Tomáš Erban

Varroóza v komplexních souvislostech – Metodika klíckového experimentu pro hodnocení vlivu *Varroa destructor* na včely se zahrnutím interakce s polutanty/pesticidy

METODIKA

NmetS

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

2024

Varroóza v komplexních souvislostech – Metodika klíckového experimentu pro hodnocení vlivu *Varroa destructor* na včely se zahrnutím interakce s polutanty/pesticidy

Tomáš Erban

Tomáš Erban[a]

[a]Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Drnovská 507/73, 161 06 Praha 6-Ruzyně

Korespondence: RNDr. Tomáš Erban, Ph.D

erban@vurv.cz, arachnid@centrum.cz ORCID: 0000-0003-1730-779X

Oponenti:

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

MVDr. Leoš Čeleda, CSc. – Oddělení ochrany zdraví zvířat, Státní veterinární správa, Praha

Vydal:

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

ISBN 978-80-7427-434-3

Financování:

Metodika byla vytvořena s finanční podporou projektu č. QK1910018 „Vývoj MULTIOMICS analýzy rizik pesticidů na včely s ohledem na reálné znečištění, koktejlový efekt a další stresory“ Ministerstva zemědělství ČR, Národní agentury pro zemědělský výzkum (NAZV).

Uznání metodiky:

Metodice bylo uděleno osvědčení Státní veterinární správy (SVS) č. SVS/2024/138188-G.

O uplatnění metodiky je uzavřena smlouva QK1910018m02 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 Doc. Mgr. Martin Šlachta, Ph.D., a MVDr. Leoš Čeleda, CSc..

Prohlášení:

Předkladatel metodiky prohlašuje, že nemá žádný konflikt zájmu a že zpracovaná metodika nezasahuje do práv jiných osob z průmyslového nebo jiného duševního vlastnictví. Autorem všech fotografií a ilustrací je Tomáš Erban.

Poděkování: Poděkování patří Martinovi Markovičovi za pomoc s editací rukopisu a také recenzentům za podnětné a cenné připomínky.

Anotace:

Varroóza je tradičně vnímána jako onemocnění včely medonosné *Apis mellifera* způsobené invazním ektoparazitickým roztočem *Varroa destructor*, který je dlouhodobě největším rizikem pro včelstva. Dnes je potřeba varroózu vnímat v širších souvislostech. V průběhu parazitace na zavíčkovaném plodu a dospělých včelách roztoč kromě odebírání živin sáním přenáší také viry, jejichž množení také podporuje. Velmi úzká interakce se utvořila mezi *V. destructor* a virem deformovaných křídel (DWV). Právě virové infekce nakonec způsobují výrazná slábnutí včelstev a jejich úhyny. Pokročilé stádium varroózy se projevuje komplexem znaků, které se v literatuře označuje jako „syndrom parazitického roztoče“ (PMS). Některé látky v prostředí, včetně pesticidů, mohou navíc ovlivňovat interakce mezi roztočem a viry, a umocňovat tak jejich negativní sílu. Metodika představuje problém varroózy v komplexních souvislostech a je zaměřena na provedení biologického experimentu, kterým se získají vzorky pro hodnocení vlivu parazitace *V. destructor* na včely. Metodika umožňuje do experimentálního hodnocení zahrnout také látky, např. pesticidy, které mohou potenciálně zesilovat negativní dopady parazitace včel roztočem. Přínos metodiky je v identifikaci nových rizik, která mohou přispívat ke ztrátám včelstev. Pochopení rizik varroózy na včely v komplexních souvislostech je potřeba pro mitigaci škod. Předpokládané přínosy jsou také v dentifikaci a snižování rizik znečištění prostředí pro včely a při hodnocení rizik polutantů/pesticidů na životní prostředí.

Title: Varroosis in comprehensive contexts – Methodology for a cage experiment to assess the impact of *Varroa destructor* on bees including interaction with pollutants/pesticides

Annotation:

Varroosis has traditionally been perceived as a disease of honey bees *Apis mellifera* caused by the invasive ectoparasitic mite *Varroa destructor*, which poses the greatest long-term threat to honey bee colonies. Today, varroosis must be viewed in a broader context. In the process of parasitizing brood and adult bees, the mite not only sucks up nutrients, but also transmits and promotes the multiplication of viruses. A very close interaction has formed between *V. destructor* and deformed wing virus (DWV). It is the viral infections that ultimately cause significant colony collapse and mortality. The advanced stage of varroosis is manifested by a complex of signs that is referred to as "Parasitic Mite Syndrome" (PMS). In addition, certain substances in the environment, including pesticides, can influence the interactions between the mite and the viruses, thus amplifying their negative force. The methodology presents the problem of varroosis in a comprehensive context and is aimed at conducting a biological experiment to obtain samples to assess the impact of *V. destructor* parasitization on bees. The methodology also allows the inclusion in the experimental evaluation of substances, such as pesticides, that can potentially amplify the negative effects of mite parasitization of bees. The contribution of the methodology is to identify new risks that may contribute to colony losses. Understanding the risks of varroosis to bees in a comprehensive context is necessary for mitigation. Benefits are also expected in identifying and reducing the risks of environmental pollution to bees and in assessing the risks of pollutants/pesticides to the environment.

Obsah

1. Úvod ..... - 1 -
1.1. *Varroa destructor* – původce varroózy včely medonosné *Apis mellifera* ..... - 1 -
1.2. Varroóza – samotný roztoč a jeho vliv na včely ..... - 2 -
1.3. Varroóza není jen roztoč ale i viry, zejména DWV ..... - 4 -
1.4. Varroóza – syndrom parazitického roztoče ..... - 7 -
1.5. Varroóza – zesílení důsledků ovlivněním interakce s polutanty/pesticidy ..... - 10 -
2. Cíl metodiky ..... - 11 -
3. Vlastní popis metodiky ..... - 11 -
3.1. Experimentální klícka ..... - 12 -
3.3. Biologický materiál – včely a roztoči ..... - 14 -
3.3.1. Vzorky samiček *V. destructor* ..... - 14 -
3.3.2. Vzorky zdravých líhnoucích se včelích dělnic ..... - 15 -
3.3. Výběr pesticidní látky ..... - 18 -
3.4. Experimentální varianty a založení experimentu ..... - 18 -
3.5. Analýzy vzorků a interpretace dat ..... - 19 -
4. Příklad provedení metodiky ..... - 19 -
5. Srovnání novosti metodiky ..... - 24 -
6. Uplatnění metodiky ..... - 25 -
7. Ekonomické přínosy metodiky ..... - 26 -
8. Publikace autora, které předcházely metodice ..... - 26 -
9. Seznam citované literatury ..... - 28 -

1. Úvod

1.1. *Varroa destructor* – původce varroózy včely medonosné *Apis mellifera*

Roztoči *Varroa* jsou ektoparazité plodu a dospělců včel medonosných rodu *Apis*. Rozlišují se čtyři druhy těchto ektoparazitických roztočů: *Varroa jacobsoni*, *Varroa underwoodi*, *Varroa rindereri* a *Varroa destructor* [1]. Poslední jmenovaný druh je tím, který se vyskytuje na „naší" včele medonosné *Apis mellifera* Linnaeus, 1758. Je na místě zmínit, že původně byl chybně označován za roztoče parazitujícího na *A. mellifera* druh *Varroa jacobsoni* Oudemans, 1904. Že se ve skutečnosti jedná o jiný druh, objasnili Anderson a Trueman v roce 2000 pomocí molekulárních metod. Dospělé samice *V. destructor* se však odlišují od *V. jacobsoni* také morfologicky, jelikož jsou větší a méně kulovitého tvaru. Tyto druhy jsou navíc reprodukčně izolované. Anderson a Trueman [2] navrhli nové jméno *Varroa destructor*, které odpovídalo populacím roztočů vyskytujících se na asijské pevnině na včele východní *Apis cerana* Fabricius, 1793, ale ve studii zahrnuli také haplotyp z ostrova Jáva, jehož vzorky byly použity k prvnímu popisu *V. jacobsoni* na začátku 20. století Oudemansem [3], což pomohlo vysvětlit chybné označení roztoče parazitujícího na *A. mellifera* [2].

Včela medonosná *A. mellifera* není původním hostitelem *V. destructor*. Předpokládá se, že k přesunu roztoče z *A. cerana* došlo někdy v 50. letech 20. století. Od té doby se *V. destructor* postupně šířil na populace *A. mellifera* z východní Asie do Evropy, kde se v 80. letech 20. století rychle rozšířil. Adaptace na nového hostitele, importace matek a přesuny včelstev usnadnily a urychlily rozšíření *V. destructor* [4–6]. První záznam o výskytu *V. destructor* v tehdejším Československu ve východním Slovensku se datuje do roku 1978. Na území Česka byl objeven v roce 1981 v okrese Ústí nad Orlicí [7]. V Česku je *V. destructor* uveden na seznamu invazivních druhů s vážným dopadem na zemědělství [8, 9].

Správné označení druhu ektoparazitického roztoče včely medonosné *Apis mellifera* je *Varroa destructor* (Anderson a Trueman, 2000) a jedná se o jejího nepůvodního parazita. Existuje více druhů *Varroa*, kteří parazují na jiných druzích včel.

Pozn. 1. Nelze exaktně tvrdit, že *A. mellifera* může napadat jen *V. destructor*. Svědčí o tom fakt, že na včelách *A. mellifera* byl v roce 2008 poprvé identifikován také skutečný *V. jacobsoni*, a to v oblasti jeho výskytu v tichomořské ostrovní zemi Papua-Nová Guinea [10].

Pozn. 2. *Apis mellifera* se označuje anglicky jako western honey bee nebo European honey bee, doslovný překlad do češtiny je: „západní včela medonosná“ nebo „evropská včela medonosná“; *Apis cerana* se označuje anglicky jako eastern honey bee nebo Asian honey bee, doslovný překlad do češtiny je: „východní včela medonosná“ nebo „asijská včela medonosná“.

Pozn. 3. V českém jazyce se setkáváme s nejasnostmi ohledně správného názvu druhu z rodu *Varroa* parazitujího na *A. mellifera*. Antonín Kůrka uvádí v roce 2005 v seznamu českých názvů roztočů pro *Varroa destructor* český název **kleštík zhoubný**. Pro *Varroa jacobsoni* uvádí A. Kůrka český název **kleštík včelí** a jako „synonymum, které nedoporučuje používat“, název roztoč včelí [11]. Antonín Přidal uvádí v letech 2006 a 2007 ve včelařských časopisech pro *V. destructor* český název **kleštík včelí** a jako „nesprávná označení“ uvádí 4 názvy: *Varroa jacobsoni* auct., roztoč *Varroa*, roztoč včelí, včelík zhoubný [12–14]. Pro *V. jacobsoni* uvádí A. Přidal český název **kleštík Jakobsonův** [14].

Pozn. 4. Setkáváme se i s nejednotností ohledně nemoci včel způsobované roztoči *Varroa*. Někteří autoři používají český termín varroáza [15–18]. Jiní upozorňují na nesprávnost tohoto termínu a za správný český název považují varroóza: „Správná etymologie tohoto onemocnění je varroóza (s příponou -óza, latinsky -osis) s českým ekvivalentem kleštíkovitost včel. V Česku je používán i nesprávný termín varroáza“ [19]. Světová organizace pro zdraví zvířat (WOAH) uvádí stejně jako řada dalších organizací v zahraničí jako oficiální název varroatosis [20] nebo varroosis [1, 21–23]). V zahraničních zdrojích se však setkáváme také v angličtině používaným názvem varroasis, což odpovídá poměrně běžně používanému českému názvu varroáza.

1.2. Varroóza – samotný roztoč a jeho vliv na včely

Tradičně se varroóza definuje jako onemocnění způsobené napadením včel medonosných roztoči *Varroa* spp., jak je uvedeno v seznamu nemocí Světové organizace pro zdraví zvířat (anglicky: World Organisation for Animal Health; zkratka: WOAH) [1]. Na dospělých včelách mimo buňku stejně jako na plodu lze spatřit samičky. Samečci jsou mnohem menší a vyskytují se uvnitř buňky, mimo kterou nepřežívají [24]. Samičky můžou být na dospělých včelách přisáty na zadečcích. Snadněji je lze rozeznat, pokud se vyskytnou ve foretické fázi na hrudi včel (obrázek 1). Včelař by měl proto při prohlídce včel dbát pozornosti, zda nespatří roztoče na včelách. Roztoče lze spatřit také na otevřeném plodu, přičemž preferují starší larvy. Především jsou koncentrováni na zavíčkovaném plodu, na kterém se rozmnožují [25].

Zatímco na původním hostiteli *A. cerana* se roztoči rozmnožují pouze na samčím plodu, který je včelami méně ošetřovaný, v případě *A. mellifera* roztoč napadá trubčí i dělničí plod. Trubčí plod *A. mellifera* je však pro *V. destructor* atraktivnější, takže jej preferují [26]. Včely druhu *A. cerana* se díky dlouhému soužití s *Varroa* adaptovaly, a tak jejich dělnice díky rozvinutému čistícímu pudu dokážou napadený plod odhalit a odstranit [27–29]. Čistící pud je sledován také u *A. mellifera* a je definován jako varroarezistence. Někdy lze tedy na zavíčkovaném plodu spatřit otevřené buňky, což indikuje varroarezistenci určitých populací *A. mellifera*. Varroarezistentní

populace *A. mellifera* jsou však zatím poměrně vzácné [30] a této adaptaci včel je potřeba více porozumět [31]. Takové chování včel vede k mezerovitému plodu. Znovuotevřené buňky totiž zůstávají prázdné, jelikož včely larvy a kukly vykousávají a vyhazují. Znaky varroarezistence zároveň indikují napadení roztočem. Je však potřeba takové znaky na plodu související s varroózou odlišit od nemocí plodu jako virová nákaza včelího plodu, označované také jako „pytlíčkovitý plod“, mor včelího plodu či hniloba včelího plodu. Čistící pud dokáže rozvoj varroózy ve včelstvu zpomalit nejen odstraněním napadené larvy/kukly. Otevřením buňky je navíc významně narušen vývojový a rozmožovací cyklus roztoče, který probíhá právě v uzavřené buňce. Včelstvo sice přichází o jednotlivé včely, ale převážná většina vyvíjejícího se plodu je lépe ochráněna od přímého napadení roztoči. Kromě varroarezistence se rozlišuje také varroatolerance. Tyto dva pojmy by se neměly zaměňovat, protože znamenají něco jiného: rezistence znamená snížení rozvoje počtu *V. destructor*, zatímco tolerance snižuje parazitární zátěž navzdory podobnému napadení roztoči [32, 33]. Varroatolerantní populace tedy snesou větší napadení roztoči. Vyšší počet roztočů na stejný počet včel v úle je samozřejmě lépe rozeznatelný pro včelaře.

Přímý negativní vliv parazitismu *V. destructor* souvisí s oslabením hostitele, protože parazit odebírá sáním živiny. Líhnoucí se včely parazitované roztoči mají nižší váhu a obsah vody, což narušuje jejich životaschopnost. Mají také nižší obsah bílkovin a sacharidů, zatímco obsah lipidů nebyl ovlivněn [34]. Pomocí proteomického přístupu bylo prokázáno, že těla roztočů *V. destructor* obsahují řadu proteinů získaných od hostitelských včel [35, 36], a v roztočích byly identifikovány také virové proteiny [35]. Kromě toho byly v roztočích identifikovány buněčné složky, například z tukového tělíska [37], spolu s proteinovými složkami hemolymfy [35]. Podle Ramsey a kol. (2019) se roztoči živí spíše tukovým tělískem včel než jejich hemolymfou [37].

Samičky *V. destructor* jsou okem viditelné na dospělých včelách, plodu i plástech. Samotní roztoči škodí odebíráním živin plodu i dospělým dělnicím, čímž je oslabují a snižují jejich životaschopnost. Mezi včelstvy jsou rozdíly ve schopnosti odolávat napadení roztoči.

Obrázek 1. Dospělé samičky *V. destructor* na včelách i na plástech jsou rozeznatelní okem. Na jednotlivých včelách se může vyskytnout v jednom okamžiku i více roztočů. Pokud taková včela s roztoči opustí úl, může šířit nákazu do okolních včelstev, přičemž značné riziko představuje zalétávání. Včelař by měl při prohlídce včelstev sledovat, zda neobjeví foretické roztoče na včelách, jelikož jsou indikátorem varroózy. Zvláště foretičtí roztoči na hrudi jsou dobře rozeznatelní.

1.3. Varroóza není jen roztoč ale i viry, zejména DWV

Vzhledem k rostoucím znalostem o virech včel a jejich potvrzené významné roli v souvislosti s výskytem *V. destructor* při úhynech (kolapsech) včelstev však varroóza definovaná jako výskyt roztoče ve včelstvech již nereprezentovala celý proces onemocnění u *A. mellifera* [5, 38]. Největší riziko pro včelstva infestovaná *V. destructor* představuje přenos virů na hostitele. Ve skutečnosti *V. destructor* přenáší viry mezi včelstvy a parazitací způsobuje zvyšování virových hladin [5, 39]. Ve včelstvech se vyskytuje mnoho druhů různých virů. Napadení včel *V. destructor* nejvíce souvisí s virem deformovaných křídel (anglicky Deformed wing virus; zkratka DWV). Tento virus, jak jeho název napovídá, způsobuje deformace včel (obrázek 2), což je považováno za typický příznak varroózy na celém světě [40]. Líhnoucí se včely totiž v důsledku parazitace roztoči poměrně často vykazují morfologické deformace, jejichž pravděpodobnost výskytu se zvyšuje s mírou napadení roztoči [34].

Obrázek 2. Včely parazitované *V. destructor* v průběhu vývoje se líhnou poměrně často s deformacemi těla a křídel v různém stupni poškození. Včely mohou mít i vyplazený jazyk. Takto poškozené včely jsou typickým znakem varroózy. Pokud se ve včelstvu vyskytují takto poškozené včely, je v něm varroóza nepochybně v pokročilém stádiu.

Šíření infekce DWV v populacích *A. mellifera* umocnilo rozšiřování *V. destructor* po celém světě [41]. Z důvodu evolučních, epidemiologických a ekologických tlaků se DWV stal z relativně neznámého viru v *A. mellifera* dominantním [40, 42–45]. Poměrně běžně se uvádí, že výskyt *V. destructor* ve včelstevech je asociován s mnoha druhy virů (10 i více), což není přesné. Kromě DWV je výskyt *V. destructor* asociován s viry řazenými do ABPV (anglicky: Acute (bee) paralysis virus; česky: virus akutní paralýzy včel) komplexu. Nové studie dokonce ukazují, že ani vysoce virulentní viry ABPV komplexu, pro které jsou historicky přesvědčivé důkazy o aktivním přenosu roztoči *V. destructor* [46], nemusí být dnes už asociované s výskytem *V. destructor* [47]. Historicky jsou viry ABPV komplexu obecně prvními viry spojovanými s varroózou co do prevalence a zátěže

[39, 43, 48]. Později je však vytlačil DWV z důvodu nadměrné virulence. Dominance DWV proběhla na úrovni jedinců a včelstev [39, 48, 49].

Některá včelstva dokonce mohou být tolerantní na DWV i ABPV. Varroarezistenní včelstva zároveň lépe odolávají virovým infekcím, což je důležitá adaptace, aby přežila varroózu [50]. V této souvislosti bude patrně důležitý poznatek, že roztoči s vysokým obsahem DWV rychle usmrtí své dospělé včelí hostitele, zatímco roztoči s nízkou virovou náloží usmrcují včely pomaleji. U včel parazitovaných roztoči s nízkou virovou náloží může docházet k šíření a sdílení virů, i když zůstávají asymptomatické [51]. Pro odolnost včelstev proti infestaci *V. destructor* je zjevně klíčová míra odolnosti proti virům, které včelstva v konečném důsledku zahubí [26].

Patrně kritickou roli v ovlivnění včelstev varroózou hraje interakce mezi *V. destructor* a DWV, jelikož ta ovlivňuje výskyt variant DWV. V současnosti se ve včelách vyskytují tři genotypy DWV-A, DWV-B a DWV-C. Varianty DWV mohou mít různé vztahy s *V. destructor*, což v důsledku ovlivňuje jejich zastoupení ve včelstvech na různých lokalitách [52]. Studie ukazují, že *V. destructor* má klíčový vliv na evoluci viru, přičemž je sledována postupná dominance DWV-B genotypu nad DWV-A [53–55]. Předpokládá se, že DWV-B by mohl pocházet z původního hostitele *A. cerana* [56]. *V. destructor* však ovlivňuje nejen varianty viru DWV, ale ovlivňuje celkový virom včel, což ukázala srovnávací analýza viromu včelích populací ve střední Evropě s naivními populacemi včel v Austrálii, které byly v době provedení dané studie prosté jak roztoče *V. destructor* i DWV [57, 58]. Je na místě zmínit, že evoluci DWV mohl ovlivnit také moderní chov včel, zahrnující umělý odchov a inseminaci královen. Mohlo totiž dojít k obejití mechanismů přirozeného výběru v evoluci virulence DWV [59].

Po přechodu *V. destructor* na *A. mellifera* se mezi parazitujícími roztoči a DWV vyvinul úzký vztah, který vedl k posílení pozice tohoto viru ve včelách. Přenos DWV roztočem *V. destructor* je pro virus optimální a vzniklá interakce učinila DWV dominantním virem. Uvádí se, že DWV vytlačil i viry ABPV komplexu, které jsou považovány za druhou skupinu virů asociovaných s výskytem *V. destructor* ve včelstvech. *V. destructor* nejen přenáší DWV a zvyšuje jeho hladiny, ale navíc se uplatňuje na jeho evoluci. *V. destructor* zásadně ovlivňuje virulenci DWV a výskyt různě virulentních variant na různých lokalitách.

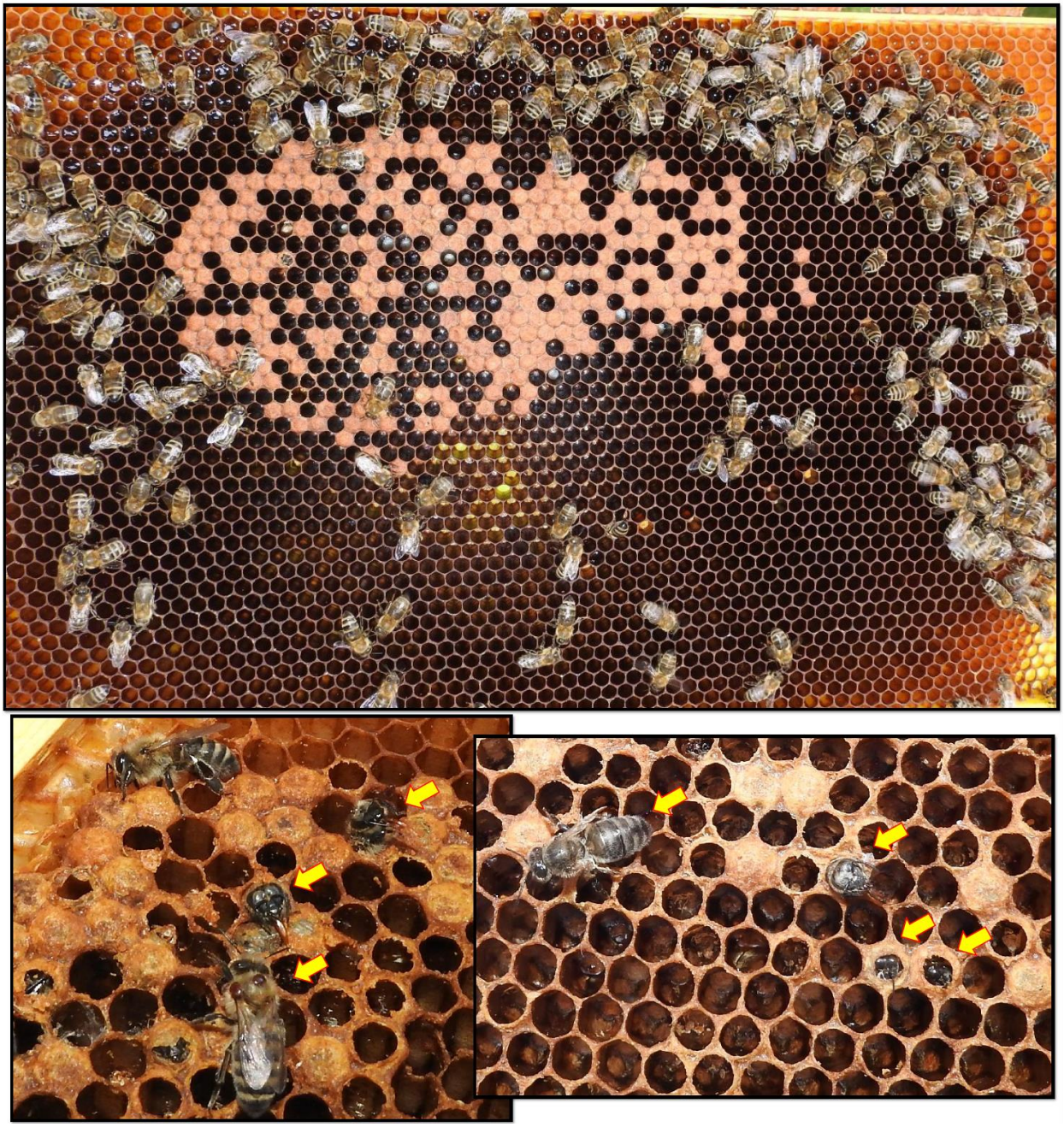
Interakce na úrovni *V. destructor*–DWV je úzce spjata se zdravotním stavem včel a zásadním způsobem ovlivňuje schopnost včelstev odolávat a přežít zejména zimní období. Pochopení mechanismů interakce mezi *V. destructor*, viry a včelami je kritické pro navrhnutí strategií, které by mohly mírnit oslabování a úhyny včelstev v důsledku varroózy. Některé populace včel jsou tolerantní na virové infekce, a tak lépe odolávají varroóze.

1.4. Varroóza – syndrom parazitického roztoče

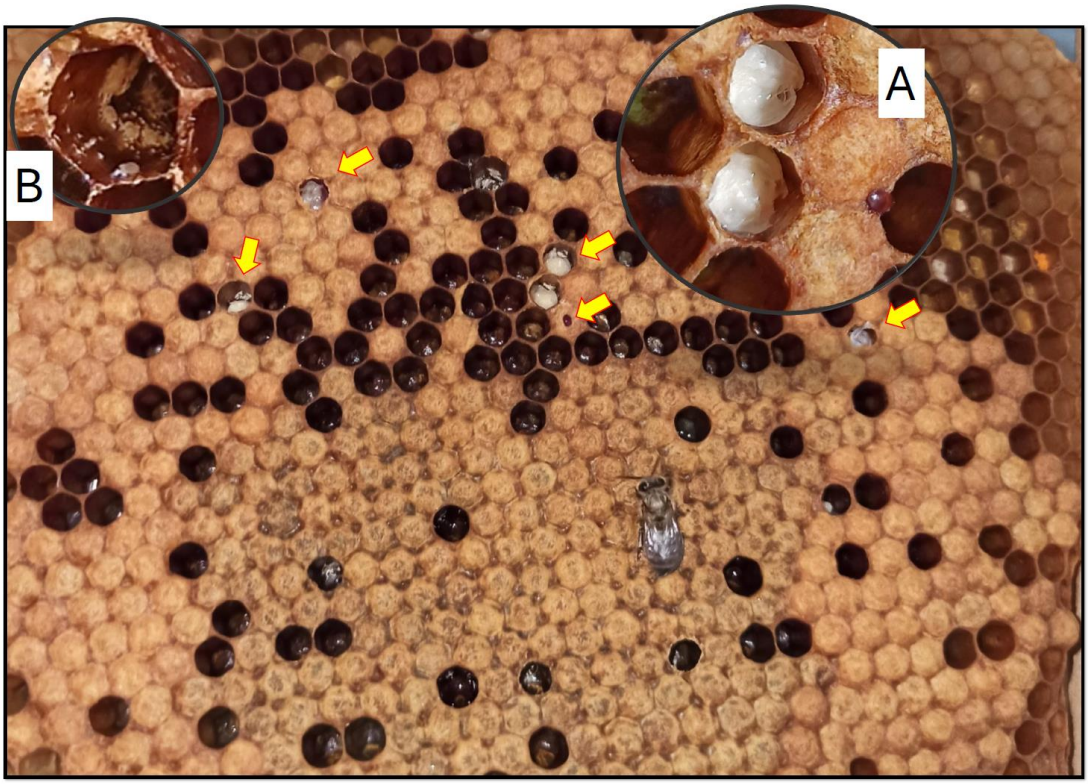
Jelikož je infestace včelstev roztoči *V. destructor* spojena s komplexem příznaků, setkáváme se v zahraniční literatuře s označením „syndrom parazitického roztoče“ (anglicky: Parasitic mite syndrome; zkratka: PMS). V podstatě se jedná o pokročilé stádium varroózy, které je spojeno s vysokým výskytem *V. destructor* ve včelstvu. Typicky lze pozorovat mezerovitý plod nebo jeho vymizení, lezoucí nebo poškozené/deformované včely, snahu včel o výměnu královen nebo přímo ztrátu královny, a náhlé „jinak nevysvětlitelné“ snížení počtu včel [5, 22, 23, 60]. Pokud je včelstvo v takovémto pokročilém stádiu poškození, je s vysokou pravděpodobností pozdě na jeho záchranu. Navíc je včelstvo extrémně velkým nebezpečím pro šíření roztočů *V. destructor* společně s vysokými náložemi virů, zejména DWV, do okolních včelstev. Znaky varroózy v pokročilém stádiu či PMS ilustruje obrázek 3. Některé znaky však mohou být projevem varroarezistence, kdy včely dokážou detekovat roztoče v buňce a plod odstraňují (obrázky 4 a 5). Příznaky PMS je nutné odlišit od jiných nemocí včelího plodu (viz kapitolu 1.2).

Varroóza se v pokročilém stádiu projevuje řadou typických projevů, které se označují v zahranicnčí literatuře jako „syndrom parazitikého roztoče“ (PMS). Typickými znaky pozorovatelnými ve včelstvu jsou mezerovitý plod nebo dokonce jeho vymizení, lezoucí nebo poškozené/deformované včely, snahu včel o výměnu královen nebo přímo ztrátu matky, a náhlé „jinak nevysvětlitelné“ snížení počtu včel.

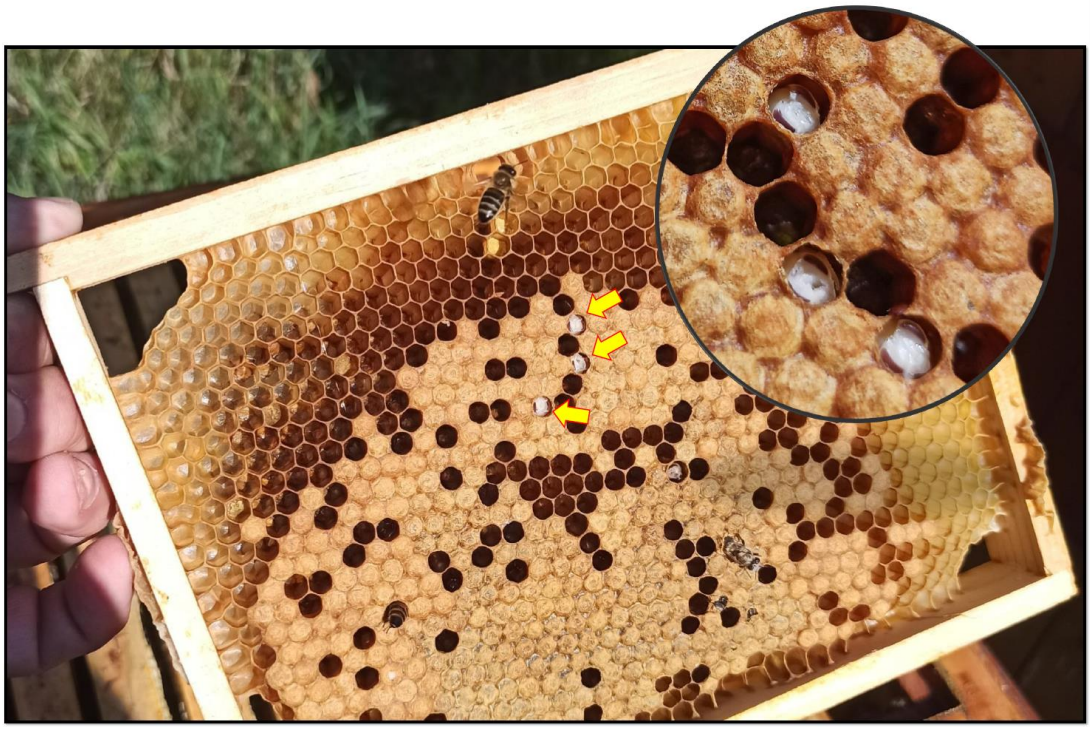
Obrázek 3. Znaky varroózy v pozdním stádiu. I když mají včely zásoby, plod slábne, královna a včely se snaží situaci zachránit, je ale pozdě, i když je začátek srpna. Na relativně malé ploše plodu je vedle sebe uzavřený plod s líhnoucími se včelami a kuklami, larvy i vajíčka. Na jiném rámku mají líhnoucí se včely už problém opustit buňky, některé v buňkách zůstávají a mají vyplazený jazyk. Ve včelstvu se vyskytují deformované včely a na některých dělnicích jsou viditelní foretičtí roztoči, kteří představují riziko pro okolní včelstva.



Obrázek 4. Znaky varroarezistence včel, které zároveň indikují přítomnost *V. destructor*. Včely otevírají buňky, v nichž dokážou odhalit roztoče. **A)** Včely některé kukly vykousávají. **B)** Vývoj nedospělých roztočů (nymfálních stádií) v buňce je otevřením buňky přerušen a roztoči nepřežijí.



Obrázek 5. Znaky varroarezistence včel. Včely otevřely kukly s hnědnoucíma očima.



1.5. Varroóza – zesílení důsledků ovlivněním interakce s polutanty/pesticidy

Včelstva mohou být negativně ovlivněna celou řadou možných faktorů, které se mohou podílet na slábnutí a úhynech. Příčiny úhynů se podaří ve světě prokázat jen u mála případů a jedná se obvykle o oficiální vyšetřování zaměřená na nemoci včel uvedených na seznamu WOAH. Takové případy představují především varroózu, mor včelího plodu a hnilobu včelího plodu [61]. Další případy představují oficiálně potvrzené otravy včel pesticidy [62, 63]. Většina ztrát včelstev však zůstává nevysvětlena, a tak jsou jejich příčiny zastřeny složitostmi různých biotických a abiotických faktorů ovlivňujících včelstva [64–68]. V již tak značně komplikované interakci mezi *V. destructor*, viry a včelami se mohou navíc uplatňovat i další faktory. Významnou roli mohou hrát látky vyskytující se v prostředí. Moderní výzkumy totiž ukázaly, že hladiny včelích patogenů mohou ovlivňovat některé pesticidy, jejichž působením může docházet k dysbióze, tedy nerovnováze mezi mikroorganismy a hostitelem [69, 70].

Jednou z aktuálně zdůrazňovaných výzev považovanou za důležitou pro ochranu včel, je zahrnutí do hodnocení rizik interakce pesticidů s patogeny hostitele [71, 72]. Včele medonosné mohou škodit různé patogeny a škůdci z různých skupin, včetně virů, bakterií, hub, protistů, roztočů i hmyzu [64, 66, 73]. I když se řada organismů rizikových pro včely vyskytuje ve včelstvech vesměs běžně a souběžně, různí původci mohou způsobovat nemoc za určitých okolností. Některé patogeny, jako *Nosema apis* (*Vairimorpha apis*) a *Nosema ceranae* (*Vairimorpha ceranae*) či *Lotmaria passim*, mohou být nebezpečné kvůli zvyšování jejich hladin skrze interakci s některými pesticidy [74–76]. V případě *L. passim* sice není definovaná nemoc, kterou bychom dnes mohli nazývat podobně jako v případě nosemózy „lotmarióza“, jelikož není pojmenovaná [77]. Interakce s některými látkami z prostředí však může být právě důležitým faktorem, který tohoto parazita učiní nebezpečným, jelikož dokáže zvyšovat jeho abundanci v hostiteli [75]. Obdobná situace může nastat v případě včelích virů, které mohou interagovat s pesticidy, přičemž jejich interakce s *V. destructor* skýtá ještě komplexnější situaci [72]. Například neonikotinoid thiamethoxam může zhoršovat účinky DWV. Thiamethoxam může negativně ovlivnit letové chování [78] a životní cyklus *A. mellifera* [79]. V některých případech však mohou parazité a pesticidy působit na zdraví včel antagonisticky. Podle Bird a kol. [80] má kombinované vystavení pesticidům a parazitům tendenci působit více letálně než samostatně, ale je pro včely výrazně méně smrtelné, než předpokládané aditivní nebo multiplikativní účinky [80]. Z obecného

pohledu však takovýto náhled může být platný jen pro některé situace. Míru rizika je potřeba určit experimentálně.

Pro účely metodiky se zaměříme na interakci mezi včelou a parazitickým roztočem *V. destructor* a pesticidy. Neodmyslitelnou součástí napadení *V. destructor* jsou však viry, tedy jednomyslně DWV. Jelikož jsou včely přirozeně vystaveny mnoha různým patogenům, 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.

2. Cíl metodiky

Cílem metodiky je poskytnout obecně platný metodický postup, který umožní připravit vzorky pro hodnocení interakce parazitismu *V. destructor* na včelách s pesticidy a případně dalšími polutanty. Obecným cílem je přispět novými prvky k hodnocení rizik varroózy na včely v komplexních souvislostech. Z jiného pohledu je cílem přispět k hodnocení rizik pesticidů na včely reprezentující necílové organismy. Metodika také představuje komplexní a moderní pohled na varroózu a její komplexní projevy.

3. Vlastní popis metodiky

Provedením metodiky je testována potenciální interakce pesticidní látky s varroózou v modelovém uspořádání a kontrolovaných podmínkách. Zdravé líhnoucí se včely ze včelstva bez příznaků jsou vystaveny roztočům *V. destructor*, zvolenému pesticidu, jejich kombinaci, a souběžně jsou provedeny kontrolní opakování. V typickém případě roztoči *V. destructor* pocházejí ze včelstva s příznaky rozvinuté varroózy, resp. s příznaky PMS. Základním prvkem metodiky je provedení experimentu, při němž jsou včely exponované testované pesticidní látce a také patogenu za účelem zjištění potenciální interakce. Metodický postup obsahuje přípravu experimentální klícky, výběr a odběr včel a roztočů pro experiment, expozici včel pesticidu a patogenu, a odběr včel pro analýzy. Uvedený standardní metodický postup může být dle potřeby modifikován. Změny se mohou dotýkat zejména volby pesticidní látky, ale třeba i míry expozice roztočům (počet *V. destructor* na včelu). Pro analýzu vzorků mohou být voleny analytické metody odvislé od možností různých

laboratoří, ale nejvhodnější jsou vysokokapacitní analýzy (proteomika, transkriptomika), které dokážou identifikovat různé změny a také interakce, které mohou nastat.

3.1. Experimentální klícka

Experimentální klícka je uzpůsobena tak, aby: **i)** umožňovala včelám volný pohyb; **ii)** roztoči nemohli unikat; **iii)** bylo možné aplikovat a vyměňovat krmivo. Pro výrobu klícky je ideální finančně nenáročný materiál vhodný pro jednorázové použití, aby se předešlo kontaminacím mezi různými experimenty či opakováními. Vhodným materiálem je hranatá plastová miska s víčkem, která se pro experimentální účely upraví. Klícka se ve vnitřním prostoru potře panenským voskem pro přiblížení přirozeným podmínkám a snadnějšímu pohybu včel po stěnách klícky (obrázek 6).

Materiál:

- Průhledná potravinová hranatá plastová miska 250 ml nebo 150 ml.
  Miska je vyrobena z polypropylenového (PP) materiálu a je vhodná pro studené i horké potraviny, proto nehrozí tepelné poškození při aplikaci horkého vosku na její stěny.
- Víčka na misky – pro každou misku jsou potřeba 2 víčka.
- Síťovina s malými oky, aby jimi nemohly prolézt samičky *V. destructor*.
- Panenský včelí vosk pro potření stěn klícky.
  Je nutné použít panenský vosk pro eliminaci nežádoucích látek, které se mohou ve vosku ukládat. V žádném případě se nesmí použít vosk, který by mohl být kontaminován chemickým ošetřením (amitraz, pyrethroidy).
- Injekční stříkačky (1 ml nebo jiný objem) pro napájení včel krmivem – v kontrole a s pesticidem.
- Ostré špičaté nůžky (akuvrtačka s příslušenstvím nebo vypalovací pájka na plast).

Postup:

- Ve dně misky se vystříhnou (vypálí) 2 otvory pro stříkačky. Velikost otvorů se přizpůsobí typu použitých stříkaček (1 ml nebo jiný obsah).
  Otvory musí být těsné, aby po vsunutí stříkačky nemohli procházet roztoči. Otvory se můžou vystřihnout nůžkami, vykroužit ostrým předmětem, např. špičatými rozevřenými nůžkami, nebo se vyvrtají či vypájí pájkou na plast.

- Na vodní lázni se roztaví panenský vosk, kterým se potřou stěny plastové misky.
- Do víček misky se vystřihne nebo vyřízne otvor.
- Vystříhne se síťovina odpovídající velikosti víček a přesahující vystřižený otvor v těchto víčkách.
- Mezi 2 upravená víčka se vloží síťovina a víčka se přimáčknou.
- Stříkačky se umístí do vykroužených otvorů ve dně misky.

Obrázek 6. Experimentální klícka, jejíž základ tvoří potravinová miska, která se dále upraví pro experimentální účely. Včely ani roztoči nesmí z klícky unikat.

3.3. Biologický materiál – včely a roztoči

Biologickými vzorky jsou dospělé samice *V. destructor* a včelí dělnice *A. mellifera*. Zatímco roztoči pocházejí ze včelstva vykazujícího znaky varroózy, včelí dělnice jsou vybírány ze „zdravého“ včelstva. Včely jsou sbírané v momentu líhnutí přímo před založením experimentu. Vzorky roztočů se připravují (den) před odebíráním líhnoucích se včel.

3.3.1. Vzorky samiček *V. destructor*

Pro odběr vzorků roztočů je potřeba včelstvo vykazující symptomy varroózy, resp. PMS. Taková včelstva se typicky vyskytují ke konci srpna a později. Je však možné, že se vyskytnou nemocná včelstva již dříve. Výskyt varroózy prakticky umožňuje provedení experimentu. Období provedení experimentu hraje velmi důležitou roli, jelikož včely se v průběhu roku fyziologicky liší. Od srpna a zejména v září včelstva produkují dlouhověké dělnice [81].

Materiál:

- Rámek s plodem ze včelstva, u nějž zjistíme znaky varroózy, resp. PMS.
- Pinzeta a párátka.
- Jednorázové rukavice.
- Miska nebo dóza se včelami (dělnice z plodového plástu) pro umisťování roztočů. Takovéto dělnice označujeme jako udržovací včely.
- Klimabox s nucenou cirkulací nastavený na 35 °C.

Postup:

- Do misky se umístí včely z plodového plástu, které budou sloužit jako udržovací včely pro roztoče.
- Rámek s plodem, ve kterém jsou roztoči, se opře do mírně nakloněné polohy.
- Párátky se kruhovým pohybem odvíčkují buňky. Roztoči samovolně vybíhající z buněk se sbírají nebo se včely vytáhnou z buněk a pak se sbírají roztoči. K odvíčkování je možné použít pinzetu.
- Odebíraní roztoči se umísťují do misek s udržovacími včelami. Udržovací včely jsou v miskách krmeny 50% cukrem (stejně jako v případě experimentálních včel).

- Roztoči se nechají na udržovacích včelách sjednotit do druhého dne (24 hodin) nebo v případě potřeby i déle. Společným sáním roztočů na udržovacích včelách se před aplikací na experimentální včely sjednotí virové nálože v roztočích.
- Udržovací včely s roztoči se vyndají na filtrační papír. Sbíraní roztoči se umisťují na experimentální včely. Roztoči někdy samovolně unikají z udržovacích včel na filtrační papír, odkud se dají snadno sbírat (obrázek 7).

Obrázek 7. Udržovací včely – roztoči pro experimentální expozici.

3.3.2. Vzorky zdravých líhnoucích se včelích dělnic

Pro odběr vzorků včel se vybírají pouze včelstva, která lze považovat za zdravá. Taková včelstva nevykazují známky onemocnění včetně varroózy, 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. Odběr včel ilustruje obrázek 8. Včely musí být vitální bez znatelných poškození, problémů s pohybem/fitness. Musí být jistota, že včela nebyla parazitovaná *V. destructor* v její buňce. *V. destructor* je totiž praticky všudypřítomný a najít včelstvo úplně bez roztočů je prakticky nemožné.

Materiál:

- Rámek s uzavřeným dělničím plodem, ve kterém se zrovna líhnou včely.
- Pinzeta a párátka.
- Jednorázové rukavice.

- Dóza vystlaná buničinou pro umisťování odebíraných včel.
- Klimabox s nucenou cirkulací nastavený na 35 °C pro provedení experimentu a případnou inkubaci rámku pro odběr líhnoucích se včel.

Postup:

- Pro odběr včel se vybere včelstvo, které nejeví znaky onemocnění, má rychlý rozvoj a nemá mezerovitý plod.

  Pozn. Ideální je použít včelstvo s historií, dlouhodobě sledované. Případně se může včelstvo před odběrem vyšetřit na patogeny molekulárními metodami.
- U vybraného včelstva se najde rámek s uzavřeným plodem, ideálně ve stavu hromadně vybíhajícího plodu.

  Pozn. Pokud vybrané včelstvo nemá v daném momentu vybíhající plod, doporučuje se udělat prohlídku uzavřeného plodu otevřením několika nahodilých víček. Vzhledem k aktuálnímu stádiu kukel se odběr vzorků líhnoucích včel načasuje. Vhodný rámek nebo i víc rámků se označí zvoleným symbolem nebo datumem pro snažší identifikaci při opětovném vstupu do úlu.
- Před odběrem se z rámku s uzavřeným plodem opatrně sklepnou včely nebo se opatrně ometou, aby nepřekážely při vzorkování líhnoucích se včel.

  Pozn. Prudší neopatrné sklepnutí může způsobit potřísnění víček sladinou/medem, což je nežádoucí, protože včely se můžou olepit, nasát při líhnutí.
- Včely se odebírají v momentu, kdy se prokousávají víčkem a chystají se opustit buňku. Při odběru se používají plastové jednorázové rukavice anebo pinzeta. Nesmí dojít k poškození odebíraných včel.

  Pozn. Na včely se nesmí sahat holou rukou kvůli kontaminaci. Např. při proteomických analýzách by byla kontaminace včel stykem s lidskou pokožkou fatální, protože by včely byly zbytečně kontaminované lidským keratinem.
- Pro experiment se použijí pouze vitální včely, u nichž je ověřeno, že se vyvíjely bez přítomnosti roztoče *V. destructor* v buňce. Každá včela se prohlédne, aby se ověřilo, že nemá na těle roztoče. Zároveň se při odebírání líhnoucí se včely prohlédne i buňka, ve které by roztoč mohl být také ukryt.

- Každá odebraná včela se opatrně umístí do krabičky (vyšší dózy), na jejímž dně je umístěna buničina (nebo papír), která změkčuje povrch dna a eliminuje poškození včel při umisťování do dózy. Všechny včely pro založení série experimentu by měly být odebrané v co nejkratším časovém úseku (ideálně v rozsahu 1–2 hodiny).

Obrázek 8. Příprava líhnoucích se včel pro experimenty.

Komentář: Pokud je to možné, doporučuje se zejména v teplých dnech, zvláště když venkovní teploty dosahují kolem 30 °C a více, odebírat včely přímo na stanovišti. Vybíhání včel po několika minutách obvykle ustává, a tak se rámek umístí na chvíli (cca 10–15 min) zpět do úlu. Poté se včely obvykle zase líhnou lépe. Alternativně je možné rámek přenést do klimaboxu přednastaveného na 35 °C. Rámek s plodem nesmí prochladnout. Delší odloučení včel od včelstva také není žádoucí, proto se upřednostňuje odběr u včelstva. To je však vhodné v teplých dnech a v době, kdy na stanovišti nedochází k loupežím. Jelikož se varroóza typicky vyskytuje ke konci srpna a později, je riziko loupeží poměrně velké. Alternativou můžou být odběry v zasíťovaném izolátoru, pokud je na stanovišti k dispozici.

3.3. Výběr pesticidní látky

Při výběru vhodné pesticidní látky nebo formulovaného pesticidu – prostředku na ochranu rostlin (POR), se zpravidla zaměřujeme na aktuální význam z hlediska společnosti a kompetentních orgánů hodnotících rizika pesticidů. Vhodné jsou pro testování také nové látky. Při výběru se lze zaměřit na modelové látky, u nichž je podezření negativního účinku z hlediska imunity. Experimentální dávka (koncentrace v dietě) by měla odpovídat reálným koncentracím v prostředí – v zásobách včel, v nektaru příp. pylu.

3.4. Experimentální varianty a založení experimentu

Zakládá se kontrolní varianta bez expozice *V. destructor* i pesticidu. Dále se zakládá varianta expozice pesticidem, ale bez *V. destructor*. Třetí varianta představuje expozici *V. destructor* bez pesticidu a čtvrtá varianta kombinuje expozice *V. destructor* a pesticidu. Podle metodiky pokus probíhá 72 hodin v klimaboxu při konstantní teplotě 35 °C a v temnu (obrázek 9). Pokud jsou založeny všechny 4 varianty, je možné porovnat, zda samotný pesticid ovlivňuje včely ve srovnání expozice pesticidem s expozicí s *V. destructor*. Je možné snížit počet variant a porovnávat expozici *V. destructor* bez pesticidu s expozicí *V. destructor* s pesticidem – získaný výsledek z takového porovnání poskytne hlavní porovnání, i když nezahrnuje kontrolní varianty bez *V. destructor*.

Obrázek 9. Experimentální klícky v klimaboxech. Důležité je, aby klimabox měl nucenou cirkulaci, aby byla udržována homogenní teplota v uzavřeném prostoru.

3.5. Analýzy vzorků a interpretace dat

Získané vzorky včel se následně analyzují zvolenými metodami. Vzorky včel je možné analyzovat řadou různých způsobů v závislosti na možnosti a vybavení laboratoří. Nejvhodnější je aplikace vysokokapacitních analýz jako proteomika a transkriptomika, jelikož výstupy poskytují komplexní obraz o změnách v organismu. Každý pesticid může způsobovat jiné změny, a pokud je sledován pouze jeden nebo několik markerů, nemusí být zjištěn důležitý efekt. Testovaná pesticidní látka se považuje za rizikovou, pokud jsou zjištěny signifikantní rozdíly zejména mezi variantami kombinované expozice *Varroa*–pesticid a *Varroa* bez pesticidu, což indikuje vliv pesticidu na interakci parazitace a včel.

4. Příklad provedení metodiky

A. <u>Vybraný modelový pesticid</u>:

Hodnocená účinná látka: imidakloprid (kat. číslo: 37894; analytický standard; PESTANAL®, Supelco, Sigma–Aldrich).

V modelovém případě je použit neonikotinoid 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 a stále aktuální.

Několik studií ukázalo, že některé neonikotioidy včetně imidaklopridu mají vliv na početnost parazitů i virů [74, 75, 78, 79].

B. Experimentální varianty a expozice:

Byly založeny 4 varianty: i) kontrola (**KON**) – krmení: 50% roztok cukru bez přídavku imidaklopridu; ii) expozice imidaklopridem bez *Varroa* (**IMI**) – krmení: roztok 50% cukru s imidaklopridem o koncentraci 2,5 µg/l; iii) expozice *Varroa* bez imidaklopridu (**VAR**) – krmení: 50% cukr, aplikováni roztoči *V. destructor* v počtu 3 roztoči na včelu; iv) expozice *V. destructor* s imidaklopridem (**VAR+IMI**) – krmení: roztok 50% cukru s 2,5 µg/l imidaklopridem, roztoči *V. destructor* v počtu 3 roztočů na včelu. Od každé varianty bylo založeno 8 včel. Včely byly v experimentu 72 hodin. Poté byl experiment ukončen. Ze včel byli odstraněni roztoči. Včely byly po jedincích zamraženy ve zkumavkách typu Eppendorf na suchém ledu a uskladněny při −80 °C do zpracování a provedení analýzy.

C. Analýzy:

Pro analýzy bylo použito 6 včel v každé ze 4 variant. Jednotlivé vzorky celých včel byly homogenizovány a 24 vzorků bylo analyzováno proteomickou analýzou. Tryptické digesce celých včel byly analyzovány pomocí nanokapalinové chromatografie (nanoLC) Dionex Ultimate 3000 ve spojení s hmotnostním spektrometrem Orbitrap Fusion Tribrid (Thermo). Proteomická analýza byla provedena v Laboratoři proteomiky BIOCEV. Data byla vyhodnocena pomocí algoritmů label-free kvantifikace (LFQ) v programu MaxQuant verze 2.2.0.0 [82]. Vyhledávací databáze představovala 23 521 sekvencí *A. mellifera*, 6 785 sekvencí selektovaných pro „*A. mellifera* a viry“ a také 30 221 sekvencí *V. destructor*, sekvence byly staženy z NCBI. Sekvence *A. mellifera* a *V. destructor* byly selektované z RefSeq NCBI. Dále byla data vyhodnocena v programu Perseus verze 2.0.7.0 [83].

D. Výsledky:

Byla získaná kvantitativní data, která poskytují porovnání proteomů včel ze 4 expozičních variant. Data byla selektována na 3 pozivní výsledky pro každý protein aspoň v jedné variantě. Bylo získáno celkem 2 168 proteinů pro porovnání abudance. Chybějící identifikace byla nahrazena hodnotami z normální distribuce (Width = 0,3, Downshift = 1,8). Mezi jednotlivými variantami bylo provedeno porovnání pomocí permutačního t-testu s použitými parametry FDR = 0,05; S0 =

0,05; 1000 permutací. Mezi IMI a CON nebyly identifikovány signifikantní rozdíly. Mezi VAR a CON bylo identifikováno 5 signifikantních proteinů, ale ve skutečnosti se jedná o 4 proteiny, 3 proteiny jsou z *A. mellifera*, a jeden je virový DWV polyprotein, všechny proteiny jsou upregulované ve VAR (tabulka 1). Mezi VAR+IMI a VAR bylo identifikováno 8 signifikantních proteinů, 7 proteinů bylo downregulovaných a 1 upregulovaný ve VAR+IMI (tabulka 2). Mezi VAR+IMI a IMI byly identifikovány 2 signifikatní proteiny, přičemž obě identifikace náleží k DWV. Vp2 protein je součástí DWV polyproteinu, identifikaci lze tedy považovat za artefakt (tabulka 3). Graficky znázorněné rozdíly pomocí volcano plotů jsou uvedeny na obrázku 10.

Tabulka 1. Statisticky (FDR = 0,05; S0 = 0,05) rozdílných 5 proteinů identifikovaných mezi VAR a CON, z toho však jeden signifikantní výsledek představuje Vp2 protein z polyproteinu DWV, takže se jedná o redundantní výsledek vzhledem k identifikaci DWV polyproteinu.

−log p	Δlog2 (VAR−CON	Fasta
5,33	4,79	APP91308.1| polyprotein [Deformed wing virus]
4,62	5,03	NP_001011615.1| hymenoptaecin preproprotein
4,35	4,29	XP_397526.2| uncharacterized protein
4,00	4,48	XP_393293.2| esterase E4
5,24	3,48	pdb|5G52|B Chain B, Vp2

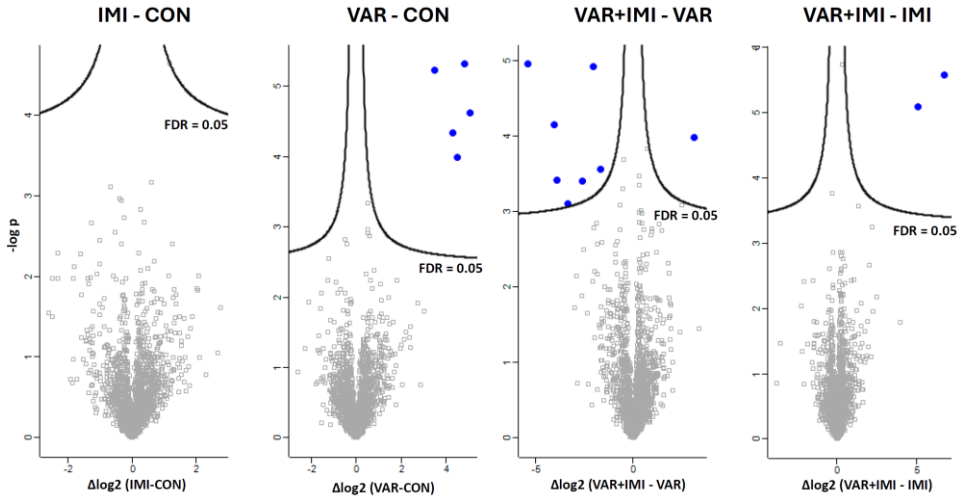
Tabulka 2. Statisticky (FDR = 0,05; S0 = 0,05) rozdílných 8 proteinů identifikovaných mezi VAR+IMI a VAR.

−log p	Δlog2 (VAR+IMI −VAR	Fasta headers
3,99	3,11	XP_016771991.1| trypsin
3,57	−1,67	NP_001229586.1| ATP synthase lipid-binding protein, mitochondrial
3,42	−2,63	XP_006564616.1| NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex assembly factor 3
4,97	−5,38	NP_001011615.1| hymenoptaecin preproprotein
4,16	−4,04	XP_397526.2| uncharacterized protein LOC408807
4,93	−2,06	XP_623908.1| elongin-B
3,42	−3,90	XP_393293.2| esterase E4
3,12	−3,35	XP_624019.1| barrier-to-autointegration factor B

Tabulka 3. Statisticky (FDR = 0,05; S0 = 0,05) rozdílné dva výsledky mezi VAR+IMI a IMI. Ve skutečnosti se jedná o jediný protein – polyprotein DWV, jelikož Vp2 je redundantní identifikace DWV obdobně jako v tabulce 1.

−log p	Δlog2 (VAR+IMI −IMI)	Fasta
5,58	6,71	APP91308.1| polyprotein [Deformed wing virus]
5,09	5,08	pdb|5G52|B Chain B, Vp2

Obrázek 10. Vizualizace rozdílů identikací mezi jednotlivými variantami pomocí volcano plotů.



Vzhledem k identifikaci DWV ve výsledcích prezentovaných výše byla v základních datech ověřena přítomnost viru v jednotlivých vzorcích. Obdobné ověření bylo provedeno pro rozdílný protein hymenoptaecin a také LOC408807. Výsledky v tabulce 4 poukazují na kvalitativní rozdíly mezi variantami v proteinech včetně DWV. Ověření ukázalo že DWV byl identifikován pouze ve vzorcích exponovaných *V. destructor*, což je správný výsledek, který potvrzuje, že kontrolní včely nebyly DWV infikovány, zatímco *V. destructor* přenesl DWV na experimentální včely v expozicích VAR a VAR+IMI. Kromě jednoho vzorku je patrné, že DWV byl ve variantě DWV+IMI abundantnější než ve VAR, což značí potenciálně vyšší abundanci DWV působením imidaklopridu.

Tabulka 4. Log2 LFQ intenzity naměřených dat pro jednotlivé vzorky tří výsledků. Tabulka ukazuje, že DWV byl identifikován pouze ve *V. destructor* parazitovaných včelách. Hymenoptaecin byl identifikován pouze ve variantě VAR, podobně jako unch. protein LOC408807.

CON						IMI							
c1	c2	c3	c4	c5	c6	i1	i2	i3	i4	i5	i6	MS/MS count	Protein
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	776	DWV polyprotein
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	29	NP_001011615.1| hymenoptaecin preproprotein
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	39	XP_397526.2| unch. protein LOC408807

VAR						VAR+IMI							
v1	v2	v3	v4	v5	v6	vi1	vi2	vi3	vi4	vi5	vi6	MS/MS count	Protein
25	26	25	24	25	27	28	26	28	27	28	23	776	DWV polyprotein
27	23	25	27	26	25	0	0	0	0	0	0	29	NP_001011615.1| hymenoptaecin preproprotein
25	0	26	27	26	25	0	0	0	0	0	0	39	XP_397526.2| unch. protein LOC408807

E. Interpretace výsledků:

Hlavním cílem experimentu bylo zjistit, zda orální expozice včel imidaklopridem v koncentraci 2,5 µg/l v krmivu [84–86] po dobu 3 dny/72 hodin může ovlivnit včelí dělnice, a to v kombinaci s expozicí *V. destructor*.

Statistické vyhodnocení vysokokapacitních proteomických dat ukázalo, že orální expozice samotným imidaklopridem nezpůsobila signifikantní rozdíly v expresi proteinů vůči kontrole. Použitá realistická orální expozice je poměrně malá a to 2,5 µg/l a po dobu 3 dní expozice se neprojevila na změně proteomu včel. Je možné, že delší expozice by odhalila známý chronický vliv imidaklopridu a mezi variantami IMI a KON by pak možná byly identifikovány signifikantní rozdíly.

Nejvíce signifikantních výsledků bylo identifikováno porovnáním expozičních variant VAR+IMI a VAR, což značí, že imidakloprid zvyšuje efekt parazitace včel *V. destructor*. Klíčový výsledek se jeví, že imunitní protein hymenoptaecin je aktivován parazitací *V. destructor*, jelikož byl identifikován pouze ve variantě VAR, ale v kombinaci s imidaklopridem, ve variantě VAR+IMI nebyl hymenoptaecin identifikován vůbec. Tyto kvalitativní rozdíly značí významné ovlivnění imunitní odpovědi imidaklopridem. Obdobná situace je v případě unch. protein LOC408807, který byl identifikován pouze ve variantě VAR. Jedná se o leucine rich repeat domain protein, který souvisí s imunitou [87]. V recentní studii Erban a kol. [88] bylo ukázáno, že

subletální vliv acetamipridu, podobně jako jiný neonikotinoid thiakloprid, dokáže aktivovat imunitu včel, ale je rozdíl v imunitní odpovědi mezi královnou a líhnoucími se včelami. Působením acetamipridu byl sledován vliv také na hymenoptaecin a LOC408807 [88], ale jiným způsobem, než zde v testu. Imidakloprid zde mohl potlačit imunitní odpověď vyvolanou *V. destructor*. Další identifikované proteiny svědčí o přídavném, patrně synergickém účinku imidaklopridu na interakci *V. destructor*–DWV ve včelách.

Výsledky naznačují, že imidakloprid by mohl zvyšovat hladiny DWV ve včelách parazitovaných *V. destructor*, ale výsledek není jednotný ve všech vzorcích, jeden vzorek DWV+IMI má nižší LFQ intenzitu DWV. Imidakloprid byl již dříve identifikován jako faktor, který zvyšuje abundanci střevních parazitů *Nosema* spp. (*Vairimorpha* spp.) a *L. passim* ve včelách [74, 75]. Získaný výsledek pro DWV však potřebuje budoucí ověření a vysvětlení. Další studie ukázaly, že jiný neonikotinoid thiamethoxam může zhoršovat účinky DWV [78, 79], což podporuje potenciál pro zvýšení DWV jiným neonikotioidem imidaklopridem.

H. <u>Závěr</u>:

Výsledky ukázaly, že imidakloprid má vliv na interakci na úrovni *V. destructor*–DWV. Výsledky ukazují, že imidakloprid ovlivňuje imunitu včel a je možný jeho synergický účinek v interakci s varroózou. Delší expozice a studium na úrovni včelstva by mohla odhalit sledované důsledky ve větší míře. Např. v Kanadě a ve Spojených státech se potýkají s velmi vysokými ztrátami včelstev, jejich míra může mít souvislost s tím, že v těchto zemích je povolen imidakloprid, který včelám škodí sám o sobě, ale navíc může podporovat rozvoj patogenů.

5. Srovnání novosti metodiky

Metodika přináší nové prvky do hodnocení rizik pesticidů na včelu medonosnou. Metodika se zaměřuje na subletální efekt pesticidů v interakci s parazitací *V. destructor*. Hodnocení v metodice je zaměřeno na interakci vyššího řádu, která představuje interakci mezi pesticidem a *V. destructor* a navíc jím přenášenými viry, zejm. DWV, a to v realistických expozicích pesticidem.

Metodika nově umožňuje hodnocení vlivu pesticidů/polutantů na nejdůležitější faktory ohrožující včely – varroózu. Současně však metodika umožňuje hodnocení vlivu interakce pesticidu s patogeny na biochemické procesy ve včelách, které mají fyziologické důsledky.

Identifikace takovýchto interakcí mezi polutanty a patogeny včel je cesta k odhalení „nevysvětlitelných“ vysokých ztrát včelstev.

Klíčovým prvkem v metodikce je experimentální provedení vedoucí k přípravě vzorků, které pak mohou být analyzovány různými způsoby respektující různé vybavení laboratoří a analytické možnosti.

6. Uplatnění metodiky

Metodika reaguje na potřebu komplexního hodnocení rizik pesticidů na včely se zahrnutím různých interakcí s patogeny, včetně polutantů/pesticidů. Obdobné modely pro hodnocení jsou požadovány světovou vědeckou komunitou a také orgány, které se zabývají ztrátami včel a hodnocením rizik pesticidů na necílové organismy. Konkrétně má metodika uplatnění při identifikaci dosud skrytých či „nevysvětlitelných“ vysokých ztrát včelstev, což dokumentuje také konkrétní příklad provedení. Identifikace rizikových interakcí mezi polutanty a patogeny včel je cesta odhalení „nevysvětlitelných“ vysokých ztrát včelstev.

Proto je uplatnění na evropské úrovni např. skrze Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) a na úrovni Česka skrze jednotlivá ministerstva a kompetentní orgány státní správy, zejména Ministerstvo zemědělství ČR ve spolupráci s Ministerstvem životního prostředí ČR. Metodika může přispět k zajištění udržitelného opylení různých rostlin a má tedy konkrétně vztah k Úmluvě o biologické rozmanitosti (Convention on Biological Diversity, CBD) [89], která patří k nejvýznamnějším mezinárodním mnohostranným úmluvám v oblasti životního prostředí. Metodika je také v souladu s Novou dohodou pro opylovače [90], 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, prože efekty sledované na včele medonosné jsou do jisté míry 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 zdraví včel s konkrétním zaměřením na varroózu. Metodika předtavuje zcela nový přístup, kdy je hodnocen potenciální vliv pesticidů na varroózu, která kombinuje parazitaci *V. destructor* a přenosy a množení virů ve včelách. Důsledky varroózy jsou ohromného dopadu, jelikož jde o hlavní faktor zodpovědný za ztráty včel, které jsou každoročně velmi vysoké.

Metodika umožňuje zhodnocení příspěvku znečištění polutanty/pesticidy na důsledky varroózy. Odhalení vlivu pesticidů na interakce vyššího řádu, jako je varroóza, může snížit ztráty včelstev, což se může globálně odrazit i v miliardových řádech. Proto metodika vysoce přesahuje náklady na experimenty a analýzy. Konkrétně se náklady na materiál a služby na modelový experiment v metodice pohybují v hodnotě cca 150 tis. Kč.

Aplikací metodiky v praxi a do hodnocení POR nebo i jiných polutantů se může snížit míra ztrát včelstev. Postupy uvedené v metodice mají potenciál přispět ke snížení ztrát včelstev, jejichž hodnoty jsou každoročně jen v Česku stamiliónové v Kč. Aplikace metodiky do hodnocení rizik pesticidů 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. (2024). Zločinné spolčení roztoče a viru. Moderní včelař 21 (6): 18–19.

Erban T., Harant K., Hubalek M., Vitamvas P., Kamler M., Poltronieri P., Tyl J., Markovic M., Titera D. (2015). In-depth proteomic analysis of *Varroa destructor*: detection of DWV-complex, ABPV, VdMLV and honeybee proteins in the mite. Scientific Reports 5: 13907. https://doi.org/10.1038/srep13907

Erban T., Kadleckova D., Sopko B., Harant K., Talacko P., Markovic M., Salakova M., Kadlikova K., Tachezy R., Tachezy J. (2024). *Varroa destructor* parasitism and Deformed wing virus infection in honey bees are linked to peroxisome-induced pathways. Proteomics 24 (9): e2300312. https://doi.org/10.1002/pmic.202300312

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. Environmental Pollution 349: 123901. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.123901

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

Erban T., Vitamvas P., Kamler M., Titera D. (2014). Identification of viruses in *Varroa destructor* using proteomic methods. *In*: De la Rila P. (ed.) EurBee 6: 6th European Conference of Apidology, 9–12 September 2014, Murcia (Spain), pp. 132–133.

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

Hubert J., Erban T., Kamler M., Kopecky J., Nesvorna M., Hejdankova S., Titera D., Tyl J., Zurek L. (2015). Bacteria detected in the honeybee parasitic mite *Varroa destructor* collected from beehive winter debris. Journal of Applied Microbiology 119 (3): 640–654. https://doi.org/10.1111/jam.12899

Hubert J., Kamler M., Nesvorna M., Ledvinka O., Kopecky J., Erban T. (2016). Comparison of *Varroa destructor* and worker honeybee microbiota within hives indicates shared bacteria. Microbial Ecology 72 (2): 448–459 https://doi.org/10.1007/s00248-016-0776-y

Kamler M., Nesvorna M., Stara J., Erban T., Hubert J. (2016). Comparison of *tau*-fluvalinate, acrinathrin, and amitraz effects on susceptible and resistant populations of *Varroa destructor* in a vial test. Experimental and Applied Acarology 69 (1): 1–9. https://doi.org/10.1007/s10493-016-0023-8

Stara J., Pekar S., Nesvorna M., Erban T., Vinsova H., Kopecky J., Doskocil I., Kamler M., Hubert J. (2019). Detection of *tau*-fluvalinate resistance in the mite *Varroa destructor* based on the comparison of vial test and PCR–RFLP of *kdr* mutation in sodium channel gene. Experimental and Applied Acarology 77 (2): 161–171 https://doi.org/10.1007/s10493-019-00353-9

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

9. Seznam citované literatury

1. WOAH. (2021). Varroosis of honey bees (infestation of honey bees with *Varroa* spp.). *In*: WOAH (ed.) WOAH terrestrial manual 2021. World Organisation for Animal Health (WOAH). https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.02.07_VARROOSIS.pdf
2. Anderson D. L., Trueman J. W. H. (2000). *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. Experimental & Applied Acarology 24 (3): 165–189. https://doi.org/10.1023/A:1006456720416
3. Oudemans A. C. (1904). Note VIII. On a new genus and species of parasitic Acari. Notes from the Leyden Museum 24: 216–222.
4. Oldroyd B. P. (1999). Coevolution while you wait: *Varroa jacobsoni*, a new parasite of western honeybees. Trends in Ecology & Evolution 14 (8): 312–315. https://doi.org/10.1016/S0169-5347(99)01613-4
5. Rosenkranz P., Aumeier P., Ziegelmann B. (2010). Biology and control of *Varroa destructor*. Journal of Invertebrate Pathology 103 (Supplement): S96–S119. https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.016
6. Denmark H. A., Cromroy H. L., Cutts L. (1991). *Varroa* mite, *Varroa jacobsoni* Oudemans (Acari: Varroidae). Entomology Circular No. 347. Florida Department of Agriculture & Consumer Services, Division of Plant Industry, Gainesville, FL.
7. Veselý V. a kolektiv. (1985). Včelařství. Státní zemědělské nakladatelství, Praha.
8. Šefrová H., Laštůvka Z. (2005). Catalogue of alien animal species in the Czech Republic [Katalog druhů živočichů cizího původu v České republice]. Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis 53 (4): 151–170. https://doi.org/10.11118/actaun200553040151
9. Pergl J., Sádlo J., Petrusek A., Laštůvka Z., Musil J., Perglová I., Šanda R., Šefrová H., Šíma J., Vohralík V., Pyšek P. (2016). Black, Grey and Watch Lists of alien species in the Czech Republic based on environmental impacts and management strategy. NeoBiota 28: 1–37. https://doi.org/10.3897/neobiota.28.4824
10. Roberts J. M. K., Anderson D. L., Tay W. T. (2015). Multiple host shifts by the emerging honeybee parasite, *Varroa jacobsoni*. Molecular Ecology 24 (10): 2379–2391. https://doi.org/10.1111/mec.13185
11. Kůrka A. (2005). Čeleď: Varroidae Delfinado & Baker 1974 - kleštíkovití. *In*: Kůrka A. (ed.) České názvy živočichů VI Pavoukovci (Arachnida) II Roztoči (Acari). Národní muzeum (zoologické oddělení PM), Praha, s. 26–26.
12. Přidal A. (2006). Odborná včelařská terminologie: názvosloví živočichů a parazitizmus. Včelařství 59 (7): I–II (příloha Diskuse).
13. Přidal A. (2007). Parazitismus, nemoci včel a názvosloví živočichů. Moderní včelař 4 (1): 27–29.
14. Přidal A. (2007). Vysvětlení nomenklatoriky a taxonomie v čeledi Varroidae (kleštíkovití). 13. června 2007. https://www.vcelarskenoviny.cz/index.php/joomla-page/14-nemoci-skudci/269-vysvetleni-nomenklatoriky-a-taxonomie-v-celedi-varroidae-klestikoviti
15. Veselý V. a kol. (2003). Varroáza včel (*varroasis apium*). *In*: Veselý V. a kol. (eds.) Včelařství, 2. vydání. Brázda, Praha, s. 218–221.
16. Titěra D. (2017). Varroáza. *In*: Titěra D. (ed.) Včely zdravé a nemocné. Brázda, Praha, s. 71–107.

17. SVS. (2024). Varroáza včel. Státní veterinární správa (SVS), Praha. https://www.svscr.cz/varroaza-vcel/
18. VÚVč. (2024). Varroáza. Výzkumný ústav včelařský (VÚVč), Dol. https://www.beedol.cz/varroaza/
19. Čermák K., Gruna B., Hajdušková J., Holub P., Klíma Z., Kovařík I., Navrátil S., Rytina L., Texl P., Texl F., Tůma Z. (2016). Varroóza včel. *In*: Rytina L. (ed.) Včelařství, svazek 1. Pracovní společnost nástavkových včelařů, České Budějovice, s. 127–131.
20. FAO. (2015). *Varroa* mites (varroatosis or varroosis). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome. https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/88524746-6085-438f-9efa-696999f73e75/content
21. Department of Agriculture, Food and the Marine. (2023). Infestation of honey bees with *Varroa* spp. (varroosis). Department of Agriculture, Food and the Marine, Dublin. http://www.animalhealthsurveillance.agriculture.gov.ie/individualdiseaselistings/infestationofhoneybeeswithvarroasppvarroosis/
22. EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW); More S., Bøtner A., Butterworth A., Calistri P., Depner K., Edwards S., Garin-Bastuji B., Good M., Gortázar Schmidt C., Michel V., Miranda M. A., Nielsen S. S., Raj M., Sihvonen L., Spoolder H., Stegeman J. A., Thulke H.-H., Velarde A., Willeberg P., Winckler C., Baldinelli F., Broglia A., Candiani D., Verdonck F., Beltrán-Beck B., Kohnle L., Bicout D. (2017). Assessment of listing and categorisation of animal diseases within the framework of the Animal Health Law (Regulation (EU) No 2016/429): infestation with *Varroa* spp. (varroosis). EFSA Journal 15 (10): e04997. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4997
23. ARS. (2021). Varroosis. Agricultural Research Service (ARS), U.S. Department of Agriculture (USDA), Washington, DC. https://www.ars.usda.gov/pacific-west-area/tucson-az/carl-hayden-bee-research-center/research/varroa/varroosis/
24. Donzé G., Guerin P. M. (1994). Behavioral attributes and parental care of *Varroa* mites parasitizing honeybee brood. Behavioral Ecology and Sociobiology 34 (5): 305–319. https://doi.org/10.1007/BF00197001
25. Aumeier P., Rosenkranz P., Francke W. (2002). Cuticular volatiles, attractivity of worker larvae and invasion of brood cells by *Varroa* mites. A comparison of Africanized and European honey bees. Chemoecology 12 (2): 65–75. https://doi.org/10.1007/s00049-002-8328-y
26. Lamas Z. S., Evans J. D. (2024). Deadly triangle: honey bees, mites, and viruses. Frontiers in Bee Science 2: 1418667. https://doi.org/10.3389/frbee.2024.1418667
27. Tewarson N. C., Singh A., Engels W. (1992). Reproduction of *Varroa jacobsoni* in colonies of *Apis cerana indica* under natural and experimental conditions. Apidologie 23 (2): 161–171. https://doi.org/10.1051/apido:19920209
28. Rath W. (1999). Co-adaptation of *Apis cerana* Fabr. and *Varroa jacobsoni* Oud. Apidologie 30 (2–3): 97–110. https://doi.org/10.1051/apido:19990202
29. Boot W. J., Calis J. N., Beetsma J., Hai D. M., Lan N. K., Toan T. V., Trung L. Q., Minh N. H. (1999). Natural selection of *Varroa jacobsoni* explains the different reproductive strategies in colonies of *Apis cerana* and *Apis mellifera*. Experimental & Applied Acarology 23 (2): 133–144. https://doi.org/10.1023/A:1006050527004
30. Martin S. J., Hawkins G. P., Brettell L. E., Reece N., Correia-Oliveira M. E., Allsopp M. H. (2020). *Varroa destructor* reproduction and cell re-capping in mite-resistant *Apis mellifera* populations. Apidologie 51 (3): 369–381. https://doi.org/10.1007/s13592-019-00721-9

31. Grindrod I., Martin S. J. (2021). Parallel evolution of *Varroa* resistance in honey bees: a common mechanism across continents? Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 288 (1956): 20211375. https://doi.org/10.1098/rspb.2021.1375
32. Schneider D. S., Ayres J. S. (2008). Two ways to survive infection: what resistance and tolerance can teach us about treating infectious diseases. Nature Reviews Immunology 8 (11): 889–895. https://doi.org/10.1038/nri2432
33. Noël A., Le Conte Y., Mondet F. (2020). *Varroa destructor*: how does it harm *Apis mellifera* honey bees and what can be done about it? Emerging Topics in Life Sciences 4 (1): 45–57. https://doi.org/10.1042/ETLS20190125
34. Bowen-Walker P. L., Gunn A. (2001). The effect of the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* on adult worker honeybee (*Apis mellifera*) emergence weights, water, protein, carbohydrate, and lipid levels. Entomologia Experimentalis et Applicata 101 (3): 207–217. https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2001.00905.x
35. Erban T., Harant K., Hubalek M., Vitamvas P., Kamler M., Poltronieri P., Tyl J., Markovic M., Titera D. (2015). In-depth proteomic analysis of *Varroa destructor*: detection of DWV-complex, ABPV, VdMLV and honeybee proteins in the mite. Scientific Reports 5: 13907. https://doi.org/10.1038/srep13907
36. McAfee A., Chan Q. W. T., Evans J., Foster L. J. (2017). A *Varroa destructor* protein atlas reveals molecular underpinnings of developmental transitions and sexual differentiation. Molecular & Cellular Proteomics 16 (12): 2125–2137. https://doi.org/10.1074/mcp.RA117.000104
37. Ramsey S. D., Ochoa R., Bauchan G., Gulbronson C., Mowery J. D., Cohen A., Lim D., Joklik J., Cicero J. M., Ellis J. D., Hawthorne D., vanEngelsdorp D. (2019). *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 116 (5): 1792–1801. https://doi.org/10.1073/pnas.1818371116
38. Genersch E. (2010). Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. Applied Microbiology and Biotechnology 87 (1): 87–97. https://doi.org/10.1007/s00253-010-2573-8
39. Martin S. J. (2001). The role of *Varroa* and viral pathogens in the collapse of honeybee colonies: a modelling approach. Journal of Applied Ecology 38 (5): 1082–1093. https://doi.org/10.1046/j.1365-2664.2001.00662.x
40. 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 in Parasitology 36 (7): 592–606. https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.04.004
41. Wilfert L., Long G., Leggett H. C., Schmid-Hempel P., Butlin R., Martin S. J. M., Boots M. (2016). Deformed wing virus is a recent global epidemic in honeybees driven by *Varroa* mites. Science 351 (6273): 594–597. https://doi.org/10.1126/science.aac9976
42. de Miranda J. R., Genersch E. (2010). Deformed wing virus. Journal of Invertebrate Pathology 103 (Supplement): S48–S61. https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.012
43. Mondet F., de Miranda J. R., Kretzschmar A., Le Conte Y., Mercer A. R. (2014). On the front line: quantitative virus dynamics in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies along a new expansion front of the parasite *Varroa destructor*. PLOS Pathogens 10 (8): e1004323. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004323
44. Martin S. J., Brettell L. E. (2019). Deformed wing virus in honeybees and other insects. Annual Review of Virology 6: 49–69. https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015700

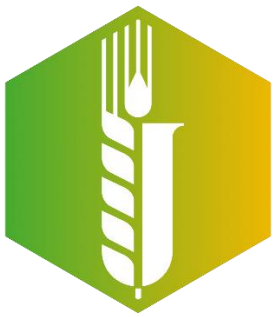
45. Beaurepaire A., Piot N., Doublet V., Antunez K., Campbell E., Chantawannakul P., Chejanovsky N., Gajda A., Heerman M., Panziera D., Smagghe G., Yañez O., de Miranda J. R., Dalmon A. (2020). Diversity and global distribution of viruses of the western honey bee, *Apis mellifera*. Insects 11 (4): 239. https://doi.org/10.3390/insects11040239
46. Yañez O., Piot N., Dalmon A., de Miranda J. R., Chantawannakul P., Panziera D., Amiri E., Smagghe G., Schroeder D., Chejanovsky N. (2020). Bee viruses: routes of infection in Hymenoptera. Frontiers in Microbiology 11: 943. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00943
47. Doublet V., Oddie M. A. Y., Mondet F., Forsgren E., Dahle B., Furuseth-Hansen E., Williams G. R., De Smet L., Natsopoulou M. E., Murray T. E., Semberg E., Yañez O., de Graaf D. C., Le Conte Y., Neumann P., Rimstad E., Paxton R. J., de Miranda J. R. (2024). Shift in virus composition in honeybees (*Apis mellifera*) following worldwide invasion by the parasitic mite and virus vector *Varroa destructor*. Royal Society Open Science 11 (1): 231529. https://doi.org/10.1098/rsos.231529
48. Sumpter D. J. T., Martin S. J. (2004). The dynamics of virus epidemics in *Varroa*-infested honey bee colonies. Journal of Animal Ecology 73 (1): 51–63. https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2004.00776.x
49. Mondet F., Kim S. H., de Miranda J. R., Beslay D., Le Conte Y., Mercer A. R. (2016). Specific cues associated with honey bee social defence against *Varroa destructor* infested brood. Scientific Reports 6: 25444. https://doi.org/10.1038/srep25444
50. Locke B., Thaduri S., Stephan J. G., Low M., Blacquière T., Dahle B., Le Conte Y., Neumann P., de Miranda J. R. (2021). Adapted tolerance to virus infections in four geographically distinct *Varroa destructor*-resistant honeybee populations. Scientific Reports 11 (1): 12359. https://doi.org/10.1038/s41598-021-91686-2
51. Lamas Z. S., Solmaz S., Ryabov E. V., Mowery J., Heermann M., Sonenshine D., Evans J. D., Hawthorne D. J. (2023). Promiscuous feeding on multiple adult honey bee hosts amplifies the vectorial capacity of *Varroa destructor*. PLoS Pathogens 19 (1): e1011061. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011061
52. Lopes A. R., Low M., Martín-Hernández R., Pinto M. A., De Miranda J. R. (2024). Origins, diversity, and adaptive evolution of DWV in the honey bees of the Azores: the impact of the invasive mite *Varroa destructor*. Virus Evolution 10 (1): veae053. https://doi.org/10.1093/ve/veae053
53. Paxton R. J., Schäfer M. O., Nazzi F., Zanni V., Annoscia D., Marroni F., Bigot D., Laws-Quinn E. R., Panziera D., Jenkins C., Shafiey H. (2022). Epidemiology of a major honey bee pathogen, deformed wing virus: potential worldwide replacement of genotype A by genotype B. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife 18: 157–171. https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2022.04.013
54. Kevill J. L., Stainton K. C., Schroeder D. C., Martin S. J. (2021). Deformed wing virus variant shift from 2010 to 2016 in managed and feral UK honey bee colonies. Archives of Virology 166 (10): 2693–2702. https://doi.org/10.1007/s00705-021-05162-3
55. Grindrod I., Kevill J. L., Villalobos E. M., Schroeder D. C., Martin S. J. (2021). Ten years of deformed wing virus (DWV) in Hawaiian honey bees (*Apis mellifera*), the dominant DWV-A variant is potentially being replaced by variants with a DWV-B coding sequence. Viruses 13 (6): 969. https://doi.org/10.3390/v13060969
56. Hasegawa N., Techer M. A., Adjlane N., Al-Hissnawi M. S., Antúnez K., Beaurepaire A., Christmon K., Delatte H., Dukku U. H., Eliash N., El-Niweiri M. A. A., Esnault O., Evans J. D., Haddad N. J., Locke B., Muñoz I., Noël G., Panziera D., Roberts J. M. K., De la Rúa P., Shebl M. A., Stanimirovic Z., Rasmussen D. A., Mikheyev A. S. (2023). Evolutionarily diverse origins of

deformed wing viruses in western honey bees. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 120 (26): e2301258120. https://doi.org/10.1073/pnas.2301258120

57. Roberts J. M. K., Anderson D. L., Durr P. A. (2018). Metagenomic analysis of *Varroa*-free Australian honey bees (*Apis mellifera*) shows a diverse Picornavirales virome. Journal of General Virology 99 (6): 818–826. https://doi.org/10.1099/jgv.0.001073
58. Kadlečková D., Tachezy R., Erban T., Deboutte W., Nunvář J., Saláková M., Matthijnssens J. (2022). The virome of healthy honey bee colonies: ubiquitous occurrence of known and new viruses in bee populations. mSystems 7 (3): e0007222. https://doi.org/10.1128/msystems.00072-22
59. Brosi B. J., Delaplane K. S., Boots M., de Roode J. C. (2017). Ecological and evolutionary approaches to managing honeybee disease. Nature Ecology & Evolution 1 (9): 1250–1262. https://doi.org/10.1038/s41559-017-0246-z
60. Shimanuki H., Calderone N. W., Knox D. A. (1994). Parasitic mite syndrome: the symptoms. American Bee Journal 134 (12): 827–828.
61. WOAH. (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/
62. 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
63. 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
64. 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., Tarpy 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
65. Goulson D., Nicholls E., Botías C., Rotheray E. L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. Science 347 (6229): 1255957. https://doi.org/10.1126/science.1255957
66. 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
67. Gray A., Adjlane N., Arab A., Ballis A., Brusbardis V., Douglas A. B., Cadahía L., Charrière J.-D., Chlebo R., Coffey M. F., Cornelissen B., da Costa C. A., Danneels E., Danihlík J., Dobrescu C., Evans G., Fedoriak M., Forsythe I., Gregorc A., Arakelyan I. I., Johannesen J., Kauko L., Kristiansen P., Martikkala M., Martín-Hernández R., Mazur E., Medina-Flores C. A., Mutinelli F., Omar E. M., Patalano S., Raudmets A., San Martin G., Soroker V., Stahlmann-Brown P., Stevanovic J., Uzunov A., Vejsnaes F., Williams A., Brodschneider R. (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. Journal of Apicultural Research 62 (2): 204–210. https://doi.org/10.1080/00218839.2022.2113329
68. Pervez M., Manzoor F. (2023). Honey bee losses and pesticides threat: an Asian perspective. Journal of Apicultural Research 62 (1): 64–75. https://doi.org/10.1080/00218839.2022.2103331

69. 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
70. 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
71. 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
72. 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
73. 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
74. 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
75. 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
76. Tesovnik T., Zorc M., Ristanić M., Glavinić U., Stevanović J., Narat M., Stanimirović Z. (2020). Exposure of honey bee larvae to thiamethoxam and its interaction with *Nosema ceranae* infection in adult honey bees. Environmental Pollution 256: 113443. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113443
77. Erban T. (2023). Imidakloprid zvyšuje pro včely riziko parazita *Lotmaria passim*. Moderní včelař 20 (11): 21–22.
78. Coulon M., Dalmon A., Di Prisco G., Prado A., Arban F., Dubois E., Ribière-Chabert M., Alaux C., Thiéry R., Le Conte Y. (2020). Interactions between thiamethoxam and deformed wing virus can drastically impair flight behavior of honey bees. Frontiers in Microbiology 11: 766. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00766
79. Phokasem P., Mookhploy W., Krongdang S., Sinpoo C., Chantawannakul P. (2022). Interaction between thiamethoxam and deformed wing virus type A on wing characteristics and expression of immune and apoptosis genes in *Apis mellifera*. Insects 13 (6): 515. https://doi.org/10.3390/insects13060515
80. Bird G., Wilson A. E., Williams G. R., Hardy N. B. (2021). Parasites and pesticides act antagonistically on honey bee health. Journal of Applied Ecology 58 (5): 997–1005. https://doi.org/10.1111/1365-2664.13811
81. Free J. B., Spencer-Booth Y. (1959). The longevity of worker honey bees (*Apis mellifera*). Proceedings of the Royal Entomological Society of London. Series A, General Entomology 34 (10–12): 141–150.https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1959.tb00230.x
82. Cox J., Hein M. Y., Luber 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

83. 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
84. Schmuck R., Schöning R., Stork A., Schramel O. (2001). Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L, Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. Pest Management Science 57 (3): 225–238. https://doi.org/10.1002/ps.270
85. Blacquière 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
86. 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 imidacloprid in soils, in plants, and in pollens. Analytical Chemistry 75 (9): 2027–2033. https://doi.org/10.1021/ac020600b
87. Albert S., Gatschenberger H., Azzami K., Gimple O., Grimmer G., Sumner S., Fujiyuki T., Tautz J., Mueller M. J. (2011). Evidence of a novel immune responsive protein in the Hymenoptera. Insect Biochemistry and Molecular Biology 41 (12): 968–981. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.09.006
88. 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. Environmental Pollution 349: 123901. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.123901
89. 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
90. 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 978-80-7427-434-3

ISBN 978-80-7427-434-3