

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra ochrany rostlin



**Hodnocení vlivu antropogenní zátěže na opylovače
proteomickými metodami**

.....
doktorská disertační práce

Autor: Ing. Klára Kadlíková

Školitel: prof. Ing. Pavel Ryšánek, CSc.

Konzultant: RNDr. Tomáš Erban, Ph.D.

Praha 2020

Obsah

1.	ÚVOD	1
2.	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
2.1.	OPYLOVAČI.....	3
2.2.	VČELY (APOIDEA)	4
2.2.1.	Včela medonosná (<i>Apis mellifera</i>)	4
2.2.2.	Biologie včely medonosné	6
2.2.3.	Význam včel.....	9
2.2.4.	Mikrobiom včely medonosné.....	11
2.3.	PATOGENY VČELY MEDONOSNÉ	13
2.3.1.	Bakterie	14
2.3.2.	Viry.....	15
2.3.3.	Parazité	17
2.3.4.	Houby	19
2.4.	ZATÍŽENÍ ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ XENOBIOTIKY	20
2.4.1.	Klasifikace pesticidů a riziko vzniku rezistence	21
2.4.2.	Systémové pesticidy a jejich vliv na včely.....	22
2.4.3.	Skupiny pesticidů škodlivých pro včely.....	24
2.4.4.	Skupiny pesticidů toxických pro včely	26
2.4.5.	Pesticidy a jejich interakce s dalšími faktory	28
3.	HYPOTÉZY A CÍL PRÁCE.....	30
4.	MATERIÁL A METODIKA	30
4.1.	Biologický materiál a příprava vzorků pro jednotlivé experimenty.....	30
4.1.1.	Biologický materiál pro experiment 1. Vliv parazitického roztoče <i>Varroa destructor</i> v interakci s virem deformovaných křídel na změny proteomu a aktivace signální dráhy TGF- β	31
4.1.2.	Biologický materiál pro experiment 2. Distribuce imidaklopridu, imidaklopid-olefinu a imidaklopid-urey v zelených částech a v kořenech řepky olejky (<i>Brassica napus</i>) z uměle kontaminované zeminy.	32
4.1.3.	Biologický materiál pro experiment 3. Případy akutních otrav včel.....	34
4.1.4.	Biologický materiál pro experiment 4. Vliv chronické expozice neonicotinoиду imidaklopridu na čmeláka zemního.	35
4.1.5.	Biologický materiál pro experiment 5. Řízené otravy včel – Hodnocení vlivu xenobiotik na včely v průběhu ontogeneze.	36
4.2.	Experimentální přístupy	38
4.2.1.	Bezgelová proteomická analýza (nanoLC-MS/MS)	38

4.2.2.	Gelová proteomická analýza a identifikace proteinů hmotnostní spektrometrií.....	39
4.2.3.	Analýza pesticidů	41
5.	VÝSLEDKY	43
5.1.	Experiment 1. Vliv roztoče <i>Varroa destructor</i> a viru deformovaných křídel na změny proteomu <i>Apis mellifera</i>	44
5.1.1.	Gelová analýza 2-D DIGE s následnou identifikací hmotnostní spektrometrií.	44
5.1.2.	Bezgelová analýza nanoLC-MS/MS	44
5.2.	Experiment 2. Distribuce imidaklopridu, imidakloprid-olefinu a imidakloprid-urey v zelených částech a v kořenech řepky olejky (<i>Brassica napus</i>)	47
5.3.	Experiment 3. Případy akutních otrav včel	48
5.4.	Experiment 4. Vliv chronické expozice neonikotinoиду imidaklopridu na čmeláka zemního.	51
5.5.	Experiment 5. Řízené otravy včel – Hodnocení vlivu xenobiotik na včely v průběhu ontogeneze.....	52
6.	DISKUZE.....	53
7.	ZÁVĚR.....	62
8.	SEZNAM LITERATURY	63
9.	PŘÍLOHY.....	88

Prohlašuji, že jsem tuto disertační práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucího disertační práce a s použitím citované literatury.

V Praze dne: 8. 12. 2020

Ing. Klára Kadlíková

Poděkování

Děkuji svému konzultantovi RNDr. Tomáši Erbanovi, Ph.D., za odborné vedení a cenné rady v průběhu doktorského studia. Dále děkuji prof. Ing. Pavlu Ryšánkovi, CSc., za vedení dizertační práce. Dále bych chtěla poděkovat Veronice Benešové za vytvoření ilustrací v programu Adobe Illustrator a celému týmu ALS Czech Republic, s.r.o. za chromatografické analýzy, jmenovitě Mgr. Marcelu Seifrtové, Ph.D., Ing. Taťáně Halešové, Ing. Martě Václavíkové, Ph.D. a Mgr. Daniele Tomešové. Děkuji také Mgr. Karlu Harantovi a Mgr. Pavlu Talackovi z OMICS Proteomické laboratoře, BIOCEV Univerzity Karlovy. Poděkování patří také doc. Mgr. Janu Hubertovi, Ph.D., Martinu Markovičovi, Mgr. Julii Chalupníkové a dalším kolegům z Výzkumného ústavu rostlinné výroby (VÚRV), za cenné rady a vytvoření přátelské atmosféry na našem pracovišti.

Dizertační práce byla řešena ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, v.v.i., v rámci následujících projektů: LD15028 (Proteinové markery onemocnění včel), TA04020267 (Minimalizace rizik spojených s dopadem výskytu chemických látek v životním prostředí), QJ1210085 (Nové metody pro komplexní diagnostiku zdravotního stavu včelstev *Apis mellifera* pro prevenci chorob a zvýšení jejich fitness), QK1910018 (Vývoj MULTIOMICS analýzy rizik pesticidů na včely s ohledem na reálné znečištění, koktejlový efekt a další stresory), RO0415, RO00416, RO0417, RO00418 (Výzkumné záměry VÚRV, v.v.i.).

1. ÚVOD

Včela medonosná (*Apis mellifera*) patří mezi nejdůležitější přirozené opylovače kulturních rostlin a zemědělských plodin (Bacandritsos et al. 2010). Včely přispívají k přirozenému ekosystému a pokles jejich populací může ohrozit opylení planě rostoucích rostlin i cíleně pěstovaných plodin (Simon-Delso et al. 2014). Od roku 2006 jsou registrovány v Evropě a v Severní Americe nevysvětlitelné ztráty včelstev (Le Conte et al. 2010). Na těchto ztrátách se podílí až 61 různých kvantifikovatelných faktorů, mezi které patří jednak abiotické faktory, jako je změna klimatu, pokles genetické variability, elektromagnetické záření, nutričně nedostatečná dieta či účinek pesticidů a dále biotické faktory, kam patří různé choroby a paraziti včel (vanEngelsdorp et al. 2009). Z dostupných informací vyplývá, že na ztrátách včelstev se pravděpodobně podílí několik faktorů najednou, avšak mezi nejvýznamnější faktory patří roztoč kleštík včelí (též zvaný kleštík zhoubný, *Varroa destructor*) (Daníhlík & Petřivalský 2015) společně s viry (Erban et al. 2015), pesticidy a další agrochemikálie (Johnson et al. 2010). Proto byl v rámci této práce studován vliv pesticidů na opylovače a interakce patogenů včel. Ochrana plodin není vzhledem k nárokům lidstva na množství potravin v současné době možná bez použití těchto látek a každým rokem je na území Česka použito několik tun pesticidů. K minimalizaci negativního dopadu pesticidů na životní prostředí i necílové organismy by prostředky na ochranu rostlin měly být využívány s rozmyslem a v souladu s platnými směrnici a vyhláškami. Z praktického hlediska je záhodno uvést, že vládou ČR byl schválen *Národní akční plán k bezpečnému používání pesticidů v České republice pro 2018–2022*. Jedná se o soubor opatření, která se snaží snížit rizika a omezit dopady používání přípravků na lidské zdraví a životní prostředí, s cílem podpořit vývoj a zavádění integrované ochrany a alternativních přístupů (MZe ČR 2018). Kvůli možnému negativnímu vlivu na necílové organismy jsou u nových i používaných pesticidů pravidelně hodnocena rizika pro opylovače a další živé organismy. Díky tomu, že bylo vyhodnoceno akutní riziko pro včely, byly nařízením Evropské komise (EK) v roce 2013 dočasně zakázány 3 vysoce toxické neonicotinoidy, a to klothianidin, thiamethoxam a imidakloprid. Tento zákaz byl v roce 2018 potvrzen (EK 2018b, c, d). V roce 2020 k nim přibyl thiakloprid (EK 2020), přestože je tento neonicotinoid považován pro včely za málo toxický. Zodpovědět všechny otázky týkající se vlivu pesticidů a dalších faktorů na opylovače je velmi obtížné a vyžaduje zdoluhavý výzkum a komplexní přístup. Alespoň dílčí odpovědi nám mohou poskytnout moderní metody, zejména vysokokapacitní metody, které umožňují pohlížet na problém komplexně. Umožňují nám například sledovat změnu proteomu vlivem pesticidů či chorob nebo detekovat spektrum pesticidů a jejich potenciálně nebezpečné

metabolity v životním prostředí, včetně včelích produktů a sledovat jejich změny. To jsou všechno esenciální informace potřebné k tomu, abychom jednou byli schopni zcela porozumět těmto mechanismům. Vysokokapacitní metody byly využity i v této práci, jednalo se o proteomiku s využitím nanoLC-MS/MS či UHPLC-MS/MS pro detekci pesticidů a metabolickou analýzu. Díky těmto metodám bylo možno sledovat vliv *V. destructor* a viru deformovaných křídel na změny v proteomu včely medonosné. Další experimenty byly zaměřeny na sledování vlivu pesticidů na opylovače. Zaměřili jsme se hlavně na pesticidy, které představují potenciální riziko pro včelu medonosnou, a proto v této práci nechybí experimenty s imidaklopridem a jeho metabolity. Poslední studie zahrnuje reálné otravy včelstev, kdy byly hodnoceny oficiální případy podezření na otravy včel v různých lokalitách. Práce zahrnuje také informace o významu mixů pesticidů a kontaminaci vnitřního prostředí včelstva.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. OPYLOVAČI

Opylování je definováno jako přenos pylového zrna z prašníku jednoho květu na stigma květu jiné či stejné rostliny. Opylení může být dosaženo biotickými nebo abiotickými prostředky. Mezi abiotické prostředky patří opylení větrem, vodou nebo gravitací, zatímco opylení biotické zajišťují živočichové. Antonín Přidal doporučuje namísto označení opylovač označení opylovatel (Přidal 2005, 2015). V této práci je používáno označení opylovač, což je slovo uznané Ústavem pro jazyk český a je dostačující v daném kontextu. Opylovači jsou velmi důležití pro fungování téměř všech suchozemských ekosystémů. Kromě nejvýznamnější skupiny opylovačů, kterou tvoří včely, existuje ještě celá řada jiných živočichů podílejících se na opylení. Mezi ně můžeme zařadit například vosy, mravence, mouchy, motýly a brouky. Z obratlovců jsou to některé skupiny ptáků jako např. kolibříci (Kevan 1999). V této práci je pozornost věnována nejvýznamnějšímu, a také nejrozšířenějšímu opylovači včele medonosné (*Apis mellifera*, Linnaeus 1758). Kromě včely medonosné jsou významnými opylovači také její blízcí příbuzní čmeláci (rod *Bombus*) (Goulson 2003) a také včely, které vedou samotářský způsob života. Bývají označovány jako samotářky, buňky si stavějí v dutinách ve dřevě, v dutých suchých stéblech rostlin (Bramke et al. 2019) či v prázdných ulitách. Některé druhy včel samotárek patří k tzv. „kukačkám“, které kladou vajíčka do hnízd svých příbuzných (Spürgin 2013). Čmeláci podobně jako včela medonosná nebo vosy patří mezi sociální hmyz. Jsou neodmyslitelnou součástí naší přírody a zajišťují opylení široké škály planě rostoucích rostlin i zemědělských plodin (Corbet et al. 1991), a to jak v technické izolaci (skleníková rajčata, papriky), tak ve volné přírodě (ovocné sady, jeteloviny a další) (May 1959; Ptáček & Votavová 2013). Lze nalézt druhy rostlin, k jejichž opylení jsou čmeláci dokonce lépe uzpůsobeni než včely. Využívají například svůj dlouhý jazyk, který jim umožňuje opylovat i květy s hlubokými květními trubkami. Další výhodou čmeláků ve srovnání se včelou medonosnou je jejich větší tolerance na chlad a vlhko. Proto mohou za potravou vylétat mnohem častěji, a to i za horšího počasí (May 1959). Díky těmto jejich vlastnostem je v dnešní době velmi populární komerční chov čmeláků (Goulson 2003).

Opylovače jako necílové organismy ohrožují přípravky na ochranu rostlin (POR), které se běžně používají v zemědělství jako ochrana před různými škůdci (Como et al. 2017). Vzhledem k tomu, že je prokázán negativní vliv POR na opylovače (Johnson et al. 2010; Kiljanek et al. 2016), je hodnocení a povolování těchto přípravků regulováno nařízením

komise EU č. 546/2011 ze dne 10. června 2011 (EK 2011). Tímto nařízením se provádí nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009 ze dne 21. října 2009, o uvádění přípravků na ochranu rostlin na trh a o zrušení směrnic Rady 79/117/EHS a 91/414/EHS (EP 2009). Toto nařízení zohledňuje i vědecký pokrok, validaci analytických metod a jejich dostatečnou citlivost. Kromě toho, že se hodnotí účinnost na cílové organismy, je důležité posouzení rizik i pro tzv. necílové organismy. Mezi necílové organismy vzhledem k jejich důležitosti jako opylovačů řadíme včelu medonosnou, samotářské včely a čmeláky (Como et al. 2017).

2.2. VČELY (APOIDEA)

Hmyz představuje velmi starou skupinu živočichů, která svým původem sahá do období mezi devonem a karbonem. Úplně nejstarší včely se mohly objevit již na paleokontinentu Gondwana, což byla původní oblast výskytu kvetoucích krytosemenných rostlin (Winston 1991). Včely patří do rodu *Apis*, který zahrnuje výhradně zástupce žijící v sociálním společenství (Beránek et al. 1956). Řadíme sem pět druhů tzv. moderních včel, a to běžnou včelu medonosnou *A. mellifera*, obří včely *A. dorsata* a *A. laboriosa*, včelu indickou *A. cerana* a trpasličí včelu *A. florea* (Winston 1991; Thomas et al. 2009).

2.2.1. Včela medonosná (*Apis mellifera*)

Včelařství je jedním z nejstarších oborů lidské činnosti a první zmínky o chovu včel v českých zemích se datují již do roku 993 n. l. V posledních letech je včelaření v Česku na vzestupu, tento vzestup úplně neplatí pro některé další státy EU, kde dochází spíše ke snižování počtu včelařů i včelstev (Erban et al. 2018). Včela medonosná je chována komerčně, a to hlavně ze dvou důvodů. Jak již bylo řečeno, patří mezi nejdůležitější opylovače, kromě toho ale také poskytuje celou řadu produktů jako je med, pyl, vosk, propolis nebo mateří kašičku (Bacandritsos et al. 2010). V současné době se v Česku nachází okolo 50 tis. včelařů, kteří ošetřují asi 550 tis. včelstev (Veselý et al. 2013; Erban et al. 2018). Proto lze Česko vzhledem k rozloze považovat za významnou zemi v daném odvětví. Velká hustota zavčelení však souvisí se snadnějším šířením včelích nemocí, a proto je důležité věnovat zdravotní problematice včelstev dostatečnou pozornost (Erban et al. 2018).

Kompletní taxonomické zařazení včely medonosné je uvedeno na obrázku 1. Druh *A. mellifera* se v průběhu vývoje diferencoval ve velké množství plemen (poddruhů), a to hlavně podle zeměpisné šířky, klimatu a snůškových podmínek. Na základě geografických

znaků rozlišujeme v zásadě tři skupiny včel, a to včelu asijskou, včelu africkou a včelu evropskou (Geisler et al. 1954).

Obrázek 1. Taxonomické zařazení *Apis mellifera*.

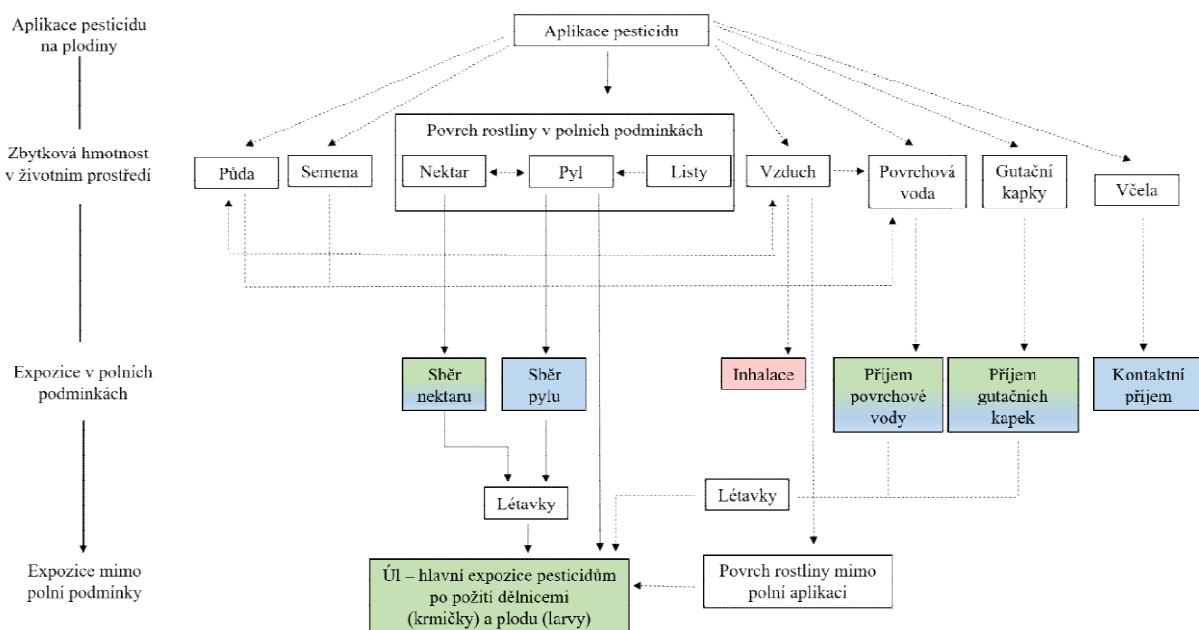
říše: Animalia
kmen: Arthropoda
podkmen: Tracheata
nadtřída: Hexapoda
třída: Insecta
podtřída: Pterygota
řád: Hymenoptera
čeleď: Apidae
rod: *Apis*
druh: *Apis mellifera*

Biologický druh *A. mellifera* je členěn do mnoha poddruhů podle celkového vzhledu, barvy a charakteristických znaků těla (Geisler et al. 1954). V Česku je nejhojněji zastoupena včela medonosná kraňská (*Apis mellifera carnica*, Pollmann 1879) lidově zvaná „kraňka“ (Přidal 2004).

Již dlouhou dobu je vědci studován globální pokles biologické rozmanitosti (Simmons et al. 2019), což zahrnuje i pokles hmyzí populace (Eisenhauer et al. 2019). Sánchez-Bayo & Wyckhuys (2019) uvádějí vysokou průměrnou míru poklesu entomofauny a naznačují, že 40 % světových druhů hmyzu by mohlo během několika desetiletí vyhnout. Někteří autoři však upozorňují na chybně provedenou metaanalýzu a zdůrazňují, že obzvláště v tomto tématu je důležitá kritická diskuze (Mupepele et al. 2019; Simmons et al. 2019). Tyto poklesy se týkají i opylovačů, včetně včely medonosné. V zimě na přelomu roku 2006/2007 byly hlášeny ve Spojených státech amerických (USA) nevysvětlitelné ztráty včelstev, které pokračovaly i v zimě 2007/2008. Tyto ztráty jsou známy pod názvem syndrom zhroucení včelstev (Colony Collapse Disorder, zkratka CCD). Na těchto ztrátách se podle dosavadních informací podílí 61 různých faktorů (vanEngelsdorp et al. 2009; Crenna et al. 2020). Mezi nejdůležitější faktory můžeme zařadit jednak abiotické faktory, jako je změna klimatu, pokles genetické variability, elektromagnetické záření, nutričně nedostatečná dieta či účinek pesticidů, a jednak biotické faktory kam patří různé choroby a paraziti včel (Bacandritsos et al. 2010; Simon-Delso et al. 2014; Gierer et al. 2019). Ze škůdců jsou včelstva nejvíce ovlivněna

globálním škůdcem ektoparazitickým roztočem *Varroa destructor* (Anderson & Trueman 2000) (Smith et al. 2013). Jak již bylo zmíněno, včely negativně ovlivňují také pesticidy. Studie odhalily, že v závislosti na způsobu aplikace pesticidu (listový postřik, ošetření semen apod.) a na jeho fyzikálně-chemických vlastnostech jsou pesticidy distribuovány rostlinou různým způsobem, a tak i obsah reziduí pesticidů v jednotlivých částech rostliny je různý. K expozici včel může dojít následujícími cestami i) prostřednictvím dermálního kontaktu (když hmyz létá na pole během aplikace pesticidu či kontaktem s ošetřeným povrchem rostliny), ii) při orálním příjmu kontaminovaného pylu, nektaru a vody, na poli nebo uvnitř úlu, iii) vdechováním kontaminovaného vzduchu (méně pravděpodobná ve srovnání s dermálním kontaktem či orálním příjmem) (Crenna et al. 2020), viz obrázek 2.

Obrázek 2. Přehled možných expozičních cest, kdy jsou včely vystaveny pesticidům. Upraveno podle Crenna et al. (2020).



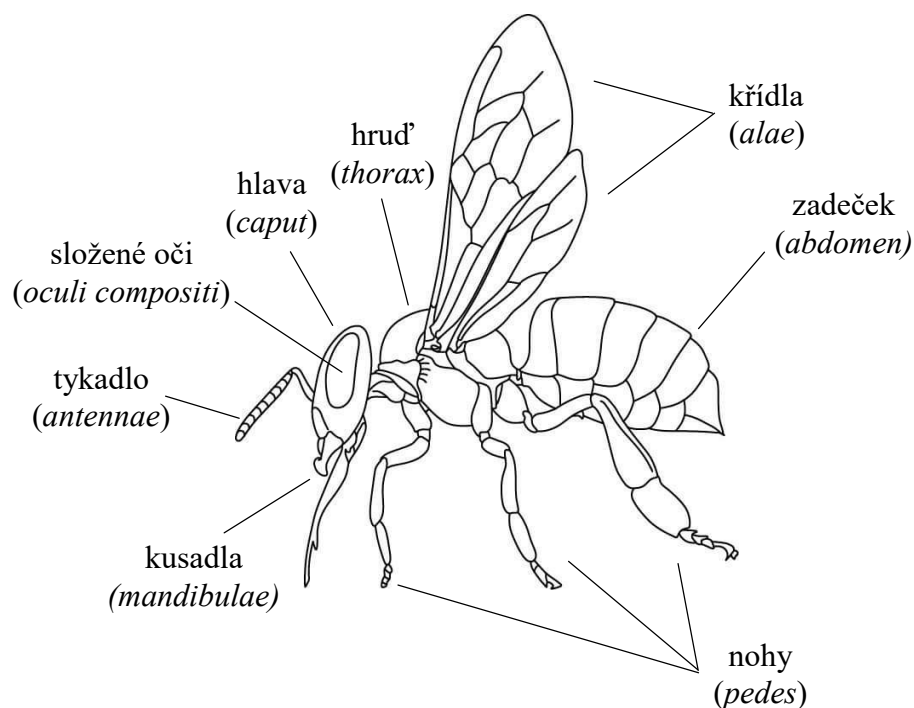
Legenda: Hlavní cesty jsou zvýrazněny tučnými čarami, další potenciální cesty jsou označeny přerušovanou čarou. Cesty expozice: **kontaktní příjem**, **orální příjem** a **přijem inhalační cestou**.

2.2.2. Biologie včely medonosné

Včely jakožto sociální hmyz žijí ve společenství označovaném jako včelstvo. Každé včelstvo je tvořeno jednou matkou, sezónně se vyskytujícími trubci a mnoha dělnicemi (Veselý et al. 2013). Stavba těla se může mezi jednotlivými kastami více či méně lišit, viz

obrázek 3. Společné pro všechny kasty je základní anatomické členění těla na tři základní části, a to na hlavu (*caput*), hrud' (*thorax*) a zadeček (*abdomen*) (Spürgin 2013). Tělo je pokryto pokožkou, která se skládá ze tří vrstev: kutikula, epidermis a podstavná blána (Veselý et al. 2013). Na hlavě jsou umístěny smyslové orgány, a to dvě složené oči (*oculi compositi*), tři jednoduchá očka (*ocelli*) a tykadla (*antennae*) (Přidal 1996, Žďárek 2013). Tykadla hrají velmi důležitou roli v orientaci a komunikaci s ostatními včelami. Rovněž informují o vlhkosti, teplotě a obsahu oxidu uhličitého ve vzduchu. Tyto hodnoty jsou důležité pro klimatizaci úlu (Spürgin 2013). Včely mají lízavě savé ústní ústrojí. Hrud' (*thorax*) je složena ze tří hrudních článků, a to předohrud' (*prothorax*), středohrud' (*mesothorax*) a zadohrud' (*metathorax*) a z jednoho zadečkového článku označovaného jako bedra (*propodeum*) (Veselý et al. 2013). Na hrudi jsou umístěny dva páry blanitých křídel (*alae*), která jsou na povrchu pokryta jemnými chloupky. Kromě křídel jsou na hrudi umístěny další orgány pohybu, a to tři páry nohou (*pedes*). Nohy však neplní pouze pohybovou funkci, ale včely je používají také při čištění těla a při sběru pylu. V zadečku včely je uloženo mnoho vnitřních orgánů, jako je převážná část trávicího ústrojí, vyměšovací ústrojí, pohlavní ústrojí, část cévní a nervové soustavy či vzdušnice a vzdušné vaky. U matky a dělnic vystupuje z posledního článku žihadlo (Spürgin 2013; Žďárek 2013).

Obrázek 3. Stavba těla včely medonosné.



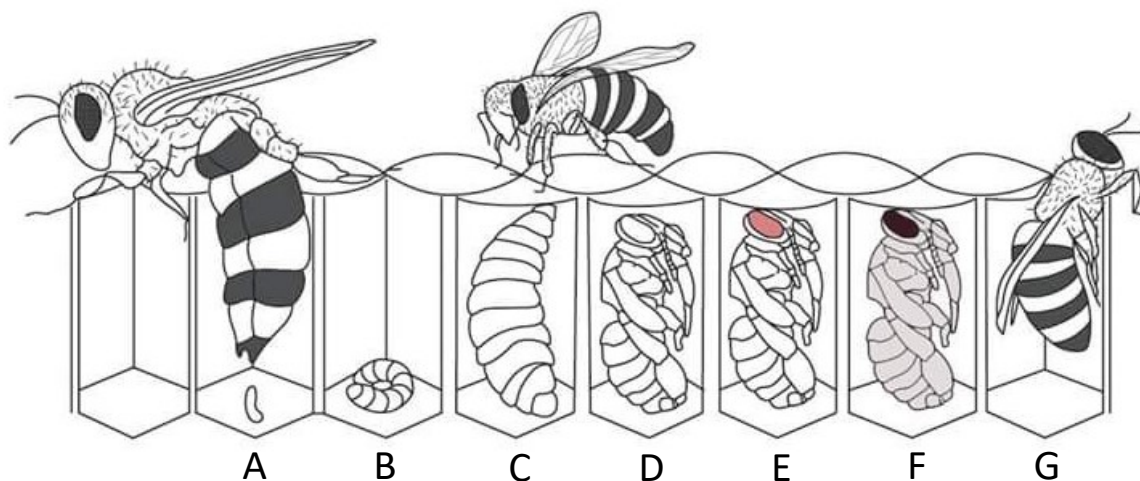
U včel můžeme nalézt celou řadu tělních soustav. V následujícím přehledu budou zmíněny ty, které souvisí s tématem této práce. Cévní soustava je u včel otevřená a krevní tekutina je označovaná jako hemolymfa. Protéká srdcem a hlavní cévou. Úkolem hemolymfy je roznášet po těle výživné látky, odplavovat škodlivé látky a nadbytečné živiny. Nemá za úkol přenášet kyslík, který je rozváděn systémem tracheálních buněk (Veselý et al. 2013). Hemolymfa včel je pro nás důležitý ukazatel fyziologického stavu organismu včel. Proteinovým zastoupením v hemolymfě můžeme sledovat rozdíly mezi kastami včel, mezi vývojovými stádii či můžeme sledovat přítomnost různých patogenů, např. roztoče *V. destructor* (Erban et al. 2016a). Žlázová soustava včel je velmi rozvinutá a zahrnuje žlázy, jež se účastní nejrůznějších dějů (Žďárek 2013). Hltanová žláza je vyvinutá pouze u dělnic a slouží k produkci mateří kašičky, kterou jsou krmeny všechny larvy až do věku tří dnů a larvy matek až do zavíčekování a matky po celý život (Spürgin 2013; Veselý et al. 2013).

Pohlavní ústrojí je uloženo v zadečkové části a je dokonale vyvinuté u matek a trubců, zatímco u dělnic je atrofované a není uzpůsobeno k páření s trubci (Spürgin 2013; Veselý et al. 2013). U matky je přítomen semenný váček, což je kulovitý útvar sloužící jako rezervoár spermií po spáření matky s trubci (Lucký 1984). U dělnic semenný váček chybí (Veselý et al. 2013). Páření matek s trubci probíhá za letu ve výšce asi 10-20 m nad zemí (Dicks 2019), obvykle daleko od úlu v místech označovaných jako trubčí shromaždiště (Tautz 2010). Matky a trubci na tato místa létají i několik kilometrů, jejich umístění a způsob, kterým ho najdou, však zůstává stále nejasný (Dicks 2019).

Včela medonosná se vyvíjí proměnou dokonalou, kdy na počátku vývoje je vajíčko, to se mění v larvu, larva v prekuklu, prekukla v kuklu a z kukly se nakonec líhne dospělec-imago (Veselý et al. 2013), viz obrázek 4. Matka začíná klást vajíčka na začátku zimy, již v lednu, v počtu několik desítek kusů denně (Lucký 1984; Žďárek 2013). Počet nakladených vajíček se postupně zvyšuje, až je v letních měsících dosaženo maxima, a to cca 1500 vajíček za den (Tautz 2010). V nakladeném vajíčku probíhá vývoj embrya, který trvá tři dny a po něm následuje stádium larvy (Tautz 2010; Veselý et al. 2013). Včelí larva vzhledově připomíná červa a její váhový přírůstek v čase je obrovský, v průběhu pěti dnů se zvýší její tělesná hmotnost až tisíckrát. Za tak rychlý vývoj je zodpovědná hodnotná potrava, kterou je krmná kašička. V prvních dnech je larva krmena výměškem hltanových žláz dělnic, tzv. mateří kašičkou, po 48 hodinách se v potravě objevuje příměs pylu a medu. Výjimkou je larva matky, která je po celou dobu svého vývoje krmena výměškem hltanových žláz (Žďárek 2013). Po dokončení larválního vývoje si larva uvnitř buňky upřede zámotek z vlákniny, jež vyrábí ze sekretu svých hltanových žláz. Po vytvoření tohoto zámotku dělnice buňky

zavíčkují a larva projde celkovou přeměnou přes stádium prekukly, kukly až v dospělou včelu (Veselý et al. 2013). Kukla včel má perleťově bílou barvu a je členěna na hlavu, hrud' a zadeček. Přeměna probíhá velmi rychle a podle zbarvení těla a složených očí můžeme rozeznat jednotlivé stupně vývoje (Tautz 2010). Nejprve složené oči zružovějí, poté zčervenají a nakonec zhnědnou, následně se chitinizuje pokožka (Duay et al. 2003). Vzhledem k tomu, že stádium červených očí je poměrně snadno rozpoznatelné a trvá poměrně krátkou dobu, je vhodné právě v tomto stádiu studovat možné fyziologické a vývojové zvláštnosti, které mohou být způsobeny přítomností patogenů (Erban et al. 2014). Podobně jako kukla ve stádiu červených očí je vhodný objekt pro studium fyziologie, fyziologických změn a onemocnění včel exaktně časově definované stádium čerstvě vylíhlá mladuška (Erban et al. 2016b). Mladuška opuštěním buňky v podstatě zakončuje stádium metamorfózy (Winston 1991). Délka vývoje jednotlivých kast včely medonosné se poměrně dost liší, celkový vývoj dělnice trvá průměrně 21 dní, matky 16 dní a trubce 24 dní (Tautz 2010; Veselý et al. 2013). U dělnic dochází po vylíhnutí k dělbě práce, kdy dělnice v závislosti na věku vykonává v úle různé funkce. Nejprve se stane uklízečkou, poté krmičkou, kojičkou, stavitelkou, strážkyní a nakonec létavkou (Crailsheim 1996; Ben-Shahar & Robinson, 2001).

Obrázek 4. Vývoj včely medonosné; **A** - vajíčko, **B** - larva, **C** - prekukla, **D** – kukla, **E** – kukla ve stádiu červené oči, **F** – kukla ve stádiu hnědé oči, **G** – mladuška.



2.2.3. Význam včel

Včela medonosná má pro člověka velký význam hned v několika směrech. Je využívána jako modelový organismus ve vývoji a výzkumu. Funguje také jako bioindikátor zamoření prostředí různými chemickými látkami (Kattwinkel et al. 2015; Quigley et al. 2019), protože při sběru potravy přichází do kontaktu se všemi složkami přírody, jako je voda, půda, ovzduší,

rostliny a stromy (Přidal 2005). Nejdůležitější je opylovací schopnost včel, neboť se řadí k nejdůležitějším přirozeným opylovačům na Zemi (Bacandritsos et al. 2010). Včely jako takové přispívají k přirozenému ekosystému a pokles jejich populací může ohrozit opylení jak planě rostoucích rostlin, tak i cíleně pěstovaných plodin, což potenciálně ohrožuje biologickou rozmanitost a produkci potravin (Simon-Delso et al. 2014). Průměrná vzdálenost, na kterou se včely vzdalují od úlu, je 2 až 4 km. Pouze zlomek květů je odkázán na jeden jediný druh hmyzu, který opylení zajišťuje, ale žádný jiný opylovač není v souhrnu tak účinný jako právě včela medonosná. Asi 75 % všech celosvětově důležitých druhů plodin je opylováno hmyzem, z toho 80 % včelami medonosnými (Klein et al. 2007). U ovocných stromů zajišťují včely opylení až 90 % květů. Přítomnost včel na polích může pozitivně ovlivnit výnosy zemědělských plodin, jako například zvýšení výnosu řepky olejky o 15-40 % oproti polím, kde je snížený výskyt opylovačů (Catarino et al. 2019). Asi na 40 000 druhů rostlin se odhaduje počet druhů kvetoucích rostlin odkázaných na opylení včelami, kterým by se bez jejich návštěvy dařilo daleko hůře. Tento počet je obdivuhodný a svědčí o tom, že včely jsou v této oblasti nenahraditelné. Uvádí se, že jedno včelstvo je schopno za jeden den navštívit několik milionů květů (Tautz 2010).

Včely jsou významné nejen z pohledu opylení kulturních rostlin a zemědělských plodin, ale poskytují také včelí produkty, kam patří med, pyl, vosk, propolis a mateří kašička (Bacandritsos et al. 2010). Med je nejznámější a nejdůležitější produkt včel. Je tvořen a zpracován včelami z nektaru nebo medovice, které včely sbírají, přenášejí v medném váčku a přeměňují je pomocí výměšků svých hltanových žláz na med (Winston 1991). Ten dále podléhá zrání, při kterém dochází k odstranění přebytečné vody, čímž je zajištěno, že med není náchylný ke kvašení a nekazí se (Veselý et al. 2013). Včela létavka dokáže v medném váčku přenést 20 až 40 mg nektaru, jehož objem během zahuštění klesne asi na polovinu. Jedno včelstvo je schopno za rok vyprodukovat asi 40 až 80 kg medu, v závislosti na kondici včelstva a jeho umístění (Tautz 2010; Seeley 2019). Med je rovněž součástí tradiční medicíny v mnoha kulturách (Gómez-Caravaca et al. 2006). Dalším produktem včel je pyl, jehož sběr zajišťují ve včelstvu včely létavky. Pylová zrna jsou samčí pohlavní buňky vyšších rostlin, jež pro včely představuje zdroj bílkovin. Po návštěvě květu vytvoří z pylu včela pylovou rousku, kterou přenáší na zadních nohách do úlu, kde je pyl uložen do pylových plástů (Almeida-Muradian et al. 2005). Při jednom letu je včela schopna přinést 15 mg pylu a celé včelstvo za jeden rok dopraví do úlu asi 20-30 kg pylu (Tautz 2010; Veselý et al. 2013). Pyl zpracovaný včelami a uložený v plodovém plástu se nazývá včelí chléb neboli perga (Barene et al. 2015). Včelí vosk je metabolickým produktem včel, který se tvoří ve voskotvorných

žlázách dělnic, jež jsou uloženy na břišní straně zadečku a jsou zakončeny voskovými zrcátky (Žďárek 2013). Včely vosk používají k výrobě plástů, které slouží jako obytný prostor, místo pro skladování zásob a také zde včely odchovávají plod (Veselý et al. 2013). Propolis jsou pryskyřičnaté látky rostlinného původu, které jsou zpracovávány včelami a využívány v hnízdě a okolo něj. Pouze malý podíl propolisu pochází z květů, většinu včely nasbírají na pupenech, listech nebo plodech různých rostlin, jako je například topol, bříza, olše či jehličnany. Propolis je za běžné teploty tvrdý a křehký, ale při úlové teplotě se stává měkký a lze ho tvarovat (Tautz 2010; Veselý et al. 2013). Včelami je využíván jako stavební a ochranná látka, která slouží k vyztužení buněk plástů, k zatmělení štěrbin a trhlin, k opravě plástů a k těsnění česna (Marcucci et al. 2001; Tautz 2010). Mateří kašička je hustá smetanově žlutá směs výměšků hltanových a kusadlových žláz dělnic, která je využívána jako strava pro larvy včel (Veselý et al. 2013). Právě mateří kašička rozhoduje o tom, zda se z larvy vylíhne dělnice či matka. O tom nerozhoduje pouze doba krmení mateří kašičkou, ale také její složení. V případě, že je v kašičce podíl jednoduchých cukrů okolo 35 %, z larvy se vyvine matka. Pokud je podíl okolo 10 %, vyvine se z larvy dělnice (Tautz 2010).

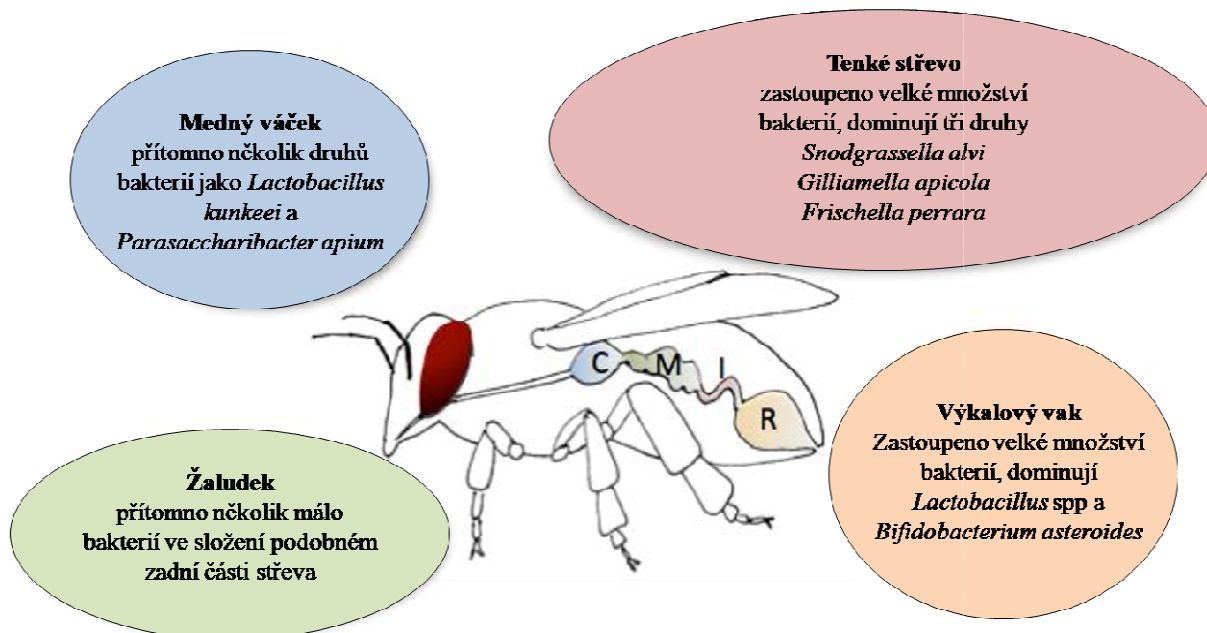
2.2.4. Mikrobiom včely medonosné

Výzkumy v poslední době naznačují, že včely představují dobrou příležitost pro studium interakce mezi biologií hostitele a střevní mikrobiotou. Vhodné složení střevního mikrobiomu je důležité pro metabolismus hostitele, endokrinní signalizaci a správné fungování imunitního systému (Zheng et al. 2018; Ellegaard & Engel 2019). Ve střevech dělnic včely medonosné jsou přítomny různé skupiny mikroorganismů. Střevní mikrobiom zahrnuje kromě symbiotických a patogenních mikroorganismů také mikroorganismy komenzální. Jejich množství, složení a vzájemné interakce mohou významně ovlivňovat zdravotní stav včel (Engel et al. 2016). Význam a důležitost nepatogenní mikrobiální komunity se staly oceňovanými teprve nedávno (Clemente et al. 2012). Velký vliv na studium mikrobiomu včel měly metody založené na analýze DNA, hlavně sekvenování nové generace (anglicky next-generation sequencing; zkratka NGS) (Alberoni et al. 2016). Tyto nové metody umožnily klasifikaci střevních mikroorganismů na základě krátkých úseků DNA (Moran 2015). Studie ukázaly, že jak u obratlovců, tak i u bezobratlých podporují symbiotické bakterie imunitní systém a hrají klíčovou roli v obraně proti patogenům (Chu & Mazmanian 2013; Engel et al. 2016; Zheng et al. 2018) a nezanedbatelný význam má mikrobiom také při trávení (Hubert et al. 2017). Dále ovlivňuje endokrinní signalizaci a přírůstek hmotnosti (Zheng et al. 2018). Symbiotické bakterie disponují také geny, které

kódují enzymy (celulázy, hemicelulázy a lignázy) nezbytné pro čerpání energie z rostlinné potravy a produkují také mastné kyseliny, aminokyseliny a další živiny a vitamíny potřebné pro zdraví včel (Alberoni et al. 2016).

Moran (2015) uvádí hlavní symbiotické bakteriální druhy osidluující trávicí trakt dělnic. Trávicí trakt dělnic je rozdělen na několik částí, začíná medným váčkem, následuje žaludek, tenké střevo a ukončen je výkalovým vakem, viz obrázek 5. Dospělá dělnice obsahuje ve střevech až 1 bilion bakteriálních buněk, z toho 95 % bakterií je umístěno v zadní části střeva (Powell et al. 2014). Mezi dominantní druhy u včel patří *Gilliamella apicola*, *Frischella perrara*, *Snodgrassella alvi*, *Lactobacillus mellis*, *L. mellife*, *L. helsingborgensis*, *L. melliventris*, *L. kimbladii*, *L. kunkeei*, *Bifidobacterium asteroides*, *B. actinocoloniiforme*, *B. bohemicuma* *Parasaccharibacter apium* (Moran 2015). Typického složení střevního bakteriomu dělnic je dosaženo třetí až pátý den po vylíhnutí dospělce (Powell et al. 2014) a toto složení se už výrazně nemění ani po přechodu dělnice z vnitřního prostředí úlu na pastvu (Corby-Harris et al. 2014).

Obrázek 5. Části střeva včely medonosné a zastoupení symbiotických bakterií, převzato z Moran (2015); C = medný váček, M = žaludek, I = tenké střevo, R = výkalový vak



Složení a vyváženost střevního mikrobiomu včel mohou být negativně ovlivněna antropogenní činností, jako je málo pestrá a nutričně nedostatečná dieta nebo používání antibiotik při léčbě bakteriálních infekcí (Tian et al. 2012; Engel et al. 2016). Používání antibiotik k tlumení chorob včel však v Česku zakazuje zákon č. 166/1999 Sb. o veterinární

pěči a o změně některých souvisejících zákonů („veterinární zákon“) (Česko 1999). Dalším antropogenním faktorem, který významně ovlivňuje mikrobiom včel, je intenzivní používání POR. Tyto přípravky mění strukturu a funkci mikrobiomu a tím ovlivňují funkci střeva včel a jejich celkový zdravotní stav (Kakumanu et al. 2016). Glyfosát je jednou účinnou látkou z POR, jež může narušit střevní mikroflóru a ovlivnit tím zdraví včel (Motta et al. 2018). Výzkum ukázal, že glyfosát vyvolal u dělnic silný pokles bakterie *S. alvi* a mírný pokles *G. apicola* (Blot et al. 2019). Střevní mikrobiom mohou ovlivnit také patogeny včel, jako je bakterie *Melissococcus plutonius*, původce hniloby včelího plodu (Erban et al. 2017b), *Paenibacillus larvae*, původce moru včelího plodu (Erban et al. 2017c) či fungální patogeny hmyzomorka včelí (*Nosema apis*) (Zander, 1909) a *Nosema ceranae* (Fries, 1996). Vliv na mikrobiom včel byl prokázán rovněž u parazitů včel, a to u ektoparazitického roztoče *V. destructor* a trypanosomy *Lotmaria passim* (Hubert et al. 2017).

2.3. PATOGENY VČELY MEDONOSNÉ

Včely jsou napadány řadou parazitů a patogenů, z nichž některé je ovlivňují a škodí jim více a jiné méně (Veselý et al. 2013). Z bakteriálních onemocnění se jedná o hnilobu a mor včelího plodu (Forsgren et al. 2018), dále jsou to různá virová onemocnění (Runckel et al. 2011). Opomenout nesmíme ani parazity. Nejčtenější a nejvýznamější je ektoparazitický roztoč *V. destructor* (Le Conte et al. 2010). Kromě něj jsou to také další parazité jako endoparazitický roztoč *Acarapis woodi* (Rennie, 1921) (Sammataro 2006), další ektoparazit včel roztoč *Tropilaelaps mercedesae* (Dainat et al. 2009) či střevní parazité *Lotmaria passim* (Ravoet et al. 2015), *Crithidia mellificae* (Runckel et al. 2014), *N. apis* (Forsgren & Fries 2010) a *N. ceranae* (Tritschler et al. 2017). Obecně dělíme nemoci včel na nakažlivé, které se mohou přenášet na ostatní jedince a nenakažlivé, kam řadíme hynutí plodu hladem, hynutí plodu zimou či přehřátím, průjemnebo zácpu včel (Veselý et al. 2013). V posledních 50 letech došlo k vývoji molekulárně-genetických metod, což umožnilo lepší identifikaci včelích patogenů a vedlo to také k objevu nových, dosud neznámých bakteriálních, plísňových i virových nemocí (Evans & Spivak 2010). Tyto metody také umožňují sledování odpovědi včel na přítomnost patogenu a sledování tzv. host-patogen interakcí, a to i z pohledu sledování vlivu více patogenů najednou. Velmi často nemoci postihují pouze určitou skupinu včelího společenství, proto se nemoci včel často rozdělují na nemoci plodu, dospělých včel či matky (Lucký 1984).

U čmeláků se také vyskytuje celá řada patogenů. Některé z nich jsou stejné jako u včel. U čmeláků byly detekovány virus deformovaných křídel (Genersch 2005b) a virus akutní paralýzy včel, dále také Entomopox virus. Z bakterií šlo převážně o zástupce rodu *Bacillus*, *Paenibacillus* a *Spiroplasma* (Schmid-Hempel 2001), u matek navíc *Pseudomonas apisepctica* (Cankaya & Kaftanoglu 2006). Častým patogenem u čmeláků je trypanozoma *Crithidia bombi*, která cizopasí ve střevech čmeláků (Schmid-Hempel & Tognazzo 2010) a hlístice *Sphaerularia bombi*, napadající samičky (Pavelka & Smetana 2003). Najít můžeme i roztoče, a to hlavně druhy *Parasitus fucorum* a *Kuzinia laevis* (Pouvreau, 1973), na rozdíl od včel ale na čmelácích neparazituje roztoč *V. destructor* (Fürst et al. 2014). Obdobně jako u včel může být i u čmeláků problémem vnitrobuněčný parazit *Nosema bombi* (Otti & Schmid-Hempel 2007).

2.3.1. Bakterie

Bakterie jsou původci dvou významných onemocnění včel, a to moru včelího plodu a hnilyby včelího plodu. Jak je již z názvu patrné, obě tyto choroby postihují včelí plod-larvy a dospělé včely fungují jako přenašeči těchto bakterií (Ebeling et al. 2016).

Mor včelího plodu je bakteriální onemocnění, jehož původcem je sporulující bakterie *Paenibacillus larvae* (Maggi et al. 2016). *Paenibacillus larvae* je na základě fenotypových a genotypových rozdílů klasifikován na dva poddruhy, a to *P. larvae* subsp. *larvae* a *P. larvae* subsp. *pulvifaciens* (Heyndrickx et al. 1996). Následné studie a analýzy využívající polymerázovou řetězovou reakci (PCR: anglicky polymerase chain reaction) ukázaly rozdíly v biochemických vlastnostech izolátů (Neuendorf et al. 2004) i rozdíly ve schopnosti vyvolat úmrtnost včel (Genersch et al. 2005a). Proto Genersch et al. (2006) navrhli klasifikaci *P. larvae* do 4 genotypů označených ERIC I–IV, tento systém klasifikace byl přijat vědeckou komunitou a je používán dodnes. Beims et al. (2020) izolovali ze vzorku španělského medu nový genotyp a pojmenovali ho ERIC V. Nejčastějším genotypem je ERIC I, méně často je identifikován genotyp ERIC II, genotypy ERIC III a ERIC IV nebyly hlášeny celá desetiletí (Genersch 2010; Schäfer et al. 2014). Jednotlivé genotypy se liší svojí virulencí, kterou lze determinovat proteomickou analýzou exoproteinové frakce (Erban et al. 2019b). Mor včelího plodu je nejzávažnější smrtelné střevní onemocnění včelích larev (Ebeling et al. 2016), a to hlavně kvůli vysoké odolnosti spor, které mohou v prostředí úlu, anebo okolo úlu, přežít i desítky let. Spory odolávají vysokým a nízkým teplotám i chemickým látkám (Genersch 2010). Šíření nákazy probíhá přes potravu, kdy jsou larvy krmeny již spory kontaminovanou potravou. V důsledku toho dochází ke tvorbě nedostatečného množství

plodu, což vede až ke kolapsu celého včelstva (Ebeling et al. 2016). Mor včelího plodu se vyskytuje téměř po celém světě a v některých zemích je k jeho léčbě povoleno používání antibiotik (Khilnani & Wing 2015). V rámci Česka není dle platných veterinárních směrnic léčba antibiotiky povolena a v případě nákazy je nařízena kompletní likvidace napadeného včelstva včetně úlu a veškerého vybavení (Veselý et al. 2013). Používání antibiotik se navíc nedoporučuje z několika důvodů: i) selekce rezistentních kmenů *P. larvae*, ii) přítomnost reziduí antibiotik ve včelích produktech, iii) spuštění tvorby vegetativních buněk *P. larvae*, které mohou být v budoucnu novým zdrojem této infekce (Khilnani & Wing 2015).

Hniloba včelího plodu je onemocnění, jehož původcem je grampozitivní bakterie *Melissococcus plutonius* (Budge et al. 2014), kmeny této bakterie se na základě různých geografických lokalit liší virulencí (Lewkowski & Erler 2018). Tato nemoc včel je rozšířená po celém světě, ale v mnoha oblastech se nemoc vyskytuje pouze s občasnými, sezónními ohnisky. V některých zemích je výskyt jiný. Například ve Švýcarsku se od konce 90. let 20. století dramaticky zvýšil výskyt této nemoci (Forsgren et al. 2013). Ve Velké Británii se hniloba včelího plodu stala nejrozšířenější bakteriální chorobou plodu (Budge et al. 2011) a v Norsku v roce 2010 vypukla choroba po 30letém období nepřítomnosti (Dahle et al. 2011). Obdobná situace nastala v Česku, kdy bylo v roce 2016 v Krkonošském národním parku (KRNAP) ověřeno klinické ohnisko bakterie *M. plutonius* po 40leté nepřítomnosti (Kamler et al. 2016b; Erban et al. 2017c). Šíření nákazy obdobně jako u moru včelího plodu probíhá kontaminovanou potravou. V některých případech může dojít k tomu, že napadená larva infekci nepodlehne a patogenní zárodky vyloučí ve výkalech, čímž je vytvořeno další ohnisko infekce (Forsgren 2010). Výskyt hniloby včelího plodu je v Česku spíše ojedinělý, a to díky radikálnímu postupu při tlumení nákazy, který je totožný jako u moru včelího plodu (Veselý et al. 2013). Obdobně jako u moru včelího plodu se k léčbě hniloby v některých státech používají antibiotika (Forsgren 2010), což je v Česku zakázáno.

2.3.2. Viry

Viry nebyly dříve považovány za velkou hrozbu pro včelstva, protože je známo, že ve včelstvech většinou přetrvávaly, aniž by způsobovaly velké ztráty. Tato situace se podstatně změnila v době, kdy na *A. mellifera* z *A. cerana* přešel roztoč *V. destructor*, což prokazuje i recentní výzkum (Martin et al. 2012). Zatímco v tu samou dobu v souvislosti s roztočem *V. destructor* umíraly včely na virus akutní paralýzy (ABPV) v Německu nebo Rusku, nebyly obdobné případy zachyceny ve Velké Británii, kde se roztoč *V. destructor* ještě nevyskytoval (Allen et al. 1986). Dosud bylo u včel identifikováno více než 20 včelích virů (McMenamin

& Genersch 2015) a většina z nich je spojována s parazitací roztočem *V. destructor* (Kevan et al. 2006; Erban et al. 2015). Postupně jsou objevovány další nové viry jako například Lake Sinai virus (LSV) (Ravoet et al. 2015). Většina virů, která byla u včel dosud identifikována, patří mezi RNA viry patřící k picornavirům (Chen et al. 2006; Maggi et al. 2016). Jejich genom se skládá z jednořetězcové RNA molekuly obalené proteinovou kapsidou a jejich replikace probíhá v cytoplazmě hostitelské buňky (Chen et al. 2006). Dále jsou zastoupeny dva DNA viry a několik nezařazených virů (Hou et al. 2016).

Včely jakožto sociální hmyz jsou mezi sebou v neustálém kontaktu, což vede ke snadnému šíření virů v rámci včelstva, a to horizontální nebo vertikální cestou. Při horizontálním přenosu dochází k přenosu virů v rámci jedné generace včel. Zde rozlišujeme přenos založený na blízkém fyzickém kontaktu s napadeným jedincem, pozřením infikované potravy či pobytem v kontaminovaném prostředí (Chen et al. 2006; Moore et al. 2014) nebo přenos prostřednictvím přenašeče. Nejvýznamnějším přenašečem virů u včel je parazitický roztoč *V. destructor*, který funguje jako vektor v přenosu virů z infikovaných jedinců na zdravé včely (Le Conte et al. 2010; Erban et al. 2015). Kromě odebírání živin sáním může roztoč vyvolat replikaci latentních virů, které jsou již přítomny v hostitelském organismu (Wegener et al. 2016). Vertikální přenos je založen na přenosu infekce z rodiče na potomstvo (Chen et al. 2006).

Mezi nejvýznamnější viry řadíme virus deformovaných křídel (DWV), virus akutní paralýzy včel (ABPV) a virus chronické paralýzy včel (CBPV) (Maggi et al. 2016). DWV je globálně rozšířený virus (Giacobino et al. 2016). Vyskytuje se ve třech variantách, z nichž nejčastější je DWV-A, následovaná DWV-B a zřídka se vyskytující DWV-C (Ryabov et al. 2019). Velice často se ve včelstvech objevuje v kombinaci s roztočem *V. destructor* (Erban et al. 2015) a infekce je rozpoznatelná na první pohled (Moore et al. 2014). U včel způsobuje morfologické deformace (malá velikost těla, zkrácení zadečku, deformace křídel), které snižují vitalitu a dlouhověkost a mají vliv na dobu letu a navigační schopnosti (Le Conte et al. 2010). ABPV a CBPV se vyznačují ochrnutím, třesem a uskupením nelétavých lezoucích včel u vstupu do úlu. ABPV byl detekován jak u plodu včel, tak u dospělých jedinců a hromadí se v oblasti mozku a hltanových žláz. Hltanové žlázy jsou zodpovědné za produkci mateří kašičky, kterou jsou krmeny larvy, pravděpodobně díky tomu infekce tímto virem přetrvává ve včelstvu. ABPV se vyznačuje vyšší virulencí než DWV a obvykle způsobuje uhynutí kolonie v rámci jednoho období (Sammataro & Yoder 2012). Pro detekci včelích virů nachází využití mimo RT-PCR a sekvenace nové generace také proteomické přístupy, zahrnující jak

gelovou, tak bezgelovou analýzu. Výhodou proteomického přístupu je, že dokáže určit stav replikace viru v hostiteli (Erban et al. 2015).

2.3.3. Parazité

V současnosti je největší včelařskou hrozbou kosmopolitní ektoparazitický roztoč *V. destructor* (Le Conte et al. 2010; Erban et al. 2015). Původně byl popsán jako *Varroa jacobsoni* (Oudemans, 1904), který přirozeně parazituje na včele východní *A. cerana*. Podle nové klasifikace, provedené na přelomu 20. Století *V. jacobsoni* zahrnuje devět haplotypů, které napadají *A. ceranae* převážně v Asii. Nové jméno *V. destructor* je dáno šesti haplotypy a tento parazit je rozšířen po celém světě (Anderson & Trueman, 2000). Roztoč *V. destructor* pochází z Asie, kde parazituje na svém původním hostiteli *A. cerana*, která má proti němu vytvořenou přirozenou ochranu (Capinera 2008; Moore et al. 2014), ta spočívá ve schopnosti včel velmi rychle a účinně odstranit roztoče z těl dospělých včel i z plodu. Oproti tomu *A. mellifera* vykazovala nízkou frekvenci tohoto čistícího chování a obecně nedokázala odstranit roztoče, jak z dospělých včel, tak z plodu (Ying-Shin et al. 1987). Pravděpodobně během transportů *A. mellifera* na východ se roztoč *V. destructor* adaptoval na nového hostitele a následným transportem včel a prodejem matek se roztoč dostal postupně až do míst, kde se včela východní nenachází (Rosenkranz et al. 2010; Veselý et al. 2013; Titěra 2017). V 50. letech 20. století byl zjištěn v Číně a poté se přes Sovětský svaz rozšířil do Evropy. V roce 1978 byl zaznamenán první nález na Slovensku, odtud se poté dostal do Česka (Titěra 2017).

Životní cyklus roztoče *V. destructor* je velmi důmyslný. Roztoč má dvě životní fáze -foretickou a reprodukční. Při foretické fázi je dospělý roztoč přichycený k dospělé včele a živí se její hemolymfou. Hlavní obětí parazitace je stádium kukly (Büchler et al. 2010). Zatímco u včely *A. cerana* parazituje pouze na trubčím plodu, tak u včel *A. mellifera* je to také na dělničím plodu (Rosenkranz et al. 2010). Jako reprodukční stádium je označován stav, kdy se oplozená samice roztoče dostane do buňky s larvou a po zavíčkování buňky během jejího vývoje dochází k rozmnožování, jehož výsledkem je 5-6 vajíček v každé buňce (Calderón et al. 2010; Moore et al. 2014). Samice roztoče jsou dospělými včelami přenášeny schované pod jejími sternity a jsou dále rozšiřovány v rámci jednoho včelstva, ale také mimo něj během shánění potravy či rojení (Rosenkranz et al. 2010). Tato fáze je označována jako foretická (Moore et al. 2014). Všechna vývojová stádia roztoče se živí hemolymfou včelího plodu a dospělých jedinců. Potravu mohou tvořit také buňky tukového tělíska (Ramsey et al. 2019). Při napadení včely tímto roztočem dochází k fyzickým i fyziologickým škodlivým účinkům. Roztoč jim způsobuje fyzická poranění (Kanbar & Engels 2003) a snižuje obsah

proteinů v hemolymfě (Erban et al. 2015). Roztoči oslabují imunitní systém a potlačují expresi genů souvisejících s imunitou. Jak již bylo uvedeno, byla také prokázána úloha roztoče jako vektoru v přenosu virů z infikovaných jedinců na zdravé včely (Le Conte et al. 2010; Moore et al. 2014; Erban et al. 2015). Roztoč *V. destructor* má navíc vliv na složení symbiotických bakterií včel (Hubert et al. 2016), které jsou významné pro správné fungování imunitního systému (Moran 2015). K potlačení roztoče lze využít více přístupů. Běžně jsou využívány akaracidy, jejichž nevýhodou je možný vznik rezistence (Sammataro et al. 2005; Kamler et al. 2016a). Podle mnoha studií mají včely schopnost přirozeně se adaptovat na roztoče a vyvinout si mechanismy, jimiž se s ním vypořádají (Panziera et al. 2017; Conlon et al. 2019; Seeley 2019).

Akarapidóza neboli roztočiková nákaza včel nebyla v Česku diagnostikována od roku 1986, ale je hlášena z okolních států (Veselý et al. 2013). Jedná se o parazitární onemocnění, jehož původcem je *Acarapis woodi* (roztočik včelí), který spolu s *V. destructor* patří do řádu Acarina (roztoči) (Sammataro 2006; Veselý et al. 2013). Zamoření včelstva tímto roztočem se může projevit několika způsoby, a to snížením množství plodu, slabšími zimními klastry, zvýšenou spotřebou medu či nižšími výnosy medu. Jsou známy i případy téměř úplného vyhynutí včelstva (Sammataro 2006).

Ektoparazitické roztoči rodu *Tropilaelaps* se podobně jako *V. destructor* původně vyskytovali hlavně v asijských zemích (Dong et al. 2017). Stejně jako *V. destructor* však dokázal přejít na západní včelu *A. mellifera*, poprvé byl objeven na Filipínách (Delfinado & Baker 1961). S roztočem *V. destructor* toho má společného více. Rovněž napadá plod a je schopen odsávat hemolymfu (Burgett & Akwatanakul 1985). Může být také vektorem pro přenos DWV (Dainat et al. 2009) a ovlivňovat imunitní odpověď hostitele (Khongphinitbunjong et al. 2015).

Dalším parazitem, který se u včel vyskytuje, je trypanozoma *Lotmaria passim* (Ravoet et al. 2015) původně popsána jako *Crithidia mellificae* (Ravoet et al. 2015; Hubert et al. 2017). Patří mezi jednobuněčné eukaryotické bičíkovce, jež poškozují střevní buňky včel a mají za následek snížení celkové kondice hostitele (Hubert et al. 2017).

Dalším velmi významným parazitem včel jsou houby rodu *Nosema* (viz kap. 2.3.4.).

2.3.4. Houby

Houby z rodu *Nosema* spp. jsou obligátní intracelulární parazité dospělých včel, ačkoliv mohou infikovat také med a včelí larvy (Hubert et al. 2017; Paris et al. 2018). V dnešní době jsou známy dva druhy, které vyvolávají znepokojení, a to *Nosema apis*, která infikuje pouze *A. mellifera* a *Nosema ceranae*, jež infikuje jak *A. mellifera*, tak *A. cerana* (Sammataro & Yoder 2012). U včel napadají střevní sliznici, což vede k poruchám trávení a ke zkrácení životnosti včel (Higes et al. 2006). U infikovaných včel bylo zjištěno nižší množství proteinů a změna ve složení mastných kyselin v hemolymfě včel, což se opět může negativně podílet na jejich zdraví (Forsgren & Fries 2010). Výskyt tohoto patogenu v Česku značně kolísá, odhaduje se ale, že je napadeno asi 50 % včelstev (Veselý et al. 2013). Kromě toho, že tato houba sama o sobě představuje významný faktor, jenž se podílí na ztrátách včelstev, negativně ovlivňuje i mikrobiom včel (Chantawannakul et al. 2016; Hubert et al. 2017) a velmi nebezpečná je také v kombinaci s POR (Pettis et al. 2013). K detekci těchto houbových patogenů se běžně používají především mikroskopické metody, jako je například světelná mikroskopie (Fries et al. 2013).

Další houbové onemocnění se týká včelího plodu. Jedná se o onemocnění označované jako zvápenatění včelího plodu, jehož původcem je *Ascospaera apis* (Veselý et al. 2013). Tato houba se vyskytuje po celém světě a napadá včelí larvy. Po požití začnou spory v žaludku larvy klíčit, až vyrostou do dlouhých vláken, která proniknou střevní dutinou až na povrch a larvu obalí (Qin et al. 2006; Chantawannakul et al. 2016), což připomíná vyschlé vápno a odtud je odvozen název této nemoci (Veselý et al. 2013). Tyto obalené larvy jsou velmi infekční a spory se snadno šíří přes skladované zásoby či přímým kontaktem (Qin et al. 2006).

Další skupina hub, která u včel způsobuje onemocnění, jsou fakultativní paraziti z rodu *Aspergillus*. Primární druh, který je zodpovědný za infekce u včel, je *Aspergillus flavus*, ve vzácnějších případech mohou být infekce vyvolány také druhy *Aspergillus fumigatus* a *Aspergillus niger*. Patogenní efekt těchto hub se obvykle projevuje pouze u kolonií oslabených dalšími faktory, jako je přítomnost jiného onemocnění nebo nevhodné životní prostředí. Infekce těmito houbami vede k tomu, že jsou v plodovém plástu přítomny tvrdé, mumifikované larvy (Samataro & Yoder 2012; Foley et al. 2014).

2.4. ZATÍŽENÍ ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ XENOBIOTIKY

Jako xenobiotika jsou označovány chemikálie, které se nepřírozně vyskytují v životním prostředí a vznikají lidskou činností (Hamsavathani et al. 2015). Mezi hlavní xenobiotika patří pesticidy, rozpouštědla, alkany, polycyklické uhlovodíky, antibiotika, syntetická azobarviva a znečišťující látky jako jsou dioxiny a polychlorované bifenyly (Sinha et al. 2009). Xenobiotické sloučeniny v životním prostředí přetrvávají relativně dlouho, protože jsou vysoce termodynamicky stabilní (Hamsavathani et al. 2015). Přibližně od roku 1962 se včely a jejich produkty stále častěji využívají ke sledování znečištění životního prostředí, a to těžkými kovy v městských průzkumech (Skorbiłowicz et al. 2018), pesticidy ve venkovských oblastech a také radionukleotidy (Celli & Maccagnani 2003). Včela medonosná je dobrým bioindikátorem, protože je neoddělitelně spjata s přírodním prostředím, ve kterém žije (Skorbiłowicz et al. 2018).

POR jsou látky v současnosti hojně využívané v zemědělství. Bez používání těchto látek se v dnešní době neobejdeme, ale tyto látky by měly být vždy využívány s rozmyslem a v souladu s platnými směrnici a vyhláškami (Erban 2013a). Pokud se pesticidy používají tak, jak mají, jsou rizika spojená s jejich použitím minimální. Například Erban et al. (2019) ve svém výzkumu studovali přítomnost pesticidů na území Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v.v.i v Praze-Ruzyni, což je zemědělská lokalita. Přesto byly zjištěné koncentrace pesticidů tak nízké, že by neměly představovat nebezpečí pro včely. Na druhou stranu ale byly detekovány látky nebo jejich metabolity, které jsou v rámci EU zakázány. To naznačuje, že některé látky jsou v prostředí stabilnější, nebo že jsou používány staré zásoby těchto látek. Z legislativy vyplývá, že pokud se jedná o profesionální využití, nemůže s těmito přípravky nakládat a manipulovat kdokoli, ale je nezbytná odborná způsobilost pro nakládání s POR. Potenciálním problémem však může být i to, že některé přípravky lze koupit volně v různých hobby prodejnách. Nakládání s nimi, pokud se nejedná o profesionální využití, však nikdo nekontroluje. Zákon č. 326/2004 Sb. o rostlinolékařské péči (Česko 2004) rovněž definuje, jaké účinné látky se mohou používat na jednotlivé druhy plodin i jejich maximální hektarová dávka, která je podle nařízení EU považována za dávku maximálně přípustnou (Harašta et al. 2015). V Úředním věstníku EU v nařízení komise EU č. 546/2011 (EK 2011) jsou stanoveny podmínky, za kterých může být daný přípravek na území používán, a to s ohledem na nezávadnost pro včelu medonosnou, jakožto necílový organismus.

S rostoucí citlivostí analytických přístrojů jsou v životním prostředí i ve velmi nízkých koncentracích detekovány pesticidy, léčiva a další mikropolutanty – dezinfekční prostředky, odmrazovací tekutiny a další. Kromě pesticidů, u nichž je prokázán negativní vliv na včely

(Smith et al. 2013), představují velký problém také léčiva. Z léčiv je pozornost věnována hlavně antibiotikům, hormonům (Christiansen et al. 2009) a protinádorovým léčivům (Johnson et al. 2008). Tyto látky mají prokázaný vliv i na včely. Antibiotika ovlivňují složení a velikost střevního mikrobiomu a tím potažmo zvyšují náchylnost včel k patogenům (Li et al. 2017; Raymann et al. 2017). Také u hormonálních látek lze sledovat efekt na včely, a to například při podání analogu juvenilního hormonu methoprenu, který u včel způsobuje rychlejší nástup pátrání po potravě, ale na druhou stranu snižuje délku hledání potravy, čas strávený hledáním a počet letů za potravou (Chang et al. 2015).

2.4.1. Klasifikace pesticidů a riziko vzniku rezistence

Pesticidy můžeme rozdělit do skupin podle několika hledisek. Prvním z možných způsobů dělení je podle cílového škodlivého činitele, viz tabulku 1. Dalším možným dělením je dělení z hlediska distribuce pesticidů v rostlině, tedy z hlediska mobility pesticidu. Rozlišujeme pesticidy kontaktní, které se vyznačují svým účinkem pouze v místě aplikace (Hajšlová & Kocourek 2003) a tzv. systémové pesticidy, jež mají schopnost transportu do jiných částí rostliny, čímž mohou kontaminovat nektar nebo pyl rostlin a tím významně ohrožovat necílové organismy (Henry et al. 2012). Třetí možností jsou kombinované pesticidy. Tyto přípravky obsahují látku s kontaktním i systémovým účinkem a látek tohoto charakteru v posledních letech přibývá. Poslední skupinu představují kvazi-systémové pesticidy, kdy se účinná látka uloží do voskové vrstvy na povrchu listů a poté se pomalu odpařuje nebo pronikne do pletiv a odtud se šíří translaminárně. To znamená, že se pohybuje z povrchu listu ošetřeného přípravkem do listových buněk na protilehlé straně listu (Salavová 2006). Poslední uvedené dělení pesticidů je velmi rozmanité a rozsáhlé. Jedná se o rozdělení podle chemické struktury, kam řadíme například glyfosáty, organofosfáty, chlorované uhlovodíky, karbamáty, pyrethroidy, neonikotinoidy a mnoho dalších (Yu 2008).

Tabulka 1. Rozdělení pesticidů z hlediska cílového škodlivého činitele, převzato z Hajšlová et al. (2003).

Druh pesticidu	Cílový škodlivý činitel
insekticid	hmyz
fungicid	houby
rodenticid	hlodavci
herbicid	plevelné rostliny
akaricid	roztoči
moluskocid	měkkýši

Cílové organismy na POR určitým způsobem reagují a dlouhodobé užívání pesticidů vede k adaptacím škůdců na účinné látky. Zvýšená tolerance škůdců se pak odráží na zvýšené spotřebě POR (Carvalho 2006). Rezistenci daného organismu k určitému pesticidu můžeme definovat jako jeho schopnost tolerovat takovou dávku pesticidu, která by pro většinu normální populace téhož druhu byla letální. První výskyt pesticidní rezistence byl pro většinu vědců velmi šokující. Toto zjištění datujeme do roku 1964, kdy byly objeveny první kmeny mouchy domácí, které vykazovaly rezistenci vůči DDT (Tsukamoto & Suzuki 1964). Navíc bylo později zjištěno, že odolní jedinci přenášeli geneticky podmíněnou rezistenci na své potomky, tudíž nové generace byly k danému pesticidu rovněž rezistentní (Cremlyn 1985). Insekticidní rezistence se může u hmyzu vyvíjet dvěma základními mechanismy. První možností je rezistence metabolická, která spočívá ve zvýšené produkci určitého enzymu, který váže a/nebo detoxifikuje daný insekticid (Bass & Field 2011). Takovými enzymy jsou esterázy, glutathion-S-transferázy a v neposlední řadě také monooxygenázy (Hemingway & Ranson 2000), ale také UDP-glukuronyltransferázy, které jsou vědeckou komunitou v oboru neprávem opomíjeny (Erban et al. 2017a). Druhým typem rezistence je genetická rezistence, někdy také označovaná jako rezistence získaná změnou cílového místa. Tento mechanismus je založen na mutaci (strukturální změně) cílového úseku, což ho činí méně citlivým na daný toxický účinek insekticidu (Bass & Field 2011). Podle nových poznatků jsou mechanismy vzniku rezistence i na epigenetické úrovni (Erban et al. 2017a).

2.4.2. Systémové pesticidy a jejich vliv na včely

Pro včely i opylovače obecně jsou nejvíce nebezpečné systémové pesticidy. Včely do úlu přinášejí rozmanitou škálu produktů jako je nektar, medovice, pyl a voda. Tyto produkty slouží včelám jako zdroj potravy a zdroj všech látek potřebných pro správné fungování společenstva, ale také pro odchov nových jedinců (Henry et al. 2012; Fairbrother et al. 2014). Včely jsou účinkům pesticidů vystaveny v zásadě dvěma způsoby. Včely „létavky“ zodpovědné za dopravení produktů do úlu se s pesticidy setkají zpravidla přímo při aplikaci a ve většině případů uhynou přímo v terénu, kde ke kontaktu došlo. V takovém případě hovoříme o akutně toxickém účinku. V druhém případě není létavka zasažena přímo v terénu, ale odnáší si kontaminovanou snůšku do úlu a zbytek včelí kolonie je ovlivněn přes skladované zásoby při zpracování kontaminovaného materiálu (Henry et al. 2012). Z mnoha studií vyplývá, že v pylu (Zhang et al. 2013), v medu (Mitchell et al. 2017), i ve vosku (Chauzat & Faucon 2007) jsou v různé míře přítomna rezidua pesticidů. Kontaminovaná snůška je ve finálním důsledku horší varianta, protože je pesticidem zasaženo prakticky celé

včelstvo včetně plodu a matky (Wu et al. 2011). V takovém případě obvykle hovoříme o chronickém působení pesticidů působících často v subletálních dávkách. V pylu a v nektaru jsou většinou pesticidy přítomny v poměrně nízkých koncentracích, ale při zvažování rizik si musíme uvědomit, že včelstvo zpracuje několik desítek kilogramů medu a pylu za sezónu, a tak úhrnná dávka těchto látek a jejich metabolitů může být v konečném důsledku poměrně vysoká (Rortais et al. 2005). V posledních letech se také hovoří o možném novém způsobu otravy včel prostřednictvím tzv. gutační tekutiny (Wirtz et al. 2018). Jako gutace je označován jev, kdy se na rostlině objevuje tekutina jako důsledek zvýšeného kořenového tlaku a snížené transpirace s denní periodicitou. Tento jev nelze zaměňovat za rosu nebo kondenzaci, kdy se kapalná voda uvolňuje z listů přes vodní póry (Thompson 2010; Gierer et al. 2019). Stále častěji jsou publikovány výsledky prokazující, že subletální dávky pesticidů nezpůsobující přímou úmrtnost, mají vysoký potenciál vyvolat celou řadu poruch v chování včel, jako například poruchy paměti a učení, ale také změny ve schopnosti orientace včel (Henry et al. 2012). Systémové pesticidy představují z hlediska mechanismu účinku skvělou ochranu před nežádoucími škůdci, na druhou stranu jsou systémové přípravky mnohem náchylnější ke vzniku rezistence, jak naznačují publikace (Vallad & Goodman 2004; Woodcock et al. 2018). U POR nepředstavuje nebezpečí pouze mateřská původní účinná látka, ale také její metabolity, které mohou vykazovat ještě vyšší toxicitu pro včely. Tak tomu je například u nejnebezpečnějšího neonikotinoidu imidaklopridu, kdy jeho metabolit imidaklopid-olefin je dokonce až 10krát toxičtější vůči hmyzu než mateřská látka (Blacquièrè et al. 2012; Seifrtova et al. 2017). Kromě toho je prokázáno, že pesticidy obecně oslabují imunitní systém včel a mohou synergicky posilovat různá infekční agens, jak bylo např. zjištěno u parazita *N. ceranae* (Pettis et al. 2013) i některých virů (Simon-Delso et al. 2014), a tím mohou být společně odpovědné za kolapsy včelstev (van der Sluijs et al. 2013). Významným problémem při používání POR jsou také možné interakce jednotlivých látek mezi sebou a zvýšení jejich toxicity pro necílové organismy. Vyšší toxicita pro včely a larvy byla zjištěna například při synergickém působení některých insekticidů a fungicidů. Konkrétně toxicita některých neonikotinoidů může být zvýšena kombinací s fungicidy (Samataro & Yoder 2012; David et al. 2016). Přestože jsou fungicidy považovány za látky pro včely relativně bezpečné, nemusí tomu tak úplně být, zvláště díky jejich potenciálnímu synergickému účinku, jak dokazují nedávné studie (Samataro & Yoder 2012; DeGrandi-Hoffman et al. 2013). Toto platí například pro prochloraz. Zatímco samotný prochloraz a thiaklopid spadají do skupiny mírně toxických pesticidů pro včely, v kombinaci představují vysoké riziko pro včely (Wernecke et al. 2019). Synergický účinek byl také

pozorován u kombinace prochlorazu a pyrethroidů (Pilling et al. 1995). Na rozdíl od insekticidů, ovlivňujících především nervovou soustavu hmyzu, mohou fungicidy ovlivňovat nukleové kyseliny, syntézu proteinů, strukturu buněčné membrány, dýchání, mitózu a dělení buněk (DeGrandi-Hoffman et al. 2013). Podle Sammataro & Yoder (2012) mohou fungicidy ovlivňovat také chování včel a jejich orientaci během pastvy.

Možným řešením, jak snížit toxicitu pesticidů, je snížit návštěvnost včel v kontaminovaném porostu či bezprostředně po postřiku. Toho lze docílit použitím repelentních přípravků, které včely odpuzují, kdy je koncentrace účinné látky nejvyšší (Ridout et al. 2006). Tyto přípravky mohou být různého původu, vhodné je však dávat přednost látkám málo toxickým pro hmyz. Za vhodné lze považovat přirozeně se vyskytující látky, například kombinace tea-tree oleje z listů kajeputu střídavolistého (*Melaleuca alternifolia*) a benzaldehydu (Sackin & Fishman 1998).

2.4.3. Skupiny pesticidů škodlivých pro včely

Účinných látek, které jsou v zemědělství využívány, je velké množství. V rámci tohoto přehledu se zaměřím na látky, u nichž je prokázán vliv na včely. Nejvíce nebezpečné pro včely jsou insekticidy, které se používají právě k hubení hmyzu. Skupina insekticidů, jež se vyznačují poměrně vysokou akutní toxicitou pro včely a přímou úmrtností včel, jsou karbamáty. Jedná se o organické sloučeniny odvozené od kyseliny karbamové. Jejich mechanismus účinku je založen na inhibici enzymu acetylcholinesterázy, což vede k hromadění neurotransmiteru acetylcholinu (Fernández et al. 2003). Mezi zástupce můžeme zařadit například pirimikarb či karbofuran, u něhož byla prokázána toxicita pro včely (Bailey et al. 2005).

Obdobný mechanismus jako karbamáty má další skupina pesticidů, organofosfáty. Ty jsou vysoce toxické vůči veškerému hmyzu (Belzunces et al. 2012). Mezi jejich zástupce patří malathion či parathion. U obou těchto látek byl prokázán negativní vliv na včely (Schricker & Stephen 1970; Thrasyvoulou et al. 1985).

Další významnou skupinou s ohledem na včely jsou fenylypyrazolové insekticidy, a to zejména jejich hlavní zástupce fipronil. Ten je velmi účinný při hubení škůdců u zemědělských plodin, u nichž blokuje GABA receptory a inhibuje ionotropní glutamátém řízené chloridové kanály (El Hassani et al. 2005). Fipronil je vysoce toxický pro včely, a dokonce i subletální dávky negativně ovlivňují vývoj a stabilitu včelí kolonie. U včel způsobuje poruchy motorické aktivity, jako je třes či ochrnutí (Zaluski et al. 2015).

Glyfosát (2-(fosfonomethyl)aminoctová kyselina) neboli *N*-(fosfonomethyl)glycin patří mezi širokospektrální herbicidy používané k hubení plevelů u celého spektra zemědělských plodin převážně různých monokultur a geneticky modifikovaných plodin. Glyfosát se používá také jako desikant (Herbert et al. 2014). Spotřeba glyfosátu v posledních desetiletí prudce vzrostla a tyto látky se staly jednou z nejpoužívanějších agrochemikálií po celém světě. Přestože jejich mechanismus účinku spočívá v inhibici drah vedoucích k syntéze aromatických aminokyselin přítomných pouze u rostlin, mikroorganismů a hub (šikimátová dráha), byly pozorovány také negativní účinky i na některé druhy bezobratlých živočichů a obratlovců (Amrhein et al. 1980; Duke & Powles 2008). Recentní studie ukázaly, že i subletální dávky glyfosátu mají negativní vliv na krátkodobou paměť včel, ovlivňují jejich navigační schopnost a mají vliv na schopnost učení (Herbert et al. 2014; Balbuena et al. 2015). Navigační schopnost včel, jejich paměť ohledně uložení informací o okolní krajině, o místech sběru snůšky a dráze letu je naprosto stěžejní pro létavky, které jsou zodpovědné za zajištění veškeré potravy (Balbuena et al. 2015). U těchto látek je vždy potřeba brát v úvahu také to, s jakým množstvím se včela může v přírodě reálně setkat a zda aplikace probíhá na kvetoucí rostliny. Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC; anglicky International Agency for Research on Cancer) nicméně zařadila glyfosát mezi látky s endokrinně disruptivními vlastnostmi (IARC 2016), přičemž zákaz nebo omezení jeho užívání se zvažuje jak pro běžné spotřebitele, tak i pro profesionální zemědělce (Erban et al. 2016b).

Méně nebezpečnou skupinou systémových pesticidů s ohledem na včely jsou močovinné pesticidy, a to konkrétně sloučeniny fenyльмоčoviny, které fungují jako herbicidy a od svého objevu v roce 1950 jsou široce využívány. Mezi zástupce těchto pesticidů patří například linuron (3-[3,4-(dichlorfenyl)-1-methoxy-1-methyl-močovina]) a tyto látky jsou klasifikovány jako relativně netoxické pro včely (Farré et al. 2007). Také chloracetanilidové pesticidy jsou používány jako herbicidy, a to hlavně při hubení plevelů v porostu sóji, kukuřice a celé řady dalších zemědělských plodin. Mezi zástupce těchto pesticidů patří například alachlor [2-chloro-*N*-(2,6-diethylphenyl)-*N*-(methoxymethyl)acetamide]. Chloracetanilidové pesticidy jsou rovněž relativně málo toxické pro včely, ale látky alachlor a acetochlor jsou nyní EU zakázány pro jejich teratogenní a karcinogenní účinek a také proto, že fungují jako endokrinní disruptory (Ashby et al. 1996).

2.4.4. Skupiny pesticidů toxických pro včely

2.4.4.1. Neonikotinoidy

Nejvíce nebezpečné systémové pesticidy s ohledem na opylovače jsou neonikotinoidy, což jsou syntetické deriváty přirozeně se vyskytujícího insekticidu nikotinu (Fairbrother et al. 2014). Mezi nejvíce používané zástupce neonikotinoidů můžeme zařadit imidaklopid, acetamiprid, thiaklopid, thiamethoxan a klothianidin (Iwasa et al. 2004; van der Sluijs et al. 2013). Za přibližně 20 let jejich používání se staly široce využívanými látkami po celém světě (van der Sluijs et al. 2013), a to hlavně díky širokospektrální aktivitě, nízkým aplikačním dávkám, nízké toxicitě pro savce a univerzálnímu způsobu aplikace (Fairbrother et al. 2014). Kvůli akutnímu riziku pro včely vydala v roce 2013 Evropská komise na základě zprávy Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA; anglicky European Food Safety Authority) nařízení č. 485/2013 o prozatímním zákazu používání POR obsahujících účinné látky klothianidin, thiomethoxam a imidaklopid. Zákaz se týkal plodin atraktivních pro včely, s výjimkou použití ve sklenících, ošetření některých plodin po odkvětu a ozimých obilnin (EK 2013). Tento zákaz byl v roce 2018 potvrzen nařízeními Evropské komise č. 2018/783-785 (EK 2018b; EK 2018c; EK 2018d). Co se týká dalšího neonikotinoidu acetamipridu, u něj bylo vyhodnoceno nízké riziko pro včely, a tak zákaz či omezování této účinné látky není nutné. Toto nařízení je platné až do roku 2033 (EK 2018a). Podstatně s jiným výsledkem skončilo hodnocení neonikotinoidu thiaklopidu, jehož registrace skončila k 30. 4. 2020 a na základě závěrů EFSA navrhly komise členských států neobnovení schválení (EK 2020). V zemědělské produkci se neonikotinoidy používají jednak proti savému hmyzu a jednak proti některým škůdcům z řádů Heteroptera, Coleoptera a Lepidoptera. Neonikotinoidy se vyznačují silným účinkem na nervový systém hmyzu a fungují jako antagonisté acetylcholinových receptorů. Jejich systémové působení uvnitř rostlin zahrnující floémový a xylémový transport má za následek, že se tyto látky v nezanedbatelném množství následně objevují v pylu a nektaru (van der Sluijs et al. 2013). Široké uplatnění a perzistence v půdě i ve vodě vede k tomu, že jsou opylovači těmito látkám v subletálních koncentracích vystaveni po většinu roku, a to má za následek častou přítomnost neonikotinoidů ve včelích úlech (Blacquièrè et al. 2012). Polní, reálné dávky neonikotinoidů mají celou řadu škodlivých, subletálních účinků, jak u včel, tak i například u čmeláků. Studie poukazují na to, že neonikotinoidy ovlivňují vývoj plodu a larev, mají vliv na paměť a učení, poškozují centrální nervovou soustavu a zvyšují náchylnost vůči onemocněním (van der Sluijs et al. 2013; Fairbrother et al. 2014). V praxi se insekticidy často aplikují současně s fungicidy, v tzv. tank-mixu. Je prokázána schopnost fungicidu zvyšovat toxicitu insekticidu (Zhu et al.

2014), jako je tomu v případě neonikotinoidu thiaklopridu a fungicidu tebukonazolu (Thompson et al. 2014). Negativní vliv těchto látek na opylovače je prokázán, na druhou stranu je potřeba se na tuto situaci dívat i z pohledu zemědělců (Woodcock et al. 2018). Neonikotinoidy jsou velmi často využívaným insekticidem a nahradit je, bude velmi obtížné. Možným řešením v boji se škůdci je využít alternativní metody, což zahrnuje použití jiného chemického insekticidu (většinou pyrethroidu). U těchto metod jsou potřeba další terénní studie (Jactel et al. 2019). Zakázaný pesticid se vždy musí nějakou látkou nahradit. Je otázkou, zda v konečném důsledku tato látka nebude mít ještě negativnější dopad než původní zakázaná.

2.4.4.2. Pyrethroidy

Pyrethroidy patří mezi nejúčinnější známé insekticidy. Jedná se o syntetické sloučeniny strukturně odvozené od pyrethrinu, jenž je produkován kopretinou starčekolistou (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) (Smith & Stratton 1986). Přírodní pyrethriny mají skvělé insekticidní vlastnosti a nízkou toxicitu pro savce, ale mají omezené použití kvůli nízké fotostabilitě a vysoké biologické rozložitelnosti (Wouters & van den Bercken 1978). Oproti tomu jsou pyrethroidy relativně stabilní, ale vykazují vysokou toxicitu pro široké spektrum hmyzu (Elliott 1976), včetně včely medonosné (Johnson et al. 2006). Jejich působení spočívá v tom, že narušují funkci nervového systému tím, že interagují se sodíkovými kanály v nervové membráně a tím vyvolávají nepřetržitou řadu nervových impulsů, která se projevuje nekoordinací, třesem a křečemi (Vijverberg et al. 1983).

Včely se do kontaktu s pyrethroidy nedostávají pouze prostřednictvím kontaminovaného nektaru, ale třeba pyrethroidní pesticid tau-fluvalinát se používá ve včelstvech k tlumení roztoče *V. destructor* (Erban et al. 2019a). Bylo prokázáno, že včely vystavené pyrethroidním pesticidům vykazovaly zhoršenou vitalitu kolonie (Bendahou et al. 1999), sníženou aktivitu acetylcholinesterázy (Badiou et al. 2008), zhoršené učení (Decourtye et al. 2004) a poruchu při kladení u matky, spočívající v tom, že klade více vajíček do jedné buňky (Zhou et al. 2011). Mezi nejvýznamnější zástupce pyrethroidů s ohledem na včely patří deltametrin a cypermetrin. Deltametrin je klasifikován jako vysoce toxický pro včely a má na ně i subletální efekt (Atkins et al. 1981) podobně jako cypermetrin (Bendahou et al. 1999). Rovněž je prokázán synergický efekt deltametrinu a azolových fungicidů (Colin & Belzunces 1992).

V tabulce 2 jsou uvedeny spotřeby vybraných účinných látek pesticidů významných svým vlivem na včely v letech 2015, 2016, 2017, 2018 a 2019.

Tabulka 2. Přehled spotřeby účinných látek POR v Česku v letech 2015 - 2019. Převzato z ÚKZÚZ.

účinná látka	spotřeba (kg)				
	2015	2016	2017	2018	2019
acetamiprid	3 455,52	3 543,65	3 715,38	5 056,41	5 233,65
α -cypermetrin	1 203,65	977,16	867,28	495,25	300,14
deltametrin	1 511,71	1 810,28	1 915,54	2 549,82	2 519,05
glyfosát	697 689,46	772 330,68	750 531,02	558 836,95	485 816,34
imidakloprid	93,24	50,56	52,99	18,35	0,63
pirimikarb	1 578,25	1 262,25	953,67	1 233,01	841,72
thiakloprid	25 833,20	25 972,18	29 277,96	35 298,95	35 146,41
thiametoxam	233,71	291,23	283,25	259,61	168,64

2.4.5. Pesticidy a jejich interakce s dalšími faktory

Z dosavadních výsledků výzkumu vyplývá, že na ztrátách včel zaznamenaných v posledních letech se nepodílí jednotlivé faktory samostatně, ale že se jedná o soubor více faktorů, působících společně (Bacandritsos et al. 2010). Některé faktory jsou považovány za významnější, jiné za méně významné. Propojení mezi těmito faktory je pro nás stále jistou neznámou a jsou nutné další studie a výzkumy pro pochopení všech souvislostí v této oblasti. Přesto se v posledních letech formují výsledky, které nám propojení pesticidů s dalšími faktory přibližují. Je potvrzeno, že některé pesticidy sami o sobě negativně ovlivňují zdraví a životaschopnost včel a oslabují jejich imunitní systém, čímž je činí náchylnější proti včelím patogenům (Smith et al. 2013). Bylo prokázáno, že pesticidy mohou synergicky posilovat infekční agens, jako je parazit *Nosema* či některé viry (Pettis et al. 2013; Simon-Delso et al. 2014). Přítomnost organochlorinových pesticidů a organofosfátů způsobuje vyšší citlivost včel vůči patogenům z rodu *Nosema* (Sammataro & Yoder 2012). Obdobně kombinace neonikotinoиду imidaklopridu a patogenu *Nosema* způsobila u včel výrazně vyšší mortalitu než samostatně působící faktory (Alaux et al. 2010). Každý z pesticidů, který se v úlech vyskytuje v subletálních dávkách, představuje potenciálního kandidáta, který může interagovat s některým z široké škály patogenů běžně infikujících včely (Sammataro & Yoder 2012). Jak již bylo uvedeno, pesticidy neinteragují pouze s nežádoucími včelími patogeny, ale také s mikroorganismy, které jsou součástí střevního mikrobiomu včel. Tato interakce negativně ovlivňuje složení, vyváženost, strukturu a funkci mikrobiomu, a tím negativně ovlivňuje zdraví včel (Kakumanu et al. 2016).

Masivní používání pesticidů, které má zabránit ztrátám ve výnosu plodin se uplatňuje zejména u velkoplošných monokultur. Dalším negativním dopadem těchto monokultur je nedostatečná rozmanitost a nízký obsah látek jako jsou sacharidy, bílkoviny, lipidy, vitamíny a minerální látky (Di Pasquale et al. 2013). Tyto látky jsou nezbytné pro schopnost včel produkovat potomstvo, dlouhověkost a zdraví dospělých včel a také pro produktivitu kolonie. Nedostatek těchto látek vede k rozvoji nutričního stresu, který může být mimo jiné zodpovědný za úhyn kolonií (Brodschneider & Crailsheim 2010). V případě nutričně nedostatečné diety je možné použít vhodný doplněk stravy, který má na včely pozitivní efekt. Jedná se například o zelenou jednobuněčnou sladkovodní řasu *Chlorella* (Jehlík et al. 2019). Vzhledem k tomu, jak jsou pesticidy i opylovači důležití pro zemědělskou produkci na celém světě, je nutné, aby byly benefity i rizika interakcí komerčních včel a dalších opylovačů s pesticidy vyhodnocovány správně a podle platných zákonů.

3. HYPOTÉZY A CÍL PRÁCE

- Včelstva jsou ovlivněna působením přípravků na ochranu rostlin a nedostatečnou výživou, což může vést k jejich oslabení a zvýšené náchylnosti k patogenům včel.
- Působení pesticidů se projevuje na včelách akutní nebo chronickou toxicitou a chronické působení pesticidů zvyšuje náchylnost k patogenům a kolapsům včelstev.
- Včely musí odolávat velkému množství patogenů, ale také environmentálnímu zatížení agrochemikáliemi a tyto faktory mohou různým anebo společným až zesilujícím účinkem ovlivňovat biochemické dráhy, což se v konečném důsledku projeví na celostním zdraví včel.

Cílem práce je získat nové informace o vlivu pesticidů a dalších faktorů na zdraví opylovačů, zejména včely medonosné, a přispět k porozumění příčin jejich ztrát.

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1. Biologický materiál a příprava vzorků pro jednotlivé experimenty

Jako biologický materiál pro tuto práci byl zvolen ekonomicky významný opylovač včela medonosná (*A. mellifera*), pro jeden experiment další opylovač čmelák zemní (*Bombus terrestris* Linnaeus 1758) a pro další experiment rostlina řepka olejka (*Brassica napus*). Pro jednotlivé experimenty byla odebírána různá vývojová stádia včel. Vzhledem k tomu, že se jednotlivá vývojová stádia liší proteinovým složením, je nezbytné provádět analýzy na definovaných vývojových stádiích (Chan & Foster 2008; Woltedji et al. 2013; Erban et al. 2014, 2016b). Kukla včely medonosné prochází během svého vývoje několika stádii, kdy se postupně mění zbarvení složených očí. Vzhledem k tomu, že stádium červených očí je snadno rozpoznatelné a trvá poměrně krátkou dobu, je vhodné právě v tomto stádiu studovat možné fyziologické a vývojové zvláštnosti, které mohou být způsobeny přítomností patogenů (Erban et al. 2014). Podobně jako kukla ve stádiu červených očí je vhodný objekt pro studium onemocnění včel exaktně časově definované stádium čerstvě vylíhlá mladuška, která tak ukončuje stádium metamorfózy (Winston 1991; Erban et al. 2016b). Vzorky včel byly odebírány po jednotlivých jedincích pomocí etanolem sterilizované entomologické pinzety (Dent & Walton 1997), větší množství úlových včel bylo odebráno oklepem z rámku do sterilního pytle. Sbíraný materiál byl na místě odběru ukládán do vzorkovnic (zkumavky typu Eppendorf apod.) na suchý led a byl přepraven do mrazicího boxu. Všechny vzorky byly skladovány při teplotě -80 °C do upotřebení.

4.1.1. Biologický materiál pro experiment 1. Vliv parazitického roztoče *Varroa destructor* v interakci s virem deformovaných křídel na změny proteomu a aktivace signální dráhy TGF- β .

Pro analýzu patogenů a určení markerů onemocnění byly odebrány čerstvě se líhnoucí mladušky. Odebrány byly jednak včely kontrolní, které byly bez patologických změn a nevykazují tak znaky přítomnosti některého z patogenů a dále včely s patologickými příznaky onemocnění, jako např. deformovaná křídla, kratší zadeček či parazitace roztočem *V. destructor*. Pro tento experiment byly využity čtyři typy vzorků líhnoucích se včel (mladušek), viz tabulku 3. Ke sledování vlivu roztoče *V. destructor* a viru deformovaných křídel byly použity dva přístupy, a to gelová analýza označovaná jako gel-based (2-D DIGE) a bezgelová analýza označovaná jako gel-free metoda (nanoLC-MS/MS).

Tabulka 3. Typy vzorků líhnoucích se včel použitých při experimentu 1.

Typ vzorku	Popis	Značení
I	kontrolní včela	KON
II	včela parazitovaná roztočem	VD
III	včela parazitovaná roztočem se symptomy DWV	DWV_VD
IV	včela se symptomy DWV	DWV

Společným krokem přípravy vzorků je jejich homogenizace, která se lišila použitím homogenizačního pufru v závislosti na analýze. Pro homogenizaci vzorků pro gel-free neboli bezgelovou analýzu byl použit 100mM TEAB (101640245, Fluka, Švýcarsko) s přídatkem 2% SDC (101578428, Sigma-Aldrich, Německo) o objemu 2,5 ml homogenizačního pufru na 1 včelu. Následovala homogenizace v 5 ml Potter-Elvehjem skleněném homogenizátoru (Kavalier, Česko), 3krát po dobu přibližně 2 min, rozhodující je úplná homogenizace bez velkých částí vzorku. Poté byl homogenát odstředěn ve vysokootáčkové centrifuze MR 23-i (Jouan, Francie) při 3000 x g a získaný supernatant byl podroben bezgelové analýze. Všechny vzorky byly analyzovány ve třech biologických a dvou analytických opakováních. Před samotnou analýzou byly vzorky štěpeny trypsinem (V5280, Promega, Spojené státy).

Pro gel-based metodu neboli gelovou analýzu byl jako homogenizační pufr zvolen 50mM Tris-HCl o pH=7,4 s 1% Tritonem X-100 (T9284, Serva, Německo) a s přídatkem inhibitoru proteáz (14866100, Complete, EDTA-free, Roche, Německo). Objem homogenizačního pufru byl zvolen 500 μ l na včelu. Následovala homogenizace v 5 ml

Potter-Elvehjem skleněném homogenizátoru, 2krát po dobu přibližně 2 min, rozhodující je úplná homogenizace bez velkých částí vzorku. Poté byl homogenát naředěn 2 ml nanočisté H₂O (Thermo SCIENTIFIC, Spojené státy) a znovu homogenizován. Získaný homogenát byl následně odstředěn v centrifuze při 20 000 x g, 20 min, 4 °C a získaný supernatant přepipetován po 1 ml do 1,5 ml eppendorf (Sigma-Aldrich, Německo) a znovu odstředěn. Pro gelovou analýzu následovala kvantifikace proteinů, s využitím metody podle Bradfordové (Bradford, 1976). Tato metoda je založená na reakci mezi Bradfordovým činidlem (B6916, Sigma-Aldrich, Spojené státy) a vzorkem obsahujícím proteiny. Vzniklý komplex proteinů s Brilliant Blue G má absorpční maximum při 595 nm. Pro určení obsahu proteinů ve vzorku byly vzorky 5krát naředěny a následně bylo smícháno 10 µl naředěného vzorku s 240 µl Bradfordova činidla. Jako kontrola bylo pipetováno 10 µl nanočisté H₂O a 240 µl Bradfordova činidla. Po 10 minutové inkubaci byla absorbance v mikrotitrační destičce (96 jamek) změřena na ELISA readeru (Multiscan ASCENT, Thermo, Čína) při vlnové délce 595 nm. Podle zjištěné koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích byly vzorky rozpipetovány po daném obsahu proteinů a následně lyofilizovány přístrojem PowerDry LL3000 (Thermo, Česko).

4.1.2. Biologický materiál pro experiment 2. Distribuce imidaklopridu, imidaklopid-olefinu a imidaklopid-urey v zelených částech a v kořenech řepky olejky (*Brassica napus*) z uměle kontaminované zeminy.

Pro tento experiment byla ve skleníku VÚRV napěstována řepka olejka po dobu 6 týdnů, viz obrázek 6. Semena řepky byla naklíčena na Petriho misce, na buničině navlhčené nanočistou H₂O. Naklíčená semena byla umístěna do sadbovače naplněného substrátem (AGRO CS, Česko), kde byla ponechána po dobu cca 1-2 týdnů, kdy rostliny dosahovaly výšky cca 10 cm. Poté byly rostliny přesazeny do květináčů, které obsahovaly 1,5 kg substrátu a po cca 2 týdnech zality vodným roztokem přípravku Confidor 200OD (Bayer, Německo) tak aby bylo dosaženo koncentrace účinné látky imidaklopridu 250 µg/kg substrátu a 2500 µg/kg substrátu. Nádoby použité na zalití byly vymyty 300 ml nanočisté H₂O. Třetí vzorek představovala kontrola, kdy byly rostliny zality 300 ml nanočisté H₂O. Květináče byly překryty netkanou textilií s otvorem, aby bylo zabráněno možné kontaminaci vzorků mezi sebou. Po 4 týdnech od aplikace imidaklopridu byla odebrána 4 biologická opakování od každého vzorku. Vzorky představovaly tyto matrice – půda, kořen a zelené části, včetně květů. Vzorky byly analyzovány metodou UHPLC-MS/MS.

Obrázek 6. Napěstování řepky olejky pro experiment 2.



A = naklíčení semen řepky olejky na Petriho misce, **B** = přesazení semen do sadbovače, **C** = přesazení rostlinek řepky do samostatných květináčů, **D** = celkový pohled na experiment před odběrem

Analýza pesticidů ve vzorcích byla prováděna v rámci projektové spolupráce na pracovišti ALS Czech Republic, a to metodou ultraúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC) ve spojení s tandemovou hmotnostně spektrometrickou detekcí (MS/MS) za použití trojitého kvadrupólu (Seifrtova et al. 2017). Extrakce pesticidů z lyofilizovaných vzorků byla v ALS Czech Republic provedena extrakční metodou QuEChERS (Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe), jejíž princip popsali Anastassiades et al. (2003). Tato metoda nachází v různých modifikacích uplatnění jak v potravinářském průmyslu (Lesueur et al., 2008), tak i při analýze jiných matric jako jsou včely či rostlinný materiál (Mullin et al., 2010). Princip této metody je založen na tom, že se k lyofilizovanému vzorku přidají sorbenty, značené standardy, extrakční činidlo acetonitril (60004, Honeywell, Spojené státy) a nanočistá H₂O (Anastassiades et al. 2003). Pro stanovení pesticidů ve vzorcích řepky byly použity matrice – kořen a zelené části, které byly homogenizovány pomocí přístroje Philips HR2860 (Philips, Nizozemsko). Do 50 ml propylenových centrifugačních zkumavek byly odváženy 2 g půdy, 5 g homogenizovaných zelených částí (stonek, listy a květy) či 3 g homogenizovaného kořene. Po přidání směsi izotopově značených standardů byl vzorek extrahován 5 ml nanočisté H₂O a 10 ml acetonitrilu. Pro extrakci zelených částí řepky nebyla přidána žádná nanočistá H₂O, protože podle evropské normy EN 15662 není nutné přidávat vodu do vzorků s obsahem vody vyšším než 80 %. Poté byla ke vzorkům přidána kombinace citrátových solí QuEChERS, vzorky byly protřepány na třepače Reax2 (Heidolph Instruments, Německo) po dobu 10 minut a následně centrifugovány na Rotina 38R (Hettich, Německo) při 11000 x g, 5 min. Následně byl acetonitrilový supernatant smíchán se sorbenty (MgSO₄, PSA, C18 či C) pro přečištění extraktu. Kombinace a množství sorbentu bylo pro každou matici optimalizováno při vývoji metod tak, aby bylo dosaženo návratnosti v rozmezí

70-120%. Následně byly vzorky protřepány a znovu odstředěny 5 min při 11000 x g. V závěrečném kroku dochází k zakoncentrování vzorků s použitím dusíku (LabEva ND-2, Labicom, Česko). Vzorky byly rekonstituovány v mobilní fázi a před nástřikem na kolonu filtrovány pomocí 13 mm stříkačkových filtrů (Teknokroma, Španělsko).

4.1.3. Biologický materiál pro experiment 3. Případy akutních otrav včel

Náhodné otravy včel, a to jak akutní, tak chronické otravy v subletálních dávkách byly sledovány v Česku v letech 2015 a 2016. Vzorky živých úlových včel z plodového plástu, mrtvých včel, porostu a pylu z plodového plástu bylo-li to možné, byly odebírány v různých lokalitách. Souběžně s naším odběrem byl prováděn odběr vzorků také Státní veterinární správou (SVS) za účelem potvrzení/vyloučení úhynu včel spojených s aplikací POR. My jsme se v rámci tohoto experimentu zaměřili pouze na vybrané případy podezřelých otrav včel, ale zato jsme je sledovali detailněji. V roce 2015 bylo šetřeno SVS 29 případů podezřelých na otravu včel, z toho 8 případů bylo potvrzeno, v roce 2016 se jednalo o 22 případů, z nichž potvrzeno bylo rovněž 8. Pro naše účely byly v roce 2015 odebrány vzorky ze čtyř lokalit zahrnujících Štětí, Panoší Újezd, Libodřice a Rohovládovou Bělou. V roce 2016 byly odebrány vzorky z 6 lokalit, a to z Tišic, Chrudimi, Vlkova nad Lesy, Dlouhopolska, Hýsel a Sedmihorek. Jako kontrola byly odebrány vzorky z 3 lokalit, které nevykazovaly známky otrav. Jednalo se o lokality Líšnice (nachází se několik metrů od velkého řepkového pole), Ruzyně (lokalita, která se nachází ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby v Praze, zemědělská lokalita s mírným využíváním pesticidů, v oblasti se nachází řepka) a Divoká Šárka (lokalita v Praze, v údolí s potokem a se zahradami, pole v doletové vzdálenosti). V těchto třech lokalitách byly analyzovány včely odebrané z plodového plástu a pyl z plodového plástu. V případě Líšnice se podařilo odebrat také řepku z blízkého pole. Analýza pesticidů ve vzorcích včel byla prováděna opět ve spolupráci s ALS Czech Republic metodou UHPLC s MS/MS.

Pro tuto analýzu byl použit reprezentativní vzorek, který čítal 30 jedinců úlových včel. Tyto včely byly odebrány oklepem z prvního rámmku do sterilního pytle a následně zmrazeny na suchém ledu. Byly odebrány nejen živé, ale také mrtvé včely z podložky úlu, případně z místa úhynu mimo úl a pro získání kompletních informací také pyl z plodového plástu a porost, bylo-li to možné. Vzorky byly zváženy a pro tuto analýzu byly připraveny homogenizací včel v 50 ml Potter-Elvehjem skleněném homogenizátoru (Kavalier, Česko) v acetonitrilu (60004, Honeywell, Spojené státy) nebo nanočisté H₂O. Objem byl 250 µl acetonitrilu nebo nanočisté H₂O na včelu. Následovala homogenizace přibližně 3krát po dobu

asi 2 min. Poté byl homogenát převeden do 15ml zkumavek a lyofilizován. K lyofilizátu byla poté přidána nanočistá H₂O a tato směs byla třepána na překlopné třepačce Reax2 (Heidolph Instruments, Německo) po dobu 10 min a v následujícím kroku byly přidány anorganické soli, které mají usnadnit přechod analytů ze vzorku do acetonitrilové fáze. Následovalo ruční třepání a centrifugace vzorků na Rotina 38R (Hettich, Německo) při 11000 x g, 5 min. Poté byly k alikvotnímu podílu přidány další anorganické soli pro přečištění, následovalo třepání a centrifugace vzorků. V závěrečném kroku dochází k zakoncentrování vzorků s použitím dusíku (LabEva ND-2, Labicom, Česko). Před nástřikem vzorku na kolonu kapalinového chromatografu byly vzorky podle potřeby naředěny a přefiltrovány přes stříkačkové filtry o průměru 13 mm (Teknokroma, Španělsko).

4.1.4. Biologický materiál pro experiment 4. Vliv chronické expozice neonikotinoidu imidaklopidu na čmeláka zemního.

Biologický materiál pro tento experiment byl poskytnut firmou Biobest (Westerlo, Belgie) a zahrnoval miniúľ s hnízdem se čmeláky a pyl. Miniúľ funguje jako bezúdržbový nutriční systém, který byl umístěn do uzavřené nádoby a vybaven automatickým krmítkem pro ptáky, pomocí kterého byla dávkována cukrová strava i imidaklopid. V horní části nádoby byl vytvořen kulatý, síťový otvor, který sloužil jednak k větrání a jednak k podávání pylu. Do nádoby byla umístěna další tkanina, která poskytla kolonii čmeláků stavební materiál.

Po jednodenní aklimatizaci bylo vybráno 6 hnízd čmeláků, 3 byly ošetřeny imidaklopidem a 3 sloužily jako kontrola. Koloniím byl denně podáván čerstvý cukerný roztok s/bez imidaklopidu a pyl. Cukerný roztok byl připraven rozpuštěním granulovaného cukru v pitné vodě v poměru 1:1. Tato pitná voda byla screeningem vyhodnocena jako prostá pesticidů, a tak mohla být použita, aniž by ovlivnila měření. Zásobní roztok imidaklopidu byl připraven zředěním analytického standardu (37894, Sigma-Aldrich, Spojené státy) v nanočisté H₂O. Zásobní roztok imidaklopidu byl rozdělen na alikvoty a ty byly zmrazeny. Každý den byla použita nová zkumavka, aby byla zajištěna příslušná dávka. Ta byla založena na studiích, které ukazují, že obsah imidaklopidu v reálných dávkách v terénu je několik µg na kg pylu či nektaru. První týden byla aplikována dávka 0,1 µg imidaklopidu ve 40 ml cukerného roztoku, poté se dávka zvýšila dvakrát. Experiment byl ukončen 46. den po začátku experimentu umístěním jemných částic suchého ledu do nádoby. Zmrazená kolonie byla demontována a byly odebrány jednotlivé vzorky pro analýzu, které zahrnovaly dělnice čmeláků. U vzorků byly v zmrazeném stavu odříznuty hlavy, ze kterých byla odstraněna

tykadla. Hlavy byly použity pro proteomickou analýzu. Zbývající tělo bylo použito pro analýzu pesticidů. Z každé kolonie byla připravena dvě biologická opakování sestávající z 10 hlav nebo odpovídajících 10 zbytků těl.

Hlavy a těla čmeláků byly homogenizovány v 5 či 50 ml Potter-Elvehjem skleněném homogenizátoru (Kavalier, Česko), 3krát pod dobu přibližně 2 min, rozhodující je úplná homogenizace bez velkých částí vzorku. Pro zpracování 10 hlav čmeláků (bez tykadel) byla použita homogenizace v 2 ml 100mM triethylamoniumbikarbonátového pufru (TEAB; 17902, Sigma-Aldrich, Spojené státy) obsahujícího 2% deoxycholát sodný (SDC; 30970, Sigma-Aldrich, Spojené státy). Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí BCA proteinového kitu (23225, Thermo, Spojené státy). Cysteiny byly redukovány 5 mM TCEP (tris(2-karboxyethyl)fosfin (51805, Sigma-Aldrich, Spojené státy) 60°C po dobu 60 min a zablokovány 10mM MMTS (methyl(methanthiosulfonát) (23011, Thermo, Spojené státy) 10 min při pokojové teplotě. Vzorky byly štěpeny trypsinem, při 37°C přes noc. Poté byly vzorky okyseleny kyselinou trifluoroctovou (76-05-1, Sigma-Aldrich, Spojené státy) na konečnou koncentraci 1 %. SDC byl odstraněn extrakcí do ethylacetátu a poté do hexanu. Peptidy byly odsoleny na koloně Michrom C18 (Bioz, Spojené státy). Vysušené peptidy byly resuspendovány ve 25 µl vody obsahující 2% acetonitrilu a 0,1% kyseliny trifluoroctové. Vzorky byly dále analyzovány pomocí nanoLC-MS/MS.

10 těl čmeláků bez hlavy bylo homogenizováno v 15 ml nanočisté H₂O, dalších 10 ml nanočisté H₂O bylo použito k vypláchnutí zbytku homogenátu do 50 ml centrifugačních zkumavek (Sarstedt, Německo). Homogenát byl zakoncentrován lyofilizací a poté skladován při -80°C do extrakce a analýzy pesticidů metodou UHPLC-MS/MS.

4.1.5. Biologický materiál pro experiment 5. Řízené otravy včel – Hodnocení vlivu xenobiotik na včely v průběhu ontogeneze.

Řízené otravy včel představují situaci, kdy jsou včely POR vystaveny cíleně, a které probíhají v izolátorech se síťovinou kapucí. Tento experiment byl opakován v letech 2015 a 2016 s různým spektrem účinných látek, viz tabulku 4. Pro tento experiment bylo nutné připravit oddělky o obdobném počtu jedinců (cca 5000 jedinců). Včelstva byla umístěna do izolátorů a krmena roztokem cukr/voda v poměru 1:1 po dobu jednoho měsíce. Následně byly do cukerného roztoku přidány testované látky, v případě kontroly byl zachován čistý cukerný roztok. Koncentrace aplikovaných látek vycházela ze známých hodnot chronického a akutního účinku a dále byl také určen/ověřen kvantitativní LC-MS/MS analýzou realistický výskyt pesticidu/metabolitu ve včelstvu pro reálnou představu o distribuci pesticidu ve

včelstvu. Všechny použité POR nebo čisté účinné látky byly ředěny do vodného prostředí, aby se vyloučil vliv rozpouštědel během experimentu. Aby byla zajištěna kontinuální produkce plodu, byl včelstvům navíc podáván mražený, rozemletý rouskovaný pyl. Experiment byl zahájen první dávkou testované látky a tato dávka byla aplikována v intervalu 3-4 krát týdně po dobu čtyř týdnů. Ideálně 2 dny před odběrem vzorků byly izolátory vyčištěny od veškerých mrtvých včel, nacházejících se mimo úl. Poté byly provedeny odběry vzorků, které zahrnovaly odběr kukly ve stádiu červených očí, mladušek, včel z plodového plástu a včel nacházejících se mimo úl. Úlové včely byly podrobeny kromě pesticidové analýze také proteomické analýze. Ze včel z plodového plástu bylo odebráno také 5x10ks střev pro zjištění vlivu pesticidů na expresi proteinů v trávicím traktu, dále 3x200ks tykadel pro analýzu vlivu testovaných látek na orientaci včel a 3x30ks hlav na analýzu proteinů se zaměřením na mozek včel. Ve výsledkové části této dizertační práce nejsou uvedeny výsledky z tohoto experimentu, protože ještě nejsou kompletně vyhodnoceny a zpracovány. Získané výsledky byly použity pro tvorbu metodiky „Hodnocení vlivu xenobiotik na včely v průběhu ontogeneze metodami proteomické, metabolomické a genomické analýzy“.

Tabulka 4. Účinné látky použité v roce 2015 a 2016 pro řízené otravy včel.

Rok	Účinná látka v POR	Rok	Účinná látka v POR
2015	kontrola – bez účinné látky	2016	kontrola – bez účinné látky
2015	imidaklopid	2016	imidaklopid
2015	deltametrin	2016	thiaklopid
2015	kresoxim-methyl	2016	chlormekvat

Včely nacházející se mimo úl zahrnovaly dva typy vzorků, a to mrtvé a živé lezoucí či létající včely. Vzorky byly v tomto případě odebrány pomocí ethanolem sterilizované pinzety do vzorkovnice a umístěny na suchý led. Včely z plodového plástu byly odebrány sklepnutím do plastových sterilních pytlů, které byly umístěny na suchý led, čímž došlo k rychlému usmrcení a zároveň zamrazení. Rozebírání vzorků probíhalo v laboratoři na suchém ledu, pro náš experiment bylo z každého experimentálního včelstva odebráno 6 x 30 jedinců úlových včel, tj. celkem 180 jedinců.

Reprezentativní vzorek, který čítal 30 jedinců mrtvých nebo živých včel nacházejících se mimo úl či 30 jedinců úlových včel, byl zvážen a homogenizován v 50 ml Potter-Elvehjem

skleněném homogenizátoru v 15 ml nanočisté H₂O 3krát pod dobu asi 2 min. Rozhodující je opět úplné rozmělnění homogenátu a nepřítomnost velkých částí včel. Následně byl homogenát převeden do 50 ml zkumavek a homogenizér byl vypláchnut dalšími 10 ml nanočisté H₂O. Vzorky byly zmrazeny při -80°C a lyofilizovány. Následný postup zpracování vzorků včetně analýzy vzorků na pracovišti ALS Czech Republic, s.r.o. byl shodný s postupem použitým při zpracování vzorků včel z experimentu „Náhodné otravy včel“.

4.2. Experimentální přístupy

Vliv patogenů a pesticidů na opylovače byl pro komplexní pohled studován různými metodami. Kromě proteomických gelových metod zahrnujících dvourozměrnou (2-DE) a dvourozměrnou diferenční gelovou elektroforézu (2-D DIGE) byly využity také proteomické bezgelové přístupy zahrnující nanoLC-MS/MS a neproteomické metody zahrnující analýzu pesticidů metodou ultraúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostně spektrometrickou detekcí (UHPLC-MS/MS). Využití proteomických metod při těchto analýzách nám umožňuje sledovat kvalitativní a kvantitativní změny proteinového zastoupení u zdravých a nemocných jedinců, dále můžeme sledovat přítomnost proteinů daného patogenu, změny proteinů během vývoje včel a také možné změny proteinového zastoupení při účinku pesticidů (Erban et al. 2014; Erban et al. 2016a).

4.2.1. Bezgelová proteomická analýza (nanoLC-MS/MS)

Tato metoda byla použita pro vzorky z experimentu 1 a pro část vzorků z experimentu 5. Pro analýzu vzorků bezgelovou proteomickou analýzou byla využita metoda nanoLC spolu s hmotnostní spektrometrií Orbitrap Fusion™ Tribrid™ (Thermo, Spojené státy) (Hebert et al. 2014). Instrumentace LC-MS bylo dříve využito také pro hodnocení příčin ztrát včel. Avšak data ve studii Bromenshenk et al. (2010) byla chybně vyhodnocena a interpretována. Hlavní příčinou je chybně zvolená prohledávací databáze a nerespektování specifičnosti peptidů pro daný organismus (Foster 2011; Erban et al. 2015). Proto je potřeba obezřetnost ve vyhodnocování takových dat. Pro separaci trypsinem natrávených proteinů byly použity nano reverzní fázové kolony (EASY-Spray column, 50cm x 75µm ID, PepMap C18). Mobilní fáze A se skládala z vody, 2% acetonitrilu a 0,1% kyseliny mravenčí. Mobilní fáze B se skládala z 80% acetonitrilu a 0,1% kyseliny mravenčí. Vzorky byly nanášeny na kolonu (Acclaim PepMap300 C18, 300 µm x 5 mm) po dobu 4 minut při průtoku 15 µl/min a nanášecí pufr byl složen z vody, 2% acetonitrilu, 0,1% trifluoroctové kyseliny. Pouze prekursor, jejichž stav nabití byl v rozmezí 2-6, byly podrobeny druhé části hmotnostní analýzy MS/MS. Přesnost

byla nastavena na 10ppm okolo zvoleného prekursoru a jeho izotopů. Byl nastaven monoizotopický výběr prekursorů (Erban et al. 2017a). Získaná data byla analyzována a kvantifikována pomocí algoritmu využívajícího MaxQuant software (verze 1.5.3.8.) a dále byla data zpracována pomocí software Perseus (Cox et al. 2014). Minimální délka řetězce byla stanovena na sedm aminokyselin a dále byly zahrnuty dvě modifikace, a to oxidace methioninu a acetylace N-terminálního proteinu. Data byla vyhodnocena pomocí vícefaktorové ANOVA softwarem Perseus na hladině významnosti 0,05.

4.2.2. Gelová proteomická analýza a identifikace proteinů hmotnostní spektrometrií

Z gelových proteomických metod byla v této práci využita 2-DE s následnou hmotnostní spektrometrií a modifikace 2-DE označovaná jako 2-D DIGE, kdy se proteinové vzorky značí fluorescenčním barvivem CyDyesTM. Vzhledem k užití až tří barviv CyDyes je možné nanášet na jeden gel dva různé vzorky a k tomu navíc ještě směsný vzorek (Vítámvás et al. 2010). Dvourozměrná elektroforéza je separační metoda, která se skládá ze dvou kroků. Prvním krokem je izoelektrická fokusace, která je založená na dělení proteinů podle elektrického náboje. Druhým krokem je SDS-PAGE, kdy jsou proteiny separovány ve směru kolmém na první rozměr a jsou separovány na základně velikosti (Dent & Walton 1997). Kombinace těchto dvou metod umožňuje zvýšení rozlišení komplexních proteinových směsí (O'Farrell 1975).

Lyofilizované proteinové vzorky byly přímo použity pro první rozměr dvourozměrné elektroforézy, tedy pro isoelektrickou fokusaci (IEF). Vzorky byly rozpuštěny v daném objemu rehydratačního pufru DeStreakTM (0,2%, pI 3-10 nebo pI 4-7; 17-6003-19, Bio-Sciences, Švédsko) na požadovanou koncentraci a poté byly naneseny na 7 cm nebo 13 cm keramické holdery (80-6417-25, Bio-Sciences, Švédsko). K takto připraveným vzorkům byly naneseny IPG stripy, separace proběhla v přístroji Ettan IPG Phor 3 s kontrolním softwarem Ettan IP Gphor3, version 1,2 (Bio-Sciences, Spojené státy). Po proběhnutí prvního rozměru byly stripy ekvilibrovány v ekvilibračním roztoku (6M urea, 2% SDS, 0,05M Tris-HCl pH=8,8, 20% glycerol) obsahujícím dithiotreitol (100 mg/10 ml; 43817, Sigma-Aldrich) po dobu 15 min. Dithiotreitol funguje jako redukční činidlo thiolových skupin. Následně byl přidán iodacetamid (57670, Fluka, Spojené státy) fungující jako alkylační činidlo pro cysteinové zbytky a ekvilibrace probíhala dalších 15 min (Peiren et al. 2005; Erban et al. 2014). Následovalo dělení proteinů ve druhém rozměru. Separace proteinů ve druhém rozměru je dle jejich velikosti. Připravené stripy po isoelektrofokusaci byly umístěny na 14% polyakrylamidový gel (PAGE) s přidavkem dodecylsulfátu sodného (SDS) a fixovány

pomocí 1% agarózy (A7431, Sigma-Aldrich). Elektroforéza probíhala v zařízení SE 600 Ruby (Hoefler, Spojené státy) v tris-glycinovém uspořádání a byla prováděna za soustavného chlazení při konstantním napětí 77V po dobu asi 30 min, poté bylo napětí zvýšeno na přibližně 300 V. Po ukončení druhého rozměru elektroforézy byly gely převedeny do fixačního roztoku (40% metanol a 10% kyselina octová) a následně vizualizovány barvením pomocí Coomassie Brilliant Blue G-250 (Phastgel Blue R, Bio Sciences, Švédsko) (Peiren et al. 2005; Erban et al. 2014). Po přibližně 60 min třepání byly gely přemístěny do odbarvovacího roztoku, který je pro tento typ elektroforézy totožný s fixačním roztokem. Takto získané gely byly dokumentovány na zařízení G:BOX EXTENDED (SYNGENE, Spojené království) za použití zdroje bílého světla a UV:06 filtru. Následovalo měření hmotnostním spektrometrem 4800 Plus MALDI-TOF/TOF (AB Sciex, Spojené státy) (Erban et al. 2013).

Pro 2D-DIGE analýzu byly použity stejné lyofilizované vzorky jako pro klasickou dvourozměrnou elektroforézu. Tato modifikace dvourozměrné gelové elektroforézy využívá až tři fluorescenční barviva CyDyesTM (Cy2, Cy3, Cy5) (GE Healthcare, Spojené království). Proteinové vzorky byly před barvením rozpuštěny v lyzačním pufu (30mM Tris, 7M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS) na koncentraci 5 µg/µl. Pro úspěšné navázání CyDye barviv na vzorek by mělo být pH vzorku okolo 8,5. CyDyesTM barviva byla nejprve rozpuštěna v dimethylformamidu na koncentraci 0,4 mM (Sigma-Aldrich, Německo) a následně přidána k 10 µg rozpuštěných vzorků. Po 30 minutách barvení se inaktivovalo nenavázané barvivo 10mM lysinem (L-Lysine monohydrochloride, Sigma-Aldrich, Německo). Takto připravené vzorky byly naneseny na IPG stripy (Vítámvás et al. 2010). Následná isoelektrofokuse ani druhý rozměr elektroforézy se nelišil od klasické dvourozměrné elektroforézy. Lišila se následná detekce separovaných proteinů, ke které byl v tomto případě využit laserový fluorescenční scanner Molecular Imager PhorosFX Plus (Biorad, Spojené státy). Analýza výsledků probíhala softwarem PDQuest (Biorad) nebo Dymension3 (Syngene).

2D-DIGE analýzou byly vytipovány spoty, které byly následně z obarvených gelů z 2D-E separovány. Separované „spoty“ měly průměr okolo 0,5-1 mm a představovaly jednotlivé proteiny či isoformy daného proteinu. Spoty byly vloženy do zkumavek typu eppendorf (Protein LoBind Tube 0,5 ml, Spojené státy) a po zpracování byla provedena identifikace pomocí hmotnostní spektrometrie 4800 Plus MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems/MDS Sciex, Spojené státy). Před samotnou analýzou bylo ze spotů odstraněno barvivo Coomassie promytím 100 µl 50mM amonium bikarbonátu (ABC) rozpuštěného v 50 % acetonitrilu s 50mM DTT. Vzorky byly následně sonikovány po dobu 5 minut. Pro

odstranění IAA byly vzorky promyty roztokem ABC/ACN/DTT o stejné koncentraci. Po odstranění supernatantu byly vzorky sonikovány 5 minut v 100 μ l HPLC/MS vodě a následně 5 minut v 100 μ l ACN. Vzorky byly ponechány 2 minuty v otevřených eppendorfkách pro úplné odstranění roztoku evaporací. Poté byly vzorky štěpeny 5 mg trypsinu rozpuštěného v 10 μ l 50mM ABC a inkubovány při teplotě 37 °C přes noc. Tryptické štěpy byly eluovány pomocí ultrazvukové lázně po přidání 0,5 μ l 3% kyseliny trifluoroctové rozpuštěné v ACN. Vzorky byly sonikovány po dobu 10 minut a poté nanášeny v objemu 0,5 μ l na MALDI destičku. Po zaschnutí byly převrstveny 0,5 μ l matrice CHCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, Sigma-Aldrich, Německo) a měřeny hmotnostním spektrometrem v rozmezí 700-4000 m/z. Měřená molekula je v MALDI umístěna v matici organických molekul a následně ozářena zábleskem laseru Nd:YAG laser (355 nm, 200 Hz), vzniknou kladně nabitě ionty, které jsou nasměrovány do hmotnostního spektrometru. Výsledkem jsou spektra, která byla porovnána s databází NCBI (National Center for Biotechnology Information) pomocí programu Mascot v 2.2 (Matrix Science, Spojené státy). Vzorky byly analyzovány v Laboratoři hmotnostní spektrometrie na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze.

4.2.3. Analýza pesticidů

Analýza pesticidů pomocí UHPLC-MS/MS byla provedena za použití ultraúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s XEVO TQ-S trojitým kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem QqQ (Waters, Milford, Spojené státy). Této analýze byly podrobeny vzorky půdy a řepky z experimentu 2, včely z náhodných a cílených otrav z experimentu 3 a 4 a část vzorků z experimentu 5. Chromatografická separace pesticidů a pyrethroidů byla provedena na analytické koloně BEH C18 (100mm x 2,1mm x 1,7 μ m, Waters, Spojené státy), která byla chráněna předkolonou Vanguard BEH C18 (5,0mm x 2,1mm x 1,7 μ m, Waters, Spojené státy). V průběhu analýzy byla udržována teplota kolony na konstantních 40°C. Jako mobilní fáze byl využit 5mM octan amonný a methanol při průtokové rychlosti 0,40 ml/min za použití elučního gradientu. Analýza kvarterních amoniových solí byla provedena na chromatografické koloně Kinetex HILIC (100mm x 2,1mm x 1,7 μ m, Phenomenex). Teplota kolony byla nastavena na 30°C. Separace probíhala v isokratickém módu s mobilní fází 150mM mravenčan amonný pH 3,7 a acetonitril při průtoku 0,5 ml/min. Vzorky o objemu 5 μ l byly injekčně aplikovány do UHPLC systému. Ionizace elektrosprejem byla prováděna v pozitivním módu. Nastavení hmotnostního spektrometru (napětí na kapiláře, desolvatační teplota, průtok desolvatačního plynu) bylo optimalizováno pro jednotlivé metody. Přístroj byl

ovládán pomocí softwaru MassLynx (v. 4.1, Waters) a k vyhodnocování dat byl využit software TargetLynx (v. 4.1, Waters).

Pro každou sloučeninu byly sledovány dva MRM přechody pro potvrzení přítomnosti stanovované látky. Za pozitivní byl považován takový výsledek, kdy poměr mezi přechody pro analyt ve vzorku odpovídal poměru přechodů ve standardu. Kvantifikace byla prováděna metodou vnějšího standardu s korekcí na výtěžnost extrakčních isotopicky značených standardů.

5. VÝSLEDKY

Publikace v časopise recenzovaném metodou peer-review s impakt faktorem

Kadlikova K, Vaclavikova M, Halesova T, Kamler M, Markovic M, Erban T. 2021. The investigation of honey bee pesticide poisoning incidents in Czechia. *Chemosphere* 263 (128056). DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.128056. (IF₂₀₁₉ = 5.778; Q1).

Erban T, Sopko B, **Kadlikova K**, Talacko P, Harant K. 2019. *Varroa destructor* parasitism has a greater effect on proteome changes than the deformed wing virus and activates TGF- β signaling pathways. *Scientific Reports* 9: 9400. DOI: 10.1038/s41598-019-45764-1. (IF₂₀₁₉ = 3.998; Q1).

Erban T, Sopko B, Talacko P, Harant K, **Kadlikova K**, Halesova T, Riddelova K, Pekas A. 2019. Chronic exposure of bumblebees to neonicotinoid imidacloprid suppresses the entire mevalonate pathway and fatty acid synthesis. *Journal of Proteomics* 196: 69-80. DOI: 10.1016/j.jprot.2018.12.022. (IF₂₀₁₈ = 3.537; Q1).

Seifrtova, M., Halesova, T., **Sulcova, K.**, Riddelova, K., Erban, T. 2017. Distributions of imidacloprid, imidacloprid-olefin and imidacloprid-urea in green plant tissues and roots of rapeseed (*Brassica napus*) from artificially contaminated potting soil. *Pest Management Science* 73: 1010-1016. DOI: 10.1002/ps.4418. (IF₂₀₁₇ = 3.429; Q1).

Certifikované metodiky

Erban T, Kamler M, **Šulcová K**, Titěra D, Seifrtová M, Riddelová K, Hubert J, Hortová B, Halešová T. 2016b. Hodnocení vlivu xenobiotik na včely v průběhu ontogeneze metodami proteomické, metabolické a genomické analýzy: certifikovaná metodika. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby. 36 s. ISBN: 978-80-7427-210-3.

Erban T, Kamler M, **Kadliková K**, Markovič M, Titěra D, Seifrtová M, Halešová T. 2018. Nový přístup hodnocení suspektních otrav včel pesticidy: certifikovaná metodika. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby. 22 s. ISBN: 978-80-7427-252-3.

Poster prezentace

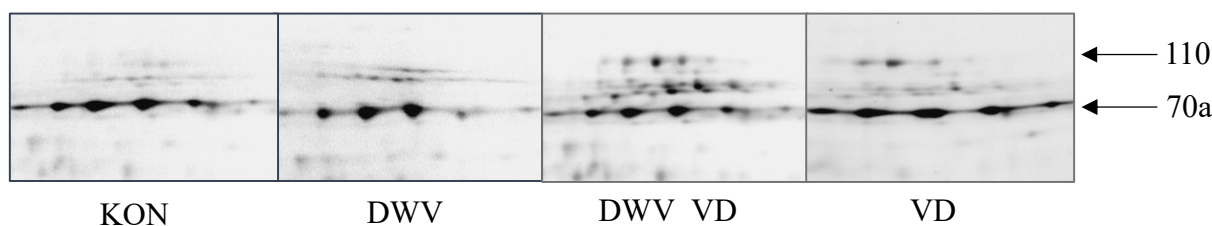
Šulcová K, Vítámvás P, Harant K, Kamler M, Erban T. 2016. Vliv roztoče *Varroa destructor* v interakci s virem deformovaných křídel na vývoj *Apis mellifera*. In: Bryja J, Sedláček F, Fuchs R, (eds.). s. 221 – 222. Sborník abstraktů z konference 11.-12. února 2016. Zoologické dny České Budějovice 2016. 1. vyd.: Ústav biologie obratlovců AV ČR. Brno. ISBN 978-80-87189-20-7.

5.1. Experiment 1. Vliv roztoče *Varroa destructor* a viru deformovaných křídel na změny proteomu *Apis mellifera*.

5.1.1. Gelová analýza 2-D DIGE s následnou identifikací hmotnostní spektrometrií.

Gelovou analýzou byly ve vzorcích včel nejvýznamnější kvantitativní změny pozorovány u hexamerinů. Jedná se o zásobní proteiny, které slouží jako zdroj energie a aminokyselin především v období, kdy včely nepřijímají potravu. U včel byly identifikovány čtyři hexameriny označované jako 70a, 70b, 70c a 110 (Erban et al. 2016a). Nám se touto metodou podařilo vizualizovat pouze hexamerin 70a a 110, viz obrázek 7. Hexamerin 70a byl ve všech testovaných vzorcích konstantní, což značí, že nebyl parazitací roztočem a virem DWV ovlivněn. Parazitace roztočem *V. destructor* zvyšuje zastoupení hexamerinu 110. Výhodou této analýzy je možnost analyzovat isoformy jednotlivých hexamerinů.

Obrázek 7. Změny hexamerinu 70a a 110 u jednotlivých typů vzorků. Výřezy z 2-D DIGE.



Legenda: KON – kontrolní včela, DWV – včela se symptomy DWV, DWV_VD - včela parazitovaná roztočem se symptomy DWV, VD - včela parazitovaná roztočem.

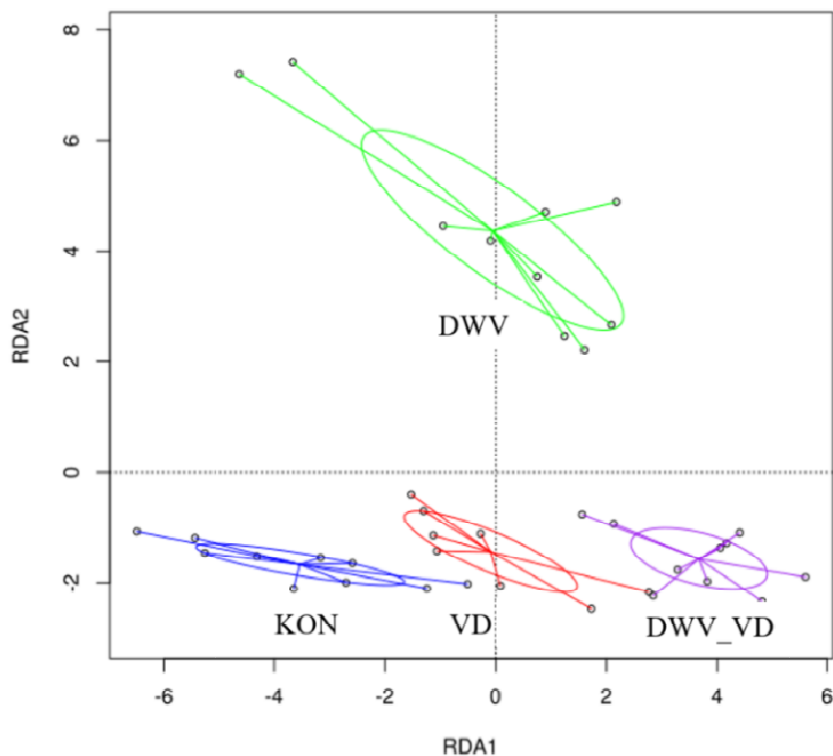
5.1.2. Bezgelová analýza nanoLC-MS/MS

Po filtraci relativních kvantitativních proteomických dat hodnocených v software Perseus bylo pro další hodnocení zařazeno 2316 proteinových záznamů. Byl počítán počet roztočů, kteří se nacházeli na každé včele, a bylo také testováno, zda počet roztočů může být

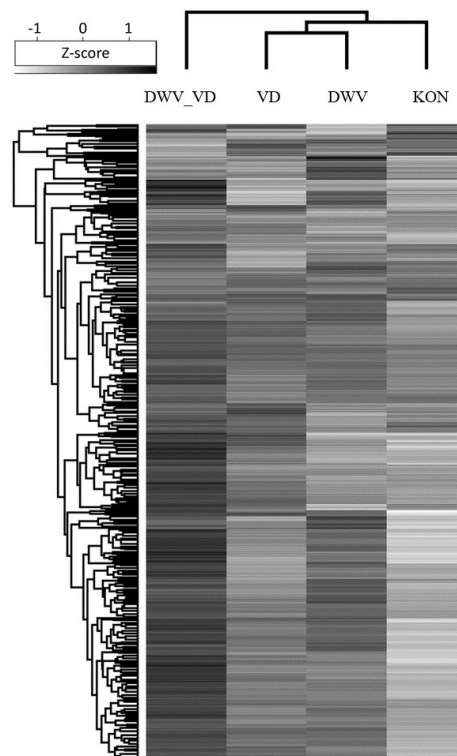
významným faktorem ovlivňující změny proteomu. Naše testování neodhalilo významné rozdíly.

Změna proteomu u včel byla studována pomocí redundanční analýzy (RDA), viz obrázek 8 a klastrové analýzy s heatmapou, viz obrázek 9. Tyto analýzy prokázaly rozdíly mezi celkovými proteomy u všech čtyř testovaných variant. Různé polohy variant DWV a DWV_VD v biplotu RDA naznačují různé účinky roztočů a virů na proteom, ačkoliv analyzované včely byly vizuálně podobné. Umístění KON, VD, DWV_VD ve stejném směru a DWV odděleně od nich naznačuje, že roztoč *Varroa* měl na změny proteomu větší vliv než DWV, viz obrázek 8. Hierarchické seskupení ve sloupcích klastrové analýzy podporuje tyto výsledky z RDA, viz obrázek 9. Podle výsledků se dále jeví, že účinek parazitace roztočem je aditivní v případě, že *Varroa* parazituje na deformované včele, protože posun DWV_VD od KON je přibližně dvakrát větší než posun samotného VD.

Obrázek 8. Redundanční analýza (RDA) proteomických dat ukazuje rozdíly způsobené parazitací roztočem *Varroa* (VD), virem deformovaných křídel (DWV) a jejich interakcí (DWV_VD) vzhledem ke kontrolním včelám (KON). Hladina významnosti RDA1 je 65,83% a RDA2 23,83%.

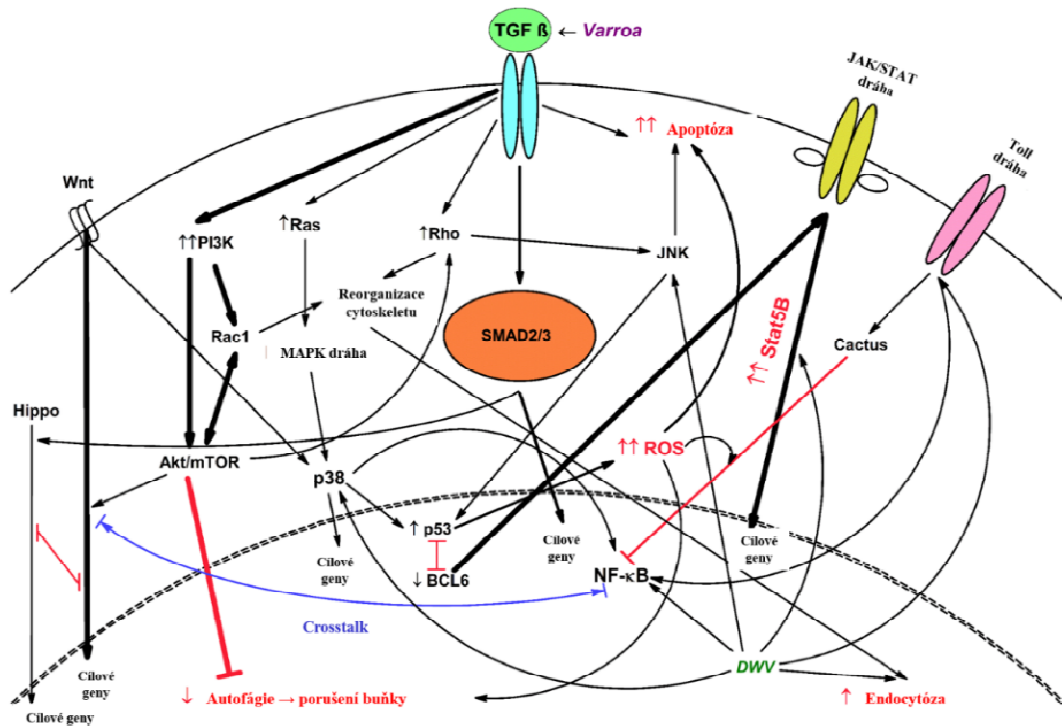


Obrázek 9. Teplotní mapa, která vizualizuje rozdíly proteomu u čtyř testovaných variant. Obrázek ukazuje, že změny proteomu u varianty DWV_VD byly ve srovnání s KON rozdílnější než u DWV a VD.



Vzhledem k tomu, že vliv patogenů a parazitů je spojen se změnami imunitního systému hostitele, byly zkoumány proteiny, u kterých je prokázána role v obraně včel proti virům. V NCBI bylo srovnáním s dřívějším review (Brutscher et al. 2015) identifikováno 9 proteinů, z nichž 5 vykazovalo v našem porovnání významné změny. Ostatní sekvence byly z databází procesováním vyřazeny, a proto jsme je nehodnotili. Dále byly ze seznamu identifikovaných proteinů vybrány další důležité proteiny související s imunitou a v řadě z nich byly zjištěny změny. Jednalo se o proteiny zapojené do různých imunitních cest jako je JAK/STAT, MAPK, JNK, Toll, LLRs, NF- κ B či RIG-I. Vzhledem k tomu, že *Varroa* do jisté míry potlačuje změny proteomu indukované DWV, jak je znázorněno na obrázku 10, naznačuje to, že roztoč potlačuje mechanismy, které za normálních okolností usnadňují infekci DWV. V signalizaci NF- κ B a JAK/STAT tím dochází k opačným účinkům.

Obrázek 10. Zjednodušené schématické znázornění postižených cest u líhnoucích se mladušek, v důsledku interakce roztoče *Varroa* a DWV.



5.2. Experiment 2. Distribuce imidaklopridu, imidakloprid-olefinu a imidakloprid-urey v zelených částech a v kořenech řepky olejky (*Brassica napus*)

V tomto experimentu byla sledována distribuce imidaklopridu a jeho degradačních produktů imidakloprid-olefinu a imidakloprid-urey z půdy přes kořenový systém až do zelených částí rostliny. Imidakloprid-urea je primární metabolit imidaklopridu v půdě, zatímco imidakloprid-olefin je hlavním rostlinným metabolitem. Před samotným experimentem byl změřen zásobní roztok imidaklopridu, který obsahoval 528,9 µg/ml imidaklopridu a 5,38 µg/ml imidakloprid-urey. Imidakloprid-olefin nebyl detekován. Ze získaných hodnot byl vypočten molární poměr mezi imidaklopridem a imidakloprid-ureou, který činil 81,44. Tento poměr jsme považovali za počáteční stav v době aplikace imidaklopridu do půdy. V kořenech byla zjištěna přítomnost mateřské sloučeniny imidaklopridu a imidakloprid-urey, zatímco v zelených částech rostlin byla navíc zjištěna přítomnost imidakloprid-olefinu, viz tabulku 5.

Tabulka 5. Molární poměry (n/n) imidaklopridu a jeho dvou metabolitů imidakloprid-urey a imidakloprid-olefinu v zemině, kořenech a zelených částech řepky olejky 4 týdny po aplikaci imidaklopridu do substrátu. Molární poměry pro sloučeniny byly vypočítány samostatně v každé LC-MS/MS analýze a data byla poté zprůměrována.

Typ vzorku	Počáteční koncentrace imidaklopridu v zemině	Imidakloprid / imidakloprid-urea	Imidakloprid / imidakloprid-olefin
zelené části	250 µg/kg	10,59 ± 2,48	2,24 ± 0,48
	2500 µg/kg	11,94 ± 0,88	1,47 ± 0,28
kořen	250 µg/kg	22,19 ± 9,97	nedetekováno
	2500 µg/kg	30,41 ± 3,78	nedetekováno
zemina	250 µg/kg	35,06 ± 8,06	nedetekováno
	2500 µg/kg	30,41 ± 6,05	264,69 ± 67,50

5.3. Experiment 3. Případy akutních otrav včel

Ve vzorcích odebraných v rámci podezření z otravy včel bylo celkově identifikováno 23 pesticidů a 2 metabolity, viz tabulku 6. Obsah jednotlivých pesticidů ve včelách, v pylu z plodového plástu (perga) a v rostlinné matrici se u jednotlivých lokalit významně lišil. Nejvýznamnějšími detekovanými pesticidy z pohledu velmi vysoké toxicity byl organofosfát chlorpyrifos a z kvantitativního hlediska neonikotinoid thiakloprid. Dalšími významnými detekovanými pesticidy byly pyretroidy deltametrin a cypermetrin a neonikotinoid imidakloprid z hlediska vysoké toxicity a fungicidy azoxystrobin, prochloraz a tebukonazol z kvantitativního hlediska.

Tabulka 6. Přehled pesticidů detekovaných ve vzorcích včel, pylu z plodového plástu (perga) a rostlin podezřelých z otravy včel.

Pesticid	Typ	Toxicita	Včely	Perga	Rostlina
6-chloronikotinová kyselina	I-metab.	netoxický	x	—	—
acetamiprid	I	mírně toxický	x	x	x
azoxystrobin	F	netoxický	x	x	x
boskalid	F	netoxický	x	x	x
chlorpyrifos	I	vysoce toxický	x	x	x
klomazon	H	mírně toxický	—	x	—
klothianidin	I	vysoce toxický	x	—	x
cyprokonazol	F	netoxický	x	x	x
dimoxystrobin	F	středně toxický	x	x	—
epoxikonazol	F	středně toxický	—	x	x
imidakloprid	I	vysoce toxický	x	x	x
isoproturon	H	netoxický	x	x	—
kresoxim-methyl	F	mírně toxický	x	—	—

metazachlor	H	středně toxický	—	x	—
methiokarb sulfoxid	I-metab.	nezjištěno	—	—	x
prochloraz	F	mírně toxický	x	x	x
pyrimethanil	F	mírně toxický	—	x	—
tebukonazol	F	středně toxický	x	x	x
thiakloprid	I	mírně toxický	x	x	x
thiametoxam	I	vysoce toxický	x	x	x
cypermetrin	I	vysoce toxický	x	—	x
deltametrin	I	vysoce toxický	x	—	x
tau-fluvalinát	I	středně toxický	x	x	x
chlormekvat	G	středně toxický	x	x	x
mepikvat	G	netoxický	x	x	x

Legenda: I – insekticid, F – fungicid, H – herbicid, G – regulátor růstu

V tabulce 7 je uveden výběr nejdůležitějších detekovaných pesticidů v naší studii a jejich vztah ke zdroji otravy. Chlorpyrifos, cypermetrin, deltametrin a imidakloprid jsou klasifikovány pro včely jako vysoce toxické, zatímco prochloraz a thiakloprid jsou mírně toxické a chlormekvat je netoxický.

Tabulka 7. Nejdůležitější detekované pesticidy v jednotlivých lokalitách ve vztahu ke zdroji otravy.

Pesticid	akutní toxicita	akutní orální toxicita LD50 ng/včelu	akutní kontaktní toxicita LD50 ng/včelu	lokality	mrtvé/umírající včely ng/včelu	úlové včely ng/včelu	pyl ng/g	rostlina ng/g
chlorpyrifos	vysoce toxický	240-360	59-72	Panoší Újezd	0,2-2,8	0,7	29,0	0,9-5,7
				Libodřice	146,1-289,4	1,3-226,1	1,9	3,9
				Chrudim	12,1	NM	NM	NM
				Štětí	1,8	0,1	1,7	n.d.
prochloraz	mírně toxický	684030	14890	Panoší Újezd	58,7-227,7	3,2	179,8	788,5-11340
				Rohovládova Bělá	1,0-294,2	1,3-1,5	1,0-7,2	59,6-2156
thiakloprid	mírně toxický	17 320-27885	38820	Panoší Újezd	76,8-217,8	1,4	9,6	301,5-2316
deltametrin	vysoce toxický	79	34-50	Panoší Újezd	5,9-16,4	0,3	n.d.	99,4-1614
cypermetrin	vysoce toxický	64	34	Libodřice	57,1-86,3	90,7	n.d.	49,8
				Rohovládova Bělá	13,6-16,8	n.d.	n.d.	79,2-104,2
imidakloprid	vysoce toxický	3,7	81	Rohovládova Bělá	4,3-5,3	n.d.	n.d.	0,6-1,7
chlormekvat	netoxický	>111500	> 100000	Štětí	0,3	0,3	23,0	1,7 letecky 2 608 traktorem

Legenda: NM = neměřeno, n.d. = nedetekováno

V kontrolních vzorcích bylo identifikováno 17 sloučenin, a to 16 pesticidů a metabolit methiokarbsulfoxid. Ve všech vzorcích včel ve všech třech lokalitách byla detekována velmi nízká hladina pesticidů, viz tabulku 8.

Tabulka 8. Tři lokality, které byly považovány za kontrolu, protože u nich nebyly pozorovány příznaky otravy včel.

pesticid	akutní toxicita	akutní orální toxicita LD50 ng/bee	akutní kontaktní toxicita LD50 ng/bee	lokality	úlové včely ng/bee	perga ng/g	rostlina ng/g
acetamiprid	mírně toxický	14 000	8 000	Líšnice	n.d.	n.d.	n.d.
				Ruzyně	n.d.	0,31-0,35	x
				Tichá Šárka	0,01-0,04	0,14-0,87	x
azoxystrobin	netoxický	25 000	200 000	Líšnice	0,21-0,24	83,7-122,5	90,4
				Ruzyně	n.d.	0,48-0,50	x
				Tichá Šárka	0,02-0,05	1,3-32,8	x
boskalid	netoxický	166 000	200 000	Líšnice	n.d.	0,32-0,67	n.d.
				Ruzyně	0,06	1,8-2,1	x
				Tichá Šárka	n.d.	1,3-32,8	x
chlorpyrifos	vysoce toxický	240 - 360	59 - 72	Líšnice	0,07-0,68	24,7-84,8	4,9
				Ruzyně	0,06-0,08	6,8-18,7	x
				Tichá Šárka	0,04-0,06	2,0-17,6	x
klothianidin	vysoce toxický	4	44	Líšnice	0,03-0,04	n.d.	1,6
				Ruzyně	n.d.	n.d.	x
				Tichá Šárka	n.d.	n.d.	x
cyprokonazol	netoxický	>100 000	>100 000	Líšnice	n.d.	2,3	2,0
				Ruzyně	n.d.	0,9-1,5	x
				Tichá Šárka	n.d.	n.d.	x
dimoxystrobin	středně toxický	>79 400	>100 000	Líšnice	n.d.	1,3	n.d.
				Ruzyně	0,03-0,21	5,0-5,2	x
				Tichá Šárka	n.d.	0,5-4,0	x
isoproturon	netoxický	195 000	200 000	Líšnice	n.d.	0,09-0,28	n.d.
				Ruzyně	n.d.	0,04-0,12	x
				Tichá Šárka	n.d.	0,32	x
methiokarb sulfoxid	nezjištěno	nezjištěno	nezjištěno	Líšnice	n.d.	n.d.	n.d.
				Ruzyně	0,05-0,36	n.d.	x
				Tichá Šárka	n.d.	n.d.	x

pethoxamid	netoxický	>200 000	>200 000	Líšnice	n.d.	0,5	0,2
				Ruzyně	n.d.	n.d.	x
				Tichá Šárka	n.d.	n.d.	x
pyrimethanil	mírně toxický	>100 000	>100 000	Líšnice	n.d.	n.d.	n.d.
				Ruzyně	0,04-2,12	0,5-1,4	x
				Tichá Šárka	n.d.	n.d.	x
tebukonazol	středně toxický	83 000	200 000	Líšnice	0,7-1,3	146,5-495,5	1652,9
				Ruzyně	0,03-0,04	3,1-8,0	x
				Tichá Šárka	0,02-0,03	0,5-2,6	x
thiaklopid	mírně toxický	17 320 – 27 885	38,820	Líšnice	2,0-2,1	32,9-241,8	85,2
				Ruzyně	1,4-2,6	1,8-5,0	x
				Tichá Šárka	0,1-1,2	1,7-10,4	x
thiamethoxam	vysoce toxický	5	24	Líšnice	n.d.	n.d.	n.d.
				Ruzyně	n.d.	n.d.	x
				Tichá Šárka	0,01	0,08-0,60	x
cypermetrin	vysoce toxický	64	34	Líšnice	n.d.	n.d.	3,2
				Ruzyně	n.d.	n.d.	x
				Tichá Šárka	n.d.	n.d.	x
deltametrin	vysoce toxický	79	34 - 50	Líšnice	n.d.	2,4-15,8	29,5
				Ruzyně	n.d.	n.d.	x
				Tichá Šárka	n.d.	n.d.	x
tau-fluvalinát	středně toxický	45 000	8 700	Líšnice	0,01	2,3-2,5	n.d.
				Ruzyně	0,02	n.d.	x
				Tichá Šárka	n.d.	0,8-2,1	x

Legenda: n.d. = nedetekováno

5.4. Experiment 4. Vliv chronické expozice neonikotinoidu imidaklopidu na čmeláka zemního.

Výsledky analýzy těl čmeláků metodou UHPLC-MS/MS ukázaly přítomnost pouze dvou sloučenin, a to imidaklopidu v množství $0,57 \pm 0,22$ ng/g a imidaklopid-olefinu v množství $1,95 \pm 0,43$ ng/g. Metabolit imidaklopid-urea nebyl přítomen. Hladina nebezpečného metabolitu imidaklopid-olefinu byla 3,4krát vyšší než hladina imidaklopidu.

Kvantitativní proteomika hlav čmeláčích dělnic bezgelovou analýzou nanoLC-MS/MS umožnila kvantitativní porovnání 2883 proteinů, z nich 206 bylo významně ovlivněno ošetřením imidaklopidem. Další analýzou a využitím genové databáze KEGG bylo zjištěno,

že řada vysoce down regulovaných markerů je členy biosyntetické cesty terpenoidů. Při konkrétnějším zkoumání bylo zjištěno, že byly významně sníženy markery, které patří do mevalonátové dráhy, jež produkuje isopentenylpyrofosfát nebo dimethylallylpyrofosfát jako konečný produkt z acetyl-CoA, čímž byla potlačena biosyntéza páteřní kostry terpenoidů a metabolismus mastných kyselin. Blokace mevalonátové cesty má přímou souvislost se syntézou hormonů a membránových proteinů.

5.5. Experiment 5. Řízené otravy včel – Hodnocení vlivu xenobiotik na včely v průběhu ontogeneze.

Výsledky za rok 2015 ukazují, že v případě kontroly nebyly v žádných vzorcích detekovány účinné látky POR. V případě imidaklopridu bylo zjištěno, že vzorky úlových včel vykazovaly řádově vyšší koncentraci imidaklopridu než odebrané mrtvé včely. U úlových včel byly rovněž ve všech vzorcích detekovány degradační produkty imidaklopridu, a to imidaklopid-urea a imidaklopid-olefin v nízkých koncentracích. V případě deltametrinu byla v mrtvých včelách detekována nekolikanásobně vyšší koncentrace této látky než ve vzorcích úlových včel. V případě kresoxim-methylu byla naměřena velmi vysoká koncentrace ve všech vzorcích včel. V žádném vzorku líhnoucích se včel (mladušek) ani kukel ve stádiu červené oči nebyla detekována přítomnost účinných látek, kromě vzorků vystavených kresoxim-methylu, kde byly jak u mladušek, tak u kukel detekovány nízké koncentrace. Data získaná z tohoto experimentu byla použita pro realizaci certifikované metodiky. Výsledky budou dále zpracovávány, vyhodnocovány a později publikovány.

6. DISKUZE

Význam včely medonosné z pohledu důležitého opylovače i poskytovatele celé řady produktů je nepopíratelný. V této souvislosti, ale nesmíme opomenout ani další zástupce nadčeledi Apoidea, a to včely samotářky a čmeláky. V literatuře lze dohledat velké množství publikací zabývajících se ztrátami včel, které můžeme v posledních letech pozorovat po celém světě. Je velmi obtížné určit jeden konkrétní faktor, který by mohl být zodpovědný za tyto ztráty, neboť na ztrátách včel se podílí celá řada faktorů (Bacandritsos et al. 2010; Simon-Delso et al. 2014). Proto je důležité tyto ztráty dále studovat a hledat souvislosti mezi různými faktory. Zatímco u včely medonosné se můžeme setkat s periodickými úhyny, v případě samotárek a čmeláků je na místě podtrhnout mizení určitých druhů. To může být způsobeno nejen užíváním pesticidů a nemocemi, ale také změnou podnebí a dalšími faktory (Condamine & Hines 2015). Včela medonosná a čmelák zemní patří mezi sociální hmyz, a tak distribuce případného pesticidu v tomto společenství probíhá jiným způsobem než u samotárek. V případě, že si samotářka přinese kontaminovanou potravu, je touto kontaminací ovlivněno potomstvo pouze jednoho jedince. U sociálního hmyzu jsou to desetitisíce jedinců u včel a desítky až stovky jedinců u čmeláků. Odběr vzorků při analýzách v takovýchto pokusech není vždy snadný, stále musíme mít na mysli to, že se jedná o živý, propracovaný systém, který ne vždy funguje podle toho, jak bychom si představovali. Aby bylo možné mezi sebou jednotlivé vzorky porovnávat, je vhodné vždy analyzovat jednotlivá vývojová stádia, která lze snadno identifikovat, jako je vajíčko (Fang & Li 2010), larva (Gregorc et al. 2012), kukla ve stádiu červených očí (Erban et al. 2014) či čerstvě se líhnoucí mladuška (Erban et al. 2016b). Ikdyž se vzorky pro tyto analýzy většinou odebírají v terénu, je potřeba zajistit alespoň základní podmínky odběru, aby nedocházelo ke znehodnocování materiálu. Jedná se především o manipulaci se vzorky čistými pomůckami, uskladnění vzorků v čistých nádobách a za stálého chlazení, aby během transportu či zpracování vzorků nedocházelo k jejich degradaci. Jednotliví zástupci nám také nabízejí různé možnosti při prováděných experimentech. U včely medonosné je výhodou, že kolonie obsahuje mnoho jedinců, a tak většinou nebývá problém s nedostatkem vzorků. Oproti tomu u čmeláka je ve srovnání se včelou medonosnou menší počet jedinců, ale kolonie jsou vhodnější pro laboratorní pokusy. Nejnáročnější je z praktického hlediska realizace experimentů se samotářkami.

V experimentu 1 byl sledován vliv roztoče *V. destructor* a DWV na změny v proteomu včely medonosné s využitím dvou metod. S využitím gelové analýzy s následnou hmotnostní detekcí byly sledovány změny hexamerinu 70a a 110. Hexameriny jsou hlavní proteiny

využívané při metamorfóze včel z larvy na dospělého jedince (Erban et al. 2016a). Výsledky jako celek jsou překvapivé v tom smyslu, že neodpovídají původnímu předpokladu, že parazitace roztočem *V. destructor* snižuje zastoupení zásobních proteinů tím, že roztoč včelám odebírá živiny s hemolymfou (Bowen-Walker & Gunn 2001; Erban et al. 2016a). Naopak, pravděpodobně vlivem parazitace roztočem dochází ke stimulaci exprese některých z těchto zásobních proteinů. Druhá zvolená metoda bezgelová analýza nanoLC-MS/MS poskytla komplexnější výsledky. Je zřejmé, že přítomnost roztoče *Varroa* a klinického projevu DWV způsobuje změny v proteomu včel. V případě hexamerinů byly částečně potvrzeny výsledky získané gelovou analýzou. Byla zjištěna významná up-regulace hexamerinu 70c a 110 spojená s parasitismem *Varroa* i kombinací *Varroa* a DWV. Opačná situace byla zjištěna u hexamerinu 70b, který byl down-regulován v přítomnosti *Varroa* a DWV. Navíc byla pozorována down-regulace u hexamerinu 110 ve variantě s DWV. Jediný rozdíl v porovnání s gelovou analýzou byl pozorován u hexamerinu 70a, který byl v případě bezgelové analýzy ve všech testovaných variantách téměř konstantní. To potvrzuje předpoklad, že hexamerin 70a není zásobním proteinem používaným během metamorfózy, ale může spíše fungovat jako transportní protein (Erban et al. 2016a). Z výsledků vyplývá, že protichůdné změny ve skladování hexamerinů 70b, 70c a 110 způsobené infekcí DWV a parazitací *Varroa* vedly k zesílení účinku parazitace *Varroa*. Podle získaných výsledků se jeví, že interakce DWV a *Varroa* v souvislosti s vlivem na hostitele je založena na kooperaci a kompetici, což je do jisté míry v souladu s interakcí klíště-hostitel-patogen (de la Fuente et al. 2016). Kromě změn v zásobních proteinech je vliv patogenů a parazitů spojen se změnami imunitního systému hostitele, proto zkoumání imunitních mechanismů je klíčem k výzkumu a pochopení tohoto tématu. Analýza konkrétních markerů, jež byly srovnány s markery ve studii Xie et al. (2003) ukázaly, že sliny roztoče *Varroa* by měly obsahovat látky, které způsobují narušení hojení ran. Pravděpodobně se jedná o transkripční růstový faktor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) nebo jeho analogy, čemuž nasvědčovaly změny celé řady markerů ve srovnání s jinou studií (Xie et al. 2003). Vlivem interakce *Varroa*-včela-DWV je potlačena syntéza eikosanoidů, což způsobuje nadměrnou aktivaci dráhy TGF- β , a to zhoršuje imunitu hostitele. Výsledky naznačují, že *Varroa* a DWV soutěží o manipulaci imunitního systému. Důležité je, že *Varroa* a DWV mají protichůdné účinky na aktivaci a potlačení NF- κ B (nukleární faktor kappa B), které DWV potřebuje pro replikaci. Bylo popsáno, že TGF- $\beta 1$ je aktivátor apoptózy, který down-reguluje NF- κ B (Azuma et al. 1999). Ve všech vyšetřovaných vzorcích jsme pozorovali nadměrnou aktivaci signální dráhy JAK/STAT, přičemž upregulace této signalizace je klíčovou vlastností antivirové odpovědi u včel (Chen et al. 2014; Brutscher et al. 2015, 2017). Dráha

JAK/STAT je pravděpodobně hyperaktivována a zpětnovazební smyčka p53-BCL-6 se z výsledků jeví přerušena, takže apoptóza indukovaná p53 a dráha JAK/STAT působí současně. Ještě větší problém nastane, pokud do interakce roztoč *Varroa*-včela-DWV zasáhne navíc pesticid. Je prokázáno, že neonikotinoidy klothianidin a imidaklopid zvyšují virulenci DWV. Klothianidin zároveň snižuje aktivaci NF- κ B, a to tím, že u bezobratlých zvyšuje expresi genu pro LRR (leucine-rich repeat) proteiny, které potlačují tuto signalizační dráhu (Di Prisco et al. 2013). Tento výsledek ve své práci potvrdila také Bártová (2020), když ve svém experimentu prokázala zvýšení virulence DWV v přítomnosti imidaklopidu. Zároveň je možné, že imidaklopid působí stejným mechanismem jako klothianidin, který u včel snižuje aktivaci NF- κ B. V tomto experimentu bylo dále zjištěno, že imidaklopid u včel, které byly napadeny *V. destructor*, způsobil, že neprodukovaly antimikrobiální polypeptid protein hymenoptacin, který je důležitou součástí humorální imunity včel (Bártová 2020). Vybrané markery je však potřeba dále studovat, čímž by tyto hypotézy získané z vysokokapacitního screeningu měly být upřesněny.

V experimentu 2 jsme sledovali distribuci imidaklopidu a jeho degradačních produktů z půdy do rostliny řepky olejky. Použitý substrát pro pěstování řepky byl na počátku experimentu otestován na přítomnost imidaklopidu a jeho degradačních produktů, aby výsledky nebyly ovlivněny jeho neočekávanou přítomností v kontrolních vzorcích. Dále byla změřena koncentrace imidaklopidu, imidaklopid-urey a imidaklopid-olefinu v připraveném zásobním roztoku. Přítomnost imidaklopid-urey v zásobním roztoku není překvapivá, protože tento metabolit je primárním hydrolytickým produktem imidaklopidu (Zheng & Liu 1999; Anhalt et al. 2007). Koncentrace imidaklopidu byly zvoleny tak, aby bylo možno sledovat i rezidua málo abundantních metabolitů. Při srovnání molárního poměru mezi imidaklopidem a imidaklopid-ureou na počátku a na konci experimentu se molární poměr snížil 2,3krát (pro koncentraci 250 μ g/kg) a 2,7krát (pro koncentraci 2500 μ g/kg). Ve skleníkových podmínkách je přeměna imidaklopidu na imidaklopid-ureu v půdě přibližně 2,5 za 4 týdny od expozice. Hodnota vyšší než 2 indikuje, že poločas rozpadu imidaklopidu v půdě je kratší než 4 týdny a je také kratší v porovnání s jinými polními studiemi (Scholz & Spiteller 1992; Rouchaud et al. 1996). Rychlá transformace mohla být ovlivněna periodickým zaléváním a relativně vysokou teplotou ve skleníku, což urychlilo přeměnu a mohlo se jednat o prostou hydrolyzu. Při ošetření imidaklopidem o dávce 2500 μ g/kg jsme detekovali imidaklopid-olefin v půdě v reziduální koncentraci, ale nedetekovali jsme jej v kořenech. Předpokládáme, že na tvorbě imidaklopid-olefinu v půdě se podílely mikroorganismy (Ma et al. 2014). V kořenech jsme detekovali mateřskou sloučeninu imidaklopid

i imidaklopid-ureu, ale nedetekovali jsme imidaklopid-olefin. V zelených částech řepky byly detekovány všechny tři sloučeniny, což není příliš dobrá zpráva s ohledem na opylovače. Ti mohou být těmito látkám vystaveni při sběru pylu nebo nektaru. Tento výsledek se shoduje s později provedeným experimentem ve studii Li et al. (2019), který prokázal, že se imidaklopid snadněji koncentruje v rostlinných pletivech než v kořenech. Molární poměr mezi imidaklopidem a imidaklopid-ureou v kořenu řepky byl podobný jako v půdním substrátu. Množství imidaklopid-urey se však v zelených částech rostliny zvýšilo více než dvojnásobně. Tento výsledek naznačuje, že kořen přijímá imidaklopid i imidaklopid-ureu z půdy a transportuje je prostřednictvím xylému do cílového pletiva listů, kde dochází díky fotosyntéze k tvorbě imidaklopid-olefinu. Nebezpečí pro necílové organismy může spočívat v tom, že metabolit imidaklopid-olefin je až dokonce 10krát toxičtější vůči hmyzu než mateřská sloučenina imidaklopid a při jeho značném výskytu v rostlinných pletivech je zvýšené riziko pro opylovače (Seifrtova et al. 2017). Ve starší studii Westwood et al. (1998) detekovali imidaklopid v kořenech cukrové řepy po moření semen. Detekovali však pouze stopové množství metabolitů, ale náš experiment se lišil od tohoto experimentu tím, že zemina byla v našem případě rezervoárem imidaklopidu, a že v našem případě se zvyšoval obsah imidaklopid-urey. Podobnější postup tomu našemu zvolili Thurman et al. (2013), kdy aplikovali imidaklopid na vrchní vrstvu půdy. Tito autoři však nezkoumali kořeny a jako hlavní metabolit v cibuli detekovali guanidin, 4-hydroxyimidaklopid a pouze stopové množství imidaklopid-urey.

V rámci experimentu 3 jsme sledovali reálné případy akutních otrav včel vlivem pesticidů v letech 2015 a 2016. Z výsledků vyplývá, že během analýzy bylo detekováno 23 pesticidů a 2 metabolity. Některé pesticidy byly detekovány ve vysokých koncentracích, jiné v nízkém nebo dokonce stopovém množství. Nicméně subletální účinek pesticidů byl v posledních letech zdůrazněn hned v několika studiích (Desneux et al. 2007; Siviter et al. 2018; Tosi & Nieh 2019). Právě subletální efekt pesticidů byl příčinou, proč byly v roce 2013 v EU zakázány a tento zákaz byl potvrzen v roce 2018, tři neonikotinoidy (EK 2013; EFSA 2013; EK 2018b,c,d). V testovaných vzorcích byla nalezena široká škála pesticidů, jejichž synergický účinek může negativně ovlivnit zdraví včel (Johnson et al. 2010). Vyšší toxicita v rámci synergického působení byla prokázána u některých insekticidů a fungicidů, kdy se toxicita neonikotinoidů může zvýšit v kombinaci s fungicidy (David et al. 2016) nebo tankové směsi pyrethroidů a fungicidů vedou k vyšší toxicitě (Fletcher & Barnett 2003). Ve Velké Británii jsou popsány případy otrav včel po aplikaci pyrethroidů a fungicidů v řepkových polích (Schmuck et al. 2003). V Česku dohlíží na ochranu včel zákon č. 369/2019 Sb., zákon,

kterým se mění zákon č. 326/2004 Sb., o rostlinolékařské péči a o změně některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a další související zákony. Zákon definuje, jak mají být správně aplikovány POR a postup při podezření na otravu včel vlivem POR. Zatímco SVS analyzuje pouze mrtvé včely a podezřelou plodinu, my jsme navíc analyzovali i včely odebrané z plodového plástu a pyl z plodového plástu. V některých případech jsou ztráty včel způsobeny nejen přímou expozicí pesticidu, ale také přítomností pesticidu v kolonii, což je důležité při posuzování příčin úhynu včel. Obsah pesticidů zjištěných ve včelách z plodového plástu považujeme za velmi důležitý údaj, protože může naznačit, zda byl pesticid přenášen po celé kolonii, čímž můžeme potvrdit subletální otravu, která by jinak mohla zůstat skrytá. Vzorky pro tuto analýzu byly odebírány v součinnosti se SVS, která v letech 2015 a 2016 vyšetřovala 16, respektive 10 podezření na otravu včel. V každém roce byla u 8 incidentů prokázána souvislost mezi úhynem včel a použitím POR. Naše data ukazují podobnou souvislost, s tím rozdílem, že SVS vyhodnotí podezření na otravu včel jako otravu včel pouze v případě, že je stejná látka detekována ve včelstvu a v plodině. V některých případech je ale velmi obtížné zjistit zdroj otravy (podezřelá plodina).

Podle zprávy SVS jsou otravy včel hlášeny nejčastěji v období, kdy kvete řepka, která je v Česku nejběžnější plodinou (SVS ČR 2017). Navíc většina vzorků plodin, které jsme analyzovali při podezření na otravu včel, byla řepka (případně se jednalo o hořčici). Velmi důležité vzhledem k opylovačům je zvážit metodu a čas aplikace POR. V úvahu musíme brát také složení jednotlivých směsí pesticidů, z důvodu možného synergického účinku, který byl prokázán (Pilling et al. 1995; Johnson et al. 2009; Wu et al. 2011). Z tohoto důvodu jsme se v našem experimentu nezabývali pouze pesticidy, které jsou hodnoceny jako vysoce toxické pro včely, ale i pesticidy pro včely prakticky netoxickými. Vysoký obsah chlorpyrifosu nalezený v uhynulých včelách (146,1-289,4 ng / včela) naznačuje, že tento pesticid může být zodpovědný za úhyn včel v lokalitě Libodřice. Uhynulé včely na dalších třech lokalitách rovněž obsahovaly značné množství chlorpyrifosu. Ten byl také detekován u podezřelé plodiny z lokality Panoší Újezd a Libodřice, ale nebyl zjištěn u podezřelé řepky z lokality Štětí. Takové porovnání bohužel nebylo možné u vzorků z lokality Chrudim, protože jsme pro analýzu měli k dispozici pouze mrtvé včely. Obsah chlorpyrifosu v nich, lze ale považovat za smrtelný (12,1 ng / včela). Obsah chlorpyrifosu v hořčici bílé a v pylu z lokality Libodřice byl relativně nízký v porovnání s mrtvými a úlovými včelami. V tomto případě tedy není úplně jisté, zda odebraná hořčice bílá je opravdu zdrojem vysokého obsahu chlorpyrifosu u včel. Je možné, že mrtvé včely byly zasaženy pesticidem přímo během jeho aplikace, anebo že

zdrojem otravy byla jiná plodina. Důležité pro hodnocení otravy včel je, že v lokalitě Libodřice byl detekován ve velmi vysokém množství další vysoce toxický insekticid cypermetrin, a to jak u mrtvých a živých včel, tak i u hořčice. U cypermetrinu je tedy zdroj otravy zřejmý. Na tomto příkladu je ukázáno, jak je vyhodnocování zdroje otravy složité a co všechno je potřeba brát v úvahu. V lokalitě Rohovládova Bělá byla u mrtvých včel nalezena letální hladina imidaklopridu (4,2-5,3 ng / včela) a podezřelá plodina řepka mohla být možným zdrojem kontaminace imidaklopridem. Ten však nebyl detekován ani v úlových včelách ani v pylu. Kromě toho byla u mrtvých včel nalezených mimo úl a u podezřelé řepky detekována vysoká koncentrace cypemetrinu a prochlorazu, zatímco úlové včely (živé z plodového plástu i mrtvé včely ze spodní části úlu) obsahovaly nízkou hladinu tohoto pesticidu. Tento výsledek naznačuje, že mrtvé včely byly otráveny přímo během aplikace POR na podezřelou plodinu. Samotný cypermetrin mohl způsobit otravu kvůli jeho vysoké akutní toxicitě, ale výsledky ukazují, že byl na plodinu použit v kombinaci s mírně toxickým prochlorazem. Bylo popsáno, že kombinace pyrethroidů a prochlorazu vykazuje synergický efekt (Pilling et al. 1995). Koktejl pesticidů detekovaný ve včelách na této lokalitě byl extrémně nebezpečný a mohl způsobit úmrtí včel už s nebo bez přidané expozice imidaklopridu. Další velmi nebezpečná kombinace pesticidů byla zjištěna v lokalitě Libodřice, kde byla detekována přítomnost vysoce toxického chlorpyrifosu a cypermetrinu, a to u mrtvých včel i úlových včel z plodového plástu. V lokalitě Panoší Újezd byla akutní toxicita způsobena kromě chlorpyrifosu, také deltametrinem, prochlorazem a thiaklopridem. Obsah deltametrinu (5,9-16,4ng / včela) v mrtvých včelách indikuje, že látka samotná může být příčinou úhynu včel. Mírně toxický prochloraz (Pilling et al. 1995) a thiaklopid (Darriet & Chandre 2013) k tomu mohou přispět prostřednictvím synergického účinku. V případě podezření na otravu v lokalitě Štětí jsme rovněž dospěli k zajímavým závěrům. Nepodařilo se nám identifikovat pesticid, který by se shodoval ve včelách a v podezřelé plodině. V této lokalitě však bylo podezření na aplikaci POR dvěma způsoby, pozemní aplikaci a leteckou aplikaci. Například chlorpyrifos byl detekován u mrtvých včel, v pylu z plodového plástu i u úlových včel, nezjistili jsme ho však v podezřelém porostu řepky. Některé další pesticidy byly nalezeny v relativně nízkých koncentracích u včel, ale nebyla nalezena shoda s pylem z plodového plástu nebo podezřelou plodinou. V tomto případě jsme se rozhodli analyzovat kvaty a zjistili jsme poměrně vysoký obsah (2608 ng /g) chlormekvatu v řepce ošetřené pozemně (traktorem) a 1,7 ng / g chlormekvatu v řepce po letecké aplikaci. Protože ve včelách byla zjištěna velmi nízká koncentrace chlormekvatu (0,3 ng / včela), tak pole s vysokým obsahem chlormekvatu nebylo potvrzeno jako zdroj akutní otravy včel v lokalitě

Štětí. Pro srovnání lokalit s podezřením na otravu včel jsme analyzovali také vzorky ze tří lokalit, kde nebylo podezření na otravu. Jednalo se o lokality Líšnice, Ruzyně a Tichá Šárka. Ve vzorcích včel i pylu z plodového plástu ze všech kontrolních lokalit byla detekována relativně nízká hladina pesticidů. Navzdory tomu, že je lokalita Ruzyně zemědělská, detekovaná hladina pesticidů byla obdobně nízká jako v lokalitě Tichá Šárka, která není zemědělská. Jak již bylo uvedeno dříve, mírné používání pesticidů a dodržování základních podmínek jejich aplikace může vést k nízké hladině pesticidů ve včelách (Erban et al. 2019a). Z testovaných kontrolních míst byla relativně vysoká hladina pesticidů zjištěna v pylu v lokalitě Líšnice. Vzhledem k tomu, že jsme odebrali vzorky řepky z lokality Líšnice, byli jsme schopni porovnat výskyt pesticidů mezi kolonií a plodinami v blízkém okolí. Výsledky jasně dokazují, že řepka byla významným zdrojem pesticidů, především azoxystrobinu, tebuknazolu, thiaklopridu, deltametrinu a chlorpyrifosu. Kromě toho byl v úlových včelách z plodového plástu a ve vzorcích řepky detekován klothianidin. Protože byly v pylu z plodového plástu detekovány shodné pesticidy jako v řepce, situace byla vyhodnocena jako vysoce riziková, a to převážně pro včelí potomstvo. Na závěr diskuze výsledků tohoto experimentu bych ráda uvedla závěry ohledně pesticidů vysoce toxických pro včely. Do této skupiny patří neonicotinoidy. I přes jejich omezení jsme detekovali imidakloprid u včel, v pylu z plodového plástu i v plodině u vzorků odebraných v roce 2015, zatímco u vzorků z roku 2016 jsme žádný imidakloprid nezjistili. Je pravděpodobné, že byl použit zbytek POR obsahujícího imidakloprid nebo se může jednat o reziduální kontaminaci půdy, protože imidakloprid má poločas rozpadu 1 rok až několik let (Miles 1993), i když tato data se mohou výrazně lišit dle podmínek a lokality. Imidakloprid se převážně nacházel v řádu setin nebo desetín ng na včelu, kromě lokality Rohovládova Bělá, kde byl detekován u mrtvých včel a včel nalezených v křečích v koncentracích 4,2-5,3 ng / včelu. Imidakloprid byl také detekován ve vzorcích řepky z této lokality v rozmezí 0,6-1,7 ng/g. U dvou vzorků řepky byly dále zjištěny klothianidin a thiamethoxam v nízkých koncentracích. Přesto kombinace těchto pesticidů může představovat riziko pro včely vzhledem k jejich synergickému účinku. Další skupinou pesticidů vysoce toxických pro včely jsou pyrethroidy. Zjistili jsme případy akutní otravy včel způsobené užíváním pyrethroidů. Ačkoliv pyrethroidy nezpůsobují akutní otravu při subletálních koncentracích, jsou u nich prokázány jiné negativní účinky. Hlavním problémem pyrethroidů je jejich potenciální synergistický účinek s fungicidy aplikovanými na kvetoucí řepku, což bylo prokázáno ve Velké Británii (Thompson & Wilkins 2003). Pokud se však pyrethroidy používají správně, jsou v přírodě snadno odbouratelné a proto ekologicky přijatelné. Pyrethroid tau-fluvalinát se používá k potlačení parazitického roztoče *Varroa*

uvnitř včelstva (Zhou et al. 2011) a jeho rezidua při správném použití představují velmi nízké riziko pro včely. Tau-fluvalinát byl detekován u mnoha vzorků včel, a to jak u vzorků podezřelých na otravu včel, tak u referenčních vzorků. Jeho obsah byl obvykle v řádu desetin nebo stovek ng / včelu. Zvýšený obsah tohoto pesticidu byl detekován u mrtvých včel z lokality Hýsly, navíc byl detekován i v pylu. Poslední skupinu představují vysoce toxické organofosfáty. Vzhledem k jejich vysoké toxicitě pro savce se od těchto látek od druhé poloviny 90. let začalo upouštět (Yu 2008). Později bylo zjištěno, že jsou vysoce toxické i pro včely, ptáky, ryby a dokonce i vodní bezobratlé živočichy (Rehman et al. 2012). V našich vzorcích byl detekován běžně používaný organofosfát chlorpyrifos a byl spojený s akutní otravou. Také při vyšetřování podezření na otravu včel ve Velké Británii v letech 1994-2003 byla potvrzena otrava chlorpyrifosem, který byl aplikován na rostliny maliníku (Barnett et al. 2007). Výsledky z tohoto experimentu ukazují, že je nutné dále sledovat a zjišťovat vliv pesticidů na necílové organismy. Zároveň je ale nutné obzvlášť v tomto tématu, klást důraz na správnou interpretaci výsledků a zvážit všechna pozitiva a negativa v rámci aplikace POR.

Experiment 4, při kterém jsme sledovali chronický subletální účinek neonikotinoиду imidaklopridu na čmeláka *B. terrestris* za laboratorních pomínek, nám poskytl další důležité informace o tomto pesticidu. Ačkoliv se o tomto neonikotinoиду mnoho napsalo, drtivá většina nedávných studií nezmiňuje tvorbu nebezpečných metabolitů. Výzkum prováděný začátkem 21. století ukázal, že imidaklopid-olefin může být až 10krát toxicitější vůči hmyzu než imidaklopid (Nauen et al. 1998). Důležité zjištění poskytla studie autorů Suchail et al. (2001), kteří prokázali, že imidaklopid-olefin je pro včely dvakrát toxicitější než imidaklopid. V naší studii jsme v nedávné studii demonstrovali tvorbu imidaklopid-olefinu v pletivech zelených rostlin a hodnotili jsme toto riziko pro včely (Seifrtova et al. 2017). Abychom získali kompletní představu o metabolitech, změřili jsme také další degradační produkt, a to imidaklopid-urea, která je pro včely méně toxická (Suchail et al. 2001). Tento metabolit však v našich vzorcích nebyl detekován. Naše výsledky z analýzy čmeláků jsou v souladu s předchozími závěry, že imidaklopid-olefin se tvoří ve včelách (Suchail et al. 2004). Nejdůležitější je však informace, že množství imidaklopid-olefinu bylo 3,4krát vyšší než imidaklopridu. Čmelák tedy v sobě uchovává vysoký podíl nebezpečného metabolitu, čímž se toxická látka v podstatě kumuluje. Abychom zjistili dopad expozice subletálního účinku imidaklopridu na fyziologii čmeláků, využili jsme nejmodernější nanoLC spojenou s hmotnostním spektrometrem Orbitrap Fusion. Jak již bylo zmíněno ve výsledcích, řada down-regulovaných markerů je členy biosyntetické cesty páteře terpenoidů. Kromě toho byla výrazně snížena farnesylypyrofosfát syntáza, která produkuje klíčový isoprenoid

(2E,6E)-farnesyl-PP C10-C20. Dále bylo sledováno potlačení dalších důležitých cest jako je degradace a elongace v metabolismu mastných kyselin, biosyntéza nenasycených mastných kyselin, metabolismus glycerolipidů a syntéza a degradace ketolátek. Mevalonátová dráha a metabolismus mastných kyselin jsou nezbytné pro každý organismus, a proto jsou přísně regulovány. Hydroxymethylglutaryl-CoA reductáza (Hmgcr) a CAA jsou enzymy omezující rychlost metabolismu mevalonátu (Goldstein & Brown 1990) a mastných kyselin (Spencer et al. 1993). Hmgcr patří do skupiny vysoce regulovaných enzymů a existuje několik mechanismů zpětné vazby (Goldstein & Brown 1990). Například inhibice Hmgcr statiny se farmaceuticky využívá pro snížení hladiny cholesterolu (Istvan 2002). Nakonec jsme identifikovali SREBP (sterol regulated element binding protein), který je transkripčním faktorem pro celou cestu mevalonátu (Sakakura et al. 2001) a další down-regulované proteiny související se syntézou cholesterolu, mastných kyselin, triacylglycerolů a fosfolipidů (Horton 2002). Klíčovou aktivační složkou dráhy SREBP je SCAP, který řídí proteolytické štěpení prekursoru SREBP za vzniku konkrétních transkripčních faktorů (Rawson 2003). Domníváme se, že imidaklopid zahrnuje blokádu SCAP, která tak brání generování transkripčně aktivních izoform SREBP. Dále se domníváme, že narušení lipidové homeostázy ovlivňuje komunikaci mezi čmeláky, kdy byla zjištěna down-regulace proteinu neuronové membrány 1 (Snmp 1; anglicky sensory neuron membrane protein 1), který je důležitý pro čich a citlivost na feromony. Změna tohoto markeru může naznačovat narušení komunikace v kolonii a může objasnit dříve hlášené nežádoucí účinky imidaklopidu na čich (Decourtye et al. 2004). Do této chvíle jsme se zaměřili na proteiny, které byly down-regulované. Ačkoliv up-regulace nebyla tak rozsáhlá, i tyto změny poskytují důležité informace. Nejvíce up-regulované proteiny byly tropinin C vázající aktin a filamin-A, dále byly zvýšeny ještě některé další strukturní proteiny. Tyto změny mohou ukazovat částečnou kompenzaci za narušení syntetické dráhy, jako je tvorba membránových proteinů.

Jednotlivé experimenty v této práci na sebe navazují a souvisejí spolu. Sledování vlivu patogenů a pesticidů na včely bude i v budoucnu velmi důležitým tématem. V posledních letech jsou ve velké míře publikovány výsledky zabývající se tímto tématem. I nadále tak zůstává potřeba zjišťovat další a podrobnější informace, abychom jednou byli schopni úplně pochopit celý mechanismus a třeba i odpovědět na doposud nezodpovězené otázky.

7. ZÁVĚR

V této práci byl sledován vliv různých stresorů zahrnující klíčové patogeny a pesticidy s metabolity na včely s použitím proteomických metod. Také byla hodnocena rizika pesticidů na včely použitím analýzy pesticidů ve včelách, pylu a rostlinách. Byl prokázán aditivní účinek *V. destructor* a DWV na včelu medonosnou v momentu líhnutí mladušky. Dále byly zjištěny významné změny v proteinech zapojených do imunitního systému včel. Pokud do těchto drah zasáhne další faktor, jako například pesticid imidaklopid, může být efekt patogenů pro včelstvo ještě více devastující. Při sledování distribuce imidaklopidu a jeho degradačních produktů imidaklopid-urey a imidaklopid-olefinu v kořenech a zelených částech řepky olejky byla v zelených částech zjištěna přítomnost imidaklopid-olefinu, který může být i o řád toxičtější vůči hmyzu než mateřská sloučenina, což může pro včely představovat významné riziko. Při chronické expozici imidaklopidu čmeláka zemního byl v jejich těle detekován imidaklopid a imidaklopid-olefin. Kvantitativní proteomickou analýzou bylo zjištěno potlačení mevalonátové dráhy, což se projeví narušením biosyntézy terpenoidů a porušení metabolismu mastných kyselin. Narušení homeostázy těchto drah se negativně projeví na komunikaci mezi čmeláky. Výsledek tak může objasnit dříve indikované nežádoucí účinky imidaklopidu na smysly včel. V posledním experimentu byly hodnoceny případy akutních otrav včel v reálných podmínkách. Ve včelách byly detekovány vysoce toxické pesticidy, ale také pesticidy méně toxické, avšak v poměrně vysokých dávkách. Ve výsledku byly hodnoceny výskyty pesticidů a jejich tank-mixů v souvislosti s akutními otravami včel a zvýrazněny byly nedávno nebo v současnosti zakázané pesticidy. Kromě toho tato analýza ukázala skutečný stav včelstev v Česku, kdy na mnoha lokalitách bylo detekováno více pesticidů v malém množství, což může pro včely představovat problém ve formě synergického účinku. Jedná se zejména o kombinaci pyrethroidů s fungicidy a neonicotinoidů s fungicidy. Jedním z významných pesticidů pro otravy včel byl hodnocen také imidaklopid, na který byly zaměřeny i jiné studie v této práci. Výsledky této práce přináší řadu nových poznatků. Některé výsledky se již povedlo převést do praxe, ale stále je potřeba dalšího studia daného tématu. Zatímco výsledky, ve kterých se hodnotí akutní účinky pesticidů, jsou snadněji uchopitelné a využitelné pro běžné uživatele (včelaři, zemědělci), ostatní výsledky poskytují důležité informace pro ty, kteří se zabývají hodnocením rizik pesticidů, např. studiem subletálního účinku. Výsledky potvrzují, že je nutno aplikovat pesticidy správně a vždy zvažovat možná rizika, čímž můžeme ochránit necílové organismy proti jejich účinku.

8. SEZNAM LITERATURY

- Alaux C, Brunet JL, Dussaubat C, Mondet F, Tchamitchan S, Cousin M, Brillard J, Baldy A, Belzunces LP, Le Conte Y. 2010. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology* **12**:774-782.
- Alberoni D, Gaggia F, Baffoni L, Di Gioia D. 2016. Beneficial microorganisms for honey bees: problems and progresses. *Applied Microbiology and Biotechnology* **100**: 9469-9482.
- Allen MF, Ball BV, White RF, Antoninw JF. 1986. The detection of acute paralysis virus in *Varroa jacobsoni* by the use of a simple indirect ELISA. *Journal of Apicultural Research* **25**: 100-105.
- Almeida-Muradian LB, Pamplona LC, Coimbra S, Barth OM. 2005. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *Journal of Food Composition and Analysis* **18**: 105-111.
- Amrhein N, Deus B, Gehrke P, Steinrücken HCh. 1980. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate: II interference of glyphosate with chorismate formation *in vivo* and *in vitro*. *Plant Physiology* **66**: 830-834.
- Anastassiades M, Lehotay SJ, Štajnbaher D, Schenck FJ. 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International* **86**: 412-431.
- Anderson DL, Trueman JW. 2000. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology* **24**: 165-189.
- Anhalt JC, Moorman TB, Koskinen WC. 2007. Biodegradation of imidacloprid by an isolated soil microorganism. *Journal of Environmental Science and Health* **42**: 509-514.
- Ashby J, Kier L, Wilson AGE, Green T, Lefevre PA, Tinwell H, Willis GA, Heydens WF, Clapp MJL. 1996. Evaluation of the potential carcinogenicity and genetic toxicity to humans of the herbicide acetochlor. *Human and Experimental Toxicology* **15**: 702-735.
- Atkins EL, Kellum D, Atkins KW. 1981. Reducing pesticide hazards to honey bees: mortality prediction techniques and integrated management strategies: leaflet 2883. University of California, Division of Agricultural Science.
- Azuma M, Motegi K, Aota K, Yamashita T, Yoshida H, Sato M. 1999. TGF-beta1 inhibits NG-kappaB activity through induction of IkappaB-alpha expression in human salivary

- gland cells: a possible mechanism of growth suppression by TGF-beta1. *Experimental Cell Research*. **250**: 213-222.
- Bacandritsos N, Granato A, Budge G, Papanastasiou I, Roinioti E, Caldon M, Falcaro C, Gallina A, Mutinelli F. 2010. Sudden deaths and colony population decline in Greek honey bee colonies. *Journal of Invertebrate Pathology* **105**: 335-340.
- Badiou A, Meled M, Belzunces LP. 2008. Honeybee *Apis mellifera* acetylcholinesterase – a biomarker to detect deltamethrin exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **69**: 246-253.
- Bailey J, Scott-Dupree C, Harris R, Tolman J, Harris B. 2005. Contact and oral toxicity to honey bees (*Apis mellifera*) of agents registered for use for sweet corn insect control in Ontario, Canada. *Apidologie* **36**: 623-633.
- Balbuena MS, Tison L, Hahn ML, Greggers U, Menzel R, Farina WM. 2015. Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation. *Journal of Experimental Biology* **218**: 2799-2805.
- Barene I, Daberte I, Siksnas S. 2015. Investigation of bee bread and development of its dosage forms. *Proteins* **21**: 16-22.
- Barnett EA, Charlton AJ, Fletcher MR. 2007. Incidents of bee poisoning with pesticides in the United Kingdom, 1994–2003. *Pest Management Science* **63**: 1051-1057.
- Bártová K. 2020. Vliv pesticidů na včely se zaměřením na jejich endokrinně disruptivní účinek. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie. Praha.
- Bass Ch, Field LM. 2011. Gene amplification and insecticide resistance. *Pest Management Science* **67**: 886-890.
- Beims H, Bunk B, Erler S, Mohr KI, Spröer C, Pradella S, Günther G, Rohde M, von der Ohe W, Steinert M. 2020. Discovery of *Paenibacillus larvae* ERIC V: Phenotypic and genomic comparison to genotypes ERIC I-IV reveal different inventories of virulence factors which correlate with epidemiological prevalences of American Foulbrood. *International Journal of Medical Microbiology* **310**: (151394). DOI: 10.1016/j.ijmm.2020.151394.
- Belzunces LP, Tchamitchian S, Brunet JL. 2012. Neural effects of insecticides in the honey bee. *Apidologie* **43**: 348-370.
- Bendahou N, Fleche C, Bounias M. 1999. Biological and biochemical effects of chronic exposure to very low levels of dietary cypermethrin (Cymbush) on honeybee colonies (Hymenoptera: Apidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **44**: 147-153.

- Ben-Shahar Y, Robinson GE. 2001. Satiating differentially affects performance in a learning assay by nurse and forager honey bees. *Journal of Comparative Physiology A* **187**: 891-899.
- Beránek V, Geisler V, Lisý E, Rošický M, Savvin J, Svoboda J, Tocháček E, Vitek J. 1956. *Včelařská encyklopedie*. 2. vyd., dopl. a přepřac. Státní zemědělské nakladatelství. Praha.
- Blacquièrè T, Smagghè G, van Gestel CAM, Mommaerts V. 2012. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology* **21**: 973–992.
- Blot N, Veillat L, Rouzè R, Delatte H. 2019. Glyphosate, but not its metabolite AMPA, alters the honeybee gut microbiota. *PLoS One* **14** (e0215466). DOI: 10.1371/journal.pone.0215466.
- Bowen-Walker PL, Gunn A. 2001. The effect of the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* on adult worker honeybee (*Apis mellifera*) emergence weights, water, protein, carbohydrate and lipid levels. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **101**: 207-217.
- Bramke K, Müller U, McMahon DP, Rolff J. 2019. Exposure of larvae of the solitary bee *Osmia bicornis* to the honey bee pathogen *Nosema ceranae* affects life history. *Insects* **10** (380). DOI: 10.3390/insects10110380.
- Brodschneider R, Crailsheim K. 2010. Nutrition and health in honey bees. *Apidologie* **41**: 278-294.
- Bromenshenk JJ, Henderson CB, Wick CH, Stanford MF, Zulich AW, Jabbour RE, Deshpande SV, McCubbin PE, Seccomb RA, Welch PM, Williams T, Firth DR, Skowronski E, Lehmann MM, Bilimoria SL, Gress J, Wanner KW, Cramer RA. 2010. Iridovirus and microsporidian linked to honey bee colony decline. *PLoS One* **5** (e13181). DOI: 10.1371/journal.pone.0013181.
- Brutscher LM, Daughenbaugh KF, Flenniken ML. 2015. Antiviral defense mechanisms in honey bees. *Current Opinion in Insect Science* **10**: 71-82.
- Brutscher L, Daughenbaugh KF, Flenniken ML. 2017. Virus and dsRNA-triggered transcriptional responses reveal key components of honey bee antiviral defense. *Scientific Reports* **7** (6448). DOI: 10.1038/s41598-017-06623-z.
- Budge GE, Jones B, Powell M, Anderson L, Laurensen L, Pietravalle S, Marris G, Haynes E, Thwaites R, Bew J, Wilkins S, Brown MA. 2011. Recent advances in our understanding of European foulbrood in England and Wales. In *Proceedings of the COLOSS workshop; The future of brood disease research – guidelines, methods and development*. Copenhagen, Denmark.

- Budge GE, Shirley MDF, Jones B, Quill E, Tomkies V, Feil EJ, Brown MA, Haynes EG. 2014. Molecular epidemiology and population structure of the honey bee brood pathogen *Melissococcus plutonius*. *ISME Journal* **8**: 1588-1597.
- Büchler R, Berg S, Le Conte Y. 2010. Breeding for resistance to *Varroa destructor* in Europe. *Apidologie* **41**: 393-408.
- Burgett M, Akkratanakul P. 1985. *Tropiaelaps clareae*, a little known honey bee brood mite. *American Bee Journal* **125**: 112-114.
- Calderón RA, van Veen JW, Sommeijer MJ, Sanchez LA. 2010. Reproductive biology of *Varroa destructor* in Africanized honey bees (*Apis mellifera*). *Experimental and Applied Acarology* **50**: 281-297.
- Cankaya NE, Kaftanoglu O. 2006. An investigation on some diseases and parasites of bumblebee queens (*Bombus terrestris* L.) in Turkey. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **9**: 1282-1286.
- Capinera JL. 2008. *Encyclopedia of entomology*. 2. vyd. Springer Science + Business Media. Dordrecht.
- Carvalho FP. 2006. Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environmental Science and Policy* **9**: 685–692.
- Catarino R, Bretagnolle V, Perrot T, Vialloux F, Gaba S. 2019. Bee pollination outperforms pesticides for oilseed crop production and profitability. *Proceedings of the Royal Society B* 286 (20191550). DOI: 10.1098/rspb.2019.1550.
- Celli G, Maccagnani B. 2003. Honey bees as bioindicators of environmental pollution. *Bulletin of Insectology* **56**: 137-139.
- Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. 2012. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell* **148**: 1258-1270.
- Colin ME, Belzunces LP. 1992. Evidence of synergy between prochloraz and deltamethrin: a convenient biological approach. *Pesticide Science* **36**: 115-119.
- Como F, Carnesecchi E, Volani S, Dorne JL, Richardson J, Bassan A, Pavan M, Benfenati E. 2017. Predicting acute contact toxicity of pesticides in honeybees (*Apis mellifera*) through a k-nearest neighbor model. *Chemosphere* **166**: 438-444.
- Condamine FL, Hines HM. 2015. Historical species losses in bumblebee evolution. *Biology Letters* 11 (20141049). DOI: 10.1098/rsbl.2014.1049.
- Conlon BH, Aurori A, Giurgiu AI, Kefuss J, Dezmirean DS, Moritz RFA, Routtu J. 2019. A gene for resistance to the *Varroa* mite (Acari) in honey bee (*Apis mellifera*) pupae. *Molecular Ecology* **28**: 2958-2966.

- Corbet SA, Williams IH, Osborne JL. 1991. Bees and the pollination of crops and flowers in the European Community. *Bee World* **72**: 47-59.
- Corby-Harris V, Maes P, Anderson KE. 2014. The bacterial communities associated with honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *PLoS One* **9** (e95056) DOI: 10.1371/journal.pone.0095056.
- Cox J, Hein MY, Luber ChA, Paron I, Nagaraj N, Mann M. 2014. Accurate proteomewide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Molecular and Cellular Proteomics* **13**: 2513-2526.
- Crailsheim K, Hrassnigg N, Stabentheiner A. 1996. Diurnal behavioural differences in forager and nurse honey bees (*Apis mellifera carnica* Pollm). *Apidologie* **27**: 235-244.
- Cremlyn, R. 1985. *Pesticidy*, 1. vyd. Státní nakladatelství technické literatury. Praha.
- Crenna E, Jolliet O, Collina E, Sala E, Fantke P. 2020. Characterizing honey bee exposure and effects from pesticides for chemical prioritization and life cycle assessment. *Environment International* **138** (105642). DOI: 10.1016/j.envint.2020.105642.
- Česko. 1999. Zákon č. 166/1999 Sb. ze dne 13. července 1999 o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinární zákon). Sbíрка zákonů České republiky, 1999, částka 57. <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1999-166>
- Česko. 2004. Zákon č. 326/2004 Sb. ze dne 29. dubna 2004 o rostlinolékařské péči a o změně některých souvisejících zákonů. Sbíрка zákonů České republiky, 2004, částka 106. URL: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2004-326>.
- Česko. 2019. Zákon č. 369/2019 Sb. ze dne 17. prosince 2019 kterým se mění zákon č. 326/2004 Sb., o rostlinolékařské péči a o změně některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a další související zákony. Sbíрка zákonů české republiky, 2019, částka 153. URL: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2019-369>.
- Dahle B, Sorum H, Weidemann JE. 2011. European foulbrood in Norway: How to deal with a major outbreak after 30 years absence. In: *Proceeding of the COLOSS workshop: Future of brood disease research – guidelines, methods and development*. 10-12 April, 2011. Copenhagen, Denmark.
- Dainat B, Ken T, Berthoud H, Neumann P. 2009. The ectoparasitic mite *Tropilaelaps mercedesae* (Acari, Laelapidae) as a vector of honeybee viruses. *Insectes Sociaux* **56**: 40-43.
- Danihlík J, Petřivalský M. 2015. Aktuální vědecké poznatky o imunitě a zdraví včel. *Veterinářství* **6**: 434-441.

- Darriet F, Chandre F. 2013. Efficacy of six neonicotinoid insecticides alone and in combination with deltamethrin and piperonyl butoxide against pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *Pest Management Science* **69**: 905-910.
- David A, Botías C, Abdul-Sada A, Nicholls E, Rotheray EL, Hill EM, Goulson D. 2016. Widespread contamination of wild flower and bee-collected pollen with complex mixtures of neonicotinoids and fungicides commonly applied to crops. *Environment International* **88**: 169-178.
- Decourtye A, Devillers J, Cluzeau S, Charreton M, Pham-Delégue MH. 2004. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **57**: 410-419.
- DeGrandi-Hoffman G, Chen Y, Simonds R. 2013. The effects of pesticides on queen rearing and virus titers in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Insects* **4**: 71-89.
- de la Fuente J, Villar M, Cabezas-Cruz A, Estrada-Peña A, Alberdi P. 2016. Tick-host-pathogen interactions: conflict and cooperation. *PLoS Pathogens* **12** (e1005488). DOI: 10.1371/journal.ppat.1005488.
- Delfinado MD, Baker EW. 1961. *Tropilaelaps* a new genus of mite from the Philippines (Laelapidae: Acarina). *Fieldiana Zoology* **44**: 53-56.
- Dent DR, Walton MP. 1997. *Methods in ecological and agricultural entomology*. CAB International. Wallingford. ISBN 978-0-85199-131-3.
- Desneux N, Decourtye A, Delpuech JM. 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology* **52**: 81-106.
- Dicks L. 2019. The curious and vital role of insects takes center stage in three new tomes. *Science* **365** (6451). 329-331.
- Di Pasquale G, Salignon M, Le Conte Y, Belzunces LP, Decourtye A, Kretzschmar A, Suchail S, Brunet JL, Alaux C. 2013. Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter? *PLoS One* **8** (e72016). DOI: 10.1371/journal.pone.0072016.
- Di Prisco G, Cavaliere V, Annoscia D, Varricchio P, Caprio E, Nazzi F, Gargiulo G, Pennacchio F. 2013. Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 18466-18471.

- Dong X, Armstrong SD, Xia D, Makepeace BL, Darby AC, Kadowaki T. 2017. Draft genome of the honey bee ectoparasitic mite, *Tropilaelaps mercedesae*, is shaped by the parasitic life history. *Gigascience* **6**: 1-17.
- Duay P, De Jong D, Engels W. 2003. Weight loss in drone pupae (*Apis mellifera*) multiply infested by *Varroa destructor* mites. *Apidologie* **34**: 61-65.
- Duke SO, Powles SB. 2008. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science* **64**: 319-325.
- Ebeling J, Knispel H, Hertlein G, Fünfhaus A, Genersch E. 2016. Biology of *Paenibacillus larvae*, a deadly pathogen of honey bee larvae. *Applied Microbiology and Biotechnology* **100**: 7387-7395.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2013. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance thiamethoxam. *EFSA Journal* **11** (3067).DOI: 10.2903/j.efsa.2013.3067.
- Eisenhauer N, Bonn A, Guerra CA. 2019. Recognizing the quiet extinction of invertebrates. *Nature Communications* **10** (50).DOI: 10.1038/s41467-018-07916-1.
- EK (Evropská komise). 2011. Nařízení Komise (EU) č. 546/2011 ze dne 10. června 2011, kterým se provádí nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009, pokud jde o jednotné zásady pro hodnocení a povolování přípravků na ochranu rostlin, text s významem pro EHP. Úřední věstník Evropské unie, L 155/127, 11. 6. 2011. URL: <http://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2011/546/oj>
- EK (Evropská komise). 2013. Prováděcí nařízení komise (EU) č. 485/2013 ze dne 24. května 2013, kterým se mění prováděcí nařízení (EU) č. 540/2011, pokud jde o podmínky schválení účinných látek klothianidin, thiamethoxan a imidakloprid, a kterým se zakazuje použití a prodej osiva ošetřeného přípravky na ochranu rostlin obsahujícími uvedené účinné látky. Úřední věstník Evropské unie, L 139/12, 25. 5. 2013. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013R0485&from=EN>
- EK (Evropská komise). 2018a. Prováděcí nařízení komise (EU) 2018/113 ze dne 24. ledna 2018, kterým se v souladu s nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009 o uvádění přípravků na ochranu rostlin na trh obnovuje schválení účinné látky acetamipridu a kterým se mění příloha prováděcího nařízení komise (EU) č. 540/2011. Úřední věstník Evropské unie, L 20/7, 25. 1. 2018. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018R0113&from=BG>

- EK (Evropská komise). 2018b. Prováděcí nařízení komise (EU) 2018/783 ze dne 29. května 2018, kterým se mění prováděcí nařízení (EU) č. 540/2011, pokud jde o podmínky schválení účinné látky imidaklopid. Úřední věstník Evropské unie, L 132/31, 30. 5. 2018. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018R0783&from=EN>.
- EK (Evropská komise). 2018c. Prováděcí nařízení komise (EU) 2018/784 ze dne 29. května 2018, kterým se mění prováděcí nařízení (EU) č. 540/2011, pokud jde o podmínky schválení účinné látky klothianidin. Úřední věstník Evropské unie, L 132/35, 30. 5. 2018. URL: https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_impl/2018/784/oj?locale=cs.
- EK (Evropská komise). 2018d. Prováděcí nařízení komise (EU) 2018/785 ze dne 29. května 2018, kterým se mění prováděcí nařízení (EU) č. 540/2011, pokud jde o podmínky schválení účinné látky thiamethoxam. Úřední věstník Evropské unie, L 132/40, 30. 5. 2018. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX:32018R0785>
- EK (Evropská komise). 2020. Prováděcí nařízení komise (EU) 2020/23 ze dne 13. ledna 2020, kterým se v souladu s nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009 o uvádění přípravků na ochranu rostlin na trh neobnovuje schválení účinné látky thiaklopid a kterým se mění příloha prováděcího nařízení Komise (EU) č. 540/2011. Úřední věstník Evropské unie, L 8/8, 14. 1. 2020. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32020R0023&from=ES>
- El Hassani AK, Dacher M, Gauthier M, Armengaud C. 2005. Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* **82**: 30-39.
- Ellegaard KM, Engel P. 2019. Genomic diversity landscape of the honey bee gut microbiota. *Nature Communications* **10**: 446. DOI: 10.1038/s41467-019-08303-0.
- Elliott M. 1976. Future use of natural and synthetic pyrethroids. *Environmental Science and Technology* **6**: 163-190.
- Engel P, Kwong WK, McFrederick Q, Anderson KE, Barribeau SM, Chandler JA, Cornman RS, Dainat J, de Miranda JR, Doublet V, Emery O, Evans JD, Farinelli L, Flenniken ML, Granberg F, Grasis JA, Gauthier L, Hayer J, Koch H, Kocher S, Martinson VG, Moran N, Munoz-Torres M, Newton I, Paxton RJ, Powell E, Sadd BM, Schmid-Hempel P, Schmid-Hempel R, Song SJ, Schwarz RS, vanEngelsdorp D, Dainat B. 2016. The bee microbiome: impact on bee health and model for evolution and ecology of host-microbe interactions. *mBio* **7** (e02164-15). DOI: 10.1128/mBio.02164-15.

- EP (Evropský parlament). 2009. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009 ze dne 21. října 2009 o uvádění přípravků na ochranu rostlin na trh a o zrušení směrnic Rady 79/117/EHS a 91/414/EHS. Úřední věstník Evropské unie, L 309/1, 24.11.2009. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/cs/TXT/?uri=CELEX:32009R1107>
- Erban T. 2013a. Mohou pesticidy za úmrtí včel? Včelařství **66**: 366-367.
- Erban T, Bartoš M, Markovič M, Kamler M, Kovářová J, Hrabák J. 2018. Proč studovat virulenci bakterie *Paenibacillus larvae*, obávaného původce moru včelího plodu. Veterinářství **68**: 38-44.
- 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, Harant K, Chalupnikova J, Kocourek F, Stara J. 2017a. Beyond the survival and death of the deltamethrin-threatened pollen beetle *Meligethes aeneus*: An in-depth proteomic study employing a transcriptome database. Journal of Proteomics **150**: 281-289.
- Erban T, Harant K, Kamler M, Markovic M, Titera D. 2016a. Detailed proteome mapping of newly emerged honeybee worker hemolymph and comparison with the red-eye pupal stage. Apidologie **47**: 805-817.
- Erban T, Jedelsky PL, Titera D. 2013b. Two-dimensional proteomic analysis of honeybee, *Apis mellifera*, winter worker hemolymph. Apidologie **44**: 404-418.
- Erban T, Kamler M, Šulcová K, Titěra D, Seifrtová M, Riddellová K, Hubert J, Hortová B, Halešová T. 2016b. Hodnocení vlivu xenobiotik na včely v průběhu ontogeneze metodami proteomické, metabolomické a genomické analýzy: certifikovaná metodika. Výzkumný ústav rostlinné výroby. Praha. ISBN: 978-80-7427-210-3.
- Erban T, Ledvinka O, Kamler M, Nesvorna M, Hortova B, Tyl J, Titera D, Markovic M, Hubert J. 2017b. Honeybee (*Apis mellifera*)-associated bacterial community affected by American foulbrood detection of *Paenibacillus larvae* via microbiome analysis. Scientific Reports 7 (5084). DOI: 10.1038/s41598-017-05076-8.
- Erban T, Ledvinka O, Kamler M, Hortova B, Nesvorna M, Tyl J, Titera D, Markovic M, Hubert J. 2017c. Bacterial community associated with worker honeybees (*Apis mellifera*) affected by European foulbrood. PeerJ 5 (e3816)DOI: 10.7717/peerj.3816.

- Erban T, Petrova D, Harant K, Jedelsky PL, Titera D. 2014. Two-dimensional gel proteome analysis of honeybee, *Apis mellifera*, worker red-eye pupa hemolymph. *Apidologie* **45**: 53-72.
- Erban T, Vaclavikova M, Tomesova D, Halesova T, Hubert J. 2019a. tau-Fluvalinate and other pesticide residues in honey bees before over wintering. *Pest Management Science* **75**: 3245-3251.
- Erban T, Zitek J, Bodrinova M, Talacko P, Bartos M, Hrabak J. 2019b. Comprehensive proteomic analysis of exoproteins expressed by ERIC I, II, III and IV *Paenibacillus larvae* genotypes reveals a wide range of virulence factors. *Virulence* **10**: 363-375.
- Evans JD, Spivak M. 2010. Socialized medicine: individual and communal disease barriers in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**: S62-S72.
- Fang Y, Li J. 2010. Analysis of developmental proteome at egg stage of drone honeybees (*A. m. ligustuca*). *Agricultural Sciences in China* **9**: 392-400.
- Fairbrother A, Purdy J, Anderson T, Fell R. 2014. Risks of neonicotinoid insecticides to honeybees. *Environmental Toxicology and Chemistry* **33**: 719-731.
- Farré MJ, Brosillon S, Doménech X, Peral J. 2007. Evaluation of the intermediates generated during the degradation of Diuron and Linuron herbicides by the photo-Fenton reaction. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **189**: 364-373.
- Fernández M, Picó Y, Mañes J. 2003. Simultaneous determination of carbamate and organophosphorus pesticides in honeybees by liquid chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia* **58**: 151-158.
- Fletcher M, Barnett L, 2003. Bee pesticide poisoning incidents in the United Kingdom. *Bulletin of Insectology* **56**: 141-145.
- Foley K, Fazio G, Jensen AB, Hughes WOH. 2014. The distribution of *Aspergillus* spp. opportunistic parasites in hives and their pathogenicity to honey bees. *Veterinary Microbiology* **169**: 203-210.
- Forsgren E. 2010. European foulbrood in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**: S5-S9.
- Forsgren E, Budge GE, Charrière JD, Hornitzky MAZ. 2013. Standard methods for European foulbrood research. *Journal of Apicultural Research* **52** (52.1.12) DOI: 10.3896/IBRA.1.52.1.12.
- Forsgren E, Fries I. 2010. Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Veterinary Parasitology* **170**: 212–217.

- Forsgren E, Locke B, Sircoulomb F, Schäfer MO. 2018. Bacterial diseases in honeybees. *Current Clinical Microbiology Reports* **5**: 18-25.
- Foster LJ. 2011. Interpretation of data underlying the link between colony collapse disorder (CCD) and an invertebrate iridescent virus. *Molecular & Cellular Proteomics* **10** (M110.006387). DOI: 10.1074/mcp.M110.006387.
- Fries I, Chauzat MP, Chen YP, Doublet V, Genersch E, Gisder S, Higes M, McMahon DP, Martín-Hernández R, Natsopoulou M, Paxton RJ, Tanner G, Webster TC, Williams GR. 2013. Standard methods for *Nosema* research. *Journal of Apicultural Research* **52** (52.1.14). DOI: 10.3896/IBRA.1.52.1.14.
- Fürst MA, McMahon DP, Osborne JL, Paxton RJ, Brown MJF. 2014. Disease associations between honeybees and bumblebees as a threat to wild pollinators. *Nature* **506**: 364-366.
- Geisler V, Lisý E, Rošický M, Savvin J, Svoboda J, Tocháček E, Vítek J. 1954. Malá včelařská encyklopedie. Státní zemědělské nakladatelství. Praha.
- Genersch E, Ashiralieva A, Fries I. 2005a. Strain- and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a bacterial pathogen causing American foulbrood disease in honeybees. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 7551-7555.
- Genersch G, Yue C, Fries I, Miranda JR. 2005b. Detection of deformed wing virus, a honey bee viral pathogen, in bumble bee (*Bombus terrestris* and *Bombus pascuorum*) with wing deformities. *Journal of Invertebrate Pathology* **1**: 61-63.
- Genersch E, Forsgren E, Pentikainen J, Ashiralievam A, Rauch S, Kilwinski J, Fries I. 2006. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**: 501-511.
- Genersch E. 2010. American foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**: S10-S19. DOI: 10.1016/j.jip.2009.06.015.
- Giacobino A, Molineri AI, Pacini A, Fondevila N, Pietronave H, Rodríguez G, Palacio A, Cagnolo NB, Orellano E, Salto CE, Signorini ML, Merke J. 2016. *Varroa destructor* and viruses association in honey bee colonies under different climatic conditions. *Environmental Microbiology Reports* **8**: 407-412.
- Gierer F, Vaughan S, Slater M, Thompson HM, Elmore JS, Girling RD. 2019. A review of the factors that influence pesticide residues in pollen and nectar: future research

- requirements for optimising the estimation of pollinator exposure. *Environmental Pollution* **249**: 236-247.
- Goldstein JL, Brown MS. 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* **343**: 425-430.
- Gómez-Caravaca AM, Gómez-Romero M, Arráez-Román D, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. 2006. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **41**: 1220-1234.
- Goulson D. 2003. *Bumblebees: their behaviour and ecology*. 1. vyd. Oxford University Press Oxford, New York, NY. ISBN: 978-0-19-852606-3.
- Gregorc A, Evans JD, Scharf M, Ellis JD. 2012. Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and *Varroa* mites (*Varroa destructor*). *Journal of Insect Physiology* **58**: 1042-1049.
- Hajšlová J, Kocourek V. 2003. Osud prostředků pro ochranu rostlin v potravním řetězci člověka. Vědecký výbor fyto-sanitární a životního prostředí. Praha. URL: <http://www.phytopsanitary.org/projekty/2003/vvf-05-03.pdf>
- Hamsavathani V, Aysha OS, Valli S. 2015. Biodegradation of xenobiotics: a review on petroleum hydrocarbons and pesticide degradation. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **4**: 1791-1808.
- Harašta P, Peterka V, Talich P, Řehák V, Zapletal M. 2015. Správné a bezpečné používání přípravků na ochranu rostlin. Ministerstvo zemědělství ČR. Praha. ISBN: 978-80-7434-265-3.
- Hebert AS, Richards AL, Bailey DJ, Ulbrich A, Coughlin EE, Westphall MS, Coon JJ. 2014. The one hour yeast proteome. *Molecular and Cellular Proteomics* **13**: 339-347.
- Hemingway J, Ranson H. 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology* **45**: 371-391.
- Henry M, Béguin M, Requier F, Rollin O, Odoux JF, Aupinel P, Aptel J, Tchamitchian S, Decourtye A. 2012. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* **336**: 348-350.
- Herbert LT, Vázquez DE, Arenas A, Farina WM. 2014. Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behaviour. *Journal of Experimental Biology* **217**: 3457-3464.
- Heyndrickx M, Vandemeulebroecke K, Hoste B, Janssen P, Kersters K, De Vos P, Logan NA, Ali N, Berkeley RC. 1996. Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a later subjective synonym of

- Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash et al. 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with Emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**: 270-279.
- Higes M, Martín R, Meana A. 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology* **92**: 93-95.
- Horton JD. 2002. Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochemical Society Transactions* **30**: 1091-1095.
- Hou Ch, Li B, Luo Y, Deng S, Diao Q. 2016. First detection of *Apis mellifera* filamentous virus in *Apis cerana cerana* in China. *Journal of Invertebrate Pathology* **138**: 112-115.
- Hubert J, Bicianova M, Ledvinka O, Kamler M, Lester PJ, Nesvorna M, Kopecky 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**: 685-698.
- Hubert J, Kamler M, Nesvorna M, Ledvinka O, Kopecky J, Erban T. 2016. Comparison of *Varroa destructor* and worker honeybee microbiota within hives indicates shared bacteria. *Microbial Ecology* **72**: 448-459.
- Chan QWT, Foster LJ. 2008. Changes in protein expression during honey bee larval development. *Genome Biology* 9 (R156). DOI: 10.1186/gb-2008-9-10-r156.
- Chang LH, Barron AB, Cheng K. 2015. Effects of the juvenile hormone analogue methoprene on rate of behavioural development, foraging performance and navigation in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Experimental Biology* **218**: 1715-1724.
- Chantawannakul P, de Guzman LI, Li J, Williams GR. 2016. Parasites, pathogens, and pests of honeybees in Asia. *Apidologie* **47**: 301-324.
- Chauzat MP, Faucon JP. 2007. Pesticide residues in beeswax samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera* L.) in France. *Pest Management Science* **63**: 1100-1106.
- Chen Y, Evans J, Feldlaufer M. 2006. Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology* **92**: 152–159.
- Chen YP, Pettis JS, Corona M, Chen WP, Li CJ, Spivak M, Visscher PK, DeGrandi-Hoffman G, Boncristiani H, Zhao Y, vanEngelsdorp D, Delaplane K, Solter L, Drummond F, Kramer M, Lipkin WI, Palacios G, Hamilton MC, Smith B, Huang SK, Zheng HQ, Li JL, Zhang X, Zhou AF, Wu LY, Zhou JZ, Lee ML, Teixeira EW, Li ZG, Evans JD. 2014. Israeli acute paralysis virus: epidemiology, pathogenesis and implications for honey bee health. *PLoS Pathogens* 10 (e1004261). DOI: 10.1371/journal.ppat.1004261.

- Christiansen S, Scholze M, Dalgaard M, Vinggaard AM, Axelstad M, Kortenkamp A, Hass U. 2009. Synergistic disruption of external male sex organ development by a mixture of four antiandrogens. *Environmental Health Perspectives* **117**: 1839-1846.
- Chu H, Mazmanian SK. 2013. Innate immune recognition of the microbiota promotes host-microbial symbiosis. *Nature Immunology* **14**: 668-675.
- IARC. 2016. Glyphosate. In: IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 112: Some organophosphate insecticides and herbicides: diazinon, glyphosate, malathion, parathion, and tetrachlorvinphos. Lyon, France: 3–10 March 2015. International Agency for Research on Cancer (IARC). Lyon. URL: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol112/mono112-09.pdf>.
- Istvan ES. 2002. Structural mechanism for statin inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *American Heart Journal* **144**: S27-S32.
- Iwasa T, Motoyama N, Ambrose JT, Roe RM. 2004. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Protection* **23**: 371-378.
- Jactel H, Verheggen F, Thiéry D, Escobar-Gutiérrez AJ, Gachet E, Desneux N. 2019. Alternatives to neonicotinoids. *Environment International* **129**: 423-429.
- Jehlík T, Kodrík D, Křišťůfek V, Koubová J, Sáblová M, Danihlík J, Tomčala A, Čapková Frydrychová R. 2019. Effects of *Chlorella* sp. on biological characteristics of the honey bee *Apis mellifera*. *Apidologie* **4**: 564-577.
- Johnson RM, Ellis MD, Mullin ChA, Frazier M. 2010. Pesticides and honey bee toxicity – USA. *Apidologie* **41**: 312-331.
- Johnson AC, Jürgens MD, Williams RJ, Kümmerer K, Kortenkamp A, Sumpter JP. 2008. Do cytotoxic chemotherapy drugs discharged into rivers pose a risk to the environment and human health? An overview and UK case study. *Journal of Hydrology* **348**: 167-175.
- Johnson RM, Wen Z, Schuler MA, Berenbaum MR. 2006. Mediation of pyrethroid insecticide toxicity to honey bees (Hymenoptera: Apidae) by cytochrome P450 monooxygenases. *Apiculture and Social Insects* **99**: 1046-1050.
- Johnson RM, Pollock HS, Berenbaum MR. 2009. Synergistic interactions between in-hive miticides in *Apis mellifera*. *Journal of Economic Entomology* **102**: 474-479.
- Kakumanu ML, Reeves AM, Anderson TD, Rodrigues RR, Williams MA. 2016. Honey bee gut microbiome is altered by in-hive pesticide exposures. *Frontiers in Microbiology* **7** (1255). DOI: 10.3389/fmicb.2016.01255.

- Kamler M, Nesvorna M, Stara J, Erban T, Hubert J. 2016a. 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**: 1-9.
- Kamler M, Tyl J, Nesvorná M, Hubert J, Merta J, Karešová B, Titěra D. 2016b. Hniloba včelího plodu – znovuobjevená infekce včelstev v České republice. *Veterinářství* **66**: 435-438.
- Kanbar G, Engels W. 2003. Ultrastructure and bacterial infection of wounds in honey bee (*Apis mellifera*) pupae punctured by *Varroa* mites. *Parasitology Research* **90**: 349-354.
- Kattwinkel M, Liess M, Arena M, Bopp S, Streissl F, Römbke J. 2015. Recovery of aquatic and terrestrial populations in the context of European pesticide risk assessment. *Environmental Reviews* **23**: 382-394.
- Kevan PG. 1999. Pollinators as bioindicators of the state of the environment: species, activity and diversity. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **74**: 373-393.
- Kevan PG, Hannan MA, Ostiguy N, Guzman-Novoa E. 2006. A summary of the *Varroa*-virus disease complex in honey bees. *American Bee Journal* **146**: 694–697.
- Khilnani JC, Wing HJ. 2015. Protocols to test the activity of antimicrobial peptides against the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*. *Journal of Microbiological Methods* **117**: 54-56.
- Khongphinitbunjong K, de Guzman LI, Tarver MR, Rinderer TE, Chantawannakul P. 2015. Interactions of *Tropilaelaps mercedesae*, honey bee viruses and immune response in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research* **54**: 40-47.
- Kiljanek T, Niewiadowska A, Semeniuk S, Gaweł M, Borzęcka M, Posyniak A. 2016. Multi-residue method for the determination of pesticides and pesticide metabolites in honeybees by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry – honeybee poisoning incidents. *Journal of Chromatography A* **1435**: 100-114.
- Klein AM, Vaissière BE, Cane JJ, Steffan-Dewenter S, Cunningham SA, Kremen C, Tscharntke T. 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the royal society B* **274**: 303-313.
- Le Conte Y, Ellis M, Ritter W. 2010. *Varroa* mites and honey bee health: can *Varroa* explain part of the colony losses? *Apidologie* **41**: 353-363.
- Lesueur C, Knittl P, Gartner M, Mentler A, Fuerhacker M. 2008. Analysis of 140 pesticides from conventional farming foodstuff samples after extraction with the modified QuEChERS method. *Food Control* **19**: 906-914.

- Lewkowski O, Erler S. 2018. Virulence of *Melissococcus plutonius* and secondary invaders associated with European foulbrood disease of the honey bee. *MicrobiologyOpen* 8 (e00649). DOI: 10.1002/mbo3.649
- Li JH, Evans JD, Li WF, Zhao YZ, DeGrandi-Hoffman G, Huang SK, Li ZG, Hamilton M, Chen Y. P. 2017. New evidence showing that the destruction of gut bacteria by antibiotic treatment could increase the honey bee's vulnerability to *Nosema* infection. *PLoS One* 12 (e0187505). DOI: 10.1371/journal.pone.0187505.
- Li Y, Lonh L, Ge J, Li H, Zhang M, Wan Q, Yu X. 2019. Effect of imidacloprid uptake from contaminated soils on vegetable growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67: 7232-7242.
- Lucký Z. 1984. Nemoci včel. 3. přeprac. vyd. Státní pedagogické nakladatelství. Praha.
- Ma Y, Zhai S, Mao SY, Sun SL, Wang Y, Liu ZH, Dai YJ, Yuan S. 2014. Co-metabolic transformation of the neonicotinoid insecticide imidacloprid by the new soil isolate *Pseudoxanthomonas indica* CGMCC 6648. *Journal of Environmental Science and Health* 49: 661-670.
- Maggi M, Antúnez K, Invernizzi C, Aldea P, Vargas M, Negri P, Brasesco C, De Jong D, Message D, Teixeira EW, Principal J, Barrios C, Ruffinengo S, Da Silva RR, Eguaras M. 2016. Honeybee health in South America. *Apidologie* 47: 835-854.
- Marcucci MC, Ferreres F, Garca-Viguera C, Bankova VS, De Castro SL, Dantas AP, Valente PHM, Paulino N. 2001. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology* 74:105-112.
- Martin SJ, Highfield AC, Brettell L, Villalobos EM, Budge GE, Powell M, Nikaido S, Schroeder DC. 2012. Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science* 336: 1304-1306.
- May J. 1959. Čmeláci v ČSR, jejich bionomie, chov a hospodářský význam. 1. vyd. Státní zemědělské nakladatelství. Praha.
- McMenamin AJ, Genersch E. 2015. Honey bee colony losses and associated viruses. *Current Opinion in Insect Science* 8: 121-129.
- Miles 1993. Imidacloprid: pesticide leaching potential model. Reports 105008. Miles, Inc., Agricultural Division, Shawnee Mission, KS.
- Mitchell EAD, Mulhauser B, Mulot M, Mutabazi A, Glauser G, Aebi A. 2017. A worldwide survey of neonicotinoids in honey. *Science* 358: 109-111.

- Moore PA, Wilson ME, Skinner JA. 2014. Honey bee viruses, the deadly *Varroa* mite associates. Department of Entomology and Plant Pathology, University of Tennessee, Knoxville TN.
- Moran AN. 2015. Genomics of the honey bee microbiome. *Current Opinion in Insect Science* **10**: 22-28.
- Motta EVS, Raymann K, Moran NA. 2018. Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **115**: 10305-10310.
- Mullin ChA, Frazier M, Frazier JL, Ashcraft S, Simonds R, vanEngelsdorp D, Pettis JS. 2010. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS One* 5 (e9754). DOI: 10.1371/journal.pone.0009754.
- Mupepele ACh, Bruelheide H, Dauber J, Krüß A, Potthast T, Wägele W, Klein AM. 2019. Insect decline and their drivers: unsupported conclusions in a poorly performed meta-analysis on trends – a critique of Sánchez-Bayo and Wyckhuys (2019). *Basic and Applied Ecology* 37.
- MZe ČR (Ministerstvo zemědělství České republiky). 2018. Národní akční plán pro bezpečné používání pesticidů pro období 2018 – 2022. 6. června 2018. Ministerstvo zemědělství ČR. Praha. URL: <http://eagri.cz/public/web/mze/zivotni-prostredi/udrzitelne-pouzivani-pesticidu/>.
- Nauen R, Tietjen K, Wagner K, Elbert A. 1998. Efficacy of plant metabolites of imidacloprid against *Myzus persicae* and *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae). *Pesticide Science* **52**: 53 – 57.
- Neuendorf S, Hedtke K, Tangen G, Genersch E. 2004. Biochemical characterization of different genotypes of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a honey bee bacterial pathogen. *Microbiology* **150**: 2381-2390.
- O'Farrell PH 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry* **250**: 4007-4021.
- Otti O, Schmid-Hempel P. 2007. *Nosema bombi*: A pollinator parasite with detrimental fitness effects. *Journal of Invertebrate Pathology* **96**: 118-124.
- Panziera D, van Langevelde F, Blacquiére T. 2017. *Varroa* sensitive hygiene contributes to naturally selected *Varroa* resistance in honey bees. *Journal of Apicultural Research* **56**: 635-642.
- Paris L, El Alaoui H, Delbac F, Diogon M. 2018. Effects of the gut parasite *Nosema ceranae* on honey bee physiology and behavior. *Current Opinion in Insect Science* **26**: 149-154.
- Pavelka M, Smetana V. 2003. Čmeláci. ZO ČSOP. Valašské Meziříčí

- Peiren N, Vanrobaeys F, de Graaf DC, Devreese B, Van Beeumen J, Jacobs FJ. 2005. The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics* **1752**: 1-5.
- Pettis JS, Lichtenberg EM, Andree M, Stitzinger J, Rose R, vanEngelsdorp D. 2013. Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. *PLoS One* **8** (e70182). DOI: 10.1371/journal.pone.0070182.
- Pilling ED, Bromley-Challenor KAC, Walker CH, Jepson PC. 1995. Mechanism of synergism between the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin and the imidazole fungicide prochloraz, in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **51**: 1-11.
- Powell JE, Martinson VG, Urban-Mead K, Moran NA. 2014. Routes of acquisition of the gut microbiota of the honey bee *Apis mellifera*. *Applied and Environmental Microbiology* **80**: 7378-7387.
- Přidal A. 1996. Morfologie, anatomie, fyziologie, pitva a preparace včely medonosné (*Apis mellifera* L.) Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. Brno.
- Přidal A. 2004. Checklist of the bees in the Czech Republic and Slovakia with comments on their distribution and taxonomy (Insecta: Hymenoptera: Apoidea). *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* **52**: 29-66.
- Přidal A. 2005. Ekologie opylovatelů. Nakladatelství LYNX. Brno. 109 s. ISBN: 80-86787-04-4.
- Přidal A. 2015. Opylovatel nebo opylovač? *Moderní včelař* **5**:21-21.
- Ptáček V, Votavová A. 2013. Termínovaný chov čmeláka zemního (*Bombus terrestris* L.): certifikovaná metodika. *Zemědělský výzkum*. Troubsko. ISBN: 978-80-905080-7-1.
- Qin X, Evans JD, Aronstein KA, Murray KD, Weinstock GM. 2006. Genome sequences of the honey bee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*. *Insect Molecular Biology* **15**: 715-718.
- Quigley TP, Amdam GV, Harwood GH. 2019. Honey bees as bioindicators of changing global agricultural landscapes. *Current Opinion in Insect Science* **35**: 132-137.
- Ramsey DR, Ochoa R, Bauchan G, Gulbranson C, Mowery JD, Cohen A, Lim D, Joklik J, Cicero JM, Ellis JD, Hawthorne D, vanEngelsdorp D. 2019. *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**: 1792-1801.

- Ravoet J, De Smet L, Wenseleers T, de Graaf DC. 2015. Genome sequence heterogeneity of Lake Sinai virus found in honey bees and Orf1/RdRP-based polymorphisms in a single host. *Virus Research* **201**: 67-72.
- Ravoet J, Schwarz RS, Descamps T, Yañez O, Tozkar CO, Martin-Hernandez R, Bartolomé C, De Smet L, Higes M, Wenseleers T, Schmid-Hempel R, Neumann P, Kadowaki T, Evans JD, de Graaf DC. 2015. Differential diagnosis of the honey bee trypanosomatids *Crithidia mellifica* and *Lotmaria passim*. *Journal of Invertebrate Pathology* **130**: 21-27.
- Rawson RB. 2003. the SREBP pathway – insights from insigs and insects. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **4**: 631-640.
- Raymann K, Zack S, Moran NA. 2017. Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honeybees. *PLoS Biology* **15** (e2001861). DOI: 10.1371/journal.pbio.2001861.
- Rehman SU, Rehman S, Waliullah MIS. 2012. Chlorpyrifos-induced neuro-oxidative damage in bee. *Toxicology and Environmental Health Sciences* **4**: 30-36.
- Ridout MS, Faddy MJ, Solomon MG. 2006. Modelling the effects of repellent chemicals on foraging bees. *Journal of the Royal Statistical Society: Series C (Applied Statistics)* **55**: 63-75.
- Rortais A, Arnold G, Halm MP, Touffet-Briens F. 2005. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie* **36**: 71-83.
- Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B. 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**: S96-S119.
- Rouchaud J, Gustin F, Wauters A. 1996. Imidacloprid insecticide soil metabolism in sugar beet field crops. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **56**: 29-36.
- Runckel Ch, Flenniken ML, Engel JC, Ruby JG, Ganem D, Andino R, DeRisi JL. 2011. Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema*, and *Crithidia*. *PLoS One* **6** (e20656). DOI: 10.1371/journal.pone.0020656.
- Runckel Ch, DeRisi J, Flenniken ML 2014. A draft genome of the honey bee trypanosomatid parasite *Crithidia mellifica*. *PLoS One* **9** (e95057). DOI: 10.1371/journal.pone.0095057.
- Ryabov EV, Childers AK, Lopez D, Grubbs K, Posada-Florez F, Weaver D, Girtten W, vanEngelsdorp D, Chen Y, Evans JD. 2019. Dynamic evolution in the key honey bee

- pathogen deformed wing virus: novel insights into virulence and competition using reverse genetics. *PLoS Biology* 17 (e3000502). DOI: 10.1371/journal.pbio.3000502.
- Sackin BM, Fishman Y. 1998. Honey bee repellent composition comprising tea tree oil, April 14 1998, US Patent **5**: 738-863.
- Sakakura Y, Shimano H, Sone H, Takahashi A, Inoue K, Toyoshima H, Suzuki S, Yamada N. 2001. Sterol regulatory element-binding proteins induce an entire pathway of cholesterol synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **286**: 176 – 183.
- Salavová R. 2006. Acanto – strobilurin nové generace pro časnou aplikaci. In: Sborník z konference „Úspěšné plodiny pro velký trh“. pp 61-63.
- Sammataro D, Untalan P, Guerrero F, Finley J. 2005. The resistance of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) to acaricides and the presence of esterase. *International Journal of Acarology* **31**: 67-74.
- Sammataro D. 2006. An easy dissection technique for finding the tracheal mite, *Acarapis woodi* (Rennie) (Acari: Tarsonemidae), in honey bees with video link. *International Journal of Acarology* **32**: 339-343.
- Sammataro D, Yoder JA. 2012. Honey bee colony health: challenges and sustainable solutions. CRC Press. Boca Raton. FL. ISBN: 978-1-4398-7940-5.
- Schäfer MO, Genersch E, Fünfhaus A, Poppinga L, Formella N, Bettin B, Karger A. 2014. Rapid identification of differentially virulent genotypes of *Paenibacillus larvae*, the causative organism of American foulbrood of honey bees, by whole cell MALDI-TOF mass spectrometry. *Veterinary Microbiology* **170**: 291-297.
- Schmid-Hempel P. 2001. On the evolutionary of host-parasite interactions: addressing the question with regard to bumblebees and their parasites. *Naturwissenschaften* **88**: 147-158.
- Schmid-Hempel R, Tognazzo M. 2010. Molecular divergence defines two distinct lineages of *Crothidia bombi* (Trypanosomatidae), parasites of bumblebees. *Eukaryotic Microbiology* **57**: 337-345.
- Schmuck R, Stadler T, Schmidt HW. 2003. Field relevance of a synergistic effect observed in the laboratory between an EBI fungicide and a chloronicotinyl insecticide in the honeybee (*Apis mellifera* L, Hymenoptera). *Pest Management Science* **59**: 279-286.
- Scholz K, Spiteller M. 1992. Influence of groundcover on the degradation of ¹⁴C-imidacloprid in soil. In: Brighton Crop Protection Conference – Pests and diseases, British Crop Protection Council, Farnham, UK. 883 – 888.

- Schricker B, Stephen WP. 1970. The effect of sublethal doses of parathion on honeybee behaviour. I. Oral administration and the communication dance. *Journal of Apicultural Research* **9**:141-153.
- Seeley TD. 2019. *The lives of bees: The untold story of the honey bee in the wild*. Princeton University Press. Princeton. NJ. ISBN:978-0-691-16676-6.
- Seifrtova M, Halesova T, Sulcova K, Riddellova K, Erban T. 2017. Distributions of imidacloprid, imidacloprid-olefin and imidacloprid-urea in green plant tissues and roots of rapeseed (*Brassica napus*) from artificially contaminated potting soil. *Pest Management Science* **73**: 1010-1016.
- Sinha S, Chattopadhyay P, Pan I, Chatterjee S, Chanda P, Bandyopadhyay D, Das K, Sen S K. 2009. Microbial transformation of xenobiotics for environmental bioremediation. *African Journal of Biotechnology* **8**: 6016-6027.
- BI, Balmford A, Bladon AJ, Christie AP, De Palma A, Dicks LV, Gallego-Zamorano J, Johnston A, Martin PA, Purvis A, Rocha R, Wauchope HS, Wordley CFR, Worthington TA, Finch T. 2019. Worldwide insect declines? An important message, but interpret with caution. *Ecology and Evolution* **9** (7687). DOI: 10.1002/ece3.5153.
- Simon-Delso N, San Martin G, Bruneau E, Minsart LA, Mouret C, Hautier L. 2014. Honeybee colony disorder in crop areas: the role of pesticides and viruses. *PLoS One* **9** (e103073). DOI: 10.1371/journal.pone.0103073.
- Siviter H, Koricheva J, Brown MJF, Leadbeater, E. 2018. Quantifying the impact of pesticides on learning and memory in bees. *Journal of Applied Ecology* **55**: 2812-2821.
- Skorbiłowicz M, Skorbiłowicz E, Cieśluk I. 2018. Bees as bioindicators of environmental pollution with metals in an urban area. *Journal of Ecological Engineering* **19**: 229-234.
- Smith KM, Loh EH, Rostal MK, Zambrana-Torrel CM, Mendiola L, Daszak P. 2013. Pathogens, pests, and economics: drivers of honey bee colony declines and losses. *EcoHealth* **10**: 434-445.
- Smith TM, Stratton GW. 1986. Effects of synthetic pyrethroid insecticides on nontarget organisms. *Residue Reviews* **97**: 93-120.
- Spencer EB, Bianchi A, Widmer J, Witters LA. 1993. Brain acetyl_CoA carboxylase? Isozymic identification and studies of its regulation during development and altered nutrition. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **192**: 820-825.
- Spürgin A. 2013. *Zázračné včely: od včelstva ke včelaření. Víkend*. Líbeznice. ISBN: 978-80-7433-069-8.

- Stejskal V, Vendl T, Fraňková M, Aulický R. 2019. Přehled skladištních hlodavců, hmyzu a roztočů škodících na semenech cukrové řepy a řepných produktech. *Listy cukrovarnické a řepářské*. **135**: 248-254.
- Suchail S, Guez D, Belzunces LP. 2001. Toxicity of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. In: *Hazards of pesticides to bees*, INRA, Paris (2001). pp 121-126.
- Suchail S, Debrauwer L, Belzunces LP. 2004. Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. *Pest Management of Science* **60**: 291 – 296.
- SVS ČR (Státní veterinární správa České republiky), 2017. Hromadné úhyny včelstev, Zpráva o činnosti v oblasti ochrany zdraví zvířat v roce 2016 – informační bulletin č. 2/2017. Státní veterinární správa ČR. Praha. 91-92. URL: <http://www.svs.cz/wp-content/files/dokumenty-a-publikace/ib1702.pdf>.
- Tautz J. 2010. Fenomenální včely: biologie včelstva jako superorganismu. 2. vyd v češtině. Brázda. Praha. ISBN: 978-80-209-0379-2.
- Titěra D. 2017. Včely zdravé a nemocné. Brázda. Praha. ISBN: 978-80-209-0420-1.
- Thomas SG, Varghese A, Roy P, Bradbear N, Potts SG, Davidar P. 2009. Characteristics of trees used as nest sites by *Apis dorsata* (Hymenoptera, Apidae) in the Nilgiri Biosphere Reserve. India. *Journal of Tropical Ecology* **25**: 559-562.
- Thompson HM. 2010. Risk assessment for honey bees and pesticides-recent developments and „new issues“. *Pest Management Science* **66**: 1157-1162.
- Thompson HM, Fryday SL, Harkin S, Milner S. 2014. Potential impacts of synergism in honeybees (*Apis mellifera*) of exposure to neonicotinoids and sprayed fungicides in crops. *Apidologie* **45**: 545-553.
- Thompson H, Wilkins, S. 2003. Assessment of the synergy and repellency of pyrethroid/fungicide mixtures. *Bulletin of insectology* **56**: 131-134.
- Tsukamoto M, Suzuki R. 1964. Genetic analyses of DDT-resistance in two strains of the housefly, *Musca domestica* L. *Scientific Insect Control*. 76-89.
- Thrasylvoulou A, Ifantidis MD, Pappas NLK. 1985. Malathion residues in Greek honey. *Apidologie* **16**: 89-94.
- Thurman EM, Ferrer I, Zavitsanos P, Zweigenbaum JA. 2013. Identification of imidacloprid metabolites in onion (*Allium cepa* L.) using high-resolution mass spectrometry and accurate mass tools. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **27**: 1891-1903.
- Tian B, Fadhil NH, Powell JE, Kwong WK, Moran NA. 2012. Long-term exposure to antibiotics has caused accumulation of resistance determinants in the gut microbiota of honeybees. *mBio* 3 (e00377-12). DOI: 10.1128/mBio.00377-12.

- Tosi S, Nieh JC. 2019. Lethal and sublethal synergistic effects of a new systemic pesticide, flupyradifurone (Sivanto®), on honeybees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 286(20190433). DOI: 10.1098/rspb.2019.0433.
- Tritschler M, Retsching G, Yañez O, Williams GR, Neumann P. 2017. Host sharing by the honey bee parasites *Lotmaria passim* and *Nosema ceranae*. *Ecology and Evolution* 7: 1850-1857.
- ÚKZUZ. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský. Spotřeba pesticidů v jednotlivých letech. URL: <http://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/pripravky-na-or/ucinne-latky-v-por-statistika-spotreba/spotreba-pripravku-na-or/spotreba-v-jednotlivych-letech/>
- Vallad GE, Goodman RM. 2004. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science* 44: 1920-1934.
- van der Sluijs JP, Simon-Delso N, Goulson D, Maxim L, Bonmatin JM, Belzunces LP. 2013. Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. *Current Opinion in Environmental Sustainability* 5: 293-305.
- vanEngelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin Ch, Haubruge E, Nguyen BK, Frazier J, Cox-Foster D, Chen Y, Underwood R, Tarpay DR, Pettis JS. 2009. Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS One* 4 (e6481). DOI: 10.1371/journal.pone.0006481.
- Veselý V, Bacílek J, Drobníková V, Kamler F, Kubišová S, Ptáček V, Titěra D. 2013. *Včelařství*. 3. vyd. Brázda. Praha. ISBN: 978-80-209-0399-0.
- Vijverberg HP, van der Zalm JM, van Kleef RG, van den Bercken J. 1983. Temperature- and structure-dependent interaction of pyrethroids with the sodium channels in frog node of Ranvier. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 728: 73-82.
- Vítámvás P, Kosová K, Škodáček Z, Prášil IT. 2010. Metoda dvourozměrné diferenční gelové elektroforézy (2-D DIGE) a její využití v proteomice. *Chemické listy* 104: 671-676.
- Wegener J, Ruhnke H, Scheller K, Mispagel S, Knollmann U, Kamp G, Bienefeld K. 2016. Pathogenesis of varroosis at the level of the honey bee (*Apis mellifera*) colony. *Journal of Insect Physiology* 91-92: 1-9.
- Wernecke A, Frommberger M, Forster R, Pistorius J. 2019. Lethal effects of various tank mixtures including insecticides, fungicides and fertilizers on honey bees under laboratory, semi-field and field conditions. *Journal of Consumer Protection and Food Safety* 14: 239-249.
- Westwood F, Bean KM, Dewar AM, Bromilow RH, Chamberlain K. 1998. Movement and persistence of [¹⁴C]imidacloprid in sugar-beet plants following application to pelleted sugar-beet seed. *Pesticide Science* 52: 97-103.

- Winston ML. 1991. The biology of the honey bee. Harvard University Press. Cambridge. MA. ISBN: 978-0-674-07409-5.
- Wirtz IP, Hauer-Jákli M, Schenke D, Ladewig E, Märlander B, Heimbach U, Pistorius J. 2018. Investigations on neonicotinoids in guttation fluid of seed treated sugar beet: Frequency, residue levels and discussion of the potential risk to honey bees. *Crop Protection* **105**: 28-34.
- Wolteđji D, Fang Y, Han B, Feng M, Li R, Lu X, Li J. 2013. Proteome analysis of hemolymph changes during the larval to pupal development stages of honeybee workers (*Apis mellifera ligustica*). *Journal of Proteome Research* **12**: 5189-5198.
- Woodcock BA, Ridding L, Freeman SN, Pereira MG, Sleep D, Redhead J, Aston D, Carreck NL, Shore RF, Bullock JM, Heard MS, Pywell RP. 2018. Neonicotinoid residues in UK honey despite European Union moratorium. *PLoS One* **13**(e0189681). DOI: 10.1371/journal.pone.0189681.
- Wouters W, van den Bercken J. 1978. Action of pyrethroids. *General Pharmacology* **9**: 387-398.
- Wu JY, Anelli CM, Sheppard WS. 2011. Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PLoS One* **6** (e14720). DOI: 10.1371/journal.pone.0014720.
- Xie L, Brian Law BK, Aakre ME, Edgerton M, Shyr Y, Bhowmick NA, Moses HL. 2003. Transforming growth factor beta-regulated gene expression in a mouse mammary gland epithelial cell line. *Breast Cancer Research* **5**: R187-R198.
- Ying-Shin P, Fang Y, Xu S, Ge L. 1987. The resistance mechanism of the Asian honey bee, *Apis cerana* Fabr., to an ectoparasitic mite, *Varroa jacobsoni* Oudemans. *Journal of Invertebrate Pathology* **49**: 54-60.
- Yu SJ. 2008. The toxicology and biochemistry of insecticides. CRC Press. Boca Raton. FL. ISBN: 978-1-4200-5975-5.
- Zaluski R, Kadri SM, Alonso DP, Ribolla PEM, de Oliveira Orsi R. 2015. Fipronil promotes motor and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) and affects the development of colonies exposed to sublethal doses. *Environmental Toxicology and Chemistry* **34**: 1062-1069.
- Zhang L, Wang Y, Sun Ch, Yang Sm He H. 2013. Simultaneous determinativ of organochlorine, organophosphorus and pyretroid pesticides in bee pollens by solid-phase extraction cleanup followed by gas chromatogramy using electron-capture detector. *Food Analytical Methods* **6**: 1508-1514.

- Zheng W, Liu W. 1999. Kinetics and mechanism of the hydrolysis of imidacloprid. *Pesticide Science* **55**: 482-485.
- Zheng H, Steele MI, Leonard SP, Motta EVS, Moran NA. 2018. Honey bees as models for gut microbiota research. *Lab Animal* **47**: 317-325.
- Zhou T, Zhou W, Wang Q, Dai PL, Liu F, Zhang YL, Sun JH. 2011. Effects of pyrethroids on neuronal excitability of adult honeybees *Apis mellifera*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **100**: 35-40.
- Zhu W, Schmehl DR, Mullin CA, Frazier JL. 2014. Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae. *PLoS One* 9 (e77547). DOI: 10.1371/journal.pone.0077547 24416121.
- Žďárek J. 2013. Hmyzí rodiny a státy. Academia. Praha. ISBN: 978-80-200-2225-7.

9. PŘÍLOHY

Tabulka 9. Zkratky a názvy.

Zkratka	Název
ABPV	Acute bee paralysis virus
ANOVA	analýza rozptylu
CBPV	Chronic bee paralysis virus
CCD	colony collaps disorder
DDT	1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiotreitol
DWV	Deformed wing virus
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
GABA	gama-aminomáselná kyselina
IAA	iodoacetamid
JAK/STAT	Janus kinase / signal transducers and activators of transcription
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LSV	Lake Sinai virus
MAPK	mitogen-activated protein kinase
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF- κ B	nukleární faktor kappa B
NGS	next generation sequencing
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
POR	přípravky na ochranu rostlin
QuEChERS	quick easy cheap effective rugged and safe
RNA	ribonukleová kyselina
RT-PCR	real time polymerase chain reaction
SDC	sodium deoxycholate
SDS	sodium dodecyl sulfát
SDS-PAGE	tris-glycinova elektroforéza
TEAB	tetraethylammonium tetrahydroborate
UHPLC	ultra-high performance liquid chromatography