

Tomáš Erban a kol.

# **Metodika pro hodnocení vlivu subletálních dávek pesticidů na samotářské včely s využitím OMICs přístupu**

**CERTIFIKOVANÁ METODIKA**



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

2021



---

# Metodika pro hodnocení vlivu subletálních dávek pesticidů na samotářské včely s využitím OMICs přístupu

---

Tomáš Erban a kolektiv

---

**Autorský tým:**

Tomáš Erban<sup>a</sup>, 

Elena Shcherbachenko<sup>a,b</sup>

Martin Šlachta<sup>d</sup>

Pavel Cudlín<sup>d</sup>

Julie Chalupníková<sup>a</sup>

Tat'ána Halešová<sup>c</sup>

Daniela Tomešová<sup>c</sup>

Marta Václavíková<sup>c</sup>

Alena Votavová<sup>e</sup>

---

<sup>a</sup>Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Drnovská 507/73, 161 06 Praha 6-Ruzyně

<sup>b</sup>Ústav pro životní prostředí, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Benátská 433/2, 128 01 Praha 2

<sup>c</sup>ALS Czech Republic, s. r. o., Na Harfě 336/9, 190 00

Praha 9-Vysočany

<sup>d</sup>Ústav výzkumu globální změny AV ČR, v. v. i., Bělidla 986/4a, 603 00 Brno

<sup>e</sup>Zemědělský výzkum, spol. s r.o., Zahradní 400/1, 664 41 Troubsko

 RNDr. Tomáš Erban, Ph.D, arachnid@centrum.cz; erban@vurv.cz

**Oponenti:**

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

RNDr. Radmila Čapková Frydrychová, Ph.D. – Entomologický ústav, Biologické centrum AV ČR, České Budějovice

**Vydal:**

**Financování:**

Tato certifikovaná metodika je výsledkem projektu TA ČR č. TH03030134 s názvem „Podpora přirozené opylovací kapacity zemědělských ekosystémů a hodnocení rizik subletálních dávek pesticidů na samotářské včely“ řešeného v období 2018–2021.

**Certifikace:**

Metodice bylo uděleno osvědčení UKZUZ 228656/2021.

O uplatnění metodiky je uzavřena smlouva mezi účastníky projektu a Ovocnářskou unií ČR, z. s., podle ustanovení § 1746 odst. 2 zákona č. 89/2012 Sb., občanského zákoníku.

Oponentní posudky vypracovaly Mgr. Hana Kubátová, Ph.D., a RNDr. Radmila Čapková Frydrychová, Ph.D.

**Prohlášení:**

Předkladatel metodiky prohlašuje, že zpracovaná metodika nezasahuje do práv jiných osob z průmyslového nebo jiného duševního vlastnictví.

**Poděkování:** Autoři děkují Pavlu Talackovi, Martinu Markovičovi a Sylvě Číhalové za technickou pomoc. Autorský tým děkuje recenzentům metodiky za podnětné a cenné připomínky.



**Anotace:** Opylovači jsou v prostředí potenciálně vystaveni působení řadě pesticidů. Nejdůležitější skupina rizikových látek pochází z kategorie prostředků na ochranu rostlin (POR), které aplikují nejen zemědělci, ale i drobní zahrádkáři. Každý POR, počínaje účinnou látkou a konče jeho konkrétní formulací, prochází velmi podrobným a přísným hodnocením, které v Evropské unii (EU) vychází z nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009. Ačkoliv jsou při správném zacházení negativní vlivy POR na životní prostředí a necílové organismy minimalizovány, nemůžeme vyloučit možné skryté účinky subletálního charakteru. K identifikaci skrytých vedlejších účinků napomáhají moderní analytické přístupy, jako je aplikace vysokokapacitních metod. Předložená metodika je zaměřena na hodnocení vlivu subletálních dávek pesticidů na samotářské včely s využitím OMICs přístupu. Při hodnocení rizik pesticidů je jako modelový druh opylovače dlouhodobě upřednostňována včela medonosná, zatímco samotářské včely stojí v pozadí. Pro experimenty a hodnocení rizik je nutné si uvědomit zcela odlišný životní cyklus a životní strategie samotářských včel v porovnání s vysoce sociální včelou medonosnou. Metodika obsahuje inovativní aspekty pro experimenty, jako je modifikovaný izolátor, příprava rostlin pro expozici, načasování experimentu, sledování distribuce aktivních látek či proteomická analýza samotářských včel pro identifikaci skrytých účinků sledované látky nebo její formulace. V této metodice byla jako modelový druh vybrána samotářská včela zednice rezavá (*Osmia bicornis*). Metodika je však aplikovatelná i na jiné, zejména příbuzné druhy samotářských včel. Metodika může najít využití v oblastech státní správy, v soukromých laboratořích i ve výzkumné činnosti při hodnocení environmentálních rizik pesticidů na samotářské včely. Metodický postup může potvrdit nebo vyloučit environmentální rizika při registraci nových přípravků nebo reevaluaci stávajících přípravků. Tato metodika má proto potenciál pro využití při testování nových látek určených na ochranu rostlin před jejich registrací. V příkladu provedení byl testován vliv acetamipridu ve formulaci Careo tyčinek. Byla hodnocena distribuce acetamipridu v půdním substrátu a v rostlině. V rostlinných pletivech byl identifikován rizikový metabolit acetamipridu IM-2-1. Proteomická analýza však ukázala velmi malé nebezpečí acetamipridu pro *O. bicornis*. Tento výsledek je v souladu s tím, že acetamiprid byl EFSA vyhodnocen jako málo rizikový pro včely a má v EU registraci do 28. února 2033.



## **Title: Methodology for assessing the effect of sublethal doses of pesticides on solitary bees employing the OMICs approach**

**Annotation:** Pollinators are potentially exposed to a number of pesticides in the environment. The most important group of hazardous substances comes from the category of plant protection products (PPPs), which are applied not only by farmers but also by small gardeners. Each PPP including the active substance and formulation undergoes a very detailed and thorough evaluation, which is in the European Union (EU) based on Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council. Although the negative effects of PPPs on the environment and non-target organisms are minimized with proper use, we cannot rule out possible hidden effects, especially those of a sublethal nature. Modern analytical approaches, such as the application of high-throughput methods, help to identify hidden side effects. This methodology is focused on the evaluation of the effect of sublethal doses of pesticides on solitary bees employing the OMICs approach. In the risk assessment of pesticides, the honey bee has long been preferred as a model species of pollinator, while solitary bees stay in the background. The methodology contains innovative aspects for experiments, such as a modified isolator, preparation of plants for exposure, the timing of the experiment, monitoring of active substance distribution or proteomic analysis of solitary bees to identify hidden effects of the test substance or its formulation. In this methodology, the model of the solitary bee, red mason bee (*Osmia bicornis*), is considered. However, the methodology is also applicable to other, especially related species of solitary bees. The methodology can be used in areas of state administration, private laboratories and research activities in the assessment of environmental risks of pesticides on solitary bees. The methodological procedure can confirm or even eliminate environmental risks when registering new products or reevaluating existing products. This methodology therefore has the potential for use in testing new substances intended for plant protection before their registration. In an exemplary embodiment, the effect of acetamiprid in a Careo sticks formulation was tested. The distribution of acetamiprid in the soil substrate and the plant was evaluated. The hazardous metabolite acetamiprid IM-2-1 was identified in plant tissues. However, proteomic analysis indicated a very low risk of acetamiprid for *O. bicornis*. This result is in agreement with the fact that acetamiprid has been assessed by EFSA to be a low risk for bees and is registered in the EU until 28 February 2033.



## Obsah

1. Úvod.....	- 1 -
2. Cíl metodiky.....	- 1 -
3. Význam samotářských včel a rizika plynoucí ze zemědělské činnosti.....	- 2 -
4. Vlastní popis metodiky .....	- 4 -
4.1.1. Výběr látky nebo POR pro hodnocení.....	- 4 -
4.1.2. Experimentální izolátor .....	- 5 -
4.1.3. Biologický materiál – samotářské včely a rostliny.....	- 6 -
4.1.4. Průběh experimentu .....	- 8 -
4.1.5. Sběr vzorků.....	- 8 -
4.1.5. Analýzy vzorků rostlin a zeminy .....	- 8 -
4.1.6. Analýzy vzorků samotářských včel .....	- 9 -
4.1.7. Interpretace dat .....	- 10 -
4.1.7. Schématické znázornění metodického postupu.....	- 11 -
5. Příklad provedení metodiky.....	- 11 -
6. Srovnání novosti metodiky .....	- 20 -
7. Uplatnění metodiky.....	- 20 -
8. Ekonomické přínosy metodiky .....	- 21 -
9. Publikace, které předcházely metodice.....	- 22 -
10. Přílohy.....	- 23 -
11. Seznam literatury .....	- 25 -



## 1. Úvod

Samotářské včely hrají velmi významnou roli v opylování divokých i kulturních rostlin a v řadě případů jsou v ekosystémech nezastupitelné. Hodnocení rizik pesticidů na samotářské včely se však ve srovnání se včelou medonosnou a čmeláky dosud prováděly méně často. V poslední době však přibyly nové poznatky o vlivu pesticidů na samotářské včely a doporučení pro hodnocení rizik pesticidů na samotářské včely se stala součástí metodických dokumentů implementovaných na národní i nadnárodní úrovni. Ve srovnání se včelou medonosnou nebo čmelákem zemním je hodnocení rizik pesticidů na samotářské včely spojeno s jistými specifiky. Na včelu medonosnou je totiž potřeba nahlížet jako na superorganismus, který má sociální a kastovní systém na nejvyšší úrovni. Také kolonie čmeláka zemního, který je častým modelovým druhem, jsou vysoce organizované, i když nedosahují tak vysoké úrovně eusociality jako v případě včely medonosné.

Pro identifikaci skutečných rizik pesticidů je zásadní prokázat nebo vyvrátit negativní subletální vliv konkrétních posuzovaných účinných látek nebo přípravků na necílový organismus. Podstatným krokem je přitom identifikovat na molekulární úrovni mechanismus účinku zodpovědný za případný negativní účinek pesticidu. Ověření je potřeba provést na vzorcích připravených v kontrolovaném experimentu s minimalizací externích vlivů mimo testovanou látku. Výsledky analýz vzorků z venkovního prostředí mohou být totiž ovlivněny dalšími proměnnými, a ne pouze hodnocenou látkou nebo přípravkem. Experimenty je potřeba provádět u druhů samotářských včel, u nichž lze zavést metodiku chovu. To zaručí přípravu dostatečného množství experimentálně srovnatelných jedinců, a také případné opakování experimentů na obdobných reprezentativních biologických vzorcích pro potvrzení výsledků. Tato metodika je do jisté míry inspirována certifikovanou metodikou, která byla vytvořena pro potřeby hodnocení subletálních účinků pesticidů na včelu medonosnou [1]. Pro značné mezidruhové odlišnosti, které ve velké míře souvisí se stupněm sociality, je však metodika pro samotářské včely podstatným způsobem modifikována.

## 2. Cíl metodiky

Cílem metodiky je přispět novými prvky k hodnocení rizik pesticidů na necílové organismy. Konkrétní cílovou skupinou této metodiky jsou samotářské včely. Samotářské včely mají odlišnou životní strategii než druhy žijící ve vysoce organizovaných společenstvech (včela medonosná,



čmelák zemní). Je tedy zřejmé, že rizika pro samotářské včely mohou být z tohoto důvodu značně odlišná. Podstatné rozdíly v citlivosti a odpovědi na pesticidy budou nevyhnutelně odrážet rozdílnosti v genetické výbavě, jejíž funkční soubor představují tisíce exprimovaných proteinů neboli proteom a další funkční molekuly známé jako metabolom. Cílem metodiky tedy bylo co nejvíce uzpůsobit postupy pro testování vlivu subletálních dávek pesticidů s využitím OMICs technologií na zvolený modelový druh samotářské včely, zednici rezavou (*Osmia bicornis*). Tato samotářská včela je poměrně dost rozšířená, a dokonce je využívána komerčně k opylení. Proto ji lze považovat za dobře dostupný a vhodný modelový druh samotářské včely pro experimenty. Rozšíření této metodiky na další druhy samotářských včel je však s využitím obecně platných principů a postupů této metodiky reálné bez podstatných odchylek. Zaměřili jsme se na testování subletálních dávek v reálné expozici. Je třeba zdůraznit, že negativní vliv subletálních dávek nemůže být prokázán, pokud je hodnocení prováděno běžnými postupy, jako je zjišťování akutní toxicity. Metodika je cílena především na odborníky z oboru ekotoxikologie a ochrany rostlin. Praktický význam má však také pro pěstitelé, kteří využívají samotářské včely pro opylení plodin. Pěstitelé totiž aplikují prostředky na ochranu rostlin (POR), které mohou představovat rizika pro opylovače zahrnující také samotářské včely.

### 3. Význam samotářských včel a rizika plynoucí ze zemědělské činnosti

Více než 80 % volně rostoucích rostlin profituje ze vzájemné spolupráce s živočišnými opylovači. Zachování opylovací služby je klíčovým prvkem pro udržení ekosystémů a biologické rozmanitosti. Hmyzem zprostředkované opylení hraje významnou roli při produkci více než 70 % plodin, které zahrnují zejména ovoce, ořechy, olejniny, přadné rostliny a zeleninu. Opylení hmyzem se odráží významným nebo dokonce podstatným způsobem na výnosech řady plodin [2–5]. Zajištění udržitelného opylení mnoha druhů rostlin se vztahuje k Úmluvě o biologické rozmanitosti (Convention on Biological Diversity, CBD), která patří k nejvýznamnějším mezinárodním mnohostranným úmluvám v oblasti životního prostředí. Počátek její platnosti se datuje již do roku 1993 [6]. Iniciativa ochrany a udržitelného využívání opylovačů byla formálně ustanovena rozhodnutím VI/5 přílohy II Konference smluvních stran v roce 2002 a je postavena na čtyřech součástech a jejich podpůrných činnostech [7]. Rámec pro iniciativu byl vytvořen s ohledem na doporučení Sãopaulské deklarace o opylovačích, která se konala v roce 1998. Důraz je kladen na využívání opylovačů, hlavně včel, v zemědělství [8]. Úmluva o biologické





rozmanitosti zdůraznila mimo jiné význam opylovačů a ekosystémových služeb pro dosažení řady cílů Organizace spojených národů (OSN) v oblasti udržitelného rozvoje a propojení s jeho ekonomickou a sociální oblastí. Tyto iniciativy jsou v rámci Programu OSN pro životní prostředí (United Nations Environment Programme, UNEP) [9, 10]. Přímou na úrovni EU jsou implementovány strategie v oblasti rozmanitosti s výhledem implementace pro rok 2030 [11].

Nejnámějším a nejvíce využívaným opylovačem kulturních rostlin a zemědělských plodin je domestikovaná včela medonosná (*Apis mellifera*) [12]. Komerční využití včely medonosné pro opylování monokultur je považováno za prakticky nepostradatelné [13–15]. Včela medonosná však není v některých případech nejvhodnějším opylovačem [12]. Proto jsou místo ní využívána komerčně produkovaná hnízda čmeláků, zejména čmeláka zemního (*Bombus terrestris*) [16, 17]. Umisťování komerčních čmeláků do volné přírody však přináší také svá rizika, jako je ovlivnění lokálních přirozených populací čmeláků [18]. Proto bychom neměli zapomínat, že přirozeně vytvořená společenstva opylovačů jsou nejlepším řešením vzhledem k biodiverzitě. Pozitiva lze navíc spatřovat také z ekonomického hlediska. Průměrnou přidanou hodnotu volně žijících včel pro hmyzem opylované (hmyzosnubné) plodiny lze vyčíslit přibližně na 3 tisíce amerických dolarů na hektar [19]. Rizika ohrožující přirozené, ale i komerčně používané opylovače, je potřeba eliminovat. Tato potřeba je zakotvena v legislativě, která je implementována při registracích účinných látek i jejich formulací – POR. Požadavek na eliminaci rizik POR na relevantní necílové organismy a prostředí zahrnuje nařízení komise EU č. 1107/2009 [20], podle kterého se řídí schvalování POR. Členské státy EU musí mít dle čl. 4 směrnice EP a Rady 2009/128/ES národní akční plány, jejichž účelem je dosažení udržitelného používání pesticidů [21].

Studie ukázaly, že k produkci řady kulturních a zemědělských plodin významně přispívají přirozená společenstva samotářských včel. Samotářské včely jsou v některých případech důležitějšími opylovači než včela medonosná [22–24]. Samotářské včely předčí z hlediska efektivity opylení včelu medonosnou. Je však potřeba brát v úvahu konkrétní plodiny nebo dokonce odrůdy [23, 25]. Význam samotářských včel, podobně jako čmeláků, se zvyšuje v případech, kdy není k dispozici opylovací služba včely medonosné. Limitujícím faktorem je venkovní teplota, protože včela medonosná nelétá při teplotách pod 12 °C. Uvádí se, že čmeláci a jarní druhy samotářských včel jsou aktivní i při chladnějších a deštivých dnech [26–28].



#### 4. Vlastní popis metodiky

Vlastní metodika je založena na inovativním přístupu, jehož aplikací v praxi je možné získat data pro hodnocení realistických rizik pro opylovače. Získání takových dat je nezbytné pro prokázání nebo vyvrácení negativních účinků pesticidů nebo formulovaných přípravků na samotářské včely.

Níže uvedený standardní metodický postup může být dle potřeby modifikován. Změny se mohou dotýkat zejména modelového druhu samotářské včely. Dalším kritickým faktorem, který může ovlivnit standardní provedení, je testovaná látka nebo přípravek. V tomto případě je při návrhu biologického experimentu nutno brát v úvahu mechanismus účinku a fyzikální a chemické vlastnosti účinné látky a přípravku. Velmi podstatným faktorem je způsob použití přípravku, tedy zda se jedná o systémový, požerový či kontaktní pesticid.

##### 4.1.1. Výběr látky nebo POR pro hodnocení

Při výběru vhodné látky nebo POR pro hodnocení rizik můžeme vycházet z aktuálních potřeb společnosti a odpovědných orgánů. Pro příklad můžeme uvést poměrně známou a stále aktuální potřebu hodnocení rizik neonikotinoidů na včely, jejichž omezení používání se významně dotýká zemí EU.

Každá účinná látka a konkrétní formulace – POR musí v členské zemi EU projít schvalovacím procesem v souladu s nařízením Rady č. 1107/2009 [20]. Nařízení bere v úvahu také dobu platnosti povolení, přičemž musí být umožněn přezkum. Členský stát může po posouzení povolení odejmout, změnit nebo rozhodnout o neobnovení. Při hodnocení rizik se zvažuje účinnost jak na cílové organismy, tak negativní účinek na plodiny a jejich produkty, vliv aplikací a reziduí z nich plynoucích na zdraví lidí, necílových organismů (živočichů, rostlin, mikroorganismů) a životní prostředí. Navíc je zvažován osud a distribuce účinné látky a metabolitů v životním prostředí [20]. Součástí posouzení je hodnocení dopadu těchto látek na necílové organismy a dle nařízení EK č. 546/2011 [29] se bere při hodnocení v úvahu především toxicita pro nejcitlivější relevantní testovaný organismus. Při hodnocení je zvažován i pokrok v analytických metodách a ve vědeckém poznání.

V souladu s nařízeními Komise EU č. 1107/2009 [20] a č. 546/2011 [29] využívá tato metodika nejmodernějších analytických přístupů pro sledování osudu testované látky a její distribuce v prostředí. Zároveň je v metodice počítáno s možností analýzy pomocí

vysokokapacitního OMICs přístupu. Právě samotářské včely mohou navíc představovat citlivější organismy pro hodnocení rizika některých POR a účinných látek, než je tomu u organizovaných společenstev včely medonosné a čmeláků, která čítají řádově několik set nebo dokonce tisíce jedinců.

#### 4.1.2. Experimentální izolátor

Pro provedení biologického experimentu byl navržen izolátor (obr. 1), který tvoří dvě oddělené části – předsíňka a experimentální prostor. Předsíňka slouží jako pojistka proti úniku jedinců z izolátoru. V případě samotářských včel totiž pracujeme s poměrně omezeným počtem dospělých jedinců a ztráta každého z nich způsobená únikem z experimentálního prostoru může být citelná. Předsíňka umožňuje vstup pracovníka do experimentálního prostoru v průběhu experimentu, např. při odběru vzorků. Pokud samotářská včela unikne, dostane se do prostoru předsíňky, odkud může být navrácena zpět do experimentálního prostoru.

**Obrázek 1.** Izolátor pro experimenty se samotářskými včelami. Předsíňka izolátoru slouží jako pojistka v případě úniku samotářské včely z experimentálního prostoru, což se může stát při vstupu do experimentálního prostoru, ale také malým otvorem, např. u zipu. Základní rozměry izolátoru jsou: 1,5 m (šířka), 3 m (délka), 2 m (výška uprostřed), výška na boku je 1,8 m. Na dně izolátoru je podlážka. Konstrukce je vyrobena z nerezového materiálu. Potah byl vyroben firmou FAMTENTS & RENTS s.r.o.





### 4.1.3. Biologický materiál – samotářské včely a rostliny

Biologický materiál dle metodiky představují: **a)** modelový druh samotářské včely a **b)** modelová rostlina. Rostlina slouží včelám jako zdroj živin, ale také pro expozici POR nebo jeho aktivním složkám.

- a) Samotářské včely.** Pro experimenty jsou potřeba kokony experimentálního druhu samotářské včely. Nejvhodnější druhy samotářských včel jsou ty, které lze snadno chovat. Důležitým parametrem je také obecně dobrá znalost biologie daného druhu a snadná klasifikovatelnost do druhu podle kokonu. Vhodnými experimentálními druhy samotářských včel se proto jeví zednice rezavá *Osmia bicornis* (dříve *O. rufa*) a zednice rohatá *Osmia cornuta*. Tyto druhy také navrhl Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) jako modelové testovací organismy vhodné pro použití v hodnocení rizik pesticidů v rámci EU [30]. Kokony těchto druhů zednic lze zakoupit v zahraničí, například v Německu Dr. Schubert Plant Breeding (<http://www.mauerbienen.eu/>) nebo v Polsku u společnosti BioDar (<https://www.biodar.com.pl/>). Po zakoupení násady lze produkovat vlastní kokony, které se zazimují uskladněním při 4 °C. Při této teplotě se kokony udržují do zahájení experimentu. Při plánování experimentu je potřeba brát v úvahu, že *O. bicornis* i *O. cornuta* jsou jarní druhy, a proto je vhodné provádět experimenty v období duben–červen. Později provedené experimenty, zejména až v srpnu či v září, mohou být zatíženy příliš dlouhým, tedy nefyziologickým setrváním kokonu v klidovém stavu. Protože je vždy porovnávána kontrola s expozicí, tak i výsledky v pozdním létě budou mít svou specifickou vypovídající hodnotu.

Důležitým faktorem při výběru druhu pro experimentální testování je znalost biologie daného druhu a popsání genomu, alternativně jen hrubý genom (draft genom) nebo transkriptom. V případě molekulárně biologických analýz, jako je vysokokapacitní proteomická analýza, je totiž potřeba mít k dispozici sekvence pro vyhodnocení dat. Databázi pro vyhodnocení dat lze konstruovat z anotovaných sekvencí, ale i z hrubých dat genomu nebo transkriptomu [31–34]. V případě sledování konkrétních vybraných markerů, je potřeba mít k dispozici také sekvence k navržení primerů (pro qPCR) nebo vybraní prekursorů (pro cílenou proteomiku).

Z hlediska výše uvedeného požadavku na znalost genomu je v současné době vhodným modelovým druhem samotářské včely *O. bicornis* [35]. Genom této samotářské včely je totiž



k dispozici (GenBank: Genom – MPJT00000000; RNAseq data: SRP065762) a navíc je anotovaný. Obdobná data však nejsou v současné době k dispozici pro *O. cornuta*.

**POZN. Praktické využití samotářských včel.** Samotářské včely se v některých zemích (USA, Japonsko) chovaly za účelem opylení již v polovině 20. století. Jedná se o zednice (rod *Osmia*) a příbuznou čalounici vojtěškovou (*Megachile rotundata*). V praxi se čalounice vojtěšková využívá k opylení vojtěšky ve Spojených státech (USA) a v Kanadě. Ovocné stromy, jako mandloně, jabloně a třešně, opylují zednice *O. lignaria*, *O. cornuta* (druh dovezený z Evropy) a *O. cornifrons* (druh dovezený z Japonska). V Japonsku se *O. cornifrons* používá pro opylení jabloní a třešní již od 40. let 20. století, zatímco ve Spojených státech se využívá také k opylení borůvek na komerčních plantážích. V jižních státech USA se pro tento účel chová *O. ribifloris* [36–38]. V Evropě byly zkoumány možnosti opylování ovocných stromů *O. bicornis* a *O. cornuta*. U *O. bicornis* byl zkoumán potenciál pro opylování ovocných stromů, jahodníku a řepky olejky. Ke komerčnímu využití zednic pro opylování ve střední Evropě však prakticky nedošlo [39, 40]. Ve Výzkumném ústavu pícninářském v Troubsku byla v 80. letech 20. století vypracována metodika podpory populací samotářské včely trnočelky hladké (*Rhopitoides canus*), také nazývané šedosrstka tolicová, za účelem opylování vojtěšky [41, 42].

**b) Modelové rostliny.** Při výběru rostliny je potřeba brát v úvahu upotřebitelnost z experimentálního hlediska. Je potřeba zvažovat relevantnost rostliny pro zvolený druh samotářské včely. Rostlina by měla být snadno pěstovatelná. Je nutno si uvědomit, že je potřeba načasovat květ rostliny a umístění kokonů do izolátoru. Velmi vhodnými rostlinami jsou svazenka vratičolistá (*Phacelia tanacetifolia*) či řepka olejka (*Brassica napus* subsp. *napus*). V případě řepky volíme samozřejmě jarní typ. Obě rostliny jsou v Česku i jinde v Evropě běžně pěstovány, a navíc vynikají bohatým květem.

Pro pěstování rostlin se použije zásadně substrát bez reziduí pesticidů. Můžeme použít biosubstrát nebo substrát, ve kterém před experimentem ověříme přítomnost reziduí pesticidů. Rezidua pesticidů je však vhodné ověřovat i pro biosubstrát. Pokud by se v substrátu nacházela rezidua některých pesticidů, mohlo by dojít k ovlivnění konečného výsledku hodnocení rizika konkrétního POR nebo účinné látky z důvodu potenciálního synergického, aditivního či antagonistického efektu. Na pěstební substrát nanese vrstvu jílu.



#### 4.1.4. Průběh experimentu

1. Do izolátoru umístíme květníky s modelovou rostlinou, která je na počátku květu.
2. Dle typu použití (systémový, kontaktní, požerový) aplikujeme POR, samotnou účinnou látku, případně jednotlivé složky formulace. Aplikace se provádí na rostlinu nebo do substrátu.
3. Do izolátoru umístíme domeček pro samotářské včely a také nádobu s pitnou vodou. Nádoba s vodou musí být upravena tak, aby nedocházelo k utopení včel, tedy např. umístěním plováku na vodní hladinu.
4. Do izolátoru umístíme kokony samotářské včely. Alternativně umístíme do izolátoru čerstvě vylíhlé jedince.
5. V průběhu experimentu se provádí periodická zálivka rostlin pitnou vodou.

#### 4.1.5. Sběr vzorků

6. Vzorky odebíráme v průběhu nebo jen na konci experimentu. Záleží na konkrétním návrhu experimentu.
7. Odebereme vzorky samotářských včel. Jedince umístěné do vzorkovnic okamžitě po odběru zmrazíme na suchém ledu. Včely si můžeme pro snadnější umístění do vzorkovnic přispat v atmosféře CO<sub>2</sub> (např. v krabici se suchým ledem).
8. Pro sledování distribuce testované látky odebereme zeminu a části rostliny. Tyto vzorky je vhodné odebírat ihned po odběru samotářských včel (viz bod 7).

**POZN.** Při odběrech vzorků pracujeme vždy v jednorázových rukavicích a vzorků se zásadně nedotýkáme holýma rukama. Z důvodu eliminace rizika křížové kontaminace odebíráme vzorky nejprve v kontrolních izolátorech.

#### 4.1.5. Analýzy vzorků rostlin a zeminy

9. Zmražené vzorky zeminy a rostlin lyofilizujeme. Výhoda lyofilizace spočívá v tom, že nemusíme v jiném dílu vzorku separátně zjišťovat obsah vody pro přepočty výsledků na sušinu. Eliminujeme tak krok, který může zanést do přepočtů nepřesnost.



10. Lyofilizované vzorky zvážíme. V uzavřených vzorkovnicích je uchováváme zmražené v hlubokomrazicím boxu.
11. Vzorky analyzujeme kvantitativní metodou na distribuci sledované účinné látky. Distribuce se může týkat jedné i více látek. Vhodnými analytickými metodami jsou LC-MS/MS nebo GC-MS/MS. Pro spolehlivou kvantitativní analýzu jsou zapotřebí validované metody pro konkrétní analyty. Metody pro různé analyty se mohou vzhledem k jejich fyzikálním a chemickým vlastnostem značně lišit.
12. Podle potřeby sledujeme v matricích také metabolity mateřské látky. Pokud jsou metabolity známy, tak je analyzujeme cílenou analytickou metodou jako LC-MS/MS nebo GC-MS/MS.
13. Metabolity můžeme analyzovat také pomocí necílené analýzy pomocí vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie LC-MS/MS nebo GC-MS/MS. Pomocí této analýzy dokážeme poměrně spolehlivě identifikovat látky, které mají hmotnostní spektra uložená v databázi. I tak je vhodné identitu sledované molekuly ověřit použitím analytického standardu, pokud je k dispozici. Poměr mateřské látky a metabolitu lze určit z kvantitativních hodnot přepočtených na molekulovou hmotnost. Alternativně můžeme pro odhad poměrného zastoupení mateřské látky a metabolitu využít jejich intenzit z dat hmotnostního spektrometru. Další metabolity lze predikovat ze souboru MS/MS spekter. Pro spolehlivou identifikaci je však potřeba neznámou látku izolovat a charakterizovat.

#### 4.1.6. Analýzy vzorků samotářských včel

Vzhledem ke krátkověkosti samců, lze analýzu chronického efektu provádět pouze na vzorcích samic.

14. Vzorky samotářských včel analyzujeme na změny přepisu genetické informace v rámci jedince. Vhodnými metodami, které ukážou komplexní pohled na změny, jsou vysokokapacitní proteomická a transkriptomická analýza. Případně můžeme využít kombinace těchto dvou přístupů.



**15.** Pro konkrétní situace a na základě předchozích výsledků můžeme zvažovat také kompartmentalizaci vzorků samotářských včel, tzn. detailnější analýzy můžeme provádět po jednotlivých částech těla nebo orgánech (hlava, hrud', zadeček, střevo, tykadla atd.).

#### **4.1.7. Interpretace dat**

**16.** Zvažujeme distribuci a kvantitu mateřské látky v rostlině a případně v zemině. Velmi významným výsledkem však může být vznik potenciálního metabolitu v rostlině nebo zemině, který by mohl představovat riziko pro včely. Pokud byly analyzovány vzorky odebírané v průběhu experimentu (časová osa), vyhodnotíme změny v obsahu sledovaných látek v závislosti na době od aplikace. Vždy hodnotíme, do jaké míry byla zvolená expozice konkrétní látky nebo konkrétnímu POR realistická vzhledem k aplikaci v praxi.

**17.** Změny mezi kontrolními a exponovanými vzorky včel musí být signifikantní alespoň na hladině významnosti 0,05. Validitu identifikovaných individuálních rozdílů získaných ze standardního vyhodnocení pro vysokokapacitní data v programu ověříme také ručně tak, že naměřené hodnoty prohlédneme jednotlivě alespoň pro vybrané markery. Ověřujeme počet identifikací (hitů) na jednotlivé vzorky. Některé markery mohou totiž vykazovat rozdíly kvalitativního charakteru, resp. marker byl, nebo nebyl detekován. Zároveň můžeme narazit na detekční limity použitých metod. I přes použití velmi citlivých a přesných metod je nutno brát v potaz možné limitace. Další limitace můžou mít svůj původ ve zvoleném vzorku. V této metodice jsou analyzovány vzorky dospělé včely. Pokud by se v nich nebo jejich kompartmentech neprojevíly významné změny, nemůžeme vyloučit případný vliv na jiné stádium.

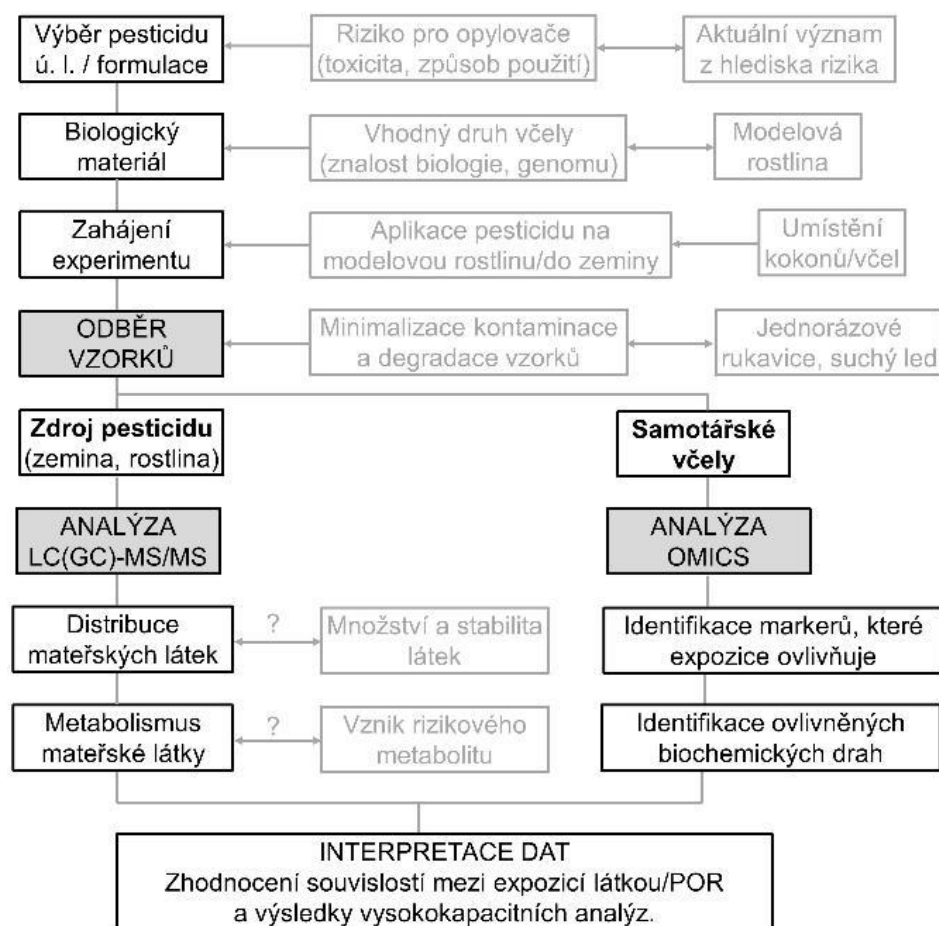
**18.** Identifikované rozdíly v markerech zvažujeme vzhledem k jejich intenzitě. Pokud je identifikováno více markerů, je nutné vyhodnotit jejich souvislosti. Celkově hodnotíme, jaký dopad můžou mít sledované změny na fyziologii modelového organismu.





#### 4.1.7. Schématické znázornění metodického postupu

Obrázek 2. Zjednodušené schématické znázornění metodického postupu.



## 5. Příklad provedení metodiky

### A. Testovaný pesticid:

- **Hodnocená účinná látka:** acetamiprid (ve formulovaném přípravku)

*Komentář:* Ze skupiny neonikotinoidů bylo v EU původně povoleno pět účinných látek. Jednalo se o imidaklopid, thiamethoxam, klothianidin, thiaklopid a acetamiprid. První tři jmenované neonikotinoidy jsou pro včely vysoce toxické. Evropská komise (EK) na základě zprávy EFSA od roku 2013 zásadně omezila používání imidaklopidu, thiamethoxamu a klothianidinu [43]. Následně EK zákaz těchto neonikotinoidů potvrdila nařízením z roku 2018 [44–46]. V roce 2020



nebyla čtvrtému neonikotinoиду, thiaklopridu, obnovena registrace v EU [47]. Rozhodnutí bylo provedeno na základě závěrů EFSA [48]. Jediným povoleným neonikotinoidem v EU je v současnosti acetamiprid, který má platnou registraci do 28. února 2033 [49]. Hodnocení rizik acetamipridu a jeho formulací je stále aktuální.

- **Formulace přípravku:** Careo

*Typ prostředku:* Careo<sup>®</sup> combi tyčinky proti škůdcům, neprofesionální balení POR

*Druh a množství účinné látky:* acetamiprid 40 g/kg (4 % hmotnosti)

Balení: PAP blistr 20 tyčinek po 1,25 g

*Určení použití:* Přípravek není určen pro aplikaci ošetření plodin určených ke konzumaci a ke zkrmování. Přípravek je navíc možné aplikovat pouze do květináčů a truhlíků. Na etiketě bylo uvedeno, že MRL (maximal residue level) není potřeba stanovovat.

*Výrobce účinné látky:* Nippon Soda Co. Ltd., Tokyo, Japonsko

*Výrobce přípravku a držitel rozhodnutí o povolení:* Scotts Celaflor Handelsgesellschaft m. b. H., Salzburg, Rakousko

**Komentář:** Použitá formulace přípravku Careo<sup>®</sup> combi tyčinky byla vybrána vzhledem k tomu, že ji běžně používají zahrádkáři a určení je pro použití na ochranu okrasných rostlin. Okrasné rostliny např. na balkónech i zahrádkách můžou navštěvovat včely, včetně samotářských včel. Přípravek je zejména proti molícím, štítenkám, housenkám, mšicím či červcům.

Výsledky hodnocení rizik acetamipridu a tohoto jeho formulovaného přípravku mohou přispět k ověření správnosti rozhodnutí o malé rizikovosti této účinné látky pro včely [49].

## **B. Biologický materiál:**

- **Rostlina:** svazenka vratičolistá (*Phacelia tanacetifolia*)

Svazenka byla pěstována v truhlících Nohel Garden Anthea (rozměry: d = 100 cm x š = 45 cm x v = 40 cm). Do každého truhlíku bylo umístěno 100 l biologického (100%) předhnojeného rašelinového substrátu All Mix 50l (Biobizz Worldwide SL, Legizamon, Španělsko). Složení substrátu: 20 % rašeliníku, 35 % zahradní rašeliny, 10 % organického hnojiva (žížalí trus), 30 % perlitu a 5 % BioBizz Pre-Mix.



**Komentář:** Svazenka byla pěstována v truhlících od 1. března 2021 a pro zahájení experimentu byla připravena na začátku června.

- ***Druh samotářské včely:*** zednice rezavá (*Osmia bicornis*)  
Kokony samotářských včel pocházely od firmy Dr. Schubert Plant Breeding (Landsberg, Německo). Kokony byly do zahájení experimentu skladovány při 4-5 °C.

#### **C. Zahájení experimentu:**

- Do izolátorů byly umístěny dva truhlíky se svazenkou, která byla na počátku kvetení.
- Tři dny před umístěním včel/kokonů do izolátorů (1. června) byly do substrátu aplikovány tyčinky. Byly aplikovány vždy 2 tyčinky s rozestupem 15 cm po délce a 13 cm po šířce truhlíku. Do truhlíku bylo tedy aplikováno celkem 20 tyčinek.
- Experiment byl zahájen vložением 30 kokonů do izolátorů dne 4. června.

#### **D. Ukončení experimentu a sběr vzorků:**

- Vzorky včel byly sbírány 17. června.
- Pro sběr včel byly použity plastové krabičky, do kterých byly včely jednotlivě odchyceny. Plastové krabičky byly přikryty papírem a jejich vložением do polystyrénové krabice se suchým ledem na přibližně 20 sekund byly včely přispány. Následně byla každá včela vložena do zkumavky typu eppendorf a zamražena na suchém ledu.
- Po odebrání vzorků včel byly odebrány reprezentativní vzorky substrátu a rostlin. Substrát byl odebrán v místech mimo aplikaci tyčinek. Odebraný rostlinný materiál činily listy a květy. Odebrané vzorky substrátu a rostlin byly mraženy a následně lyofilizovány a zváženy.
- Všechny vzorky byly skladovány při -80 °C do zpracování na analýzy.

#### **E. Provedené analýzy vzorků:**

- Lyofilizované vzorky zeminy, listů a květů rostlin byly analyzovány validovanými metodami společností ALS Czech Republic, s. r. o., za použití UPLC-MS/MS (ACQUITY UPLC I-Class; XEVO TQ-XS – Waters, Milford, MA, USA). Metody byly použity např. ve studiích Seifrtova et al. [50] a Kadlíkova et al. [51]. Kromě této



mateřské látky acetamipridu bylo ověřeno, že se v experimentálních matricích nevyskytovala rezidua jiných pesticidů.

- Stejně extrakty, které byly analyzovány cílenou metodou na pesticidy včetně acetamipridu (viz výše), byly podrobeny analýze pomocí vysokorozlišovacího hybridního hmotnostního spektrometru metodou UHPLC-MS/MS (Thermo Dionex Ultimate 3000; QExactive – Thermo, Waltham, MA, USA) ve full-scan data-dependent MS<sup>2</sup> modu. Výsledky byly vyhodnoceny v prostředí Compound Discoverer 2.1. (Thermo). Kromě mateřských látek byly hledány potenciální metabolity mateřské látky acetamipridu.
- Samice samotářských včel byly analyzovány zavedeným vysokokapacitním proteomickým přístupem, viz např. studie Erban et al. [33, 34, 52]. Homogenizace byla provedena v Potter-Elvehjem skleněných homogenizérech s teflonovým pístem. Včely byly homogenizovány ve 100 mM triethylammonium bikarbonátovém pufru s 2% (w/v) obsahem deoxycholátu sodného. Připravené trypsinové štěpy byly analyzovány na přístrojovém vybavení nanoLC-MS/MS (Thermo Dionex Ultimate 3000; Orbitrap Fusion – Thermo, Waltham, MA, USA). Výsledky byly vyhodnoceny v prostředí MaxQuant [53] a Perseus [54], přičemž byla použita aktuální RefSeq [55] databáze pro daný taxon (taxonomy id: 1437190) přístupná v NCBI. Celkový počet sekvencí použitých při vyhodnocení hrubých proteomických dat byl 24 839. Databáze byla aktuální ke dni 2. prosince 2021.

## F. Výsledky:

- ***Distribuce acetamipridu:***

Ve všech třech matricích (půdní substrát, listy, květy) bylo provedeno a získáno šest výsledků pro kontrolní i acetamipridem exponovaný izolátor. Výsledky v tabulce 1 ukazují, že obsah acetamipridu na sušinu byl největší v listech a přibližně 16,6krát menší byl v květech. V půdním substrátu byl obsah acetamipridu při hodnocení na sušinu přibližně 0,15 mg/kg. Tyto výsledky ukazují, že acetamiprid je v rostlině velmi dobře distribuován z půdního sustrátu.



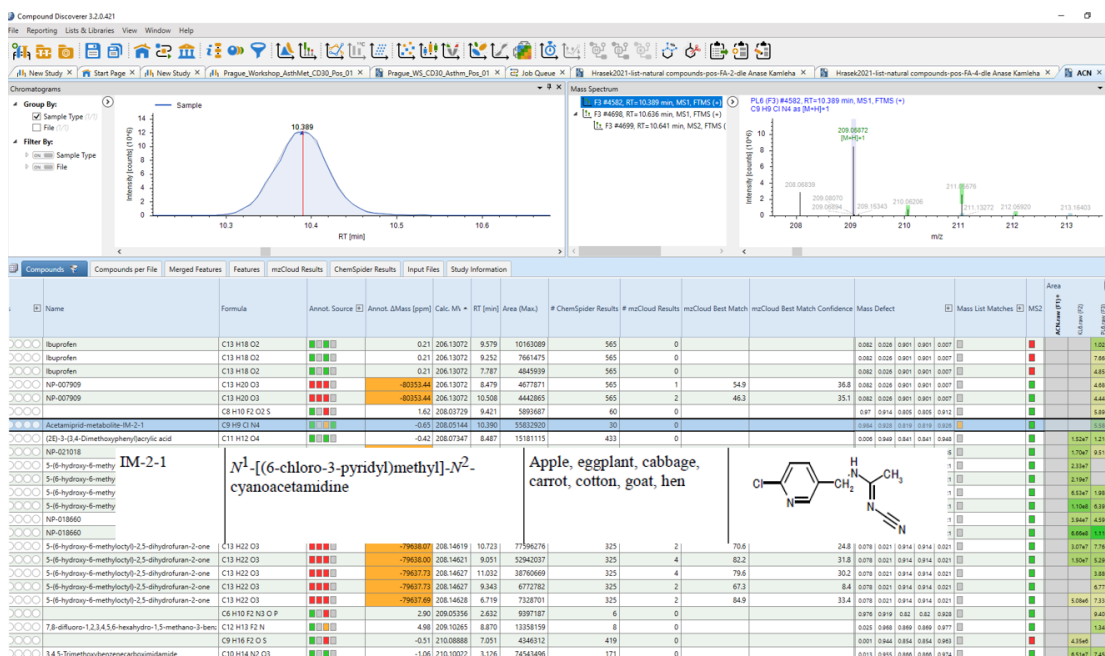
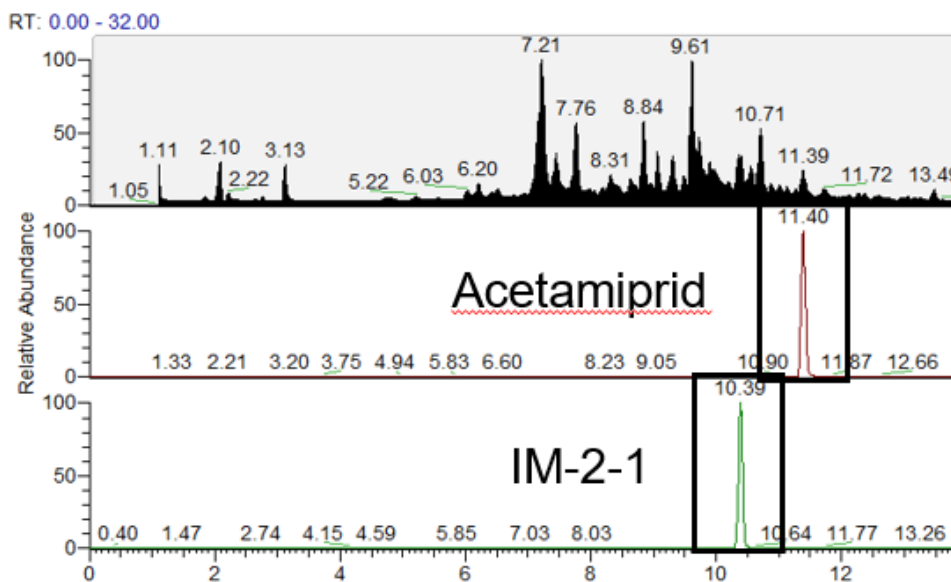
**Tabulka 1.** Obsah acetamipridu v jednotlivých vzorcích a průměry výsledků se směrodatnými odchylkami v maticích.

Kontrola - acetamiprid [mg/kg] sušiny						Expozice - acetamiprid - tyčinky Careo [mg/kg] sušiny						Expozice acetamiprid	
LISTY												Průměr	±SD
---	---	---	---	---	---	40,96	11,17	126,93	17,35	25,04	29,01		
KVĚTY													
---	---	---	---	0,002	---	1,55	3,72	4,00	3,70	0,52	1,54	<b>2,51</b>	<b>1,48</b>
PŮDNÍ SUBSTRÁT													
---	---	---	---	---	---	0,15	0,02	0,02	0,18	0,47	0,05	<b>0,15</b>	<b>0,17</b>

Limity kvantifikace (LOQ) a limity pro reportování (LOR) UPLC-MS/MS analýz acetamipridu byly: LOD = 0,0002 mg/kg sušiny a LOR = 0,01 mg/kg sušiny.

- **Identifikace relevantního metabolitu acetamipridu:**

Extrakty byly následně podrobeny necílené analýze pomocí vysokorozlišovacího UHPLC-MS/MS (Thermo Scientific Q Exactive™). Vyhodnocení ukázalo přítomnost N-desmethyl metabolitu acetamipridu, který je zkráceně označován jako IM-2-1 (obr. 3 a 4). Sumární vzorec tohoto metabolitu je C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>ClN<sub>4</sub> a jeho relativní molekulová hmotnost je 208,05142. Správná identifikace metabolitu byla ověřena změřením certifikovaného standardu dané látky. Metabolit byl identifikován v listech a květech. Přítomnost IM-2-1 v půdním substrátu nebyla spolehlivá, což je pochopitelné vzhledem k celkové nízké koncentraci mateřského acetamipridu v této matici.

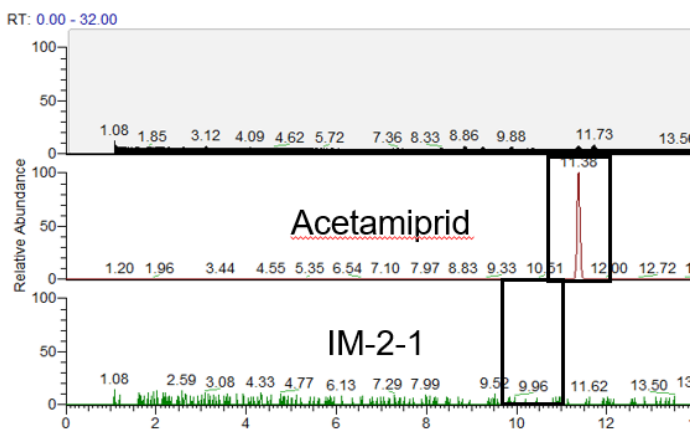
**Obrázek 3.** Identifikace metabolitu IM-2-1 v softwaru Compound Discoverer 2.1.**Obrázek 4.** Retenční čas a relativní abundance mateřské látky acetamidridu a metabolitu IM-2-1 v listech. Obdobný výsledek byl získán pro květ.

Přestože identifikace metabolitu acetamidridu IM-2-1 byla vyhodnocena jako spolehlivá, bylo přistoupeno k ověřovacím krokům. Proto byla provedena analýza

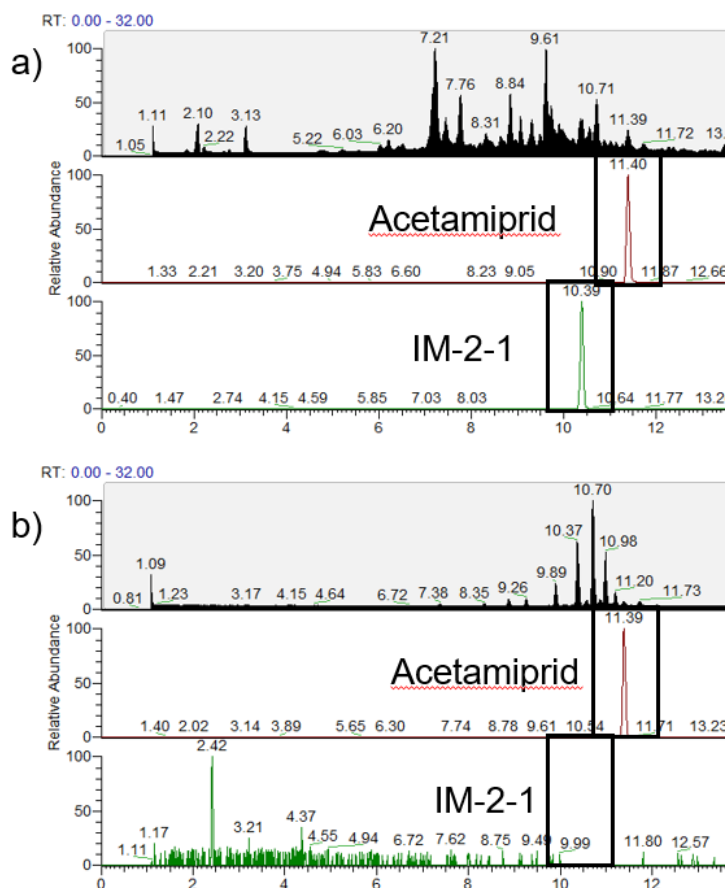


samotného standardu acetamipridu, v němž byl výskyt metabolitu vyloučen (obr. 5). Výskyt metabolitu byl vyloučen také v použité formulaci – tyčinkách Careo (obr. 6).

**Obrázek 5.** Vyloučení přítomnosti IM-2-1 ve standardu acetamipridu.



**Obrázek 6.** Vyloučení přítomnosti IM-2-1 v přípravku Careo (tyčinky). Pro porovnání je uveden výsledek analýzy pro extrakt z listu (a) a formulaci Careo (b).

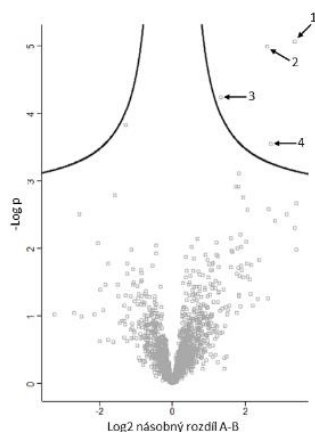




- **Proteomické změny v samotářských včelách:**

Proteomickou analýzou bylo celkově identifikováno 2 347 proteinů. Výsledky byly následně statisticky vyhodnoceny.

**Obrázek 7.** Rozdíly v proteomu vzorků samotářských včel vystavených acetamipridu a kontrolních vzorků.



Statisticky signifikantní výsledky (FDR = 0.05)

No.	Logp	Fasta headers
		XP_029052136.1  very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase hpo-8
1	5.07	
2	4.99	XP_029031945.1  copper transport protein ATOX1
3	4.24	XP_029044885.1  E3 UFM1-protein ligase 1 homolog
4	3.55	XP_029045471.1  monocarboxylate transporter 3 isoform X3

Statistické vyhodnocení proteomických dat ukázalo 4 signifikantně rozdílné markery. Toto porovnání bylo vyhodnoceno za použití korekce typu FDR (false-discovery rate) 0,05. Výsledek analýzy s použitím T-testu a 1 000 randomizací názorně zobrazuje obr. 7. K signifikantním výsledkům *O. bicornis* byly nalezeny pomocí Blastp [56] homologické proteiny a příslušné geny *A. mellifera* (tabulka 2). Následná analýza na interakci proteinů/genů v prostředí STRING 11.5 [57] však neukázala přímou spojitost mezi nalezenými markery.

**Tabulka 2.** Homologické proteiny a geny *A. mellifera* k signifikantním markerům *O. bicornis* (viz obr. 7).

No.	Překrytí	Identita	NCBI	<i>Apis mellifera</i> [ <i>Apis mellifera</i> ]	Gen
1	100%	66,23%	XP_003250467.2	very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase hpo-8	LOC100577192
2	100%	83,33%	XP_001121022.1	copper transport protein ATOX1	LOC725138
3	99%	84,31%	XP_003250392.2	E3 UFM1-protein ligase 1 homolog	LOC411483
4	97%	93,54%	XP_026296554.1	monocarboxylate transporter 3 isoform X5	LOC725015





## G. Interpretace výsledků:

Výsledky analýzy distribuce acetamipridu indikovaly relativně vysoký obsah v rostlinných pletivech. Dochází tedy k přechodu acetamipridu z půdního substrátu do rostliny a jeho koncentraci v rostlinných pletivech. Kromě mateřské látky byl v rostlinných pletivech identifikován také metabolit acetamipridu IM-2-1. Tento metabolit je významný relevantní metabolit acetamipridu, který byl diskutován mimo jiné ve zprávě EFSA, která hodnotila rizika acetamipridu [58]. Také podle zprávy FAO je IM-2-1 relevantním metabolitem v rostlinách [59]. Jistý význam má také zjištění, že IM-2-1 je relevantním významným metabolitem acetamipridu v živočišných tkáních a také ve mléku, a to dokonce při absenci mateřského acetamipridu [58, 59]. Výsledky příkladu provedení v této metodice ukazují, že IM-2-1 je relevantní metabolit pro modelovou rostlinu svazenu.

Z proteomické analýzy bylo možné porovnávat expresi celkem 2 347 proteinů, což představuje dosti velký počet. Šest biologických opakování, resp. šest jedinců, v expozici acetamipridu a taktéž v kontrolní expozici představuje dostatečný počet opakování pro statistické zpracování. Výsledky proteomické analýzy ukázaly na celkově relativně malé změny v proteomu. Nález pouze čtyř statisticky signifikantně rozdílných markerů, u nichž nebyla indikována ani vzájemná přímá souvislost, potvrzuje malý vliv acetamipridu na včely. Vzhledem k získaným výsledkům lze hodnotit vliv expozice samotářských včel *O. bicornis* acetamidem jako relativně malý. Signifikantní výsledky by bylo potřeba v budoucnu ověřit.

Výsledky analýz jsou v souladu s vyhodnocením malé rizikovosti acetamipridu pro včely dle EFSA [58] a prodloužením jeho registrace do 28. února 2033 [49]. Je možné, že v budoucnu budou objevena nová rizika acetamipridu na samotářské včely. Dle našich dat je potřeba věnovat pozornost nejen mateřské látce, ale také metabolitům, zejména IM-2-1.



## 6. Srovnání novosti metodiky

Metodika přináší nové prvky do hodnocení rizik pesticidů na opylovače. Metodika zohledňuje potřebu hodnocení rizik pesticidů v realistické expozici. Moderními analytickými přístupy je možné ověřit distribuci pesticidů v maticích, ale také metabolický osud sledovaných látek. V metodice je počítáno s využitím nejmodernějších analytických přístupů, což je také v souladu s legislativou, která je v EU spojena se schvalováním účinných látek a formulovaných přípravků. Při hodnocení rizik pesticidů je totiž vhodné brát v úvahu technologický a vědecký pokrok. Výhodu metodiky lze spatřovat v možnosti komplexního hodnocení dopadu hodnocených látek a přípravků na necílové organismy. Zařazení OMICs technologií do hodnocení rizik pesticidů je kriticky důležité z toho pohledu, že umožňuje sledování tisíců markerů najednou, a to proteomickým nebo případně transkriptomickým či metabolickým přístupem.

## 7. Uplatnění metodiky

Metodika je určena zejména pro odborné pracovníky zaměřené na hodnocení rizik pesticidů na necílové organismy a životní prostředí jako takové. Samotářské včely mají významný podíl na opylení plodin zejména v obdobích, kdy není vhodné nebo možné efektivně využít včely medonosné. Značný význam bude mít metodika pro ovocnáře a odborníky zabývající se opylením plodin a zároveň hodnocením rizik pesticidů na opylovače. Potenciálními uživateli v Česku ale i v zahraničí jsou také orgány zabývající se používáním prostředků na ochranu rostlin a hodnocením rizik spojených s jejich používáním. Metodika se vztahuje k Národnímu akčnímu plánu k bezpečnému používání pesticidů (NAP) spadajícího do gesce Ministerstva zemědělství ČR, které jej ve spolupráci s Ministerstvem životního prostředí ČR a Ministerstvem zdravotnictví ČR vyhodnocuje a periodicky aktualizuje. Metodika může přispět také 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.

V uživatelské sféře se metodika uplatní při pěstování ovoce a jiných plodin tak, že přispěje k ochraně přirozených i komerčních opylovačů. Eliminace negativního vlivu POR je velmi důležitou součástí produkce v sadech, ale i jinde. Správnou definicí rizik POR je možné lépe chránit přirozená společenstva samotářských včel, která představují záruku zisku z ovocnářské produkce do budoucna.



## 8. Ekonomické přínosy metodiky

Metodika je zaměřena na hodnocení rizik pesticidů na samotářské včely, které mají dle výzkumů větší účinnost při opylování plodin, než včela medonosná. Samotářské včely, vedle komerčních opylovačů (včela medonosná, čmelák zemní), významným způsobem přispívají ke zvýšení produkce a kvality řady kulturních a zemědělských plodin. Přirozeně vytvořená společenstva opylovačů jsou nejlepším řešením vzhledem k ochraně biodiverzity a výrazná pozitiva lze navíc spatřovat také právě z ekonomického hlediska. Pokud jsou v dostatečné míře zachováni přirození opylovači, nemusí pěstitelé zajišťovat alternativní opylování komerčními opylovači, jako je včela medonosná nebo čmelák zemní. Možnost použití komerčně produkovaných čmeláků je v Česku také omezena vzhledem k rizikům ohrožení jejich přirozených populací. Riziko by mohlo spočívat v ovlivnění genetiky lokálních přirozených populací a úniku nepůvodních taxonů do přírody. Jistá rizika pro přirozené opylovače představuje také krajina převčelená včelou medonosnou. Význam samotářských včel je podobně jako v případě čmeláků navíc zvýrazněn pro období nebo případy, kdy není k dispozici opylovací služba včely medonosné. Např. v publikaci Kleijn et al. [19] byla vyčíslena přidaná hodnota volně žijících včel pro hmyzem opylované plodiny přibližně na 3 tisíce amerických dolarů na hektar.

Postupy uvedené v metodice se týkají ochrany samotářských včel před negativními vlivy POR a v nich obsažených účinných látek. Tato certifikovaná metodika využívá nejmodernějších analytických metod, kterými jsou analyzovány vzorky připravené simulací přirozené expozice pesticidům. V posledních letech se dostává do popředí trend hodnocení rizik pesticidů takovými přístupy, které dokážou odhalit případný skrytý mechanismus. Běžněji a tradičně jsou rizika pesticidů hodnocena z pohledu stanovení letální dávky (např. LD50). Taková data jsou nepochybně důležitá, ale neposkytují informace o mechanismu účinku látek na samotářskou včelu. Spotřeba jedinců na stanovení letálních dávek může být podstatně vyšší než v případě našeho modelového experimentu. V případě našeho přístupu hodnocení jsou však podstatně vyšší požadavky na instrumentální vybavenost pracoviště a také odborné znalosti související s používanými přístroji a metodami. Přidaná hodnota v získaných výsledcích z vysokokapacitních metod je však velmi vysoká, jelikož dokáže s velkou spolehlivostí určit reálná rizika pesticidů pro necílové organismy a prostředí. Takto komplexní pohled na problematiku tradiční metody založené pouze na biotestech poskytnout nedokážou. Celkové náklady na experimenty v této metodice lze odhadovat nejméně 10krát až 100krát vyšší než v případě běžných postupů založených na biotestech.



## 9. Publikace, které předcházely metodice

- 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 pp.
- Šlachta M. (2021) Výzkum k opylovací službě samotářek. *Mod. včelař* 18(11): 18–18.
- Šlachta M., Erban T., Votavová A., Bešta T., Skalský M., Václavíková M., Halešová T., Edwards-Jonášová M., Včeláková R., Cudlín P. (2020) Domestic gardens mitigate risk of exposure of pollinators to pesticides—an urban-rural case study using a red mason bee species for biomonitoring. *Sustainability* 12: 9427.
- Votavová A., Šlachta M., Erban T. (2020) Domek pro chov včel samotářek: užitný vzor číslo 34188. Úřad průmyslového vlastnictví, Praha, 3 pp.

## 10. Přílohy

### Truhlík



Zdroj: <https://www.hudetz.cz/plastovy-truhlík-anthea-antracit>

### Miska pod truhlík



Zdroj: <https://www.hudetz.cz/miska-pod-truhlík-anthea-antracit>

### Domeček pro samotářky v síťovniku



Průměr trubiček se uzpůsobuje dle druhu samotářské včely.

### Samotářská včela *O. bicornis* na květu v izolátoru





## 11. Seznam literatury

1. Erban T., Kamler M., Šulcová K., Titěra D., Seifrtová M., Riddelová K., Hubert J., Hortová B., Halešová T. (2016) Hodnocení vlivu xenobiotik na včely v průběhu ontogeneze metodami proteomické, metabolické a genomické analýzy: certifikovaná metodika. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha, 36 pp.
2. Ollerton J., Winfree R., Tarrant S. (2011) How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos* 120: 321–326.
3. Eilers E. J., Kremen C., Smith Greenleaf S., Garber A. K., Klein A.-M. (2011) Contribution of pollinator-mediated crops to nutrients in the human food supply. *PLoS ONE* 6: e21363.
4. COST (2013) Memorandum of Understanding for the implementation of a European Concerted Research Action designated as COST Action FA1307: SUPER-B: SUSTAINABLE POLLINATION IN EUROPE: JOINT RESEARCH ON BEES AND OTHER POLLINATORS. COST 060/13, 22 November 2013. European Cooperation in the field of Scientific and Technical Research (COST), Brussels, 26 pp. URL: [http://superb-project.eu/getatt.php?filename=FA1307-e\\_11311.pdf](http://superb-project.eu/getatt.php?filename=FA1307-e_11311.pdf)
5. Garratt M. P. D., Breeze T. D., Jenner N., Polce C., Biesmeijer J. C., Potts S. G. (2014) Avoiding a bad apple: insect pollination enhances fruit quality and economic value. *Agric. Ecosyst. Environ.* 184: 34–40.
6. Convention on Biological Diversity (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, 3<sup>rd</sup> edn. Secretariat of the Convention on Biological Diversity, Montreal, pp. 399–408. URL: <https://www.cbd.int/doc/handbook/cbd-hb-09-en.pdf>
7. Convention on Biological Diversity (2000) COP 5 Decision V/5: Retired sections: paragraphs 1–2, 8, 20–21 and 28–29. Agricultural biological diversity: review of phase I of the programme of work and adoption of a multi-year work programme. In: Convention on Biological Diversity (ed.) Meeting Documents: Fifth Ordinary Meeting of the Conference of the Parties to the Convention on Biological Diversity, 15–26 May 2000, Nairobi, Kenya. Convention on Biological Diversity (CBD), Nairobi. URL: <https://www.cbd.int/decision/cop/?id=7147>
8. Dias B. S. F., Raw A., Imperatri-Fonseca V. L. (1999) International Pollinators Initiative: The São Paulo Declaration on Pollinators: Report on the Recommendations of the Workshop on the Conservation and Sustainable Use of Pollinators in Agriculture with Emphasis on Bee. Brazilian Ministry of the Environment, Brasília, 79 pp. URL: <https://www.cbd.int/doc/case-studies/agr/cs-agr-pollinator-rpt.pdf>
9. Cambridge Institute for Sustainability Leadership, Fauna & Flora International, University of East Anglia, UNEP-WCMC (2017) The pollination deficit: Towards supply chain resilience in the face of pollinator decline. UNEP-WCMC, Cambridge, UK, 42 pp. URL: [https://www.unep-wcmc.org/system/dataset\\_file\\_fields/files/000/000/517/original/The\\_pollination\\_deficit\\_FINAL\\_1804\\_18.pdf](https://www.unep-wcmc.org/system/dataset_file_fields/files/000/000/517/original/The_pollination_deficit_FINAL_1804_18.pdf)
10. Convention on Biological Diversity (2016) Decision adopted by the Conference of the Parties to the Convention on Biological Diversity, Thirteenth meeting, Cancun, Mexico, 4–17 December 2016: XIII/15. Implications of the IPBES assessment on pollinators, pollination and food production for the work of the Convention: CBD/COP/DEC/XIII/15. Convention on Biological Diversity (CBD), Cancun, 5 pp. URL: <https://www.cbd.int/doc/decisions/cop-13/cop-13-dec-15-en.pdf>
11. Directorate-General for Environment (2020) Biodiversity strategy for 2030 [Strategie v oblasti biologické rozmanitosti do roku 2030]. European Commission (EC), Brussels. URL: [https://ec.europa.eu/environment/strategy/biodiversity-strategy-2030\\_en](https://ec.europa.eu/environment/strategy/biodiversity-strategy-2030_en)



12. Klein A.-M., Vaissière B. E., Cane J. H., Steffan-Dewenter I., Cunningham S. A., Kremen C., Tscharntke T. 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. Biol. Sci.* 274: 303–313.
13. Southwick E. E., Southwick Jr. L. (1992) Estimating the economic value of honey bees (Hymenoptera: Apidae) as agricultural pollinators in the United States. *J. Econ. Entomol.* 85: 621–633.
14. Watanabe M. E. (1994) Pollination worries rise as honey bees decline. *Science* 265: 1170–1170.
15. Roubik D. W. (2002) The value of bees to the coffee harvest. *Nature* 417: 708–708.
16. Knapp J. L., Becher M. A., Rankin C. C., Twiston-Davies G., Osborne J. L. (2019) *Bombus terrestris* in a mass-flowering pollinator-dependent crop: a mutualistic relationship? *Ecol. Evol.* 9: 609–618.
17. Ings T. C., Raine N. E., Chittka L. (2005) Mating preference in the commercially imported bumblebee species *Bombus terrestris* in Britain (Hymenoptera: Apidae). *Entomol. Gen.* 28: 233–238.
18. Owen E. L., Bale J. S., Hayward S. A. L. (2016) Establishment risk of the commercially imported bumblebee *Bombus terrestris dalmatinus*—can they survive UK winters? *Apidologie* 47: 66–75.
19. Kleijn D., Winfree R., Bartomeus I., Carvalheiro L. G., Henry M., Isaacs R., Klein A.-M., Kremen C., M'Gonigle L. K., Rader R., Ricketts T. H., Williams N. M., Lee Adamson N., Ascher J. S., Báldi A., Batáry P., Benjamin F., Biesmeijer J. C., Blitzer E. J., Bommarco R., Brand M. R., Bretagnolle V., Button L., Cariveau D. P., Chifflet R., Colville J. F., Danforth B. N., Elle E., Garratt M. P. D., Herzog F., Holzschuh A., Howlett B. G., Jauker F., Jha S., Knop E., Krewenka K. M., Le Féon V., Mandelik Y., May E. A., Park M. G., Pisanty G., Reemer M., Riedinger V., Rollin O., Rundlöf M., Sardiñas H. S., Scheper J., Sciligo A. R., Smith H. G., Steffan-Dewenter I., Thorp R., Tscharntke T., Verhulst J., Viana B. F., Vaissière B. E., Veldtman R., Ward K. L., Westphal C., Potts S. G. (2015) Delivery of crop pollination services is an insufficient argument for wild pollinator conservation. *Nat. Commun.* 6: 7414.
20. EP, Rada ES (2009) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009 ze dne 21. října 2009 o uvádění přípravků na ochranu rostlin na trh a o zrušení směrnic Rady 79/117/EHS a 91/414/EHS. *Úř. věst. E. U. L* 309: 1–48, 24. 11. 2009. URL: <http://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2009/1107/oj>
21. EP, Rada (2009) Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2009/128/ES ze dne 21. října 2009, kterou se stanoví rámec pro činnost Společenství za účelem dosažení udržitelného používání pesticidů. *Úř. věst. E. U. L* 309: 71–86, 24. 11. 2009. URL: <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2009/128/oj>
22. Garibaldi L. A., Steffan-Dewenter I., Winfree R., Aizen M. A., Bommarco R., Cunningham S. A., Kremen C., Carvalheiro L. G., Harder L. D., Afik O., Bartomeus I., Benjamin F., Boreux V., Cariveau D., Chacoff N. P., Dudenhöffer J. H., Freitas B. M., Ghazoul J., Greenleaf S., Hipólito J., Holzschuh A., Howlett B., Isaacs R., Javorek S. K., Kennedy C. M., Krewenka K. M., Krishnan S., Mandelik Y., Mayfield M. M., Motzke I., Munyuli T., Nault B. A., Otieno M., Petersen J., Pisanty G., Potts S. G., Rader R., Ricketts T. H., Rundlöf M., Seymour C. L., Schüepp C., Szentgyörgyi H., Taki H., Tscharntke T., Vergara C. H., Viana B. F., Wanger T. C., Westphal C., Williams N., Klein A. M. (2013) Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. *Science* 339: 1608–1611.
23. Garratt M. P. D., Breeze T. D., Boreux V., Fountain M. T., McKerchar M., Webber S. M., Coston D. J., Jenner N., Dean R., Westbury D. B., Biesmeijer J. C., Potts S. G. (2016) Apple pollination: demand depends on variety and supply depends on pollinator identity. *PLoS ONE* 11: e0153889.
24. Pardo A., Borges P. A. V. (2020) Worldwide importance of insect pollination in apple orchards: a review. *Agric. Ecosyst. Environ.* 293: 106839.
25. Eeraerts M., Vanderhaegen R., Smaghe G., Meeus I. (2020) Pollination efficiency and foraging behaviour of honey bees and non-*Apis* bees to sweet cherry. *Agric. Forest Entomol.* 22: 75–82.
26. Corbet S. A., Fussell M., Ake R., Fraser A., Gunson C., Savage A., Smith K. (1993) Temperature and the pollinating activity of social bees. *Ecol. Entomol.* 18: 17–30.





27. Vicens N., Bosch J. (2000) Weather-dependent pollinator activity in an apple orchard, with special reference to *Osmia cornuta* and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Megachilidae and Apidae). *Environ. Entomol.* 29: 413–420.
28. Kenna D., Pawar S., Gill R. J. (2021) Thermal flight performance reveals impact of warming on bumblebee foraging potential. *Funct. Ecol.* 35: 2508–2522.
29. EK (2011). Nařízení Komise (EU) č. 546/2011 ze dne 10. června 2011, kterým se provádí nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009, pokud jde o jednotné zásady pro hodnocení a povolování přípravků na ochranu rostlin. *Úř. věst. E. U. L* 155: 127–175, 11. 6. 2011. URL: <http://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2011/546/oj>
30. European Food Safety Authority (EFSA) (2013) EFSA Guidance Document on the risk assessment of plant protection products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. and solitary bees). *EFSA J.* 11:3295.
31. Kocourek F., Stara J., Sopko B., Talacko P., Harant K., Hovorka T., Erban T. (2021) Proteogenomic insight into the basis of the insecticide tolerance/resistance of the pollen beetle *Brassicogethes (Meligethes) aeneus*. *J. Proteomics* 233: 104086.
32. Erban T., Harant K., Chalupnikova J., Kocourek F., Stara J. (2017) Beyond the survival and death of the deltamethrin-threatened pollen beetle *Meligethes aeneus*: an in-depth proteomic study employing a transcriptome database. *J. Proteomics* 150: 281–289.
33. Erban T., Klimov P., Talacko P., Harant K., Hubert J. (2020) Proteogenomics of the house dust mite, *Dermatophagoides farinae*: allergen repertoire, accurate allergen identification, isoforms, and sex-biased proteome differences. *J. Proteomics* 210: 103535.
34. Erban T., Klimov P. B., Harant K., Talacko P., Nesvorna M., Hubert J. (2021) Label-free proteomic analysis reveals differentially expressed *Wolbachia* proteins in *Tyrophagus putrescentiae*: mite allergens and markers reflecting population-related proteome differences. *J. Proteomics* 249: 104356.
35. Beadle K., Singh K. S., Troczka B. J., Randall E., Zaworra M., Zimmer C. T., Hayward A., Reid R., Kor L., Kohler M., Buer B., Nelson D. R., Williamson M. S., Davies T. G. E., Field L. M., Nauen R., Bass C. (2019) Genomic insights into neonicotinoid sensitivity in the solitary bee *Osmia bicornis*. *PLoS Genet.* 15: e1007903.
36. Sampson B. J., Stringer S. J., Cane J. H., Spiers J. M. (2004) Screenhouse evaluations of a mason bee *Osmia ribifloris* (Hymenoptera: Megachilidae) as a pollinator for blueberries in the southeastern United States. *Small Fruits Rev.* 3: 381–392.
37. Mader E., Spivak M., Evans E. (2010) Managing alternative pollinators: a handbook for beekeepers, growers, and conservationists. Sustainable Agriculture Research and Education (SARE), College Park, MD; Natural Resource, Agriculture, and Engineering Service (NRAES), Ithaca, NY, 162 pp. URL: <https://www.sare.org/resources/managing-alternative-pollinators/>
38. Sedivy C., Dorn S. (2014) Towards a sustainable management of bees of the subgenus *Osmia* (Megachilidae; *Osmia*) as fruit tree pollinators. *Apidologie* 45: 88–105.
39. Krunić M. D., Stanisavljević L. Ž. (2006) The biology of European orchard bee *Osmia cornuta* = Biologija evropske pčele voćnjaka *Osmia cornuta*. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd, 137 pp.
40. Kornmilch J.-C. (2010) Einsatz von Mauerbienen zur Bestäubung von Obstkulturen: Handbuch zur Nutzung der Roten Mauerbiene in Obstplantagen und Kleingärten. Bienenhotel.de, Rostock, 26 pp. URL: [http://www.bienenhotel.de/Handbuch\\_der\\_Mauerbienenzucht.pdf](http://www.bienenhotel.de/Handbuch_der_Mauerbienenzucht.pdf)
41. Ptáček V. (1989) Hnízdní pásy pro šedostřku tolicovou (*Rhophitoides canus* Ev., Hymenoptera, Apoidea) v semenářství vojtěšky. *Sbor. věd. prací OSEVA, VŠÚP Troubsko* 11: 261–273.
42. Přidal A. (2009) Opylování semenných porostů vojtěšky seté (*Medicago sativa*) samotářskou včelou šedostřkou tolicovou (*Rhophitoides canus*). *Bio* 13(10): 20–20.



- 43.EK (2013) Prováděcí nařízení Komise (EU) č. 485/2013 ze dne 24. května 2013, kterým se mění prováděcí nařízení (EU) č. 540/2011, pokud jde o podmínky schválení účinných látek klothianidin, thiamethoxam a imidakloprid, a kterým se zakazuje použití a prodej osiva ošetřeného přípravky na ochranu rostlin obsahujícími uvedené účinné látky. Úř. věst. E. U. L 139: 12–26, 25. 5. 2013. URL: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?qid=1484755697880&uri=CELEX:32013R0485>
- 44.EK (2018) Prováděcí nařízení Komise (EU) 2018/783 ze dne 29. května 2018, kterým se mění prováděcí nařízení (EU) č. 540/2011, pokud jde o podmínky schválení účinné látky imidakloprid. Úř. věst. E. U. L 139: 31–34, 30. 5. 2018. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX%3A32018R0783>
- 45.EK (2018) Prováděcí nařízení Komise (EU) 2018/784 ze dne 29. května 2018, kterým se mění prováděcí nařízení (EU) č. 540/2011, pokud jde o podmínky schválení účinné látky klothianidin. Úř. věst. E. U. L 132: 35–39, 30. 5. 2018. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX%3A32018R0784>
- 46.EK (2018) Prováděcí nařízení Komise (EU) 2018/785 ze dne 29. května 2018, kterým se mění prováděcí nařízení (EU) č. 540/2011, pokud jde o podmínky schválení účinné látky thiamethoxam. Úř. věst. E. U. L 132: 40–44, 30. 5. 2018. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX%3A32018R0785>
- 47.EK (2020) Prováděcí Nařízení Komise (EU) 2020/23 ze dne 13. ledna 2020, kterým se v souladu s nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009 o uvádění přípravků na ochranu rostlin na trh neobnovuje schválení účinné látky thiacloprid a kterým se mění příloha prováděcího nařízení Komise (EU) č. 540/2011. Úř. věst. E. U. L 8: 8–11, 14. 1. 2020. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX:32020R0023>
- 48.European Food Safety Authority (EFSA), Abdourahime H., Anastassiadou M., Arena M., Auteri D., Barmaz S., Brancato A., Brocca D., Bura L., Carrasco Cabrera L., Chiusolo A., Civitella C., Court Marques D., Crivellente F., Ctverackova L., De Lentdecker C., Egsmose M., Fait G., Ferreira L., Gatto V., Greco L., Ippolito A., Istace F., Jarrah S., Kardassi D., Leuschner R., Lostia A., Lythgo C., Magrans J. O., Medina P., Messinetti S., Mineo D., Miron I., Nave S., Molnar T., Padovani L., Morte J. M. P., Pedersen R., Raczky M., Reich H., Ruocco S., Saari K. E., Sacchi A., Santos M., Serafimova R., Sharp R., Stanek A., Streissl F., Sturma J., Szentes C., Tarazona J., Terron A., Theobald A., Vagenende B., Vainovska P., Van Dijk J., Verani A., Villamar-Bouza L. (2019) Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance thiacloprid. EFSA J. 17: e5595.
- 49.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. Úř. věst. E. U. L 20: 7–10, 25. 1. 2018. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX%3A32018R0113>
- 50.Seifrtova M., Halesova T., Sulcova K., Riddellova K., Erban T. (2017) Distributions of imidacloprid, imidacloprid-olefin and imidacloprid-urea in green plant tissues and roots of rapeseed (*Brassica napus*) from artificially contaminated potting soil. Pest Manag. Sci. 73: 1010–1016.
- 51.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.
- 52.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- $\beta$  signaling pathways. Sci. Rep. 9: 9400.
- 53.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. Mol. Cell. Proteomics 13: 2513–2526.



54. Tyanova S., Temu T., Sinitcyn P., Carlson A., Hein M. Y., Geiger T., Mann M., Cox J. (2016) The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat. Methods* 13: 731–740.
55. O'Leary N. A., Wright M. W., Brister J. R., Ciuffo S., Haddad D., McVeigh R., Rajput B., Robbertse B., Smith-White B., Ako-Adjei D., Astashyn A., Badretdin A., Bao Y., Blinkova O., Brover V., Chetvernin V., Choi J., Cox E., Ermolaeva O., Farrell C. M., Goldfarb T., Gupta T., Haft D., Hatcher E., Hlavina W., Joardar V. S., Kodali V. K., Li W., Maglott D., Masterson P., McGarvey K. M., Murphy M. R., O'Neill K., Pujar S., Rangwala S. H., Rausch D., Riddick L. D., Schoch C., Shkeda A., Storz S. S., Sun H., Thibaud-Nissen F., Tolstoy I., Tully R. E., Vatsan A. R., Wallin C., Webb D., Wu W., Landrum M. J., Kimchi A., Tatusova T., DiCuccio M., Kitts P., Murphy T. D., Pruitt K. D. (2016) Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res.* 44: D733–D745.
56. Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403–410.
57. Szklarczyk D., Gable A. L., Lyon D., Junge A., Wyder S., Huerta-Cepas J., Simonovic M., Doncheva N. T., Morris J. H., Bork P., Jensen L. J., von Mering C. (2019) STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* 47: D607–D613.
58. European Food Safety Authority (EFSA) (2016) Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance acetamiprid. *EFSA J.* 14: e04610.
59. Lunn D. () Acetamiprid (246). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, pp. 27–133. URL: [https://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests\\_Pesticides/JMPR/Evaluation11/Acetamiprid.pdf](https://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation11/Acetamiprid.pdf)

T A  
Č R

Tomáš Erban a kol. – Subletální vliv pesticidů na samotářské včely



T A  
Č R

Technologická  
agentura  
České republiky



ISBN 978-80-7427-368-1