třetina popsaných cytochromů P450 se podílí na metabolismu xenobiotik (Vannette et al. 2015; Mao et al. 2015). U včel zprostředkovávají především detoxikaci flavonoidů, akaricidů (tau-fluvanilátu, kumafosu a fenproximátu), pyrethroidů, organofosfátů, insekticidů na bázi neonikotinoidů a mykotoxinů hub rodu *Aspergillus* (aflatoxin B1 a ochratoxin), které se v úlu, spolu s dalšími zástupci, např. z rodu *Penicillium*, běžně vyskytují (Niu et al. 2011; Foley et al. 2014). Zvýšená exprese genů pro cytochromy P450 je jedním z mechanismů rezistence vůči insekticidům, např. geny rodin CYP4 a CYP6 jsou spojeny s rezistencí k DDT, pyrethroidům a neonikotinoidům (Scott et al. 1998). Včela medonosná má v genomu pouze 4 geny z rodiny CYP4. Zcela pak chybí rodina CYP12. V průběhu evoluce ovšem došlo k adaptivní radiaci genovými duplikacemi v rodinách CYP6 a CYP9, což vedlo k oddělení druhů *A. mellifera* a *A. cerana* od ostatních druhů, resp. podrodů včel (*A. florea*, *A. dorsata*, *A. laboriosa*). Těmito mechanismy došlo k rozvoji hormonálních a chemosenzorických procesů spojených s vysokým stupněm jejich eusociality (Claudianos et al. 2006).

Rychlý rozvoj metod molekulární biologie přinesl i značné rozšíření spektra technik a jejich aplikací. Jednou z významných aplikací je možnost hodnocení exprese studovaných genů a posouzení změn v expresi vyvolaných vnějšími podněty a zásahy.

Princip analýzy exprese zájmových genů spočívá v izolaci celkové RNA, purifikaci mRNA a přepisu mRNA na cDNA. Templáty cDNA jsou pak kvantifikovány pomocí techniky RT-PCR (qPCR). Kvantifikace je prováděna v relaci ke genům, které mají stálou, jednotkovou, expresi. Na základě výsledků analýzy exprese je pak možné

posoudit, zda je zájmový gen za daných experimentálních podmínek up nebo down-regulován a jaká je jeho odezva na tento podnět. Analýza exprese patří ke složitějším postupům molekulární biologie a pro získání relevantních dat je nutné dodržet správné postupy jak při odběru a manipulaci se vzorky, tak i postupy vlastní molekulární analýzy.

Postup hodnocení genové exprese u genů pro cytochromy P450

Odběr vzorků:

Vzorky včel a larev jsou odebírané přímo v úlu na včelnici a musí být okamžitě hluboce zamrazeny v kapalném dusíku. Rovněž při převozu do laboratoře musí být vzorky uchovávány v kapalném dusíku. Vzorky jsou skladovány v -80 °C až do izolace RNA. Vzorek je představován cca 5-10 včelami/larvami a v rámci experimentu jsou analyzována 3 biologická opakování.

Izolace RNA a syntéza cDNA:

Pro získání nerozkolísaných dat je potřebné RNA izolovat v podobě bulku ze všech včel odebraných do jednoho vzorku a izolace provádět ze 3 biologických opakování.

Izolace RNA (celková RNA) probíhá podle modifikovaného protokolu pro TRIzol (MRC). Podrobný postup izolace RNA:

- Vzorky včel homogenizovat v třecí misce s kapalným dusíkem. Měkké tkáně musí být kompletně rozdrceny.
- Ke 100 mg homogenátu přidat 1 ml roztoku TRI Reagent předehřátého na 60°C, zvortexovat.
- Inkubovat 5 minut v pokojové teplotě, přidat 200 µl chloroformu, řádně promíchat po dobu 15 s.
- Inkubovat při pokojové teplotě 3 minuty.
- Centrifugovat při 14 000 rpm / 15 minut, při 4°C.
- Odebrat horní vodnou fázi do nové zkumavky a přidat 500 µl isopropanolu, několikrát převrátit (promíchat).
- Inkubovat 10 minut v pokojové teplotě.
- Centrifugovat při 14 000 rpm / 10 minut, při 4°C.
- Odstranit supernatant a přidat 1 ml 75% etanolu, zvortexovat.

- Centrifugovat při 14 000 rpm / 5 minut, při 4°C.
- Odstranit supernatant a vysušit pelet při pokojové teplotě.
- Rozpustit ve 100 µl DEPC vody při 60°C 10 minut, přidat inhibitor RNáz, skladovat při -80°C.

- Získanou RNA je dále potřeba přečistit a zbavit zbytkové DNA (např. pomocí komerčního kitu Ambion's DNA-freeTMKit podle doporučení výrobce). Vzorky RNA jsou uchovávány v hlubokomrazicím boxu při teplotě -80°C.

Při provádění expresních analýz se klade důraz na čistotu a stejnou koncentraci RNA u všech analyzovaných vzorků. Pomocí spektrofotometru Biospec Nano (Shimadzu) je na základě absorbance při 260nm (OD260) stanovena koncentrace a zároveň je odvozena i kvalita (OD260/280 a OD260/230) získané RNA, která je následně naředěna na jednotnou koncentraci 100 ng/µl.

Syntéza cDNA probíhá pomocí komerčního kitu Standart Reverse Transcription System (Promega) postupem doporučeným výrobcem s použitím oligo(dT)15 primeru a cDNA je skladována při -20°C.

RT-qPCR - Kvantitativní PCR (qPCR) a vyhodnocení míry genové exprese:

Primery pro studované geny jsou navrhovány v programu Primer 3 (Whitehead Institute for Biomedical Research) a Geneious (Biomatters ApS). Jejich specificita je dále testována pomocí programu Geneious (Biomatters ApS) a Vector NTI (Thermo Fisher Scientific) a BLAST (NCBI). Sekvence primerů použitých pro RT-qPCR jsou uvedeny v tabulce 1. Primery jsou naředěny na jednotnou koncentraci 100 pmol/µl.

RT-qPCR je založena na konceptu Ct hodnoty (Ct = *cycle of treshold*, cyklus prahu). Ct hodnota odpovídá cyklu, kdy dochází k nárůstu fluorescence nad práh pozadí, které se v reakci vyskytuje. Číslo tohoto cyklu je zaznamenáno a dále využíváno jako Ct hodnota. V ideálním případě je účinnost PCR reakce 100% a rozdíl v koncentraci templátové DNA nanesené do reakce u srovnávaných vzorků lze vyhodnotit jako rozdíl v Ct hodnotách.

RT-qPCR je provedena s použitím master mixu Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) na přístroji QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems) v 96-jamkové destičce za podmínek doporučených výrobcem a to ve třech technických opakováních pro každý vzorek.

Pro určení míry genové exprese je pro účely této metodiky použita relativní kvantifikace. V tomto případě se zjišťují změny v množství mRNA (resp. cDNA) testovaného genu v porovnání s kontrolou (kalibrátor). Ct hodnoty amplifikační křivky cílového genu jsou pak normalizovány k Ct hodnotám referenčního genu, který má stálou úroveň genové exprese ve všech typech pozorovaných vzorků. Jako referenční gen je použit gen *Am_Rp49*.

Pro výpočet relativní kvantifikace je použita komparativní metoda delta-delta ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) bez korekce efektivity (Livak, Schmittgen, 2001). Metoda delta-delta předpokládá, že cílový a referenční gen jsou amplifikovány se stejnou či podobnou efektivitou, blízkou 100 %.

Nejdříve je potřeba normalizovat Ct testovaného genu ke genu referenčnímu, což platí pro vzorek i pro kalibrátor, a to podle následujícího vzorce:

$$\Delta Ct (\text{vzorek}) = Ct (\text{cílový gen}) - Ct (\text{referenční gen})$$

$$\Delta Ct (\text{kalibrátor}) = Ct (\text{cílový gen}) - Ct (\text{referenční gen})$$

Poté se normalizuje ΔCt testovaného genu k ΔCt kalibrátoru podle vzorce:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{vzorek}) - \Delta Ct (\text{kalibrátor})$$

Posledním krokem je výpočet normalizovaného expresního poměru:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{normalizovaný expresní poměr}$$

Výsledkem je poměr cílového genu testovaného vzorku a kalibrátoru (kontroly), normalizovaného k expresi referenčního genu. Tato hodnota určuje relativní množství cílové molekuly v porovnání s kalibrátorem (kontrolou) a vyjadřuje kolikrát je exprese studovaného genu v analyzovaném vzorku (variantě) vyšší než v kontrole.

Tabulka 1: Sekvence primerů použitých pro RT-qPCR.

Gen	Sekvence primeru 5'-3'	Reference
Geny pro cytochromy:		
CYP9Q1	F: TCGAGAAGTTTTCCACCG R: CTCTTTCCTCCTCGATTG	Mao et al. 2011
CYP9Q2	F: GATTATCGCCTATTATTACTG R: GTTCTCCTTCCCTCTGAT	Mao et al. 2011
CYP9Q3	F: GTTCCGGGAAAATGACTAC R: GGTCAAAATGGTGGTGAC	Mao et al. 2011
CYP4G11	F: AATGCGAGAAGTGTCGTCGA R: AGCGGTTTCCAGAAGGATGT	Calla et al. 2018
Referenční gen:		
Ribosomal protein 49 Am_Rp49	F: CGTCATATGTTGCCAACTGGT R: TTGAGCACGTTCAACAATGG	Tesovnik et al. 2017

Složení qPCR reakce:

- 2x Power SYBR® Green PCR Master Mix
- 1 µM forward a reverse primeru
- 100 ng cDNA

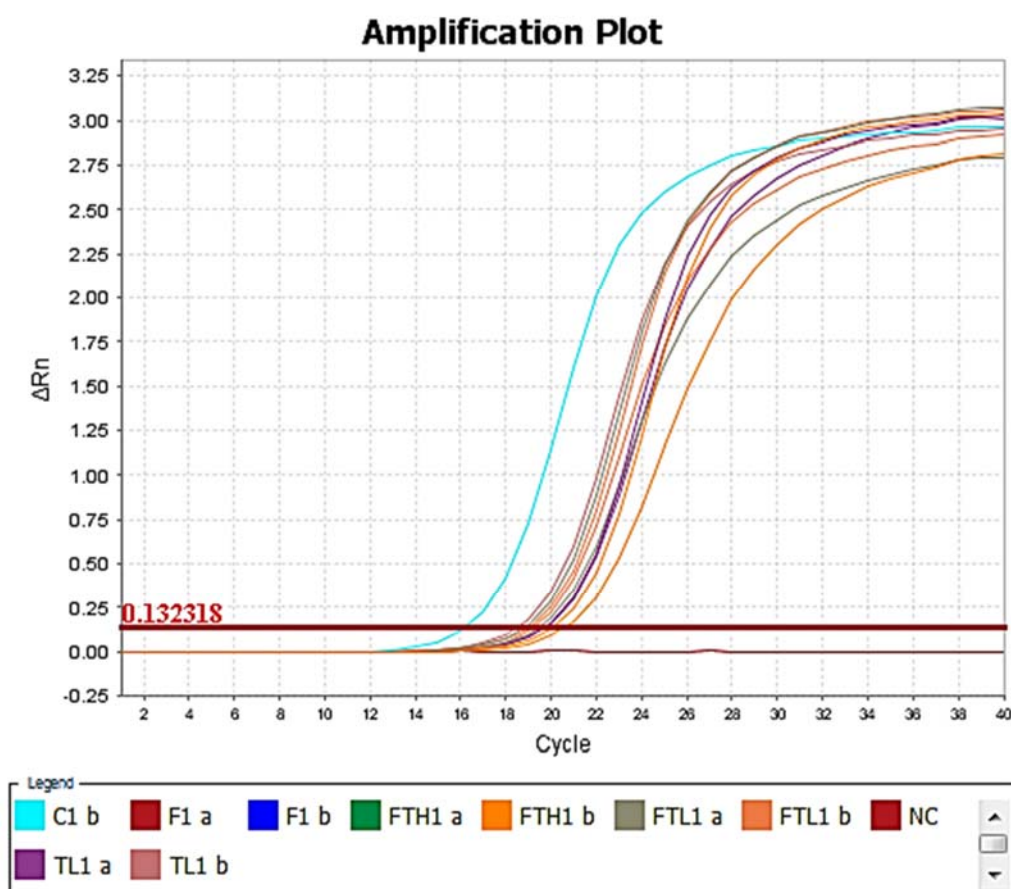
Schéma pipetování:

- 5 µl Master Mix
- 2 µl PCR vody
- 1 µl každého primeru
- 1 µl cDNA (100 ng/µl)

Teplotní profil reakce:

- počáteční denaturace 10 min 95°C
- 40 cyklů:
 - 15 s 95°C
 - 1 min 60°C

Příklady výstupů RT-PCR analýzy:



Obr. 1: Amplifikační křivka genu pro CYP9Q1.

Experimentální skupiny včel v klíčkovém experimentu kmené cukerným roztokem a cukerným roztokem s aditivou:

C1 – cukerný roztok;

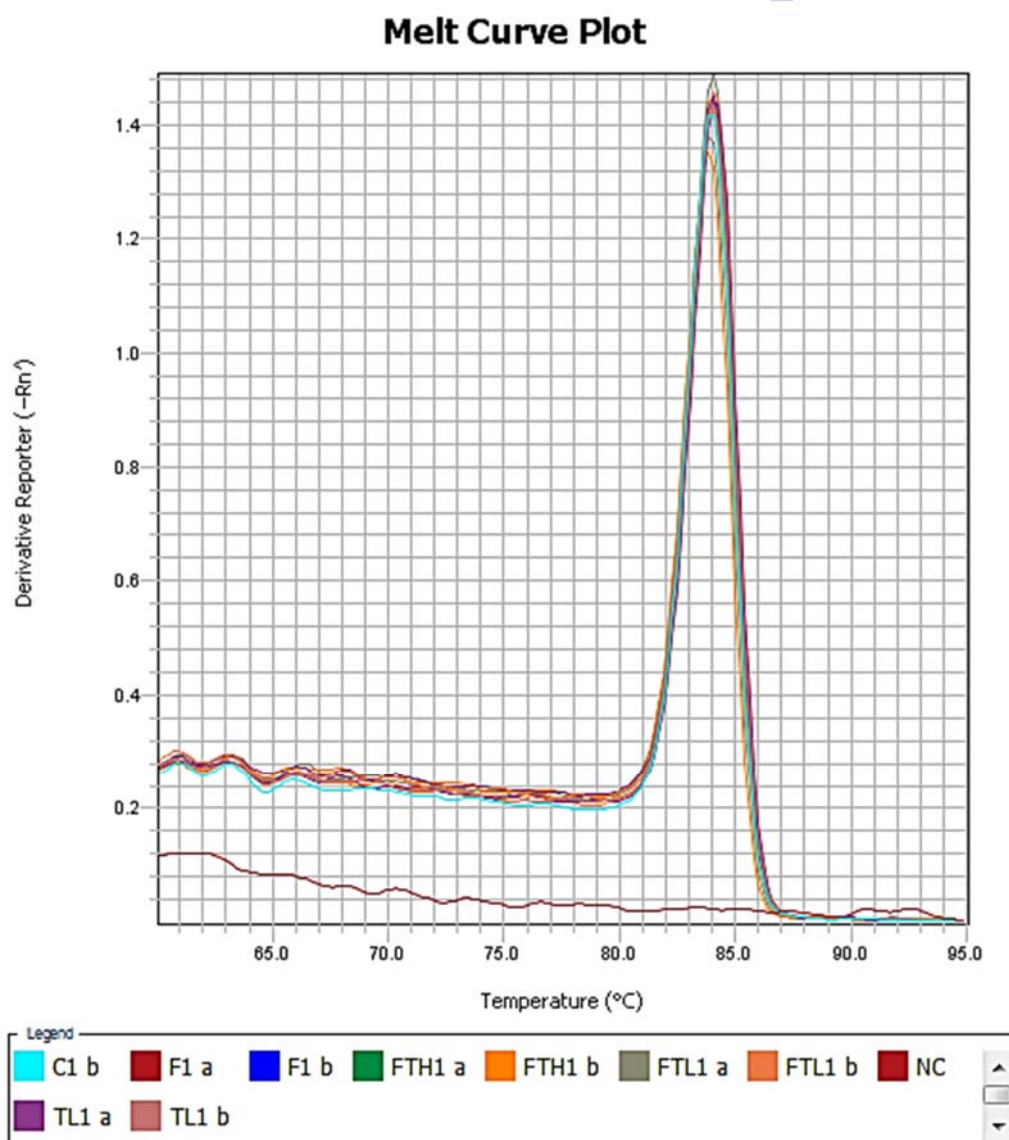
F1 – cukerný roztok + imunostimulační látky;

FTH – cukerný roztok + vysoká dávka thiaclopridu + imunostimulační látky;

FTL – cukerný roztok + nízká dávka thiaclopridu + imunostimulační látky;

TL – cukerný roztok + nízká dávka thiaclopridu.

NC – negativní kontrola.



Obr. 2: Křivka tání produktu amplifikace genu CYP9Q1.

Experimentální skupiny včel v klíčkovém experimentu krmené cukerným roztokem a cukerným roztokem s aditivy:

C1 – cukerný roztok;

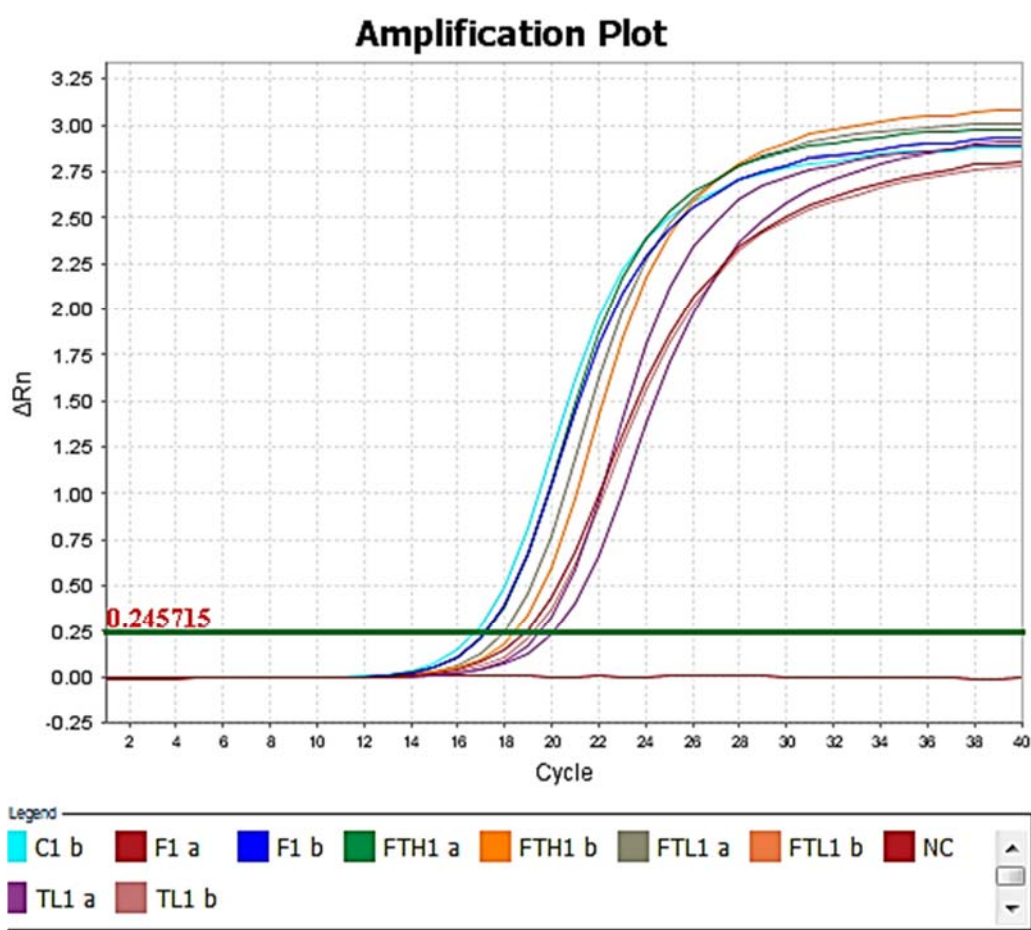
F1 – cukerný roztok + imunostimulační látky;

FTH – cukerný roztok + vysoká dávka thiaclopridu + imunostimulační látky;

FTL – cukerný roztok + nízká dávka thiaclopridu + imunostimulační látky;

TL – cukerný roztok + nízká dávka thiaclopridu.

NC – negativní kontrola.



Obr. 3: Amplifikační křivka genu pro CYP9Q2.

Experimentální skupiny včel v klíčkovém experimentu krmené cukerným roztokem a cukerným roztokem s aditivy:

C1 – cukerný roztok;

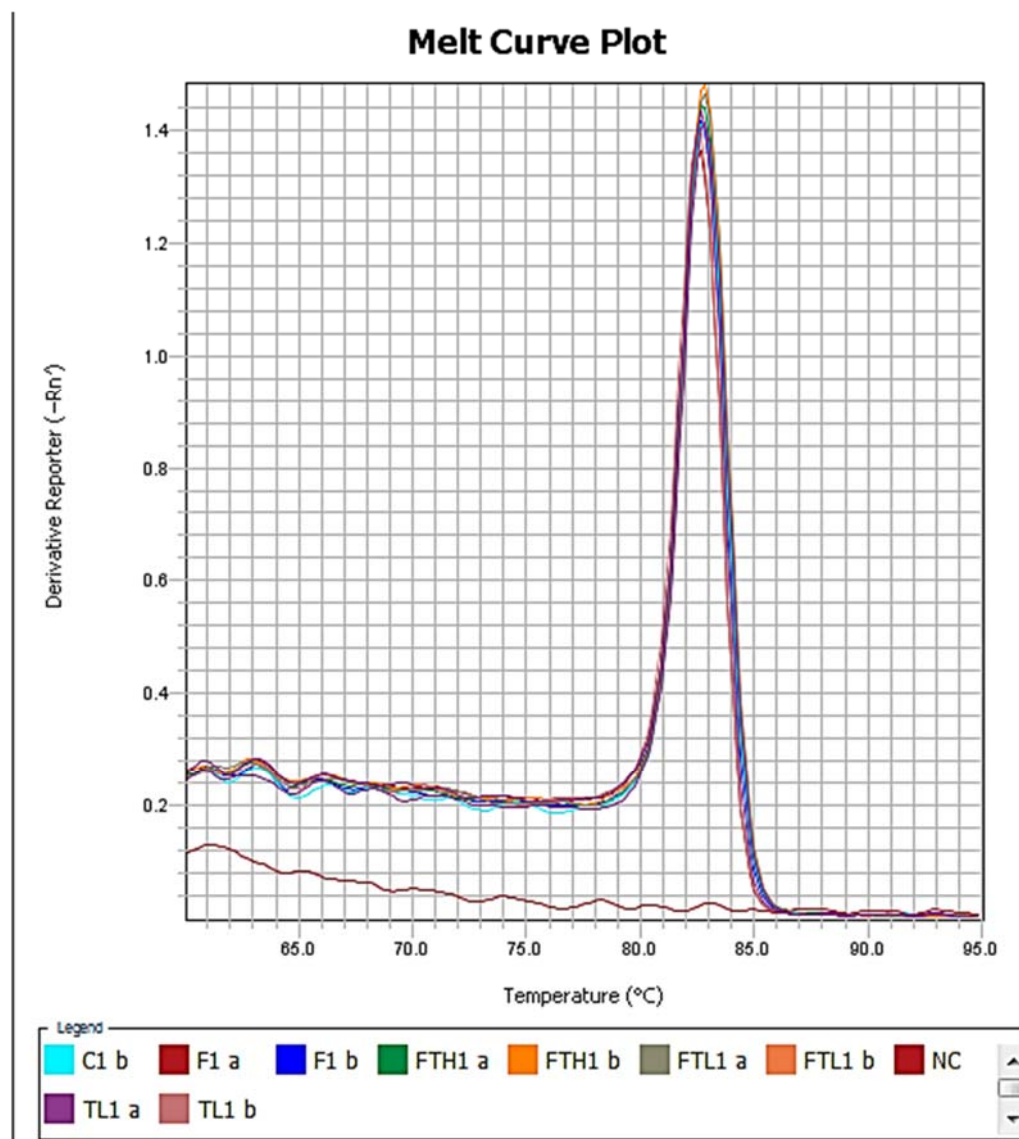
F1 – cukerný roztok + imunostimulační látky;

FTH – cukerný roztok + vysoká dávka thiaclopridu + imunostimulační látky;

FTL – cukerný roztok + nízká dávka thiaclopridu + imunostimulační látky;

TL – cukerný roztok + nízká dávka thiaclopridu.

NC – negativní kontrola.



Obr. 4: Křivka tání produktu amplifikace genu CYP9Q2.

Experimentální skupiny včel v klíčkovém experimentu kmené cukerným roztokem a cukerným roztokem s aditivou:

C1 – cukerný roztok;

F1 – cukerný roztok + imunostimulační látky;

FTH – cukerný roztok + vysoká dávka thiaclopridu + imunostimulační látky;

FTL – cukerný roztok + nízká dávka thiaclopridu + imunostimulační látky;

TL – cukerný roztok + nízká dávka thiaclopridu.

NC – negativní kontrola.

Použité přístroje a pomůcky:

- chladicí box a termoska na kapalný dusík
- hlubokomrazicí box -80°C
- porcelánová třecí miska
- centrifuga s možností chlazení
- centrifuga na PCR destičky
- sada automatických pipet
- vortex
- třepací termoblok
- termostat
- analytické váhy
- pH metr
- mrazák -20°C
- digestoř
- nanospektrofotometr
- optické PCR destičky a krycí fólie
- Real-time PCR termocykler

Chemikálie:

- kapalný dusík
- TRI reagent
- chloroform
- isopropanol
- ethanol 75%
- DEPC voda
- inhibitor RNáz
- kit na purifikaci RNA
- kit na odstranění DNA ze vzorku RNA
- kit pro syntézu cDNA
- master mix pro RT-PCR s interkalačním barvivem (SYBR® Green)
- primery
- PCR voda

Srovnání novosti postupů

Předkládanou metodiku s názvem “Metodický postup detekce exprese specifických genů významných pro detoxifikaci xenobiotických látek u včel” lze hodnotit jako novou metodiku, neboť v současné době není k dispozici ucelená metodika pro hodnocení míry genové exprese u genů pro cytochromy P450 u včel. Dosud dostupné informace jsou jen dílčí a rozptýlené ve vědeckých publikacích a monografiích, které se zabývají problematikou studia genomu včely a funkcí detoxikačních enzymů včel (např. Mao et al. 2011; Berenbaum a Johnson 2015; Gong a Diao 2017; Liao et al. 2017). Komplexní metodický postup k dispozici není.

Analýza genové exprese je moderní metodický přístup umožňující studium funkce studovaných genů v závislosti na vnějším podmětu/stresu a tento přístup má na jedné straně obrovský potenciál využití, avšak na straně druhé i své limity. Potenciál využití lze právě spatřovat v možnosti velmi precizního studia aktivity studovaných genů v různých podmínkách. Limity pak představuje náročnost techniky a značné požadavky na přístrojové vybavení, design a organizaci experimentu, dodržení všech metodických postupů a i zkušenost s vlastním provedením RT-qPCR analýzy a jejím vyhodnocením.

Předkládaná metodika pak popisuje všechny kroky analýzy od odběru vzorku, přes izolaci RNA po vlastní RT-qPCR analýzu tak, aby bylo dosaženo optimálního výsledku.

Popis uplatnění metodiky

Využití metodiky pro detekci exprese specifických genů významných pro detoxifikaci xenobiotických látek u včel je možné v laboratořích, které se zabývají molekulárně-biologickými analýzami. Metodika v první části zahrnuje teoretický úvod do problematiky. V praktické části jsou uvedeny přesné protokoly od přípravy odběru materiálu, izolaci RNA po vlastní provedení RT-qPCR analýzy a vyhodnocení genové exprese.

Tato metodika byla vyvinuta a optimalizována pro přesnou a spolehlivou detekci genové exprese cytochromů P450 u včel. Optimalizovány byly metody pro analýzu 4 včelích cytochromů. A i když jsou techniky molekulární biologie, zejména molekulární markerování či molekulární diagnostika již poměrně frekventovaně používané, analýza genové exprese je pořád technikou využívanou pro výzkumné

účely. Tato metodika pak může umožnit přenos znalostí a postupů z akademických pracovišť do běžného provozu diagnostických laboratoří.

Uživatelé metodiky jsou výzkumná pracoviště, diagnostické molekulární laboratoře, které mohou dle svých laboratorních možností využít analýzy genové exprese pro rozšíření portfolia svých postupů a služeb. Metodika bude uplatněna prostřednictvím biotechnologické firmy OncoRa s.r.o. S tímto subjektem byla uzavřena smlouva o uplatnění metodiky.

Ekonomické aspekty

Molekulární analýzy popisované v této metodice mají značný ekonomický význam z pohledu významu včel jako opylovatelů a producenta včelích produktů. Nedokonalá či absentující schopnost detoxifikace xenobiotik se projevuje i jejich vyšší toxicitou vedoucí k oslabení či úhynu včelstva. Tato problematika je samozřejmě daleko komplexnější, významným faktorem je pestrá výživa včel, stresory působící na včelstva, nenarušený střevní mikrobiom a přítomnost prospěšných mikroorganismů v přirozeném prostředí včel a potravě.

Pomocí tohoto metodického postupu lze objektivně vyhodnotit aktivitu detoxifikačních enzymů a predikovat vliv xenobiotik na včelstvo. Pro provedení analýz je potřebné disponovat vybavenou molekulárně-biologickou laboratoří, kde klíčovým přístrojovým vybavením je real-time termocykler. Náklady na analýzu pak představují kity pro izolaci, purifikaci RNA a přepis RNA na cDNA. Pro vlastní RT-qPCR analýzu jsou potřebné primery a master mix s interkalačním barvivem. Typová cena analýzy je pak na úrovni 1000 Kč. K této ceně je nutné započítat náklady na pořízení přístrojového vybavení, odpisy a energie. Pro molekulárně biologickou laboratoř uvedený metodický postup může znamenat zajímavé rozšíření portfolia nabízených služeb a ekonomický přínos v podobě zisku z prováděných analýz. V širším kontextu pak monitoring schopnosti detoxifikovat xenobiotika může vést k poukázání na stresory působící na včelstva, jejich eliminaci či omezení negativního vlivu a vitální včelstva pak mohou poskytovat své nedocenitelné ekosystémové služby.

Seznam publikací předcházející metodice

Hýbl M., Mráz P., Šipoš J., Hoštičková I., Bohatá A., Čurn V., Kopec T. (2021): Polyphenols as Food Supplement Improved Food Consumption and Longevity of Honey Bees (*Apis mellifera*) Intoxicated by Pesticide Thiacloprid. *Insects* 12: 572.

Seznam použité literatury

Berenbaum M.R., Johnson R.M. (2015): Xenobiotic detoxification pathways in honey bees. *Curr Opin Insect Sci* 10: 51–58.

Brodschneider R., Crailsheim K. (2010): Nutrition and health in honey bees. *Apidologie* 41: 278–294.

Calla B, MacLean M., Liao L., Dhanjal I., Tittiger C., Blomquist G.J., Berenbaum M.R. (2018): Functional Characterization of CYP4G11—a Highly Conserved Enzyme in the Western Honey Bee *Apis mellifera*. *Insect Mol Biol* 27: 661–674.

Claudianos C., Ranson H., Johnson R.M. (2006): A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Mol Biol* 15: 615–636.

Evans J.D., Lopez D.L. (2004): Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology* 97: 752–756.

Evans E., Smart M., Cariveau D., Spivak M. (2018): Wild, native bees and managed honey bees benefit from similar agricultural land uses. *Agric Ecosyst Environ* 268: 162–170.

Foley K., Fazio G., Jensen A.B., Hughes W.O.H. (2014): The distribution of *Aspergillus* spp. opportunistic parasites in hives and their pathogenicity to honey bees. *Vet Microbiol* 169: 203–210.

Gong Y., Diao Q. (2017): Current knowledge of detoxification mechanisms of xenobiotic in honey bees. *Ecotoxicology* 26: 1–12.

Johnson R.M., Mao W., Pollock H.S., Niu G., Schuler M.A., May R. (2012): Ecologically Appropriate Xenobiotics Induce Cytochrome P450s in *Apis mellifera*. *PLoS One* 7: 1–9.

Kakumanu M.L., Reeves A.M., Anderson T.D., Rodrigues R.R., Williams M.A. (2016): Honey bee gut microbiome is altered by in-hive pesticide exposures. *Front Microbiol* 7: 1–11.

Kwong W.K., Mancenido A.L., Moran N.A. (2017): Immune system stimulation by the native gut microbiota of honey bees. *R. Soc. Open Sci* 4: 1–9.

- Liao L.-H., Wu W.-Y., Berenbaum M.R. (2017): Impacts of dietary phytochemicals in the presence and absence of pesticides on longevity of honey bees (*Apis mellifera*). *Insects* 8: 1–13.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001): Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25: 402–408.
- Mao W., Schuler M.A., Berenbaum M.R. (2011): CYP9Q-Mediated Detoxification of Acaricides in the Honey Bee (*Apis mellifera*). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108: 12657–12662.
- Mao W., Schuler M.A., Berenbaum M.R. (2013): Honey constituents up-regulate detoxification and immunity genes in the western honey bee *Apis mellifera*. *Proc Natl Acad Sci* 110: 8842–8846.
- Mao W., Schuler M.A., Berenbaum M.R. (2015): Task-related differential expression of four cytochrome P450 genes in honeybee appendages. *Insect Mol Biol* 24: 582–588.
- Mao W., Schuler M.A., Berenbaum M.R. (2017): Disruption of quercetin metabolism by fungicide affects energy production in honey bees (*Apis mellifera*). *PNAS* 114: 2538–2543.
- McMenamin A.J. (2018): Honey Bee and Bumble Bee Antiviral Defense. *Viruses* 10: 395.
- Michener C.D. (2013): The Meliponini. In: Vit, P., Pedro, S. R. M., Roubik, D. (Eds.), *Pot-Honey: A legacy of stingless bees*, Springer, New York, pp. 3–17.
- Niu G., Johnson R.M., Berenbaum M.R. (2011): Toxicity of mycotoxins to honeybees and its amelioration by propolis. *Apidologie* 42: 79–87.
- Paludo C.R., Menezes C., Silva-Junior E.A. (2018): Stingless Bee Larvae Require Fungal Steroid to Pupate. *Sci Rep* 8: 1122.
- Potts S.G., Biesmeijer J.C., Kremen C. (2010): Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. *Trends Ecol Evol* 25: 345–353.
- Prado A., Pioz M., Vidau C. (2019): Exposure to pollen-bound pesticide mixtures induces longer-lived but less efficient honey bees. *Sci Total Environ* 650: 1250–1260.
- Sanchez-Bayo F., Goka K. (2016): Impacts of pesticides on honey bees impacts of pesticides on honey bees. In: *Beekeeping and bee conservation - advances in research*. London: IntechOpen pp. 77–97.
- Scott J.G. (2008): Insect cytochrome P450s: Thinking beyond detoxification. In: *Recent advances in insect physiology, toxicology and molecular biology*. Kerala: Research Signpost, pp. 117–124.
- Scott J.G., Liu N., Wen Z. (1998): Insect cytochromes P450: diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins. *Comp Biochem Physiol Part C* 121: 147–155.

- Steinhauer N., Kulhanek K., Antúnez K. (2018): Drivers of colony losses. *Curr Opin Insect Sci* 26: 1–7.
- Tesovnik T., Cizelj I., Zorc M., Čitar M., Božič J., Glavan G. (2017): Immune related gene expression in worker honey bee (*Apis mellifera carnica*) pupae exposed to neonicotinoid thiamethoxam and *Varroa* mites (*Varroa destructor*). *PLoS One* 12: e0187079.
- Vannette R.L., Mohamed A., Johnson B.R. (2015): Forager bees (*Apis mellifera*) highly express immune and detoxification genes in tissues associated with nectar processing. *Sci Rep* 5: 16224.
- Vásquez A., Forsgren E., Fries I., Paxton R.J., Flaberg E., Szekely L., Olofsson T.C. (2012): Symbionts as major modulators of insect health: Lactic acid bacteria and honeybees. *PLoS One* 7: e33188.
- Wink M. (2018): Plant secondary metabolites modulate insect behavior-steps toward addiction? *Front Physiol* 9: 1–9.
- Yoder J.A., Jajack A.J., Rosselot A.E., Smith T.J., Yerke, M.C., Sammataro D. (2013): Fungicide contamination reduces beneficial fungi in bee bread based on an area-wide field study in honey bee, *Apis mellifera*, colonies. *J Toxicol Environ Heal Part A* 76: 587–600.

Název: Čurn V. a kol. (2021): Metodický postup detekce exprese specifických genů významných pro detoxifikaci xenobiotických látek u včel

Autorský kolektiv: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
Ing. Irena Hoštičková, Ph.D.
Ing. Petr Mráz
Ing. Kateřina Vočadlová
Ing. Dagmar Stehlíková, Ph.D.
Ing. Karel Beneš, Ph.D.
doc. Ing. Michael Rost, Ph.D.

Vydal: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta
Studentská 1668
370 05 České Budějovice

Vydáno bez jazykové úpravy

Metodika je dostupná na:
http://biocentrum.zf.jcu.cz/docs/lab/Methodiky-metodika_v-4cadad1f20.pdf

Metodika byla schválena Ministerstvem zemědělství ČR, dopisem ze dne 21.02.2022 (č.j. MZE-2727/2022-13132), jako certifikovaná metodika s doporučením pro její využití v zemědělské praxi.

Kontakt na autory: curn@zf.jcu.cz

ISBN: 978-80-7394-894-8

