



Tomáš Erban a kol.

Metodika pro hodnocení rizik pesticidů na včelstvo v realistických expozicích

METODIKA

NmetS



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

2024

Metodika pro hodnocení rizik pesticidů na včelstvo v realistických expozicích

Tomáš Erban a kolektiv

Autorský tým:


Tomáš Erban^a, 


Martin Markovič^a

Bruno Sopko^a

^aVýzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Drnovská 507/73, 161 06 Praha 6-Ruzyně

 Korespondenční autor: RNDr. Tomáš Erban, Ph.D

 erban@vurv.cz, arachnid@centrum.cz

 ORCID: 0000-0003-1730-779X

Oponenti:

Mgr. Hana Kubátová-Hiršová, Ph.D. – specialista POR, Sekce zemědělských vstupů, Odbor přípravků na ochranu rostlin, Oddělení rizik a účinnosti POR, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno

Doc. Mgr. Martin Šlachta, Ph.D. – CzechGlobe - Ústav výzkumu globální změny AV ČR, České Budějovice

Vydal:

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Praha, 2024

ISBN 978-80-7427-435-0

Financování:

Metodika byla vytvořena s finanční podporou projektu č. QK1910018 Ministerstva zemědělství ČR, Národní agentury pro zemědělský výzkum (NAZV).



Uznání metodiky:

Metodice bylo uděleno osvědčení Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZÚZ) č. UKZUZ 185680/2024.

O uplatnění metodiky je uzavřena smlouva QK1910018m03 podle ustanovení § 1746 odst. 2 zákona č. 89/2012 Sb., občanského zákoníku. Uživatelem metodiky dle smlouvy je Český svaz včelařů, z.s.

Oponentní posudky vypracovali Mgr. Hana Kubátová-Hiršová, Ph.D., a Doc. Mgr. Martin Šlachta, Ph.D.

Prohlášení:

Předkladatel metodiky prohlašuje, že nemá žádný konflikt zájmu a že zpracovaná metodika nezasahuje do práv jiných osob z průmyslového nebo jiného duševního vlastnictví.

Poděkování: Autorský tým děkuje recenzentům metodiky za podnětné a cenné připomínky. Poděkování patří MVDr. Martinu Kamlerovi za provedení biologického experimentu, Mgr. Eleně Shcherbachenko za přípravu chemikálií, Mgr. Julii Chalupníkové za zpracování vzorků. Proteomické analýzy byly provedeny v Servisní laboratoři hmotnostní spektrometrie, BIOCEV.

Anotace: Včela medonosná (*Apis mellifera*) je klíčový opylovač, který se zejména v zemědělské krajině setkává s řadou pesticidů. Při hodnocení rizik pesticidů na včely, ale i další necílové organismy, je potřeba zohlednit realistické expozice. V případě včely medonosné je potřeba brát v úvahu vysoce eusociální fungování včelstva. Nejdůležitější pro osud včelstva je matka, jejíž negativní ovlivnění pesticidy představuje velké riziko. Negativní ovlivnění včel v průběhu vývoje může představovat také značné riziko, protože nově se líhnoucí včely mohou mít nejen kratší život, ale navíc mohou plnit svou roli ve včelstvu špatně. Právě tato metodika je zaměřena na realistickou expozici pesticidů pro včelstvo, zohledňuje ve stejném včelstvu expozici včelích matek a také dělnic v průběhu vývoje. Podle metodického postupu mohou být hodnoceny jednotlivé pesticidy i jejich koktejly. Příklad provedení ukazuje potenciál negativního vlivu acetamipridu na dělnice i matky. Metodika je v souladu s nejnovějšími trendy v hodnocení rizik pesticidů. Metodika v příkladu provedení přináší informace o negativním vlivu acetamipridu na včelstvo.

Title: Methodology for risk assessment of pesticides on honey bee colonies in realistic exposures

Annotation: The honey bee (*Apis mellifera*) is an important pollinator that is exposed to a range of pesticides, particularly in agricultural landscapes. Realistic exposures must be taken into account when assessing the risks of pesticides to bees, but also to other non-target organisms. In the case of honey bees, the highly eusocial functioning of the colony must be taken into account. The most important factor in the fate of the colony is the queen, whose exposure to pesticides is a major risk. Negative effects on bees during development can also pose a significant risk, as newly emerged bees may not only have a shorter lifespan, but may also perform their role in the colony poorly. This particular methodology aims to provide a realistic pesticide exposure for the colony, taking into account the exposure of worker bees during development and queens in the same colony. According to the methodology, individual pesticides and their cocktails can be evaluated. An example implementation shows the potential for adverse effects of acetamiprid on both workers and queens. The methodology is in line with recent trends in pesticide risk assessment. The methodology, in an example implementation, provides information on the negative effect of acetamiprid on bees.

Obsah

1. Úvod.....	- 1 -
2. Cíl metodiky.....	- 4 -
3. Vlastní popis metodiky	- 4 -
3.1. Koncept metodiky	- 5 -
3.2. Volba pesticidů/POR	- 6 -
3.3. Nastavení expozice pesticidu.....	- 6 -
3.4. Založení, průběh experimentu a odběr vzorků.....	- 7 -
3.5. Analýzy vzorků a hodnocení výsledků	- 8 -
3.6. Interpretace výsledků	- 8 -
3.7. Souhrn důležitých kroků pro provedení metodiky.....	- 9 -
4. Příklad provedení metodiky	- 11 -
5. Srovnání novosti metodiky	- 21 -
6. Uplatnění metodiky.....	- 22 -
7. Ekonomické přínosy metodiky	- 23 -
8. Publikace autorů, které předcházely metodice.....	- 23 -
9. Seznam citované literatury.....	- 25 -

1. Úvod

Meziroční ztráty včelstev *Apis mellifera* Linnaeus, 1758, se značně liší v různých zemích a regionech. Rozdíly jsou však velmi odlišné i v jednotlivých letech. V některých zemích přesahují meziroční úhyny dokonce 30 %, ale někdy i 50 % a lokálně jsou čísla i hrozivější [1–3]. Vysoké procentuální úhyny se nevyhýbají ani Česku, např. v období 2022/2023 byl celorepublikový úhyn 36 % a v některých okresech se přiblížil 80 % [4]. Hlavní globální příčinou ztrát včelstev je ektoparazitický roztoč *Varroa destructor* Anderson & Trueman, 2000, jehož infestace včel způsobuje nemoc varroózu, která je neodmyslitelně spojena s virovými koinfekcemi [5–7]. Nicméně faktorů, které se mohou podílet na úhynech včel a jevech známých pod označením Colony collapse disorder (CCD), může být několik desítek. Konkrétně vanEngelsdorp a kol. [8] v popisné studii CCD zmiňovali celkem 61 možných proměnných, ale zvláštní význam přiřazovali *V. destructor* a odolnosti včel vůči pesticidům [8]. Pesticidy jsou v souvislosti se zdravím včel zmiňovány velmi často a někdy i s velkým důrazem. Pesticidy obecně patří mezi jedny z důležitých stresorů, které mohou přímo i nepřímo přispívat k oslabením a ztrátám včelstev [9–11].

Oficiálně se podaří příčiny úhynů prokázat jen v relativně málo případech. Příčiny většinou odhalí vyšetřování zaměřená na nemoci včel ze seznamu Světové organizace pro zdraví zvířat (WOAH). Jedná se především o mor včelího plodu, hnilobu včelího plodu a varroózu [12]. Další případy zahrnují oficiálně potvrzené otravy včel v souvislosti s aplikací prostředků na ochranu rostlin (POR) [13, 14]. Ty však představují jen malou část z celkového počtu problémů, které by mohly ve včelstvech způsobit. Jedná se o akutní otravy způsobené „nesprávnou“ aplikací POR, které indikují hynoucí včely na česně a před úlem [14]. Pesticidy představují největší problém, pokud je kontaminováno celé včelstvo [14–18]. Vyšetřování akutních otrav včel kompetentními orgány je zaměřeno na včely s příznaky otravy „před úlem“. Pokud však včelstvo přijde o část létavek, i když je oslabeno, nemusí se jednat o riziko ohrožující osud celého včelstva. Ztráta i několika tisíc jedinců nepředstavuje pro včelstvo s desetitisíci jedinci vážný problém, se kterým by si nemělo poradit. Větší riziko představuje skryté riziko v kontaminaci zásob, ať už pylových nebo medu [14]. Tuto problematiku již řešila metodika Erban a kol. [19] a související publikace Kadlíková a kol. [14], podle nichž je při vyšetřování suspektních otrav včel důležité zaměřovat analýzy, kromě včel před úlem a na česně, také na zásoby a včely uvnitř úlu. Hlavní vzorky pro analýzy mají představovat včely (nejeví znaky otravy) a včelí chléb z plodového plástu. Získaná

data z těchto vzorků ukážou relativní kontaminaci pesticidy v úlu a umožňují identifikovat či predikovat riziko pro celé včelstvo z hlediska subletálního chronického účinku pesticidů.

Zásoby v plodovém plástu „neúměrně“ kontaminované pesticidy mohou negativně ovlivnit určitou generaci včel, jelikož je ohrožen jejich správný vývoj. Potravními zdroji jsou totiž přímo nejvíce zasaženy larvy. Dobrymi indikátory rizika je analýza plástového pylu neboli včelího chleba (pergy) v plodovém plástu, který je rychle spotřebován pro krmení larev. Včely na plodovém plástu, které larvy krmí, poskytnou také významnou informaci o aktuální kontaminaci [14, 19]. Negativně ovlivněna může být především generace včel vznikající v období zvýšeného používání pesticidů, pro přežití celého včelstva to však nemusí být limitující. Výsledkem neúměrné kontaminace plástového plástu pesticidy může být zpomalený rozvoj nebo dočasné zeslábnutí včelstva [14, 20]. Pokud včely uloží do zásob přebytečný pyl kontaminovaný rizikovým obsahem pesticidů, je potenciální významné riziko i pro vznikající generace včel v pozdějších obdobích. Pokud jsou takovými zásobami krmeny, larvy mohou být negativně ovlivněny nezávisle na aktuální snůšce. Tak se může kontaminace včelstva ze snůšek z různého období promítat i na další generace včel. Pokud ve včelstvu zůstanou problematické zásoby do dalšího roku, existuje riziko opakování problémů zejména na jaře dalšího roku. Publikace ukazují, že kontaminace včelího chleba pesticidy je vyšší spíše zkraje sezóny [21]. To platí v podstatě obecně a souvislost lze hledat v intenzitě používání POR gradující v jarním období. Na místě je zmínit, že včelí chléb představuje superpotravinu, a tudíž se řeší jeho kvalita z hlediska obsahu kontaminantů v potravinách pro člověka. Kontaminace pergy nemusí představovat riziko jen pro včely, a tak se v poslední době zaměřil výzkum také na obsah pesticidů ve včelím chlebu s ohledem na zdraví člověka [22, 23].

Vedlejší subletální efekty pesticidů nelze podceňovat, proto se jimi zabývá čím dál více studií. I subletální kontaminace totiž mohou vyvolat další problémy ve včelstvu. V plodovém plástu se mohou subletální obsahy pesticidů projevit negativním vlivem na vývoj včel a narušením dlouhověkosti dělnic [20]. Dlouhověkost včel je však relevantní uvažovat v období od srpna, kdy se takové včely vytváří a přežívají až do jara [24]. Pokud je vážně narušena generace dlouhověkých včel, je v ohrožení osud celého včelstva, které kvůli tomu zpravidla nepřečká zimu.

Většina studií se tradičně zaměřuje na hodnocení rizika pesticidů pouze u včelích dělnic jako reprezentativního modelu. Účinky na celá včelstva se nehodnotí snadno. Situaci komplikuje vysoce eusociální uspořádání včelstev spočívající ve výskytu více kast a dělnic plnících různé role.

V současné době Evropská unie (EU) využívá odstupňovaný proces hodnocení rizik pesticidů pro různé typy studií představující různé úrovně složitosti. Samotné dělnice se používají pouze v první úrovni hodnocení, která se používá k charakterizaci vlastní toxicity pesticidu. Vyšší úrovně zahrnují testy na úrovni celých včelstev. Také hodnocení je určeno k posouzení rizika za realističtějších podmínek expozice. Je však třeba určit souvislosti mezi subletálními účinky měřenými na úrovni jedince a účinky měřenými na úrovni celého včelstva [25]. Takové komplexní uvažování je velmi důležité, protože je potřeba překonávat omezené hodnocení z pohledu ovlivnění jedinců.

Všichni jedinci mají ve včelstvu určitou roli a jejich ovlivnění se odráží na fungování celého superorganismu a mohou ovlivnit i matku. Nepříznivé účinky na dělnice vyvolané pesticidy mohou zahrnovat zejména zhoršenou komunikaci uvnitř včelstva a zhoršenou produkci mateří kašičky. Např. změna (zmenšení) velikosti hypofaryngeálních žláz dělnic se odráží negativním vlivem na produkci mateří kašičky, kterou jsou krmeny larvy budoucích matek, dospělé matky po celou dobu života, ale i larvy dělnic po určitou dobu [26]. Je potřeba posuzovat, jak subletální expozice pesticidy souvisí s vývojem snůšky [20, 27, 28]. Celkově je při hodnocení velmi důležité zohlednit stáří analyzovaných včel, protože výsledky analýz mohou být ovlivněny věkem včel [29]. Obzvláště rizikové jsou potenciální nepříznivé účinky na matky, které mohou logicky nejvíce ovlivnit celé včelstvo. V důsledku různých subletálních expozic včelstev pesticidům byly pozorovány nepříznivé účinky na matky, které mohou vést k jejich snížené výkonnosti, zvýšené úmrtnosti, atypickému chování, zvýšené tendenci k (tichým) výměnám matek a různým fyzickým abnormalitám během vývoje [30–39].

V hodnocení rizik pesticidů na včelu medonosnou je celkově zvýšená potřeba zaměření na ovlivnění osudu celého včelstva. Je potřeba propojovat souvislosti zjištěných rizik na jedince s vlivem na eusociální uspořádání včelstva. Komplexním hodnocením rizik pesticidů na včelstvo se zabývala již metodika Erban a kol. [40], nicméně tato metodika přináší nové aspekty a představuje další propojení problematiky kontaminace jedinců s rizikem pro včelstvo. V získaných výsledcích je potřeba hledat další souvislosti, které je potřeba zvažovat v interpretacích získaných výsledků.

2. Cíl metodiky

Cílem metodiky je poskytnout obecně platný metodický postup využitelný při hodnocení vlivu pesticidů na včelstvo. Metodika reaguje na potřebu hodnocení rizik pesticidů na včely v komplexních souvislostech, které berou v potaz eusociální uspořádání včelstva. V metodice je současně zvažován vliv pesticidů na včelstvo z pohledu ovlivnění matky a zasažené generace včel. Důležitým aspektem je interpretace výsledků, která dokáže převádět potenciální riziko z jedinců na celé včelstvo. Obecným cílem je přispět novými prvky pro hodnocení rizik pesticidů na necílové organismy, principy totiž mohou být aplikovány i na jiné necílové organismy než včelu medonosnou.

3. Vlastní popis metodiky

Zaměření metodiky je na chronický subletální efekt, který se hodnotí obtížněji než akutní toxicita, kde je efekt hodnotitelný jako mortalita jedinců nebo celého včelstva v krátkém úseku. Základním prvkem metodiky je provedení experimentu, v němž jsou včely exponované testované pesticidní látky nebo mixu pesticidních látek. Nedílnou součástí metodiky je volba pesticidní látky. Kritická je znalost dosud zjištěného vlivu hodnocené látky na včely – jedince a včelstvo. Je vhodné brát v potaz také dosud zjištěné účinky na jiné organismy, zejména necílové. Je potřeba hodnotit vyvolaný efekt vzhledem k testované expozici. Testování je potřeba přizpůsobit realistické expozici/dávce látky, přípravku a koktejlů. V metodice je zaměření na hodnocení vlivu testovaných látek z pohledu potenciálního negativního ovlivnění generace včelích dělnic skrze krmění přijímané v larválním stádiu. V modelovém provedení metodiky nejsou analýzy zaměřeny na larvy, jejichž analýza se však nevylučuje. Analýzy larev se jinak poměrně často provádí. Klíčové vzorky představují až líhnoucí se včely, v nichž by se měla projevit expozice v larválním stádiu přijímajícím potravu. Zjišťuje se tak postupný vliv testovaných látek dosažený v průběhu vývoje a po metamorfóze probíhající převážně v zavíčkované buňce bez příjmu potravy. Vzorky jsou připravovány v prostředí včelstva, i když v kontrolovaných podmínkách, pro co největší přiblížení realitě. Pro zjištění vlivu na včelstvo jsou také analyzovány matky odebrané při ukončení experimentu. Výsledky z líhnoucích se včel a matek jsou pak kontrastovány v interpretaci. Na základě získaných výsledků mohou být navrhovány další potřebné testy a experimenty. Klíčové analýzy představují vysokokapacitní přístupy, které dokážou ukázat odchylky, které se mohou projevit v různých proteinech a biochemických drahách.

3.1. Koncept metodiky

Při nastavení experimentu pro hodnocení rizik testovaných látek se pracuje s faktem, že včelstvo je kontaminované v míře, která nezpůsobuje významně patrný letální efekt na úrovni včelstva, protože zaměření metodiky je na chronický subletální efekt. Před experimentem je potřeba provést rešerši na testované látky a přípravky, aby byla správně nastavena realistická a zároveň subletální expozice. Pro expozici se volí buď konkrétní látka, přípravek nebo libovolný mix/koktejl. Vychází se z reálného výskytu jednotlivých látek a případně jejich mixů v prostředí. Jedním z důležitých faktorů, které je potřeba zohledňovat, jsou známé obsahy/rezidua ve včelích matricích, zejména v nektaru, pylu a medu, příp. i vosku. Důležité údaje mohou poskytnout také zjištěná rezidua ze včel, zejména z plodového plástu, ale tato data jsou přes značnou důležitost poměrně vzácná (viz např. Erban a kol. [41], Kadliková a kol. [14]). Abundantní data bývají k dispozici pro pesticidy, které se používají delší dobu a z nějakého důvodu se na ně zaměřuje vědecká komunita. Jako reprezentativní případ lze uvést pesticidy ze skupiny neonicotinoidů, které jsou více než 10 let velmi intenzivně studovány vzhledem k negativnímu vlivu na včely a další opylovače. Zásadní informace obecně představují doporučení pro aplikace pesticidu/POR, které se obvykle uvádí v litrech přípravku na hektar, z čehož lze také spočítat účinnou látku (ú. l.) aplikovanou na hektar. Na mezinárodní úrovni lze řadu užitečných informací získat z dokumentů Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA; počáteční názvy dokumentů: „Peer review on the active substance ...“; „Peer review of the pesticide risk assessment ...“; „Statement on the active substance...“, „Statement on the toxicological properties and maximum ...“, a další). Ne vždy jsou k dispozici potřebná data v odpovídajícím rozsahu, jako v případě nových nebo ještě neschválených a vyvíjených látek/POR. Výsledek testování podle metodiky tedy může nejen sloužit pro vyloučení negativního účinku nebo ověření suspektního rizika na včely již používaných pesticidů, ale také může upozornit na negativní efekt ještě před uvedením pesticidů na trh. Při nastavení experimentu se zvažuje kontinuální expozice včelstva po dobu jednoho měsíce. Experimenty se včelami jsou sezónní záležitostí, což je potřeba brát v úvahu. Včely ke konci srpna začínají vytvářet dlouhověké včely, které jsou fyziologicky odlišné od letní generace. Proto je potřeba brát v úvahu dobu provedení experimentu. Zároveň je potřeba mít na konkrétní termín k dispozici připravená experimentální včelstva (oddělky). Proto se jeví pro provedení experimentu ideální období červen–červenec, což je také relevantní pro letní krátkověkou generaci včelích dělnic. Experiment

časovaný začátkem na srpen a ukončením v září by byl zaměřen na zimující generaci včel, která je odlišná od letní generace dělnic.

3.2. Volba pesticidů/POR

Zásadním rozhodovacím bodem pro experiment je volba testované látky (účinné látky – ú. I.), směsí látek nebo formulovaných přípravků – POR. Pokud se jedná o ú. I./POR, které jsou na trhu delší dobu, tak je důležitým faktorem při výběru aktuální význam z hlediska společnosti a orgánů hodnotících rizika pesticidů. Lze zohlednit také zájem vědecké komunity, který s uvedenými faktory souvisí. Některé látky/POR bývají navíc diskutovány i ve sdělovacích prostředcích. Je potřeba brát v úvahu, že pesticidy jsou poměrně častým „vděčným tématem“ pro sdělovací prostředky, i když někdy bez důvodného opodstatnění. Lze zvažovat také predikované riziko na základě charakteru sloučenin a skupin pesticidů. Někdy však látky ze stejných skupin pesticidů vykazují z různých důvodů, včetně biochemických, odlišné riziko na různé organismy. Pesticidy se nevyskytují v prostředí jednotlivě, a dokonce jsou pesticidy obvykle aplikovány v tank-mixech. Proto je v některých případech důležité zaměřovat se na hodnocení směsi, a to zvláště pokud je podezření na synergické, aditivní či antagonistické efekty mezi pesticidy. V takovém případě je důležité zvažovat poměr látek/POR pro hodnocení typickým výskytem v prostředí. Je vhodné brát v potaz reálné aplikace pesticidů v tank-mixech prováděných zemědělci. Relevantní je zaměření se na reziduální výskyt pesticidů v prostředí a zejména ve včelích matricích. V dnešní době se v predikci rizik pesticidů i při vývoji nových pesticidů stále více uplatňují nástroje výpočetní techniky a umělá inteligence [42–44].

3.3. Nastavení expozice pesticidu

Pro experiment je zásadní zvažovat realistické expozice. Pokud pomineme možnost, že by včely byly zasaženy pesticidy kontaktně, tak dle metodiky je zaměření se na příjem pesticidů orální cestou ve formě nektaru a pylu (příp. vody). Proto je v experimentálním provedení prováděna aplikace pesticidu krmením potravou – cukerným roztokem, což umožňuje poměrně přesnou expozici testovaným látkám/POR. Na základě dostupných dat (viz kapitolu 3.1., zejm. pokud jsou k dispozici data obsahu v nektaru/pylu) se určí relevantní experimentální koncentrace pesticidu, která se aplikuje do cukerného roztoku. Standardně se kalkuluje koncentrace pesticidu v $\mu\text{g}/\text{mg}$ na litr nebo ng na ml 50% cukerného roztoku. Pesticid se přimíchává do výsledné koncentrace do

cukerného roztoku z předpřipravených aliquotů zásobního roztoku. Při přípravě je potřeba dbát na rozpustnost látek. Při kontinuální expozici v průběhu experimentu se opakovaně připravuje čerstvý cukerný roztok, který se aplikuje opakovaně během několika dní. Pesticid se přidává do cukerného roztoku z předpřipravených aliquotů. Před experimentem se proto připraví zásobní roztok pesticidu, jehož koncentrace je kalkulovaná tak, aby při přidání určitého objemu do cukerného roztoku bylo dosaženo cílové koncentrace. Zásobní roztok se v potřebném počtu aliquotů uloží do mrazicího boxu.

3.4. Založení, průběh experimentu a odběr vzorků

Pro provedení experimentu se připraví včelstva. Připraví se tři (nebo více) včelstva pro každou testovanou variantu, tedy tři včelstva budou kontrolní a další tři budou vystavena pesticidu. Matky jsou ze stejné linie a z téhož období. Standardně se připravují včelstva o stejné síle do jednoho nástavku. Zvolená rámková míra není rozhodující, včelstva by však měla být obdobné síly. Každé včelstvo se umístí do izolátoru na jednom místě, ale s dostatečnými odstupy mezi izolátory, aby se nedotýkaly a včely si nemohly předávat krmivo. Včelstva by neměla mít přebytečné staré zásoby, jelikož jim bude dodávána jednotná potrava ve formě náhradního krmiva. Staré zásoby se včelám odeberou. Náhradní výživa představuje: i) 50% cukerný roztok (řepný cukr:voda = 1:1; nebo sirup); ii) rouskovaný pyl biokvality – pro prevenci nežádoucích reziduí pesticidů je důležité použít pyl z oblasti, která není zatížena aplikacemi pesticidů. Včelstvům je nutné dodávat pyl, aby produkovala plod. Včelstva se nechají asi týden adaptovat, až poté je náhradní cukerné krmění v pesticidní variantě obohaceno o testovaný pesticid. Včelstvům je v průběhu experimentu pravidelně dodáváno čerstvé krmivo. Expoziční experiment trvá standardně měsíc (~4–5 týdnů). Poté se odebírají vzorky líhnoucích se včel. Z plodového plástu se v rukavicích a s pinzetou odebírají včely v okamžiku líhnutí a jednotlivě se umisťují do zkumavek typu Eppendorf. Vzorky včel se okamžitě mrazí na suchém ledu. Na konci experimentu se odebere také matka, která se také zamrazí ve vzorkovnici na suchém ledu. Nevyklučuje se odběr vzorků včel v průběhu experimentu a případně larev či kukel. Klíčové vzorky dle metodiky však představují líhnoucí se dělnice a matky.

3.5. Analýzy vzorků a hodnocení výsledků

Při akutním toxickém účinku jsou nežádoucí účinky znatelné a hodnotitelné jako mortalita. Subletální efekt se projevuje až po delším časovém úseku. Ani po několika týdnech však nebývá negativní efekt, zejména jako je mortalita, patrný na první pohled. Efekt pesticidů se může v některých případech na včelstvech projevovat změnou chování, což je hodnotitelné specifickým přístupem. Pro analýzy vzorků je vhodné využít zejména vysokokapacitních molekulárních metod, které umožňují identifikaci skrytých změn na úrovni exprese. Vhodnými přístupy jsou zejména OMICs, jako proteomika a transkriptomika. Je však možné využít dalších přístupů jako metabolomika, analýza mikrobiomu, atd. Ideálně se využije kombinace více přístupů. Integrace dat z více analýz poskytne ucelený obraz o změnách získaných na více úrovních (proteom/transkriptom). Integrace dat však není jednoduchá a může skrývat problémy v odlišnostech výsledků pro interpretaci. I když je poměrně velká shoda mezi transkriptomickými a proteomickými daty, některé markery mohou vykazovat jiný výsledek, což je známým problémem [45].

Porovnávají se výsledky ze vzorků mezi kontrolními a pesticidům vystavenými včelstvy. Signifikantní výsledky jsou hodnoceny na zvolené hladině významnosti, která je typicky 5 %, zvolena však může být i jiná hladina významnosti jako 1%. Ve vysokokapacitních datech se využívá korekce typu FDR (false-discovery rate), jež kontroluje očekávaný podíl falešně pozitivních (FP) výsledků mezi zamítnutými hypotézami. Obvykle se využívá FDR na úrovni 0,05 nebo 0,01, ale často bývají využívány obě úrovně najednou.

3.6. Interpretace výsledků

Důležité jsou identifikované signifikantně (podle zvolené hladiny významnosti, nejčastěji 0,05) rozdílně abundantní proteiny, příp. transkripty a nízkomolekulární látky – metabolity. Neméně důležitá je však interpretace výsledků s ohledem na funkci identifikovaných změn. Zásadní je hledání vzájemných souvislostí v získaných výsledcích, tj. jak jsou všechny identifikované změny propojené. Zvláštní ohled je pak potřeba brát na charakter testovaného pesticidu, který má na základě mechanismu účinku vyvolat určitý očekávaný efekt. Může se však stát, že výsledné změny neodpovídají očekávaným změnám, což indikuje vedlejší efekt testovaného pesticidu. Ačkoliv byly jednotlivé pesticidy vyvinuty s určitým ověřeným mechanismem účinku, později bylo v řadě případů prokázáno, že mají i vedlejší „neočekávané“ efekty. Je potřeba brát v potaz, že

identifikované efekty mohou být „vratného charakteru“, tedy je potřeba zvažovat a v budoucnu případně ověřovat vratnost nežádoucího vlivu po odstranění pesticidu ze včelstva, což odpovídá sezónní expozici. Nutno zdůraznit, že výsledné efekty na organismy vyvolané „vysokými“ letálními a „nízkými“ subletálními expozicemi nebo dávkami mohou být značně odlišné. Pesticidy jsou vyvíjeny na tlumení škůdců, u nichž mají vyvolat toxický efekt, v podstatě akutní otravu. Proto se principiálně v případě nežádoucích efektů na necílové organismy setkáváme spíše se subletálními chronickými efekty. Kdyby totiž byly běžné akutní toxické efekty na necílové organismy, nebyly by dané pesticidy jednoduše povoleny pro dané použití, protože by byly příliš rizikové. Povolení takto rizikových pesticidů by bylo v rozporu s nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009 z kterého se vychází v Evropské unii (EU) při hodnocení POR před uvedením na trh za účelem minimalizovat negativní vlivy na prostředí a necílové organismy. V případě včely medonosné se setkáváme s případy akutních otrav, které jsou však způsobeny špatným použitím POR. Takové případy v Česku vyšetřuje společně veterinář z Krajské veterinární správy (KVS) a odborný pracovník z Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZÚZ) [19] a obdobná vyšetřování probíhají i v zahraničí [14].

3.7. Souhrn důležitých kroků pro provedení metodiky

Schéma provedení experimentu zohledňující expozici včel v larválním stádiu a matek pesticidu je znázorněno na obrázku 2. Je uvedeno zahrnutí modelového pesticidu acetamipridu. Přičemž schéma je platné pro jakékoliv pesticidy.

- **Volba pesticidů/POR pro hodnocení**

Suspektní negativní subletální efekt již registrovaného pesticidu (ú. l./POR) na včely

► Použitím metodiky lze ověřit suspektní negativní účinky již používaného pesticidu na včely a výsledek využít při reevaluacích.

Neznámé efekty pro „nový“ pesticid – vyvinutý nebo vyvíjený

► Použitím metodiky lze identifikovat, nebo vyloučit negativní účinek pesticidů na necílové organismy a předejít tak budoucím škodám a problémům ještě před jejich uvedením na trh.

Podezření na synergický efekt kombinace pesticidů

► Použitím metodiky lze hodnotit riziko koktejlů pesticidů, které se buď vyskytují v prostředí/ve včelích matricích v určité koncentraci nebo jsou aplikovány v tank-mixech.

- **Nastavení „realistické“ orální expozice pesticidu**

Vyhledání informací o reziduích v nektaru/medu a rouskovaném pylu/včelím chlebu, příp. dalších včelích matricích a samotných včelách

► Vyhledané informace o obsahu pesticidů ve včelích matricích se využijí jako základ pro nastavení realistické expozice. Je potřeba brát v úvahu, že obsah pesticidů v nektaru/medu bývá značně nižší než v pylu. Pro experiment se zvolí nižší hranice než maximální zjištěné obsahy pesticidů.

► Pokud nejsou dostupné informace o obsahu látek ve včelích matricích, využijí se informace o akutní toxicitě z kontaktních a orálních testů a zohlední se charakter látky a aplikace na plochu.

Aplikace pesticidu – aliquoty zásobního roztoku pesticidu

► Podle určené koncentrace pesticidu pro orální aplikaci formou cukerného roztoku se připraví jeho zásobní roztok. Přimícháním stanoveného objemu zásobního roztoku pesticidu do 50% cukerného roztoku se docílí požadované koncentrace.

► Zásobní roztok se rozdělí do aliquotů, které se zamrazí. Není tedy pokaždé potřeba připravovat nové roztoky.

Založení a průběh experimentu

► Připravená včelstva stejné síly se umístí do zasíťovaných izolátorů.

► Včelstva bez předchozích/starých zásob se nechají v izolátorech adaptovat.

► Včelám se podává rouskovaný pyl „biokvality“, aby produkovala plod.

► V průběhu kontinuální expozice se opakovaně během několika dní připravuje a aplikuje čerstvý cukerný 50% roztok. V pesticidové expozici se přidává koncentrovaný roztok pesticidu ze zásobních aliquotů.

Odběr vzorků

- ▶ Vzorky se odebírají po „měsíční expoziční“.
- ▶ Klíčové vzorky podle metodiky představují líhnoucí se dělnice a matky. Biologické vzorky se okamžitě mrazí ve vzorkovnicích na suchém ledu.
- ▶ Nevylučuje se odběr dalších vzorků v průběhu experimentu – larev, kukel apod.

Analýzy

- ▶ Vzorky se preferenčně analyzují vysokokapacitními OMICs metodami. Vhodnými přístupy jsou zejména proteomika a transkriptomika, je však možné využít dalších přístupů jako metabolomika, metabarkódování, analýza mikrobiomu, atd.

Interpretace výsledků

- ▶ Nalezené rozdílné výsledky mezi kontrolou a pesticidovou expoziční je potřeba správně interpretovat a vyvozovat adekvátní závěry.
- ▶ Je potřeba určit význam identifikovaných změn v organismech působením pesticidů. Analyzuje se, zda existují souvislosti v získaných výsledcích, tj. jak jsou všechny identifikované změny propojené.
- ▶ Je potřeba brát v potaz, že identifikované změny vlivem pesticidů by mohly být vratného charakteru. Je potřeba zvažovat a v budoucnu případně ověřovat vratnost zjištěného nežádoucího vlivu po odstranění pesticidu ze včelstva. V této souvislosti je potřeba navrhnout další metodické postupy pro případná ověřování.

4. Příklad provedení metodiky

A. Vybraný modelový pesticid:

- **Hodnocená účinná látka:** acetamiprid (analytický standard kat. č. 33674; PESTANAL[®], Supelco, Sigma–Aldrich).

Pozn. Acetamiprid se často vyskytuje ve včelích matricích společně s fungicidy. Jedná se např. o častý společný výskyt v ovocných sadech. Proto je možné volit v dalších

testech jejich realistickou kombinaci, např. acetamiprid+pyrimethanil. Případně se volí širší spektrum látek, z něž se připraví zásobní roztok.

Komentář: Značná část výzkumu zaměřená na pesticidy se dlouhodobě koncentruje na neonicotinoidy, což je skupina pesticidů, u nichž existuje podezření, že významně přispívají ke ztrátám včelstev a ovlivňují i populace samotářských včel [15, 46]. Evropská unie (EU), na rozdíl od jiných zemí [47], zaujala v minulých letech vůči neonicotinoidům tvrdý postoj. Používání třech neonicotinoidů imidaklopridu, thiamethoxamu a klothianidinu, které jsou vysoce toxické pro včely, se přísně regulovalo již od roku 2013 [48]. V roce 2018 byl navíc vydán zákaz jejich veškerého venkovního použití [49]. Omezení vyústila k vypršení platnosti povolení k použití těchto neonicotinoidů v letech 2019 až 2020. Ačkoli v členských státech EU byly povoleny výjimky pro venkovní použití zakázaných neonicotinoidů, po roce 2023 již žádné výjimky povolovány nejsou [50]. Po stažení registrace dalšího neonicotinoidu, thiaklopridu, v roce 2020 [51], zůstal v EU k dispozici pouze jeden neonicotinoid, acetamiprid. Důležité je, že Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) na základě nejnovějších informací stanovil, že acetamiprid představuje pro včely nízké riziko [52, 53]. Proto byl acetamiprid registrován do 28. února 2033 a stal se posledním z pěti dříve dostupných neonicotinoidů v EU. Přestože je acetamiprid regulován jinak než ostatní čtyři neonicotinoidy, je třeba dále posoudit rizika acetamipridu pro včely a další organismy, zejména jak uvádí EFSA [52, 53].

B. Krmivo:

• Cukerné krmivo

Použije se řepný cukr nebo invertovaný fruktózo-glukózový sirup. Ten však musí být kvalitní s nízkým obsahem hydroxymethylfurfuralu (HMF) a bez zbytkových cukrů, které by mohly činit trávicí problémy včelám.

- **Rouskovaný pyl:** 100% včelí pyl rouskovaný v biokvalitě

C. Biologický materiál:

- **Včelstva *Apis mellifera carnica*, Pollmann, 1879**

D. Vzorky pro analýzy

- ***Líhnoucí se dělnice + matky***

E. Postup experimentu

Každé pokusné včelstvo bylo umístěno do zasítovaného izolátoru. Celkem šest včelstev v izolátorech bylo umístěno v řadě vedle sebe, a to střídavě kontrola a pesticidová expozice (obrázek 1). Takovéto umístění na jednom místě zajišťuje stejné venkovní podmínky. Včelstva byla krmena náhradním krmivem, které představoval 50% roztok řepného cukru. Pro zajištění kontinuální produkce plodu během pokusu byla včelstva přikrmována rouskovaným včelím pylem získaným od lokálního včelaře z lokality mimo použití zemědělských pesticidů.

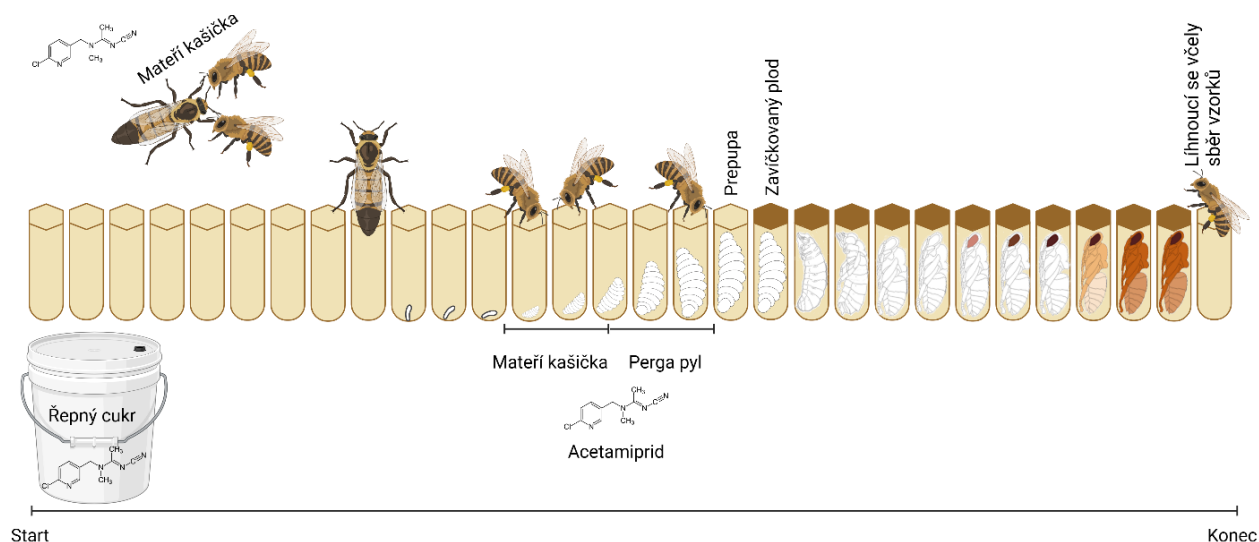
Obrázek 1. Šest včelstev v zasítovaných izolátorech bylo umístěno v řadě vedle sebe. Střídaly se kontrolní a pesticidové varianty.



Foto: T. Erban

Pro snazší představu o průběhu experimentu je uvedeno schématické znázornění (obrázek 2). Schéma představuje důležité aspekty v metodickém postupu. Jednotlivé buňky znamenají 1 den. Od začátku je včelstvo krmeno náhradním krmivem. Zásadní je distribuce pesticidu včelám, přičemž včelstvo je kontinuálně krmeno. V průběhu měsíční expozice se včelí dělnice v průběhu vývoje setká s acetamidem přímo v larválním stadiu, kdy jsou larvy krmeny včelami. Polovinu z tohoto přibližně pětidenního období jsou larvy krmeny mateří kašičkou a druhou polovinu včelím chlebem (pergou). Kdyby šlo o larvu matky, byla by krmena celou dobu výhradně mateří kašičkou. Dělnice je po zavíčkování přibližně 13 dní izolovaná od prostředí úlu v buňce a nepřijímá potravu. Na konci vývoje, kdy dělnice po metamorfóze opouští buňky, jsou odebrány, zamrazeny a poté analyzovány. Pokud se rozhodneme ukončit celý experiment na včelstvu, odebere se také matka, bez které včelstvo není plně funkční. Matka je krmena mateří kašičkou po celou dobu svého života. Pesticid se tedy do ní musí dostat skrze sekrety včel krmiček.

Obrázek 2. Schematické provedení experimentu. Patrná je expozice larev a matek pesticidu. Každá zobrazená buňka odpovídá jednomu dni.



Obrázek vytvořil B. Sopko pomocí programu BioRender (<https://biorender.com>).

Byly založeny následující experimentální skupiny: i) kontrolní skupina bez acetamidridu a ii) skupina vystavená acetamidridu, ve které byl cukerný roztok (50% řepný cukr) doplněn acetamidridem na konečnou koncentraci 20 $\mu\text{g/l}$ (= ng/ml ; $\sim \text{ppb}$). Pro každou expozici byla provedena tři biologická opakování, přičemž každé opakování představovalo plně funkční včelstvo v izolátoru. Všech šest včelstev bylo vystaveno stejným povětrnostním podmínkám, protože izolátory byly umístěny vedle sebe ve venkovním prostředí (obrázek 1). Výběr experimentální expozice acetamidridu byl odvozen od subletálních účinků tří vysoce toxických neonikotinoidů (imidakloprid, thiamethoxam a klothianidin). Ve srovnání s acetamidridem je pro ně značné množství informací. Nežádoucí efekty jsou známy již při koncentracích nižších než 10 $\mu\text{g/l}$ v nektaru a/nebo $\mu\text{g/kg}$ pylu [54–56]. Vzhledem k poměrově nižší toxicitě acetamidridu pro včely a zvýšené schopnosti včel acetamidrid detoxikovat konkrétními cytochromy P450 [57] je expozice 20 $\mu\text{g/l}$ acetamidridu v cukerném krmivu přiměřená. Například Azpiazu a kol. [58] uvedli pro meloun hladiny acetamidridu 483 $\mu\text{g/kg}$ v pylu a 6,4 $\mu\text{g/kg}$ v nektaru. Kromě toho Capela a kol. [59] uvedli maximální hladiny acetamidridu 592 ppb a 180 ppb v pylu a nektaru. Námí zvolená dlouhodobá expozice acetamidridem v cukerném roztoku je tedy přiměřená.

Zásobní roztok acetamipridu byl připraven z analytického standardu PESTANAL (kat. č. 33674, Sigma-Aldrich) rozpuštěním 10 mg acetamipridu v 500 ml H₂O (rozpuštěnost acetamipridu ve vodě je 4,2 g/l), poté byl roztok rozdělen na alikvoty, které byly zamrazeny. Tímto postupem bylo možné snadno, opakovaně a přesně připravovat čerstvý acetamiprid v cukerném roztoku po celou dobu experimentální expozice přidáním 1 ml zásobního roztoku na 1 l cukerného roztoku. Během 30denní experimentální expozice bylo aplikováno celkem 13 čerstvě připravených dávek cukerného roztoku (kontrola) nebo cukerného roztoku s 20 µg/l acetamipridu (ošetření). Na konci experimentu byly sbírány líhnoucí se včely, které byly jednotlivě umístěny do zkumavek typu Eppendorf a okamžitě usmrceny a zamrazeny na suchém ledu, tedy při teplotě přibližně -70 °C. Rovněž byly odebrány matky, které byly také zamrazeny na suchém ledu. Biologické vzorky byly až do použití uchovávány v hlubokomrazicím boxu při teplotě -80 °C.

E. Analýzy:

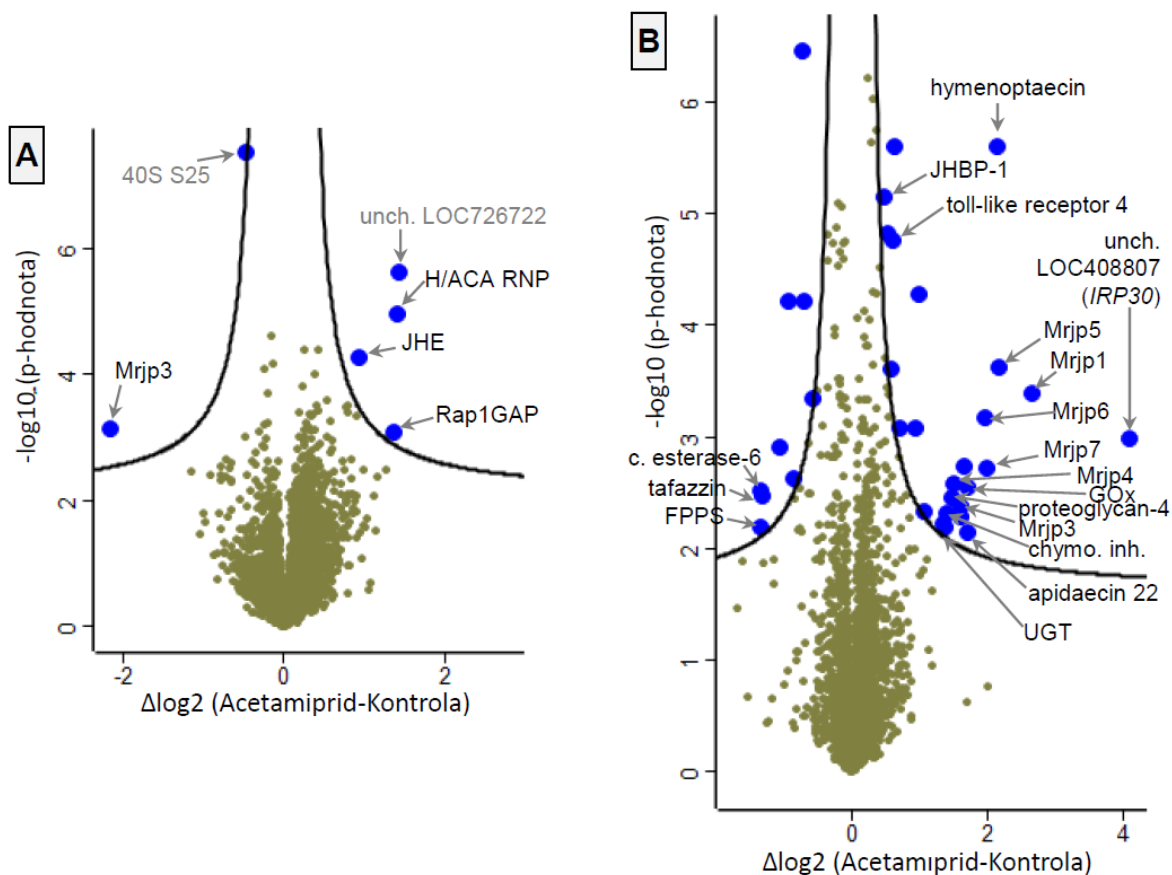
- **Proteomická analýza:** tryptické digesce z celých včel byly analyzovány pomocí nanokapalinové chromatografie (nanoLC) Dionex Ultimate 3000 ve spojení s hmotnostním spektrometrem Orbitrap Fusion Tribrid (Thermo). Analýza byla provedena metodou Data Independent Acquisition (DIA). Získaná hrubá data byla analyzována a kvantifikována pomocí softwaru Spectronaut verze 17.1. (Biognosys AG, Švýcarsko) [60]. Vyhledávání bylo provedeno pomocí analýzy directDIA s databází *Apis mellifera* (txid7460), která obsahovala 23 519 neredundantních RefSeq [61] sekvencí, které byly staženy z NCBI. Dále byla data vyhodnocena v programu Perseus verze 1.6.15.0 [62].

F. Výsledky:

- Celkem bylo analyzováno 6 líhnoucích se dělnic na úl, tedy celkem 18 v kontrole a 18 v expozici acetamipridu. Statistickým porovnáním 3 324 proteinů identifikovaných v líhnoucích se dělnicích bylo identifikováno 6 signifikantních proteinů. Matka byla z každého včelstva/úlu k dispozici jedna, každá z nich však byla analyzována třikrát. Statistickým porovnáním 4 023 proteinů z matek bylo identifikováno 34 signifikantně odlišně exprimovaných proteinů mezi kontrolou a expozicí acetamipridem. Více signifikantních proteinů bylo tedy identifikováno v matkách než v líhnoucích se

včelách. Výsledky signifikantních proteinů jsou uvedeny v tabulce 1 a jsou graficky znázorněny na obrázku 3.

Obrázek 3. Rozdílně exprimované proteiny identifikované u **A)** líhnoucích se mladušek a **B)** matek vizualizované ve volcano plotech. Všechny signifikantní proteiny (FDR = 0,05; $S_0 = 0,1$) jsou uvedeny v tabulce 1. Zde v grafu jsou zvýrazněny vybrané proteiny.



Tabulka 1. Rozdílně exprimované proteiny identifikované u **A)** líhnoucích se mladušek a **B)** matek. Signifikantně (FDR = 0,05; S0 = 0,1; randomizace = 1000) rozdílně exprimované proteiny byly identifikovány pomocí t-testu založeného na permutaci. Grafické znázornění je ve volcano plotech (obrázek 3). Proteiny v obou podskupinách byly seřazeny podle log₂ násobné změny, která byla vypočtena jako rozdíl mezi skupinou ošetřenou acetamidem a kontrolní skupinou (~ Δlog₂ (ACE-CON)). Jsou uvedeny kurátorované názvy proteinů, přístupová čísla v NCBI s hypertextovými odkazy a symboly genů.

A) signifikantně odlišně exprimované proteiny v líhnoucích se mladuškách

-log p	Δlog ₂ (ACE-CON)	Název proteinu	NCBI přístupové č.	Symbol genu
5,62	1,42	uncharacterized protein LOC726722	XP_026297324.1	<i>GB12330</i>
4,98	1,40	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 3	XP_001120529.2	<i>LOC724638</i>
3,10	1,36	rap1 GTPase-activating protein 1	XP_016769777.1	<i>Rapgap1</i>
4,28	0,91	juvenile hormone esterase precursor	NP_001011563.1	<i>Jhe</i>
7,55	-0,48	40S ribosomal protein S25	XP_006565645.2	<i>RpS25</i>
3,16	-2,17	major royal jelly protein 3 precursor	NP_001011601.1	<i>Mrjp3</i>

B) signifikantně odlišně exprimované proteiny v matkách

-log p	Δlog ₂ (ACE-CON)	Název proteinu	NCBI přístupové č.	Symbol genu
2,99	4,07	uncharacterized protein LOC408807	XP_397526.2	<i>IRP30</i>
3,40	2,64	major royal jelly protein 1 precursor	NP_001011579.1	<i>Mrjp1</i>
3,63	2,14	major royal jelly protein 5 precursor	NP_001011599.1	<i>Mrjp5</i>
5,62	2,13	hymenoptaecin preproprotein	NP_001011615.1	<i>LOC406142</i>
2,73	1,98	major royal jelly protein 7 precursor	NP_001014429.1	<i>Mrjp7</i>
3,18	1,94	major royal jelly protein 6 precursor	NP_001011622.1	<i>Mrjp6</i>
2,56	1,70	glucose oxidase	NP_001011574.1	<i>LOC406081</i>
2,16	1,69	apidaecins type 22 precursor	NP_001011642.1	<i>Apid22</i>
2,75	1,63	uncharacterized protein LOC724555	XP_026295090.1	<i>LOC724555</i>
2,30	1,59	methyltransferase-like protein 13	XP_026300784.1	<i>LOC412624</i>
2,39	1,58	major royal jelly protein 3 precursor	NP_001011601.1	<i>Mrjp3</i>
2,60	1,49	major royal jelly protein 4 precursor	NP_001011610.1	<i>Mrjp4</i>
2,47	1,45	proteoglycan 4	XP_006562848.2	<i>LOC726592</i>
2,33	1,39	chymotrypsin inhibitor-like	XP_006563421.1	<i>LOC113218518</i>
2,19	1,36	UDP-glucuronosyltransferase 1-8	XP_001120991.3	<i>LOC725106</i>
2,24	1,32	cytochrome b561 domain-containing protein 2	XP_003249671.1	<i>GB40148</i>
2,34	1,05	D-aspartate oxidase	XP_625069.1	<i>LOC552692</i>
4,29	0,98	repetitive proline-rich cell wall protein 2-like	XP_016772311.2	<i>LOC102655762</i>
3,08	0,92	luciferin 4-monooxygenase isoform X1	XP_001122105.4	<i>LOC726362</i>
3,09	0,68	uncharacterized protein LOC408280	XP_397488.4	<i>LOC408280</i>
5,61	0,62	alpha-aminoadipic semialdehyde synthase, mitochondrial	XP_624513.2	<i>LKR</i>
4,76	0,58	toll-like receptor 4 isoform X3	XP_001119831.2	<i>LOC724187</i>
3,62	0,57	FAST kinase domain-containing protein 4	XP_016767522.2	<i>GB50413</i>
4,83	0,52	39S ribosomal protein L11, mitochondrial	XP_003251076.1	<i>GB44586</i>
5,16	0,45	take-out-like carrier protein precursor	NP_001011640.1	<i>JHBP-1</i>
3,35	-0,59	apyrase precursor	NP_001127699.1	<i>LOC408474</i>
4,23	-0,72	zinc carboxypeptidase	XP_623922.2	<i>LOC551524</i>
6,47	-0,75	aminopeptidase N isoform X1	XP_006565547.1	<i>LOC551224</i>
2,63	-0,87	leucine-rich repeat-containing protein 40-like	XP_026295419.1	<i>LOC102654766</i>
4,23	-0,96	putative aminopeptidase-2	XP_026297457.1	<i>LOC409619</i>
2,92	-1,08	venom serine protease 34 isoform X1	XP_026300310.1	<i>SP34</i>
2,48	-1,35	tafazzin homolog	XP_006569667.1	<i>Taz</i>
2,52	-1,36	venom carboxylesterase-6-like	XP_006568129.2	<i>LOC413047</i>
2,21	-1,37	farnesyl pyrophosphate synthase	XP_026300405.1	<i>LOC726969</i>

G. Interpretace výsledků:

Hlavním cílem experimentu bylo určit, zda reálná expozice pesticidní látkou acetamidridem v koncentraci 2,5 µg/l způsobuje signifikantní změny ve včelstvech.

Mladušky. Identifikovaných odlišně exprimovaných proteinů v mladuškách vlivem acetamidridu bylo celkem 6, nicméně tyto změny mohou být důležitého charakteru. Změny identifikované v líhnoucích se včelách dohromady indikují ovlivnění životního cyklu včel, což může mít důsledky pro plnění role včelích dělnic v úlu i mimo úl a může být ovlivněna délka jejich života. Některé ovlivněné proteiny (H/ACA RNP; Rap1GAP indikuje ovlivnění spojené s telomery, ty jsou v oblasti DNA na koncích chromozomů, které chrání geny a regulují stárnutí [63–67]. Samotné histony však na proteinové úrovni signifikantně ovlivněny nebyly. Změny v proteinu souvisejícím s hladinami juvenilního hormonu (juvenile hormone esterase precursor) mohou znamenat ovlivnění vývoje metamorfózy, jejíž ovlivnění indikuje také změna v abundanci proteinu Mrjp3. Mrjp3 je sice znám jako jeden z „královských proteinů“ mateří kašičky, ale ovlivňuje také RNA, chování a životní cyklus včel. Snížení hladin Mrjp3 vedlo k ovlivnění přechodu krmiček na létavky [68]. Celkově tedy mohou tyto změny znamenat ovlivnění chování včel v úlu, jako je konkrétně různá doba plnění funkcí dělnic ve včelstvu.

Matky (královny). V matkách vystavení včelstva acetamidridu vyvolalo 34 signifikantně odlišných proteinů. Většina z nich je spojena s imunitou včel a největší skupina ovlivněných proteinů se řadí mezi hlavní v mateří kašičce (Mrjp 1-4 a 6-7; Mrjp – major royal jelly proteiny, česky: královské proteiny). V mateří kašičce se však vyskytují i další rozdílně exprimované proteiny v experimentu. Jsou jimi glukóza oxidáza (známá také jako notatin) a antimikrobiální peptid hymenoptaecin. Abundance všech těchto proteinů se vlivem acetamidridu zvýšila, a to v rozsahu log₂ násobné změny 1,69 až 2,64. Tento výsledek znamená, že vystavení včelstva acetamidridu v podstatě vedlo ke zvýšení zastoupení proteinů mateří kašičky v matkách a také zvýšení imunitní odpovědi. Navíc byla zvýšena exprese dalšího antimikrobiálního peptidu apidaecins type 22. Zvýšený byl i toll-like receptor 4. Změny v těchto uvedených proteinech, ale i několika dalších, tedy znamenají, že acetamidrid aktivoval imunitní odpověď v matkách. Aktivace imunitní odpovědi malými dávkami pesticidů a

také např. neonikotinoidem thiaklopridem, který je v podobné podskupině neonikotinoidů jako acetamiprid, byla dříve sledována [69]. Podobně jako v případě mladušek je potřeba si uvědomit, že některé Mrjp jsou spojovány i s dalšími funkcemi, konkrétně Mrjp1 a Mrjp3, které mohou ovlivňovat chování [70–72]. Dále byla upregulovaná detoxikace UDP-glukuronosyltransferásami, což souhlasí také dřívějšími experimenty včel s thiaklopridem [69]. Jednou z důležitých změn v matkách je také snížená exprese farnesyl pyrofosfát syntázy (FPPS), což značí ovlivnění mevalonátové dráhy trochu jiným způsobem, než jak bylo sledováno pro imidaklopid u čmeláků [73]. Potlačení FPPS může mít pro včely významné důsledky, jelikož je napojena na syntézu hormonů, zejm. juvenilního hormonu [74]. I jiné změny v proteinech, jako carboxylesterase-6-like či take-out-like carrier protein precursor [75] značí ovlivnění hospodaření s juvenilním hormonem. Kromě těchto zmíněných ovlivněných proteinů byly v matkách ovlivněny i další proteiny, které mohou mít jistý konkrétní důsledek, např. jako tafazzin, který by mohl znamenat pohybové problémy [76]. Hlavní zjištěné souvislosti vlivu však vedou k aktivované imunitní odpovědi, aktivované detoxikaci pomocí UDP-glukuronosyltransferás a ovlivnění syntézy a rovnováhy juvenilního hormonu.

H. Závěr:

Výsledky provedeného experimentu prokázaly, že vystavení včelstev nízkým koncentracím acetamipridu v náhradním krmivu cukerného roztoku mají vliv na expresi proteinů v líhnoucích se mladuškách a také v matkách. Provedená expozice acetamipridem se pohybovala na spodní hranici jeho přítomnosti v nektaru a pylu, a proto lze provedenou expozici možné považovat za realistickou. Změny v matkách vyvolaly obdobný efekt hned v několika ohledech, jako způsobily včelám subletální expozice jiným pesticidům, zejména thiaklopridu. Zvláště patrným efektem acetamipridu na matky je aktivace imunitní odpovědi, zvýšení detoxifikace UDP-glukuronosyltransferázami či ovlivnění rovnováhy juvenilního hormonu. V případě líhnoucích se včel výsledky naznačují negativně ovlivněný vývoj včel a možné ovlivnění životního cyklu včel v úlu.

Zjištěné změny mohou mít důsledek pro celé včelstvo. Nové dělnice líhnoucí se s predispozicí pro negativně ovlivněné chování a změny plnění rolí v úlu ovlivní celé včelstvo, a to od krmení plodu a matky přes sběr potravy. Zdravá a fungující matka je klíčovým prvkem pro včelstvo, proto je její ovlivnění acetamidem potenciálně závažného charakteru. U matky je expozice skrze dělnice, které ji krmí mateří kašičkou. Dělnice analyzované v momentu líhnutí byly vystaveny acetamipridu pouze v larválním stádiu skrze krmení.

Celkově lze z jednoho pohledu považovat účinky expozice acetamipridu za určité poškození včelstva, ale změny lze také považovat za méně závažné, dokud nebudou potvrzeny biologické důsledky. V budoucnu by bylo potřeba dále testovat, zda pozorované změny mohou ovlivnit i) jednu generaci dělnic včely medonosné a/nebo ii) trvale celé včelstvo (tj. zda jsou účinky trvalé a matka je nevratně ovlivněna). Měli bychom uvažovat, zda jsou sledované změny reverzibilní v nepřítomnosti acetamipridu, resp. vymizí po jeho odstranění po předchozí expozici.

V budoucnu by bylo důležité také testovat, zda existuje synergický účinek na včely mezi acetamidem a dalšími látkami, zejm. fungicidy. Pokud acetamid ovlivňuje imunitu včel, zejm. matek je taková možnost reálná.

5. Srovnání novosti metodiky

Metodika navazuje na předchozí metodiky prvního autora a přináší nové prvky do hodnocení rizik pesticidů na včelu medonosnou. Umožňuje zaměřit se na subletální chronický vliv pesticidů na včely, přičemž zjištěný vliv na jedince je interpretován z pohledu ovlivnění celého včelstva se zohledněním jeho vysoce eusociálního uspořádání. Toto je důležitým novým prvkem, který je požadován v moderním vícestupňovém hodnocení rizik pesticidů na včely. Expozice včelstva pesticidům v určitém období může ovlivnit určitou část dělnic nebo jejich určitou generaci, to však bylo běžně považováno za oslabení včelstva, se kterým by se mělo časem vyrovnat. Novým moderním prvkem je zhodnocení následků expozice, které mohou ovlivnit včelstvo ve větší míře pokud jsou trvalejšího charakteru. Zásadní je hodnocení expozice včelstva odpovídající reálným subletálním koncentracím/dávkám v krmivu a odvození vyvolaného komplexního vlivu na včelstvo skrze zjištěné změny v matkách a líhnoucích se dělnicích.

Metodika se nově zaměřuje na analýzy matek, které mohou být kontaminované pesticidy prakticky pouze formou mateří kašičky. Potenciální ovlivnění matek expozicí včelstva pesticidy je zásadní informace pro hodnocení rizik z důvodu centrálního ovlivnění celého včelstva. Značný význam tohoto hodnocení je vzhledem ke specifické formě ovlivnění matek. Matky včely medonosné jsou totiž krmeny výhradně mateří kašičkou produkovanou dělnicemi krmičkami, což odráží vysoce eusociální uspořádání včelstva. Dále jsou analýzy zaměřeny na líhnoucí se dělnice, které jsou přímému působení pesticidů vystaveny v larválním stádiu jen po dobu pěti dní, z toho však přibližně polovinu doby formou mateří kašičky a druhou polovinu včelím chlebem (pergou). Včely před koncem vývoje prakticky 2 týdny nepřijímaly potravu a tedy ani další kontaminanty, jelikož byly uzavřeny v buňce, takže pokud je zjištěno jejich ovlivnění, znamená to problém pro tyto jedince, ale i pro celé včelstvo. Dle typu a rozsahu zjištěných změn takové dělnice mohou mít ovlivněnou délku života, ale může být také negativně ovlivněna jejich role ve včelstvu. Generace takto ovlivněných včel pak naruší fungování celého včelstva, např. protože mohou „špatně“ krmit další dělnice a případně i matku. Mohou se také potenciálně vyskytnout problémy při shánění potravy, když včely dospějí do stádia létavek. V konkrétním příkladu provedení metodiky jsou takové vlivy demonstrovány na expozici acetamipridu. Přičemž změny v dělnicích a matkách byly analyzovány vysokokapacitním proteomickým přístupem. (Alternativní a doplňkové analýzy však mohou představovat i jiné přístupy jako transkriptomiku či metabolomiku nebo integraci různých metodických přístupů.) V matkách acetamiprid způsobil aktivaci imunitní odpovědi, ale i další

změny. V dělnicích se konkrétní zjištěné změny mohou projevit na životním cyklu a chování včel ve včelstvu, což jsou negativní vlivy na necílové organismy obecně přisuzované neonikotinoidům. Dle metodiky se doporučuje na základě takovýchto zjištěných výsledků navrhovat ověřovací experimenty, a to ve smyslu, zda jsou změny vratné a do jaké míry se nakonec projeví na biologické úrovni.

6. Uplatnění metodiky

Metodika má uplatnění v ochraně zdraví včely medonosné před dopady používání pesticidů. Metodika umožňuje odhalování účinků pesticidů, které není možné odhalit běžnými biologickými, ale často ani sofistikovanými analytickými přístupy. Použitím metodiky lze odhalit škodlivé vlivy pesticidů na včelstvo, které mohou mít důsledky na eusociální uspořádání včelstva. Obdobné způsoby hodnocení jsou požadovány v moderním víceúrovňovém hodnocení rizik pesticidů na včely v Evropské unii. Výsledky, které lze získat aplikací metodiky, jsou požadovány světovou vědeckou komunitou a také orgány, které se zabývají ztrátami včel a hodnocením rizik pesticidů na včely i další necílové organismy. Proto je uplatnění na evropské úrovni např. skrze Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) a Evropskou agenturu pro životní prostředí (EEA) a na úrovni Česka skrze jednotlivá ministerstva a kompetentní orgány státní správy, zejména Ministerstvo zemědělství ČR (MZe ČR) a Ministerstvo životního prostředí ČR (MŽP ČR). Uplatnění je také ve výzkumné či vzdělávací činnosti. Celkově se metodika uplatní při posuzování rizik pesticidů na včely a prostředí.

Metodika může přispět k zajištění udržitelného opylení různých rostlin a má tedy konkrétně vztah k Úmluvě o biologické rozmanitosti (Convention on Biological Diversity, CBD) [77], která patří k nejvýznamnějším mezinárodním mnohostranným úmluvám v oblasti životního prostředí. Metodika je také v souladu s dnes aktuální Novou dohodou pro opylovače [78], která se zabývá úbytkem opylovačů a opatřeními pro zlepšení jejich ochrany. V uživatelské sféře se tak metodika uplatní při ochraně komerčních opylovačů a potenciálně i přirozených opylovačů, protože efekty sledované na včele medonosné jsou do jisté míry a případně s modifikacemi aplikovatelné i na jiné druhy. Eliminace negativního vlivu POR je velmi důležitou součástí používání POR a celkové zemědělské produkce. Správnou definicí rizik POR je možné lépe chránit společenstva opylovačů, která představují nástroje ekosystémových služeb biodiverzity a také zemědělské produkce.

7. Ekonomické přínosy metodiky

Postupy uvedené v metodice se týkají zejména ochrany včel před negativními vlivy POR a v nich obsažených účinných látek. Postupy uvedené v metodice mají potenciál přispět ke snížení ztrát včelstev, jejichž hodnoty v korunách českých jsou každoročně jen v Česku stamiliónové. Náklady na modelový experiment s provedenými analýzami se pohybují v částce přibližně 200-300 tis. Kč. Aplikace metodiky do hodnocení rizik pesticidů dokáže předejít problémům, které vynaložené náklady vysoce převažují. Škody způsobené skrytými nežádoucími účinky některých pesticidů se na životním prostředí projevují v těžko vyčíslitelných hodnotách. Pokud existuje vážný nežádoucí vliv pesticidů ohrožující zdraví matek a vývoj včel, je možné se domnívat, že může existovat i relevantní riziko pro zdraví člověka. Ekonomické přínosy metodiky jsou také v potravinové bezpečnosti.

8. Publikace autorů, které předcházely metodice

Erban T. (2024) Škodí acetamiprid včelám? *Mod. včelař* 21(7):26–27.

Erban T., Markovic M., Sopko B. (2024) Sublethal acetamiprid exposure induces immunity, suppresses pathways linked to juvenile hormone synthesis in queens and affects cycle-related signaling in emerging bees. *Environ. Pollut.* 349:123901. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.123901>

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. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128056>

Erban T., Sopko B., Talacko P., Harant K., Kadlikova K., Halesova T., Riddellova K., Pekas A. (2019) Chronic exposure of bumblebees to neonicotinoid imidacloprid suppresses the entire mevalonate pathway and fatty acid synthesis. *J. Proteomics* 196:69–80. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.12.022>

Erban T. (2018) Nová metodika hodnocení rizik pesticidů pro včely pro 21. století. *Úroda* 66(8):40–42.

Erban T. (2018) Pro a proti používání pesticidů: potřeba nové metodiky hodnocení. *Úroda* 66(7):32–34.

Erban T., Kamler M., Kadlíková K., Markovič M., Titěra D., Seifrtová M., Halešová T. (2018) Nový přístup hodnocení suspektních otrav včel pesticidy: certifikovaná metodika. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha. ISBN 978-80-7427-252-3. https://www.vurv.cz/sites/File/2018_Certifikovana_metodika_Otravy_vcel_pesticidy.PDF

- Erban T., Kamler M., Šulcová K., Titěra D., Seifrtová M., Riddellová K., Hubert J., Hortová B., Halešová T. (2016) Hodnocení vlivu xenobiotik na včely v průběhu ontogeneze metodami proteomické, metabolomické a genomické analýzy: certifikovaná metodika. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha, 36 s. ISBN 978-80-7427-210-3. <https://www.vurv.cz/sites/File/Publications/ISBN978-80-7427-210-3.pdf>
- Erban T. (2020) Hodnocení otrav včel pesticidy. *Mod. včelař* 17(11):28–30.
- Erban T. (2020) Vliv pesticidů na úbytek opylovačů a úhyny včel. *Farmář* 26(2):20–22.
- Erban T. (2019) Problematika zákazu neonicotinoidů – nové poznatky o imidaklopridu. *AGRObase zprav.* 2019(srpen):16–17.
- Erban T. (2018) Potřeba nového přístupu hodnocení rizik pesticidů na včely. *Mod. včelař* 15(12):26–27.

9. Seznam citované literatury

1. Gray A., Adjlane N., Arab A., Ballis A., Brusbardis V., Douglas A. B., Cadahia L., Charrière J.-D., Chlebo R., Coffey M. F., et al. (2023) Honey bee colony loss rates in 37 countries using the COLOSS survey for winter 2019–2020: the combined effects of operation size, migration and queen replacement. *J. Apic. Res.* 62(2):204–210. <https://doi.org/10.1080/00218839.2022.2113329>
2. Bixby M., Scarlett R., Hoover S. E. (2023) Winter mortality, diversification, and self-sufficiency affect honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony profit in Canada: a model of commercial Alberta beekeepers. *J. Econ. Entomol.* 116(3):686–696. <https://doi.org/10.1093/jee/toad056>
3. Aurell D., Bruckner S., Wilson M., Steinhauer N., Williams G. R. (2024) A national survey of managed honey bee colony losses in the USA: results from the Bee Informed Partnership for 2020–21 and 2021–22. *J. Apic. Res.* 63(1):1–14. <https://doi.org/10.1080/00218839.2023.2264601>
4. Petruška M. (2023) Česko hlásí rekordné úhyny. *Dymák*. 17. dubna 2023. <https://www.dymak.online/cesko-hlasi-rekordne-uhyny/>
5. Traynor K. S., Rennich K., Forsgren E., Rose R., Pettis J., Kunkel G., Madella S., Evans J., Lopez D., vanEngelsdorp D. (2016) Multiyear survey targeting disease incidence in US honey bees. *Apidologie* 47(3):325–347. <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0431-0>
6. Traynor K. S., Mondet F., de Miranda J. R., Techer M., Kowallik V., Oddie M. A. Y., Chantawannakul P., McAfee A. (2020) *Varroa destructor*: a complex parasite, crippling honey bees worldwide. *Trends. Parasitol.* 36(7):592–606. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.04.004>
7. Warner S., Pokhrel L. R., Akula S. M., Ubah C. S., Richards S. L., Jensen H., Kearney G. D. (2024) A scoping review on the effects of *Varroa* mite (*Varroa destructor*) on global honey bee decline. *Sci. Total Environ.* 906:167492. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167492>
8. vanEngelsdorp D., Evans J. D., Saegerman C., Mullin C., Haubruge E., Nguyen B. K., Frazier M., Frazier J., Cox-Foster D., Chen Y., et al. (2009) Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS One* 4(8):e6481. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006481>
9. Johnson R. M., Ellis M. D., Mullin C. A., Frazier M. (2010) Pesticides and honey bee toxicity — USA. *Apidologie* 41(3):312–331. <https://doi.org/10.1051/apido/2010018>
10. Traynor K. S., Tosi S., Rennich K., Steinhauer N., Forsgren E., Rose R., Kunkel G., Madella S., Lopez D., Eversole H. et al. (2021) Pesticides in honey bee colonies: establishing a baseline for real world exposure over seven years in the USA. *Environ. Pollut.* 279:116566. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116566>
11. Insolia L., Molinari R., Rogers S. R., Williams G. R., Chiaromonte F., Calovi M. (2022) Honey bee colony loss linked to parasites, pesticides and extreme weather across the United States. *Sci. Rep.* 12:20787. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24946-4>
12. WOA (2024) Terrestrial animal health code: online access. World Organisation for Animal Health (WOAH), Paris. <https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-code-online-access/>

13. Barnett E. A., Charlton A. J., Fletcher M. R. (2007) Incidents of bee poisoning with pesticides in the United Kingdom, 1994–2003. *Pest Manag. Sci.* 63(11):1051–1057. <https://doi.org/10.1002/ps.1444>
14. 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. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128056>
15. Henry M., Béguin M., Requier F., Rollin O., Odoux J.-F., Aupinel P., Aptel J., Tchamitchian S., Decourtye A. (2012) A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* 336(6079):348–350. <https://doi.org/10.1126/science.1215039>
16. Runkel J. C. O., Becher M. A., Thorbek P., Osborne J. L. (2017) Modeling effects of honeybee behaviors on the distribution of pesticide in nectar within a hive and resultant in-hive exposure. *Environ. Sci. Technol.* 51(12):6908–6917. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04206>
17. Sponsler D. B., Johnson R. M. (2017) Mechanistic modeling of pesticide exposure: the missing keystone of honey bee toxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* 36(4):871–881. <https://doi.org/10.1002/etc.3661>
18. Crenna E., Jolliet O., Collina E., Sala S., Fantke P. (2020) Characterizing honey bee exposure and effects from pesticides for chemical prioritization and life cycle assessment. *Environ. Int.* 138:105642. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105642>
19. Erban T., Kamler M., Kadlíková K., Markovič M., Titěra D., Seifrtová M., Halešová T. (2018) Nový přístup hodnocení suspektních otrav včel pesticidy: certifikovaná metodika. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha. ISBN 978-80-7427-252-3. https://www.vurv.cz/sites/File/2018_Certifikovana_metodika_Otravy_vcel_pesticidy.PDF
20. Wu J. Y., Anelli C. M., Sheppard W. S. (2011) Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PLoS One* 6(2):e14720. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014720>
21. Staroň M., Allkassab A. T., Sabo R., Demková L., Valenčáková A., Michalko M., Legáth J., Pistorius J., Sabová L. (2024) Higher early than late-season residue load of pesticides in honey bee bread in Slovakia. *Apidologie* 55(4):41. <https://doi.org/10.1007/s13592-024-01079-3>
22. Ćirić J., Haneklaus N., Rajić S., Baltić T., Branković Lazić I., Đorđević V. (2022) Chemical composition of bee bread (perga), a functional food: a review. *J. Trace Elem. Min.* 2:100038. <https://doi.org/10.1016/j.jtemin.2022.100038>
23. Végh R., Csóka M., Mednyánszky Z., Sipos L. (2023) Pesticide residues in bee bread, propolis, beeswax and royal jelly – a review of the literature and dietary risk assessment. *Food Chem. Toxicol.* 176:113806. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.113806>
24. Free J. B., Spencer-Booth Y. (1959) The longevity of worker honey bees (*Apis mellifera*). *Proc. R. Entomol. Soc. A* 34(10–12):141–150. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1959.tb00230.x>
25. EFSA Scientific Committee, More M., Bampidis V., Benford D., Bragard C., Halldorsson T., Hernández-Jerez A., Bennekou S. H., Koutsoumanis K., Machera K., et al. (2021) A systems-based approach to the environmental risk assessment of multiple stressors in honey bees. *EFSA J.* 19(5):e06607. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6607>

26. Berenbaum M. R., Liao L.-H. (2019) Honey bees and environmental stress: toxicologic pathology of a superorganism. *Toxicol. Pathol.* 47(8):1076–1081. <https://doi.org/10.1177/0192623319877154>
27. Wu J. Y., Smart M. D., Anelli C. M., Sheppard W. S. (2012) Honey bees (*Apis mellifera*) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues exhibit increased susceptibility to *Nosema* (Microsporidia) infection. *J. Invertebr. Pathol.* 109(3):326–329. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.01.005>
28. Fine J. D., Corby-Harris V. (2021) Beyond brood: the potential impacts of insect growth disruptors on the long-term health and performance of honey bee colonies. *Apidologie* 52(3):580–595. <https://doi.org/10.1007/s13592-021-00845-x>
29. Tosi S., Nieh J. C. (2019) Lethal and sublethal synergistic effects of a new systemic pesticide, flupyradifurone (Sivanto®), on honeybees. *Proc. Biol. Sci.* 286(1900):20190433. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.0433>
30. Pettis J. S., Wilson W. T., Shimanuki H., Teel P. D. (1991) Fluvalinate treatment of queen and worker honey bees (*Apis mellifera* L) and effects on subsequent mortality, queen acceptance and supersedure. *Apidologie* 22(1):1–7. <https://doi.org/10.1051/apido:19910101>
31. Sokół R. (1996) Wpływ wielomiesięcznego pozostawiania Fluwarolu w ulu na rodzinę pszczelą. *Med. Wet.* 52(11):718–720.
32. Fell R. D., Tignor K. (2001) Miticide effects on the reproductive physiology of queens and drones. *Am. Bee J.* 141(12):888–889.
33. Haarmann T., Spivak M., Weaver D., Weaver B., Glenn T. (2002) Effects of fluvalinate and coumaphos on queen honey bees (Hymenoptera: Apidae) in two commercial queen rearing operations. *J. Econ. Entomol.* 95(1):28–35. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-95.1.28>
34. Collins A. M., Pettis J. S., Wilbanks R., Feldlaufer M. F. (2004) Performance of honey bee (*Apis mellifera*) queens reared in beeswax cells impregnated with coumaphos. *J. Apic. Res.* 43(3):128–134. <https://doi.org/10.1080/00218839.2004.11101123>
35. Pettis J. S., Collins A. M., Wilbanks R., Feldlaufer M. F. (2004) Effects of coumaphos on queen rearing in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie* 35(6):605–610. <https://doi.org/10.1051/apido:2004056>
36. Walsh E. M., Sweet S., Knap A., Ing N., Rangel J. (2020) Queen honey bee (*Apis mellifera*) pheromone and reproductive behavior are affected by pesticide exposure during development. *Behav. Ecol. Sociobiol* 74(3):33. <https://doi.org/10.1007/s00265-020-2810-9>
37. Milone J. P., Taryp D. R. (2021) Effects of developmental exposure to pesticides in wax and pollen on honey bee (*Apis mellifera*) queen reproductive phenotypes. *Sci. Rep.* 11:1020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80446-3>
38. Traynor K. S., vanEngelsdorp D., Lamas Z. S. (2021) Social disruption: sublethal pesticides in pollen lead to *Apis mellifera* queen events and brood loss. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 214:112105. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112105>
39. Pineaux M., Grateau S., Lirand T., Aupinel P., Richard F.-J. (2023) Honeybee queen exposure to a widely used fungicide disrupts reproduction and colony dynamic. *Environ. Pollut.* 322:121131. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121131>
40. Erban T., Kamler M., Šulcová K., Titěra D., Seifrtová M., Riddellová K., Hubert J., Hortová B., Halešová T. (2016) Hodnocení vlivu xenobiotik na včely v průběhu ontogeneze metodami

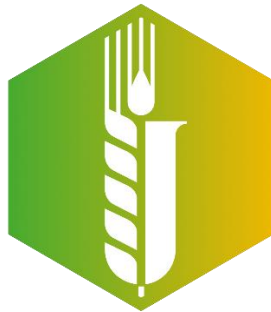
proteomické, metabolomické a genomické analýzy: certifikovaná metodika. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha, 36 s. ISBN 978-80-7427-210-3. <https://www.vurv.cz/sites/File/Publications/ISBN978-80-7427-210-3.pdf>

41. Erban T., Vaclavikova M., Tomesova D., Halesova T., Hubert J. (2019) *tau*-Fluvalinate and other pesticide residues in honey bees before overwintering. *Pest Manag. Sci.* 75(12):3245–3251. <https://doi.org/10.1002/ps.5446>
42. Anandhi G., Iyapparaja M. (2024) Systematic approaches to machine learning models for predicting pesticide toxicity. *Heliyon* 10(7):e28752. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e28752>
43. Cui J.-L., Li H., He Q., Jin B.-Y., Liu Z., Zhang X.-M., Zhang L. (2024) Integrating classic AI and agriculture: a novel model for predicting insecticide-likeness to enhance efficiency in insecticide development. *Comput. Biol. Chem.* 112:108113. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2024.108113>
44. Gao Y.-Y., Zhao W., Huang Y.-Q., Kumar V., Zhang X., Hao G.-F. (2024) *In silico* environmental risk assessment improves efficiency for pesticide safety management. *Sci. Total Environ.* 908:167878. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167878>
45. Gunawardana Y., Niranjana M. (2013) Bridging the gap between transcriptome and proteome measurements identifies post-translationally regulated genes. *Bioinformatics* 29(23):3060–3066. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt537>
46. Woodcock B. A., Isaac N. J. B., Bullock J. M., Roy D. B., Garthwaite D. G., Crowe A., Pywell R. F. (2016) Impacts of neonicotinoid use on long-term population changes in wild bees in England. *Nat. Commun.* 7:12459. <https://doi.org/10.1038/ncomms12459>
47. Erban T. (2024) Imidaklopid zvyšuje riziko nemocí včel, ale zemědělci mimo EU jej nadále používají. *AGRObase zprav.* 2024(leden):34–35. https://www.akcr.cz/data_ak/24/a/AGRObase2401.pdf
48. Evropská komise (EK) (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, thiamethoxam a imidaklopid, a kterým se zakazuje použití a prodej osiva ošetřeného přípravky na ochranu rostlin obsahujícími uvedené účinné látky. *Úř. věst. E. U. L* 139:12–26. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?qid=1484755697880&uri=CELEX:32013R0485>
49. European Commission (EC) (2023) Neonicotinoids. Directorate-General for Health and Food Safety, Bruxelles. https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/approval-active-substances/renewal-approval/neonicotinoids_en
50. Soudní dvůr Evropské unie (SDEU) (2023) Rozsudek Soudního dvora (prvního senátu) ze dne 19. ledna 2023. Pesticide Action Network Europe ASBL a další v. État belge. Žádost o rozhodnutí o předběžné otázce podaná Conseil d'État (Belgie). Řízení o předběžné otázce – Životní prostředí – Nařízení (ES) č. 1107/2009 – Uvádění přípravků na ochranu rostlin na trh – Článek 53 odst. 1 – Mimořádné stavy při ochraně rostlin – Výjimka – Působnost – Osivo ošetřené přípravky na ochranu rostlin – Neonikotinoidy – Účinné látky představující zvýšená rizika pro včely – Zákaz uvádění osiva ošetřeného přípravky na ochranu rostlin obsahujícími takové účinné látky na trh a jeho venkovního používání – Prováděcí nařízení (EU) 2018/784 a 2018/785 – Nepoužitelnost výjimky – Ochrana zdraví lidí a zvířat a životního prostředí – Zásada

- obezřetnosti. Věc C-162/21. Dokument 62021CJ0162, ECLI:EU:C:2023:30. Soudní dvůr Evropské unie (SDEU) <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX:62021CJ0162>
51. Evropská komise (EK) (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 thiakloprid a kterým se mění příloha prováděcího nařízení Komise (EU) č. 540/2011. Úř. věst. E. U. L 8:8–11. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX:32020R0023>
 52. European Food Safety Authority (EFSA) (2016) Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance acetamiprid. EFSA J. 14(11):e04610. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4610>
 53. EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR), Jerez A. H., Adriaanse P., Berny P., Coja T., Duquesne S., Focks A., Marinovich M., Millet M., Pelkonen O., et al. (2022) Statement on the active substance acetamiprid. EFSA J. 20(1):e07031. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7030>
 54. Goulson D. (2013) REVIEW: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. J. Appl. Ecol. 50(4):977–987. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12111>
 55. Tosi S., Nieh J. C., Sgolastra F., Cabbri R., Medrzycki P. (2017) Neonicotinoid pesticides and nutritional stress synergistically reduce survival in honey bees. Proc. Biol. Sci. 284(1869):20171711. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.1711>
 56. Chole H., de Guinea M., Woodard S. H., Bloch G. (2022) Field-realistic concentrations of a neonicotinoid insecticide influence socially regulated brood development in a bumblebee. Proc. Biol. Sci. 289(1987):20220253. <https://doi.org/10.1098/rspb.2022.0253>
 57. Manjon C., Troczka B. J., Zaworra M., Beadle K., Randall E., Hertlein G., Singh K. S., Zimmer C. T., Homem R. A., Lueke B., et al. (2018) Unravelling the molecular determinants of bee sensitivity to neonicotinoid insecticides. Curr. Biol. 28(7):1137–1143.e1135. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.02.045>
 58. Azpiazu C., Bosch J., Viñuela E., Medrzycki P., Teper D., Sgolastra F. (2019) Chronic oral exposure to field-realistic pesticide combinations via pollen and nectar: effects on feeding and thermal performance in a solitary bee. Sci. Rep. 9:13770. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50255-4>
 59. Capela N., Xu M., Simões S., Azevedo-Pereira H. M. S. V., Peters J., Sousa J. P. (2022) Exposure and risk assessment of acetamiprid in honey bee colonies under a real exposure scenario in *Eucalyptus* sp. landscapes. Sci. Total Environ. 840:156485. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156485>
 60. Bruderer R., Bernhardt O. M., Gandhi T., Miladinović S. M., Cheng L.-Y., Messner S., Ehrenberger T., Zanotelli V., Butscheid Y., Escher C., et al. (2015) Extending the limits of quantitative proteome profiling with data-independent acquisition and application to acetaminophen-treated three-dimensional liver microtissues. Mol. Cell. Proteomics 14(5):1400–1410. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.044305>
 61. O'Leary N. A., Wright M. W., Brister J. R., Ciuffo S., Haddad D., McVeigh R., Rajput B., Robbertse B., Smith-White B., Ako-Adjei D., et al. (2016) Reference sequence (RefSeq)

- database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res.* 44(D1):D733–D745. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1189>
62. Tyanova S., Temu T., Sinitcyn P., Carlson A., Hein M. Y., Geiger T., Mann M., Cox J. (2016). The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat. Methods* 13 (9): 731–740. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3901>
63. Chen Y., Rai R., Zhou Z.-R., Kanoh J., Ribeyre C., Yang Y., Zheng H., Damay P., Wang F., Tsujii H., et al. (2011) A conserved motif within RAP1 has diversified roles in telomere protection and regulation in different organisms. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18(2):213–221. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1974>
64. Li F., Ge Y., Liu D., Songyang Z. (2020) The role of telomere-binding modulators in pluripotent stem cells. *Protein Cell* 11(1):60–70. <https://doi.org/10.1007/s13238-019-0651-y>
65. Hama T., Ferré-D'Amaré A. R. (2010) The box H/ACA ribonucleoprotein complex: interplay of RNA and protein structures in post-transcriptional RNA modification. *J. Biol. Chem.* 285(5):805–809. <https://doi.org/10.1074/jbc.R109.076893>
66. Lin P., Mobasher M. E., Hakakian Y., Kakarla V., Naseem A. F., Ziai H., Alawi F. (2015) Differential requirements for H/ACA ribonucleoprotein components in cell proliferation and response to DNA damage. *Histochem. Cell Biol.* 144(6):543–558. <https://doi.org/10.1007/s00418-015-1359-6>
67. Czekay D. P., Kothe U. (2021) H/ACA small ribonucleoproteins: structural and functional comparison between archaea and eukaryotes. *Front. Microbiol.* 12:654370. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.654370>
68. Fang Y., Feng M., Ma C., Rueppell O., Li J. (2023) Major royal jelly proteins influence the neurobiological regulation of the division of labor among honey bee workers. *Int. J. Biol. Macromol.* 225:848–860. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.11.150>
69. Bartling M. T., Thümecke S., Russert J. H., Vilcinskis A., Lee K.-Z. (2021) Exposure to low doses of pesticides induces an immune response and the production of nitric oxide in honeybees. *Sci. Rep.* 11:6819. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86293-0>
70. Maori E., Navarro I. C., Boncristiani H., Seilly D. J., Rudolph K. L. M., Sapetschnig A., Lin C.-C., Ladbury J. E., Evans J. D., Heeney J. L., Miska E. A. (2019) A secreted RNA binding protein forms RNA-stabilizing granules in the honeybee royal jelly. *Mol. Cell* 74(3):598–608.e596. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.03.010>
71. Drapeau M. D., Albert S., Kucharski R., Prusko C., Maleszka R. (2006) Evolution of the yellow/major royal jelly protein family and the emergence of social behavior in honey bees. *Genome Res.* 16(11):1385–1394. <https://doi.org/10.1101/gr.5012006>
72. Buttstedt A., Moritz R. F. A., Erler S. (2013) More than royal food - major royal jelly protein genes in sexuals and workers of the honeybee *Apis mellifera*. *Front. Zool.* 10(1):72. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-10-72>
73. Erban T., Sopko B., Talacko P., Harant K., Kadlikova K., Halesova T., Riddellova K., Pekas A. (2019) Chronic exposure of bumblebees to neonicotinoid imidacloprid suppresses the entire mevalonate pathway and fatty acid synthesis. *J. Proteomics* 196:69–80. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.12.022>
74. Picard M.-E., Cusson M., Sen S. E., Shi R. (2021) Rational design of Lepidoptera-specific insecticidal inhibitors targeting farnesyl diphosphate synthase, a key enzyme of the juvenile

- hormone biosynthetic pathway. *J. Pestic. Sci.* 46(1):7–15. <https://doi.org/10.1584/jpestics.D20-078>
75. Chertemps T., François A., Durand N., Rosell G., Dekker T., Lucas P., Maïbèche-Coisne M. (2012) A carboxylesterase, esterase-6, modulates sensory physiological and behavioral response dynamics to pheromone in *Drosophila*. *BMC Biol.* 10:56. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-56>
76. Damschroder D., Reynolds C., Wessells R. (2018) *Drosophila tafazzin* mutants have impaired exercise capacity. *Physiol. Rep.* 6(3):e13604. <https://doi.org/10.14814/phy2.13604>
77. Convention on Biological Diversity (CBD). (2005). Section IX: Nairobi Final Act of the Conference for the Adoption of the Agreed Text of the Convention on Biological Diversity. *In: Secretariat of the Convention on Biological Diversity (ed.) Handbook of the Convention on Biological Diversity Including its Cartagena Protocol on Biosafety, 3rd edn.* Secretariat of the Convention on Biological Diversity, Montreal, pp. 399–408. <https://www.cbd.int/doc/handbook/cbd-hb-09-en.pdf>
78. Evropský hospodářský a sociální výbor (EHSV). (2023). Stanovisko Evropského hospodářského a sociálního výboru k sdělení Komise Evropskému parlamentu, Radě, Evropskému hospodářskému a sociálnímu výboru a Výboru regionů o revizi iniciativy EU týkající se opylovačů – Nová dohoda pro opylovače (COM(2023) 35 final). EESC 2023/01362, dokument 52023AE1362. Úřední věstník Evropské unie C 349: 173–178. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX:52023AE1362>



ISBN 978-80-7427-435-0



ISBN 978-80-7427-435-0