



Tomáš Erban a kol.

Metodika pro hodnocení interakce mezi střevními parazity včely medonosné a pesticidy

METODIKA

NmetS



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

2024

Metodika pro hodnocení interakce mezi střevními parazity včely medonosné a pesticidy

Tomáš Erban a kolektiv

Autorský tým:

Tomáš Erban^a 


Julie Chalupníková^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 978-80-7427-432-9

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 160610/2024.

O uplatnění metodiky je uzavřena smlouva QK1910018m01 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.

Anotace: Včelstva (*Apis mellifera*) jsou vystavena celé řadě patogenů, které představují potenciální riziko pro jejich zdraví. Rizikovými faktory jsou jednak přirození nepřátelé včel, které představuje celé spektrum patogenních bakterií, virů a parazitů. Dále mají na zdraví včel vliv různé environmentální faktory, jako jsou polutanty či klimatické podmínky. V posledních letech jsou v problematice hodnocení zdraví včel zdůrazňovány interakce mezi různými faktory, jejichž podstatu však není většinou snadné identifikovat. Předložená metodika se zaměřuje na hodnocení rizika interakce mezi střevním patogenem a pesticidy. Sledování vlivu těchto interakcí „vyššího řádu“ na včely je značně zdůrazňováno vědeckou komunitou a představuje výzvu pro identifikace příčin ztrát včelstev. Konkrétně bylo v modelovém provedení metodického postupu využito poměrně nedávno objeveného patogenu včel *Lotmaria passim*. Metodika reaguje na potřebu komplexního hodnocení lidské činnosti, konkrétně používání pesticidů, na necílové organismy. Potenciální uplatnění je na evropské úrovni skrze Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) a Evropskou agenturu pro životní prostředí (EEA). Na úrovni Česka je možné uplatnění skrze jednotlivá ministerstva a kompetentní orgány státní správy, zejména Ministerstva zemědělství ČR (MZe ČR) a Ministerstva životního prostředí ČR (MŽP ČR), která danou problematiku rizik pesticidů v souvislosti se stavy opylovačů řeší. Metodika může přispět k zajištění udržitelného opylení různých rostlin a má tedy konkrétně vztah k Úmluvě o biologické rozmanitosti, která patří k nejvýznamnějším mezinárodním mnohostranným úmluvám v oblasti životního prostředí. Metodika je také v souladu s Novou dohodou pro opylovače, která se zabývá úbytkem opylovačů a opatřeními pro zlepšení jejich ochrany.

Title: Methodology for assessing the interaction between intestinal parasites of honey bees and pesticides

Annotation: Honey bee (*Apis mellifera*) colonies are exposed to a number of pathogens that pose a potential risk to their health. Risk factors include natural enemies of bees, which represent a wide range of pathogenic bacteria, viruses and parasites. In addition, various environmental factors such as pollutants or climatic conditions have an impact on bee health. In recent years, interactions between different factors have been highlighted in the assessment of bee health, but the nature of these interactions is usually not easy to identify. This methodology focuses on the risk assessment of the interaction between an intestinal pathogen and pesticides. Monitoring the effects of these „higher-order“ interactions on bees has been emphasized by the scientific community and poses a challenge in identifying the causes of colony losses. Specifically, the relatively recently discovered bee pathogen *Lotmaria passim* was used in a model implementation of the methodological procedure. The methodology responds to the need for a comprehensive assessment of human activities, specifically pesticide use, on non-target organisms. A potential application is at European level through the European Food Safety Authority (EFSA) and European Environment Agency (EEA). At the level of Czechia, it can be implemented through individual ministries and competent state administration bodies, in particular the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (MZe ČR) and the Ministry of the Environment of the Czech Republic (MŽP ČR), which address the issue of pesticide risks in relation to pollinators. The methodology can contribute to ensuring sustainable pollination of different plants and is therefore specifically related to the Convention on Biological Diversity, which is one of the most important international multilateral environmental conventions. The methodology is also in line with the New Deal for Pollinators, which addresses the decline of pollinators and measures to improve their conservation.

Obsah

1. Úvod.....	- 1 -
2. Cíl metodiky.....	- 3 -
3. Vlastní popis metodiky	- 3 -
3.1. Experimentální klíčka	- 3 -
3.2. Krmivo pro včely	- 5 -
3.3. Výběr látky nebo POR pro hodnocení a nastavení experimentální koncentrace	- 7 -
3.4. Včely pro experimenty.....	- 8 -
3.5. Střevní parazit pro expozici včel.....	- 9 -
3.6 Průběh experimentu v klíčce a odběr vzorků.....	- 11 -
3.7. Schematické znázornění metodického postupu	- 13 -
3.8. Analýzy vzorků.....	- 13 -
3.8.1. Kvantifikace patogenu.....	- 14 -
3.8.2. Vyhodnocení a interpretace dat.....	- 14 -
4. Příklad provedení metodiky.....	- 15 -
5. Srovnání novosti metodiky	- 24 -
6. Uplatnění metodiky.....	- 24 -
7. Ekonomické přínosy metodiky	- 25 -
8. Publikace autora, které předcházely metodice.....	- 25 -
9. Seznam citované literatury.....	- 27 -

1. Úvod

Hodnocení rizik pesticidů na včely je zpravidla zaměřeno na ovlivnění samotného mnohobuněčného organismu. Výzkumné práce však ukázaly, že vliv pesticidů na živočichy může být také nepřímý předahující jejich známý mechanismus účinku. Byl popsán nežádoucí vliv pesticidů na včely skrze mikroorganismy, které jsou se včelami asociované. Klíčové mikroorganismy zahrnují symbiotické bakterie obývající střevo. Označujeme je jako prospěšný mikrobiom včel [1]. Pesticidy mohou mít na včely negativní vliv, protože působí na mikroorganismy spojené se včelou medonosnou (*Apis mellifera*). Vystavení včel pesticidům může ovlivnit prospěšný střevní bakteriální mikrobiom, což může vést k dysbióze [2–5] a navíc v té souvislosti mohou být ovlivněny imunitní dráhy včel [6]. Ve střevě včel se nevyskytují pouze prospěšné bakterie, ale mohou se v něm vyskytovat také patogenní mikroorganismy. Pesticidy můžou interagovat také s patogeny včel a v případě souběžné expozice včel patogenům a některým pesticidům může dojít též k dysbióze [7, 8]. V současnosti je jednou z předních výzev v ochraně včel studium hodnocení rizik na úrovni hostitel–patogen [9, 10]. Jelikož jsou včely vystaveny řadě patogenů, je potřeba provádět kontrolované experimenty k posouzení dopadu konkrétních interakcí na úrovni hostitel–patogen–pesticid, a to se zohledněním reálných expozičních dávek. Experimenty by navíc měly být přizpůsobeny patogenům a testovaným pesticidům, protože biologické procesy, které tyto faktory ovlivňují jednotlivě a společně, se mohou zásadně lišit zejména vzhledem k potenciálním synergickým či dokonce antagonistickým účinkům.

Včele medonosné mohou škodit různé patogeny a škůdci z různých skupin, včetně virů, bakterií, hub, protistů, roztočů i hmyzu [11–13]. Pro účely metodiky se však soustředíme na střevní parazity. V minulosti byl sledován vliv jednoho z neonikotinoidů imidaklopridu na početnost střevních mikrosporidií *Nosema* spp. (*Vairimorpha* spp.) [14]; *Nosema ceranae* (hmyzomorka východní) a *Nosema apis* (hmyzomorka včelí) byly překlasifikovány na *Vairimorpha ceranae* a *Vairimorpha apis* [15], i když o přejmenování panují pochybnosti [16]. Nosemóza je obecně známé infekční onemocnění včel, které postihuje dospělé včely a je také nazýváno včelí úplavice. Ve střevě včel se vyskytují také další paraziti, jako zástupci řádu trypanozomy (Trypanosomatida). Dlouho byla za zástupce této skupiny parazitů vyskytujícího se ve včelách označována *Crithidia mellificae*, jejíž první popisy sahají do roku 1967 [17]. Později však bylo zjištěno, že popis trypanosomatida ve včele medonosné byl nepřesný, jelikož byl tradičně uznávaný parazit *C.*

mellificae odlišen od nově popsaného a v daný moment globálně výrazně dominantního trypanosomatida *Lotmaria passim*. Pro rozlišení těchto dvou druhů bylo potřeba specifických molekulárních metod [18]. Lze se tedy domnívat, že dřívější výzkumy pojednávající o výskytu *C. mellificae* se ve skutečnosti vztahovaly k *L. passim* nebo alespoň jejich smíšenému výskytu. Je však také možné, že se poměr výskytu *C. mellificae* k *L. passim* v čase změnil.

Ačkoli je parazit *L. passim* celosvětově dominantním zástupcem trypanosomatida u včely medonosné *A. mellifera*, jeho patogenní účinek na hostitele není vyjasněn [19–21]. V současnosti je proto obtížné jednoznačně odpovědět na otázku, zda *L. passim* včelám škodí. Jelikož se *L. passim* vyskytuje prakticky ve všech včelstvech, lze považovat za nejsprávnější odpověď, že včelám může škodit za určitých okolností [22]. Je na místě zdůraznit, že tyto střevní parazité mohou podobně jako různé další faktory důležité pro zdraví včel ovlivňovat fyziologii, chování, imunitu, mikrobiom či délku života včel [19, 23–26].

Důležitým faktem pro metodiku jsou informace o biologii patogenu *L. passim* a to zejména s ohledem na výskyt ve včelích dělnicích. Prevalence *L. passim* se může ve včelstvech lišit a dochází ke koinfekcím s jinými střevními parazity [27–32]. Kromě roku a ročního období, které ovlivňují výskyt *L. passim* [33, 34], byly pozorovány značné rozdíly ve výskytu *L. passim* u dělnic různého stáří a vývojových stadií (larvy, kukly, dospělci) [35, 36]. Nepřítomnost detekce *L. passim* ve vajíčkách naznačuje, že nedochází k transovariálnímu přenosu [35]. Do nedávna nebylo jasné, zda se *L. passim* vyskytuje ve včelách v době líhnutí, a to vzhledem k experimentálním provedením ve studiích [22]. Různé studie (v minulosti např. [21, 24, 35, 37]) totiž tradičně využívají při experimentech nově vylíhlé včely, které jsou z rámků hromadně sbírány v intervalech většinou 1 až 2 dny (24 nebo 48 h) po umístění rámků s uzavřeným plodem do klimaboxu. Včely tak mohou strávit na rámcích poměrně dlouhou dobu po vylíhnutí a mohou se z rámků kontaminovat. Není navíc ověřeno, zda jsou jednotlivé včely v momentu, kdy opouštějí buňku, vitální a prosté prakticky všude přítomného ektoparazita *Varroa destructor* (kleštík zhoubný aneb kleštík včelí) nebo zda na nich roztoč neparazitoval po vylíhnutí z jiných napadených včel. Z experimentálního hlediska je důležitým zjištěním, že líhnoucí se včely neobsahují *L. passim*, a proto jsou tyto vzorky včel vhodnější při zakládání experimentu pro následné manipulativní infekce s tímto střevním parazitem [22]. Využití líhnoucích se včel v experimentech pro studium fyziologických změn ve včelách včetně interakcí hostitel–patogen bylo doporučováno i v jiných studiích [38, 39]. Pokud

by byly pro experimenty použity včely hromadně nalíhnuté na rámcích, byla by různá nežádoucí rizika podstatně vyšší než v případě sběru včel v momentě, kdy opouštějí buňku prokousáváním víčka [22].

2. Cíl metodiky

Cílem metodiky je poskytnout obecně platný metodický postup, který bude využitelný při hodnocení interakcí pesticidů a případně dalších polutantů se střevními patogeny. Potřebě porozumění interakcím mezi polutanty a patogeny včely medonosné je vědeckou komunitou přiřazován čím dále větší význam. Obecným cílem je přispět novými prvky k hodnocení rizik pesticidů na necílové organismy.

3. Vlastní popis metodiky

Základním prvkem metodiky je provedení experimentu, při němž jsou včely exponované testované pesticidní látky a také patogenu za účelem zjištění potenciální interakce. Provedením metodiky je testován vliv pesticidní látky na zastoupení patogenu, z čehož lze v konečném důsledku vyvodit vliv na včely jako hostitele. Metodický postup obsahuje přípravu experimentální klícky, výběr a odběr včel pro experiment, expozici včel pesticidu a patogenu, a také odběr včel v průběhu experimentu pro analýzy. Uvedený „standardní“ metodický postup může být dle potřeby modifikován. Změny se mohou dotýkat zejména volby pesticidní látky. Vhodnou kvantitativní analýzou patogenu je qPCR, metoda však může být modifikovaná dle dostupných přístrojů v laboratořích a případně dle zvolených kvantifikačních markerů. Při testování však může být změněn také modelový patogen, mimo *L. passim* může být použit *C. mellifcae*. Metodický postup je v principu vhodný také pro testy s *N. (V.) apis* či *N. (V.) ceranae*, a to s odpovídajícími modifikacemi pro dávkování patogenu. Metodický postup může být aplikovatelný také na koinfekce patogenů a jejich interakce s pesticidy či jinými polutanty.

3.1. Experimentální klícka

Klíčovým prvkem metodiky je experimentální klícka, která je zvolena tak, aby umožňovala testování většího počtu včel, snadnou výměnu potravy, aplikaci infekční dávky a také snadný odběr vzorků. Je potřeba, aby byl v průběhu experimentu možný odběr vzorků bez nutnosti odklopení celého víka klícky, což by mohlo být rizikové pro únik včel z klícky. K tomu účelu se použije

klíčka, která bude mít ve víku menší otvor. Dle metodiky je vhodnou experimentální klíčkou potravinová dóza s odklopovacím kruhovým víkem, která se dále upraví pro experimentální účely (obrázek 1).

Materiál:

1. Hranatá potravinová dóza LOCK&LOCK o objemu 1800 ml s odklopovacím kruhovým víkem.
2. Hygienická písková podložka (pískový koberec) pro udržení čistoty na dně klícky.
3. Hydrogel Floria v pytlíku z netkané textilie pro udržení lepšího klimatu v klícce.
4. Napáječka pro ptáky 66 ml a jemná mřížka do napáječky. Může být použit i jiný typ napáječky.
5. Filtrační papír do kruhového odklopovacího víka.
6. Aku vrtačka s příslušenstvím, vypalovací pájka na plast.
7. Panenský vosk pro potření vnitřního prostoru klícky.

Postup:

1. Do dózy se u dna na dvou protisměrných kratších stranách vyvrtají nebo vyříznou dva otvory. Otvory musí být zhotoveny tak, aby neumožňovaly při umístění krmítka a stříkačky průlez včelám ven.
2. Do jednoho otvoru ve spodní části dózy se umístí krmítko (napáječka), kterým se včely kontinuálně krmí.
3. Druhý otvor ve spodní části dózy slouží pro injekční stříkačku, kterou se aplikuje patogen.
4. Do kulatého víka ve stropním víku, které slouží k odebrání vzorků včel v průběhu experimentu, se vyvrtají otvory o průměru 2,5 mm, aby byl umožněn průchod vzduchu.
5. Kulaté víko se přelepí filtračním papírem, který sníží výměnu vzduchu mezi vnitřním prostorem experimentální klícky a okolním prostředím. Filtrační papír také slouží k prevenci potenciální křížové kontaminace.
6. Stěny klícky se potřou roztaveným panenským voskem.

Obrázek 1. Experimentální klíčka, jejíž základ tvoří potravinová dóza s odklopovacím kruhovým víkem.



3.2. Krmivo pro včely

Krmivo pro včely představuje 50% cukerný roztok, který je smíchán s upraveným rouskovaným pylem. Principiálně může základ cukerného roztoku tvořit invertovaný cukr nebo řepný cukr. V metodice je upřednostněn sirup z invertovaného cukru, ve kterém převažuje fruktóza nad

glukózou. Invertovaný cukr musí být kvalitní a nesmí obsahovat nežádoucí balastní látky jako vyšší cukry. Ačkoliv jsou někdy používány náhražky pylu [21], v metodice je upřednostněn rouskovaný pyl, vzhledem k přirozenosti pro včely. Pyl však musí být v biokvalitě, aby bylo minimalizováno riziko výskytu reziduí pesticidů. Přípravu pylové složky krmiva znázorňuje obrázek 2.

Materiál:

1. Rouskovaný pyl v biokvalitě.

V některých pracech se alternativně použilo krmivové aditivum. Byl použit např. Promotor L (Calier Lab, Barcelona, Španělsko) o koncentraci 2 % [21], což je tekuté doplňkové krmivo pro drůběž, které obsahuje 19 aminokyselin (esenciálních a neesenciálních).

2. Invertovaný (glukózo-fruktózový sirup bez zbytkových vyšších cukrů nebo řepný cukr, jehož výsledná koncentrace v krmivu se dle metodiky upravuje na 50 %.
3. Předvařená a odstátá pitná voda.
4. Mlýnek (např. kávový).
5. Ultrazvukový ponorný sonikátor.
6. Lyofylizátor.
7. Autokláv.
8. Lahve (100 ml) se šroubovacím modrým uzávěrem GL 45.

Postup:

1. Pyl se nejprve lyofilizuje, aby byl ověřen zbytkový obsah vody pro kalkulace navážky sušiny pylu. Pyl se umístí do flakónů s děrovaným víčkem a filtrem, v nichž je lyofilizován přes noc. Buď se lyofylizuje veškerý pyl určený pro přípravu, nebo se lyofylizuje pouze část a hmotnostní rozdíl se použije pro výsledné kalkulace.
2. Pyl se rozele v mlýnku (na kávu).
3. Navážka odpovídající požadovanému množství rozemletého pylu se nasype do laboratorní skleněné lahve se šroubovacím uzávěrem a přidá se odpovídající množství předvařené vody. Na 1 g sušiny pylu připadá 20 g předvařené vody.
4. Proveďte se homogenizace ultrazvukovým sonikátorem a lahve se autoklávují.
Pozn. Při sterilizaci je nutné nechat uzávěr lahve lehce povolený.
5. Do zásoby se připravuje více lahví. Jelikož by se po otevření mohl pyl kazit, je potřeba mít v záloze náhradní zdroj upraveného pylu.

6. Autoklávané a uzavřené lahve pylu s vodou se skladují v chladu a temnu při 4 ± 1 °C.
7. Pro aplikaci v krmivu se zásobní vodný roztok pylu míchá s cukerným roztokem v takovém poměru, aby bylo dosaženo koncentrace 5 g pylu na 1 kg potravy a zároveň bylo dosaženo 50% cukerného roztoku.

Obrázek 2. Znárodnění přípravy pylové složky krmiva, která se míchá s cukernou složkou.



3.3. Výběr látky nebo POR pro hodnocení a nastavení experimentální koncentrace

Při výběru vhodné pesticidní látky nebo formulovaného pesticidu – prostředku na ochranu rostlin (POR) se zpravidla zaměřujeme na aktuální význam z hlediska společnosti a orgánů hodnotících rizika pesticidů. Při výběru se lze zaměřit také na modelové látky, u nichž je předpoklad daného účinku.

Komentář: Právě z uvedených důvodů je v metodice uveden v modelovém případě neonicotinoid imidakloprid. Imidakloprid je sice v současnosti pro použití v POR v Evropské unii (EU) zakázán, ale je hojně používán jinde ve světě. Povolené používání imidaklopridu mimo EU je tedy s ohledem

na situaci v EU kontroverzní. V minulosti byl sledován vliv jednoho z neonikotinoidů imidaklopridu na početnost střevních mikrosporidií *Nosema (Vairimorpha)* spp. [14], a tak byl předpoklad, že imidakloprid bude ovlivňovat také jiné patogeny/parazity včel.

3.4. Včely pro experimenty

Pro odběr vzorků včel se vybírají pouze taková včelstva, která lze považovat za zdravá. Taková včelstva nevykazují známky onemocnění, mají rychlý rozvoj a plod nevykazuje mezerovitost. Pro založení experimentu se použijí dělnice, které jsou sbírány v okamžiku, kdy prokousávají víčko buňky, aby buňku opustily. Včely musí být vitální bez znatelných problémů s fitness a nesmí být parazitované roztočem *Varroa* v uzavřené buňce.

Materiál:

1. Rámek s uzavřeným dělničím plodem, ve kterém se líhnou včely.
2. Pinzeta.
3. Párátka.
4. Jendorázové rukavice.
5. Dóza vystlaná buničinou pro umístování odebíraných včel.
6. Klimabox s nucenou cirkulací nastavený na 35 °C pro provedení experimentu a případnou inkubaci rámu pro odběr líhnoucích se včel.

Postup:

1. Pro odběr včel se vybere včelstvo, které nejeví znaky onemocnění, má rychlý rozvoj a nemá mezerovitý plod.
Pozn. Ideální je použít včelstvo se známou historií a (dlouhodobě) sledované. Případně se může včelstvo před odběrem vyšetřit na patogeny molekulárními metodami.
2. U vybraného včelstva se najde rámek s uzavřeným plodem, ideálně s hromadně vybíhajícím plodem.
Pozn. Pokud vybrané včelstvo nemá v daném momentu vybíhající plod, doporučuje se udělat prohlídku uzavřeného plodu otevřením několika víček. Vzhledem k aktuálnímu stádiu kukel se odběr vzorků líhnoucích se včel načasuje. Vhodný rámek se označí zvoleným symbolem nebo datem.

3. Před odběrem se z rámečku s uzavřeným plodem opatrně sklepnou včely nebo se opatrně ometou, aby nepřekážely v odběru.
4. Včely se odebírají v momentu, kdy se prokousávají víčkem a opouštějí buňku. Při odběru se používají plastové jednorázové rukavice a/nebo pinzeta. Včely není vhodné odebírat holýma rukama. Nesmí dojít k poškození ani kontaminaci včel.
5. Pro experiment se použijí pouze vitální včely, které se vyvíjely bez přítomnosti roztoče *Varroa* v buňce. Každá včela se prohlédne, aby se ověřilo, že nemá na těle roztoče *Varroa*. Zároveň se prohlédne i buňka, ve které by mohl být roztoč také ukryt.
6. Odebraná včela se opatrně umístí do krabice (vyšší dózy), v níž je umístěna buničina, která změkčuje povrch dna a eliminuje poškození včel. Po nasbírání dostatečného počtu se včely přemístí do experimentální klíčky, zapíše se čas pro danou experimentální klíčku. Klíčka vybavená krmivem zatím bez jakékoliv experimentální expozice se umístí do klimaboxu přednastaveného na 35 °C pro 24hodinovou aklimatizaci.

Komentář: Pokud je to možné, doporučuje se v teplých dnech, zejména kdy venkovní teploty dosahují kolem 30 °C a více, odebírat včely přímo na stanovišti. Vybíhání včel po několika minutách obvykle ustává, a tak se rámeček umístí na chvíli (cca 10–15 min) zpět do úlu. Alternativně je možné rámeček přenést do klimaboxu přednastaveného na 35°C. Rámeček je však potřeba opakovaně vracet do klimaboxu a včely odebírat postupně, protože líhnutí ustává. Rámeček s plodem nesmí prochladnout. Delší odloučení včel od včelstva také není žádoucí, proto upřednostňujeme odběr u včelstva. To je však vhodné v teplých dnech a v době, kdy na stanovišti nedochází k loupežím. V případě, že jsou odebírány včely z izolátorů, je možné odebírat vzorky.

3.5. Střevní parazit pro expozici včel

Dalším biologickým vzorkem pro experiment je kultura parazita, který se použije pro infekci. Jednou možností je využití sbírkových kmenů. Výhoda sbírkových kmenů obvykle spočívá v tom, že již byly použity v experimentech různého druhu. V takových případech lze s výhodou využít již získaných informací o patogenitě kmenu ve srovnávacích studiích. Nevýhodou sbírkových kmenů však představuje ovlivnění patogenity delším setrváním v kultuře. Na možné ovlivnění mezi různými pasážemi v kulturách *L. passim* upozorňovali v publikaci Buendía-Abad et al. [40], kde byla experimentálně prokazována vyšší mortalita včel při použití nižších pasáží patogenu [40]. Stejná studie [40] také obsahuje optimalizovaný protokol pro izolaci *L. passim*. Nutno brát v potaz,

že významným faktorem ovlivňujícím patogenitu a případně i mortalitu včel v průběhu experimentu může být různá virulence kmenů patogenu. Bez ohledu na použitý kmen či pasáž patogenu, které mohou výrazně ovlivnit prevalenci ve včelách, by však výsledný efekt pesticidní látky na interakci mezi patogenem a včelou měl být ze statistického hlediska patrný. Základním předpokladem signifikantního zapojení pesticidu do interakce totiž je, že hodnocená látka ovlivňuje biochemické dráhy, což způsobí indukci většího pomnožení patogenu. Teoreticky však nelze vyloučit nesignifikantní nebo také opačný – supresivní efekt pesticidní látky. Pro průběh experimentu je potřeba zvolit vhodnou infekční dávku patogenu. Infekční dávku lze považovat od 5 tisíc buněk výše [41, 42]. Předpokládá se, že včely vypijí průměrně 10 μ l potravy s 10 tisíci buňkami parazita [24]. Na základě těchto informací se volí vhodná koncentrace patogenu pro infekční dávku. Je však potřeba brát také v potaz sociální chování včel, díky kterému si jedinci vzájemně předávají potravu, a tedy i nákazu.

Materiál:

1. Kultura patogenu pro infekci. Buď se získá vlastní kmen patogenu izolací, nebo se použije sbírkový izolát. V případě *L. passim* je adekvátní postup pro izolaci detailně uveden např. v publikaci Buendía-Abad et al. [40]. Je nutné přistupovat ke kultuře s ohledem na číslo pasáže, jelikož bylo identifikováno snížení virulence *L. pasim* vzhledem k dlouhodobému držení v kultuře. Je vhodné konkrétní lokální kmeny používané v experimentech charakterizovat, jelikož se jejich virulence může významně lišit [40, 43].
2. Bürkerova komůrka (speciální podložní sklíčko) pro počítání infekční dávky.
3. Cukerný sacharózový roztok z řepného cukru pro aplikaci patogenu.
4. Předvařená odstátá voda.

Postup:

1. Připraví se dieta pro infekční dávku *L. passim*, kde na 1 ml připadá 100 μ l o koncentraci 10^7 buněk/ml kultury, 600 μ l převařené odstáté vody a 300 μ l 67% cukerného roztoku.
Pozn.: Infekční dávka by měla být připravena tak, aby bylo splněno alespoň 10^4 buněk na 10 μ l [24] výsledného cukerného roztoku.
2. Ředění pro infekční dávku se připraví následovně. Z buněčné kultury se odebere 100 μ l do mikrozkušavky a přidá se 900 μ l fyziologického roztoku s formalínem (10%). Zkušavka

se promíchá. Suspenzí se pak naplní komůrka. Pod mikroskopem se spočítá množství buněk v 1 ml kultury a následně se odvodí odpovídající ředění pro docílení dávky.

3.6 Průběh experimentu v klínce a odběr vzorků

Metodika je zaměřena na určení efektu pesticidu na prevalenci patogenu ve včelách. Zakládají se dvě experimentální série. V obou sériích jsou včely vystaveny patogenu, ale pouze v jedné z nich jsou exponované také pesticidu. Kontrolní sérii představují včely, které nejsou vystaveny pesticidu. Experiment se zakládá ve třech opakováních pro kontrolní variantu bez pesticidu i pro variantu exponovanou pesticidu. Včely jsou odebírány v pravidelných intervalech odpovídající různým dnům stáří včel po vylíhnutí. Alternativně mohou být včely odebrány pouze v určitém zvoleném časovém intervalu. Experimentální provedení znázorňuje obrázek 3.

Materiál:

1. Klimabox s nucenou cirkulací umožňující stabilní a homogenní teplotu 35 °C.
2. Klícky (viz kapitolu 3.1.) se včelami sbíranými v době líhnutí (viz kapitolu 3.4).
3. Krmivo pro včely bez pesticidu (viz kapitolu 3.2) a s pesticidem (viz kapitolu 3.3).
4. Stříkačka s infekční dávkou parazita (viz kapitolu 3.5).
5. Zkumavky typu Eppendorf pro individuální sběr vzorků včel.
6. Mrazicí box –60 °C nebo lépe –80 °C pro uskladnění biologických vzorků.

Průběh experimentu:

1. Nasbírané líhnoucí se včely se umístí do připravených klícek. Do každé klícky se umístí 50 jedinců včel.
2. Do klícky se umístí krmítko s krmivem pro včely.
Pozn. Krmivo prozatím neobsahuje v exponované skupině přidaný pesticid a je stejné jako v případě kontrolní skupiny.
3. Klícky se včelami se umístí do klimaboxu s nucenou cirkulací a přednastavenou teplotou na 35 °C.
Pozn. Zvolená experimentální teplota na 35 °C představuje optimální teplotu v plodišti [44-46], kde se mladé včely uplatňují. Je potřeba si uvědomit, že včely fungují jako krmičky ve věku přibližně od 3. do 12. dne od vylíhnutí. V některých studiích byly experimenty

prováděny také při jiných, nižších teplotách, např. 27 °C [21, 47]. Takovéto teploty by však mohly být vhodné pro létavky, které včelí úl opouští, a jedná se rozhodně o starší včely.

4. Prvních 24 hodin probíhá adaptace včel. V průběhu adaptace je včelám podáváno pouze krmivo bez expoziční látky (přidaného pesticidu) ani není aplikovaná infekční dávka patogenu.
5. Dalších 24 hodin, které následují po adaptaci, probíhá infekce patogenem. Odstraní se krmítko s dietou a do protilehlého otvoru se umístí stříkačka s expoziční dávkou patogenu. Infekční expozice probíhá 24 hodin v kontrolní i expoziční sérii.
6. Po skončení infekční expozice se stříkačky vyjmou a včelám je opět podáváno krmivo. Zatímco v kontrolní variantě je včelám podáváno krmivo bez přidané pesticidní látky, které je identické krmivu použitému při adaptaci (viz bod 2), tak ve druhé expoziční variantě je totéž krmivo obohaceno o pesticidní látku. Krmivo je v průběhu experimentu pravidelně měněno (ob den), aby byla zachována jeho čerstvost a předešlo se kazení.

Pozn.: Experiment je směřován primárně ke zjištění, zda expozice pesticidní látkou ovlivňuje abundanci/prevalenci patogenu. Proto jsou obě varianty infikovány patogenem a v kontrolní expozici se včelám podává krmivo bez pesticidu, zatímco v expoziční sérii je naopak krmení obohaceno o pesticid. Je možné provést negativní kontrolu, kdy včely nejsou vystaveny včelímu patogenu. V takové sérii by neměli být paraziti detekováni, jelikož líhnoucí se včely jsou prosté parazita a parazit se tedy nevyvíjí [22].

Odběr vzorků:

Vzorky včel se odebírají v různých časových intervalech v průběhu experimentu nebo v konkrétním časovém úseku. Záleží na konkrétním návrhu experimentu, kdy se zvažuje potřeba sledování v průběhu stárnutí včel (v čase) nebo jen hodnocení v určitém konkrétním čase. Z hlediska abundance střevního parazita je ideální provádět odběr kolem 10. dne stáří včel. Maximální stáří včel v experimentu je stanoveno na 15 dní, protože později dochází k výraznému nežádoucímu úhynu vlivem parazita i u kontrolních skupin [21, 22].

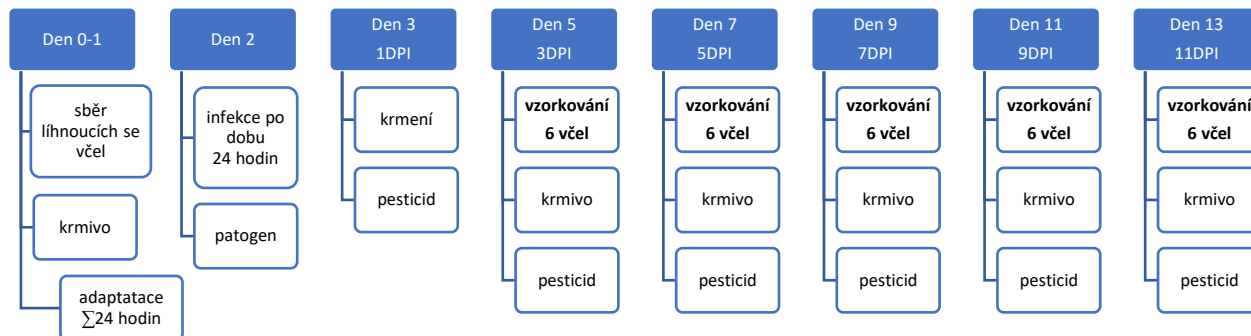
1. Vzorky včel se odebírají ob den. Při prvním odběru jsou včely staré 5 dní od vylíhnutí a jsou tedy 3. den od provedení infekce.
2. Odebrané vzorky včel se jednotlivě umístí do vzorkovnic, standardně typu Eppendorf, a okamžitě se zamrazí.

3. Standardně se odebírá 6 včel v každém časovém úseku. (Odběry v 5 časových intervalech se získá celkem 30 včel.)
4. Jednotlivé včely se okamžitě po odběru zmrazí na suchém ledu.

3.7. Schematické znázornění metodického postupu

Vzorky včel nasbíraných podle navrženého experimentu se následně analyzují zvolenými metodami. Na obrázku 3 je uvedeno schématické znázornění typového experimentu, ve kterém jsou vzorky včel odebírány v celkem pěti časových intervalech. Je možné zvolit odběr v méně časových intervalech nebo dokonce v jednom konkrétním. V takovém případě se s výhodou odebere více jednotlivců, než 6 včel. Kritickými časovými intervaly pro odběr vzorků včel jsou den 9. a den 11. Nevýhodou odběru vzorků v méně časových intervalech je absence srovnání vývoje infekce v čase.

Obrázek 3. Schematické znázornění metodického postupu. Schéma experimentálního postupu s časovým rozvržením od sběru líhnoucích se včel, podávání krmiva, expozice patogenu, expozice testované látky/pesticidu a sběru vzorků. DPI – dny po infekci (po ukončení 24hodinové expozice patogenem).



3.8. Analýzy vzorků

Vzorky včel je možné analyzovat řadou různých způsobů. Základní analýza představuje kvantifikaci patogenu, jemuž byly včely vystaveny. Je však možné využít i dalších přístupů, které poskytnou informace o vlivu expozice pesticidem na interakci host–patogen. Celé včely, jejich části nebo orgány je možné analyzovat vysokokapacitními přístupy jako je transkriptomika, proteomika, metabolomika. Záleží na instrumentálních a také finančních možnostech laboratoře a

zadavatele. Např. ve studii Erban et al. [22] byla kromě qPCR analýzy zadečků včel provedena také proteomická analýza hlav vybraných vzorků včel, které byly selektovány dle kvantitativních výsledků přítomnosti a nepřítomnosti patogenu.

3.8.1. Kvantifikace patogenu

V základním provedení se včely analyzují na patogen, jímž byly včely infikovány. Pro analýzu jsou z celých včel odebírány zadečky včel, které jsou posléze analyzovány. Metoda analýzy je závislá na konkrétním vybavení laboratoře. Jednou z možností kvantitativní detekce *L. passim* je qPCR, která vychází z publikace Xu et al. [48], ve které je popsána také kvantifikace *C. mellificae*. Metoda je uvedena také v publikaci Erban et al. [22], kde jsou pro kalibraci qPCR detekce namísto syntetických DNA fragmentů použity ředění odpovídající počtům buněk *L. passim*.

Postup:

1. Ze zmražených včel se odeberou zadečky. Zadečky se odebírají odlomením zmrzlého zadečku nebo jeho uříznutím.
2. Zadečky se povrchově sterilizují 96% ethanolem.
3. Povrchově sterilizované zadečky se očistí sterilním fyziologickým roztokem.
4. Izoluje se DNA (kitem).
5. Připraví se reakční směs, která obsahuje primery specifické pro včelí gen a patogen (viz tabulku 2 v publikaci Xu et al. [48]), proby, master mix a nuclease-free vodu.
6. Master mix se smíchá s izolovanou DNA nebo v případě negativní kontroly s vodou.
7. Pro výpočet množství DNA ve vzorku včel (zadečku) se připraví standardy o známé koncentraci. Kvantifikace buněk patogenu se odvodí z kalibrace podle ředících řad odvozených dle počítání patogenu v Bürkerově komůrce pod mikroskopem [22]. Nebo se využije syntetických DNA fragmentů [48], z nichž jsou vytvořeny kalibrace v ředící řadě.
8. Reakční směs s biologickými, kontrolními a kalibračními vzorky se pipetuje do destiček pro qPCR, které se vloží do real-time PCR cycleru, ve kterém se provede analýza.

3.8.2. Vyhodnocení a interpretace dat

Metodika je zaměřena na hodnocení rizika látek (pesticidů) na interakci mezi včelami a jejich střevními patogenem. Data se vyhodnotí statistickými metodami, typicky analýzou rozptylu (též

ANOVA z anglického ANalysis Of VAriance), přičemž za hranici signifikantního rozdílu je považována alespoň p-hodnota menší než 0,05. Pokud jsou experimenty opakovány v čase, hodnotí se také rozdíly celkového výsledku mezi těmito časově závislými opakováními. V takovém případě se použije multifaktorová variační analýza (ANOVA) a/nebo Bayesovská analýza [49, 50]. Pro Bayesovskou analýzu se využije balíček v prostředí R [51]. Z vyhodnocení dat je pak možné identifikovat míru vlivu opakování v čase na výsledek oproti samotnému vlivu testované látky. Vyhodnocení vlivu testované látky na patogen ve včelách v opakování experimentu je důležitým faktorem z hlediska průkazu opakovatelnosti s experimentálními včelami odebranými v jiném roce nebo v jiné sezóně. Ve výsledku se hodnotí také kmen patogenu použitého pro infekci, přičemž je zvažována také pasáž patogenu v kultuře [40].

4. Příklad provedení metodiky

A. Vybraný modelový pesticid:

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

Komentář: Imidaklopid je jedním z původně pěti povolených neonikotinoidů v EU, které zahrnovaly imidaklopid, thiamethoxam, klothianidin, thiaklopid a acetamiprid. V současnosti je z nich v EU povolen již jen acetamiprid, který má platnou registraci do 28. února 2033 [52]. To, že je imidaklopid zakázán v EU pro použití v prostředcích na ochranu rostlin (POR), neznamená, že není významný z globálního hlediska. V řadě států mimo EU je totiž hojně používán v POR. Navíc je i v EU povolený v biocidech např. proti mravencům [53, 54]. Imidaklopid je navíc dobrým modelem z hlediska hodnocení interakce pesticidu se střevními patogeny včely medonosné. Pettis a kol (2012) totiž prokázali, že imidaklopid zvyšuje početnost střevních mikrosporidií *Nosema* spp. (*Vairimorpha* spp.) [14]. Tato skutečnost byla předpokladem, že by mohl imidaklopid ovlivňovat také výskyt jiného střevního parazita včel *L. passim* [22].

B. Základní suroviny pro krmivo:

- **Invertovaný sirup:** Apisyrupe 71/73 (E D & F Man Ingredients).

Experiment byl proveden ve dvou letech po sobě. Protože byly použity dvě různé šarže Apisyrupe, bylo ověřeno jejich složení, do jaké míry se odlišují. Pro experimenty je také důležitý nízký obsah

HMF, který je pro včely toxický. V prvním roce měl zásobní sirup tyto přesné parametry: i) Brix 72,8; ii) pH 4,2; iii) hydroxymethylfurfural (HMF) 29 ppm; iv) cukry: fruktóza/glukóza/sacharóza v poměru 42/32/26; a ostatní cukry byly pod mezí stanovitelnosti (LOQ), která byla na základě metody HPLC 0,5 %. V druhém roce byly přesné parametry zásobního sirupu následující: i) Brix 72,4; ii) pH 3,8; iii) HMF 24 ppm; a iv) cukry: fruktóza/glukóza/sacharóza v poměru 40/28/32. Složení šarží Apisyropu je podobné a s nízkým obsahem HMF, a proto by neměly mít vliv na výsledek.

- **Rouskovaný pyl:** 100% včelí pyl rouskovaný – BIO (Naturalis).

Komentář: Je potřeba použít kvalitní invertovaný fruktózo-glukózový sirup, bez zbytkových cukrů, s nízkým obsahem HMF, které by mohly činit trávicí problémy včelám. Může být použit řepný cukr. Pyl by měl být v biokvalitě, pro minimalizaci reziduálního výskytu pesticidů.

C. Biologický materiál:

- **Líhnuocí se včelí dělnice *Apis mellifera carnica*, Pollmann 1879:** Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., stanoviště Praha-Ruzyně.
- ***Lotmaria passim*:** izolát získaný v květnu/červnu 2020 ze zadního střeva včel sbíraných ve Výzkumném ústavu včelařském, s. r. o. V experimentu byly použity pasáže 8 a 11.

D. Vzorky

V každém časovém intervalu bylo z každé klíčky v rámci opakování nasbíráno 6 včel. Celkově tedy bylo v pěti časových intervalech nasbíráno pro analýzy 30 včel. Včely byly jednotlivě umístěny do zkumavek typu Eppendorf a okamžitě byly zamrazeny na suchém ledu. Všechny vzorky byly skladovány při -80°C do zpracování na analýzy. Byly provedeny celkem dva totožné experimenty ve dvou po sobě jdoucích letech v obdobném ročním období. Opakování v čase je důležité jako průkaz reprodukovatelnosti.

E. Analýzy:

- **qPCR:** reakční směs – DNA izolovaná ze zadečků včel byla analyzována na real-time cycleru LightCycler[®] 480 System (Roche). Reakční směs představovala 5 μl směsi Maxima Probe/ROX Master (Thermo), 1 μl primerů (reverzní + forward; viz Xu et al.

[48]) a sondy (v konečné koncentraci 100 nM) a 2 μ l vody bez nukleázy. 8 μ l reakční směsi bylo pipetováno do 96jamkové PCR destičky a do každé jamky byly přidány 2 μ l DNA nebo negativní kontroly (voda). Kalibrace pro kvantifikaci byla provedena vzhledem k počtu buněk *L. passim* ve vzorku.

- **Proteomická analýza:** tryptické digesce z hlav včel byly analyzovány pomocí nanokapalinové chromatografie (nanoLC) Dionex Ultimate 3000 ve spojení s hmotnostním spektrometrem Orbitrap Fusion Tribrid (Thermo). Data byla vyhodnocena pomocí algoritmů label-free kvantifikace (LFQ) v programu MaxQuant verze 2.4.1.0 [55]. Vyhledávací databáze představovala 23 520 sekvencí z RefSeq NCBI, které byly staženy dne 13. května 2023. Dále byla data vyhodnocena v programu Perseus verze 2.0.7.0 [56].

F. Výsledky:

- Byly získány výsledky kvantifikace *L. passim* ve včelách. Zjištěné hodnoty odpovídající počtu buněk v jednotlivých vzorcích shrnuje tabulka 1. Nejvyšší hodnoty dosahovaly řádově miliónů buněk na včelu. Statistické vyhodnocení metodou multifaktorové ANOVA znázorňuje tabulka 2.
- Proteomickou analýzou hlav včel bylo celkově identifikováno 3 217 proteinů (exaktně proteinových hitů), ale po vyfiltrování datasetu podle kritéria, kdy identifikace měly aspoň 70 % platných hodnot v analyzované skupině, poskytlo 2 563 proteinů. Tyto spolehlivé identifikace byly dále detailně analyzovány a statisticky vyhodnoceny. Výsledky byly následně statisticky vyhodnoceny, přičemž výsledek analýzy znázorňuje obrázek 4. Vcelku překvapivě byl zjištěn pouze jeden statisticky signifikantní protein, který představoval transferrin 1, který je však značně spolehlivý vzhledem k identifikaci v každém vzorku a poměrně vysoké intenzitě.

Tabulka 1. Přehled zjištěných hodnot *L. passim* ve vzorcích včel (A) bez expozice imidaklopridu a (B) v kombinaci s expozicí 2,5 µl/L imidaklopridu v krmivu. Experimenty a analýzy byly provedeny ve dvou po sobě jdoucích letech (2021 a 2022). V každém roce byla provedena tři opakování samotné expozice *L. passim* a tři opakování expozice *L. passim* v kombinaci s koexpozicí krmiva s koncentrací 2,5 µl/l imidaklopridu. Odběr vzorků včel byl proveden v pěti časových intervalech a každý z odběrů zahrnoval 6 jednotlivých včel. Nejvyšší naměřené hodnoty jsou zvýrazněny červeně s nejintenzivnější červenou v nejvyšších hodnotách.

		A) <i>Lotmaira passim</i>					B) <i>Lotmaria passim</i> -imidakloprid					
		3DPI	5DPI	7DPI	9DPI	11DPI	3DPI	5DPI	7DPI	9DPI	11DPI	
		5 dnů	7 dnů	9 dnů	11 dnů	13 dnů	5 dnů	7 dnů	9 dnů	11 dnů	13 dnů	
První série analýz	1	0	11400	33400	4500	51200	0	32000	0	56000	1260	
		0	0	0	17400	104400	0	0	0	0	110200	
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2	0	52200	58600	0	601000	0	39600	74000	224000	145000	
		0	24000	23000	0	508000	0	21800	81400	2600000	142600	
		0	0	0	0	638000	0	13120	0	14980	962000	
		0	0	0	0	0	0	0	0	9200	0	
		0	0	0	0	0	0	0	0	12620	0	
	3	0	16960	91400	0	0	0	22000	186200	86600	270000	336000
		0	0	0	0	0	0	358000	26600	326000	16780	202000
		0	0	0	0	0	0	39000	16500	19780	182200	140800
		0	0	0	0	0	0	0	344000	18980	430000	1106000
		0	0	0	0	0	0	0	28000	13280	81800	54400
Druhá série analýz	1	91400	406000	26400	133400	3660000	14560	7860	1014000	2400000	4700000	
		14520	99600	1888000	76600	1098000	3420	672000	93000	5300000	8200	
		4060	744000	1090000	532000	0	51800	198400	21800	266000	638000	
		165600	48200	0	0	0	4440	67000	89600	250000	314000	
		0	996000	0	0	0	9220	224000	562000	2560000	330000	
	2	0	0	0	0	0	12780	60000	398000	0	0	
		0	0	0	7100	0	5960	118600	508000	3200000	5920000	
		0	0	0	0	0	81600	115600	1144000	1082000	142400	
		0	0	0	0	0	113600	254000	2300000	428000	7260000	
		0	0	0	0	0	53600	444000	256000	2520	0	
	3	0	0	0	0	0	13740	0	0	0	0	
		12340	38000	139400	63800	238000	0	0	0	0	0	
		8720	126000	0	5340	13620	0	0	0	0	0	
		7040	18160	0	0	28600	5260	296000	57400	206000	1294000	
		10120	4080	0	0	83200	8020	486000	64800	73600	3120	
						8800	103000	17840	1490000	23400		
						0	230000	2980000	2380000	1566000		
						0	316000	6540	4320	2920		
						0	0	35800	1156	0		
P	8	13	8	8	11	P	17	24	24	27	24	
%P	22	36	22	22	31	%P	47	67	67	75	67	
Θ	39225	198815	418775	105018	638547	Θ	47400	179178	439534	872121	1098596	
σ	58647	320177	695211	178458	1059266	σ	85870	176071	750829	1339329	1966550	

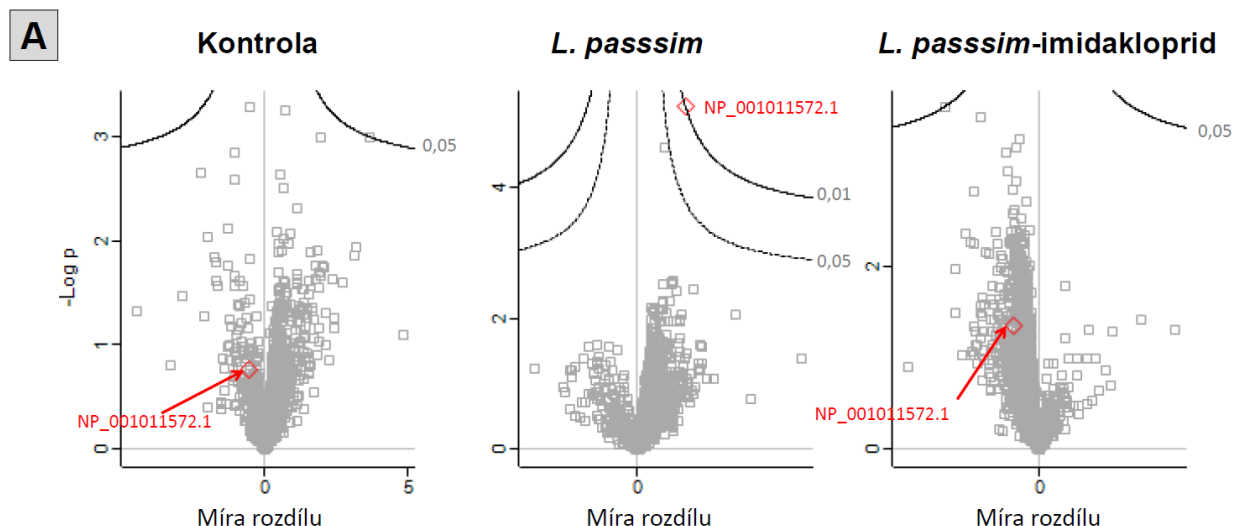
Legenda: P – počet pozitivních včel z celkového počtu 36 včel na věk/DPI; %P – procento pozitivních včel na věk/DPI; Θ – průměrný počet buněk *L. passim* u pozitivních včel; σ – směrodatná odchylka počtu buněk *L. passim* u pozitivních včel.

Tabulka 2. Výsledky manipulativního experimentu s koexpozicí včel *L. passim*-imidaklopid vyhodnocené vícefaktorovou analýzou rozptylu (ANOVA). Analýza ukázala, že výskyt *L. passim* byl významně ovlivněn rokem pokusu, datem odběru vzorků (tj. stářím včel od vylíhnutí – DPI) a expozicí pesticidu imidaklopidu.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	Signif.
Rok	1	7,51E+12	7,51E+12	16,578	5,87E-05	***
Vzorkovací_čas	5	1,12E+13	2,25E+12	4,956	0,000218	***
Imidaklopid	1	7,36E+12	7,36E+12	16,228	6,99E-05	***
Klíčka	6	1,87E+12	3,12E+11	0,688	0,659376	
Rok:Vzorkovací_čas	5	4,78E+12	9,56E+11	2,109	0,064093	.
Rok:Imidaklopid	1	3,51E+12	3,51E+12	7,74	0,005714	**
Vzorkovací_čas:Imidaklopid	4	5,77E+12	1,44E+12	3,181	0,013874	*
Rok:Klíčka	6	3,24E+12	5,41E+11	1,193	0,309482	
Vzorkovací_čas:Klíčka	20	5,62E+12	2,81E+11	0,62	0,897445	
Rok:Vzorkovací_čas:Imidaklopid	4	3,09E+12	7,72E+11	1,702	0,149126	
Rok:Vzorkovací_čas:Klíčka	20	9,32E+12	4,66E+11	1,028	0,427805	
Residua	326	1,48E+14	4,53E+11			

Kódy signifikance: '***' 0,001 '**' 0,01 '*' 0,05 '.' 0,1 '' 1

Obrázek 4. Analýza rozdílů v proteomu hlav včely medonosné. **A)** Havajský graf (Hawaii plot) znázorňuje, že pouze jeden protein prekursoru transferinu 1 (NP_001011572.1) se významně lišil a byl významně regulován přítomností *L. passim*, ale ne koexpozicí *L. passim*-imidaklopid. Signifikance je vizualizovaná na hladině významnosti 0,05 a 0,01. Všechny tři varianty byly porovnány vůči jejich komplementu (z lat. *complementum*, doplněk). **B)** Výsledky individuální kontroly významného proteinu prekursoru transferinu 1 (NP_001011572.1). Pozoruhodné je, že v pěti biologických replikátech v rámci každé ze tří expozičních skupin jsou minimální rozdíly v intenzitách Log₂ LFQ, zatímco v počtech buněk parazita jsou velké rozdíly.



Kontroly – bez <i>L. passim</i> i pesticidu imidaklopidu						
Označení vzorku	A12	B2	B3	B4	B5	Průměr
Počet buněk <i>L. passim</i>	0	0	0	0	0	0
Log ₂ LFQ intenzita	28,1	27,7	28,0	27,7	27,3	27,77
Expozice pouze <i>L. passim</i>						
Označení vzorku	G10	G11	G3	G7	G9	Průměr
Počet buněk <i>L. passim</i>	508 000	51 200	104 400	610 000	638 000	382 320
Log ₂ LFQ intenzita	28,8	29,7	29,2	29,2	28,4	29,07
Koexpozice <i>L. passim</i> -imidaklopid						
Označení vzorku	A11	A5	A6	A7	A9	Průměr
Počet buněk <i>L. passim</i>	964 000	962 000	336 000	202 000	1 106 000	714 000
Log ₂ LFQ intenzita	27,8	27,5	27,4	27,5	27,9	27,62

G. Interpretace výsledků:

Kvantitativní změny patogenu vlivem imidaklopridu

Hlavním cílem bylo určit, zda reálná expozice pesticidní látkou imidaklopridem v koncentraci 2,5 µg/l v krmivu [57–59] může ovlivnit výskyt střevních parazitů *L. passim* u včely medonosné. Výsledek ukázal, že expozice včel *L. passim* s koexpozicí imidaklopridem vedla k vyšší prevalenci a také vyšším hodnotám v případě expozice *L. passim* než bez vystavení pesticidu. Imidakloprid má tedy potenciál usnadnit šíření *L. passim* ve včelstvu, ale také do okolních včelstev. Imidakloprid tedy zvyšuje potenciál nepříznivých účinků *L. passim* na včelstvo, které se mohou za určitých podmínek vyskytnout [19–21]. Zjištění se do jisté míry podobá dřívějšímu pozorování, že imidakloprid zvyšuje početnost *Nosema (Vairimorpha)* u včel [14]. Mezi imidaklopridem a střevními parazity mohou existovat synergické účinky, které mohou způsobovat vyšší početnost patogenu v populacích včel. Celkově je zvýšená abundance parazita/patogenu nezbytnou podmínkou pro vyvolání škodlivých účinků na hostitele. Výsledky ukazují, že ve dvou odlišných experimentálních provedeních byly hodnoty abundance a prevalence pro *L. passim* odlišné podle roku provedení experimentu. V obou opakováních celého experimentu v různých letech však imidakloprid jasně zvyšoval zastoupení patogenu ve včelách. Dle dostupné literatury ovlivňuje výskyt *L. passim* také roční období. [33, 34].

Výsledky z provedených manipulativních experimentů ukazují na možnost, že imidakloprid a také jiné látky s obdobnými účinky mohou být faktorem, který zvyšuje početnost *L. passim* ve včelstvech, čímž se zvyšuje riziko onemocnění včel.

Podobně jako v předchozích studiích se množství parazitů zvyšovalo s věkem včel. [26, 36] a přežití se snižovalo s věkem, i když se rychlost úmrtí ve studiích lišila. [21, 60]. Provedený experiment prokazuje, že přibližně 10 dní věku je kritickým obdobím, kdy dochází k vysokému nárůstu početnosti *L. passim* u jednotlivých včel a u starších včel může dojít k jejich rychlému úbytku [21].

Je na místě uvést, že početnost parazitů u jednotlivých včel i míra prevalence mohou být silně ovlivněny různými faktory prostředí. V této souvislosti Gómez-Moracho et al. [21] pozorovali, že růst *L. passim* i *C. mellificae* byl ovlivněn kultivačními médii; lze

tedy předpokládat, že růst *L. passim* u včel může být ovlivněn rozdíly ve výživě včel a dalšími podmínkami prostředí, které se mění i během sezóny. Včelstva mohou z okolního prostředí sbírat mnoho různých látek včetně pesticidů, čímž mohou být včelstva přímo ovlivněna [61, 62]. Výsledky provedeného experimentu však ukazují, že spolupůsobení jediné látky (imidaklopridu) může zvýšit početnost *L. passim* na vysokou úroveň, která může být pro včely potenciálně škodlivá.

Proteomická analýza hlav včel – mechanismus kvantitativních změn

Protože analýza zaměřená na kvantifikaci *L. passim* byla zaměřena na zadeček, bylo možné provést se zbývajícím biologickým materiálem včel doplňkové analýzy. Přestože byla provedena komplexní proteomická analýza, která umožnila kvantitativní porovnání 2 347 proteinů, byl identifikován pouze jeden signifikantně odlišný protein. Vysvětlení spočívá v tom, že proteomy v hlavě včely medonosné byly značně variabilní. Je potřeba zdůraznit, že transferin 1 byl ve všech analyzovaných vzorcích relativně vysoce zastoupeným proteinem, jak ukazují jeho počty MS/MS identifikací a intenzity, což činí tento marker vysoce spolehlivým. Za velmi zajímavý výsledek lze považovat, že hladiny tohoto proteinového markeru byly zjištěny podobné v kontrolní skupině a při koexpozici *L. passim*-imidaklopid, zatímco vyšších hodnot bylo dosaženo pouze v expozici samotnému patogenu *L. passim*. To znamená, že *L. passim* způsobil zvýšení regulace transferinu 1 a že koexpozice imidaklopridu neutralizovala účinek patogenu na tento protein.

Otázkou je mechanismus, který může vysvětlit regulaci transferinu 1 parazitem *L. passim* a vyrušení jeho zvýšené exprese ve včelách expozicí imidaklopridu. Transferin 1 je protein vážící a transportující železo, který je indukován infekcí a může být součástí obrany hostitele [63–65]. Rodríguez-García et al. [66] zjistili, že jeho regulace (na úrovni mRNA) je zvýšená v důsledku infekce *N. (V.) ceranae*, což je v souladu s tím, že transferin 1 hraje klíčovou roli v boji o železo. Navíc zjistili, že RNAi dosáhla potlačení transferinu 1 a vedla ke snížení transkripční aktivity *N. (V.) ceranae*, zmírnění ztráty železa a zvýšení imunity spojené s lepším přežíváním včel. [66]. Trypanosomy v krevním řečišti navíc získávají železo z transferinu, což je hostitelský protein přenášející železo [67].

Výsledek, že infekce *L. passim* byla spojena se zvýšenou hladinou transferinu 1, je v souladu s obecnou úlohou a reakcí tohoto proteinu na infekci. Výsledná neutralizace transferinu 1 spojená se zvýšenou úspěšností infekce *L. passim* pomocí imidaklopridu však zůstává nejasná. Je však patrné, že imidaklopid je sloučenina, která podobně zvyšuje početnost střevních parazitů, jako je *L. passim* (tato metodika; [22]) a *Nosema* (*Vairimorpha*) [14] u včel. Možným vysvětlením je, že neočekávaný účinek imidaklopridu je způsoben modulací mevalonátové dráhy, obdobně jak bylo pozorováno u čmeláků [68]. Je možné, že imidaklopid ovlivňuje buněčnou smrt parazita založenou na ferroptóze [69, 70], která je spojena s mevalonátovou cestou [71, 72].

H. Závěr:

Výsledky prokázaly, že imidaklopid významně ovlivňuje zastoupení *L. passim* ve včelách. Imidaklopid zasahuje do imunitní odpovědi včel na přítomnost tohoto patogenu, což se jeví podobné dříve zjištěnému jevu v případě *Nosema* (*Vairimorpha*). Kromě přímého ovlivnění včel hodnoceným pesticidem dochází ke zvyšování hladin střevních parazitů. *L. passim* je sice běžný parazit ve včelstvech, jehož výskyt nemusí znamenat riziko pro včely, ale jeho interakce s pesticidem imidaklopridem nebo jinými látkami s obdobným efektem jej může činit nebezpečným pro zdraví včel.

5. Srovnání novosti metodiky

Metodika přináší nové prvky do hodnocení rizik pesticidů na opylovače. Metodika se nezaměřuje na přímý vliv pesticidu na včely, jako je letální efekt pesticidů. Dokonce se neomezuje na hodnocení vlivu pesticidu na fyziologii včel. Hodnocení v metodice je zaměřeno na interakci vyššího řádu, která představuje interakci mezi pesticidem a střevním patogenem, a to v realistických expozicích.

Metodika nově umožňuje hodnocení vlivu testovaných pesticidních látek na včely z pohledu zastoupení střevního patogenu. Zároveň však metodika umožňuje hodnocení vlivu interakce pesticidu s patogenem na biochemické procesy ve včelách, které mají fyziologické důsledky, a to doplňkovými analýzami. Doplnkové analýzy mohou představovat např. vysokokapacitní OMICs analýzy jako proteomiku, transkriptomiku či metabolomiku, a výsledky mohou identifikovat podstatu interakce. Klíčovým prvkem v metodice je experimentální provedení vedoucí k přípravě vzorků, které pak mohou být analyzovány různými způsoby s ohledem na různé vybavení a možnosti laboratoří, ale také otázky, které je potřeba zodpovědět.

6. Uplatnění metodiky

Cíl uplatnění metodiky je ve zlepšení možností ochrany zdraví včely medonosné před dopady používání pesticidů. Metodika umožňuje odhalování „skrytých“ účinků pesticidů, které přesahují jejich mechanismus účinků na škůdce. Obdobné modely jsou požadovány světovou vědeckou komunitou a také orgány, které se zabývají ztrátami včel a hodnocením rizik pesticidů na různé 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 a Ministerstvo životního prostředí ČR. Uplatnění je také ve výzkumné 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) [73], která patří k nejvýznamnějším mezinárodním mnohostranným úmluvám v oblasti životního prostředí. Metodika je také v souladu s dnes aktuální Novou dohodou pro opylovače [74], 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 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 jsou každoročně jen v Česku stamiliónové. Aplikace metodiky do hodnocení rizik petiscidů zároveň dokáže předejít problémům způsobeným jejich skrytými nežádoucími účinky a s tím spojenými následnými škodami na životním prostředí, ale případně i na zdraví člověka. Ekonomické přínosy jsou také v potravinové bezpečnosti.

8. Publikace autora, které předcházely metodice

- Erban T. (2023). Imidaklopid zvyšuje pro včely riziko parazita *Lotmaria passim*. Moderní včelař 20 (11): 21–22.
- Erban T. (2024). Imidaklopid zvyšuje riziko nemocí včel, ale zemědělci mimo EU jej nadále používají. AGRObase zpravodaj 2024 (leden): 34–35.
- Erban T., Parizkova K., Sopko B., Talacko P., Markovic M., Jarosova J., Votypka J. (2023). Imidaclopid increases the prevalence of the intestinal parasite *Lotmaria passim* in honey bee workers. Science of The Total Environment 905: 166973. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166973>
- Erban T. (2023). MassIVE MSV000092818 - Imidaclopid increases the prevalence of *Lotmaria passim* in honey bee workers. DOI: 10.25345/C5RN30J5M, ProteomeXchange PXD045086. <https://massive.ucsd.edu/ProteoSAFe/dataset.jsp?accession=MSV000092818>
- Hubert J., Bicianova M., Ledvinka O., Kamler M., Lester P. J., Nesvorna M., Kopecky J., Erban T. (2017). Changes in the bacteriome of honey bees associated with the parasite *Varroa destructor*, and pathogens *Nosema* and *Lotmaria passim*. Microbial Ecology 73 (3): 685–698. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0869-7>
- Pařízková K. (2023). Trypanosomatida včel a jejich interakce s polutanty: magisterská diplomová práce. Katedra parazitologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha, 95 s. (školitel specialista: Tomáš Erban)
- 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., 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.

9. Seznam citované literatury

1. Motta E. V. S., Moran N. A. (2024). The honeybee microbiota and its impact on health and disease. *Nature Reviews Microbiology* 22 (3): 122–137. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00990-3>
2. Kakumanu M. L., Reeves A. M., Anderson T. D., Rodrigues R. R., Williams M. A. (2016). Honey bee gut microbiome is altered by in-hive pesticide exposures. *Frontiers in Microbiology* 7: 1255. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01255>
3. Motta E. V. S., Raymann K., Moran N. A. (2018). Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (41): 10305–10310. <https://doi.org/10.1073/pnas.1803880115>
4. El Khoury S., Gauthier J., Bouslama S., Cheaib B., Giovenazzo P., Derome N. (2021). Dietary contamination with a neonicotinoid (clothianidin) gradient triggers specific dysbiosis signatures of microbiota activity along the honeybee (*Apis mellifera*) digestive tract. *Microorganisms* 9 (11): 2283. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112283>
5. Rouzé R., Moné A., Delbac F., Belzunces L., Blot N. (2019). The honeybee gut microbiota is altered after chronic exposure to different families of insecticides and infection by *Nosema ceranae*. *Microbes and Environments* 34 (3): 226–233. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME18169>
6. Motta E. V. S., Powell J. E., Moran N. A. (2022). Glyphosate induces immune dysregulation in honey bees. *Animal Microbiome* 4 (1): 16. <https://doi.org/10.1186/s42523-022-00165-0>
7. O’Neal S. T., Anderson T. D., Wu-Smart J. Y. (2018). Interactions between pesticides and pathogen susceptibility in honey bees. *Current Opinion in Insect Science* 26: 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.01.006>
8. Paris L., Peghaire E., Moné A., Diogon M., Debroas D., Delbac F., El Alaoui H. (2020). Honeybee gut microbiota dysbiosis in pesticide/parasite co-exposures is mainly induced by *Nosema ceranae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 172: 107348. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107348>
9. Straub L., Strobl V., Yañez O., Albrecht M., Brown M. J. F., Neumann P. (2022). Do pesticide and pathogen interactions drive wild bee declines? *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 18: 232–243. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2022.06.001>
10. Harwood G. P., Dolezal A. G. (2020). Pesticide–virus interactions in honey bees: challenges and opportunities for understanding drivers of bee declines. *Viruses* 12 (5): 566. <https://doi.org/10.3390/v12050566>
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. *Scientific Reports* 12: 20787. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24946-4>
12. vanEngelsdorp D., Evans J. D., Saegerman C., Mullin C., Haubruge E., Nguyen B. K., Frazier M., Frazier J., Cox-Foster D., Chen Y., Underwood R., Tarry D. R., Pettis J. S. (2009). Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS One* 4 (8): e6481. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006481>
13. Genersch E., Evans J. D., Fries I. (2010). Honey bee disease overview. *Journal of Invertebrate Pathology* 103 (Supplement): S2–S4. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.015>
14. Pettis J. S., vanEngelsdorp D., Johnson J., Dively G. (2012). Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften* 99 (2): 153–158. <https://doi.org/10.1007/s00114-011-0881-1>
15. Tokarev Y. S., Huang W.-F., Solter L. F., Malysh J. M., Becnel J. J., Vossbrinck C. R. (2020). A formal redefinition of the genera *Nosema* and *Vairimorpha* (Microsporidia: Nosematidae) and

- reassignment of species based on molecular phylogenetics. *Journal of Invertebrate Pathology* 169: 107279. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107279>
16. Bartolomé C., Higes M., Martín Hernández R., Chen Y. P., Evans J. D., Huang Q. (2024). The recent revision of the genera *Nosema* and *Vairimorpha* (Microsporidia: Nosematidae) was flawed and misleads bee scientific community. *Journal of Invertebrate Pathology* (in press): 108146. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2024.108146>
 17. Langridge D. F., McGhee R. B. (1967). *Crithidia mellificae* n. sp. an acidophilic trypanosomatid of the honey bee *Apis mellifera*. *The Journal of Protozoology* 14 (3): 485–487. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1967.tb02033.x>
 18. Schwarz R. S., Bauchan G. R., Murphy C. A., Ravoet J., de Graaf D. C., Evans J. D. (2015). Characterization of two species of Trypanosomatidae from the honey bee *Apis mellifera*: *Crithidia mellificae* Langridge and McGhee, and *Lotmaria passim* n. gen., n. sp. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 62 (5): 567–583. <https://doi.org/10.1111/jeu.12209>
 19. Arismendi N., Caro S., Castro M. P., Vargas M., Riveros G., Venegas T. (2020). Impact of mixed infections of gut parasites *Lotmaria passim* and *Nosema ceranae* on the lifespan and immune-related biomarkers in *Apis mellifera*. *Insects* 11 (7): 420. <https://doi.org/10.3390/insects11070420>
 20. Nanetti A., Ellis J. D., Cardaio I., Cilia G. (2021). Detection of *Lotmaria passim*, *Crithidia mellificae* and replicative forms of Deformed wing virus and Kashmir bee virus in the small hive beetle (*Aethina tumida*). *Pathogens* 10 (3): 372. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030372>
 21. Gómez-Moracho T., Buendía-Abad M., Benito M., García-Palencia P., Barrios L., Bartolomé C., Maside X., Meana A., Jiménez-Antón M., Olías-Molero A., Alunda J., Martín-Hernández R., Higes M. (2020). Experimental evidence of harmful effects of *Crithidia mellificae* and *Lotmaria passim* on honey bees. *International Journal for Parasitology* 50 (13): 1117–1124. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.06.009>
 22. Erban T., Parizkova K., Sopko B., Talacko P., Markovic M., Jarosova J., Votypka J. (2023). Imidacloprid increases the prevalence of the intestinal parasite *Lotmaria passim* in honey bee workers. *Science of The Total Environment* 905: 166973. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166973>
 23. Runckel C., Flenniken L. M., Engel J. C., Ruby J. G., Ganem D., Andino R., DeRisi J. L. (2011). Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema*, and *Crithidia*. *PLoS One* 6(6): e20656. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020656>
 24. Schwarz R. S., Evans J. D. (2013). Single and mixed-species trypanosome and microsporidia infections elicit distinct, ephemeral cellular and humoral immune responses in honey bees. *Developmental & Comparative Immunology* 40 (3–4): 300–310. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.03.010>
 25. Ravoet J., Maharramov J., Meeus I., De Smet L., Wenseleers T., Smagghe G., de Graaf D. C. (2013). Comprehensive bee pathogen screening in Belgium reveals *Crithidia mellificae* as a new contributory factor to winter mortality. *PLoS One* 8 (8): e72443. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072443>
 26. Strobl V., Yañez O., Straub L., Albrecht M., Neumann P. (2019). Trypanosomatid parasites infecting managed honeybees and wild solitary bees. *International Journal for Parasitology* 49 (8): 605–613. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2019.03.006>

27. Michalczyk M., Sokół R., Bancercz-Kisiel A. (2022). Coexistence between selected pathogens in honey bee workers. *Journal of Apicultural Research* 61 (3): 346–351. <https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1994261>
28. Hubert J., Bicianova M., Ledvinka O., Kamler M., Lester P. J., Nesvorna M., Kopecky J., Erban T. (2017). Changes in the bacteriome of honey bees associated with the parasite *Varroa destructor*, and pathogens *Nosema* and *Lotmaria passim*. *Microbial Ecology* 73 (3): 685–698. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0869-7>
29. Michalczyk M., Bancercz-Kisiel A., Sokół R. (2020). *Lotmaria passim* as third parasite gastrointestinal tract of honey bees living in tree trunk. *Journal of Apicultural Science* 64 (1): 143–151. <https://doi.org/10.2478/jas-2020-0012>
30. Tritschler M., Retschnig G., Yañez O., Williams G. R., Neumann P. (2017). Host sharing by the honey bee parasites *Lotmaria passim* and *Nosema ceranae*. *Ecology and Evolution* 7 (6): 1850–1857. <https://doi.org/10.1002/ece3.2796>
31. Williams M.-K. F., Cleary D. A., Tripodi A. D., Szalanski A. L. (2024). Co-occurrence of *Lotmaria passim* and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera* L.) from six states in the United States. *Journal of Apicultural Research* 63 (1): 136–139. <https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1960745>
32. Aguado-López D., Bartolomé C., Lopes A. R., Henriques D., Segura S. K., Maside X., Pinto M. A., Higes M., Martín-Hernández R. (2023). Frequent parasitism of *Apis mellifera* by trypanosomatids in geographically isolated areas with restricted beekeeping movements. *Microbial Ecology* 86 (4): 2655–2665. <https://doi.org/10.1007/s00248-023-02266-y>
33. Vejnovic B., Stevanovic J., Schwarz R. S., Aleksic N., Mirilovic M., Jovanovic N. M., Stanimirovic Z. (2018). Quantitative PCR assessment of *Lotmaria passim* in *Apis mellifera* colonies co-infected naturally with *Nosema ceranae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 151: 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.11.003>
34. Stevanovic J., Schwarz R. S., Vejnovic B., Evans J. D., Irwin R. E., Glavinic U., Stanimirovic Z. (2016). Species-specific diagnostics of *Apis mellifera* trypanosomatids: a nine-year survey (2007–2015) for trypanosomatids and microsporidians in Serbian honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* 139: 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.07.001>
35. Arismendi N., Castro M. P., Vargas M., Zapata C., Riveros G. (2022). The trypanosome *Lotmaria passim* prevails in honey bees of different ages and stages of development. *Journal of Apicultural Research* 61 (1): 63–69. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1828239>
36. Michalczyk M., Sokół R., Bancercz-Kisiel A. (2024). Presence of *Lotmaria passim*, *Crithidia mellificae* and *Nosema* spp. in differently aged *Apis mellifera* brood. *Journal of Apicultural Research* 63 (2): 287–296. <https://doi.org/10.1080/00218839.2022.2055265>
37. Buendía-Abad M., García-Palencia P., de Pablos L. M., Alunda J. M., Osuna A., Martín-Hernández R., Higes M. (2022). First description of *Lotmaria passim* and *Crithidia mellificae* haptomonad stages in the honeybee hindgut. *International Journal for Parasitology* 52 (1): 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2021.06.005>
38. Erban T., Harant K., Kamler M., Markovic M., Titera D. (2016). Detailed proteome mapping of newly emerged honeybee worker hemolymph and comparison with the red-eye pupal stage. *Apidologie* 47 (6): 805–817. <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0437-7>
39. Erban T., Sopko B., Kadlikova K., Talacko P., Harant K. (2019). *Varroa destructor* parasitism has a greater effect on proteome changes than the deformed wing virus and activates TGF- β signaling pathways. *Scientific Reports* 9: 9400. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45764-1>

40. Buendía-Abad M., Higes M., Martín-Hernández R., Barrios L., Meana A., Fernández A. F., Osuna A., De Pablos L. M. (2021). Workflow of *Lotmaria passim* isolation: experimental infection with a low-passage strain causes higher honeybee mortality rates than the PRA-403 reference strain. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 14: 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2020.12.003>
41. Brown M. J. F., Schmid-Hempel R., Schmid-Hempel P. (2003). Strong context-dependent virulence in a host–parasite system: reconciling genetic evidence with theory. *Journal of Animal Ecology* 72 (6): 994–1002. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2656.2003.00770.x>
42. Logan A., Ruiz-González M. X., Brown M. J. F. (2005). The impact of host starvation on parasite development and population dynamics in an intestinal trypanosome parasite of bumble bees. *Parasitology* 130 (6): 637–642. <https://doi.org/10.1017/S0031182005007304>
43. MacInnis C. I., Luong L. T., Pernal S. F. (2023). A tale of two parasites: responses of honey bees infected with *Nosema ceranae* and *Lotmaria passim*. *Scientific Reports* 13: 22515. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-49189-9>
44. Medrzycki P., Sgolastra F., Bortolotti L., Bogo G., Tosi S., Padovani E., Porrini C., Sabatini A. G. (2010). Influence of brood rearing temperature on honey bee development and susceptibility to poisoning by pesticides. *Journal of Apicultural Research* 49 (1): 52–59. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.07>
45. Cho S., Lee S. H., Kim S. (2022). Determination of the optimal maturation temperature for adult honey bee toxicity testing. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 257: 109359. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109359>
46. Cook D., Blackler A., McGree J., Hauxwell C. (2021). Thermal impacts of apicultural practice and products on the honey bee colony. *Journal of Economic Entomology* 114 (2): 538–546. <https://doi.org/10.1093/jee/toab023>
47. Martín-Hernández R., Meana A., García-Palencia P., Marín P., Botías C., Garrido-Bailón E., Barrios L., Higes, M. (2009). Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (8): 2554–2557. <https://doi.org/10.1128/AEM.02908-08>
48. Xu G., Palmer-Young E., Skyrn K., Daly T., Sylvia M., Averill A., Rich S. (2018). Triplex real-time PCR for detection of *Crithidia mellificae* and *Lotmaria passim* in honey bees. *Parasitology Research* 117 (2): 623–628. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5733-2>
49. Morey R. D., Rouder J. N., Jamil T. (2015). BayesFactor: computation of Bayes factors for common designs. CRAN - The Comprehensive R Archive Network. <https://CRAN.R-project.org/package=BayesFactor>
50. Puga J. L., Krzywinski M., Altman N. (2015). Bayesian statistics. *Nature Methods* 12 (5): 377–378. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3368>
51. Etz A. (2015). Using Bayes factors to get the most out of linear regression: a practical guide using R. The Winnower. <https://web.archive.org/web/20151022205527/https://thewinnower.com/papers/278-using-bayes-factors-to-get-the-most-out-of-linear-regression-a-practical-guide-using-r>
52. Evropská komise (EK). (2018). Prováděcí nařízení Komise (EU) 2018/113 ze dne 24. ledna 2018, kterým se v souladu s nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009 o uvádění přípravků na ochranu rostlin na trh obnovuje schválení účinné látky acetamiprid a kterým se mění příloha prováděcího nařízení Komise (EU) č. 540/2011. *Úřední věstník Evropské unie* L 20: 7–10. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX%3A32018R0113>

53. Evropský parlament (EP). (2021). Usnesení Evropského parlamentu ze dne 10. června 2021 o prováděcím nařízení Komise (EU) 2021/621 ze dne 15. dubna 2021, kterým se mění nařízení (EU) č. 37/2010 za účelem klasifikace látky imidakloprid podle maximálního limitu reziduí v potravinách živočišného původu (2021/2705(RSP)). https://www.europarl.europa.eu/doceo/document/TA-9-2021-0284_CS.html
54. European Chemicals Agency (ECHA). (2023). Substance infocard: imidakloprid (ISO); 1-(6-chloropyridin-3-ylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylidenamine. Evropská agentura pro chemické látky. <https://echa.europa.eu/cs/substance-information/-/substanceinfo/100.102.643>
55. Cox J., Hein M. Y., Lubner C. A., Paron I., Nagaraj N., Mann M. (2014). Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Molecular & Cellular Proteomics* 13 (9): 2513–2526. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.031591>
56. 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. *Nature Methods* 13 (9): 731–740. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3901>
57. Schmuck R., Schöning R., Stork A., Schramel O. (2001). Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L, Hymenoptera) by an imidakloprid seed dressing of sunflowers. *Pest Management Science* 57 (3): 225–238. <https://doi.org/10.1002/ps.270>
58. Blacquièrre T., Smagghe G., van Gestel C. A. M., Mommaerts V. (2012). Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology* 21 (4): 973–992. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0863-x>
59. Bonmatin J. M., Moineau I., Charvet R., Fleche C., Colin M. E., Bengsch E. R. (2003). A LC/APCI-MS/MS method for analysis of imidakloprid in soils, in plants, and in pollens. *Analytical Chemistry* 75 (9): 2027–2033. <https://doi.org/10.1021/ac020600b>
60. Liu Q., Lei J., Darby A. C., Kadowaki T. (2020). Trypanosomatid parasite dynamically changes the transcriptome during infection and modifies honey bee physiology. *Communications Biology* 3 (1): 51. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0775-x>
61. Ardalani H., Vidkjær N. H., Kryger P., Fiehn O., Fomsgaard I. S. (2021). Metabolomics unveils the influence of dietary phytochemicals on residual pesticide concentrations in honey bees. *Environment International* 152: 106503. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106503>
62. Arathi, H. S., Bernklau E. (2021). Context-dependent effect of dietary phytochemicals on honey bees exposed to a pesticide, thiamethoxam. *Journal of Insect Science* 21 (4): 11. <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieab053>
63. Yoshiga T., Georgieva T., Dunkov B. C., Harizanova N., Ralchev. K., Law J. H. (1999). *Drosophila melanogaster* transferrin. Cloning, deduced protein sequence, expression during the life cycle, gene localization and up-regulation on bacterial infection. *European Journal of Biochemistry* 260 (2): 414–420. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00173.x>
64. Iatsenko I., Marra A., Boquete J.-P., Peña J., Lemaitrea B. (2020). Iron sequestration by transferrin 1 mediates nutritional immunity in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117 (13): 7317–7325. <https://doi.org/10.1073/pnas.1914830117>
65. Najera D. G., Dittmer N. T., Weber J. J., Kanost M. R., Gorman M. J. (2021). Phylogenetic and sequence analyses of insect transferrins suggest that only transferrin 1 has a role in iron homeostasis. *Insect Science* 28 (2): 495–508. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12783>

66. Rodríguez-García C., Heerman M. C., Cook S. C., Evans J. D., DeGrandi-Hoffman G., Banmeke O., Zhang Y., Huang S., Hamilton M., Chen Y. P. (2021). Transferrin-mediated iron sequestration suggests a novel therapeutic strategy for controlling *Nosema* disease in the honey bee, *Apis mellifera*. *PLoS Pathogens* 17 (2): e1009270. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009270>
67. Taylor M. C., McLatchie A. P., Kelly J. M. (2013). Evidence that transport of iron from the lysosome to the cytosol in African trypanosomes is mediated by a mucolipin orthologue. *Molecular Microbiology* 89 (3): 420–432. <https://doi.org/10.1111/mmi.12285>
68. Erban T., Sopko B., Talacko P., Harant K., Kadlikova K., Halesova T., Riddelova K., Pekas A. (2019). Chronic exposure of bumblebees to neonicotinoid imidacloprid suppresses the entire mevalonate pathway and fatty acid synthesis. *Journal of Proteomics* 196: 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.12.022>
69. Zou Y., Schreiber S. L. (2020). Progress in understanding ferroptosis and challenges in its targeting for therapeutic benefit. *Cell Chemical Biology* 27 (4): 463–471. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2020.03.015>
70. Li S., Xu W., Wang H., Tang T., Ma J., Cui Z., Shi H., Qin T., Zhou H., Li L., Jiang T., Li C. (2022). Ferroptosis plays an essential role in the antimalarial mechanism of low-dose dihydroartemisinin. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 148: 112742. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112742>
71. Zheng J., Conrad M. (2020). The metabolic underpinnings of ferroptosis. *Cell Metabolism* 32 (6): 920–937. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.10.011>
72. Hao S., Liang B., Huang Q., Dong S., Wu Z., He W., Shi M. (2018). Metabolic networks in ferroptosis. *Oncology Letters* 15 (4): 5405–5411. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8066>
73. 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>
74. 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 978-80-7427-432-9