

Jan Hubert a kol.

**Certifikovaná metodika pro hodnocení
rezistence roztoče *Varroa destructor* vůči
tau-fluvalinátu**



Uplatněná certifikovaná metodika vznikla za finanční podpory MZe ČR a je výstupem řešení projektu Management zamezující šíření rezistence roztoče *Varroa destructor* k akaricidním přípravkům (projekt MZe – KUS QJ1530148)

Metodika je určena pro státní správu. Metodice bylo uděleno osvědčení Státní veterinární správy č. SVS/2018/068686-G. O uplatnění metodiky byla dne 5. 6. 2018 uzavřena smlouva podle ustanovení § 269 zákona č. 513/1991 Sb., obchodního zákoníku.

Odborný oponent:

Ing. Rostislav Zemek, CSc., Biologické centrum AV ČR, České Budějovice

Oponent ze státní správy:

MVDr. Kateřina Beranová, Ústřední veterinární správa Státní veterinární správy, Praha 2

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., 2018

ISBN 978-80-7427-280-6

Název: Certifikovaná metodika pro hodnocení rezistence roztoče
Varroa destructor vůči *tau*-fluvalinátu

Autoři metodiky: doc. Mgr. Jan Hubert, Ph.D.¹
Ing. Marta Nesvorná¹
Ing. Ivo Doskočil, Ph.D.²
MVDr. Martin Kamler^{2,3}
Ing. Jitka Stará, Ph.D.¹

Afiliace:

¹ Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Drnovská 507/73, Praha 6-Ruzyně,
CZ-161 06

² Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie potravinových a
přírodních zdrojů, Kamýcká 129, Praha 6-Suchbát, CZ-165 00

³ Výzkumný ústav včelařský, s. r. o., Máslovice-Dol 94, p. Libčice nad Vltavou,
CZ-252 66

Certifikovaná metodika pro hodnocení rezistence roztoče *Varroa destructor* vůči tau-fluvalinátu

Metodika je zpracována pro potřeby Státní veterinární správy k tlumení varroázy. Metodika je zaměřena na problematiku týkající se identifikace rezistence roztoče *Varroa destructor* vůči akaricidní látce tau-fluvalinát. Metodika přináší dva postupy pro stanovení citlivosti roztočů vůči tau-fluvalinátu, které lze používat společně nebo jednotlivě. Stanovení citlivosti roztočů vůči tau-fluvalinátu pomocí lahvičkového testu využívá diskriminační koncentrace tau-fluvalinátu aplikované na vnitřní povrch lahvičky. Roztoči, kteří jsou rezistentní, přežijí, zatímco citliví jedinci uhynou během 24 hodinové inkubace v těchto lahvičkách. Lahvičkový test je využitelný pro vyškolené včelaře. Stanovení citlivosti vůči tau-fluvalinátu pomocí identifikace L925V mutace využívá PCR amplifikace genu kódující sodný kanál roztoče a následné restriční analýzy fragmentu genu (PCR–RFLP). Identifikace pomocí PCR–RFLP rozpozná citlivé a rezistentní roztoče a smíšené populace roztočů. Tato metoda je využitelná jak pro roztoče získané ze zimní měli, tak pro roztoče odchycené přímo ve včelstvech. Je možné ji využít i pro roztoče z lahvičkových testů. Tato metoda je vhodná pro pracovníky laboratoří státní správy nebo laboratoří vybavených pro postupy molekulární biologie. Aplikací postupů v této metodice lze předejít zbytečné aplikaci tau-fluvalinátu ve včelstvech s rezistentními roztoči a tím zbytečnému zatěžování včelstev dávkami akaricidních látek.

Certified technological procedure of detection of *Varroa destructor* resistance to *tau*-fluvalinate

The certified technological procedure was developed for the State Veterinary Administration of the Czech Republic to reduce varroosis. The procedure enables to identify resistance of *Varroa destructor* to *tau*-fluvalinate (acaricide) and its application is beneficial to reduce spreading of resistant mites. Two detection tools were developed. (i) The vial test is based on the application of discrimination concentration of *tau*-fluvalinate into the vials. The sensitive mites die and resistant survived during 24 hours of the incubation in the vials. The vial test is suitable for beekeepers. (ii) The identification of L925V mutation in sodium channel gene of *Varroa destructor* by PCR amplification and restriction fragment length polymorphism (PCR–RFLP) is method to distinguish between sensitive, resistant and mixed populations of mites. PCR–RFLP method is suitable to identify the resistance in the samples of mites from winter bee wax debris, directly collected mites and mites from the vial test. This method needs equipment of molecular biology and is suitable for laboratories of veterinary inspection. The both methods were developed to eliminate the application of *tau*-fluvalinate to beehives with resistant mites.

Obsah

1. CÍL METODIKY.....	6
2. VLASTNÍ POPIS METODIKY	
2.1 Invazní druh <i>Varroa destructor</i>	7
2.2 Dostupné akaricidní látky pro tlumení varroózy	8
2.3 Mechanismy a výskyt rezistence <i>Varroa destructor</i> vůči akaricidním látkám.....	11
2.4. Rezistence roztoče <i>Varroa destructor</i> vůči tau-fluvalinátu	12
2.5. Detekce rezistence u roztoče <i>Varroa destructor</i>	16
2.6. Postup stanovení rezistence roztoče <i>Varroa destructor</i> s použitím lahvičkové metody pomocí detekčního setu.....	19
2.7. Postup stanovení rezistence roztoče <i>Varroa destructor</i> s použitím amplifikace fragmentu genu kódující sodný kanál a následné restrikční analýzy (PCR–RFLP).....	22
2.8. Kombinace lahvičkové metody a PCR–RFLP.....	24
3. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ.....	26
4. EKONOMICKÉ ASPEKTY.....	27
5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	28
6. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE.....	30

1. CÍL METODIKY

Včelstva včely medonosné (*Apis mellifera*) jsou masivně parazitována invazním roztočem *Varroa destructor*. Eliminace parazitace je obtížná, neboť použití akaricidních prostředků je velmi omezené. Jako funkční prostředky se používají ty, které nejsou toxické pro včelu, ale dokáží usmrtit roztoče, např. *tau*-fluvalinát, amitraz, flumetrin a organické kyseliny. Intenzivní používání akaricidních přípravků vede ke vzniku rezistence v některých populacích *V. destructor* především vůči *tau*-fluvalinátu, ale objevuje se i rezistence vůči amitrazu. Pokud není rezistence u roztočů včas prokázána, dochází k neúčelným a opakovaným aplikacím akaricidů, které nevedou k redukci populací roztočů, ale jen zesilují selekční tlak na další rozvoj rezistence.

Rezistence je schopnost roztoče překonat dávku akaricidu, která by pro něj měla být smrtelná. Jakmile se rezistence objeví, tak se pod tlakem akaricidních látek začne šířit v populaci, neboť selekční tlak akaricidní látky přežívají pouze rezistentní roztoči a ti rezistenci předávají na svoje potomstvo. Rezistence je spojená s mutacemi v genech kódujících cílové struktury, v tomto případě se jedná o záměnu aminokyseliny v genu kódující sodný kanál L925V. Tato rezistence se masivně šíří ve Spojených státech (USA) a v Evropě, Česko nevyjímaje.

Cílem této metodiky je poskytnout pracovníkům ve státní správě dvě testovací metody, které umožňují porovnat citlivost různých populací roztočů k *tau*-fluvalinátu. Popsané metody umožňují stanovovat rezistenci roztočů odebraných ze zimní měli, pro lahvičkový test je nutný přímý sběr roztočů. Použitím této metodiky je možné snížit rizika spojená s nevhodnou aplikací *tau*-fluvalinátu a tím zamezit šíření rezistence.

Přínos metodiky

- Aplikace nové metody využívající testování akaricidních látek v lahvičkovém testu, včetně stanovení diskriminačních koncentrací.
- Aplikace nové metody využívající detekci mutace L925V v genu kódujícím sodný kanál spojenou s rezistencí vůči *tau*-fluvalinátu.

2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

2.1. Invazní druh *Varroa destructor* (kleštík zhoubný)

Roztoč *Varroa destructor* (Anderson & Trueman 2000), česky kleštík zhoubný (Kůrka 2005) nebo kleštík včelí (Přidal 2006), je považován za největší hrozbu pro včelstva včely medonosné (*Apis mellifera*). *V. destructor* je relativně novým parazitem včely medonosné, k jeho celosvětovému rozšíření došlo v posledních 30 letech. Doposud mezi roztočem *V. destructor* a jeho hostitelem není ustálena rovnováha a včelaři nemají dlouhodobou zkušenost v boji s tímto parazitem. V podmínkách Česka napadená včelstva bez pravidelného ošetřování kolabují během 2 až 3 let. Ošetřování včelstev zvyšuje náklady spojené s včelařením a roste riziko výskytu reziduí aplikovaných látek ve včelích produktech. Parazitace včelstev roztoči je považována za hlavní faktor snižující počty včelstev jak v Evropě, tak i ve světě. Dochází k poklesu efektivních opylovačů, což může vést k významným problémům s opylováním zemědělských plodin (Rosenkranz et al. 2010).

V posledních letech je pozorován zvýšený úhyn včel a přesto, že se problému věnují rozsáhlé vědecké studie, tento dramatický úbytek nejdůležitějších opylovačů se nedaří zastavit. Se včelami je spojený nenahraditelný trh se včelími produkty, které se používají jako potravina nebo aditivum ve farmacii. Produkce medu dosahuje v Evropské unii (EU) tržní hodnoty okolo 140 milionů eur ročně. Mimo přímý ekonomický význam jsou včely klíčoví opylovači, na kterých závisí cca 35 % zemědělských produktů, které slouží pro výživu člověka. Odhad produkce zemědělských plodin závisející na opylovačích v zemích EU je 14,2 biliónů eur. Celosvětový odhad je 152 biliónů eur. Počet včelařů v EU je asi 700 tisíc, z nichž se většina věnuje včelaření jako koníčku, navíc je včelaření v řadě zemí součástí kulturního dědictví (Hubert et al. 2017b).

Tlumení roztočů v napadených včelstvech je obtížné z několika důvodů: (i) většina chemických přípravků je více toxická pro včely než pro roztoče, (ii) rezidua použitých akaricidních prostředků se dostávají do včelích produktů, (iii) roztoči si vyvinuli rezistenci na nejčastěji používané akaricidní látky (Colin et al. 1997; Elzen et al. 1999; Thompson et al. 2003). Řešením problematiky rezistence *V. destructor* se zabývá rozsáhlá vědecká a odborná komunita ve světě (Moritz et al. 2010). Jsou hledány nové „přírodní“ látky toxické pro roztoče, netoxické pro včelu a současně bez rizika výskytu reziduí. V případě nalezení nových účinných látek je však jejich uplatnění ztěžováno registračním procesem v EU, který je časově a finančně náročný. Další možností je šlechtění včel, které jsou více odolné vůči

roztočům (Büchler et al. 2010). Toto řešení však znamená nahradit včelstva, která v některých případech byla dlouhodobě šlechtěna pro řadu dalších užitečných vlastností (např. užitkovost a mírnost), včelstvy novými.

2.2. Dostupné akaricidní látky pro tlumení varroázy

Přehled akaricidních prostředků pro tlumení varroázy je uveden v tabulce č. 1. Místa působení vybraných akaricidních látek uvádí obrázek č. 1.

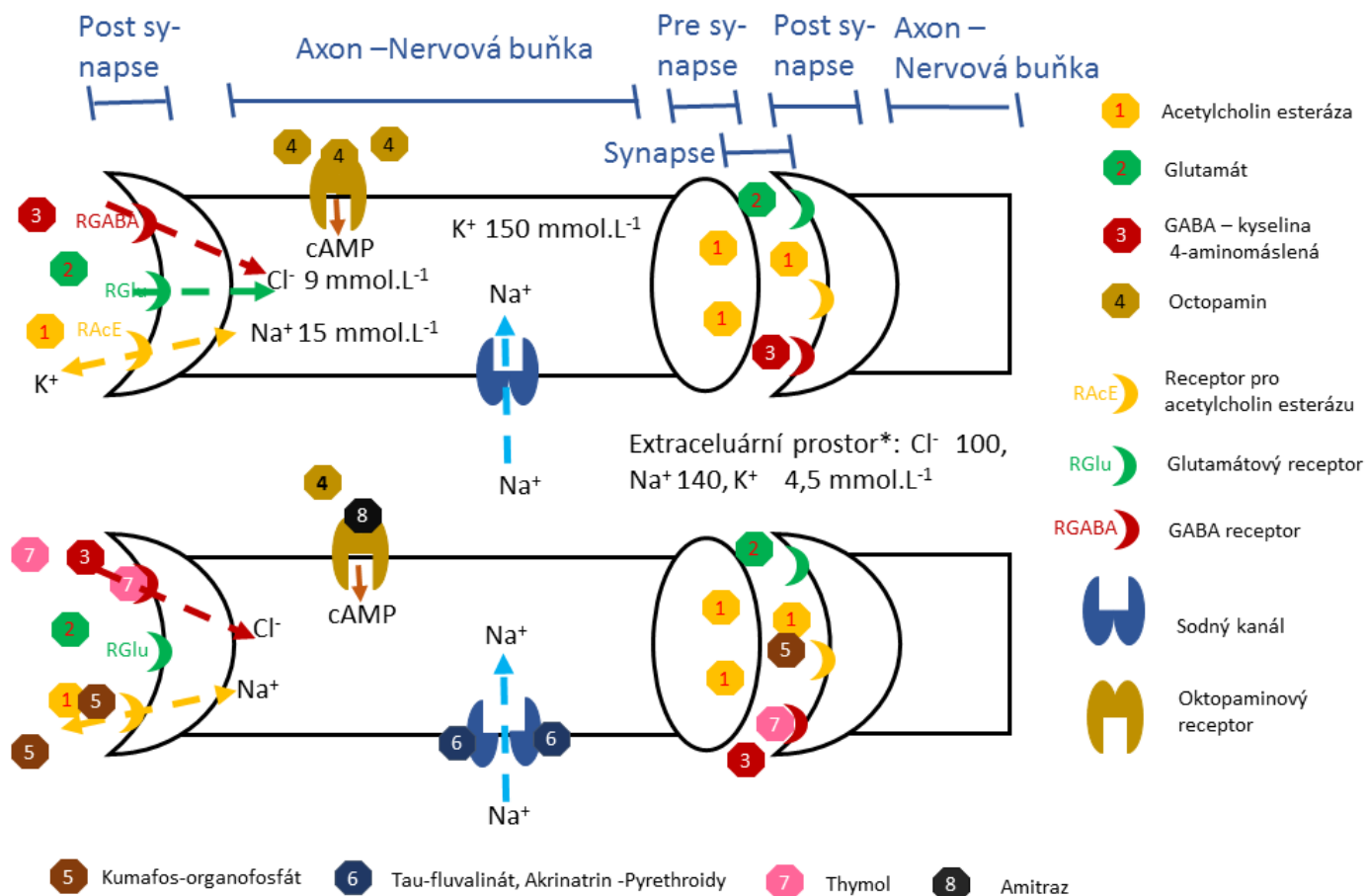
Tabulka č. 1. Seznam aktuálně registrovaných veterinárních léčivých přípravků pro včely (Hubert et al. 2017b).

název	účinná látka	obsah účinné látky	formulace
Apiguard	tymol	25 %	gel
Apitraz	amitraz	500 mg	proužek do úlu
Formidol	kyselina mravenčí	41 g	proužek do úlu
Formidol 81 g proužky do úlu	kyselina mravenčí	81 g	proužek do úlu
Gabon PF	<i>tau</i> -fluvalinát	90 mg	proužek do úlu
M-1 AER	<i>tau</i> -fluvalinát	240 mg/ml	koncentrát pro roztok k léčebnému ošetření včel
MP 10 FUM	<i>tau</i> -fluvalinát	24 mg/ml	fumigantní roztok do úlu
Oxuvar	kyselina šťavelová	41 mg/ml	koncentrát pro přípravu kožního roztoku
Thymovar, 15 g proužky do úlu pro včely	tymol	15,0 g	proužek do úlu
Varidol	amitraz		roztok k léčebnému ošetření včel
VarroMed	k. mravenčí + k. šťavelová	75 mg/ml + 660 mg/ml	disperze do úlu

Nejčastěji se používá syntetický pyretroid ***tau*-fluvalinát**. Jedná se o stabilní netěkavou látku rozpustnou v tucích. Místem působení *tau*-fluvalinátu je nervová soustava, respektive sodný kanál nervových buněk. *Tau*-fluvalinát se váže na membránový protein sodného kanálu a mění jeho konformaci, se změnou konformace se mění propustnost sodného kanálu a tím se znemožní přenos vzruchu nervovými buňkami (O'Reilly et al. 2014). *Tau*-fluvalinát je

mnohem méně jedovatý pro včelu než pro roztoče. Při povrchové aplikaci se hodnoty LD₅₀ pro včelu pohybovaly v rozsahu 1–188 µg na včelu (Santiago et al. 2000; Dahlgren et al. 2012), zatímco LD₅₀ pro roztoče byla 15 pg (Santiago et al. 2000).

Amitraz je formamidový akaricid a insekticid, který je nerozpustný ve vodě. Místem působení je nervová soustava, amitraz se váže na octopaminový receptor nervových buněk.



Obrázek č. 1. Nervová buňka roztoče *Varroa destructor* jako cíl pro aplikaci akaricidních látek. Organofosfát kumafos inhibuje enzym acetylcholinestrázu. Pyrethroidy tau-fluvalinát a akrinatrin se váží na sodný kanál a způsobují konformační změnu ovlivňující propustnost Na⁺ iontů. Bodová mutace v sodném kanálu vede k tomu, že se tyto pyrethroidy nedokáží navázat a způsobit konformační změnu. Thymol se váže na GABA receptor, který je za normálních podmínek modulován kyselinou gama-aminomáselnou. Thymol kompetuje s tímto neurotransmiterem. Amitraz se váže na oktopaminový receptor a mění produkci cAMP (Hubert et al. 2017b).

Tato vazba způsobuje přestimulování buněk a vede k paralýze až úhynu roztočů (Chen et al. 2007). Při povrchové aplikaci LD₅₀ na včelu dosahuje hodnot 3–27 µg na včelu (Santiago et al. 2000; Dahlgren et al. 2012), zatímco LD₅₀ pro roztoče je 2 pg na roztoče (Santiago et al. 2000). Na rozdíl od ostatních akaricidních prostředků dochází k aktivaci amitrazu hydrolyzou (Dahlgren et al. 2012).

Tymol je přírodní monoterpenový fenolový derivát cymenu, který je přítomný v silicích tymiánu obecného (*Thymus vulgaris*). Vyznačuje se aromatickou vůní a aseptickými vlastnostmi. Je součástí esenciálních olejů využívaných v kontrole hmyzu a roztočů. Místem působení tymolu je nervová soustava roztoče. Při přenosu nervového signálu se uplatňuje kanál, který reguluje Cl⁻ anionty. Tento kanál je spojen s tzv. GABA receptorem, na který se váže kyselina gama-aminomáselná (GABA). Tato kyselina působí jako inhibiční neurotransmitter. Tymol je pozitivní modulátor GABA receptoru, tím kompetuje s kyselinou gama-aminomáselnou a mění propustnost kanálu (García et al. 2006). Při povrchové aplikaci tymolu bylo zjištěno LD₅₀ 524 µg na včelu (Dahlgren et al. 2012). Rezidua tymolu v medu se pohybovala 0,12 do 8,8 mg na kg medu a 22–150 mg na kg vosku (Floris et al. 2004).

Jako méně rizikové akaricidní látky se v ochraně před varroázou používají organické kyseliny **kyselina mravenčí** a **kyselina šťavelová**. Nově se zavádí pyretroid **flumetrin** v přípravku Gabon Flum jako náhrada *tau*-fluvalinátu a akrinatrinu, dále je testován **rotenon** v přípravku Vaderis. Rezistence vůči organickým kyselinám není v odborné literatuře známá. Z Mexika existují případy výskytu rezistence vůči flumetrinu (Rodríguez-Dehaibes et al. 2005).

2.3. Mechanismy a výskyt rezistence *Varroa destructor* vůči akaricidním látkám

Rezistence je schopnost roztoče překonat dávku akaricidní látky, která by pro něj měla být smrtelná. Rezistence je spojená s mutacemi v genech kódujících cílové struktury, na které působí akaricidní látky, se změnami chování, atd. Jakmile se rezistence objeví, tak se pod tlakem akaricidních látek začne šířit v populaci roztočů, neboť selekční tlak akaricidní látky přežívají pouze rezistentní roztoči a ti rezistenci předávají na svoje potomstvo. V praxi se vznik rezistence projevuje tím, že ošetření včelstva je neúčinné, tedy i po ošetření jsou roztoči stále živí a aktivní. Jestliže vznikne u roztoče rezistence vůči jednomu nebo více přípravkům se stejnou účinnou látkou, lze očekávat, že se brzy objeví rezistence vůči dalším přípravkům s obdobnou účinnou látkou ze stejné skupiny (Kunz & Kemp 1994).

U roztoče *Varroa destructor*, mimo rezistence vůči *tau*-fluvalinátu, viz níže, byla prokázána rezistence vůči organofosfátu kumafos. Objevuje se však rezistence i vůči této látce, a to v Itálii, Švýcarsku a Chorvatsku (Martin 2004), ale i USA a Argentině (Johnson et al. 2010). Mechanismus rezistence u roztoče *Varroa* je nejasný, předpokládá se odbourávání a detoxikace pomocí esteráz (Johnson et al. 2010). U klíštěte *Boophilus microplus* rezistentního ke kumafosu byla prokázána zvýšená metabolická detoxifikace (Li et al. 2003).

Rezistence vůči amitrazu je hlášena z Evropy, USA a Argentiny. Na argentinských populacích roztoče *Varroa* bylo pomocí laboratorních testů prokázáno, že existují populace s 35-39x vyšší hodnotou LC_{50} než populace citlivé (Maggi et al. 2010). Mechanismus rezistence u *Varroa* není znám. U populací klíštěte *Boophilus (Rhipicephalus) microplus* rezistentních a citlivých vůči amitrazu byl klonován gen kódující oktopamínový receptor (*RmβAOR*). V genech citlivých a rezistentních populací klíšťat byly nalezeny rozdíly, což může indikovat existenci mutací tohoto genu u rezistentních populací roztočů (Chen et al. 2007). Pozdější studie prokázala, že s rostoucím selekčním tlakem amitrazu roste frekvence mutací v tomto genu a také rezistence vůči amitrazu (Corley et al. 2013). Rezistence vůči akaricidům ovlivňující komplex I v mitochondriích není u roztoče *V. destructor* známa, avšak existují bodové mutace proteinu podílející se na fosforylaci, které vedou k rezistenci (Van Leeuwen et al. 2010). Dosud nebyla zjištěna rezistence roztočů vůči aplikaci organických kyselin.

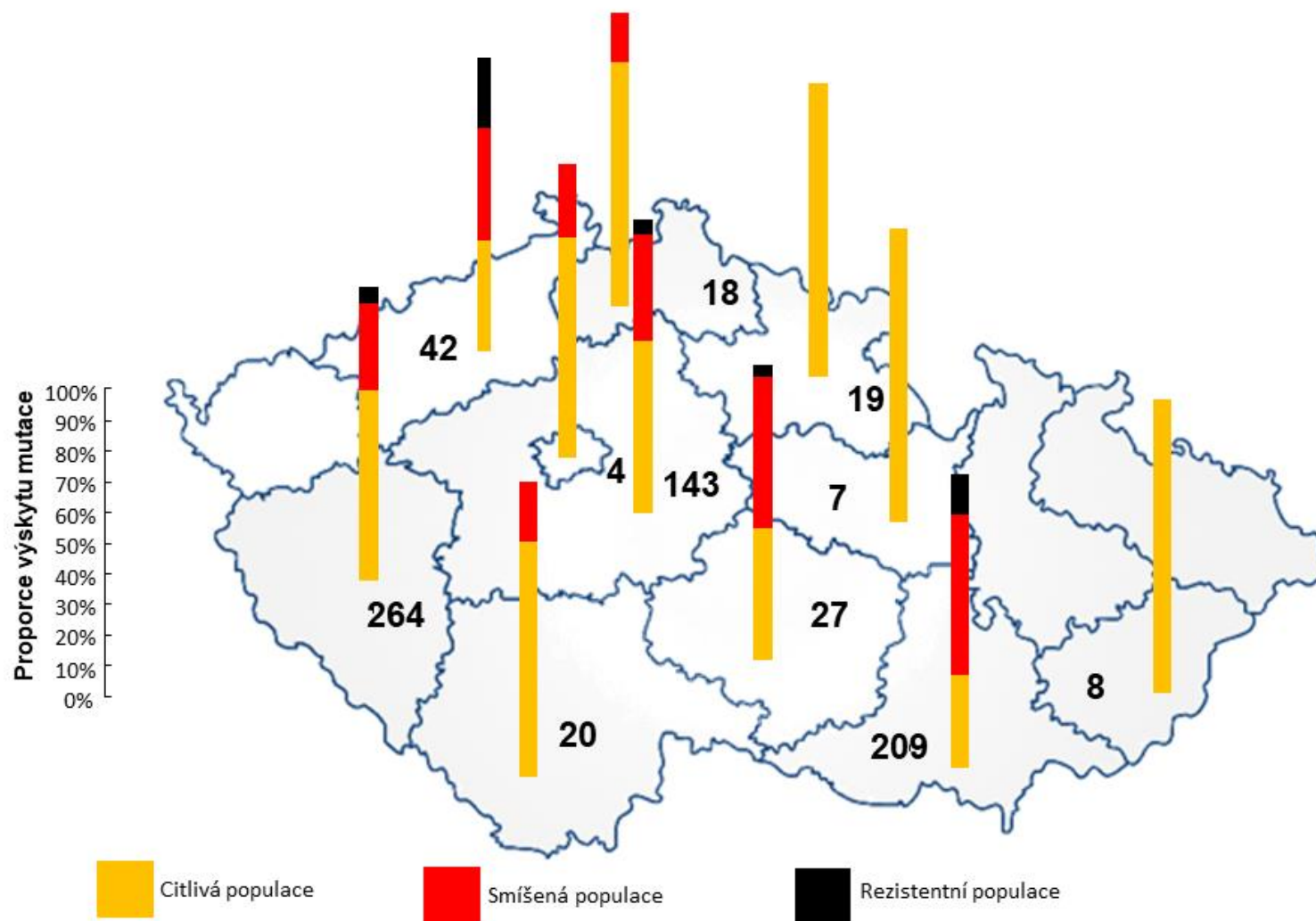
Rezistence je však často spojená s nižší fitness jedinců a tak může po skončení selekčního tlaku v populaci roztočů mizet, jako je tomu např. u rezistence roztočů vůči *tau*-fluvalinátu (González-Cabrera et al. 2018). Např. v Itálii začaly být rezistentní populace *V. destructor* opět částečně citlivé již po 2–5 letech (Milani & Della Vedova 2002). V laboratorních pokusech byla následně prokázána zvyšující se účinnost *tau*-fluvalinátu po zastavení ošetřování včelstev a již za jeden rok stoupla mortalita roztočů z 10 na 50% jedinců (Elzen & Westervelt 2004).

2.4. Rezistence roztoče *Varroa destructor* vůči *tau*-fluvalinátu

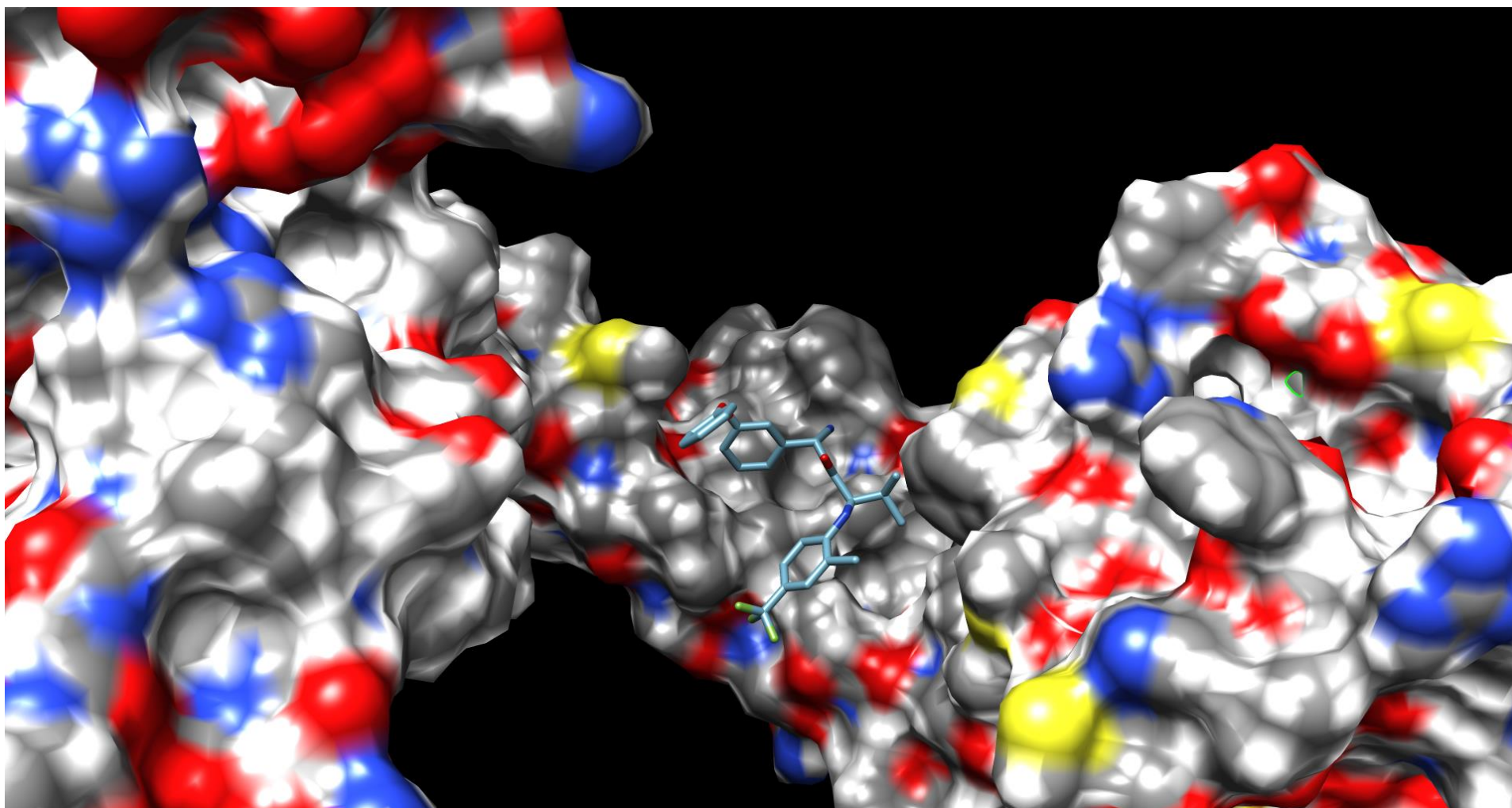
Masivní používání *tau*-fluvalinátu vyvolalo vznik rezistence vůči tomuto přípravku a také vůči akrinatinu, neboť oba přípravky mají stejný mechanismus působení. Šíření rezistence vůči pyretroidům u *V. destructor* shrnuje Martin (2004). V roce 1991 se rezistence objevila v Itálii a postupně se rozšířila do Švýcarska, Slovinska a jižní Francie. V roce 1997 je hlášena z Německa, Rakouska, Maďarska a Belgie, v roce 1998 proniká do Finska. V roce 2001 se

rezistence objevila ve Spojeném království, kde se masivně rozšířila v roce 2004. Šíření a výskyt rezistence v podmínkách Česka zachycuje námi připravená specializovaná mapa: <https://www.svsr.cz/zdravi-zvirat/vcely-ostatni/> (Hubert et al. 2018). Z této mapy je zřejmé, že existují ohniska rezistence v Plzeňském, Ústeckém a Jihomoravském kraji. Výskyt rezistence pro jednotlivé okresy ukazuje obrázek č. 2.

Rezistence vůči *tau*-fluvalinátu je spojená s bodovou mutací v sodném kanálu (obrázek č. 3) (Wang et al. 2002). V naší předchozí práci jsme zjistili, že roztoči, kteří jsou rezistentní vůči *tau*-fluvalinátu, mají v genu kódujícím sodný kanál (SC) mutaci L925V (značení dle *Musca domestica* SC) (Hubert et al. 2014). Vazba *tau*-fluvalinátu na sodný kanál *V. destructor* u citlivé populace roztoče je znázorněna v obrázku č. 2. Tato mutace byla zjištěna také týmem González-Cabrera et al. (2013), kteří aplikací PCR v reálném čase kvantifikovali výskyt mutace v populacích roztoče ve Velké Británii. Navzdory výskytu rezistence je *tau*-fluvalinát používán jak v Evropě, tak ve Spojených státech (Johnson et al. 2010). Rezistence vůči *tau*-fluvalinátu je spojená i s rezistencí vůči flumetrinu. To je např. ilustrováno situací v Anglii, kde byly porovnávány citlivé a rezistentní populace roztoče. Rezistence vůči *tau*-fluvalinátu se projevovala 11x vyšší LC_{50} u rezistentní populace roztoče. Rezistence vůči flumetrinu se projevila 13x vyšší LC_{50} ve srovnání s citlivou populací (Thompson et al. 2002). Vznik rezistence pro oba pyretridy nebyl spojen s výskytem rezistence ke kumafosu, amitrazu ani cymiazolu (Thompson et al. 2002, 2003).



Obrázek č. 2. Výskyt L925V mutace u roztočů *Varroa destructor* v Česku. Mutace je spojená s rezistencí roztočů vůči *tau*-fluvalinátu. Čísla udávají počet vzorků.



Obrázek č. 3. Proteinový model sodného kanálu roztoče *Varroa destructor* s navázaným *tau*-fluvalinátem, tato vazba je typická pro citlivou populaci, zatímco v rezistentní populaci k vazbě *tau*-fluvalinátu nedojde. Model vytvořen na základě sekvencí dle Hubert et al. (2014, 2017b).

2.5 Detekce rezistence u roztoče *Varroa destructor*

Včasná detekce rezistence vůči akaricidním látkám je základem dlouhodobé strategie používání chemických akaricidních prostředků v tlumení varroázy. Pro tuto detekci je třeba zavést systém jednoduchých biotestů, které mají nízkou variabilitu a jsou snadno opakovatelné (Santiago et al. 2000). Testování citlivosti k akaricidním látkám se provádí dvěma rozdílnými způsoby, které jsou označovány jako polní a laboratorní. V polním testu je odhadnuta populace roztočů ve včelstvu pomocí přirozeného spadu roztočů a následné aplikace akaricidních látek ve stripech do včelstva. Následuje sledování spadu roztočů (Floris et al. 2001; Semkiw et al. 2013). Tato metoda odhaluje rezistenci s určitou, avšak nízkou mírou nepřesnosti, jak prokázalo porovnání s laboratorními testy (Thompson et al. 2002, 2003). Nevýhodou této metody je také obtížnost stanovení diskriminačních koncentrací pesticidů.

Laboratorní metoda spočívá v běžných postupech pro identifikaci citlivosti členovců vůči pesticidům. Definovaný počet roztočů je vystaven definované koncentraci pesticidu a následně je stanovena mortalita. Mortalita pro různé koncentrace pesticidu je následně vyhodnocena probitovou regresí, jež umožní provést stanovení koncentrací pesticidu pro 50, 90 a 95% mortalitu (LC_{50} , LC_{90} a LC_{95}). Přestože princip tohoto testu je jednoduchý a pro svoji jednoduchost je doporučován např. IRAC (Insecticide Resistance Action Committee, <http://www.irac-online.org/about/irac/>) pro identifikaci rezistence herbivorních škůdců, existuje několik úskalí, která ovlivňují využití tohoto testu pro *V. destructor*. Lahvičková metoda doporučená IRAC byla používána pro testování řady akaricidních látek vůči *V. destructor* (Elzen et al. 1999, 2000; Kanga et al. 2010). Metoda spočívá v rozpuštění akaricidní látky v acetonu, aplikaci acetonu do horizontálně se točící lahvičky, dojde k odpaření acetonu a akaricidní látka se rovnoměrně rozptýlí po povrchu lahvičky. Avšak pro roztoče *Varroa* existují dvě modifikace této metody. Milaniho metoda používá aplikaci akaricidní látky do parafínu, kterým je následně pokryt vnitřní povrch lahvičky nebo kapsle. Kapsli tvoří dva skleněné disky (62 mm průměr) a dva kovové kroužky (56 mm vnitřní průměr a 5 mm celková výška). Vnitřní část kapsle je potažena parafínem (Merck 7151, melting point 46–48 °C) (Milani & Della Vedova 1996). Jiným přístupem je využití metody bez pokrytí lahvičky parafínem. Používají se 20 mL lahvičky (Elzen et al. 2000). Výhodou lahvičkové metody je univerzálnost použití pro identifikaci rezistence. Problémem lahvičkové metody je relativně vysoká přirozená mortalita dosahující 25 %. Přirozenou mortalitu se nám podařilo sice snížit při použití borosilikátových lahviček, avšak stále je významným faktorem,

který může ovlivnit stanovení rezistence. V současné době jsme pozorovali nejnižší přirozenou mortalitu do 5 % při použití polypropylenových lahviček (Hubert et al. 2015; Stara et al. 2018).

Dalším krokem pro detekci rezistence je stanovení diskriminační dávky, tj. koncentrace akaricidní látky, která umožní odlišit sensitivní a rezistentní jedince. Nejčastěji se používají koncentrace LC₉₀ nebo LC₉₅. Přehled těchto koncentrací pro lahvičkovou metodu je uveden v tabulce č. 2. Elzen et al. (2000) otestoval lahvičkovou metodu s využitím LC₉₀ pro stanovení diskriminační koncentrace (tabulka č. 2). Citlivé populace (Texas) na *tau*-fluvalinát a amitraz dosahovaly mortality nad 80 %, zatímco rezistentní (Minnesota) 14 a 32 %. Milaniho metodou byla identifikována rezistence v Anglii. Jako diskriminační dávka byla použita koncentrace 200 mg/kg, mortalita citlivé populace roztočů byla 80 %, rezistentní 30 % (Thompson et al. 2002, 2003). Diskriminační koncentrace pro stanovení rezistence pomocí Milaniho metody jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Od objevení L925V mutace v genu sodného kanálu roztoče se objevily také molekulární detekční metody této mutace. Tyto metody vycházely nejprve ze sekvenování fragmentů genů amplifikovaných pomocí PCR (Hubert et al. 2014). Předchozí kombinace amplifikačních primerů: V11R 5-CGAGAAAGAACGGGATACA-3 odpovídají pozici genu pro sodný kanál *Varroa destructor* 3232-3250 a V12F 5-GCCAACGTTGAATCTACTGA-3 (pozice 2955-2974) a sekvenačních primerů: anti_V12 5-CCGCTGTTGTTACCGTGGAG-3 (pozice 1956-1975) a anti_V11 5-CGTCGCCGTTGATGTTGCTA-3 (pozice 2838-2857) (Hubert et al. 2014). V dalším kroku byla vyvinuta metoda qPCR, která poskytovala kvantitativní odhad počtu genů citlivých a rezistentních jedinců roztočů (González-Cabrera et al. 2013). Později byly v této pozici u roztočů s USA nalezeny další mutace L925M a L925I, které jsou také spojené s rezistencí vůči *tau*-fluvalinátu (González-Cabrera et al. 2016). Tyto mutace se vyskytují i v jižní Evropě (Alissandrakis et al. 2017), avšak v Česku nebyly nalezeny (Stara et al. 2018). Pro detekci mutací byl navrhnout set primerů, které v PCR reakci amplifikují cca 650 bp genu sodného a následně je tento produkt štípán pomocí SacI enzymu (Millán-Leiva et al. 2018). Stejný postup s využitím jiných primerů byl využit i pro analýzu populace roztočů v Česku (Stara et al. 2018).

Tabulka č. 2. Doporučené diskriminační dávky pro stanovení rezistence roztoče *Varroa destructor* pomocí lahvičkového testu. Pro lahvičkový test byly použity 20mL lahvičky s borosilikátového skla. Fitované dávky jsou uvedeny na lahvičku s 95% konfidenčním limitem v závorce. Jako doporučené diskriminační koncentrace jsou fitované hodnoty pro LC₉₀, nebo indikované*.

Akaricidní látka	Fitované dávky (µg)		Autoři
	LC50	LC90	
<i>tau</i> -fluvalinát		2,4 (1,2–8,2)	Elzen et al. (1999)
<i>tau</i> -fluvalinát	0,56 (0,31–0,82)	5*	Elzen et al. (2000)
	0,66*	0,66(0,39–1,37)	Kamler et al. (2016)
fluvaliante	0,1 (0,03–0,3)	0,124	Kanga et al. (2010)
kumafos	6,3 (2,06–11)	53 (26–288)	Elzen et al. (2000)
	0,15 (0,001–0,42)	10*	Kanga et al. (2010)
amitraz	0,18(0,12–0,35)	0,19*	Kamler et al. (2016)
	16,4 (1,44–35)	124 (57–1661)	Elzen et al. (2000)
akrinatrin	0,26*	0,25(0,14–0,51)	Kamler et al. (2016)

Tabulka č. 3. Doporučené diskriminační dávky pro stanovení rezistence roztoče *Varroa destructor* pomocí Milaniho metody. Pro Milaniho metodu je pesticid rozpuštěn v parafínu a parafínem je pokryt vnitřní povrch kapsle, kde jsou roztoči exponováni. Fitované hodnoty jsou uvedeny s 95% konfidenčním limitem v závorce.

Akaricidní látka	Populace	Fitované koncentrace (mg/kg)		Autoři
		LC ₅₀	LC ₉₅	
fluvalinát	S	1	29	Bağ et al. (2012)
	R	200	5000	Bağ et al. (2012)
	?	35	150	Bağ et al. (2012)
<i>tau</i> -fluvalinát	S	25 (22–29)	105 (87–133)	Trouiller (1998)
	S	13–24		Milani (1995)
	S	47		Thompson et al. (2002)
	S	41,5#		Mozes-Koch et al. (2000)
	R	9234 (6580–13135)	810539 (310524–1000000)	Trouiller (1998)
	R	250–1571		Milani (1995)
	R	477		Thompson et al. (2002)
	R	92.1#		Milani (1995)
	S	0,47		Thompson et al. (2002)
	R	10	100	Bağ et al. (2012)
flumetrin	R	0,5	7	Bağ et al. (2012)
	R	6,3		Thompson et al. (2002)
	?	5	20	Bağ et al. (2012)

Legenda: S – citlivá populace, R – rezistentní populace, ? – populace s rizikem vzniku rezistence; # - jednotky mg/L.

2.6. Postup stanovení rezistence roztoče *Varroa destructor* s použitím lahvičkové metody v detekčním setu

Námi zvolený postup vychází z detekčního setu pro stanovení rezistence kleštíka zhoubného (*Varroa destructor*) vůči *tau*-fluvalinátu (obrázek č. 4).

Tento detekční set obsahuje: 3 × lahvička s *tau*-fluvalinátem 0.5 µg (BARVA červená)
3 × kontrolní lahvička (BARVA zelená)



Obrázek č. 4. Detekční set pro stanovení rezistence kleštíka zhoubného (*Varroa destructor*) vůči *tau*-fluvalinátu.

Popis a princip metody: Tento set umožňuje stanovit, zda je populace roztoče citlivá nebo rezistentní (odolná) k léčivům obsahujícím *tau*-fluvalinát. Lahvičky s *tau*-fluvalinátem obsahují na svém vnitřním povrchu 0,5 µg rovnoměrně rozprostřeného *tau*-fluvalinátu. Roztoči, kteří se pohybují v lahvičce, jsou s touto látkou v kontaktu a u citlivých jedinců dochází k úhynu, zatímco rezistentní jedinci přežívají. Vždy je nutno k testu použít i kontrolní – čisté – lahvičky s roztoči.

Další potřebné pomůcky: párátko nebo entomologická pinzeta, čistý papír.

Postup:

1. Odchyt roztočů: pro test se odebírají dospělé samičky roztoče, které poznáme podle tmavě červenohnědého zbarvení. Roztoče získáme buď při prohlídce a kontrole napadení zavíčkovaného plodu (ideální jsou trubčí kukly ve fázi fialových očí); anebo metodou oklepu včel v moučkovém cukru (detailní postup lze nalézt na webu VÚVě Dol www.beedol.cz).
2. Roztoče vyjmeme pomocí párátko nebo entomologické pinzety do testovacích lahviček. Do každé lahvičky dáme 12 roztočů. Jako první dáme roztoče do červené lahvičky s *tau*-fluvalinátem, dále dáme roztoče do kontrolní zelené lahvičky. Dále dáme 12 roztočů opět do lahvičky s *tau*-fluvalinátem (červená) a 12 roztočů do kontrolní lahvičky (zelená). Pro možnost využití metody je nutné získat **minimálně 36 roztočů** ze stanoviště nebo úlu, pro menší počet jedinců nelze metodu použít.
3. Lahvičky uložíme do krabice a necháme do druhého dne při pokojové teplotě.
4. Po 24 hodinách roztoče postupně vyklepeme na čistý papír a pro každou lahvičku pozorujeme a počítáme živé a mrtvé roztoče. Živí roztoči se budou pohybovat, mrtví roztoči jsou strnulí a ani po delší době se nepohybují. Zaznamenané počet živých a mrtvých roztočů v lahvičkách.

Vyhodnocení:

1. krok: Je mrtvých roztočů v kontrolní lahvičce více než 3 (25 %)?

1.1 Jestliže **ANO**, test nelze vyhodnotit. Došlo k problému s roztoči při odběru nebo skladování lahviček s roztoči. Při manipulaci mohli být roztoči rozmáčknuti pinzetou, nebo se na lahvičce vysrážela vzdušná vlhkost a roztoči se přilepili na její povrch.

1.2 Jestliže **NE**, vyhodnotíme roztoče v lahvičce s *tau*-fluvalinátem.

2. krok: Je počet mrtvých roztočů v lahvičce s *tau*-fluvalinátem vyšší než 6 jedinců (50 %)?

2.1 Jestliže **ANO**, jedná se o citlivou populaci, kterou lze redukovat přípravky na bázi *tau*-fluvalinátu.

2.2 Jestliže **NE**, jedná se o rezistentní populaci a její kontrola přípravky na bázi *tau*-fluvalinátu nemusí být účinná.

Výsledky vyhodnocení spolu s roztoči můžete zaslat pro další vyhodnocení do laboratoře.

Mrtvé a živé roztoče umístíme odděleně do nádoby s etanolem.

Po uplynutí expirační doby nebo po vystavení lahviček vysoké teplotě může dojít k degradaci *tau*-fluvalinátu a test může poskytovat falešně identifikované rezistentní populace.

Formulář:

Chovatel - Jméno a kontakt

Stanoviště včelstev:

Počet testovaných včelstev:

Kontrolní lahvička: počet mrtvých roztočů

počet živých roztočů

Lahvička s *tau*-fluvalinátem: počet mrtvých roztočů

počet živých roztočů

2.7. Postup stanovení rezistence roztoče *Varroa destructor* s použitím amplifikace fragmentu genu kódujícího sodný kanál a následné restriční analýzy (PCR–RFLP)

Navržený postup spočívá v PCR amplifikaci kratšího úseku genu sodného kanálu 603 bp pomocí primerů v1440f ATTAGGTCTTTGCCATTGCTA a v2022r CTCCTTCCATACGCTATATGC, následné štěpení ampliconu restriční endonukleázou *SacI* rozštěpí na cca 270 a 333 bp úseky u sensitivních jedinců, zatímco L925V rezistentní jedinci mají amplicon nerozštěpený, tj. 603bp. PCR Amplicony je možné vizualizovat pomocí agarózového gelu a elektroforézy (obrázky č. 5 a 6) (Hubert et al. 2017a).

Postup:

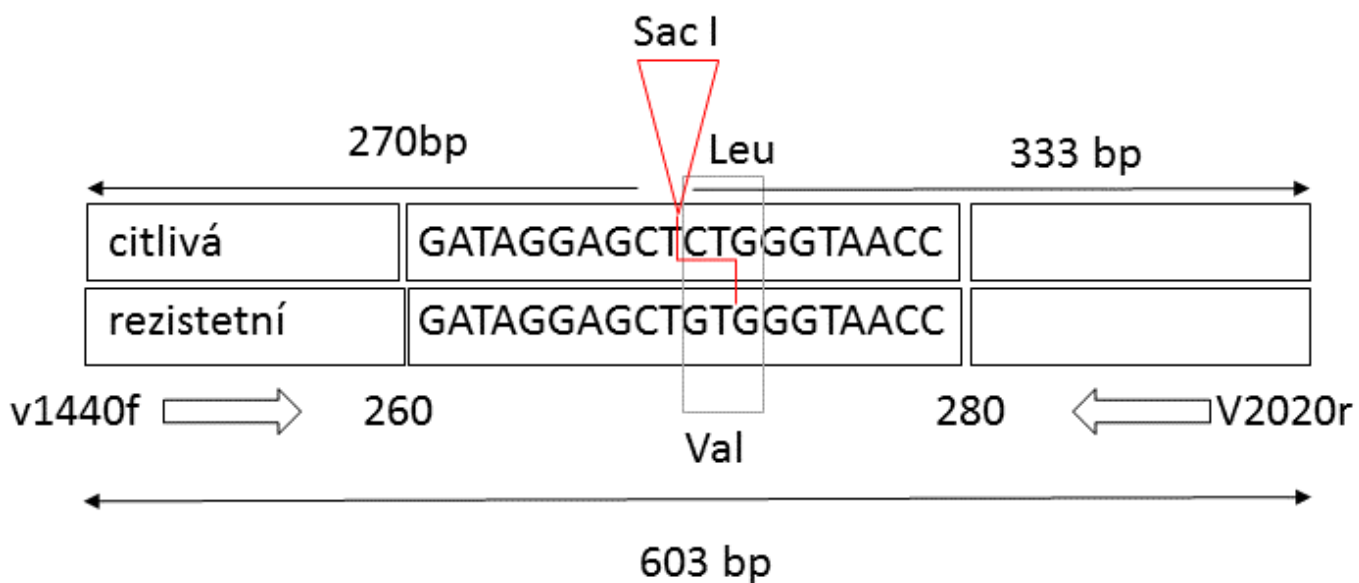
Extrakce DNA: Roztoči *Varroa destructor* 10 ks/vzorek ze zimní měli jsou homogenizováni a DNA je extrahována pomocí Genomic DNA Mini Kit (kat. č. GT300; Geneaid, New Taipei City, Taiwan).

Amplifikační směs a amplifikace: 5 unit/ μ L LA polymerase (Top-Bio, Praha, Česko), 200 μ M dNTPs, 3 mM MgCl₂, primery – v1440 a v2022r (100 nM každý), 8,5 ng templátové DNA. Reakční podmínky pro TM Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, Kalifornie, USA): (i) 180 s - 94 °C, následuje 35 cyklů: (ii) 30 s - 94 °C, (iii) 30 s - 58 °C, (iv) 60 s - 72 °C; poté finální extenze (v) 5 min - 72 °C a ponechání v 8 °C.

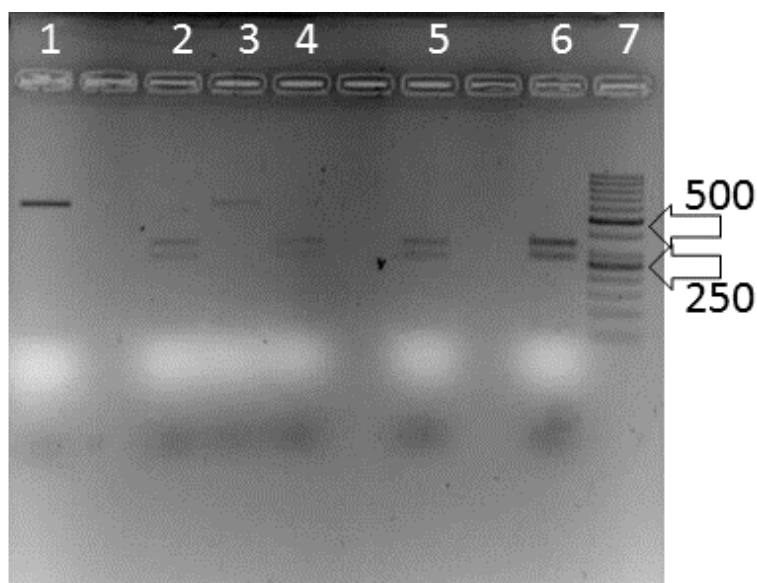
Vizualizace produktu: Získaný PCR produkt je vizualizován na 1% agarózovém gelu, velikost ampliconu odpovídá cca 603 bp.

Restriční štěpení a vizualizace: Produkt je purifikován (QIAquick PCR Purification Kit, kat. č. 28106) do 50 μ L ddH₂O, do roztoku je přidáno 5 μ L 10x NEBuffer 1.1 (BioLabs kat. č. R0156S), a 0,5 μ L Sac I (BioLabs kat. č. R0156S), vzorek je inkubován 1,5 hod v 37°C. Poté je znovu přidán 0,5 μ L Sac I a následuje inkubace 1,5h. Poté je 10 μ L vzorku nanášeno na 2,5% agarózový gel. Na gel je přidáno 2 μ L ladderu 50 (Thermo Scientific, SM0373). Elektroforéza při napětí 60V běží cca 60 minut. Gel je zdokumentován na dokumentačním systému. V případě rozštěpení se oddělí dva produkty 270 a 333 bp u vzorků bez výskytu mutace L925V tj. citlivých nerezistentních. U vzorků, kde nedojde k rozštěpení a vyskytuje se pouze původní amplicon tj. 603 bp, je doplněno 1 μ L Sac I a vzorky se inkubují dalších 12 hodin (přes noc) při 37°C. Poté je 40 μ L produktu nanášeno na 2,5% agarózový gel 2 μ L s doplněním ladderu 50. Elektroforéza při napětí 60V běží cca 60 minut. Gel je vizualizován v dokumentačním systému. Jestliže nedošlo k rozštěpení ampliconu na 270 a 333 bp je vzorek považován za rezistentní s mutací L925V (obrázky č. 5 a 6). Tato metoda je vhodná pro identifikaci mutace pro vzorky roztočů ze zimní měli.

Obrázek č. 5. Fragment genu kódující část segmentu IIS4-IIS6 sodného kanálu *Varroa destructor* v místě výskytu mutace L925V. Amplikon sodného kanálu citlivých a rezistentních roztočů z amplifikačních primerů v1440f a v2022r je 603 bp velký. U citlivých jedinců je štěpen enzymem Sac I na dva fragmenty, zatímco u rezistentních roztočů štěpen není.



Obrázek č. 6. Produkt 603 bp amplikonu sodného kanálu roztoče *Varroa destructor* byl připraven pro citlivé a rezistentních roztoče *Varroa destructor*. Produkt byl získán z amplifikačních primerů v1440f a v2022r a štěpen pomocí *Sac I* enzymu.



Legenda: rezistentní vzorky roztočů: 1, 3; citlivé vzorky roztočů: 2, 4, 5, 6. agarózový gel obsahuje ladder 50 bp.

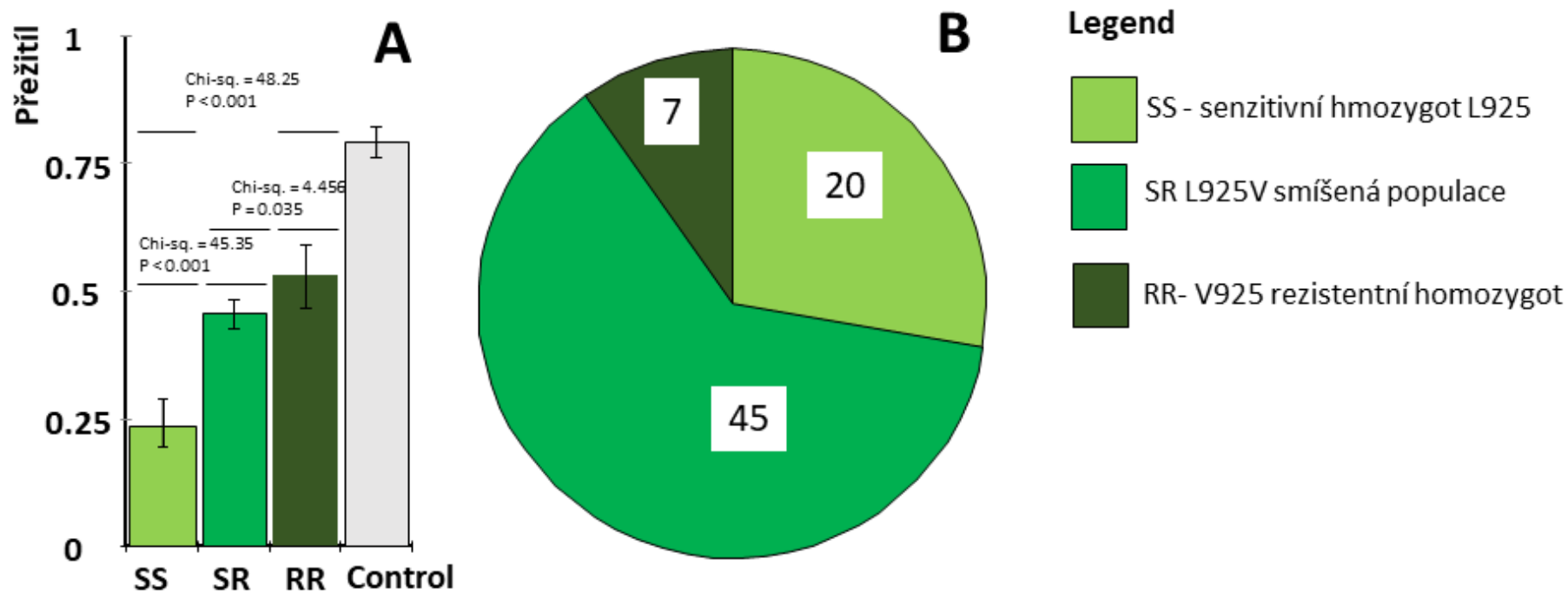
2.8. Kombinace lahvičkové metody a PCR–RFLP

Naše současné výsledky ukazují, že v lahvičkovém testu může dojít k chybné determinaci rezistence v některých případech (tabulka č. 4). Proto doporučujeme výsledky lahvičkového testu v případě indikace rezistence ověřit metodou PCR–RFLP. Lahvičkový test rozdělí roztoče na uhynulé a přeživší, tyto skupiny je vhodné analyzovat odděleně, neboť uhynulí jedinci jsou často citliví, zatímco přeživší rezistentní. Další problematickou skupinou jsou smíšené populace roztočů. Kde se vyskytují jak citliví, tak rezistentní jedinci, případně heterozygoti. V naší analýze bylo srovnáváno 72 včelstev, z toho 7 obsahovalo rezistentní homozygoty, 20 včelstev citlivé homozygoty a zbytek včelstev obsahoval smíšenou populaci roztočů (obrázek č. 7) (Stara et al. 2018).

Tabulka č. 4. Počet vzorkovaných včelstev vyhodnocený lahvičkovým testem a následně PCR–RFLP L925V mutace v genu kódující sodný kanál roztoče *Varroa destructor* (Stara et al. 2018).

Skupina	SacI identifikace		Lahvičkový test	
	uhynulí	přežili	N	Mortalita % rozsah
citliví	SS	nd	12	100
	SS	SS	8	31–93
smíšení	SR	nd	10	100
	SS	SR	21	10–83
	SR	SR	14	40–82
	SS	RR	3	33–75
	SR	RR	3	25–96
rezistentní	RR	RR	1	53
kontrola			28	0–31

Legenda: N - počet vzorků (včelstev), SacI štěpení: SS - citliví L925 homozygoti; SR - smíšená populace SS, SR a RR L925V jedinců; RR - V925 rezistentní homozygoti.



Obrázek č. 7 Přežívání roztoče *Varroa destructor* v lahvičkovém testu (Stara et al. 2018). (A) Diskriminační koncentrace *tau*-fluvalinátu a přežívání roztoče v souvislosti s výskytem L925V mutace. Jednotlivé počty byly od sebe porovnány chí-kvadrát testem. (B) Rozšíření L925V mutace ve včelstvech v Česku, celkem bylo vzorkováno 72 včelstev, počet včelstev udává číslo v grafu. Přežívání roztočů bylo spočítáno probitovým modelem, úsečka indikuje 95% konfidenční interval pro fit.

3. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

V Česku existuje jen velmi málo souhrnných informací o rizicích spojených s rezistencí roztoče *Varroa destructor* vůči *tau*-fluvalinátu. V době, kdy se zvyšují negativní tlaky na včelstva vzhledem k zatížení životního prostředí pesticidy, šíření řady nákaz jako je mor a hniloba včelího plodu, nosematóza, virová onemocnění, je důležité zabránit škodlivému působení roztočů, zároveň však neohrozit včelstva a včelí produkty, tj. především med rezidui akaricidních látek. Při častém používání *tau*-fluvalinátu dochází k šíření rezistentních roztočů *Varroa destructor* jako vedlejší efekt těchto ošetření. Znalost mechanismů a možnosti včasné identifikace rezistence zefektivňují kontrolu tohoto parazitického roztoče. V této metodice přinášíme dva postupy identifikaci rezistence vůči *tau*-fluvalinátu, 1) pomocí detekčního setu využívajícího diskriminační koncentraci v lahvičkové metodě a 2) molekulární identifikaci rezistence pomocí PCR–RFLP, případně kombinaci těchto metod. Všechny metody a postupy byly vyvinuty řešitelským týmem. Obdobné postupy začínají být aplikovány ve Spojeném království, Řecku a Spojených státech, avšak v podmínkách Česka nikdy dosud použity nebyly.

4. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Metodika je určena především pro státní správu, lahvičkové testy mohou provádět sami včelaři, avšak ti nemají zázemí pro metody molekulární biologie. Náklady na lahvičkovou metodu se pohybují okolo 100 Kč na detekční set. Pro vyhodnocení jednoho lahvičkového testu je třeba provést dvě PCR reakce, plus pozitivní a negativní kontrolu a restriční analýzu. Cena pro jednu analýzu je odhadována na 150 Kč včetně kitů, laboratorního plastu a dalšího vybavení.

Zavedení postupu laboratorního testování rezistence přinese další možnosti řešení problematiky šíření varroázy. Využitím správných přípravků je možné provést včasná ošetření, která jsou levnější než neúčinná ošetření rezistentních roztočů.

5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Alissandrakis E., Ilias A., Tsagkarakou A. (2017) Pyrethroid target site resistance in Greek populations of the honey bee parasite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *Journal of Apicultural Research* 56 (5): 625–630.
- Anderson D. L., Trueman J. W. H. (2000) *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology* 24 (3): 165–189.
- Bak B., Wilde J., Siuda M. (2012) Characteristics of north-eastern population of *Varroa destructor* resistant to synthetic pyrethroids. *Medycyna Weterynaryjna* 68 (12): 603–606.
- Büchler R., Berg S., Le Conte Y. (2010) Breeding for resistance to *Varroa destructor* in Europe. *Apidologie* 41 (3): 393–408.
- Colin M. E., Vandame R., Jourdam P., Di Pasquale S. (1997) Fluvalinate resistance of *Varroa jacobsoni* Oudemans (Acari: Varroidae) in Mediterranean apiaries of France. *Apidologie* 28 (6): 375–384.
- Corley S. W., Jonsson N. N., Piper E. K., Cutullé C., Stear M. J., Seddon J. M. (2013) Mutation in the Rm β AOR gene is associated with amitraz resistance in the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 110 (42): 16772–16777.
- Dahlgren L., Johnson R. M., Siegfried B. D., Ellis M. D. (2012) Comparative toxicity of acaricides to honey bee (Hymenoptera: Apidae) workers and queens. *Journal of Economic Entomology* 105 (6): 1895–1902.
- Elzen P. J., Baxter J. R., Spivak M., Wilson W. T. (2000) Control of *Varroa jacobsoni* Oud. resistant to fluvalinate and amitraz using coumaphos. *Apidologie* 31 (3): 437–441.
- Elzen P. J., Eischen F. A., Baxter J. R., Elzen G. W., Wilson W. T. (1999) Detection of resistance in US *Varroa jacobsoni* Oud. (Mesostigmata: Varroidae) to the acaricide fluvalinate. *Apidologie* 30 (1): 13–17.
- Elzen P., Westervelt D. (2004) A scientific note on reversion of fluvalinate resistance to a degree of susceptibility in *Varroa destructor*. *Apidologie* 35 (5): 519–520.
- Floris I., Satta A., Cabras P., Garau V. L., Angioni A. (2004) Comparison between two thymol formulations in the control of *Varroa destructor*: effectiveness, persistence, and residues. *Journal of Economic Entomology* 97 (2): 187–191.
- Floris I., Satta A., Garau V. L., Melis M., Cabras P., Aloul N. (2001) Effectiveness, persistence, and residue of amitraz plastic strips in the apiary control of *Varroa destructor*. *Apidologie* 32 (6): 577–585.
- García D. A., Bujons J., Vale C., Suñol C. (2006) Allosteric positive interaction of thymol with the GABA_A receptor in primary cultures of mouse cortical neurons. *Neuropharmacology* 50 (1): 25–35.
- González-Cabrera J., Bumann H., Rodríguez-Vargas S., Kennedy P. J., Krieger K., Altreuther G., Hertel A., Hertlein G., Nauen R., Williamson M. S. (2018) A single mutation is driving resistance to pyrethroids in European populations of the parasitic mite, *Varroa destructor*. *Journal of Pest Science* (in press). DOI: 10.1007/s10340-018-0968-y.
- González-Cabrera J., Davies T. G. E., Field L. M., Kennedy P. J., Williamson M. S. (2013) An amino acid substitution (L925V) associated with resistance to pyrethroids in *Varroa destructor*. *PLoS One* 8 (12): e82941. DOI: 10.1371/journal.pone.0082941.
- González-Cabrera J., Rodríguez-Vargas S., Davies T. G. E., Field L. M., Schmehl D., Ellis J. D., Krieger K., Williamson M. S. (2016) Novel mutations in the voltage-gated sodium channel of pyrethroid-resistant *Varroa destructor* populations from the Southeastern USA. *PLoS One* 11 (5): e0155332. DOI: 10.1371/journal.pone.0155332.
- Hubert J., Nesvorná M., Doskočil I., Kamler M. (2018) Výskyt bodových mutací v genu pro sodný kanál u roztoče *Varroa destructor*: certifikovaná mapa. Státní veterinární správa ČR, Praha. URL: <https://www.svscr.cz/zdravi-zvirat/vcely-ostatni/>
- Hubert J., Nesvorná M., Kamler M., Kopecký J., Tyl J., Titera D., Stara J. (2014) Point mutations in the sodium channel gene conferring *tau*-fluvalinate resistance in *Varroa destructor*. *Pest Management Science* 70 (6): 889–894.
- Hubert J., Nesvorná M., Kopecký J., Kamler M. (2017a) Identifikace bodové mutace genu sodného kanálu roztoče *Varroa destructor* pomocí specifických primerů a štěpení amplikonu restrikční endonukleázou: užitečný vzor číslo 30257. Úřad průmyslového vlastnictví, Praha.
- Hubert J., Nesvorná M., Stará J. (2017b) Poznatky o rezistenci kleštíka zhoubného (*Varroa destructor*) vůči akaricidům. *Veterinářství* 67 (6): 560–566.
- Hubert J., Nesvorná M., Stará J., Kamler M. (2015) Detekční set pro stanovení rezistence kleštíka včelího (*Varroa destructor*) vůči akaricidním látkám: užitečný vzor číslo 28536. Úřad průmyslového vlastnictví, Praha.
- Chen A. C., He H., Davey R. B. (2007) Mutations in a putative octopamine receptor gene in amitraz-resistant cattle ticks. *Veterinary Parasitology* 148 (3–4): 379–383.
- Johnson R. M., Ellis M. D., Mullin C. A., Frazier M. (2010) Pesticides and honey bee toxicity – USA. *Apidologie* 41 (3): 312–331.
- Kamler M., Nesvorná M., Stara J., Erban T., Hubert J. (2016) Comparison of *tau*-fluvalinate, acrinathrin, and amitraz effects on susceptible and resistant populations of *Varroa destructor* in a vial test. *Experimental and Applied Acarology* 69 (1): 1–9.

- Kanga L. H. B., Adamczyk J., Marshall K., Cox R. (2010) Monitoring for resistance to organophosphorus and pyrethroid insecticides in *Varroa* mite populations. *Journal of Economic Entomology* 103 (5): 1797–1802.
- Kunz S. E., Kemp D. H. (1994) Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. *Revue scientifique et technique de l'Office international des épizooties* 13 (4): 1249–1286.
- Kůrka A. (2005) České názvy živočichů VI: pavoukovci (Arachnida) II: roztoči (Acari). Národní muzeum (zoologické oddělení PM), Praha.
- Li A. Y., Davey R. B., Miller R. J., George J. E. (2003) Resistance to coumaphos and diazinon in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) and evidence for the involvement of an oxidative detoxification mechanism. *Journal of Medical Entomology* 40 (4): 482–490.
- Maggi M. D., Ruffinengo S. R., Negri P., Eguaras M. J. (2010) Resistance phenomena to amitraz from populations of the ectoparasitic mite *Varroa destructor* of Argentina. *Parasitology Research* 107 (5): 1189–1192.
- Martin S. J. (2004) Acaricide (pyrethroid) resistance in *Varroa destructor*. *Bee World* 85 (4): 67–69.
- Milani N. (1995) The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud to pyrethroids: a laboratory assay. *Apidologie* 26 (5): 415–429.
- Milani N., Della Vedova G. (1996) Determination of the LC₅₀ in the mite *Varroa jacobsoni* of the active substances in Perizin[®] and Cekafix[®]. *Apidologie* 27 (3): 175–184.
- Milani N., Della Vedova G. (2002) Decline in the proportion of mites resistant to fluvalinate in a population of *Varroa destructor* not treated with pyrethroids. *Apidologie* 33 (4): 417–422.
- Millán-Leiva A., Hernández-Rodríguez C. S., González-Cabrera J. 2018. New PCR–RFLP diagnostics methodology for detecting *Varroa destructor* resistant to synthetic pyrethroids. *Journal of Pest Science* (in press). DOI: 10.1007/s10340-018-0964-2
- Moritz R. F. A., de Miranda J., Fries I., Le Conte Y., Neumann P., Paxton R. J. (2010) Research strategies to improve honeybee health in Europe. *Apidologie* 41 (3): 227–242.
- Mozes-Koch R., Slabezki Y., Efrat H., Kalev H., Kamer Y., Yakobson B. A., Dag A. (2000) First detection in Israel of fluvalinate resistance in the *Varroa* mite using bioassay and biochemical methods. *Experimental and Applied Acarology* 24 (1): 35–43.
- O'Reilly A. O., Williamson M. S., González-Cabrera J., Turberg A., Field L. M., Wallace B. A., Davies T. G. E. (2014) Predictive 3D modelling of the interactions of pyrethroids with the voltage-gated sodium channels of ticks and mites. *Pest Management Science* 70 (3): 369–377.
- Přidal A. (2006) Odborná včelařská terminologie: názvosloví živočichů a parazitizmus. *Včelařství* 59 (7): Diskuse I–Diskuse II.
- Rodríguez-Dehaibes S. R., Otero-Colina G., Sedas V. P., Jiménez J. A. V. (2005) Resistance to amitraz and flumethrin in *Varroa destructor* populations from Veracruz, Mexico. *Journal of Apicultural Research* 44 (3): 124–125.
- Rosenkranz P., Aumeier P., Ziegelmann B. (2010) Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology* 103 (Supplement 1): S96–S119.
- Santiago G. P., Otero-Colina G., Sánchez D. M., Guzmán M. E. R., Vandame R. (2000) Comparing effects of three acaricides on *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) using two application techniques. *Florida Entomologist* 83 (4): 468–476.
- Semkiw P., Skubida P., Pohorecka K. (2013) The amitraz strips efficacy in control of *Varroa destructor* after many years application of amitraz in apiaries. *Journal of Apicultural Science* 57 (1): 107–121.
- Stara J., Nesvorna M., Erban T., Vinsova H., Kopecky J., Dosekocil I., Kamler M., Hubert J. (2018) Developing tools for detection of *tau*-fluvalinate resistance in the mite *Varroa destructor* connected to L925V point mutation of sodium channel gene. *Experimental and Applied Acarology* (under review).
- Thompson H., Ball R., Brown M., Bew M. (2003) *Varroa destructor* resistance to pyrethroid treatments in the United Kingdom. *Bulletin of Insectology* 56 (1): 175–181.
- Thompson H. M., Brown M. A., Ball R. F., Bew M. H. (2002) First report of *Varroa destructor* resistance to pyrethroids in the UK. *Apidologie* 33 (4): 357–366.
- Trouiller J. (1998) Monitoring *Varroa jacobsoni* resistance to pyrethroids in western Europe. *Apidologie* 29 (6): 537–546.
- Van Leeuwen T., Vontas J., Tzagkarakou A., Dermauw W., Tirry L. (2010) Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: a review. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40 (8): 563–572.
- Wang R., Liu Z., Dong K., Elzen P. J., Pettis J., Huang Z. (2002) Association of novel mutations in a sodium channel gene with fluvalinate resistance in the mite, *Varroa destructor*. *Journal of Apicultural Research* 41 (1–2): 17–25.

6. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Erban T., Harant K., Hubalek M., Vitamvas P., Kamler M., Poltronieri P., Tyl J., Markovic M., Titera D. (2015) In-depth proteomic analysis of *Varroa destructor*: detection of DWV-complex, ABPV, VdMLV and honeybee proteins in the mite. *Scientific Reports* 5: 13907. DOI: 10.1038/srep13907.
- Erban T., Vitamvas P., Kamler M., Titera D. (2014) Identification of viruses in *Varroa destructor* using proteomic methods. *In: De la Rila P. (ed.) EurBee 6: 6th European Conference of Apidology, 9–12 September 2014, Murcia (Spain)*, pp. 132–133.
- Hejdánková S. (2016) Parazitická bakterie *Arsenophonus* u včely medonosné a jejího parazita *Varroa destructor*: magisterská diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra ekologie, Praha.
- Holenková M. (2012) Studium fyziologie a hledání proteomických nástrojů pro supresi a detekci *Varroa destructor*: magisterská diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Praha.
- Hubert J., Nesvorná M., Doskočil I., Kamler M. (2018) Výskyt bodových mutací v genu pro sodný kanál u roztoče *Varroa destructor*: certifikovaná mapa. Státní veterinární správa ČR, Praha. URL: <https://www.svscr.cz/zdravi-zvirat/vcely-ostatni/>
- Hubert J., Bicianova M., Ledvinka O., Kamler M., Lester P. J., Nesvorná M., Kopecký J., Erban T. (2017) Changes in the bacteriome of honey bees associated with the parasite *Varroa destructor*, and pathogens *Nosema* and *Lotmaria passim*. *Microbial Ecology* 73 (3): 685–698.
- Hubert J., Erban T., Kamler M., Kopecký J., Nesvorná M., Hejdankova S., Titera D., Tyl J., Zurek L. (2015) Bacteria detected in the honeybee parasitic mite *Varroa destructor* collected from beehive winter debris. *Journal of Applied Microbiology* 119 (3): 640–654.
- Hubert J., Kamler M., Nesvorná M., Ledvinka O., Kopecký J., Erban T. (2016) Comparison of *Varroa destructor* and worker honeybee microbiota within hives indicates shared bacteria. *Microbial Ecology* 72 (2): 448–459.
- Hubert J., Kopecký J., Stará J., Nesvorná M. (2014) Primery pro detekci mutací souvisejících s rezistencí *Varroa destructor* k tau-fluvalinátu: užitiný vzor číslo 26193. Úřad průmyslového vlastnictví, Praha.
- Hubert J., Nesvorná M., Kamler M., Kopecký J., Tyl J., Titera D., Stará J. (2014) Point mutations in the sodium channel gene conferring tau-fluvalinate resistance in *Varroa destructor*. *Pest Management Science* 70 (6): 889–894.
- Hubert J., Nesvorná M., Kopecký J. (2014) Primery pro detekci patogenních bakterií rodu *Bartonella* přenášených roztočem *Varroa destructor* na včelu medonosnou: užitiný vzor číslo 26370. Úřad průmyslového vlastnictví, Praha.
- Hubert J., Nesvorná M., Kopecký J., Kamler M. (2017) Identifikace bodové mutace genu sodného kanálu roztoče *Varroa destructor* pomocí specifických primerů a štěpení ampikonu restriční endonukleázou: užitiný vzor číslo 30257. Úřad průmyslového vlastnictví, Praha.
- Hubert J., Nesvorná M., Stará J. (2017) Poznatky o rezistenci kleštika zhoubného (*Varroa destructor*) vůči akaricidům. *Veterinářství* 67 (6): 560–566.
- Hubert J., Nesvorná M., Stará J., Kamler M. (2015) Detekční set pro stanovení rezistence kleštika včelího (*Varroa destructor*) vůči akaricidním látkám: užitiný vzor číslo 28536. Úřad průmyslového vlastnictví, Praha.
- Kamler M., Kopecký J., Nesvorná M., Tyl J., Stará J., Erban T., Hubert J., Titera D. (2012) Are mutations in sodium channel encoding gene responsible for pyrethroid resistance in *Varroa destructor*? *In: Barth B., Scharpenberg H., Moritz R. F.A. (eds.) EurBee5: 5th European Conference of Apidology, 3–7th September 2012, Halle an der Saale*, pp. 228–228.
- Kamler M., Nesvorná M., Stará J., Erban T., Hubert J. (2016) Comparison of tau-fluvalinate, acrinathrin, and amitraz effects on susceptible and resistant populations of *Varroa destructor* in a vial test. *Experimental and Applied Acarology* 69 (1): 1–9.
- Stará J., Nesvorná M., Erban T., Vinsova H., Kopecký J., Doskočil I., Kamler M., Hubert J. (2018) Developing tools for detection of tau-fluvalinate resistance in the mite *Varroa destructor* connected to L925V point mutation of sodium channel gene. *Experimental and Applied Acarology (under review)*.
- Šulcová K., Vitamvas P., Harant K., Kamler M., Erban T. (2016) Vliv roztoče *Varroa destructor* v interakci s virem deformovaných křídel na vývoj *Apis mellifera*. *In: Bryja J., Sedláček F., Fuchs R. (eds.) Zoologické dny České Budějovice 2016. Sborník abstraktů z konference 11.–12. února 2016. Ústav biologie obratlovců AV ČR, Brno*, pp. 221–222.

PODĚKOVÁNÍ

Autoři této metodiky děkují RNDr. Tomáši Erbanovi, Ph.D., Martinu Markovičovi za pomoc s editováním tohoto textu, včelařům za vzorky roztočů a recenzentům za podnětné připomínky k této metodice.

Autoři: Jan Hubert, Marta Nesvorná, Ivo Doskočil, Martin Kamler, Jitka Stará

Název: Certifikovaná metodika pro hodnocení rezistence roztoče *Varroa destructor* vůči taufluvalinátu

Vydal: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Drnovská 507/73, Praha 6-Ruzyně, CZ-161 06

Metodika je veřejně přístupná na webové adrese www.vurv.cz

Náklad: 300 výtisků

Vydáno bez jazykové úpravy.

Kontakt na autora: hubert@vurv.cz

Autoři fotografií: Ivo Doskočil, Jan Hubert, Marie Bostlová

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., 2018

ISBN 978-80-7427-280-6