

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra zoologie a rybářství



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

Sledování letové aktivity včel pomocí RFID technologie

Diplomová práce

Vojtěch Purnoch

Ekologické zemědělství

Vedoucí práce: Ing. Dalibor Titěra

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Efektivní letová aktivita opylovačů v krajině" jsem vypracoval(a) samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 4.4.2021

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval Ing. Daliboru Titěrovi CSc. za jeho trpělivý přístup a vedení.

Sledování letové aktivity včel pomocí RFID technologie

Souhrn

Cílem práce je lepší porozumění a rozšíření znalostí o aktivitě opylovačů a technologii RFID čipování, která byla využívána při monitoringu a sběru dat v experimentální části. Práce si klade za cíl prohloubení znalostí o efektivní letové aktivitě opylovačů, aby její výsledky mohly být využity pro zlepšení a zefektivnění ochrany těchto živočichů.

První část je věnována rešerši literatury zabývající se letovou aktivitou opylovačů, problémy s ní spojenými. V samostatných kapitolách je pak popsána samotná RFID technologie společně s vědeckými pracemi a experimenty, které tuto technologii za dobu její existence využily ke zkoumání opylovačů. Dále pak práce zmiňuje faktory, jež mohou včelí aktivitu ovlivňovat.

Druhá část je věnována samotným experimentům, které se zabývají efektivní letovou aktivitou opylovačů za použití UHF RFID zařízení. Práce popisuje postup a výsledky dvou experimentů a upozorňuje na nedostatky, čímž směřuje k vylepšení testování v dalších letech.

Klíčová slova: opylovači, včely, čmeláci, letová aktivita, letová vzdálenost, ochrana opylovačů, UHF, RFID.

Measurement of flight activity of honey bees using RFID technique

Summary

The aim of the thesis is to better understand and expand knowledge about pollinator activity and RFID chip technology, which was used in monitoring and data collection in the experimental part. The thesis aims to deepen knowledge of the effective flight activity of pollinators so that its results can be used to improve and streamline the protection of these animals.

The first part is devoted to the research of literature dealing with the flight activity of pollinators, the problems associated with it. In separate chapters, RFID technology itself is described together with scientific work and experiments that have used this technology during its existence to examine pollinators. Furthermore, the thesis mentions factors that can influence bee activity.

The second part is devoted to the experiments themselves, which deal with the effective flight activity of pollinators using UHF RFID devices. The thesis describes the progress and results of two experiments and highlights shortcomings, thus aiming to improve testing in the coming years.

Keywords: pollinators, bees, bumblebees, flight activity, flight distance, pollinator protection, UHF, RFID.

Obsah

1	Úvod	8
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	9
3	Opylovači	10
4	RFID	10
4.1	Co je RFID	10
4.1.1	Varianta 1	11
4.1.2	Varianta 2	12
4.1.3	Varianta 3	13
4.2	Úspěšnost monitoringu	13
4.3	Výhody a nevýhody RFID monitoringu	14
4.3.1	RFID versus Radar	15
4.4	Aplikace RFID ve výzkumu včel	15
4.4.1	Včela medonosná	16
4.4.2	Čmeláci	18
4.4.3	Bezžihadlové včely	19
4.5	Včelí letová aktivita a její limitace	20
4.5.1	Vliv cirkadiálních rytmů	20
4.5.2	Časová paměť	22
4.5.3	Teplotní limitace	23
5	Metodika	24
5.1	Metodika správného čipování	24
5.2	Příprava	26
5.3	Příprava pokusů monitoru včelí aktivity pomocí RFID technologie v terénních a laboratorních podmínkách	26
5.4	Pokus 1	26
5.4.1	Příprava	27
5.4.2	Postup	27
5.4.3	Výsledky	28
5.4.4	Včelí individualita	31
5.5	Pokus 2	33
5.5.1	Příprava	33
5.5.2	Postup	33
5.5.3	Výsledky	34
6	Celkové Výsledky	36
7	Diskuze	37
8	Závěr	38

9 Literatura..... 39

1 Úvod

Opylovači jsou pro přírodní ekosystémy nezbytní a velká část druhového spektra rostlin se bez jejich pomoci není schopna dobře rozmnožit (Johnson et al. 1998). Nejedná se pouze o přírodní ekosystémy. Více jak 35 procent rostlinných zemědělských produktů pochází z plodin, jež jsou na opylování buď přímo závislé, nebo na něm alespoň výrazně benefitují (Kremen et al., 2007). Již více jak dvě desítky let pozorujeme postupný úbytek opylovačů (Buchmann & Nabhan 1996; Kearns et al. 1998). V Evropě proběhlo hned několik studií monitorujících toto rapidní ztenčování hmyzích populací. Fenomén byl následně potvrzen dlouhodobou studií (Hallmann et al. 2017) upozorňující na 75% úbytek hmyzí biomasy.

Při monitoringu hmyzu byla vědecká společnost dlouhou dobu odkázána pouze na přímé pozorování, což bylo nejen časově náročné, ale také potenciálně nepřesné. V poslední dekádě však můžeme pozorovat práce, které svá pozorování zakládají na technologii RFID. I když je pravdou, že se tato technologie nejvíce využívá právě pro studium včel (nejvíce pak *A. mellifera*), je třeba vyzdvihnout její obrovský a doposud ne zcela využitý potenciál i pro jiný hmyz. Stovky druhů sociálního hmyzu nebyly doposud touto technologií pozorovány. Hlavní limitací je bohužel i v dnešní době velikosti sledovacích zařízení, což představuje jednu z hlavních, nikoliv však jedinou, nevýhodu této technologie. Mnohé z prozatím vůbec či ne zcela prozkoumaných druhů sociálního hmyzu jsou velikostí srovnatelné s *A. mellifera*, a tudíž by se pro tuto technologii více než hodily. Velkou neznámou jsou v tomto ohledu samotářské včely, což bude patrně práce výzkumníků dalších let.

Systémy RFID se primárně používají k ověření účinků pesticidů a patogenů na let včel a jejich dlouhověkost. V menší míře byla technologie použita k lepšímu pochopení plasticity chování při hledání potravy. Systém RFID by však mohl být použit ke zodpovězení mnoha dalších důležitých otázek, jako je dopad dalších biotických a abiotických proměnných prostředí (krajina, podnebí, znečištění...) na letovou aktivitu včel, což je výzkum, až na výjimky, technologie RFID prostý.

Letová aktivita kolonie je spojena s jejími vnitřními podmínkami (Hilário et al. 2000; Meikle & Holst 2015) a změny těchto podmínek mohou naznačovat změny v okolním prostředí (Pham-Delègue et al. 2002; Maia-Silva et al. 2015). Tím pádem by tento typ studia mohl pomoci objasnit, jak včelstvo reaguje na různorodé stresory, a poskytovat přesné vzorce letové aktivity podle okolního prostředí kolonie. Sledování letové aktivity včelstev by mohlo představovat nástroj pro monitorování podmínek prostředí samostatně nebo v kombinaci s jinými metodami, jako je např. analýza kontaminantů v medu a pylu.

Vysoká druhová bohatost včel naznačuje jejich velký potenciál pro použití jako bioindikátor a společně s jednoduchostí monitorování jejich odpovědí na disturbance představují ideální kombinaci.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Práce si klade za cíl přípravu unikátní číselné řady čipů pro lepší možnosti zpracování dat a dobrého rozlišení jednotlivých pozorovaných a očipovaných subjektů v experimentu. Zároveň je třeba zdokonalit techniku připevňování RFID čipů tak, aby docházelo k co nejmenším ztrátám pozorovaných subjektů a zároveň k co nejmenšímu vlivu na přirozené chování. Dalším cílem práce je monitoring letové aktivity opylovačů, jehož výsledky mohou být využity pro další výzkum v oblasti ochrany hmyzu v krajině.

3 Opylovači

Nejdříve je třeba krátce pohovořit o pojmu opylovač, který v mé práci budu používat. V běžném jazyce se pod pojmem opylovač rozumí ten, kdo přenáší pyl. Angličtina pro stejný výraz používá slovo „pollinator“. Je zde však nutné zmínit, že ovocnářská terminologie používá stejný český výraz, tedy opylovač, pro rostlinu, jež je svým vlastním pylem schopna opylit rostlinu alogamní. Alogamní rostlinou je rostlina taková, která není schopná opylení pomocí vlastního pylu. V českém jazyce používáme pro takovou rostlinu pojem cizosprašná. Pro živočicha přenášejícího hmyz proto ovocnářská terminologie používá slovo opylovatel. Díky poměrně malému množství vědeckých textů, ve kterých se oba termíny nacházejí naráz, se však zavedený pojem opylovač používá nadále. Tak tomu bude i v této práci.

4 RFID

Včely, jakožto skupina hmyzu, jsou pro vědecký výzkum a zejména pak například pro aplikovanou ekologii potenciálně velmi dobrým indikátorem prostředí (Meléndez et al. 2014). To samozřejmě zahrnuje jak přírodní, tak i antropogenní změny prostředí (Winfree et al. 2009). Mnohé ze včel reagují na změny v prostředí prakticky okamžitě (McGeoch 1998), proto mohou být využity pro sledování krátkodobých i dlouhodobých stresorů na biotu a jejich taxonomická rozmanitost zase velmi dobře odráží celkovou kvalitu ekosystému v dané oblasti (McGeoch 1998).

Jednou z možností, jak monitorovat změny ve včelích společenstvech, je pozorovat jejich chování při sběru potravy. Právě potrava totiž představuje jednu z cest ke kontaminaci kolonie, neboť sběračky s ní přijdou přímo do styku a jejich prostřednictvím následně celé společenstvo. Může se jednat o pesticidy (Salkova et al. 2016), těžké kovy (Moroń et al. 2012; Salkova et al. 2016) a také patogeny (Graystock et al. 2015). Mnohé práce ukázaly, že právě takovéto stresory mohou vést ke změnám chování v letové aktivitě opylovačů (Dussaubat et al. 2013; Lach et al. 2015; Benaets et al. 2017). Navíc se nemusí jednat pouze o cizorodé agens, ale třeba pouze o změnu ekosystému z ryze mechanického úhlu pohledu. Například degradace stanoviště může způsobit prodloužení doby shánění potravy kvůli nedostatku vhodných potravních zdrojů.

Speciálním a pozoruhodným fenoménem je nedostatek vizuálních podnětů, které včela využívá k orientaci v prostoru. (Cartwright & Collett 1982; Leonhardt et al. 2016). Ač se absence nějakého většího stromu nebo vyvýšeného kopce může zdát triviální, v případě samotářských včel to znamená delší lety a horší zisky potravy. Kvůli tomu v konečném důsledku dochází ke snížení počtu životaschopných buněk s larvami včel samotárek (Zurbuchen et al. 2010).

Je tedy patrné, že množství a délka letu může být pro hlubší poznání aktuálního stavu ekosystémů klíčové a technologie RFID je v tomto směru velkou pomocí.

4.1 Co je RFID

Technologie RFID je systém založený na radiových vlnách, který se používá pro automatické čtení speciálních čipů. Toho se využívá k identifikaci zboží v obchodech, ale také zvířat (Nunes-Silva et al. 2019). Pro správné fungování je třeba tří komponentů: přijímače

(anténa), čtečky (reader) a čipu (tag). Anténa vyšle rádiový signál na určité frekvenci, ten způsobí aktivaci značky, která odešle svá data čtečce, většinou unikátní číslo daného čipu, pomocí modulovaného signálu. Celkový záznam společně s časem, kdy byl záznam pořízen, jsou uloženy do počítače. (Nunes-Silva et al. 2019). Frekvence, se kterými RFID technologie většinou pracuje, jsou při monitoringu hmyzu tři.

4.1.1 Varianta 1

První (HF; 13.56 MHz) rádiový signál používaly již první RFID přístroje. Dodnes je tato frekvence hojně využívána ve výzkumu. Dosah signálu závisí na čipu a čtečce. Obecně přijímanou měrou je vzdálenost kolem čtyř milimetrů. Tomu musí být uzpůsoben i samotný vstup do hnízda, aby byl reader schopen čip zachytit. Dodržení vzdálenosti je tu velice klíčové, v opačném případě totiž dochází k masivním ztrátám dat a včely procházejí čtečkou, aniž by je systém zachytil. Pokud ale dodržíme předepsanou vzdálenost, vizuální kontrolkou ve studii zabývající se měřením pesticidů (Decourtye et al. 2011) bylo prokázáno, že pouze 1 ze 300 včel není v takovém případě čtečkou zaznamenána.

Samotný tag zde nemá vlastní zdroj energie a plní pouze pasivní funkci. Reader (čtečka) automaticky rozpoznává prakticky neomezený počet identifikačních kódů (přesněji $18 \cdot 10^{18}$) (Decourtye et al. 2011). Každý označený jedinec se pak díky tomu může ohlašovat čtečce tímto unikátním číslem. Velikost samotného tagu je zde 2,4 mm a hmotnost se pohybuje kolem 3 mg, což jsou asi tři procenta včelí hmotnosti. Včela medonosná je však schopná unést přibližně 70 mg nektaru nebo pylu, tudíž pro ni 3 mg nepředstavují větší problém.



Foto 1.: Ilustrační fotografie HF čipu. Autor: Peter Cullen

4.1.2 Varianta 2

Druhý typ používá ke čtení čipy aktivované laserem. Tento typ dokáže číst čipy i na poměrně velké vzdálenosti v porovnání s velikostí čipu. Vzdálenost se odhaduje až na 10 mm. Čip má přitom stejnou velikost jako varianta 1 (Tenzcar et al. 2014). Jako problémová se však ukazuje samotná detekce čipů. A obecně se doporučuje používat alespoň dva čipy naráz, aby se zvýšila pravděpodobnost zachycení. Studie z roku 2014 zabývající se letovou aktivitou opylovačů (Tenzcar et. al. 2014) použila právě tuto metodu. Pro správné čtení čipu byl z plastové trubice vyroben úzký koridor se dvěma laserovými čtečkami. Problémem však bylo čtení čipu u včel, které koridorem procházely břichem ke čtečce. Aby včela procházela čtečkou správně, byla část trubice poryta polytetrafluoroethilenem a do spodní části bylo vyvrtáno množství děr, za které se včely mohly zachytit. Táto komplikovaná opatření měla podpořit včely v tom, aby se v trubici pohybovaly co nejvíce hlavou nahoru a nikoliv obráceně.



Foto 2.: Ilustrační fotografie dvou laserových čipů na včele. Autor: Tenzcar et al.

4.1.3 Varianta 3

Třetí typ užívá vysokofrekvenční (UHF; 860–960 MHz). Jedná se o technologii umožňující čtení čipů až do vzdálenosti tří centimetrů. (Engelke et al. 2016; Gama et al. 2017; Gomes et al. 2017). Bohužel jsou čipy této technologie obvykle větší než jejich dva předchůdci. I přes větší rozměry se ve výzkumu včel tento typ využívá a díky jeho snadnému ovládní a všeobecné dostupnosti jsem si ho vybral i já. Rozhodnutí o tom, kterou z daných technologií je vhodné použít, závisí totiž nejen na velikosti hmyzu, který budeme zkoumat, ale zároveň také na finančním zázemí dané studie. UHF systém je sice co do velikosti čipů největší, jeho cenová dostupnost však předčí všechny ostatní systémy. Je samozřejmé, že pro drobný hmyz jako jsou rody *melipona* a *trigona* je použití UHF nemožné a namísto toho musíme použít dražší, avšak drobnější variantu.



Foto 3.: Ilustrační fotografie UHF čipu na včele Autor: Vojtěch Purnoch

4.2 Úspěšnost monitoringu

Již několik studií zkoumalo úspěšnost systému RFID při monitoringu hmyzu. Jejich výsledky se však bohužel poměrně liší kvůli mnoha proměnným faktorům. Ať už se jedná o kapacitu dané čtečky nebo různé druhy použitých čipů či elektromagnetického signálu. Míra úspěšnosti se pohybuje od osmdesáti do devadesáti procent (Tenczar et al., 2014; Ohashi et al., 2010; Robinson et al. 2009). V roce 2018 dokonce studie vykazala téměř stoprocentní úspěšnost (De Souza et al. 2018), ale mezi ostatními výzkumy se jedná spíše o výjimku.

Jak již bylo zmíněno, velkým problémem je neschopnost čtečky vždy čip přečíst. Nízká úspěšnost čtení následně snižuje validitu výsledků. Při monitoringu včel je dále jedním z velkých problémů ztráta čipů kvůli špatnému pojetí. V mém případě bylo nutné v průběhu pokusů přejít z běžného bílého barviva pro označování matek na šelakové lepidlo, neboť ztrátovost dosahovala u některých částí pokusu i šedesáti procent. Nelze ovšem všechnu vinu svalovat pouze na vnější vlivy, počasí nebo prosté odpadnutí čipu. Očipované včely si často čip pokoušejí sundat samy, mnohdy také úspěšně (Souza et al. 2018).

Dalším faktorem zodpovědným za nízké množství správně připevněných čipu je lidská chyba. Výzkumní pracovníci, kteří nejsou zvyklí zacházet se včelami či jiným zkoumaným hmyzem, často nalepí čip špatně nebo je jejich neodbornou manipulací hmyz raněn (Souza et al. 2018).

Výsledná retence čipů na hmyzím těle se tak kvůli tomu pohybuje v dobrých studiích od dvaceti do devadesáti procent (Souza et al. 2018).

4.3 Výhody a nevýhody RFID monitoringu

Hlavní výhodou je možnost nepřetržitého sledování prakticky neomezeného množství jedinců, neboť každý z nich může vlastnit své individuální číslo (Decourtye et al. 2011). Toho není možné docílit u přímého pozorování, neboť značení na včelách musí být dobře rozeznatelné (většinou se odlišují pomocí různých barevných teček), aby se zabránilo lidské chybě.

RFID čtečky jsou pomocí speciálních programů nastavitelné tak, aby snímaly čip vždy jen jednou za určitou dobu, a tak nám ušetřily budoucí práci spočívající v čištění velkého množství neužitečných dat lišících se od sebe v řádech milisekund.

Čtečky také umožňují čtení většího množství čipů naráz, což otevírá možnost načipování skutečně velkého množství jedinců bez obavy, že některý z nich nebude zachycen (Decourtye et al. 2011). Tyto vlastnosti představují nespornou výhodu vůči samotnému přímému pozorování. I kdybychom měli možnost u přímého pozorování označit tři desítky včel najednou, byla by velká pravděpodobnost, že v „letové dopravní špičce“ nějakou přehlédneme.

Nemůžeme tu však hovořit pouze o výhodách. Jednou z velkých nevýhod je technická náročnost celé monitorovací sestavy oproti přímému pozorování. Studie zabývající se letovou aktivitou často zároveň k monitoringu používají právě metodu přímého pozorování. Většinou tak zaznamenávají počty vletů a odletů za definovaný čas, který si autoři studie určí (Biesmeijer & Tóth 1998, Oliveira-Abreu et al. 2014). I když se může zdát, že takový systém je zastaralý a RFID technologie je mu nadřazena, jsou určité informace, které takovým pozorováním můžeme zachytit a které bychom pomocí RFID monitoringu pozorovat nemohli. Takovou informací je například druh komodity, kterou včela nese do hnízda. Je však třeba zmínit možnost doplnění RFID technologie o videozáznam, kterým se tento problém dá částečně vyřešit.

Metoda přímého pozorování vyžaduje pouze ruční počítadlo, barvu a trpělivost výzkumného pracovníka, což jsou věci poměrně levné a dostupné, a představují tak oproti RFID technologii značnou výhodu.

4.3.1 RFID versus Radar

Věc, kterou RFID technologie nikdy nepostihne, je prostor. Vzhledem k tomu, že čip lze zachytit pouze u čtečky, a to jen na vzdálenost maximálně několika centimetrů, nelze RFID použít pro studie vyžadující prostorový monitoring. (Kissling et al., 2014). Pro účely zachycení trajektorie včelích letů se ukázal být nejlepší variantou radar. V průkopnické studii z roku 1996 (Osborne et al., 1996) autoři dokázali zaznamenat lety nízko letících včel a čmeláků až do vzdálenosti 250 m (Osborne et al., 1996).



Foto 3.: Ilustrační fotografie radarová anténa na čmelákově. Autor: Rothamsted Research

Dnes je tato technologie využívána již poměrně běžně v mnoha jiných studiích zabývajících se jak včelami, tak i čmeláky (Capaldi et al., 2000; Riley and Smith 2002; Woodgate et al. 2016). Na rozdíl od RFID technologie, radar pro své fungování vyžaduje anténu připevněnou přímo na jedinci, což výzkum poměrně komplikuje. Její velikost a váha jsou pro menší druhy hmyzu natolik nepřekonatelným problémem, že na ně tuto technologii nelze použít. U včel jsou vhodnými kandidáty pro takový výzkum větší samotářské včely, včela medonosná je na anténu příliš malá. Ani pokud zkoumáme větší hmyz, není monitoring bez problémů. Předměty, jako jsou stromy, keře či budovy, které se vyskytnou mezi radarem a anténou, snižují schopnost monitoringu nebo ho dokonce znemožňují úplně.

4.4 Aplikace RFID ve výzkumu včel

Sledování pomocí RFID technologie lze použít v nepřeberném množství studií sociálního hmyzu. Od vos (Sumner et al. 2007) až po mravence (Robinson et al. 2009). V případě včel

můžeme nalézt studie používající RFID pro zkoumání různorodých aspektů včelího života. Je však pravdou, že výzkum se netýká včel samotářských, ale pouze včely medonosné, čmeláků a bezžihadlových včel. Sociální společenstva těchto druhů mohou totiž obsahovat od několika stovek až po tisíce jednotlivců (Michener 1974), což umožňuje vyšší počty vzorků, a navíc lze vycvičit k tomu, aby létali na uměle vytvořená krmítka, což je u samotářského hmyzu často problém. (Raine & Chittka 2008). Konkrétní aspekty zkoumané prostřednictvím RFID technologie primárně souvisí se společenským životem a cirkadiánními rytmy včel, stejně jako s pesticidy a chorobami, u nichž je známo, že ovlivňují sociální včely.

4.4.1 Včela medonosná

Včela medonosná (*Apis mellifera*) je nejvíce studovaným druhem včel. Tento hmyz byl domestikován před více než dvěma tisíci lety a je našim největším producentem medu na světě. Včely medonosné jsou eusociální a vytvářejí trvalé kolonie s tisícovkami jedinců ale pouze jednou matkou (Crane 1984). Právě u těchto včel byla technologie RFID použita v převratné studii k prozkoumání demografických rozdílů mezi evropskými (*A. mellifera*) a asijskými včelami (*A. cerana*). Technologie byla využita zejména k identifikaci rozdílů v jejich letové aktivitě a naváděcí schopnosti (He et al. 2013).

Vzhledem k nedávné naléhavosti identifikace dopadů agrochemikálií na populace opylovačů byly RFID technologie také použity k testování účinků pesticidů na aktivitu při hledání potravy a návratu nazpět do hnízda (Decourtye et al. 2011; Henry et al. 2012; Thompson et al., 2016). Experiment, který krmil značené létavky fipronilem a monitoroval jejich let v tunelu, zjistil, že tento pesticid způsobil snížení množství přenášené potravy na včelu (Decourtye et al. 2011), což značí nevyrovnanost mezi příjmy a výdaji celého společenstva. V jiné studii byly včely označeny a krmeny thiamethoxamem, což je neonikotinoid, a vypuštěny z úlu (Henry et al. 2012). Podíl ošetřených létavek, které se vrátily do kolonie, byl nižší než u kontrolní skupiny a výsledky ukázaly, že thiamethoxam měl na létavky negativní dopad: 10,2 až 31,6 % exponovaných včel se po návštěvě ošetřené plodiny do kolonie nevrátilo vůbec (Henry et al. 2012). Hledání potravy na řepce olejné pěstované ze semen ošetřených thiamethoxamem však nemělo žádný vliv na délku životnosti včely nebo na hledačské chování včel, přestože byl tento pesticid zjištěn na celé rostlině, tedy i v květech a nektaru (Thompson et al. 2016). Problém však nastává v tom, že straší studie z roku 2012 (Henry et al. 2012) došla k opačnému názoru. Metoda RFID monitoringu není účinná pouze pro monitorování a detekci změn v činnosti vyhledávání potravy, ale také pro krátkodobé zaznamenávání a změny po krátkém ošetření pesticidy (Schneider et al. 2012).

Změny ve včelím chování ovšem nejsou způsobeny pouze pesticidy, jak dokazuje studie zabývající se virovým onemocněním deformity křídel (DWV). Monitoringem zde bylo prokázáno, že napadené včely začínají létat dříve ve svém životním cyklu a létají na kratší vzdálenosti. Zároveň mají zvýšenou smrtelnost a tím negativně ovlivňují zdraví celého společenstva (Benaets et al. 2017). Mezi další onemocnění včel patří izraelský virus akutní paralýzy (IAPV), který byl také testován ve vztahu k jeho účinkům na schopnost shánění potravy a orientace (opět pomocí RFID). Studie ukázaly, že létavky infikované IAPV měly zhoršenou orientační schopnosti ve srovnání s neinfikovanými létavkami (Li et al. 2014).

Analýza následně prokázala velké množství virových částic v hlavové části infikovaných létavek a společně se získanými daty z RFID pozorování bylo možné vyvodit, že virus patrně zhoršuje včelí schopnost se učit a snižuje zároveň i jejich schopnost orientace a navigace (Li et al. 2014).

Velice rozšířeným patogenem u včel je *nosema apis*, intracelulární houbový parazit ve včelím střevě, který se zvyšuje nutriční požadavky i úmrtnost včel (Evans a Schwarz 2011). Účinky různých patogenních zátěží lze pozorovat po nakrmení včel spory *nosemy*. Poté byly nakrmené včely označeny čipy a byla pozorována jejich letová aktivita (Dosselli et al., 2016). Infikované včely méně létaly a množství pylu, které na svých cestách sebraly, bylo negativně ovlivněno počtem přítomných spor ve včelím traktu. *Nosema apis* má podobný dopad i v počátečním stadiu infekce a snižuje délku průměrného letu již po čtyřech dnech od infekce (Dosselli et al. 2016).

Ačkoli technologie RFID primárně využívala k ověření účinků pesticidů a virů na letovém chování včel, byla také použita ke studiu elitářství při hledání potravy pomocí analýzy interindividuální variace ve včelím chování při sběru (Tenczar et al. 2014). Ke sledování bylo použito značné množství RFID čipů, což následně ukázalo, že se množství práce mezi jednotlivými včelami značně liší, přičemž někteří jedinci vykazují mnohem větší aktivitu než ostatní (Tenczar et al. 2014). Experiment pokračoval odebráním části létavek. Zbytek včelstva na tuto změnu zareagoval zvýšením aktivity, což naznačuje, že úroveň práce, kterou včela dokáže vykonat, je možné zvyšovat a snižovat v rámci potřeb společenstva (Tenczar et al. 2014).

Analýza chování při hledání potravy za pomoci RFID metod umožnila také výzkum fenoménu známého jako „Colony failure“, tedy selhání kolonie způsobené rapidní ztrátou celé populace (Perry et al. 2015; Chang et al. 2015). RFID monitorování patologicky mladých létavek kolonie ukázalo, že tyto létavky provedly méně výletů a bylo pravděpodobnější, že při prvních letech zemřou (Perry et al. 2015). Na základě těchto informací byl vytvořen demografický model, který vysvětlil, proč častou reakcí na stres kolonie je ztráta dospělé populace v krátkém časovém období (Perry et al. 2015). Tento fenomén může být způsoben rozpadem dělby práce. Mladá včela totiž do úlu přinese méně potravy je obecně méně efektivní. Navíc má větší šanci, že jako nezkušená a slabší včela na své cestě za potravou zemře. Její smrt pak vyvolá větší poptávku po nových létavkách, které se opět rekrutují z mladších včel. Celý proces se v průběhu času stává stále méně efektivním, až nakonec celá kolonie zkolabuje, protože nedokáže naplnit poptávku po jídle. Malé množství zásob proces akceleruje, což vede k masivním úmrtím mladších včel a dramatickému snížení dospělé populace. (Perry et al. 2015).

Jako velice zajímavá studie se ukázala i aplikace látky methopren (analogickou látkou juvenilního hormonu). Ta vedla k podobnému výsledku, tedy k dřívějšímu přechodu do stádia létavky (Chang et al. 2015), což je podobné výsledkům ze skupiny Perry et al. (2015). Chang (2015) ale nezjistili významný účinek na schopnost navigace u krátkých vzdáleností. Výsledkem studie bylo zjištění, že malé množství zásob v kolonii a nemoci v konečném důsledku sniží průměrný věk létavek, které jsou pak kolonii méně užitečné, což následně vede k rychlému populačnímu poklesu (Chang et al. 2015).

A konečně RFID bylo použito také k monitoringu příletů a odletů a doby strávené uvnitř hnízda při výzkumu včelí navigační paměti (Beyaert et al. 2012). Krom RFID byl ve studii

použit i harmonický radar, kamerový záznam a barevné značení. Bylo zjištěno, že včelí spánek je důležitou součástí správné orientace (respektive orientační paměti). Včely, kterým byl spánek odepřen, spaly nakonec delší dobu než včely, kterým bylo umožněno přirozené chování, a zároveň včely, jež byly deprimované, častěji nebyly schopny najít správnou cestu do úlu.

Právě díky velkému rozmachu této technologie ve výzkumu včel vyvstala otázka zdraví a vlivu samotné technologie na hmyz. Studie z roku 2016 ovšem shledala radiové vlny, které vysílá technologie RFID, pro včely jako bezpečné. (Darney et al. 2016)

4.4.2 Čmeláci

Ani čmelákům se technologie RFID nevyhnula, zejména pak studium ekologie chování. Takovým chováním je například taplining, tedy opakované návštěvy živočicha na jednom zdroji potravy (Ohashi et al. 2008, Ohashi & Thomson, 2009). Během studie byly použity světelné diody (LED). Ty byly umístěny u vrcholů umělých květin, aby bylo možno sledovat frekvenci a délku návštěv na každé z květin. Nacházela se zde i RFID čtečka, která rozpoznávala jednotlivé čmeláky. Takto zkombinované technologie pak monitorovaly účinek zkušenosti a konkurence při trapliningu (Ohashi et al. 2008),

Podobné umělé květy a RFID technologie byly využity v roce 2013 při zkoumání schopnosti čmeláků (*Bombus impatiens*) rozlišit různé koncentrace cukru (Nachev et al. 2013). Když byly rozdíly v koncentracích vysoké, čmeláci preferovali ty s větším množstvím cukru, a pokud byly v koncentracích pouze malé rozdíly, čmeláci je ignorovali a létali na květy náhodně. (Nachev et al. 2013).

Efekt nápadnosti květu má také svůj vliv na čmeláci chování, a i ten byl pomocí RFID sledován. V této studii byly ovšem umělé květy opatřeny různými pigmenty nebo těkavými látkami. Zdá se, že nápadnost může hrát klíčovou roli ve vztahu rostliny a jejího opylovače, neboť pozitivně zlepšuje počáteční reakci a podporuje u čmeláků schopnost učení (Katzenberger et al. 2013). Navíc bylo také zjištěno, že květy, které nesou specifické značení vedoucí čmeláky do středu květu, jsou efektivnější než květy se značením na okrajích listů. Čmeláci díky takovým značkám navštěvovali i ty květy, které byly potravně nevýhodné (Orbán & Plowright 2013).

Další důležitou otázkou týkající se ekologie čmeláků je, zda čmeláci (*Bombus terrestris*) realizují svůj životní cyklus během teplých zim v Anglii. Otázka vyvstala v období, kdy byly zimy Anglii teplejší než obvykle (Stelzer et al. 2010). Toto chování bylo potvrzeno pomocí několika metod, včetně RFID. Stejná technologie byla u čmeláků použita i pro zkoumání vnějších environmentálních faktorů. Studie z roku 2010 například dokazuje, že kolonie *B. terrestris* a *B. pascuorum* vykazovaly diurnální ritus dokonce i za stálých světelných podmínek (Stelzer & Chittka, 2010). Studie zkoumající účinek větru na čmeláka (*Bombus impatiens*) a způsob shánění potravy prokázala, že jedinci vystavení proudění vzduchu různých rychlostí a intenzit turbulencí se v těchto podmínkách nebojí létat a jsou schopni v nich vykonávat sběračskou práci (Crall et al. 2016).

Stejně jako tomu je u včel, i čmeláci letová aktivita může být ovlivněna agrochemikáliemi v prostředí. Pomocí technologie RFID bylo prokázáno, že vystavení účinkům pesticidů neonikotinoidů (imidakloprid) a pyrethroidů (l-cyhalothrin) negativně ovlivnilo přirozené

chování *Bombus terrestris* při hledání potravy (Gill et al. 2012) a zvýšil se počet jedinců, kteří se do kolonie nevrátili, což má samozřejmě negativní důsledky pro celou kolonii (Gill et al. 2012).

Následující studie se zaměřila na účinky neonikotinoidů a pyrethroidpesticidů na časovou dynamiku potravy čmeláka kolonie (*Bombus terrestris*) po dobu čtyř týdnů (Gill a Raine 2014) a ukázala, že expozice neonikotinoidům a imidaklopridům měla akutní a chronické účinky, které v průběhu času zhoršovaly výkon při hledání potravy (Gill a Raine 2014). Navíc tyto agrochemikálie také ovlivnily změny v potravní výkonnosti související s věkem jednotlivců. V koloniích, které nebyly vystaveny pesticidům, měli straší jedinci výraznější zastoupení a přinášeli větší množství pylu, zatímco v koloniích ošetřených pesticidy tomu bylo naopak. Korelace mezi věkem jedince a množstvím pylu byla negativní (Gill and Raine 2014).

Účinky jiných neonikotinoidních insekticidů (thiamethoxam a imidacloprid) na hledání potravy a navádění byly také studovány pomocí RFID a výsledky těchto zkoumání jsou podobné těm z předchozích studií pro neonikotinoidy (Gill and Raine 2014). Bylo zjištěno, že látky prodlužují dobu strávenou venku z hnízda na úkor efektivity shánění potravy (Stanley et al. 2016) a kvantitativně sebraného pylu *Bombus terrestris* (Feltham et al. 2014, Stanley et al. 2016). Podobné výsledky týkající se schopnosti navádění však trochu překvapivě nebyly pozorovány u thiamethoxamu, který neměl na zkoumaný hmyz významné účinky (Stanley et al. 2016).

4.4.3 Bezžihadlové včely

Jedná se o eusocilání tropický a subtropický hmyz tvořící trvalé kolonie od stovek až po desetitisíce jedinců (Michener 1974). Výzkumy, které by při jejich výzkumu využívaly RFID čipování, jsou ale vzácné. Za zmínku stojí studie zabývající se vnitrodruhovým parazitismem u včely *Melipona scutellaris*. Ta prokázala, že spárené královny vyhledávají hnízda, jejichž vlastní matka není schopná reprodukce. Tato cizí matka následně převezme vládu nad kolonií. Výzkum prokázal, že takové případy jsou nejen možné, ale dokonce poměrně běžné (Van Oystaeyen et al. 2013). RFID technologie byla také aplikována pro měření letových vzdáleností u druhu *Melipona fasciculata*.

4.5 Včelí letová aktivita a její limitace

Včelí aktivita mimo úl, tedy cesty podnikané většinou staršími včelami (létavkami) za účelem sběru pylu, nektaru či vody, jsou nezbytnou součástí včelího chování (Gould and Gould 1988). Samotná letová aktivita je pak ovlivňována množstvím specifických faktorů, jako je množství dostupné potravy, poptávka potravy v kolonii či věková struktura společenstva (McLellan 1977). Náhlé proměny v tomto chování mohou indikovat problémy či změny v kolonii. Samotná letová aktivita je popisována počtem včel vstupujících či vystupujících z hnízda za určité časové období.

Včely medonosné jsou spolu s dalším hmyzem proslulé svou pozoruhodnou prostorovou orientací, která se opírá o časově kompenzovaný sluneční kompas. Kvůli rotaci Země se relativní poloha slunce mění během dne a včely musí tento posun kompenzovat o čas uplynulý během letu. V několika studiích, kde byly hodiny včel fázově posunuty, bylo prokázáno, že cirkadiánní hodiny jsou pro sluneční kompas nezbytné (Cheeseman et al. 2012). Ve včelím mozku byla nalezena speciální centra řídící tuto schopnost (Zeller et al. 2015). Transmedulární neurony, zodpovědné za kompas, pocházejí z oblasti hřbetního okraje prodloužené míchy blízkost neuronů PDF (Zeller et al. 2015). Tyto neurony mohou komunikovat s centrálním nervovým komplexem, který obecně řídí orientaci a navigaci v hmyzu (např. Pegel et al., 2019).

4.5.1 Vliv cirkadiálních rytmů

Je známo od přelomu minulého století, že včely *A. mellifera* jsou schopné se naučit čas dne, kdy květiny vylučují nektar. Včely létavky se vracejí vícekrát ke zdroji potravy ve stejný čas během několika po sobě jdoucích dní a tato schopnost přetrvává i dny po odstranění zdroje potravy. Tato zdánlivá paměť byla experimentálně testována již v začátku dvacátého století. Ukázalo se, že včely lze vycvičit ke sběru nektaru a pylu prakticky kdykoli během dne. Tyto práce jsou považovány za historický milník poskytující první přesvědčivé důkazy o cirkadiálních rytmech a schopnosti živočichů měřit čas (Moore-Ede et al., 1982). Bylo zjištěno, že včely synchronizují své chování s denními květinovými rytmy tak, aby dorazily ke zdroji potravy v dobu, kdy je množství přítomného nektaru či pylu největší. V mezičase spíše zůstávají v úlu a šetří energii. Tento cirkadiální rytmus má délku s mírnou odchylkou přibližně 24 hodin a je patrně poháněn endokrinním cirkadiálním oscilátorem (Frisch & Aschoff, 1987). Včela má schopnost v kteroukoliv denní i noční dobu rozpoznat, jaký je čas, což naznačuje nepřetržité fungování cirkadiálního oscilátoru, který je schopen okamžité rekognoskace času a funguje tak skutečně jako klasické hodinky.

Pozoruhodný příklad nepřetržitého fungování těchto biologických hodin poskytují tančící včely. Jedná se o létavky, které „tančí“ a snaží se tak přesvědčit ostatní včely, aby letěly na místo, jež daná létavka našla. Takový tanec může provádět i hodiny poté, co se vrátila do úlu, její tanec však přesně udává směr zdroje potravy s ohledem na azimut slunce kdykoli během dne nebo v noci. V souladu s jinými cirkadiánními jevy, je rytmus shánění potravy veden

pomocí světla – tmy. Cykly krom toho mohou být fázově posunuty v závislosti například na roční době. Včelí tance můžeme pozorovat pouze u starších včel létavek. Mladé včely však tento rytmus postrádají a netančí. Spangler (1972) ově vylíhlé včely jsou arytmičné a získají schopnost vnímat cirkadiální rytmy až sociálním kontaktem se staršími jedinci ve včelstvu. Jednoduše řečeno si seřídí své biologické hodiny dle starší a zkušenější včely. Existuje ale i jiná podobně věrohodná hypotéza. Postup od arytmičné k rytmické aktivitě je normální zabudovanou složkou chování, stejně jako dělba práce, měnící se s věkem, když včely projdou v hnízdě řadou zaměstnání, které nakonec asi po třech týdnech vyvrcholí zaměstnáním létavky (Robinson 1992).

Létavka, jejíž biologické hodiny pracují správně shromažďuje pyl, nektar, vodu, pryskyřici nebo kombinaci těchto zdrojů z oblasti o rozloze nejméně 100 km². Chování při hledání potravy je přísně diurnální. Je zcela jasné, že létavky vyžadují funkční a neustále pracující cirkadiální hodiny, aby se mohly orientovat pomocí kompasu, ale také vyjadřovat a interpretovat směrové informace obsažené v tanci na základě úhlového posunutí zdroje vzhledem k neustále se měnícímu azimutu a času.

V případě pravdivosti první hypotézy vyvstává otázka, kdy vlastně dochází k tomuto přerodu. Nutnost rytmičnosti při plnění úkolů v úlu není jasná. Z dlouhodobých pozorování jedné včely dospěl Lindauer (1952) k závěru, že neexistují žádné rozdíly mezi dnem a nocí v péči o potomstvo nebo matku. Free (1992) nenalezl žádnou dílčí rytmiku ani v chování matky nebo včel, které se jí věnují. Crailsheim a jeho spolupracovníci (1996) zkoumali včely kojičky a létavky během poledne a půlnoci a nenašli žádné rozdíly mezi dnem a nocí v chování kojiček. Nalezli ovšem významný vzorec aktivity u létavek. Jejich noční nečinnost byla popsána jako forma spánku. Včely měly snížený svalový tonus, sníženou tělesnou teplotu a vyšší prahové hodnoty behaviorální reakce ve srovnání s denní dobou úrovně (Kaiser 1988, Sauer a Kaiser 1995)

Přelomová a velice precizní studie z přelomu tisíciletí pozorovala několik individuálně označených včel dělnic, které byly sledovány prakticky po celou dobu jejich vývoje (Moore et al. 1998). Jedinci byli podrobně pozorováni každé tři hodiny po dobu 24 hodin ve velké kolonii s úlem vybaveným skleněnými stěnami. Nebyl nalezen absolutně žádný důkaz o rytmičnosti při plnění jakéhokoli behaviorálního úkolu. Všechny úkoly v úlu byly prováděny ve všechny denní a noční hodiny. Dokonce i skladování potravy spojené s jejím sháněním, jako například kontrola pylových buněk, kontrola buněk medu a jeho víčkování, nevykazovalo žádnou rytmiku. Jeden možný způsob, jak pracovat nepřetržitě, je rozdělit rytmické pracovníky do samostatných směn, přičemž každá směna si zachovává svou vlastní rytmiku, ale zároveň je mimo fázi s ostatními směnami. Spíše však než rozdělování se na směny, včelí jedinci individuálně plánovali své pracovní povinnosti zdánlivě nezávisle na ostatních jedincích (Moore et al. 1998).

Protože jednotlivé včely dělnice nevykazují žádnou rytmiku při plnění úkolů v úlu, dalo by se předpokládat, že rytmičnost nastane náhle s nástupem sběračského chování. Experimenty ale naznačují, že ke změně dochází ještě předtím (Moore et al., 1998). Například postupné zvyšování klidové fáze v noci probíhá po celou dobu dospívání včely. Do hry navíc vstupují i genotypové rozdíly. Protože pro včelí matky je typické páření s 6-10 trubci, existuje několik podskupin (genotypů) včelích dělnic v rámci kolonie. Práce z roku 1994 (Giray & Robinson, 1994) pozorovala skupinu genotypů, které se významně lišily počtem dní, nutných pro postup

od mladé včely až po nástup chování létavky. Bylo zjištěno, že genotypově rychlé včely dosáhly významné hodnoty rytmičnost v mladším věku, než tomu bylo u pomalého genotypu. Většina genotypově rychlých včel se stala rytmickými už ve fázi kojiček, zatímco většina včel s pomalým genotypem se stala rytmickými až pozdě ve fázi skladování potravin (Moore et al., 1998).

4.5.2 Časová paměť

Ač bychom mohli nesprávně usoudit, že nejlepší by pro včelu bylo mít paměť výbornou a pamatovat si co možná nejvíce po co možná nejdělsí dobu, opak je pravdou. Časová paměť včel musí být poněkud labilní, protože kolonie neustále získává a opouští různé zdroje nektaru podle jejich ziskovosti (Visscher & Seeley 1982). Rozhodnutí pokračovat či opustit zdroj zjevně není založeno na přímém srovnání mezi množstvím potravy přivedené zpět do kolonie. Namísto toho jednotlivé létavky samostatně hodnotí ziskovost jejich současného zdroje nektaru na základě informací mimo jiné o koncentraci cukru a vzdálenosti od úlu (Seeley et al. 1991). Interní prahové hodnoty pro rozlišení mezi lepšími a chudšími zdroji mohou být upravovány podle nutričního stavu kolonie. Létavka vracející se ze ziskového zdroje nektaru má větší pravděpodobnost na provedení tance, má tedy větší šanci, že se jí podaří přemluvit více včel a její zdroj bude navštěvován častěji. Kolonie se tedy samostatně nerozhoduje, ale vlastní rozhodování o změně místa pro získávání potravy se děje na úrovni jednotlivých létavek, kdy se nezaměstnané včely snaží mezi tančícími družkami najít ten tanec, který odpovídá nejlepšímu zdroji potravy. Jejich chuť použít určitý zdroj může být také posílena tím, že jim tančící družka dá ochutnat to, co na daném místě sehnala (Seeley and Towne 1992).

Obecně se věří, že včelí povědomí o místě výskytu potravy poměrně snadno uhasne, pokud není podpořeno pozitivní zpětnou vazbou, tedy opakovaným vracením se na stejné místo. Pokud se tak neděje, časoprostorová paměť o zdroji potravy rychle přestane existovat a létavky se mohou připojit k řadám nezaměstnaných včel, aby mohly opět přijmout jiný produktivní zdroj potravy. Na druhou stranu, v případě nepříznivého počasí je třeba, aby si včely udržely v paměti místo potravy alespoň na několik dnů, což přispívá v konečném důsledku k dobrému zásobování kolonie potravou, jinak by musely být zdroje po každé delší době nepříznivého počasí znovu objevovány skauty. Hypoteticky se zdá, že existují dva antagonistické selekční tlaky formující časovou paměť včel. Jeden upřednostňuje rychlé zapomínání a druhý podporuje dlouhodobou paměť, která vytrvá v čase. Proces zapomínání patrně není tak rychlý, jak se dříve předpokládalo. Studie (Moore et al. 1989) ukázala, že ačkoliv se počet létavek létajících na starý zdroj potravy v čase zmenšoval každý den po posledním dni od tréninku, někteří jednotlivci místo i nadále navštěvovali po dobu nejméně tří po sobě následujících dnů. Když bylo jídlo v místě opět po čtyřech dnech doplněno, 73 % včel v jednom pokusu a 55 % v jiném znovu přiletělo, včetně jednotlivců, kteří nenavštívili místo během kteréhokoli z předchozích tří testovacích dnů.

4.5.3 Teplotní limitace

Včelí letová aktivita obvykle probíhá v rámci limitací mikroklimatických podmínek. Tedy podmínek, které dovolují let (Stone & Willmer, 1989). Teplotní limitace může ovlivňovat jak úspěšnost sběru potravy, tak také v konečném důsledku i opylovací schopnost hmyzu, neboť je hmyz limitován množstvím dní, které pro svou aktivitu může využít. Přesná identifikace dolní prahové hodnoty pro letovou aktivitu vyžaduje specializovaný výzkum (Stone & Willmer 1989). Je ovšem možné určit alespoň přibližnou polohu spodní teplotní hranice mikroklimatického okna. Ta se dá získat pomocí jednoduchých terénních studií (Corbet et al. 1993).

Jeden ze způsobů, jak zjistit spodní prahovou teplotu pro let, je zaznamenání teploty vzduchu v době odletu první včely z úlu nebo hnízda ráno v den, kdy je teplota dostatečně nízká, aby omezila zahájení shánění potravy. Tato hranice má tu nevýhodu, že může být uměle snížena několika jedinci, kteří mohou létat při teplotách vzduchu pod úroveň, při níž lze létat dlouhodobě (Stone and Willmer, 1989). Pokud se aktivita včel a mikroklima zaznamenávají v intervalech po určitou dobu a podíl množství včel, které se ukáží venku, koreluje s mikroklimatem, k modelování lze použít regresní analýzu a identifikovat tak nižší prahovou teplotu pro sběračskou činnost. Je však nutná opatrná interpretace, pokud je hledání potravy omezeno jinými faktory, které samy souvisejí s mikroklimatickými změnami. Nutno také zmínit, že teplotní limitace pro sběr potravy nemusí korelovat s limitacemi pro ostatní aktivity (přílety, vyprazdňování atd.) a proto ji není možné určit přesně. Za zmínku stojí zajímavý fakt, že schopnost čelit těmto podmínkám nezávisí na velikosti včely. Mnohé menších druhů včel vykazují lepší schopnost snášet nepříznivě chladné podmínky, než jejich větší příbuzní (Stone & Willmer 1989)

Dostáváme se na opačný konec teplotního spektra. Zvýšení teploty nutí včely k rapidnějšímu chlazení a v konečném důsledku větší spotřebě vody. To se projeví ve větší letové aktivitě, jejímž účelem je však pouze donáška vody (Kühnholz & Seeley 1997, VolletNeto et al. 2015).

5 Metodika

5.1 Metodika správného čipování

Důležitým faktorem pro zdařilý průběh experimentu je metodika čipování. V průběhu testovací fáze bylo vyzkoušeno mnoho různých přístupů k tomuto problému, ze kterých byla vybrána metodika kombinující nejjednodušší manipulaci s dostatečným množstvím včel schopných projevit přirozené chování i po aplikaci.

Výběr jedinců je jednou z klíčových částí experimentů. Je tu třeba podotknout, že každá včela, pokud v průběhu svého života nezemře, se ve svém životě (přibližně za tři týdny) stane létavkou. Ideální možností je tedy odchyťvat jedince přímo v hnízdě. Tato metoda však má svá úskalí. Pojivo fixující čipy na tělech jedinců musí být kvalitní, protože očipovaná včela v závislosti na svém věku může setrvat uvnitř hnízda ještě mnoho dní a tím zvyšovat pravděpodobnost, že se čip odpoutá od těla ještě dříve, než se včela stane létavkou. Dalším problémem je nutnost rozebírat včelí dílo, nebo alespoň každých několik dní nahlédnout dovnitř a jedince odchyťvat. Nejenže takto časté narušování včelstva není příliš vhodné, ale navíc u více agresivních kolonií takový postup není komfortní ani pro samotného pracovníka. Další metodou je odběr přímo z česna úlu, tato metoda je rychlá a poměrně neinvazivní. Problémem ovšem může být umělá selekce, kdy v případě čipování v určitou denní dobu, můžeme očipovat včely, které jsou právě v tuto dobu neaktivnější, a jiné, létající dříve nebo později večer, tak můžeme z experimentu nevědomky vyřadit. Proto je vhodné v případě tohoto postupu včely odchyťvat náhodně v různou denní dobu.

Jedince je před samotnou aplikací čipu třeba uspat nebo dostatečně zpomalit, aby se při čipování nebránil a nezpůsobil si tak újmu na zdraví. Čipovat včely bez anestezie je sice pro zkušeného včelaře možné, ale nastává zde riziko, že si včela čip sundá a látka použitá jako lepidlo následně potřísní její křídla nebo hlavu a oči. V obou případech se z jedince stane včela neschopná letu. Pro samotnou anestezii lze využít oxid uhličitý, který při krátké aplikaci včelám nečiní problém. Ovšem zmiňme také, že ne všechny druhy hmyzu na oxid uhličitý reagují stejně. Z dalších pokusů bylo například zjištěno, že čmeláci reagují na vysoké koncentrace CO_2 podstatně hůře než včely.

Další možností usnutí je zchlazení. Zchlazení nesmí být rapidní a nesmí trvat déle než několik minut. Při opatrném postupu a monitoringu včelí aktivity během zchlazování je možné docílit stejného výsledku jako u CO_2 bez rizika udušení.

Látka fungující jako pojivo pro fixaci čipu musí být dostatečně odolná přírodním podmínkám a zároveň mírně pružná, aby nedošlo k jejímu odloupení během pohybu chitinu na včelím toraxu. Při experimentech bylo využito lepidlo na bázi šelaku (Lepidlo na značky na včelí matky, výrobce: Výzkumný ústav včelařský, s. r. o.). Původní experimenty používající namísto lepidla barvu na označování včelích matek byly vyhodnoceny jako méně úspěšné, neboť často docházelo ke ztrátám čipu krátce po jeho aplikaci. Aplikování kapky lepidla je nejlepší provádět drobným předmětem – hlavička od špendlíku, naostřené dřevěné párátko, v případě polních podmínek i úzké stéblo trávy. Terénní pracovník při aplikaci musí mít na

paměti expanzi pojiva do stran. Za žádných okolností se nesmí lepidlo dostat do kontaktu s křídly nebo hlavou hmyzu.

Čip musí být uložen vždy na horní straně toraxu jedince, tak aby se nedotýkal křídel, zadní části hlavy ani začátku abdomenu. Čtvercový čip je ukládán vždy v šikmé poloze k tělu. I když takové uložení čipu činí distanční vzdálenost čipu od křídel ještě menší, v případě správného usazení tento postup zajišťuje jedinci větší volnost. Je třeba dbát zvýšené opatrnosti při jeho přitlačení na tělo jedince. Větší síla rozprostře pojivo do tenčí vrstvy, která má menší pevnost a zároveň se může přebytečné pojivo dostat k důležitým částem těla a zhoršit tak včelí fitness. Nedostatečná síla naopak způsobuje špatné přilnutí čipů na tělo, kdy pojivo efektivně drží jen malou část čipu a ten má tendenci odpadávat při kontaktu s jinými povrchy, například když se včela otře o stěnu úlu nebo prochází škvírou ve dřevě.

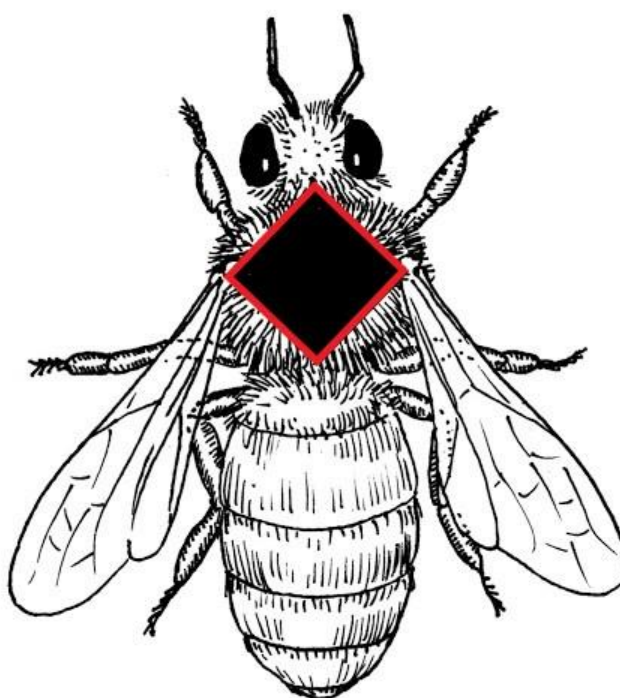


Foto 5.: Nákres správného umístění včely na trup včely. Autor: Vojtěch Purnoch / Chloe Ruby

Po aplikaci je třeba nechat očipovaného jedince odpočinout. To zaručí zotavení se z narkózy a zatuhnutí pojiva. Včela by neměla být v žádné fázi vystavena přímému světlu nebo příliš horkému prostředí. Zvláště v letních měsících nastává nebezpečí, že bezbranné a omámené jedince velice rychle zabijeme tím, že je přehřejeme. Po probuzení by měli jedinci dostat možnost napít se silného roztoku cukru a vody, nejlépe však medu. To přispívá nejen k jejich rychlejšímu zotavení, ale zároveň k lepšímu přijetí jedince zpět do kolonie. Látky používané v pojivu totiž těkají z pod čipu i po zatuhnutí pojiva a včelí strážkyně takto nestandardně vonící včelu často považují za cizí. Včela přinášející ve svých útrobach med je však daleko častěji strážkyněmi přijata, i když se její pach od ostatních liší.

5.2 Příprava

5.3 Příprava pokusů monitoru včelí aktivity pomocí RFID technologie v terénních a laboratorních podmínkách

Základem pokusu bylo několik včelích společenstev, nasazených do nástavkového úlu s rámkovou mírou 39/24 cm a speciálního boxu vyrobeného pro účely pokusů v proletové místnosti. Vchod do úlu a boxů byl upraven pomocí speciálního zařízení pro instalaci dvou RFID UHF snímačů. Zařízení schopné pokrýt prostor česna u úlu obsahovalo úzkou štěrbinu fungující jako chodba v níž se včely pohybovaly. Na začátku a konci chodby byly připojeny snímače s označením 1 pro snímač blíže venkovnímu prostředí a 2 pro snímač blíže vnitřním prostorům hnízda. Procházející očipovaná včela tak vždy prošla nejdříve pod jedním a následně druhým snímačem, pořadí, ve kterém se pak snímače na časové ose objevovaly, determinovalo, zda včela vchází dovnitř, či vychází ven. Samotné snímače byly připojeny k přenosnému počítači a ovládány pomocí programů Echainconnect (program dodaný samotným poskytovatelem RFID technologie). Výsledná data obou snímačů byla následně zkombinována.

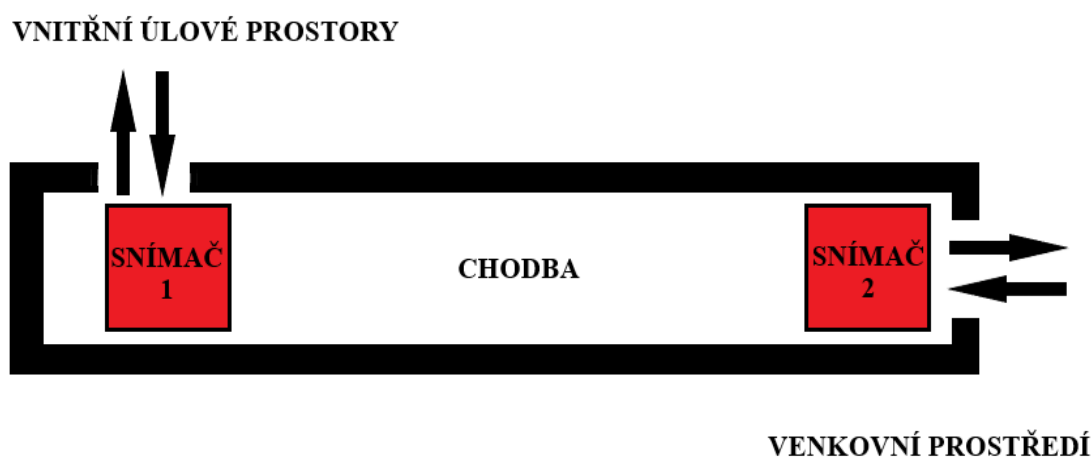


Foto 6.: Náčrt chodby se snímači pro monitoring včel. Autor: Vojtěch Purnoch

5.4 Pokus 1

Pokus měl za cíl určit maximální doletovou vzdálenost včel za průměrného dne a frekvenci včelích letů a aktivity, aby tak byla prohloubena znalost o efektivní letové vzdálenosti včel, která tak v budoucnu pomůže k lepší ochraně hmyzích společenstev.

5.4.1 Příprava

Na pokus bylo třeba jedno včelstvo, přenosný počítač, dva UHF RFID snímače, speciálně vytvořené zařízení pro upevnění snímačů s koridorem pro včely, 110 čipů, stejný počet odchycených včel.

5.4.2 Postup

Na jeden nástavek obsazený včelstvem bylo nainstalováno zařízení obsahující dva RFID snímače a jeden přenosný počítač. Česno bylo upraveno tak aby bylo znemožněno včelám opouštět úl jinou cestou než pomocí štěrbiny se snímači.

Po navyknutí včelstva na zúžený prostor bylo každý týden ve včelstvu odchyceno a načepováno několik včel. Pokusný vzorek vždy obsahoval deset včel (aby se tak s co největší mírou kompenzovali možné ztráty).

RFID čipy byly aplikovány na torax včel tak, aby nedošlo k možnému poškození včely nebo znemožnění letu. Čipy byly aplikovány pomocí šelakového lepidla na značení včelích matek.

5.4.3 Výsledky

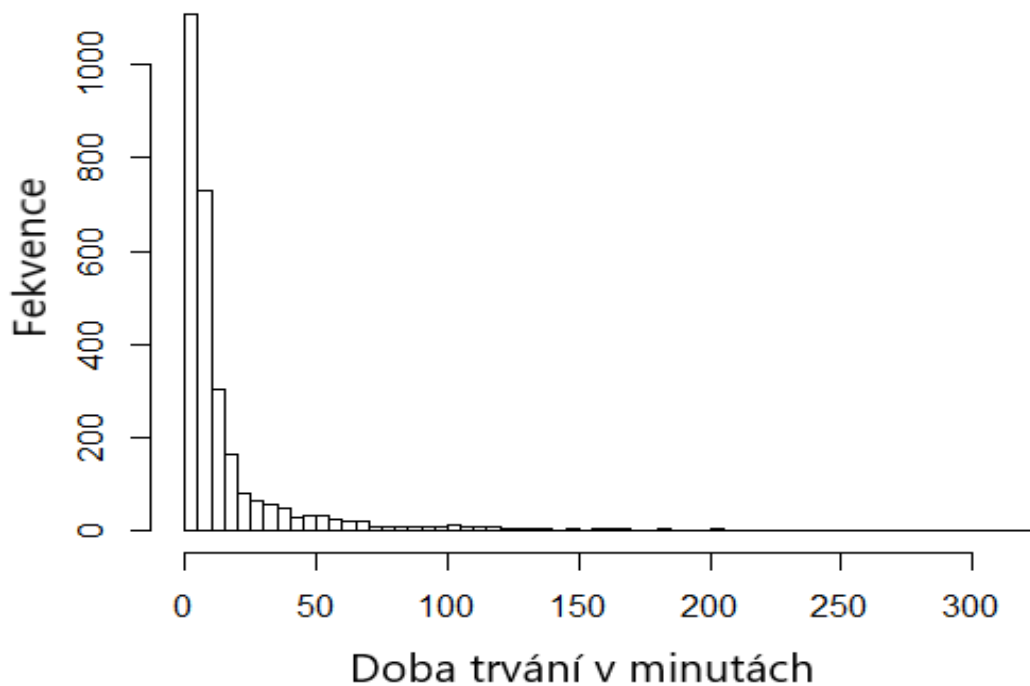


Graf 1.: Záznam délek letů v sumárním dni.

Kombinovaný přehled letů včel ukazuje vrchol aktivity během dvanácté hodiny s maximální délkou letu 321 minut. Odhadovaná průměrná rychlost letu se pohybuje kolem 10–12 km/h. Což by pro létavku znamenalo s ohledem na cestu na místo a zpět do úlu vzdálenost

až 32 km. Mluvíme tu však o extrémním případě. Vzhledem k tomu, že lety nad 150 minut zaujmají pouze zanedbatelná 2 % letů, můžeme o nich hovořit jako o výjimkách. Je však dobré zmínit, že v rámci rozmezí trvání letu 50 až 321 minut se pohybuje pouhých 8 včel z celkových 78. Nelze však tvrdit, že by dlouhé lety byly pouze jejich výhradním posláním, neboť i jiní očipovaní jedinci za dobu monitoringu menší počet delších letů vykonaly. A naopak i včely s vyšší mírou dlouhých letů vykonávaly lety kratší.

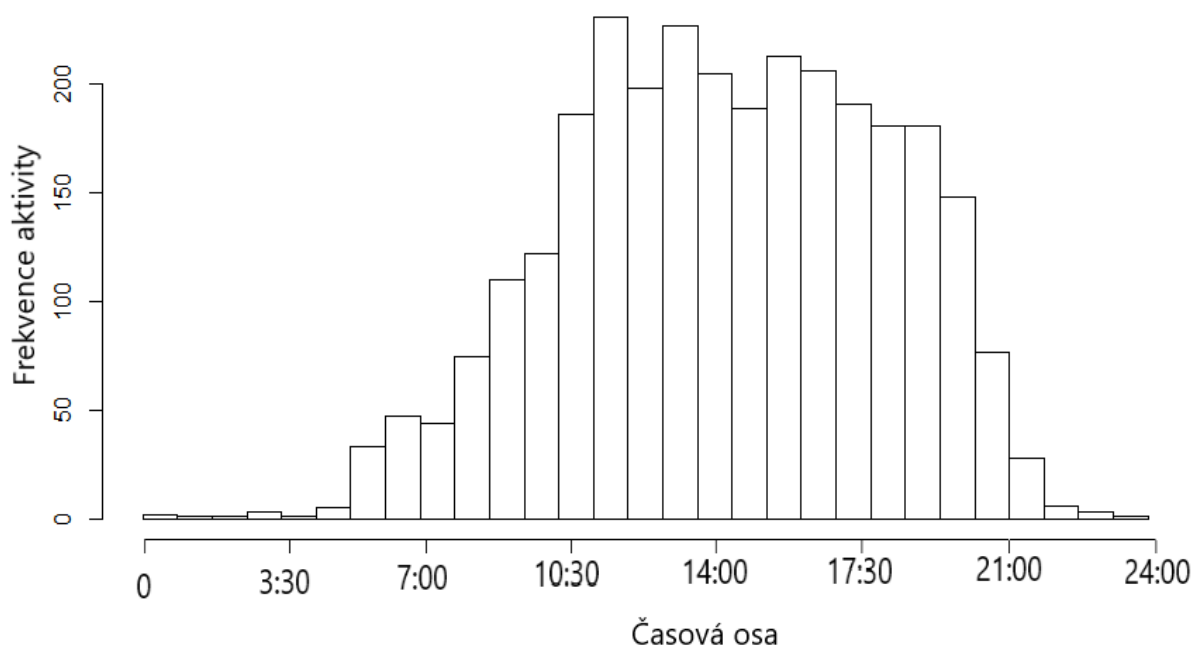
Celkové množství letů



Graf 2.: Záznam celkového množství letů během sumárního dne v závislosti na letové délce

Faktorem poukazujícím spíše na kratší letové vzdálenosti je fakt, že 84,11 % letů, které očipované včely vykonaly, nepřekročilo hranici třiceti minut. Když uvážíme nutný návrat do kolonie, běžná cesta za potravou není delší než 3 km tam a 3 km zpátky. Hranici 50 minut, tedy doby, která byla pro účely experimentu stanovena jako doba dlouhého letu, pak překračuje už jen pouhých 6,2 % letů. To v konečném důsledku znamená, že běžná včela sběračka se za svůj život nedostane od svého hnízda dál, než je vzdálenost 5 km, a i tyto případy budou pro takové jedince značně ojedinělé. Je jasně vidět, že včelstvo preferuje co nejkratší lety za potravou, což odpovídá dosavadním znalostem chování včely medonosné.

Histogram aktivity během sumárního dne

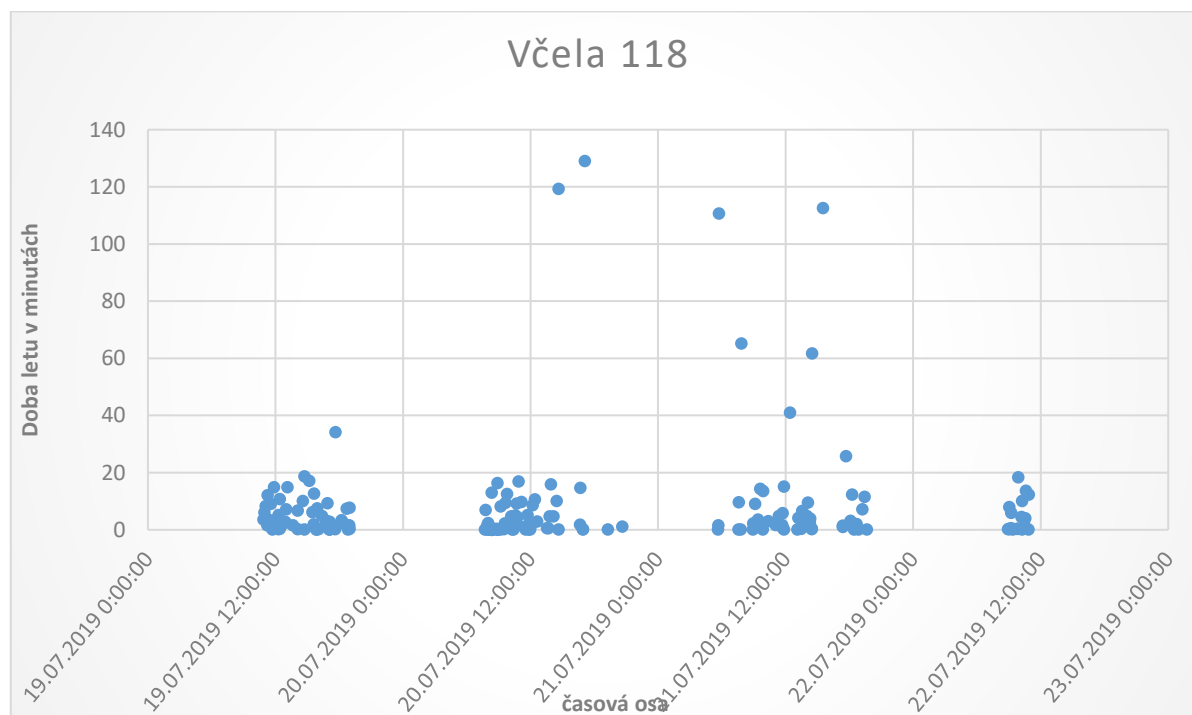


Graf 3.: Celková aktivita během sumárního dne.

Jako další zajímavý detail vystupuje rozdíl mezi včelí aktivitou a letovou frekvencí. Zatímco reálná letová aktivita začala až s rozbřeskem kolem sedmé hodiny ranní, samotná aktivita u vstupu do úlu začala už přibližně o hodinu a půl dříve. Čtečka však v tuto dobu zaznamenávala pouze informace o délce mezi deseti a třiceti sekundami. To naznačuje ruch u vchodu do úlu, nikoliv však reálný let za potravou.

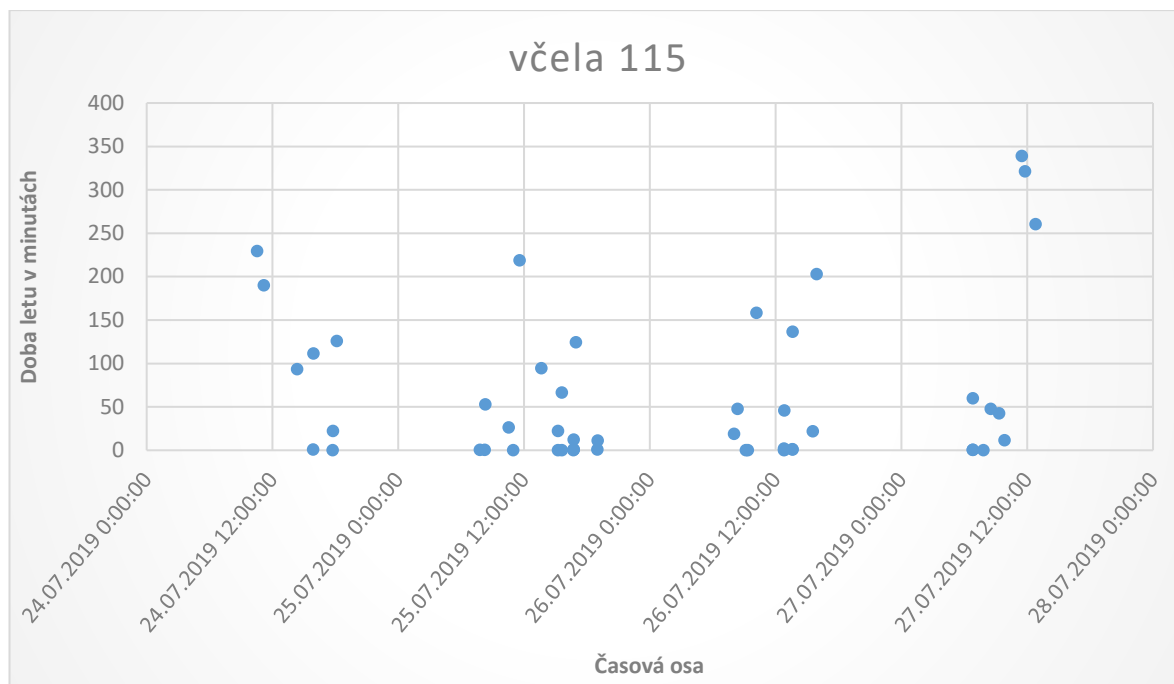
5.4.4 Včelí individualita

Dalším faktorem je včelí individualita, tedy rozdíl v množství práce i délce letů mezi jednotlivými včelami. Jako příklad jsou zde uvedeny čtyři individuální záznamy očipovaných létavek.



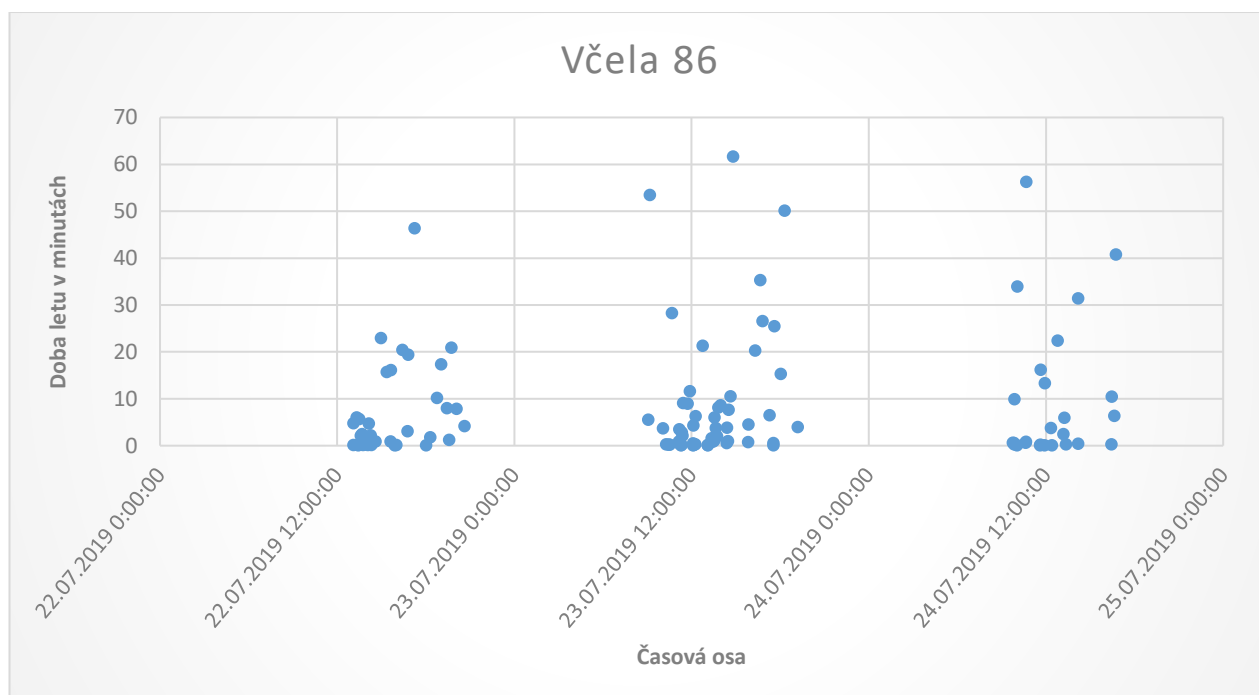
Graf 4: Záznamy letů očipované včely 118.

Včela s krátkými lety a vysokou frekvencí. Včela 118 podnikla za dobu pozorování 195 letů, a i když se v jejím záznamu objevilo několik dlouhých cest (jeden případ dokonce přesahoval délku 128 minut), její průměrná doba letu byla pouhých 430 sekund (7,16 minuty). Cesty přesahující délku dvaceti minut představují pouze 0,5 % všech letů včely 118.



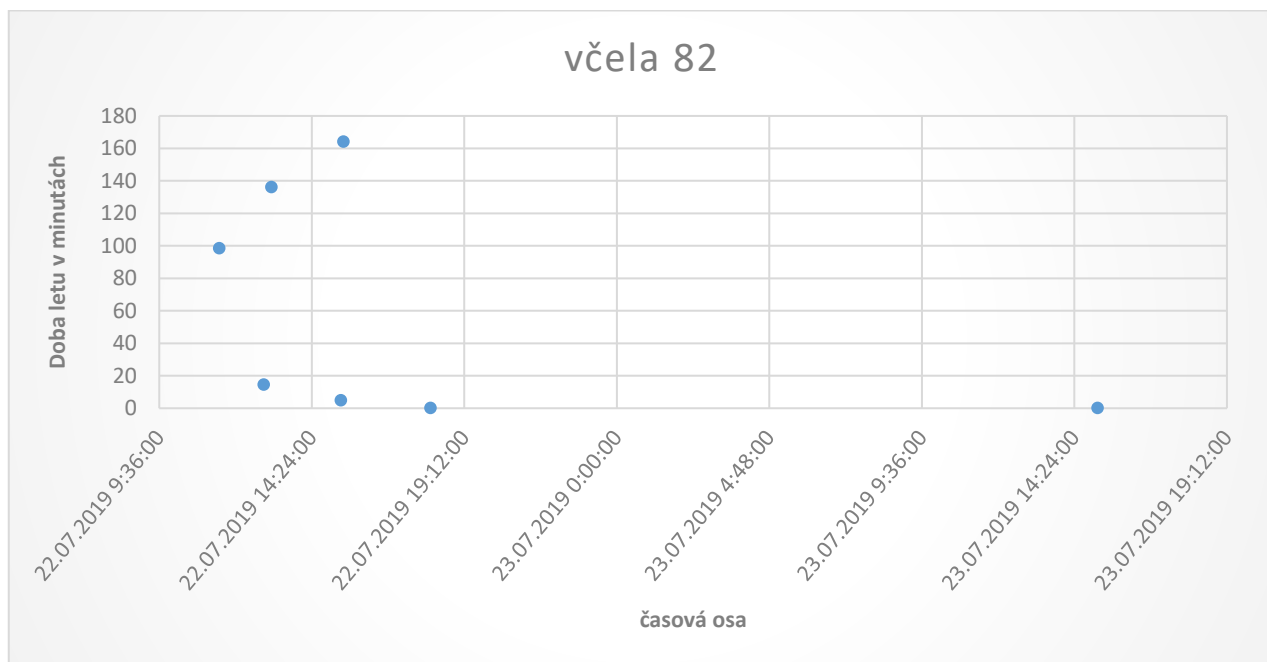
Graf 5: Záznamy letů očiřované včely 115.

Včely s dlouhými lety a nízkou frekvencí. Včela 115 za dobu sledování nalétala pouze 50 letů, je s největší pravděpodobností skautem. Jejím úkolem je mapovat okolí a přinášet o něm zprávy. Její průměrný let tak trval více než hodinu (62,35 minuty) a její maximální délka letu byla 321 minut.



Graf 6.: Záznamy letů očiřované včely 86.

Včely s velmi krátkými lety. Včela 86 se soustředila na krátké lety. Její maximální délka letu tak byla pouze 61 minut. Její průměrná doba letu byla 499,3 sekundy (8,32 minuty). Za tak krátkou dobu by se nedokázala od hnízda vzdálit více než na 850 metrů.



Graf 7.: Záznamy letů očipované včely 82.

Včely s velice nízkou frekvencí. Představitelkou včel, které mají jen minimální množství záznamů, je zde včela s číslem 82. Interpretovat existenci této skupiny včel je poměrně těžké. Teorií, se kterou bylo v průběhu experimentu pracováno, je, že byla včela poškozena při manipulaci. Záznamy ukazují jejich sporadický výskyt. Včela byla natolik silná, aby vykonala několik letů, a je zřejmé, že včela nezemřela a čip má stále na sobě. Tento typ včely je poměrně sporný, může také jít o jedince poškozeného manipulací při instalaci čipu, ovšem fakt, že byla včela 82 v jednom případě venku 164 minut a stále se dokázala vrátit a pokračovat v práci (neboť jí můžeme znovu vidět na záznamu), značí její životaschopnost. S pouhými sedmi lety za celou dobu jejího pozorování je však jednou z nejméně aktivních včel zaznamenaných v experimentu.

5.5 Pokus 2

5.5.1 Příprava

Na pokus bylo třeba jedno včelstvo, přenosný počítač, dva UHF RFID snímače, speciálně vytvořené zařízení pro upevnění snímačů s koridorem pro včely, proletován místnost.

5.5.2 Postup

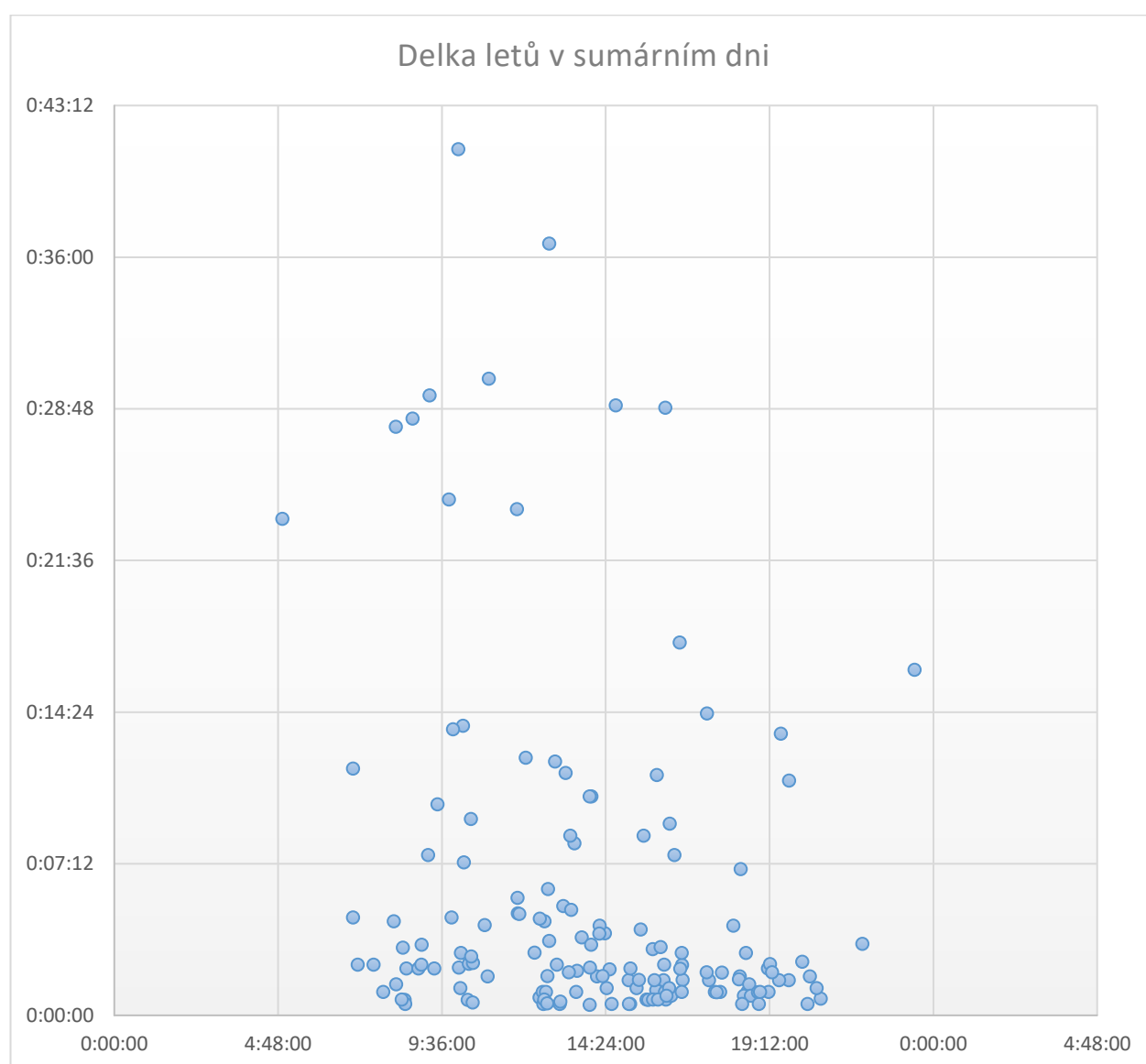
Na jeden nástavek obsazený včelstvem bylo naistalováno zařízení obsahující dva RFID snímače a jeden přenosný počítač. Česno bylo upraveno tak, aby bylo znemožněno včelám opouštět úl jinou cestou než pomocí štěrbinu se snímači.

Po navyknutí včelstva na zúžený prostor bylo každý týden ve včelstvu odchyceno a očipováno několik včel. Pokusný vzorek vždy obsahoval deset jedinců (aby se co nejvíce kompenzovaly možné ztráty).

RFID čipy byly aplikovány na torax včel tak, aby nedošlo k možnému poškození jedince nebo znemožnění letu. Čipy byly aplikovány pomocí šelakového lepidla na značení včelích matek.

Při aplikaci bylo třeba opatrnosti (stejně jako u experimentu 1), neboť pokud je čip nalepen nesouměrně nebo je naneseo větší či příliš malé množství šelakového lepidla, dochází ke ztrátě čipu nebo úmrtí včely.

5.5.3 Výsledky

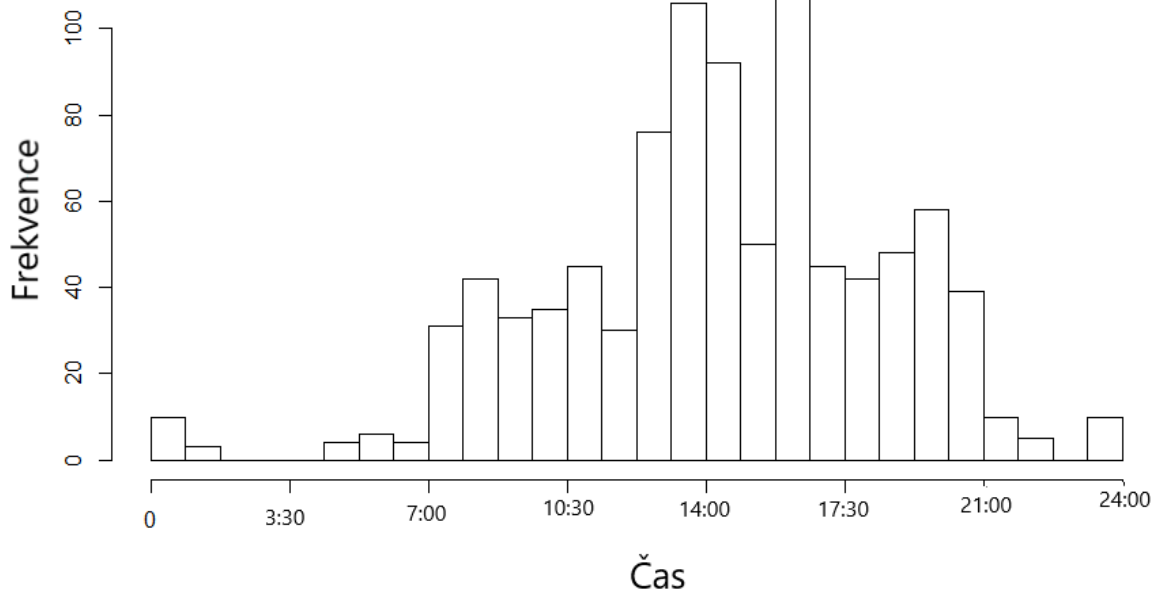


Graf 8.: Záznam délek letů v sumárním dni.

Ani při laboratorním pokusu nepřesáhla délka pobytu včely venku v 98,3 % případů dobu 30 minut. Letová aktivita však začíná, téměř stejně jako u prvního pokusu, i když včely

neměly žádný přístup k přírodnímu světlu. Je třeba zmínit, že i zde byla zaznamenána včelí individualita a rozdíly ve vzoru letové aktivity jednotlivých včel. Pík letové aktivity je posunut blíže odpoledním hodinám tento fenomén může mít souvislost s dobou krmení pomocí pylových zrn.

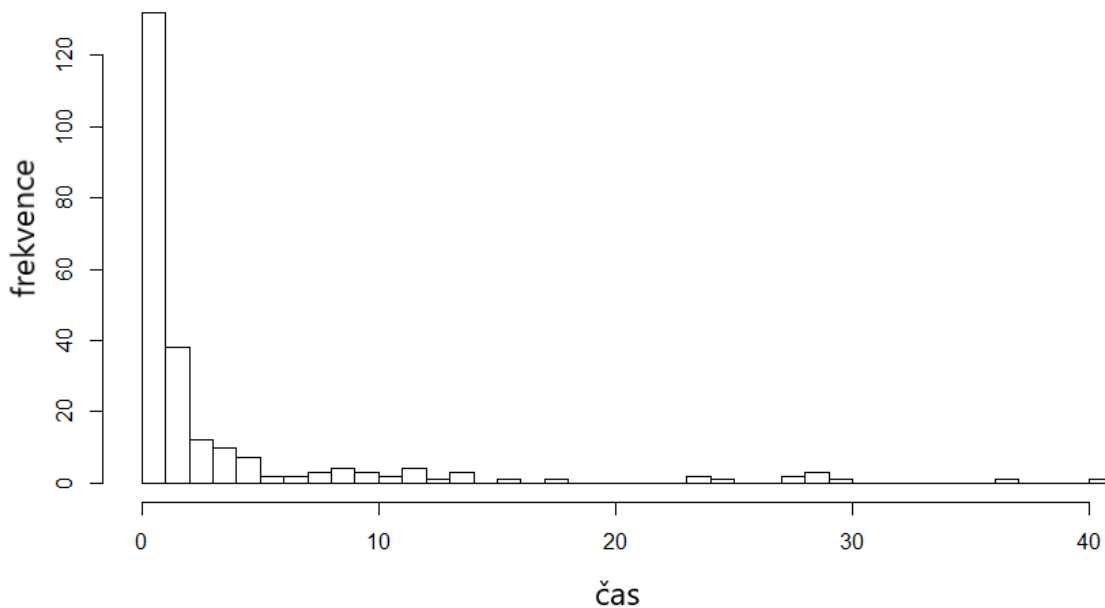
Množství letů v průběhu dne



Graf 9.: Záznam celkové aktivity během sumárního dne.

Zajímavým faktem o včelí aktivitě v laboratorních podmínkách je záznam zvýšené aktivity v průběhu noci. Aktivita začíná během čtyřiaadvacáté hodiny a utichá kolem druhé hodiny ranní. Zde, jako u prvního experimentu, nemůžeme hovořit o letové aktivitě. Záznamy ukazují intervaly kratší než 30 sekund. Pro tento fenomén nemám vysvětlení v danou chvíli se nikdo v proletové místnosti nenacházel, neprobíhalo žádné krmení a je jen velmi nepravděpodobné že by něco právě v tuto dobu včelstvo systematicky rušilo.

Celkové množství letů



Graf 10.: Záznam celkového množství letů během sumárního dne v závislosti na letové délce.

Stejně jako tomu bylo v terénním pokusu, i zde mají majoritní zastoupení kratší lety. Čas pohybuující se kolem dvou minut je tu v poměru k ostatním dokonce 1,8krát častější, než tomu bylo u terénního pokusu. Důvodem patrně je, že se krmítko s potravou nacházelo pouhé dva metry od úlu. Můžeme však pozorovat i lety na delší vzdálenosti (tedy lety trvající po delší dobu). I tak je ovšem délka průměrného letu pouhých 3,6 minuty.

6 Celkové Výsledky

Kombinovaný přehled letů včel ukazuje vrchol aktivity během dvanácté hodiny v terénu. V experimentálním pokusu byla aktivita posunuta blíže k odpoledním až večerním hodinám, což není překvapivé zjištění a výsledky se shodují pozorováním i v jiných studiích (Seeley et al. 1991). Maximální zaznamenaná délka letu (321 minut) je naprostou výjimkou. Zbývá pozorování, pohybuující se většinou maximálně kolem hranice 30 minut, tomu nasvědčují. Velice krátké lety do 10 minut jsou zastoupeny v 62,1 %. Včely v terénu tedy nepřekvapivě preferují zdroj potravy v jejich blízkosti před zdrojem vzdálenějším. Uvážíme-li průměrnou rychlost 10 km/h, rádius, který je včela za 10 minut schopná obsáhnout, je přibližně 1,6 km a v případě 30minutové hranice pak 4,8 km. Velikost areálu je však značně variabilní a z jednotlivých záznamů je patrná rozdílnost jedinců v kolonii. Některé včely létají vyloženě na kratší lety, zatímco jiné jsou průzkumnice. Tento fakt platí jak v terénu, tak v laboratorních podmínkách. Ačkoliv původní předpoklady indikovaly vliv velikosti a hmotnosti čipů na aktivitu včel, samotné pokusy ukazují, že očipovaní jedinci jsou schopni proceduru čipování nejen přežít, ale i se opět zapojit do včelí kolonie. O specifickém vlivu by bylo třeba dále spekulovat.

7 Diskuze

V experimentech se podařilo prokázat schopnost včel snášet podmínky experimentů, tedy velikost a hmotnost čipů, zúženou možnost pro vlet do úlu a přítomnost zařízení emitujícího radiové vlny, což byl jeden z hlavních úkolů této práce. Cenová dostupnost a relativní nenáročnost na obsluhu dělá z UHF RFID čipů velmi vhodnou alternativu k ostatním variantám pozorování.

Samotná aktivita včel vykazuje velice zajímavé závěry, zejména aktivita včel v pozdních večerních a brzkých ranních hodinách u vchodu do úlu. Fenomén byl nejvíce zřetelný v experimentálních podmínkách. Bylo by možné takovou aktivitu považovat za anomálii ovšem ze zatím nepublikovaných pozorování dalších stanovišť pomocí stejné technologie byla zjištěna existence včel orientovaných specificky na tuto noční aktivitu. V mém pozorování takto specificky orientované včely nebyly zaznamenány, což mohlo být způsobeno odběrem včel u vchodu do hnízda pouze v ranních a odpoledních hodinách. Tento výběr mohl favorizovat včely s denní aktivitou. I když je výskyt těchto „večerních“ jedinců spíše sporadický, je třeba ho zmínit a upozornit na nedostatek informací o tomto neočekávaném chování.

Letová aktivita opylovačů se poměrně shoduje s již dříve publikovanými experimenty. Uvážíme-li rychlost 10 až 12 km/h, z pozorování získáváme poměrně střídavá data. Je třeba podotknout, že včely nelétají v přímkách a stejně tak je nutno uvážit přibližně 60 sekund, které potřebují pro samotný sběr a následně podobné množství času na vyložení nákladu v úlu.

Důležitým zjištěním je existence individuality u jednotlivých včel. Ze záznamů je jasné vidět fakt, že včely létají na rozdílné vzdálenosti. Pro tvrzení, že včely létavky v sobě obsahují další distingované kasty, však není dostatečně evidentní jejich rozdělení. I včely schopné delších letů stále provozují lety drobnějšího charakteru. Mezi včelami s kratšími lety a delšími lety nelze s přesností určit bod zlomu, tedy množství dalekých či krátkých letů, po nichž bychom mohli říct, do jaké skupiny včela patří, není dostačující. Existují totiž také včely se středními vzdálenostmi letu a také s větším či menším množstvím letů. Přesto však na exemplárních případech jasné vidíme trend, kterým se včely určitého charakteru ubírají.

Speciální skupinou včel byly včely s dramaticky malou aktivitou. Tato skupina může být dle mého názoru skupinou jedinců poškozených během experimentů, ať již kvůli špatnému zacházení v průběhu aplikace čipu nebo nevhodné reakci na oxid uhličitý aplikovaný během narkózy. Druhou možností je jejich skutečná existence ve včelí kolonii jakožto létavek s výrazně sníženou aktivitou. Přítomnost včel s takto malou aktivitou by pro včelstvo samozřejmě znamenala velkou zátěž, ta by však mohla být kompenzována jinými úkoly v kolonii. Takovéto tvrzení však není ničím jiným než hypotézou a pro hlubší porozumění tomuto fenoménu je třeba další výzkum.

8 Závěr

Experimenty v této práci poodhalily nové a zajímavé informace týkající se aktivity létavek, z nichž hned několik se zdá být vhodnými kandidáty pro další výzkum, ať je to včelí individualita letové aktivity či zdánlivě nesmyslná aktivita během noci.

Práce si dále jako jeden z cílů stanovila zjistit, zdali je vůbec možné kombinovat včely a tento typ RFID pozorování. Výsledky ukazují, že tato metodika je pro práci použitelná, nikoliv však stoprocentně účinná a specifický vliv velikosti a hmotnosti čipu by měl být cílem dalšího výzkumu.

9 Literatura

BENAETS, Kristof, et al. Covert deformed wing virus infections have long-term deleterious effects on honeybee foraging and survival. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2017, 284.1848: 20162149.

BEYAERT, Lisa; GREGGERS, Uwe; MENZEL, Randolph. Honeybees consolidate navigation memory during sleep. *Journal of Experimental Biology*, 2012, 215.22: 3981-3988.

BIESMEIJER, J. C.; TÓTH, E. Individual foraging, activity level and longevity in the stingless bee *Melipona beecheii* in Costa Rica (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Insectes Sociaux*, 1998, 45.4: 427-443.

BUER, Charles S.; MUDAY, Gloria K.; DJORDJEVIC, Michael A. Flavonoids are differentially taken up and transported long distances in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 2007, 145.2: 478-490.

BUCHMANN, Stephen L.; NABHAN, Gary Paul. The pollination crisis: the plight of the honey bee and the decline of other pollinators imperils future harvests. *The Sciences*, 1996, 36.4: 22-28.

CAPALDI, Elizabeth A., et al. Ontogeny of orientation flight in the honeybee revealed by harmonic radar. *Nature*, 2000, 403.6769: 537-540.

CARTWRIGHT, B. A.; COLLETT, T. S. How honey bees use landmarks to guide their return to a food source. *Nature*, 1982, 295.5850: 560-564.

CORBET, Sarah A., et al. Temperature and the pollinating activity of social bees. *Ecological entomology*, 1993, 18.1: 17-30.

CRALL, James D., et al. Social buffering of pesticides in bumblebees: agent-based modeling of the effects of colony size and neonicotinoid exposure on behavior within nests. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2019, 7: 51.

CRANE, Eva, et al. Directory of important world honey sources. International Bee Research Association, 1984.

DANIEL KISSLING, W.; PATTEMORE, David E.; HAGEN, Melanie. Challenges and prospects in the telemetry of insects. *Biological Reviews*, 2014, 89.3: 511-530.

DARNEY, Keyvin, et al. Effect of high-frequency radiations on survival of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, 2016, 47.5: 703-710.

DE SOUZA, Paulo, et al. Low-cost electronic tagging system for bee monitoring. *Sensors*, 2018, 18.7: 2124.

DECOURTYE, Axel, et al. Honeybee tracking with microchips: a new methodology to measure the effects of pesticides. *Ecotoxicology*, 2011, 20.2: 429-437.

DOSSELLI, Ryan, et al. Flight behaviour of honey bee (*Apis mellifera*) workers is altered by initial infections of the fungal parasite *Nosema apis*. *Scientific reports*, 2016, 6.1: 1-11.

DUSSAUBAT, Claudia, et al. Flight behavior and pheromone changes associated to *Nosema ceranae* infection of honey bee workers (*Apis mellifera*) in field conditions. *Journal of invertebrate pathology*, 2013, 113.1: 42-51.

EVANS, Jay D.; SCHWARZ, Ryan S. Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee health. *Trends in microbiology*, 2011, 19.12: 614-620.

FELTHAM, Hannah; PARK, Kirsty; GOULSON, Dave. Field realistic doses of pesticide imidacloprid reduce bumblebee pollen foraging efficiency. *Ecotoxicology*, 2014, 23.3: 317-323.

FILIPPI, Antonio; PETRUSSA, Elisa; BRAIDOT, Enrico. Flavonoid facilitated/passive transport: Characterization of quercetin microsomal uptake by a DPBA-dependent assay. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2016, 1857: e64.

FRANGNE, Nathalie, et al. Flavone glucoside uptake into barley mesophyll and *Arabidopsis* cell culture vacuoles. Energization occurs by H⁺-antiport and ATP-binding cassette-type mechanisms. *Plant Physiology*, 2002, 128.2: 726-733.

FRISCH, Karl von, et al. Dance language and orientation of bees. 1967.

GILL, Richard J.; RAINE, Nigel E. Chronic impairment of bumblebee natural foraging behaviour induced by sublethal pesticide exposure. *Functional Ecology*, 2014, 28.6: 1459-1471.

GILL, Richard J.; RAMOS-RODRIGUEZ, Oscar; RAINE, Nigel E. Combined pesticide exposure severely affects individual-and colony-level traits in bees. *Nature*, 2012, 491.7422: 105-108.

GOULD, James L., et al. The honey bee. *Scientific American Library*, 1988.

GRAYSTOCK, Peter; GOULSON, Dave; HUGHES, William OH. Parasites in bloom: flowers aid dispersal and transmission of pollinator parasites within and between bee species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2015, 282.1813: 20151371.

- HALLMANN, Caspar A., et al. More than 75 percent decline over 27 years in total flying insect biomass in protected areas. *PloS one*, 2017, 12.10: e0185809.
- HE, Xujiang, et al. Assessment of flight activity and homing ability in Asian and European honey bee species, *Apis cerana* and *Apis mellifera*, measured with radio frequency tags. *Apidologie*, 2013, 44.1: 38-51.
- HENRY, Mickaël, et al. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science*, 2012, 336.6079: 348-350.
- HILÁRIO, Sergio Dias; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; KLEINERT, AdMP. Flight activity and colony strength in the stingless bee *Melipona bicolor bicolor* (Apidae, Meliponinae). *Revista brasileira de biologia*, 2000, 60.2: 299-306.
- HODGES, Dorothy, et al. The pollen loads of the honey bee: a guide to their identification by colour and form. International Bee Research Association, 1984.
- HODGES, Dorothy, et al. The pollen loads of the honey bee: a guide to their identification by colour and form. International Bee Research Association, 1984.
- CHANG, Wei-Lun, et al. An artificial bee colony algorithm for data collection path planning in sparse wireless sensor networks. *International Journal of Machine Learning and Cybernetics*, 2015, 6.3: 375-383.
- CHEESEMAN, James F., et al. Way-finding in displaced clock-shifted bees proves bees use a cognitive map. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111.24: 8949-8954.
- JEANDET, Philippe, et al. Deciphering the role of phytoalexins in plant-microorganism interactions and human health. *Molecules*, 2014, 19.11: 18033-18056.
- JOHNSON, S. D.; LINDER, H. P.; STEINER, K. E. Phylogeny and radiation of pollination systems in *Disa* (Orchidaceae). *American journal of Botany*, 1998, 85.3: 402-411.
- KATZENBERGER, Tim D.; LUNAU, Klaus; JUNKER, Robert R. Salience of multimodal flower cues manipulates initial responses and facilitates learning performance of bumblebees. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 2013, 67.10: 1587-1599.
- KEARNS, Carol A.; INOUYE, David W.; WASER, Nickolas M. Endangered mutualisms: the conservation of plant-pollinator interactions. *Annual review of ecology and systematics*, 1998, 29.1: 83-112.
- KLEBER, Elisabeth. Hat das Zeitgedächtnis der Bienen biologische Bedeutung?. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 1935, 22.2: 221-262.

- KREMEN, Claire, et al. Pollination and other ecosystem services produced by mobile organisms: a conceptual framework for the effects of land-use change. *Ecology letters*, 2007, 10.4: 299-314.
- KÜHNHOLZ, Susanne; SEELEY, Thomas D. The control of water collection in honey bee colonies. *Behavioral ecology and sociobiology*, 1997, 41.6: 407-422.
- LEONHARDT, Sara Diana, et al. Ecology and evolution of communication in social insects. *Cell*, 2016, 164.6: 1277-1287.
- LI, Zhiguo, et al. Viral infection affects sucrose responsiveness and homing ability of forager honey bees, *Apis mellifera* L. *PLoS One*, 2013, 8.10: e77354.
- LINDAUER, Martin. Ein Beitrag zur Frage der Arbeitsteilung im Bienenstaat. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 1952, 34.4: 299-345.
- MAIA-SILVA, Camila, et al. Survival strategies of stingless bees (*Melipona subnitida*) in an unpredictable environment, the Brazilian tropical dry forest. *Apidologie*, 2015, 46.5: 631-643.
- MCGEOGH, MELODIE A. The selection, testing and application of terrestrial insects as bioindicators. *Biological reviews*, 1998, 73.2: 181-201.
- MCLELLAN, A. R. Growth and decline of honeybee colonies and inter-relationships of adult bees, brood, honey and pollen. *Journal of Applied Ecology*, 1978, 155-161.
- MEDUGORAC, I.; LINDAUER, M. Das Zeitgedächtnis der Bienen unter dem Einfluß von Narkose und von sozialen Zeitgebern. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 1967, 55.4: 450-474.
- MEIKLE, W. G.; HOLST, Niels. Application of continuous monitoring of honeybee colonies. *Apidologie*, 2015, 46.1: 10-22.
- MICHENER, Charles Duncan; MICHENER, Charles D. The social behavior of the bees: a comparative study. Harvard University Press, 1974.
- MOORE, Darrel. Honey bee circadian clocks: behavioral control from individual workers to whole-colony rhythms. *Journal of insect physiology*, 1982, 47.8: 843-857.
- MORÓN, Dawid, et al. Survival, reproduction and population growth of the bee pollinator, *Osmia rufa* (Hymenoptera: Megachilidae), along gradients of heavy metal pollution. *Insect Conservation and Diversity*, 2014, 7.2: 113-121.
- NUNES-SILVA, P., et al. Applications of RFID technology on the study of bees. *Insectes sociaux*, 2019, 66.1: 15-24.

- OHASHI, Kazuharu; D'SOUZA, Daniel; THOMSON, James D. An automated system for tracking and identifying individual nectar foragers at multiple feeders. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 2010, 64.5: 891-897.
- OHASHI, Kazuharu; LESLIE, Alison; THOMSON, James D. Trapline foraging by bumble bees: V. Effects of experience and priority on competitive performance. *Behavioral Ecology*, 2008, 19.5: 936-948.
- OHASHI, Kazuharu; THOMSON, James D. Trapline foraging by pollinators: its ontogeny, economics and possible consequences for plants. *Annals of botany*, 2009, 103.9: 1365-1378.
- OLIVEIRA-ABREU, Carina, et al. Pollen and nectar foraging by *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) in natural habitat. *Sociobiology*, 2014, 61.4: 441-448.
- ORBÁN, Levente L.; PLOWRIGHT, Catherine MS. The effect of flower-like and non-flower-like visual properties on choice of unrewarding patterns by bumblebees. *Naturwissenschaften*, 2013, 100.7: 621-631.
- OSBORNE, J. L., et al. Harmonic radar: a new technique for investigating bumblebee and honey bee foraging flight. In: VII International Symposium on Pollination 437. 1996. p. 159-164.
- PAWLAK-SPRADA, Sylwia; STOBIECKI, Maciej; DECKERT, Joanna. Activation of phenylpropanoid pathway in legume plants exposed to heavy metals. Part II. Profiling of isoflavonoids and their glycoconjugates induced in roots of lupine (*Lupinus luteus*) seedlings treated with cadmium and lead. *Acta Biochimica Polonica*, 2011, 58.2.
- PEGEL, Uta, et al. Two compasses in the central complex of the locust brain. *Journal of Neuroscience*, 2019, 39.16: 3070-3080.
- PERRY, Clint J., et al. Rapid behavioral maturation accelerates failure of stressed honey bee colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, 112.11: 3427-3432.
- PHAM-DELÈGUE, Minh-Hà, et al. Behavioural methods to assess the effects of pesticides on honey bees. *Apidologie*, 2002, 33.5: 425-432
- PITTENDRIGH, Colin; BRUCE, Victor; KAUS, Peter. On the significance of transients in daily rhythms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1958, 44.9: 965.
- RAINE, Nigel E.; CHITTKA, Lars. The correlation of learning speed and natural foraging success in bumble-bees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2008, 275.1636: 803-808.

- RIBBANDS, C. Ronald. The] behaviour and social life of honeybees. 1953.
- RILEY, J. R.; SMITH, A. D. Design considerations for an harmonic radar to investigate the flight of insects at low altitude. *Computers and Electronics in Agriculture*, 2002, 35.2-3: 151-169.
- ROBINSON, Elva JH, et al. Radio tagging reveals the roles of corpulence, experience and social information in ant decision making. *Behavioral ecology and sociobiology*, 2009, 63.5: 627-636.
- ROBINSON, Elva JH, et al. Radio tagging reveals the roles of corpulence, experience and social information in ant decision making. *Behavioral ecology and sociobiology*, 2009, 63.5: 627-636.
- ROBINSON, Gene E., et al. Colony integration in honey bees: mechanisms of behavioral reversion. *Ethology*, 1992, 90.4: 336-348.
- SALKOVA, D., et al. Honey bees and their products as indicators of environmental pollution: a review. *Agricultural Science and Technology*, 2016, 8.3: 175-182.
- SEELEY, Thomas D. The honey bee colony as a superorganism. *American Scientist*, 1989, 77.6: 546-553.
- SEELEY, Thomas D.; CAMAZINE, Scott; SNEYD, James. Collective decision-making in honey bees: how colonies choose among nectar sources. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 1991, 28.4: 277-290.
- SEELEY, Thomas D.; TOWNE, William F. Tactics of dance choice in honey bees: do foragers compare dances?. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 1992, 30.1: 59-69.
- SCHNEIDER, Christof W., et al. RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. *PloS one*, 2012, 7.1: e30023.
- SPANGLER, Hayward G. Daily activity rhythms of individual worker and drone honey bees. *Annals of the Entomological Society of America*, 1972, 65.5: 1073-1076.
- STANLEY, Dara A., et al. Investigating the impacts of field-realistic exposure to a neonicotinoid pesticide on bumblebee foraging, homing ability and colony growth. *Journal of Applied Ecology*, 2016, 53.5: 1440-1449.
- STELZER, Ralph J., et al. Winter active bumblebees (*Bombus terrestris*) achieve high foraging rates in urban Britain. *PLoS One*, 2010, 5.3: e9559.
- STELZER, Ralph J.; CHITTKA, Lars. Bumblebee foraging rhythms under the midnight sun measured with radiofrequency identification. *BMC biology*, 2010, 8.1: 1-7.

- STONE, G. N.; WILLMER, P. G. Warm-up rates and body temperatures in bees: the importance of body size, thermal regime and phylogeny. *Journal of Experimental Biology*, 1989, 147.1: 303-328.
- SUMNER, Seirian, et al. Radio-tagging technology reveals extreme nest-drifting behavior in a eusocial insect. *Current Biology*, 2007, 17.2: 140-145.
- TENCZAR, Paul, et al. Automated monitoring reveals extreme interindividual variation and plasticity in honeybee foraging activity levels. *Animal Behaviour*, 2014, 95: 41-48.
- THOMPSON, Helen, et al. Thiamethoxam: assessing flight activity of honeybees foraging on treated oilseed rape using radio frequency identification technology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2016, 35.2: 385-393.
- VAN OYSTAEYEN, Annette, et al. Sneaky queens in *Melipona* bees selectively detect and infiltrate queenless colonies. *Animal Behaviour*, 2013, 86.3: 603-609.
- VILLEGAS, Mirza; SOMMARIN, Marianne; BRODELIUS, Peter E. Effects of sodium orthovanadate on benzophenanthridine alkaloid formation and distribution in cell suspension cultures of *Eschscholtzia californica*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2000, 38.3: 233-241.
- VISSCHER, P. Kirk; SEELEY, Thomas D. Foraging strategy of honeybee colonies in a temperate deciduous forest. *Ecology*, 1982, 63.6: 1790-1801.
- VOLLET-NETO, Ayrton; MENEZES, Cristiano; IMPERATRIZ-FONSECA, Vera Lucia. Behavioural and developmental responses of a stingless bee (*Scaptotrigona depilis*) to nest overheating. *Apidologie*, 2015, 46.4: 455-464
- WINFREE, Rachael, et al. A meta-analysis of bees' responses to anthropogenic disturbance. *Ecology*, 2009, 90.8: 2068-2076.
- WOODGATE, Joseph L., et al. Life-long radar tracking of bumblebees. *PloS one*, 2016, 11.8: e0160333.
- YE, Yaoyao, et al. The role of receptor-like protein kinases (RLKs) in abiotic stress response in plants. *Plant cell reports*, 2017, 36.2: 235-242.
- ZELLER, Maximilian, et al. Transmedulla neurons in the sky compass network of the honeybee (*Apis mellifera*) are a possible site of circadian input. *PLoS One*, 2015, 10.12: e0143244.

ZURBUCHEN, Antonia, et al. Maximum foraging ranges in solitary bees: only few individuals have the capability to cover long foraging distances. *Biological Conservation*, 2010, 143.3: 669-676.

