

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

KATEDRA EKOLOGIE



Imunitní systém invazního slunéčka *Harmonia axyridis*

Immune system in invasive ladybird *Harmonia axyridis*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Diplomant: Bc. Michal Řeřicha

Vedoucí práce: Ing. Michal Knapp, Ph. D.

2017

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Michal Řeřicha

Ochrana přírody

Název práce

Imunitní systém invazního sluněčka *Harmonia axyridis*

Název anglicky

Immune system in invasive ladybird *Harmonia axyridis*

Cíle práce

Cílem práce bude sepsat literární rešerši na téma fungování imunitního systému hmyzu, včetně části úzce zaměřené na imunitní systém sluněček (Coleoptera: Coccinellidae), zejména invazního druhu *Harmonia axyridis*. Součástí diplomové práce bude i metodologický výzkum porovnávající dvě metody sběru vzorků hemolymfy ze sluněček, experimentální výzkum vývoje imunitního systému sluněčka *Harmonia axyridis* během ontogeneze a výzkum vlivu teploty během stádia kukly na imunitní systém dospělců druhu *Harmonia axyridis*.

Metodika

Literární rešerše v českém jazyce o rozsahu cca 10 stran bude vypracována s pomocí vědecké literatury nalezené v databázi Web of Knowledge. Metodologický experiment bude porovnávat vlastnosti hemolymfy odebrané ze sluněček během reflexního krvácení s vlastnostmi hemolymfy odebrané metodou punkce (vpich do těla sluněčka). Během laboratorního experimentu zkoumajícího ontogenezi imunitního systému budou za standardizovaných podmínek chována sluněčka *Harmonia axyridis* od vajíček až po stárnoucí dospělce. Jednotlivým vývojovým stádiím (2. larvální instar, 3. instar, 4. instar, prepupa, čerstvý dospělec, 4 dny starý dospělec, 8 dní starý, 16 dní starý a 32 dní starý dospělec) bude odebrána hemolymfa. Z odebrané hemolymfy bude analyzována koncentrace hemocytů, obsah bílkovin a antimikrobiální aktivita hemolymfy. Při experimentu zkoumajícím vliv teploty během stádia kukly na imunitní systém dospělců budou laboratorně chovány larvy sluněčka *Harmonia axyridis* v teplotě 26°C a na stádium kukly budou jedinci přemístěni do teploty 17°C, 26°C nebo 35°C. Následně bude u 24h starých dospělců a u 7 dní starých dospělců spočítána koncentrace hemocytů v hemolymfě. Přílohou diplomové práce bude i anglicky psaný manuskript vědeckého článku pojednávající o ontogenezi imunitního systému sluněčka *Harmonia axyridis*.

Doporučený rozsah práce

cca 50 stran + přílohy

Klíčová slova

Antibakteriální aktivita, *Harmonia axyridis*, hemocyty, imunitní systém, larvální růst, odběr hemolymfy, ontogeneze, reflexní krvácení, stárnutí, teplota

Doporučené zdroje informací

- Firlej A et al., 2012: Immune Response of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) Supports the Enemy Release Hypothesis in North America. *ANNALS OF THE ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA* 105: 328-338.
- Gross J et al., 2010: A Well Protected Intruder: The Effective Antimicrobial Defense of the Invasive Ladybird *Harmonia axyridis*. *JOURNAL OF CHEMICAL ECOLOGY* 36: 1180-1188.
- Roehrich Ch et al., 2012: Harmonine, a defence compound from the harlequin ladybird, inhibits mycobacterial growth and demonstrates multi-stage antimalarial. *BIOLOGY LETTERS* 8: 308-311.
- Schmidtberg H et al., 2013: A switch from constitutive chemical defence to inducible innate immune responses in the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *BIOLOGY LETTERS* 9: art. no. 20130006.
- Vilcinskas A, Mukherjee K, Vogel H, 2013: Expansion of the antimicrobial peptide repertoire in the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *PROCEEDINGS OF THE ROYAL SOCIETY B-BIOLOGICAL SCIENCES* 280: art. no. 20122113.
-

Předběžný termín obhajoby

2016/17 LS – FŽP

Vedoucí práce

Ing. Michal Knapp, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra ekologie

Konzultant

Pavel Dobeš (PřF MU, Brno)

Elektronicky schváleno dne 21. 2. 2017

Ing. Jiří Vojar, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 23. 2. 2017

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Děkan

V Praze dne 08. 04. 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně, pod vedením Ing. Michala Knappa, Ph.D., a konzultováním s Mgr. Pavlem Dobešem, Ph.D., a že jsem uvedl všechny literární prameny a publikace, ze kterých jsem čerpal.

V Praze dne 18. 4. 2017

.....

Poděkování

Rád bych poděkoval rodině a přítelkyni za jejich podporu, trpělivost a povzbuzování během celého studia. Kamarádům děkuji za krásné vzpomínky na celé studium. Dále děkuji Mgr. Pavlu Dobešovi, Ph.D., za pomoc při odborných konzultacích a za poskytnuté zázemí v Brně během provádění části experimentální práce. V neposlední řadě bych chtěl také poděkovat svému školiteli práce Ing. Michalu Knappovi, Ph.D., za jeho velkou ochotu, vždy vstřícný a pozitivní přístup.

V Praze dne 18. 4. 2017

.....

Abstrakt

Slunéčko východní, *Harmonia axyridis*, je považováno za velmi úspěšný invazní druh hmyzu. Úspěšnost invaze zřejmě souvisí s vlastnostmi druhu, jako jsou výkonný imunitní systém či výborně fungující chemická obrana. Přes výrazný recentní boom studií zaměřených na výzkum biologie tohoto druhu je jeho imunitní systém oblastí probádanou jen částečně a dává významný prostor pro další bádání. Tento fakt byl hlavním impulzem k vytvoření diplomové práce zabývající se imunitním systémem vybraných druhů slunéček s důrazem na *H. axyridis*. V práci jsou představeny tři odlišné studie shrnující moje několikaleté experimentování se slunéčky.

První experiment se zabýval porovnáním koncentrace hemocytů, bílkovin a antimikrobiální aktivitou hemolymfy pocházející z tělní dutiny a z reflexního krvácení u *H. axyridis* a dvou původních druhů našich slunéček. Reflexní krvácení je způsob chemické obrany hmyzu, kdy páchnoucí a toxická hemolymfa je dobrovolně vykrváčena na predátora. Výsledky experimentu ukazují, že měřené imunitní parametry se neliší mezi vzorky odebranými různými metodami. Odběr vzorků z reflexního krvácení je tak přirozenou alternativou ke standardním metodám způsobujícím nepřirozená zranění. Studie však ukazuje i zajímavé mezidruhové rozdíly, například invazní slunéčko *H. axyridis* má významně vyšší koncentraci volně cirkulujících hemocytů než naše původní *Ceratomegilla undecimnotata* a *Coccinella septempunctata*.

Další experiment se věnoval striktně vývoji vybraných fyziologických a imunitních parametrů během ontogeneze u *H. axyridis*. Byl zkoumán vliv ontogeneze na obsah hemocytů, bílkovin a antimikrobiální aktivitu hemolymfy od 2. larválního instaru až po 32 dnů staré dospělce. Obecně lze říci, že průběh ontogeneze sledovaných imunitních a fyziologických parametrů *H. axyridis* se liší oproti doposud publikovaným datům pro hmyz. Bazální imunitní systém larev je méně výkonný než dospělců a počty hemocytů i antimikrobiální aktivita navíc výrazně rostou i v průběhu života dospělce. Získaná data také poukazují na možné metodické nedostatky srovnávacích studií, které porovnávají jedince různého či neznámého věku.

Poslední experimentální část navazuje na moji bakalářskou práci, která se věnovala vlivu teploty během stádia kukly na imunitní systém dospělců *H. axyridis*. V rámci třetího experimentu byl porovnáván vliv teploty během kukly na koncentraci hemocytů u čerstvých, jednodenních dospělců a i starších, týdenních dospělců. Nižší teplota během stádia kukly vedla k vyšší koncentraci hemocytů u čerstvých dospělců a tento trend nevymizel ani u starších dospělců. Samci navíc mají vyšší koncentraci hemocytů v hemolymfě než samice, což je patrné především u zvířat pocházejících z vyšší teploty.

Dle mých dosavadních výzkumů se zdá být *H. axyridis* velmi zajímavým druhem, který se vymyká mnoha obecným představám o fungování imunitního systému hmyzu. Další výzkum tak může přinést mnohá nečekaná překvapení.

Klíčová slova:

Antimikrobiální aktivita, *Harmonia axyridis*, hemocyty, imunitní systém, larvální růst, odběr hemolymfy, ontogeneze, reflexní krvácení, stárnutí, teplota

Abstract

Harlequin ladybird, *Harmonia axyridis*, is considered to be one of the most successful invasive insect species in the world. Its invasive success is among the other traits thought to be caused also by a powerful immune system and excellent chemical defence. Despite a marked recent boom of studies focused on biology of this species, its immune system is still partially unexplored and provides a significant topic for novel research. This thesis composes of three different experiments focused on immune system and physiology of *H. axyridis*.

In the first experiment I compared the concentration of hemocytes, antimicrobial activity and protein concentration in hemolymph between samples collected using two different sampling methods, reflex bleeding and puncture. The experiment was repeated for three different ladybird species (*Ceratomegilla undecimnotata*, *Coccinella septempunctata* and *Harmonia axyridis*). The reflex bleeding is a defence behaviour of insects, when the smelling and toxic hemolymph is voluntarily bled to a predator. The results show that the measured immune parameters do not differ between the sampling methods and reflex bleeding is thus a very good alternative method of hemolymph sampling to the standardly employed puncture. The advantage of reflex bleeding sampling is that it does not cause unnatural injuries to beetles. In addition, interesting interspecific differences in immune system between ladybird species were observed. For example, *H. axyridis* has a significantly higher concentration of circulating hemocytes than our native species *C. undecimnotata* and *C. septempunctata*.

In the second experiment I investigated the development of above mentioned physiological and immune parameters during ontogeny in *H. axyridis*, from 3rd larval instar to 32 days old adults. Protein concentration, concentration of circulating hemocytes as well as constitutive antimicrobial activity against *Escherichia coli* differed in the course of ontogeny. In general, patterns observed for *H. axyridis* contrasted to the results reported for other insects. Innate immune system of larvae is less efficient than in adults and also the concentration of hemocytes grow significantly during adulthood. Substantial variation in physiological and immune parameters during ontogeny has also important methodological implications, as individuals of exactly the same stage/age have to be employed for comparative studies.

In the last experiment I investigated effects of temperature (17 °C, 26 °C and 35 °C) experienced during pupal stage on hemocyte concentration in adult harlequin ladybirds. Effects of pupal temperature on adults of different age, either 1 day old or 7 days old, were measured. Concentration of circulating hemocytes steeply decreased with increasing pupal temperature in fresh (1 day old) as well as older (7 days old) adults. Males had higher concentration of hemocytes in the hemolymph than females and this pattern emerged especially for beetles that experienced higher pupal temperature.

The immune system of the harlequin ladybird, *H. axyridis*, seems to differ from other insect species and further research could bring many unexpected, exciting and novel findings.

Keywords:

Aging, antimicrobial activity, haemolymph, *Harmonia axyridis*, immune system, larval growth, ontogeny, reflex bleeding, sampling technique, temperature

Obsah

1. Úvod	9
1.1 Imunitní systém a jeho důležitost pro organismy	9
1.2 Imunitní systém hmyzu	9
1.2.1 Úvod do imunitního systému hmyzu a důležitost hemolymfy	9
1.2.2 Imunitní schopnosti hmyzu.....	10
1.2.3 Reakce humorálního typu	11
1.2.4 Koagulační kaskáda jako hranice mezi buněčnou a humorální imunitou .	12
1.2.5 Reakce buněčného typu a možné druhy hemocytů.....	13
1.3 Imunitní systém a chemická obrana brouků čeledi slunéčkovití (Coccinellidae) s důrazem na invazní druh <i>Harmonia axyridis</i> (Pallas, 1773)	15
1.3.1 Biologie a ekologie studovaného druhu <i>Harmonia axyridis</i>	15
1.3.2 Současné poznatky o imunitním systému čeledi Coccinellidae	17
1.3.3 Reflexní krvácení jako chemická obrana čeledi Coccinellidae před predací.....	19
2. Cíle práce	20
3. Experimentální část	21
3.1 Porovnání dvou odlišných metod odběru hemolymfy z těl slunéček <i>Harmonia axyridis</i> , <i>Ceratomegilla undecimnotata</i> a <i>Coccinella septempunctata</i>	21
3.1.1 Uvedení do problematiky.....	21
3.1.2 Metodika - chov jedinců a odběr hemolymfy	22
3.1.3 Metodika - měření vybraných fyziologických a imunitních parametrů	23
3.1.4 Metodika - analýza dat.....	24
3.1.5 Výsledky	25
3.1.6 Diskuze	27
3.2 Měření vybraných imunitních parametrů během ontogenetického vývoje slunéčka <i>Harmonia axyridis</i>	30
3.2.1 Uvedení do problematiky.....	30
3.2.2 Metodika - chov jedinců a odběr hemolymfy	30
3.2.3 Metodika - měření vybraných fyziologických a imunitních parametrů	32
3.2.4 Metodika - analýza dat.....	33
3.2.5 Výsledky	34
3.2.6 Diskuze	36

3.3 Vliv teploty během stádia kukly na koncentraci cirkulujících hemocytů u 24 hodin a jeden týden starých dospělců <i>Harmonia axyridis</i>	39
3.3.1 Uvedení do problematiky.....	39
3.3.2 Metodika - chov jedinců	40
3.3.3 Metodika - odběr hemolymfy a zjištění koncentrace hemocytů.....	42
3.3.4 Metodika - analýza dat.....	42
3.3.5 Výsledky	43
3.3.6 Diskuze	44
4. Závěr	46
5. Přehled literatury a použitých zdrojů	47
6. Přílohy	57

1. Úvod

1.1 Imunitní systém a jeho důležitost pro organismy

Správné fungování imunitního systému je jeden ze základních předpokladů pro přežití organismů. Proto se během fylogeneze vytvořil imunitní systém téměř u všech organismů na Zemi. Původně se zřejmě jednalo pouze o mechanismus jakéhosi strážce chemické jedinečnosti každého druhu a jedince. Nejlépe lze přiblížit původ imunitního systému u bakterií a plísní, kde se vyskytuje obranný mechanismus zajišťující jistou výhodu v přežívání. Vylučují totiž do svého okolí látky, které jsou jedovaté pro jiné druhy bakterií, obvykle tím, že brání růstu jiných kolonií nebo rovnou zabrání rozmnožování v jejich životním prostředí (Ferenčík 2005).

Imunitní systém mnohobuněčných organismů je dnes mnohem složitější, jedná se o síť specializovaných molekul, buněk či tkání, kde je důležité vzájemné propojení jednotlivých struktur. Úplný imunitní systém, který realizuje schopnost rozpoznat vlastní biochemickou strukturu od cizí pomocí specializovaných molekul, se objevil již u nejprimitivnějších mnohobuněčných bezobratlých, jako jsou láčkovci či nálevníci (Ferenčík 2005). Mezi prioritní úkoly imunitního systému patří ochrana organismu před patogeny, které mohou tělu škodit, a dále odstraňování vlastních poškozených nebo abnormálních buněk. Pro efektivní fungování imunitního systému organismu je důležitý správný výběr způsobu obrany vůči danému druhu patogenu, aby nedošlo k selhání obrany či sebepoškození organismu (Hořejší 2013).

1.2 Imunitní systém hmyzu

1.2.1 Úvod do imunitního systému hmyzu a důležitost hemolymfy

Správné fungování imunitního systému je velmi důležité pro téměř veškeré organismy na Zemi a stejně tomu je i u hmyzu. Z doposud popsanych organismů žijících na Zemi tvoří bezobratlí živočiši až 70 % (Turner 1994). Nejpočetnější třídou bezobratlých živočichů je hmyz. Odhady druhové diverzity celého kmene členovců se mezi autory liší. Novotný et. al (2002) odhadují diverzitu celého kmene na 5 milionů druhů. Popsaných druhů je okolo jednoho milionu (Grimaldi et Engel 2005). Z těchto údajů je patrné, že pokud si hmyz zachoval do současnosti vysokou diverzitu a v mnoha biotopech tvoří většinu živočišné biomasy, měl by mít také kvalitně fungující imunitní systém.

Imunitní systém hmyzu je relativně rozdílný oproti imunitnímu systému obratlovců, ovšem ani v tomto případě se nejedná o jednoduchý systém (Kodrík 2004, Agaisse 2007). Pro funkčnost imunitního systému hmyzu je důležitý správně fungující oběhový systém a v něm obsažené tělní tekutiny.

Krvomíza, odborněji označována jako hemolymfa, je tělní tekutina hmyzu obsahující organické i anorganické látky a bývá velmi často pigmentována, nejčastěji do nažloutlé, zelenavé až hnědé barvy. Je zajímavé, že například obsah aminokyselin a peptidů v hemolymfě je obvykle vyšší u hmyzu než u obratlovců (Chapman 2013). Bílkoviny tvoří kolem 6 % z celkového objemu a jednou z jejich důležitých funkcí je

i účast na imunitních reakcích. Mezi imunitní proteiny lze řadit například fenoloxidázu a nespočet antimikrobiálních peptidů (Kodrík 2004). Dále se z imunitního hlediska v hemolymfě nacházejí krevní buňky zvané hemocyty (Kodrík 2004, Chapman 2013). Hemolymfa obsahuje často také steroidy, hormony a například u brouků z čeledi slunéčkovití jsou v hemolymfě časté i alkaloidy, které se podílejí na chemické obraně slunéček proti predátorům (Hodek et al. 2012). Další vlastností hemolymfy, která s imunitou velmi úzce souvisí, je schopnost srážení se (koagulace). Při poškození těla vlivem vnějšího činitele, totiž vzniká melaninová zátka, na kterou se později nabalují krevní buňky a dochází díky tomu k zástavě krvácení (Kodrík 2004).

1.2.2 Imunitní schopnosti hmyzu

Hmyz využívá především vrozenou část imunity, někdy je tato část imunity označována jako nespecifická. Předpokládá se, že se jedná o evolučně starší část imunitního systému a pravděpodobně proto také odpovídá po každém setkání s „antigenem“ stejnými mechanismy. Imunita získaná během života, neboli specifická, je fylogeneticky mladší část imunity a s určitostí se vyskytuje u obratlovců. Její existence u hmyzu je v současné době předmětem experimentálního zkoumání (Agaisse 2007, Hořejší 2013). Příkladem takové studie může být experiment s octomilkou obecnou (*Drosophila melanogaster* Meigen, 1830, Pham et al. 2007). Tato studie dokazuje určité „zapamatování si“ patogenu a může se proto jednat o jistou podobu získané imunity (Pham et al. 2007). Další příklad specifické imunitní reakce byl zjištěn u švába amerického (*Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758), Turner 1994). Do těla švábů byly nejprve aplikovány rozpuštěné proteinové toxiny v subletální koncentraci, což následně zvýšilo odolnost vůči aplikovanému toxinu (Turner 1994). Imunitní systém si zároveň udržuje určitou aktivitu neustále, ale existuje řada studií dokazující zvýšení účinnosti různých složek imunitního systému po napadení patogenem. Humorální komponenty obvykle zvyšují svou koncentraci stejně tak dochází k diferenciaci specifických typů hemocytů a jejich uvolnění do oběhu (Turner 1994, Gupta 2001, Ponnuel et Yamakawa 2002, Crozatier et al. 2004).

Prvním mechanismem chránícím před vniknutím choroboplodného zárodku do těla hmyzu je kutikula. Její pevnost je zajištěna především procesy melanizace a sklerotizace. Dalšími fyzikálními bariérami jsou epitel středního střeva a peritrofická membrána. Lze tedy říct, že se tyto procesy také nepřímo podílejí na správném fungování imunitního systému (Siva - Joty et al. 2005, Dobeš 2009). Za předpokladu, že patogen překoná vnější mechanismy, přichází na řadu spouštění vnitřních reakcí imunitního systému (Ferrandon et al. 2007). Vrozený imunitní systém se často v literatuře rozděluje do dvou základních typů reakcí, na tzv. buněčné a humorální. Je důležité zmínit, že neexistuje žádné jednoznačné a přesné oddělení obou složek. Humorální látky totiž zajišťují i kontrolu nad buněčným systémem a hemocyty zase společně s humorální složkou zajišťují například správnou koagulační činnost. Koagulační kaskáda proto leží na hranici mezi buněčnou a humorální imunitou (Theopold et al. 2004, Feldhaar et Gross 2008).

1.2.3 Reakce humorálního typu

Jedná se především o reakce zprostředkované látkami typu aglutininů, antimikrobiálních peptidů, lysinů či složek fenoloxidázové kaskády (Turner 1994).

Aglutiny, někdy známé pod obecnějším označením jako lektiny, pro svou schopnost vázat se na uhlovodíkové struktury cizorodých částic mají hlavní schopnost aglutinovat neboli shlukovat cizorodé částice či buňky. Nacházejí se nejen u živočichů, ale jsou dále u rostlin, hub a dokonce i u některých mikroorganismů. Jejich výskyt je přímo v hemolymfě nebo v podobě molekul vázaných na povrch buněk. Syntéza probíhá především pomocí hemocytů, coelomových buněk a tukového tělesa (Turner 1994, Gupta 2001). Funkce těchto látek je velmi různorodá, například zajišťují vzájemné interakce mezi samotnými buňkami či mezi buňkami a mezibuněčnou hmotou, jedná se o tzv. povrchové receptory buněk. Jsou důležité také u indukované imunity, v konečných fázích jsou totiž důležité při hojení poškozených tkání. Dále jsou aktivátory koagulace hemocytů a profenoloxidázy (Turner 1994, Gross et al. 1999, Nappi et Ottaviani 2000, Gupta 2001).

Antimikrobiální peptidy (často označovány zkratkou AMP) vznikají syntézou především v tukovém tělese a částečně také v buňkách kutikulární vrstvy, hemocytech nebo trávicí soustavě. Tato část humorální imunity se vyskytuje téměř u všech organismů a v menší míře také u rostlin (Vilmos et Kurucz 1998, Šíma et Trebichavský 2001, Feldhaar et Gross 2008). Antimikrobiální peptidy zaručují účinnou bariéru proti infekcím patogeny, od virů přes bakterie až po houby, především díky své schopnosti ničení buněčné membrány patogenu (Šíma et Trebichavský 2001). Dělení antimikrobiálních peptidů není v literatuře jednotné, nicméně za zmínku stojí rozdělení těchto nízkomolekulárních látek právě podle působení na cílové patogeny. Dle Li et al. (2012) jsou antimikrobiální peptidy děleny podle funkčnosti proti: grampozitivním bakteriím, gramnegativním bakteriím, houbám, virům a nekontrolovaně se dělícím buňkám. Podle strukturální a sekvenční podobnosti byly rozděleny antimikrobiální peptidy do skupin, podskupin a peptidových rodin. Do skupin se řadí cyklické a lineární antimikrobiální peptidy. Cyklické lze dále členit na cystein-rich peptidy z nich nejznámější jsou defenziny, lineární antimikrobiální peptidy jsou dále zde zjednodušeně rozděleny na prolin-rich peptidy a glycin-rich peptidy (Andreu et Rivas 1998).

Lysiny jsou molekuly se schopností rozkládat buněčnou stěnu (lyzovat buňky). Jejich úkol v humorální imunitě je především antimikrobiální působení a cytotoxicita. Nejznámějším zástupcem lysinů je enzym lysozym. I přesto, že slouží často jako trávicí enzym, má mnoho společného s antimikrobiálními peptidy. Byla zjištěna jeho antimikrobiální aktivita proti grampozitivním bakteriím, buňkám hub a některým zástupcům gramnegativních druhů bakterií, především v součinnosti s jinými antibakteriálními peptidy (Turner 1994, Dobeš 2007).

Fenoloxidázová kaskáda, důležitá část humorální imunity se skládá ze tří funkčních celků. Nejprve nastupuje tzv. profenoloxidázu aktivující systém. Ten zahrnuje proteiny detekující cizorodé částice a serinové proteázy. Serinové proteázy

slouží k přenosu signálu pro pozdější aktivaci profenoloxidázy. Hlavní část kaskády tvoří samotný enzym fenoloxidázy a jeho zatím neaktivní prekurzor, který je syntetizován určitými druhy hemocytů. Po dokončení syntézy profenoloxidázy může být dále prekurzor upravován a shromažďován kolem místa poranění, enkapsulovaných parazitů nebo transportován do kutikuly (Asano et Ashida 2001, Dobeš 2009). V poslední fázi již aktivovaná fenoloxidáza katalyzuje počáteční kroky fenoloxidázové kaskády. Základem této fáze je přeměna chemických látek, při které vzniká celá řada funkčně důležitých meziproductů a hlavní koncový produkt melanin (Dobeš 2009). Tento barevný pigment je hnědě zbarvený a nerozpustný. Jeho důležitost spočívá v hojení zranění, izolaci rány od patogenů a ochrany před škodlivým UV zářením. Melanin se ukládá v různých částech těla během jejich pigmentace (Sugumaran 2002). Fenoloxidáza také podporuje celou řadu buněčných imunitních odpovědí (Gupta 2001).

V recentních studiích se stále častěji objevují experimenty potvrzující také tzv. „Complement-like molecules“. Původně se předpokládalo, že komplementový systém je typický pouze pro obratlovce. U nich se jedná o formu nespecifické imunitní odpovědi, kde se kaskádovou reakcí přeměňují bílkoviny z neaktivní formy do podoby enzymů, které pak působí na další složky kaskády a postupně je cílem likvidace nežádoucích látek či buněk v těle. U hmyzu byly podobné komplementy detekovány, například u *Drosophila melanogaster*, švába smrtihlava (*Blaberus craniifer* Burmeister, 1838) nebo zavíječe voskového (*Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758), Gupta 2001, Jiravanichpaisal et al. 2006).

1.2.4 Koagulační kaskáda jako hranice mezi buněčnou a humorální imunitou

Jelikož hmyz má otevřenou cévní soustavu, předpokládá se, že musí mít velmi účinný mechanismus utěšňující poranění (schopnost kolagulace). Proces by měl být skutečně rychlý, aby nedocházelo k nadměrné ztrátě hemolymfy. Dokonce se zdá být tento systém propracovanější než u obratlovců. Využívá totiž většího množství tzv. příležitostných proteinů, které jsou za určitých okolností schopné plnit i imunitní funkci. Koagulačního procesu se samozřejmě účastní jak celé hemocyty, konkrétně se jedná o plasmacyty, tak i řada humorálních faktorů. K správné koagulační činnosti je důležité zejména propojení s fenoloxidázovou kaskádou. Enzym fenoloxidázy totiž napomáhá k zasítování bílkovin, eliminuje patogeny a při pozdější melanizaci se podílí na vytváření koagulační zátky. Koagulát je pak schopný zabránit dalšímu šíření potenciálních patogenů. Zajímavé také je, že se vyskytují rozdíly ve srážlivosti hemolymfy mezi jednotlivými zástupci kmene členovců (Kanost et al. 2004, Theopold et al. 2004). Lze tedy předpokládat rozdíly i mezi konkrétními druhy hmyzu, hlavně díky vysoké variabilitě v ekologii jednotlivých druhů.

1.2.5 Reakce buněčného typu a možné druhy hemocytů

Reakce buněčného typu jsou zajišťovány především pomocí imunitních buněk neboli hemocytů (Chapman 2013). Mezi tyto reakce patří mikroagregace často přecházející až v pozdější nodulaci, enkapsulace a fagocytóza.

Mikroagregace je proces, při kterém dochází ke shlukování hemocytů o přibližně deseti až dvaceti buňkách kolem malé částice, která vnikla do těla organismu. Po této počáteční agregaci zpravidla počet shluknutých hemocytů ještě roste a kolem cizorodého předmětu dochází ke tvorbě nodule (Stanley et Miller 2006). Patogeny, často to bývají drobnější bakterie při početnějších invazích, jsou postupně pokryty koagulátem a granulocyty s podporou plasmacytů či lamelocytů (Schmidt et al. 2001). Po adhezy granulocytů na povrch patogenu vzniká konečná nodule. Nodulace je zakončena nekrotizací granulocytů a melanizací celého útvaru. Bakterie v noduli pravděpodobně hynou vlivem fyziologického stresu, příčinou může být nedostatek živin a kyslíku (Turner 1994, Lavine et Strand 2002, Kodrík 2004).

Enkapsulace je reakce označující proces zapouzdření. Od nodulace ji odlišuje především velikost zneškodňovaných částic. Vyskytuje se totiž v případech napadení velkými objekty. Mohou to být například parazitoidi, prvoci nebo hlístice (Schmidt et al. 2001, Browne et al. 2013). Po vniknutí cizorodého objektu dochází k jeho obklopení vrstvami hemocytů. Mezi konkrétní druhy hemocytů přisedající kolem cizorodé částice patří plasmacyty a granulocyty. Pokud dojde k dostatečnému obklopení celé částice, uplatňuje se dále fenoloxidáza po jejímž působení jsou agregované hemocyty nekrotizovány a melanizovány. Následuje zničení vniknutého objektu. Obvykle celý proces trvá jeden až několik dní. Zajímavostí je, že enkapsulaci lze zatím nalézt pouze u bezobratlých (Schmidt et al. 2001, Jiravanichpaisal et al. 2006, Williams 2007).

Fagocytóza je nejstarší imunitní reakce. Původně mohly organismy díky této reakci přijímat potravu. Během evoluce však byla tato funkce u řady druhů nahrazena extracelulárním trávením a dnes je fagocytóza využívána hlavně během imunitních reakcí. Důkaz tohoto evolučního pokroku dokládají bakterie a prvoci, kteří stále využívají fagocytózu jako způsob příjmu potravy (Kodrík 2004, Ferenčík 2005). Z pohledu imunity hmyzu je fagocytóza proces, který pohlcuje poměrně malé cizorodé biotické i abiotické objekty. Mezi biotické objekty lze řadit drobné bakterie, spory hub, prvoky, kvasinky či apoptická tělíska. Fagocytóza je také důležitá během metamorfózy, kdy díky této reakci dochází k likvidaci zbytků nepotřebných tkání (Yokoo et al. 1995, Lavine et Strand 2002, Kodrík 2004). Druhy hemocytů, které se účastní fagocytózy lze označit jako fagocytární. Tyto druhy se mohou lišit napříč taxonomickými skupinami (Anggraeni et Ratcliffe 1991). Mezi nejrozšířenější fagocytární druh patří plasmacyty (Kodrík 2004). Browne et al. (2013) popisují ve své studii podrobněji celou fagocytózu. Jedná se o stupňovitý proces, se zapojením také humorálních faktorů. Na konci procesu dochází k respiračnímu vzplanutí a tím k degradaci či usmrcení patogenu.

Imunitní buňky vznikají různorodou cestou. Z embryotického mezodermu během procesu embryogeneze vznikají primární hemocyty. Další, druhotná produkce je během larválního vývoje či v kukle. Druhotné hemocyty vznikají v tzv. hemopoetických orgánech, kde z původních prohemocytů vznikají specifitější druhy (Chapman 2013). Z funkčního hlediska mají hemocyty zásadní význam při zachování homeostázy těla, část z nich totiž neustále cirkuluje v hemolymfě a zajišťuje stav pro její udržení. Při narušení vnitřní rovnováhy jedince dochází ke zvýšení aktivity, diferencují se specifitější formy a je snaha o zneškodnění patogenu. Na základě intenzity imunitní výzvy je pak možné odhadnout významnost vlivu abiotických či biotických faktorů (Turner 1994, Pandey et Tiwari 2012). Hemocyty lze kvantifikovat jako počet buněk na jednotku objemu hemolymfy. Po přepočtu lze vyjádřit jejich absolutní počet, neboli tzv. „Total hemocytes count“ (THC). Dále lze určit diferenciální počet hemocytů neboli „Differential hemocytes count (DHC; čili relativní zastoupení jednotlivých druhů hemocytů) či množství aktivních metabolitů (Szymas et Jedruszuk 2003). Celkový počet cirkulujících hemocytů se může měnit, závisí totiž na vývojovém stádiu jedince, faktorech ovlivňující fyziologickou kondici jedince a řada hemocytů je také ve stavu homeostázy pouze přisedlá na epitelové tkáni a uvolňovány do oběhu jsou až po imunitní výzvě. Je důležité si také uvědomit, že mezi druhy hmyzu se může lišit podíl vody v hemolymfě. To může být také příčinou velká variability v koncentraci hemocytů v hemolymfě různých druhů hmyzu (Kodrík 2004, Chapman 2013).

Druhy hemocytů jsou tvarově velmi proměnlivé, ale všechny mají buněčné jádro. Lze je rozdělit podle funkční, morfologické a antigenních charakteristik (Kerkut et Gilbert 1985). Zejména u starších publikací však panují značné nepřesnosti v systematice (Jones 1962, Lackie 1988, Lavine et Strand 2002, Ribeiro et Brehelin 2006). Původní snahy přiřadit názvy hemocytů podle jejich morfologie totiž nebyly vhodné. Efektivnější metodou je rozřazení hemocytů podle jejich hlavní funkce (Turner 1994). Gupta (2009) vylisuje 7 základních druhů hemocytů. Jsou to: prohemocyty, plasmacyty, granulocyty, sferulocyty, adipocyty, oenocyty a koagulocyty.

Prohemocyty jsou základním stavebním kamenem pro ostatní typy hemocytů, někdy dokonce vytvářejí ještě specifické lamelocyty, přispívající k enkapsulaci během napadení těla hostitelem nebo se účastní metamorfózy (Lanot et al. 2001). Jejich tvar je proměnlivý od kulovitě až po eliptický, jsou relativně malé s výrazným jádrem. Většina jich je uložena nediferencovaných v hemopoetických orgánech. Diferencované mají důležitou roli ve vnitřní obraně, která zahrnuje fagocytózu, hojení poranění a reakce srážení hemolymfy. Nepřeměněné prohemocyty však nejsou schopné fagocytózy (Turner 1994, Lanot et al. 2001, Kodrík 2004, Gupta 2009).

Plasmacyty jsou nejběžnějšími cirkulujícím druhem. Mají velmi variabilní tvar i velikost, jádro je kulaté až prodloužené, většinou ve středu. U některých druhů hmyzu mohou plasmacyty tvořit až 95 % ze všech hemocytů. Jejich hlavní funkce jsou enkapsulace a fagocytóza. (Nelson et al. 1994, Kodrík 2004).

Granulocyty jsou dalším, častěji zastoupeným druhem v tělní tekutině. Opět mají proměnlivý tvar, jsou oválné až sférické. V porovnání s plasmatomy je jádro menší, kulaté nebo podlouhlé, umístěno ve středu (Kodřík 2004, Gupta 2009). Jsou důležité hlavně při koagulační činnosti a tvorbě nodulí. Dle jejich názvu obsahují v cytoplazmě mnoho membránově vázaných granulí. U těchto granulí dochází k povrchové výměně, což může souviset s obranou funkcí organismu (Kodřík 2004, Strand et al. 2006).

Spherulární buňky neboli sferulocyty nejsou běžným druhem hemocytů. Jedná se o buňky kulatého až vejcovitého tvaru s proměnlivou velikostí. Jádro je většinou umístěné centrálně a je bohaté na chromatinová tělíska. Význam sferulocytů není zatím odhalen. Obsahují však velké množství spherulí (neboli tzv. kulovitých výplní buňky), které někdy vyplňují celou buňku (Kodřík 2004).

Adipocyty neboli tukové buňky, jsou opět velikostí proměnlivé kulovité nebo oválné buňky. Jádro je relativně malé, kulaté až protáhlé s umístěním často mimo středovou osu (Kodřík 2004).

Oenocyty jsou poměrně velké, tvarem protáhlé až sférické buňky. Je u nich zatím největší zkoumaná variabilita ve velikosti. Jádro je menší, často excentrické. Nacházejí se v tělní dutině, tukovém pouzdře a v epidermis. Jsou pohyblivé a důležité při fenoloxidáze, produkují látky nutné pro tvorbu kutikuly, ekdysteroidy a u Chironomidae produkují hemoglobin (Kodřík 2004, Castillo 2006).

Koagulocyty jsou obecně také variabilní ve velikosti, tvarem často sférické. Je pro ně typická jejich křehkost a nestabilita. Jádro je oválné, malé a často excentricky umístěno (Gupta 2009). Jejich zásadní význam je popsán v předchozí podkapitole.

1. 3 Imunitní systém a chemická obrana brouků čeledi slunéčkovití (Coccinellidae) s důrazem na invazní druh *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773)

Slunéčka jsou na rozdíl od většiny jiného hmyzu oblíbená širokou veřejností, to i přes jejich všeobecně známý odporný zápach a jedovatost. Je proto až s podivem, že neexistuje zatím mnoho vědecké literatury věnující se aspoň fyziologii či přesněji imunitě těchto brouků. V následujících podkapitolách tak budou prezentovány zatím známé poznatky o chemické obraně a imunitě čeledi Coccinellidae s důrazem na *H. axyridis*, jejíž imunitní systém je zatím nejprobádanější a je jí také věnována největší pozornost v praktické části méj diplomové práce.

1. 3. 1 Biologie a ekologie studovaného druhu *Harmonia axyridis*

Na ekologii slunéček východních, *Harmonia axyridis*, lze výborně demonstrovat biologickou kontrolu, která se později vymkla kontrole a druh se tak stal invazním. Jedná se o druh původem z mírného až subtropického podnebného pásu východní Asie, se západní hranicí výskytu v Kazachstánu. V průběhu 20. století bylo slunéčko opakovaně introdukováno do USA a Evropy jako predátor mšic v sadech. *H. axyridis* ve srovnání s ostatními druhy slunéček vyniká svou vysokou žravostí mšic a vysokou fekunditou. V této etapě (70. - 80. léta 20. století) ještě

nedocházelo k šíření populací mimo sady (Nedvěd 2014). Formování první „divoké“ invazní populace proběhlo kolem roku 1988 v Louisianě, USA. V severní Americe tou dobou došlo ke zkřížení dvou geneticky odlišných poddruhů dovezených z geograficky oddělených původních areálů rozšíření a později došlo pravděpodobně i k jisté mutaci. Tyto události mohou být možným vysvětlením vzniku invaze *H. axyridis*. V období na přelomu tisíciletí postupovala invaze ze Spojených států amerických do Evropy. Mezi první země osídlení invazní formou v Evropě patřily Belgie a Nizozemsko. V České republice je doložený záznam o prvním výskytu z roku 2006, ale určitě se zde druh vyskytoval již dříve. V současné době se invazní druh šíří v oblastech mírného klima napříč Evropou i USA, místy až s masovým výskytem (Lombaert et al. 2010, Nedvěd et al. 2011, Nedvěd 2014).

Velikost těla dospělců stejně jako zbarvení krovek je u *H. axyridis* velmi variabilní. Tělo dosahuje rozměrů 5 - 8 mm, je široce oválné, 1,3 - 1,4 krát delší než široké. Variabilní zbarvení krovek je určeno geneticky. V České republice je nejrozšířenější světle zbarvená forma *succinea*, ke které přísluší až 86 % jedinců. Larva je eruciformního typu, protáhlá s výraznými trnitými hrudními sklerity. Larvální vývoj se skládá ze čtyř instarů. Kukla je oranžová, typu pupa obtecta. Obsahuje černé skvrny na hrudi a na křídelních pochvách. Rozsah černé barvy u dospělců formy *succinea* je nepřímo úměrný s teplotou zažitou během stadia kukly. Pro determinaci pohlaví slouží horní pysk na kousacím ústním ústrojí a klypeus. Samice má horní pysk a tečku na klypeu černé barvy, někdy hlavu až skoro černou, kromě bílého trojúhelníku na čele. Samci mají naopak tento soubor znaků v bílé podobě (Nedvěďová 2013, Nedvěd 2015). Je důležité doplnit, že při častějším určování pohlaví je nutné přihlídnout i k morfologii posledního zadečkového článku s vyústěním kopulačních orgánů. Jelikož více melanizovaní jedinci mohou být při determinaci pohlaví pomocí horního pysku zaměňováni.

Druh žije především na listnatých stromech a keřích, někdy na bylinách a vzácně jehličnanech. *H. axyridis* je hojná na místech s masovým výskytem kolonií mšic, hlavně na lípě, peckovínách, okrasných keřích či kopřivách. Kromě mšic se živí merami, červci a alternativně dalšími drobnými měkkými druhy hmyzu, vajíčky a larvami jiných druhů sluněček nebo pylem a sladkými plody. Sluněčko východní stihne vytvořit 2 až 3 překrývající se generace za rok. V říjnu migrují dospělci na svá zimoviště a obvykle zimují v úzkých štěrbinách nejrůznějšího typu (Nedvěd 2015).

Tento druh způsobuje svou přítomností v naší přírodě řadu problémů. Může například vytvářet konkurenční tlak na některá naše původní sluněčka. Vinařům způsobuje škodu na vinné révě. Především kvůli obsahu alkaloidů v hemolymfě. Réva totiž může být při nedostatku kolonií mšic také náhradní potravou pro sluněčka. Při následném zpracování na víno dochází k znehodnocení kvality produktu. Největší nepříjemností z lidského hlediska je přirozený způsob zimování druhu ve skalních štěrbinách. Úzké skalní štěrbiny totiž bývají v náhradních stanovištích nahrazovány například okenními rámy obytných budov (Nedvěďová 2013).

1. 3. 2 Současné poznatky o imunitním systému čeledi Coccinellidae

Buněčnou imunitou slunéčka *Anisolemnia dilatata* (Fabricius, 1775) se věnují ve své práci Majumder et al. (2016), kteří zkoumali morfologii a diferenciální počet hemocytů. V práci bylo zjištěno 5 druhů hemocytů v každém z vývojových stádií. Konkrétně se jednalo o prohemocyty, plasmacyty, granulocyty, sferulocyty a oenocyty. Nejpočetnějším druhem byly plasmacyty a nejméně fluktuujícím druhem během ontogeneze byly granulocyty. Nejmenších průměrných velikostí dosahovaly prohemocyty s průměrem buňky 11, 59 μm a největší byly oenocyty s průměrem 26,11 μm . Diferenciální počty hemocytů byly zkoumány pro všechna larvální stádia, kuklu a 24 hodin staré dospělce. Mezi prvním a druhým larválním instarem nebyl signifikantní rozdíl v zastoupení jednotlivých typů hemocytů. Při porovnání třetího a čtvrtého larválního instaru byl naopak prokázán statisticky průkazný rozdíl u prohemocytů a sferulocytů, přičemž prohemocyty klesaly na úkor sferulárních buněk. Zajímavé je, že ve stádiu kukly opět stoupala koncentrace prohemocytů právě na úkor dříve diferenciovaných prohemocytů. Tento posun je pravděpodobně způsoben samotnou přeměnou (metamorfózou) během stádia kukly, kde je naopak pravděpodobně potřeba vyšší koncentrace nediferenciovaných hemocytů (prohemocytů). U 24 hodin starých dospělců byly diferenciální počty většiny druhů hemocytů velmi podobné prvním a druhému larválnímu stádiu. V práci autoři dále neprokázali statisticky významný rozdíl mezi pohlavími.

U *H. axyridis* bylo také pozorováno 5 odlišných typů hemocytů. Podobně jako u předchozí studie to jsou prohemocyty, plasmacyty, oenocyty, sferulocyty a granulocyty jsou v tomto případě rozděleny do dvou podtypů (granulocyty prvního typu – s kulovitým tvarem buňky a granulocyty druhého typu – s oválným tvarem buňky). Největším typem u slunéčka východního jsou sferulocyty, dosahující rozměrů kolem 25 μm . Nicméně i oenocyty podobně jako v předchozí studii patřily rozměry k velkým imunitním buňkám, průměr buněk byl kolem 18 μm (Firlej et al. 2012).

Výše zmíněné studie mohou předpovídat jistý předběžný typologický trend hemocytů u čeledi Coccinellidae. Další studie na larvách slunéčka sedmítečného (*Coccinella septempunctata* Linnaeus, 1758) totiž stejným druhovým složením toto potvrzuje také (Suhail et al. 2007). Humorální složkám vrozené imunity je v literatuře věnována větší pozornost. Především pro invazní druh *H. axyridis* existuje řada recentních studií. U tohoto druhu je prokázána tvorba cca 50 různých antimikrobiálních peptidů, jejichž tvorba může být zvýšena po nákaze slunéčka bakteriemi a plísněmi (Vilcinskas et al. 2013, Nedvěd 2014). Nejúčinněji pracují antimikrobiální peptidy *H. axyridis* proti kvasince pивní (*Saccharomyces cerevisiae* Hansen, 1883) a *Escherichia coli* Escherich, 1885 (Koegel et al. 2012). Schmidtberg et al. 2013 se ve své studii věnovali porovnání antimikrobiální aktivity slunéčka sedmítečného a slunéčka východního. Antimikrobiální aktivita byla měřena technikou radiální difúze 24 hodin po aplikaci pufru s *Escherichia coli* a *Micrococcus luteus* Cohn, 1872. Výsledky antimikrobiální aktivity po imunitní výzvě vyšly překvapivě vyšší u slunéčka sedmítečného v porovnání s invazní

H. axyridis, ale neindukovaná imunita byla ve studii dle očekávání mnohonásobně vyšší u *H. axyridis*. Jedním z možných vysvětlení je silný alkaloid v těle slunéčka východního, který by mohl suplovat do určité míry humorální část po imunitní výzvě. Slunéčko východní se díky tomu nemusí po imunitní výzvě tolik spoléhat na produkci antimikrobiálních peptidů, což může naopak předpokládat jistou výhodu v porovnání s původním druhem naší přírody. V práci podle Schmidtberg et al. (2013) byla dále věnována pozornost antimikrobiální aktivitě vajíček, larev a dospělcům slunéčka východního, přičemž tato aktivita u nenakažených brouků v čase života rostla. Důležité je zmínit, že však nebylo řešeno přesné stáří jednotlivých stádií, což může výsledky zkreslovat. Gross et al. (2010) dále zjistili, že dospělí jedinci *H. axyridis* mají podobnou přirozenou antimikrobiální aktivitu proti *Escherichia coli* jako larvy 4. instaru. Další studie u neindukované imunity také potvrzuje nejvyšší antimikrobiální aktivitu proti *Micrococcus luteus* u *Harmonia axyridis*, následovala *Coccinella septempunctata* a nejnižší antimikrobiální aktivitu mělo slunéčko dvoutečné (*Adalia bipunctata* Linnaeus, 1758 Roehrich et al. 2012). Navazující práce zkoumala transkriptomy antimikrobiálních peptidů u stejného druhového tria. U všech zkoumaných druhů byly nalezeny vždy všechny zkoumané antimikrobiální peptidy z osmi genových rodin (tj. attaciny, coleopteriny, defenziny, thaumatiny, cys – knot proteiny, cecropiny, C a I lysozomy). Nicméně slunéčko východní v případě attacinů, coleopterinů a defensinů vykazovalo daleko vyšší výskyt. Cecropiny a lysozomy se vyskytovaly u všech zkoumaných druhů slunéček v podobné koncentraci. Zajímavý byl také vyšší výskyt „protihoubových“ peptidů tzv. thaumatinů u slunéčka východního v porovnání s původními druhy. Vyšší množství thaumatinů může být spojený s vysokým výskytem mikrosporidií v těle tohoto invazního druhu, aniž by docházelo k letálním následkům pro hostitelské jedince. Problematice mikrosporidií bude věnována podrobněji následující podkapitola. Po imunitní výzvě coleopteriny vykazovaly u invazního druhu mnohem vyšší syntézu než u obou původních druhů naší fauny. Dále například slunéčko dvoutečné po imunitní výzvě ani nikterak nezvýšilo tvorbu defensinů (Vogel et al. 2017).

U slunéček hraje nezastupitelnou roli v obraných schopnostech také obsah melaninu. Tento pigment se totiž vyskytuje v černých skvrnách (někdy připomínajících tečky) na krovkách. Obecně se u hmyzu předpokládá pozitivní vliv obsahu melaninu na imunitní systém. Více melanické formy zpravidla vykazují účinnější imunitní obranou schopnost (Wilson et al. 2008). U slunéčka východního formy *succinea* byl dokonce zjištěný vliv melaninu na obsah 2-isopropyl-3-methoxypyrazinu. Silněji melanizovaní jedinci obsahovali vyšší koncentrace této zapáchající antipredační látky (Koegel et al. 2012).

1. 3. 3 Reflexní krvácení jako chemická obrana čeledi Coccinellidae před predací

Kromě aposematického zbarvení zvyšují sluněčkovití účinnost své antipredační obrany pomocí reflexního krvácení. Jedná se o chování, při kterém dochází po napadení predátorem k vylučování hemolymfy v podobě drobných kapek z kolenních kloubů dospělců nebo u larev ze zadečkových článků na hřbetní straně. Ve vyloučené hemolymfě jsou nechutné a toxické látky, například nejrůznější alkaloidy. Řada těchto látek je druhově specifická, jejich vznik je přikládán často vlastní syntéze (nepochází z potravy). U sluněčka sedmitečného se například vyskytuje poměrně silný alkaloid coccinellin. Obecně jsou u sluněček také časté látky typu pyrazín, které zapáchají a jsou důležité při podzimní agregaci před přezimováním (Hodek et al. 2012). Ovšem existují i případy u některých druhů vázaných na predaci mšic, že sluněčko dostane chemickou látku do svého těla právě přes konzumaci mšic z jejich původní živné rostliny.

U druhu *H. axyridis* se vyskytuje kromě již zmíněného 2-isopropyl-3-methoxy-pyrazínu také velmi silný alkaloid harmonin. Je nahořklé chuti a vykazuje širokospektrální antimikrobiální aktivitu. Pro svou výbornou účinnost je tento alkaloid předmětem zkoumání i v humánní medicíně (Schmidtberg et al. 2013). Dokonce byla zjištěna jeho účinnost proti některým kmenům bakterie tuberkulózy, tj. bacil Kochův (*Mycobacterium tuberculosis* Zopf, 1883) a zimničce tropické (*Plasmodium falciparum* Welch, 1897), původci malárie (Schmidtberg et al. 2013). Laboratorně je možné již několik let harmonin syntetizovat, což je výborné zjištění pro jeho možné další využití (Braconier et al. 1985). Kolem tohoto významného alkaloidu však zůstává stále mnohé neodhaleno. Například mechanismus, jak tělo sluněčka východního dokáže zabránit otravě vlastním harmoninem, je zatím neznámý (Roehrich et al. 2012). Ještě zajímavější jsou studie, zabývající se o mikrosporidie vyskytující se v hemolymfě *H. axyridis* (Vilcinskas et al. 2014, Vogel et al. 2017). V literatuře jsou mikrosporidie uváděny jako obligátní intracelulární parazité, ale tento invazní druh jich má ve své hemolymfě napříč všemi vývojovými stádii a geografickým rozšířením extrémně vysoké množství. Proto se pravděpodobně nemůže již jednat o parazitismus. *H. axyridis* je pravděpodobně schopna se vyrovnat s přítomností určitých druhů mikrosporidií a patrně ji ani neškodí. Jako možné vysvětlení je právě přítomnost silného harmoninu. Často se ve studiích objevují teorie, že tento parazit může zvýhodňovat sluněčko v konkurenčním tlaku před ostatními druhy sluněček, jelikož pro jiné by mohla být přítomnost mikrosporidií až letální (Vilcinskas et al. 2014). Kolem mikrosporidií je ovšem také řada neznámých a bylo by vhodné doplnit informace o sluněčku východním dalšími druhy sluněček s možným výskytem mikrosporidií v jejich hemolymfě. Z našich předběžných pozorování například víme, že v druhu *Ceratomegilla undecimnotata* (Schneider, 1792) se vyskytuje také vysoké množství těchto intracelulárních parazitů.

2. Cíle práce

Cílem literární rešerše je shrnutí dosavadních poznatků o fungování imunitního systému hmyzu. Detailněji je rešerše zaměřena na popis existujících znalostí o imunitním systému slunéček (Coleoptera: Coccinellidae). U této čeledi byl pak zájem směřován především k modelovému druhu *Harmonia axyridis*, jelikož vybrané studie, zkoumající imunitní systém tohoto invazního druhu, jsou důležitým podkladem pro experimentální část mé diplomové práce.

Cílem prvního experimentu je porovnat dvě různé metody odběru hemolymfy z jedinců tří druhů slunéček. Liší se fyziologické a imunologické vlastnosti vzorků hemolymfy mezi metodou punkce a metodou odběru reflexním krvácením? Podobné studie ve vědecké literatuře chybí, ačkoliv případné rozdíly mohou zkreslovat výsledky publikovaných i budoucích studií. Zajímavá je tato studie i z evolučního pohledu, protože „plýtvat“ cennými součástmi hemolymfy (např. hemocyty či bílkoviny) může být pro slunéčka fyziologicky náročné. Je zde tedy předpoklad, že výsledky tohoto porovnávání budou v budoucnu publikovány formou vědeckého článku.

Druhý experiment si klade za cíl zkoumat ontogenetický vývoj imunitního systému slunéčka východního, *H. axyridis*. Hlavním cílem této části je snaha o detailní porozumění vývoje základních parametrů imunitního systému během larválního vývoje a během stárnutí dospělců. I tento experiment má metodologické dopady, protože poukazuje na fakt, že při zkoumání imunity hmyzu je třeba dbát na determinaci přesného stáří analyzovaných jedinců. Cílem je i vytvoření vlastního manuskriptu vědeckého článku, který je přílohou této diplomové práce.

Cílem posledního experimentu je doplnit zkoumané poznatky získané během mé bakalářské práce na téma „vliv teploty během preimaginální vývoje na imunitní systém dospělců u slunéčka *H. axyridis*“. Cílem je porovnat vliv teploty během stádia kukly (17°C, 26°C, 35°C) na počet cirkulujících hemocytů v hemolymfě dospělců starých 24 hodin či jeden týden. Data z mé bakalářské práce jsou v tomto případě doplněna právě o týden staré jedince.

Všechny tři experimenty mají ambici být publikovány ve vědeckých časopisech. Základním cílem práce je však především přispět novými poznatky ke znalostem biologie významného invazního druhu hmyzu, kterým slunéčko východní, *Harmonia axyridis*, bezpochyby je.

3. Experimentální část

3.1 Porovnání dvou odlišných metod odběru hemolymfy z těl slunéček *Harmonia axyridis*, *Ceratomegilla undecimnotata* a *Coccinella septempunctata*

3.1.1 Uvedení do problematiky

Reflexní krvácení je formou obranné reakce proti predaci, která není mezi druhy hmyzu nikterak vzácná. Hemolymfa vyroněná při reflexním krvácení obsahuje jedovaté a zapáchající látky. Některé druhy hmyzu jsou při obranné reakci schopny hemolymfu dostříknout až do vzdálenosti několika centimetrů (Glenn 1991). Reflexní krvácení je známé jak u larev, tak dospělců například těchto řádů: blanokřídlí (Hymenoptera; Boevé et Schaffner 2003), pošvatky (Plecoptera; Moore et Williams 1990), rovnokřídlí (Orthoptera; Bateman et Fleming 2009), polokřídlí (Hemiptera; Bugila et al. 2014). U řádu brouci (Coleoptera) je známo reflexní krvácení například u čeledí majkovití (Meloidae; Nicolson 1994), mandelinkovití (Chrysomelidae; Jolivet et Poinar 2007), Erotylidae (Drilling et Dettner 2010), světluškovití (Lampyridae; Fu et al. 2009) či slunéčkovití (Coccinellidae; Sato et al. 2009). U některých čeledí, jako jsou slunéčkovití, je reflexní krvácení natolik rozšířenou obranou reakcí, že na něj spoléhá valná většina druhů. Účinnost reflexního krvácení jako obrany proti predaci byla dokázána proti predátorům z řad obratlovců i bezobratlých, například proti drobným savcům, ptákům či ještěrkám (Eisner et al. 2005, Bateman et Fleming 2009, Sato et al. 2009, Novgorodova 2015, Zvereva et Kozlov 2016).

Tento způsob mimotělního krvácení je vhodnou a účinnou strategií, jelikož kořist dává svou nechutnost a jedovatost najevo už před samotnou predací (Endler 1986). Nedávná studie shrnující různé způsoby chemické obrany hmyzu potvrdila účinnost reflexního krvácení. Herbivorní druhy hmyzu, které využívají této strategie, byly méně predovány než druhy s nechutnou hemolymfou, kterou si však ponechávaly pouze uvnitř těla (Zvereva et Kozlov 2016). Na druhou stranu je důležité upozornit na fyziologickou náročnost ztráty hemolymfy po reflexním krvácení, která musí být v krátké době opět doplněna. Časté reflexní krvácení v larválním stádiu může vést například ke snížení velikosti těla dospělců (Rowell – Rahier et Pasteels 1986, Gril et Moore 1998, Sato et al. 2009), či prodloužení ontogenetického vývoje larev (Gril et Moore 1998). Zvereva et Kozlov (2016) ve své studii ukazují, že reflexně krvácející druhy mohou mít vyšší riziko nákazy parazity či parazitoidy. To by mohlo být způsobeno oslabeným imunitním systémem v důsledku krvácení. Aby byl tento negativní vliv minimalizován, jsou některé taxonomické skupiny schopny vstřebávat vyloučenou hemolymfu zpět do těla (Rowell - Rahier et Pasteels 1986). Jiné druhy (včetně slunéček) vstřebávání schopny nejsou a musí tak následně rychle obnovit původní objem hemolymfy (Hodek et al. 2012). Možností, jak v takovém případě minimalizovat riziko spojené se ztrátou hemolymfy vlivem reflexního krvácení, může být schopnost některých druhů odfiltrovat cenné komponenty hemolymfy (např. hemocyty) během krvácení a ponechat si je tak i nadále ve svém těle (Dixon 2000). Podobné studie dokazující možnou “schopnost”

udržení důležitých komponentů hemolymfy i nadále v těle během reflexního krvácení však u čeledi Coccinellidae zatím v literatuře stále chybí.

Cílem prvního experimentu je porovnávat koncentrace cirkulujících hemocytů, celkové koncentrace bílkovin a antimikrobiální účinnost proti *Escherichia coli* (K12) mezi vzorky získaných pomocí reflexního krvácení či standartní metody punkce, vždy od stejných jedinců třech vybraných druhů slunéček. Takto strukturovaný experiment navíc poskytuje možnost porovnání základních imunitních parametrů u třech druhů slunéček. V experimentu byl úmyslně zahrnut druh slunéčka *Ceratomegilla undecimnotata*, o kterém v literatuře zatím nejsou známy žádné imunitní či fyziologické charakteristiky.

3.1.2 Metodika - chov jedinců a odběr hemolymfy

Jedinci všech třech druhů použitých v tomto experimentu byli sebráni na území hl. m. Prahy. Po přenosu sebraných brouků do laboratoře bylo ihned zjištěno pohlaví všech jedinců. Následně byla slunéčka rozdělena po cca čtyřech jedincích, vždy stejného druhu a pohlaví, a ubytována do Petriho misek (9 cm průměr). Každá Petriho miska obsahovala filtrační papír složený do harmoniky (příloha 1), na který byla vždy následně aplikována potrava v podobě vajíček zavíječe moučného (*Ephestia kuehniella* Zeller, 1879). Kromě potravy bylo jedincům zajištěno také neomezené množství tekutin v podobě vody aplikované na buničitou vatou (2 cm x 2,5 cm). Dostatek potravy byl kontrolován denně. Jedinci byli chováni v klimatických komorách při konstantní teplotě 26 °C, fotoperiodě nastavené na dlouhý den (16L : 8D) a relativní vlhkosti cca 50 %.

Pro získání hemolymfy z těl dospělých slunéček byly vytvořeny dvě odlišné metody odběru, které byly později vzájemně porovnávány. Metoda punkce vyžadovala nejprve přichycení brouků za pomoci oboustranné lepicí pásky na speciálně upravenou část Petriho misky (příloha 2). Následně došlo za pomoci sterilizovaného entomologického špendlíku (o průměru 0,30 mm) k propíchnutí hrudní části těla, zpravidla v oblasti předohrudí. Takto poraněný brouk ihned začal v oblasti poranění ronit hemolymfu. Metoda reflexního krvácení je vlastní vytvořenou metodou odběru hemolymfy. Při této metodě bylo opět nejprve nutné brouka dostatečně znehybnit pomocí přichycení na oboustrannou lepicí pásku. Po důkladné fixaci brouka nastalo opakované dráždění entomologickým špendlíkem (o průměru 0,30 mm) za účelem výronu hemolymfy při reflexním krvácení. U slunéčkovitých jde o proces chemické obrany, při kterém dochází k vylučování hemolymfy v podobě drobných kapek z kolenních kloubů dospělců nebo u larev ze zadečkových článků na hřbetní straně. Právě v těchto místech byli brouci dostatečně drážděni.

U všech analyzovaných jedinců byl nejprve proveden odběr hemolymfy metodou reflexního krvácení a až posléze odběr metodou punkce. Odběry byly provedeny v co nejkratším časovém intervalu, aby takto odebrané vzorky bylo možné korektně porovnávat. Kapka čerstvě vyroněné hemolymfy, nezávisle na použité metodě vždy cca 0,5 - 1,5 μ l, byla nasána vlivem kapilárních sil

do skleněné mikrokapiláry (značka: Hirschmann, Německo; příloha 3). Objem odebraného vzorku hemolymfy byl následně změřen ve skleněné mikrokapiláře pomocí posuvného měřítka a vyfouknut do 50 μ l pufru. Následně byl vzorek naředěn do konečného poměru 1 μ l čisté hemolymfy ku 100 μ l antikoagulačního pufru. Složení pufru podle Firlej et al. (2012) je následující: 62 mM chloridu sodného, 100 mM glukózy, 10 mM EDTA, 30 mM citronanu sodného a 26 mM kyseliny citronové. Po naředění vzorků v antikoagulačním pufru byla ihned analyzována koncentrace cirkulujících hemocytů v hemolymfě obsažená u obou metod odběru, zbylý objem vzorků byl zmražen při - 25 °C pro další měření fyziologické a imunitní parametry.

3.1.3 Metodika - měření vybraných fyziologických a imunitních parametrů

Měření vybraných fyziologických a imunitních parametrů bylo rozděleno na dvě fáze. V první fázi byla zjištěna koncentrace hemocytů cirkulujících v hemolymfě. Hemocyty byly měřeny proto, že jejich tvorba je poměrně energeticky náročná pro organismus a jejich velká velikost by mohla umožňovat mechanickou filtraci. Z evolučního hlediska by tak mohlo být výhodné hemocyty z hemolymfy neztrácet. Zjištění koncentrace cirkulujících hemocytů v 1 μ l hemolymfy bylo analyzováno pod světelným mikroskopem značky Olympus CX31 (Japan). U všech získaných vzorků bylo odebráno pomocí automatické pipety 7,5 μ l roztoku hemolymfy s antikoagulačním pufrům. Napipetované vzorky, v původním poměru ředění 1 μ l čisté hemolymfy na 100 μ l antikoagulačního pufru, byly postupně aplikovány na Bürkerovu počítací komůrku (příloha 4). Počet hemocytů byl vždy sečten v padesáti velkých čtvercích komůrky při celkovém zvětšení mikroskopu čtyřístakrát (přílohy 5, 6, 7). Přesný postup počítání hemocytů v Bürkerově komůrce a následný přepočítání zjištěného počtu hemocytů na koncentraci hemocytů v 1 μ l čisté hemolymfy je zobrazen v přílohách 8 a 9. Zbývající objem odebraných vzorků byl zmražen a později převezen na Přírodovědeckou fakultu Masarykovy univerzity v Brně (Ústav experimentální biologie), kde byla Mgr. Pavlem Dobešem, Ph.D. zjištěna antimikrobiální aktivita proti gramnegativním bakteriím *Escherichia coli* a koncentrace bílkovin v hemolymfě.

Poranění po proniknutí špičky špendlíku do těla sluníček sebou nese riziko kontaminace hemolymfy dalšími tkáněmi, které mohou později zkreslovat interpretaci samotných dat, například koncentraci bílkovin v hemolymfě. Koncentrace bílkovin (mg/ml) v hemolymfě byla zjištěna pomocí Bradfordovi metody měření proteinů. Do jednotlivých plástů pro pozdější analýzu ve spektrofotometru bylo nanášeno vždy 5 μ l ředěné hemolymfy (1:100) smíchané se speciálním přípravkem (Bio-Rad, USA). Ze sady přípravku Bio-Rad bylo přidáno do antikoagulačního pufru s hemolymfou 25 μ l reaktantu A a poté 200 μ l reaktantu B. Důležité je dodržet pořadí přidávání jednotlivých přípravků, jelikož díky správnému užití dochází k chemické reakci mědi s bílkovinnými strukturami, což způsobuje žádoucí namodrávání celého roztoku pro pozdější analýzu. Po cca 15 minutách čekání bylo zjištěno množství absorbovaného světla ve spektrofotometru (měřeno při $\lambda = 700 - 750$ nm). Následně bylo možné za pomoci kalibrační křivky

porovnat míru absorpce s přesně definovaným standardem (v tomto případě byl standardem přípravek Bio-La-Test® LYONORM, Česká republika) a vypočíst koncentraci bílkovin.

Antimikrobiální aktivita hemolymfy je jednou z velmi často měřených veličin při výzkumu humorální části imunitního systému. Pro tento experiment byla měřena antimikrobiální aktivita proti gramnegativním bakteriím metodou bioluminometrie za použití geneticky modifikovaného kmene bakterie *Escherichia coli* (K12). Tento kmen bakterie obsahuje svítící enzym, luciferázu. Metoda vychází ze základní myšlenky, že míra bioluminiscenčního signálu je přímo úměrná přežívání bakterií. Podrobnější popis metody a příprava ředění bakterií pro následnou aplikaci je popsána v práci Vojtek et al. (2014). Pro luminometrické měření bylo použito 40 μ l zředěné hemolymfy z původních mražených vzorků. Tento roztok byl smíchán se 120 μ l PBS (pH = 7) s přibližným počtem 100 000 bakteriálních buněk. Po napipetování vzorků na předem připravenou destičku luminometru byla sledována síla světelného signálu po dobu 60 minut. Výsledkem měření jsou jednotlivé křivky úbytku světelného signálu bakterií pro jednotlivé analyzované vzorky. Výslednou analyzovanou veličinou je integrál svítivosti vzorku po dobu 60 minut, který je relativizován vůči kontrolnímu vzorku s přidáním jen samotného PBS bez bakterií (kontrola = 100 % přežívání bakterií).

3.1.4 Metodika - analýza dat

Pro porovnání vzorků získaných dvěma metodami odběru vzorků hemolymfy z těl sluníček byly použity zobecněné lineární modely se smíšenými efekty (GLMMs). Každý laboratorně měřený fyziologický a imunitní parametr byl analyzován v samostatném modelu. Ve všech modelech byla identita zvířete použita jako náhodný efekt a metoda odběru hemolymfy (punkce či reflexní krvácení), pohlaví jedince a druhová identita jedince jako nezávislé proměnné. Všechny vysvětlující proměnné jsou kategoriální, přičemž druhová identita nabývala tří kategorií (*Harmonia axyridis*, *Ceratomegilla undecimnotata*, *Coccinella septempunctata*), pohlaví dvou (samec, samice) a metoda odběru hemolymfy dvou (reflexní krvácení, punkce). V modelu vysvětlující koncentraci hemocytů v hemolymfě bylo použito quasipoissonova rozdělení chyb. V modelu analyzujícím koncentraci bílkovin v hemolymfě bylo použito gamma rozdělení chyb. V posledním modelu analyzujícím antimikrobiální aktivitu proti gramnegativním bakteriím *Escherichia coli* (K12) bylo použito binomické rozdělení. Analýzy byly zpracovány ve statistickém programu R verze 3. 0. 3. (R Core Team 2014).

Nulové hypotézy byly pro všechny modely stanoveny následovně:

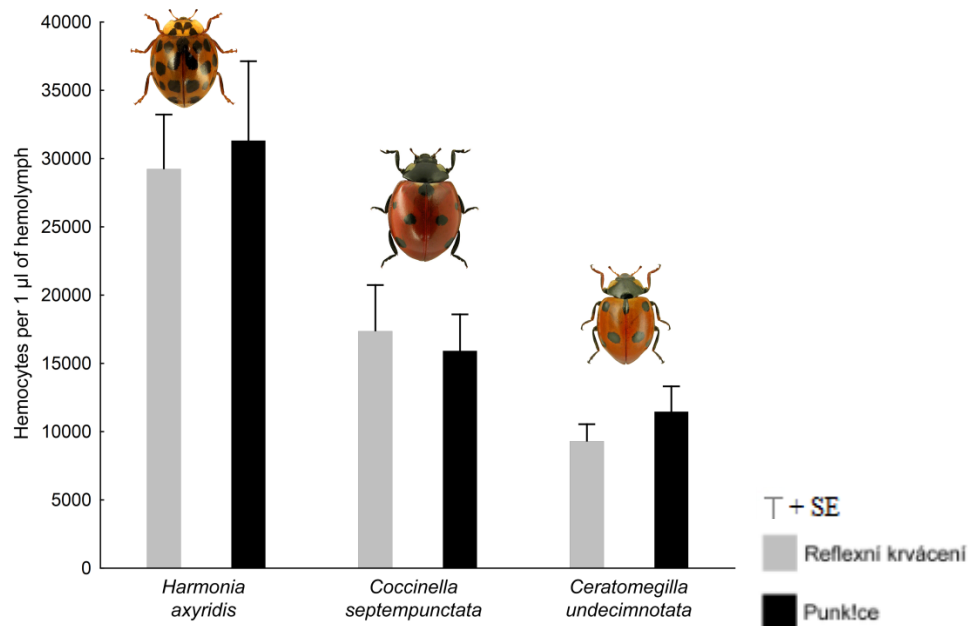
H₀₁: Měřená veličina nezávisí na metodě odběru hemolymfy.

H₀₂: Měřená veličina nezávisí na pohlaví jedince.

H₀₃: Měřená veličina nezávisí na druhové identitě jedince.

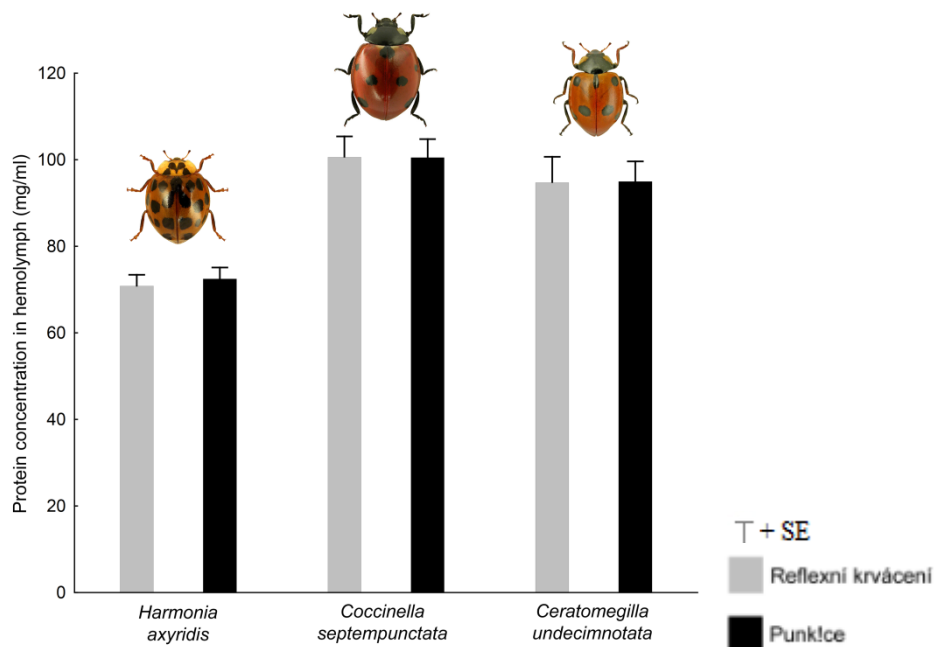
3.1.5 Výsledky

Koncentrace hemocytů v hemolymfě se statisticky významně nelišila mezi hemolymfou z tělní dutiny a tou reflexně vykrvácenou (GLMM: $F = 0,77$; $P = 0,38$). Dále nebyl prokázán ani signifikantní rozdíl mezi pohlavím (GLMM: $F = 0,01$; $P = 0,93$). Ovšem při mezidruhovém porovnání koncentrace hemocytů v hemolymfě jedinců tří odlišných druhů slunéček vyšel výrazně průkazný rozdíl mezi zkoumanými druhy (GLMM: $F = 16,00$; $P < 0,001$; obrázek 1).



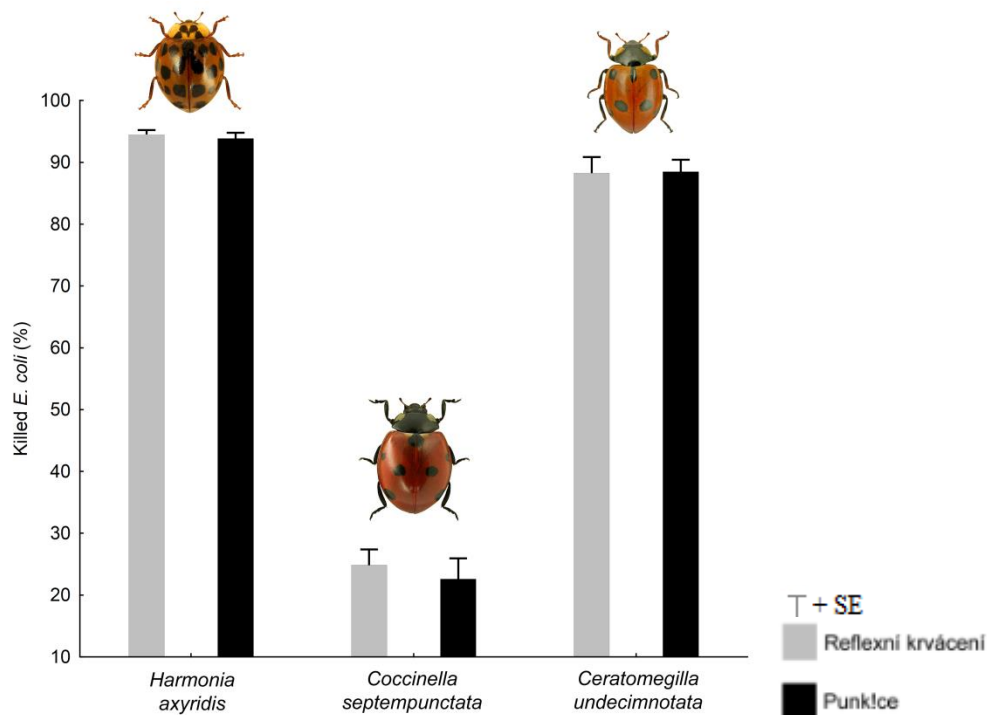
Obrázek 1: Vliv metody odběru hemolymfy (punkce - černá barva a reflexní krvácení - šedá barva) na koncentraci cirkulujících hemocytů v 1 µl čerstvé hemolymfy u tří druhů slunéček. Data jsou zobrazena bez rozdílu pohlaví (sloučený dataset pro obě pohlaví). Vyneseny jsou průměrné hodnoty doplněné o střední chybu průměrů - SE.

Koncentrace bílkovin v hemolymfě se také statisticky významně nelišila mezi oběma metodami odběru hemolymfy (GLMM: $F = 0,20$; $P = 0,66$). Opět ani v těchto datech nebyl statisticky průkazný rozdíl mezi pohlavím (GLMM: $F = 0,0002$; $P = 0,99$). Koncentrace bílkovin se však statisticky průkazně lišila mezi zkoumanými druhy (GLMM: $F = 16,19$; $P < 0,001$; obrázek 2).



Obrázek 2: Vliv metody odběru hemolymfy (punkce - černá barva a reflexní krvácení - šedá barva) na koncentraci bílkovin (mg/ml) hemolymfy u tří druhů slunéček. Data jsou zobrazena bez rozdílu pohlaví (sloučený dataset pro obě pohlaví). Vyneseny jsou průměrné hodnoty doplněné o střední chybu průměrů - SE.

Antimikrobiální aktivita hemolymfy, měřená jako mortalita gramnegativních bakterií *Escherichia coli* (K12), se statisticky významně nelišila mezi metodou punkce a reflexním krvácením (GLMM: $F = 2,26$; $P = 0,14$). Ani vliv pohlaví na antimikrobiální aktivitu hemolymfy nebyl statisticky průkazný (GLMM: $F = 0,57$; $P = 0,45$). I v případě antimikrobiální aktivity byl však prokázán významný rozdíl mezi jednotlivými druhy slunéček ($F = 186,33$; $P < 0,001$; obrázek 3).



Obrázek 3: Vliv metody odběru hemolymfy (punkce - černá barva a reflexní krvácení - šedá barva) na mortalitu gramnegativních bakterií *Escherichia coli* (K12) u tří druhů slunéček. Data jsou zobrazena bez rozdílu pohlaví (sloučený dataset pro obě pohlaví). Vyneseny jsou průměrné hodnoty doplněné o střední chybu průměrů - SE.

3.1.6 Diskuze

Výsledek tohoto experimentu má významné metodologické souvislosti. Reflexní krvácení může představovat nedestruktivní metodu extrakce DNA (Karystinou et al. 2004). Tato studie potvrzuje i možnost využití odběru hemolymfy z reflexního krvácení, tedy bez traumatizace hmyzu při jejich poraňování, i pro imunologické analýzy. Odběr hemolymfy metodou reflexního krvácení je také dále vhodný i pro studie vyžadující opakované odebrání vzorku z konkrétního jedince (například před a po působení určitého stresoru). Naopak odběr vzorků tradičními technikami (například metoda punkce) může mít po vytvoření nepřírodního poranění určité stimulační účinky na imunitní systém hmyzu. Lze říci, že v takovém případě může být vyvolána tzv. imunitní výzva. Imunitní systém si udržuje neustále určitou hladinu imunitní aktivity, ale právě po poranění při metodě punkce dochází k možnosti vniknutí patogenu do těla jedinců, což je spouštěčem pro zvýšení aktivity nejrůznějších složek imunitního systému, například zvýšení koncentrace antimikrobiálních peptidů či diferenciací specifických typů hemocytů (Turner 1994, Gupta 2001, Ponnuvel et Yamakawa 2002, Crozatier et al. 2004). Kromě možného

vniknutí patogenu do těla, je pro organismus výzvou i samotné poranění, dochází totiž ke spouštění mechanismů podílejících se na tzv. koagulačním procesu (Kanost et al. 2004, Theopold et al. 2004).

Z evolučního pohledu je zajímavé, že slunéčka s hemolyfou vybavenou důležitými imunitními složkami při reflexním krvácení nikterak nešetří. Slunéčka si tedy nevytvořila schopnost udržení si důležitých složek hemolymfy uvnitř těla během reflexního krvácení. Reflexní krvácení tedy znamená ztrátu cenných bílkovin, hemocytů, vody atd. a může být pro slunéčka značně fyziologicky nákladné. Nabízí se však otázka, zda jsou případné mechanismy omezující tyto ztráty skutečně pro slunéčka tak důležité a je-li možné, zda slunéčkům ztráta hemolymfy nepřináší významné snížení fitness. Faktem je, že některé nedávno publikované studie naznačují opak. Dle Sato et al. (2009) reflexní krvácení vede ke snížení velikosti larev. Například Higginson et al. (2011) zjistili ve své studii u běláška zelného (*Pieris brassicae* (Linnaeus, 1758)) negativní vliv časté regurgitace (opakovaného „zvracení“) během larválního stádia na fyziologické procesy. Vliv regurgitace se totiž projevuje zmenšením velikosti či sníženou schopností dožítí kukel tohoto motýla. Dalším možným vysvětlením bránící zbytečné ztrátě hemolymfy je i zapojení jiných mechanismů, například behaviorálních. Slunéčka v horší tělesné kondici mohou mít sníženou ochotu reflexně krváčet při útoku predátora a přicházet tak o cennou hemolymfu (Dejong et al. 1991). Detailnější studium této problematiky je jedním z úkolů pro budoucí ekofyziologický výzkum zaměřený na slunéčka.

Tato studie navíc dále ukazuje zajímavé mezidruhové rozdíly v základních fyziologických a imunitních parametrech hemolymfy slunéček. Například invazní slunéčko *Harmonia axyridis* má významně vyšší koncentraci cirkulujících hemocytů v 1 μ l hemolymfy než další dva druhy našich původních slunéček. Překvapením je vysoká antimikrobiální aktivita u druhu *Ceratomegilla undecimnotata*, která je téměř srovnatelná s antimikrobiální aktivitou invazního slunéčka východního, *Harmonia axyridis* (Roehrich et al. 2012, Schmidtberg et al. 2013, Vogel et al. 2017). Ačkoliv řada studií předpokládá, že *H. axyridis* má výborně fungující imunitní systém a hemolymfu s vysokou antimikrobiální aktivitou, což má být jednou z příčin jejího invazního úspěchu (Schmidtberg et al. 2013, Vogel et al. 2017)

Pohlavní dimorfismus u měřených imunitních a fyziologických parametrů je v případě hmyzu velmi častý (McKean et Nunnery 2005, Nunn et al. 2009, Schwenke et al. 2016). V této studii však nebyly prokázány rozdíly mezi pohlavími ani u jednoho zkoumaného druhu. Jako možné vysvětlení pro chybějící efekt pohlaví se nabízí vytvoření optimalizovaných podmínek po samotném sběru slunéček z venkovního prostředí. Pobyt v laboratorních podmínkách (zamezení páření oddělením samců a samic, poskytování zdrojů v nadbytku, ochrana před predátory a parazitoidy) by totiž mohl smazat případný rozdíl v tlaku prostředí na různá pohlaví (McKean et Nunnery 2005).

Závěrem je ještě důležité zmínit upozornění, že odběr vzorků hemolymfy pomocí reflexního krvácení má smysl pro imunoekologický výzkum pouze za předpokladu, že jsou vlastnosti hemolymfy odebrané reflexně totožné

s vlastnostmi hemolymfy odebrané pomocí standardních metod destruktivního typu, nejčastěji punkce. Hlavním cílem této studie je proto poukázat na zcela novou metodu odběru hemolymfy z reflexního krváčení, která tyto předpoklady naplňuje (viz konkrétní měření vybraných fyziologických a imunitních parametrů) a současně je šetrnější ke zkoumaným zvířatům.

3.2 Měření vybraných imunitních parametrů během ontogenetického vývoje slunéčka *Harmonia axyridis*

3.2.1 Uvedení do problematiky

Velmi rychlé šíření invazního druhu slunéčka *Harmonia axyridis* ve spojení s potenciálním rizikem pro původní druhy dalo jasný impuls k zaměření pozornosti právě na výzkumu biologie tohoto druhu. Výsledkem je více než pět set publikovaných článků v posledním desetiletí (Web of Science 2006 - 2016). V literatuře existují studie zaměřené na imunitní systém jednotlivých složek *H. axyridis*, ale experiment zkoumající vývoj imunitního systému během života není až na dvě výjimky řešen (Gross et al. 2010, Schmidtberg et al. 2013). Přitom imunitní systém musí čelit různým výzvám během překonávání jednotlivých vývojových životních fází. Zejména u hmyzu s proměnou dokonalou je odlišnost jednotlivých vývojových stádií obrovská (Wilson - Rich et al. 2008, Nation 2015). Buněčná imunita se dokonce mění i během metamorfózy, kdy jsou vytvářeny specifické druhy hemocytů z tzv. prohemocytů, které se podílejí na odstranění odumřelé tkáně, jedná se například o lamelocyty (Chapman 2013). Ontogeneze imunitního systému není však zajímavá jen z pohledu ekologie či evoluční biologie hmyzu, ale může představovat také významný metodologický problém. Kolísání měřených imunitních parametrů by mělo být bráno v úvahu při designu navrhovaných srovnávacích studií. Měli by být totiž vždy srovnávání jedinci stejného stáří.

Studie zkoumající vývoj imunitního systému hmyzu v závislosti na čase jsou známé především u hospodářsky významných či vědecky „oblíbených“ druhů. Mezi prozkoumané druhy patří *Drosophila melanogaster* (Lanot et al. 2001, Krzemien et al. 2010, Khan et Prasad 2013), z medicínského pohledu zajímaví komáři (Hillyer et al. 2005, King et Hillyer 2013), pro zemědělství důležitá včela medonosná (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758; Wilson - Rich et al. 2008, Laughton et al. 2011, Gaetschenberger et al. 2013) či další hmyzí škůdci (Milks et al. 1998, Gardiner et Strand 2000, Stoepler et al. 2013, Tan et al. 2013).

Znalosti o ontogenetickém vývoji imunitního systému *H. axyridis* jsou omezeny na jedinou studii. Schmidtberg et al. (2013) však porovnávali pouze stádia vajíček, larev a dospělců blíže nespécifického věku a to pouze u humorální imunity. V práci byla řešena antimikrobiální aktivita pomocí radiální difúze u bakterií *Escherichia coli* a *Micrococcus luteus*. Nutno podotknout, že hlavním cílem práce nebylo sledování vývoje imunity během ontogeneze, ale porovnání imunitního systému *Harmonia axyridis* s druhem *Coccinella septempunctata*.

3.2.2 Metodika - chov jedinců a odběr hemolymfy

Jedinci *H. axyridis* určené pro založení rodičovských párů byly sebrány v srpnu 2015 z lip srdčitých (*Tilia cordata* Miller, 1768) rostoucích v rámci univerzitního kampusu České zemědělské univerzity v Praze (GPS: 50° 8' N, 14° 21' E; cca 285 m n. m.). Po přenosu sebraných jedinců do laboratoře bylo zjištěno pohlaví jedinců. Následovalo rozdělení brouků do rodičovských párů, vždy jeden

samec a samice společně v Petriho misce o průměru 9 cm. Všechny Petriho misky obsahovaly filtrační papír složený do harmoniky (příloha 1), na který byla aplikována potrava v podobě vajíček zavíječe moučného (*Ephestia kuehniella* Zeller, 1879). Kromě neomezeného množství potravy bylo jedincům dopřáváno dostatečné množství vodného roztoku obohaceného o sacharidy (med). Dostatek potravy byl kontrolován denně, vždy ve stejný čas. Při kontrole byl zároveň zajištěn odběr čerstvě nakladených vajíček. Pro ještě lepší efektivitu byly po několika dnech kladení vajíček vybrány pouze tři páry s nejvyšší plodností a pouze ty byly nakonec zahrnuty do vlastního experimentu. Všichni jedinci již rozdělení v Petriho miskách, měli vždy stejné prostředí pro život. Kromě potravy bylo jedincům zajištěno také neomezené množství tekutin v podobě vody aplikované na buničitou vatu (2 cm x 2,5 cm). Dostatek potravy byl kontrolován denně. Jedinci byli chováni v klimatických komorách při konstantní teplotě 26 °C, fotoperiodě nastavené na dlouhý den (16L : 8D) a relativní vlhkosti cca 50 %.

Vajíčka, později larvy či dospělci od vybraných rodičovských párů byly drženy opět ve stejných standardizovaných podmínkách. K pití však potomci dostávali pouze čistou vodu bez medu. První a druhé instary larev byly chovány společně v jediné Petriho misce celá snůška. Po svlečení do třetího instaru byly larvy z jedné snůšky rozděleny do několika Petriho misek po 4 - 5 jedincích. Důvodem bylo snížení rizika spojeného s možným kanibalismem. Vždy po naklazení snůšky byla tato snůška náhodně přiřazena k jedné z devíti ontogenetických fází zkoumaných v experimentu (tj. rozdělení pro odběry hemolymfy v: 3. a 4. larválním instaru, v prepulální fázi života, 1, 2, 4, 8, 16 a 32 dnech staří dospělců). Pro následné měření jednotlivých imunitních parametrů bylo vybráno vždy šest jedinců od všech larválních stádií (3. instar, 4. instar a prepupa) a všech rodičovských párů. U čerstvě vylíhlých dospělců bylo nejprve určeno pohlaví a poté byli vybráni čtyři dospělci od každého pohlaví a rodičovského páru opět pro jednotlivé odběry hemolymfy na výše uvedené fáze experimentu. Důležité bylo, že dospělci byli chováni jednotlivě v Petriho miskách, aby nedocházelo k jejich páření, které by mohlo významně ovlivnit měřené fyziologické a imunitní parametry.

Pro získání hemolymfy z těl sluněček byla vytvořena vlastní metoda odběru. Jedinci byli přichytáváni za pomoci oboustranné lepicí pásky na speciálně upravenou část Petriho misky (příloha 2). Odběr hemolymfy byl zajištěn metodou reflexního krvácení (podrobněji popsáno v předchozím experimentu). Kapka čerstvě vyroněné hemolymfy (cca 0,5 – 1,5 μ l) byla nasáta vlivem kapilární elevace do skleněné mikrokapiláry (značka: Hirschmann, Německo; příloha 3). Objem odebraného vzorku hemolymfy byl následně změřen ve skleněné mikrokapiláře pomocí posuvného měřítka a vyfouknut do 50 μ l pufru. Následně byl vzorek naředěn do konečného poměru 1 μ l čisté hemolymfy ku 100 μ l antikoagulačního pufru. Složení pufru podle Firlej et al. (2012) je následující: 62 mM chloridu sodného, 100 mM glukózy, 10 mM EDTA, 30 mM citronanu sodného a 26 mM kyseliny citronové. Po naředění vzorků v antikoagulačním pufru byla ihned analyzována koncentrace cirkulujících hemocytů v hemolymfě obsažená u obou metod odběru,

zbylý objem vzorků byl zmražen při - 25 °C pro další měření fyziologické a imunitní parametry.

3.2.3 Metodika - měření vybraných fyziologických a imunitních parametrů

Měření vybraných fyziologických a imunitních parametrů bylo rozděleno na dvě fáze. V první fázi byla zjištěna koncentrace hemocytů cirkulujících v hemolymfě. Hemocyty byly měřeny proto, že jejich tvorba je poměrně energeticky náročná pro organismus a jejich velká velikost by mohla umožňovat mechanickou filtraci. Z evolučního hlediska by tak mohlo být výhodné hemocyty z hemolymfy neztrácet. Zjištění koncentrace cirkulujících hemocytů v 1 μ l hemolymfy bylo analyzováno pod světelným mikroskopem značky Olympus CX31 (Japan). U všech získaných vzorků bylo odebráno pomocí automatické pipety 7,5 μ l roztoku hemolymfy s antikoagulačním pufrem. Napipetované vzorky, v původním poměru ředění 1 μ l čisté hemolymfy na 100 μ l antikoagulačního pufru, byly postupně aplikovány na Bürkerovu počítací komůrku (příloha 4). Počet hemocytů byl vždy sečten v padesáti velkých čtvercích komůrky při celkovém zvětšení mikroskopu čtyřístakrát (příloha 5). Přesný postup počítání hemocytů v Bürkerově komůrce a následný přepočet zjištěného počtu hemocytů na koncentraci hemocytů v 1 μ l čisté hemolymfy je zobrazen v přílohách 8 a 9. Zbývající objem odebraných vzorků byl zmražen a později převezen na Přírodovědeckou fakultu Masarykovy univerzity v Brně (Ústav experimentální biologie), kde byla Mgr. Pavlem Dobešem, Ph.D., zjištěna antimikrobiální aktivita proti gramnegativním bakteriím *Escherichia coli* a koncentrace bílkovin v hemolymfě.

Koncentrace bílkovin (mg/ml) v hemolymfě byla zjištěna pomocí Bradfordovi metody měření proteinů. Do jednotlivých plástů pro pozdější analýzu ve spektrofotometru bylo nanášeno vždy 5 μ l ředěné hemolymfy (1:100) smíchané se speciálním přípravkem (Bio-Rad, USA). Ze sady přípravku Bio-Rad bylo přidáno do antikoagulačního pufru s hemolymfou 25 μ l reaktantu A a poté 200 μ l reaktantu B. Důležité je dodržet pořadí přidávání jednotlivých přípravků, jelikož díky správnému užití dochází k chemické reakci mědi s bílkovinovými strukturami, což způsobuje žádoucí namodráání celého roztoku pro pozdější analýzu. Po cca 15 minutách čekání bylo zjištěno množství absorbovaného světla ve spektrofotometru (měřeno při $\lambda = 700 - 750$ nm). Následně bylo možné za pomoci kalibrační křivky porovnání míry absorpce s přesně definovaným standardem (v tomto případě byl standardem přípravek Bio-La-Test® LYONORM, Česká republika) a vypočítat koncentraci bílkovin.

Antimikrobiální aktivita hemolymfy měřená u gramnegativních bakterií byla zjištěna metodou bioluminometrie za použití geneticky modifikovaného kmene bakterie *Escherichia coli* (K12). Tento kmen bakterie obsahuje svítící enzym, luciferázu. Metoda vychází ze základní myšlenky, že míra bioluminiscenčního signálu je přímo úměrná přežívání bakterií. Podrobnější popis metody a příprava ředění bakterií pro následnou aplikaci je popsána v práci Vojtek et al. (2014). Pro luminometrické měření bylo použito 40 μ l zředěné hemolymfy z původních

mražených vzorků. Tento roztok byl smíchán se 120 μ l PBS (pH= 7) s přibližným počtem 100 000 bakteriálních buněk. Po napipetování vzorků na předem připravenou destičku luminometru byl sledován počet světelných signálů za sekundu (tzv. CPS), vše bylo zaznamenáváno po dobu deseti minut. Po uplynutí deseti minut působení roztoku hemolymfy na roztok bakterií byla výsledná hodnota (svítivost daného vzorku) porovnána se svítivostí kontrolního vzorku (jen PBS bez hemolymfy) a byla vypočtena mortalita bakterií (0 % = svítivost jako kontrolní vzorek; 100 % = všechny bakterie mrtvé = nulová svítivost vzorku).

3.2.4 Metodika - analýza dat

Pro analýzu ontogenetických změn v měřených imunitních a fyziologických parametrech *Harmonia axyridis* byly použity zobecněné lineární modely se smíšenými efekty (GLMMs). Každý měřený parametr byl analyzován v samostatných modelech, tedy: 1) koncentrace cirkulujících hemocytů v hemolymfě, 2) antimikrobiální aktivita proti *Escherichia coli* (K12) a 3) koncentrace bílkovin v hemolymfě. Identita rodičovského páru byla vždy použita jako náhodný efekt pro zohlednění různých genotypů. Pro každý měřený parametr byly vytvořeny dva modely. V prvním modelu byla jako pevný efekt použita ontogenetická etapa vývoje (tj. larvy 3. a 4. instaru, prepupa, 1, 2, 4, 8, 16 a 32 dní stáří dospělci). Pro zjištění statisticky významných rozdílů mezi jednotlivými ontogenetickými etapami bylo použito post-hoc testování pomocí Tukeyho kontrastů. Tento model si kladl za cíl zkoumat změny imunitních a fyziologických parametrů napříč celým zkoumaným obdobím vývoje (larvy až 32 dní starí dospělci). Druhý model zkoumal jen změny v imunitních a fyziologických parametrech u dospělců (1 až 32 dní starých), ale rozlišoval i vliv pohlaví. Jako nezávislé proměnné tak bylo použito stáří jedince, jeho pohlaví a interakce mezi stářím a pohlavím. V modelech zkoumajících koncentraci bílkovin v mg/ml hemolymfy a koncentraci hemocytů cirkulujících v hemolymfě bylo použito gamma rozdělení chyb. Data závislé proměnné totiž mohou teoreticky nabývat všech reálných hodnot v intervalu $(0, \infty)$. Mortalita gramnegativních bakterií *Escherichia coli* (K12) po prvních deseti minutách měření pomocí luminometru byla analyzována pomocí modelů s binomickým rozdělením chyb. Proměnná totiž nabývala hodnot 0 až 100 %, kde 0 % byla mortalita odpovídající kontrolnímu vzorku (tedy nulová) a 100 % mortalita představovala situaci, kdy všechny bakterie zemřely do 10 minut od přidání roztoku s hemolymfou. Data byla analyzována pomocí programu R verze 3. 0. 3. (R Core Team 2014).

Nulové hypotézy byly pro jednotlivé modely stanoveny následovně:

Model 1a: Koncentrace cirkulujících hemocytů v 1 μ l hemolymfy není závislá na ontogenetickém vývoji jedinců.

Model 1b: Koncentrace cirkulujících hemocytů v 1 μ l hemolymfy není závislá na pohlaví jedince.

Model 2a: Koncentrace bílkovin (mg/ml) obsažených v hemolymfě není závislá na ontogenetickém vývoji jedinců.

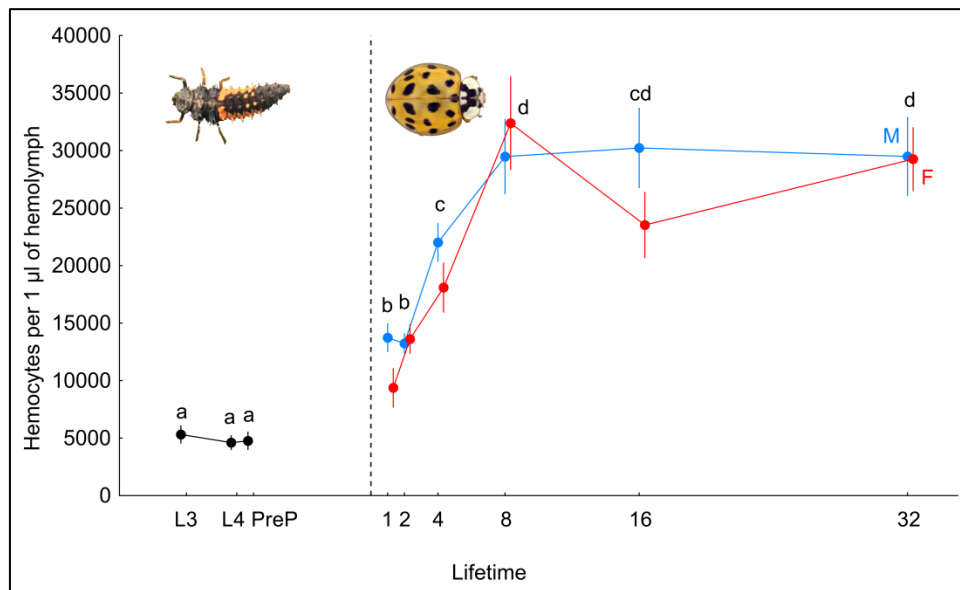
Model 2b: Koncentrace bílkovin (mg/ml) obsažených v hemolymfě není závislá na pohlaví jedince.

Model 3a: Mortalita gramnegativních bakterií *Escherichia coli* (K12) v hemolymfě při desetiminutovém měření v luminometru není závislá na ontogenetickém vývoji jedinců.

Model 3b: Mortalita gramnegativních bakterií *Escherichia coli* (K12) v hemolymfě při desetiminutovém měření v luminometru není závislá na pohlaví jedince.

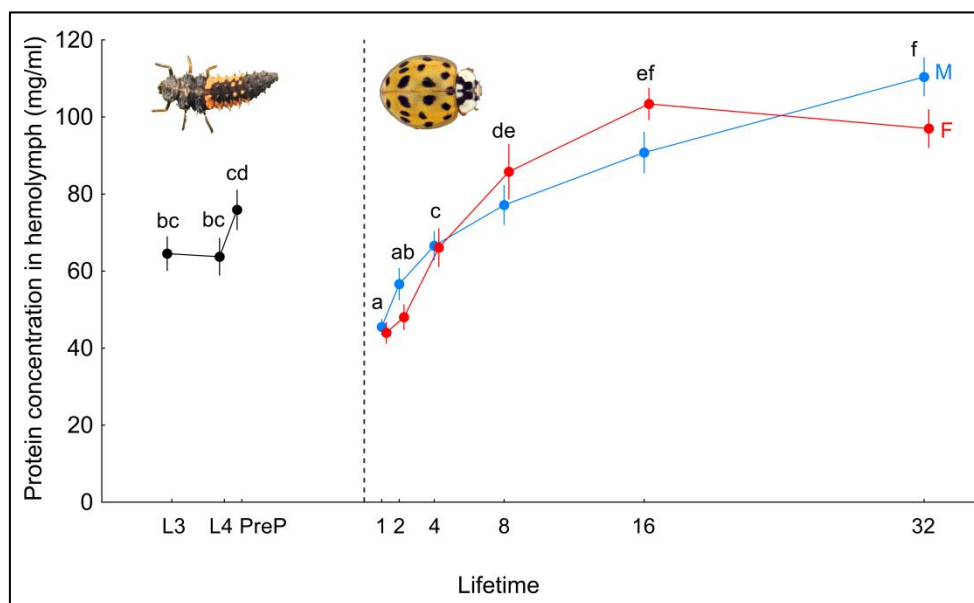
3.2.5 Výsledky

Koncentrace hemocytů v 1 μ l hemolymfy slunéčka *H. axyridis* se průkazně liší v průběhu ontogenetického vývoje (GLMM: $F=30,40$; $P < 0,001$; obrázek 4). Během larválního vývoje se koncentrace příliš nemění a je v průměru 5000 hemocytů v 1 μ l hemolymfy. Koncentrace hemocytů dále roste až do 8. dne stáří dospělé (v průměru 30000 hemocytů v 1 μ l hemolymfy). Během dalšího života dospělého (do 32. dne stáří) již zůstává koncentrace hemocytů v hemolymfě víceméně konstantní.



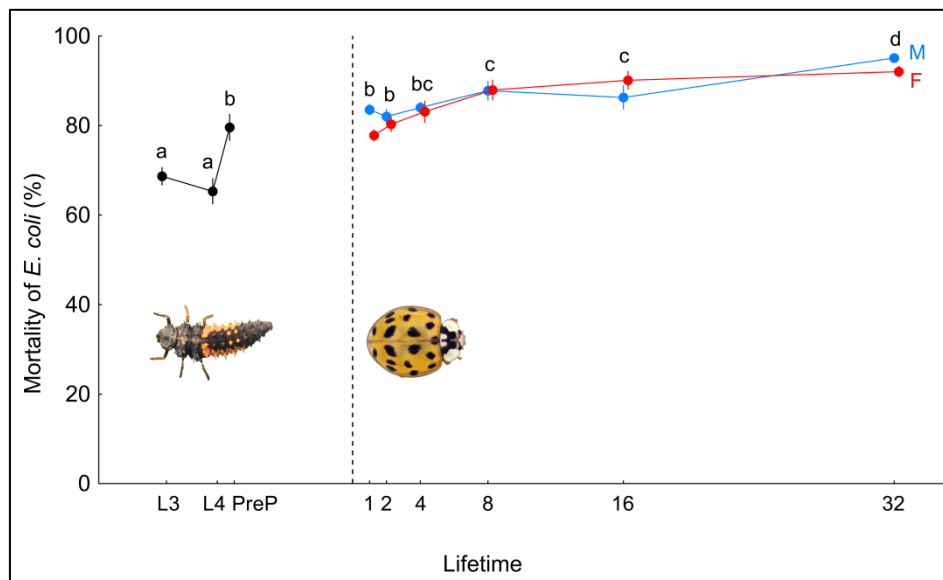
Obrázek 4: Vývoj koncentrace hemocytů v hemolymfě *H. axyridis* v průběhu ontogeneze (Hemocytes per 1 μ l of hemolymph). Délka života dospělce (Lifetime) je uvedena ve dnech, vždy od procesu vykuknutí (vpravo od přerušované čáry). Preimaginální vývojová stádia jsou označena následujícím způsobem: L3 = larva 3. instaru, L4 = larva 4. instaru a PreP = prepupální stupeň ve čtvrtém larválním stádiu. Stádia, která navzájem nesdílejí stejné písmeno, vykazují statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) v koncentraci hemocytů. Průměrné hodnoty, doplněné o střední chybu průměru (\pm SE), jsou pro dospělé uvedeny zvlášť pro jednotlivá pohlaví (M) a (F).

Koncentrace bílkovin obsažených v hemolymfě (mg/ml) se také signifikantně lišila v průběhu ontogeneze (GLMM: $F= 31,06$; $P < 0,001$; obrázek 5). Nejnižší koncentrace bílkovin byla pozorována u čerstvě vylíhlých dospělců (cca 45 mg/ml hemolymfy). Středních hodnot dosahovala preimaginální stádia (cca 70 mg/ml hemolymfy) a nejvyšší koncentrace byla zaznamenána u 8 a více dní starých dospělců, kolem 100 mg/ml hemolymfy.



Obrázek 5: Vývoj koncentrace bílkovin v hemolymfě *H. axyridis* v průběhu ontogeneze (Protein concentration in hemolymph mg/ml). Délka života dospělců (Lifetime) je uvedena ve dnech, vždy od momentu vykuklení (vpravo od přerušované čáry). Preimaginální vývojová stádia jsou označena následujícím způsobem: L3 = larva 3. instaru, L4 = larva 4. instaru a PreP = prepupální stupeň ve čtvrtém larválním stádiu. Stádia, která navzájem nesdílejí stejné písmeno, vykazují statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) v koncentraci bílkovin. Průměrné hodnoty, doplněny o střední chybu průměru (\pm SE), jsou uvedeny zvlášť pro jednotlivá pohlaví (M) a (F).

Antimikrobiální aktivita hemolymfy *H. axyridis* proti *Escherichia coli* (K12) se také statisticky průkazně změnila v průběhu ontogeneze (GLMM: $F = 29,82$; $P < 0,001$; obrázek 6). Úbytek přežívání (viability) bakterií ve srovnání s kontrolními bakteriemi byl nejvyšší u nejstarších dospělců (mortalita bakterií cca 95 %). Naopak hemolymfa larválních stádií dovolila přežití podstatné části bakterií (až 40 %).



Obrázek 6: Změna antimikrobiální aktivity hemolymfy *H. axyridis* vůči bakteriím *Escherichia coli* během ontogeneze (Mortality of *E. coli*). Délka života dospělců (Lifetime) je uvedena ve dnech, vždy od procesu vykuknutí (vpravo od přerušované čáry). Preimaginální vývojová stádia jsou označena následujícím způsobem: L3 = larva 3. instaru, L4 = larva 4. instaru a PreP = prepupální stupeň ve čtvrtém larválním stádiu. Stádia, která navzájem nesdílejí stejné písmeno, vykazují statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) v procentuální úmrtnosti bakterií. Průměrné hodnoty, doplněny o střední chybu průměru (\pm SE), jsou uvedeny zvlášť pro jednotlivá pohlaví (M) a (F).

3.2.6 Diskuze

V ontogenetické studii byly zjištěny podstatné změny ve fyziologických a imunitních parametrech v závislosti na vývojovém stádiu invazního druhu *H. axyridis*. Významná změna ve fyziologických a imunitních parametrech v průběhu ontogeneze má evoluční i metodické důsledky. Navíc výsledky této studie podporují již dříve publikované studie o velice účinném fungování imunitního systému invazního slunéčka *H. axyridis* (Roehrich et al. 2012, Schmidtberg et al. 2013, Vogel et al. 2017).

Obecně platí, že studie zkoumající ontogenezi buněčné imunity hmyzu často ukazují vyšší koncentrace hemocytů během larválního vývoje (Gardiner et Strand 2000, Lanot et al. 2001, Strand 2008, Wilson - Rich et al. 2008, Tan et al. 2013) a naopak snížení koncentrace hemocytů v dospělosti (Hillyer et al. 2005; King et Hillyer 2013; Park et al. 2011; Wilson - Rich et al. 2008). V této studii lze však pozorovat mírný propad koncentrace hemocytů během larválního vývoje. V průběhu života larev totiž dochází k výraznému zvětšování velikosti těla a tak může být pokles hemocytů způsoben zvýšením objemu hemolymfy (naředěním koncentrace cirkulujících hemocytů), ačkoliv nemuselo dojít ke snížení tvorby nových imunitních

buněk. Celkově larvy *H. axyridis* mají velice nízké koncentrace hemocytů. Studie na motýlech *Pseudoplusia includens* (Walker, 1857) a *Spodoptera frugiperda* (Smith 1797) však během larválního stádia zaznamenala nárůst koncentrace hemocytů i celkového objemu hemolymfy (Gardiner et Strand 2000). Další možné vysvětlení nižší koncentrace hemocytů v larválních stádiích je spojeno s životní strategií preimaginálního vývoje. Larvy slunéčka východního potřebují rychle zpracovat dočasný zdroj potravy a při nedostatku potravy inklinují dokonce ke kanibalismu (Hodek et al. 2012). Proto musí pravděpodobně investovat vyšší množství energie spíše do rychlého růstu nežli do buněčné imunity (Labrie et al. 2006, Dmitriew 2011, Knapp 2014). Zvyšující se koncentrace hemocytů během rané fáze dospělosti *H. axyridis* je opět v určitém rozporu se studiiemi včel, komárů či cvrčků (Hillyer et al. 2005, Wilson - Rich et al. 2008, Park et al. 2011, King et Hillyer 2013). Zvyšující se koncentrace hemocytů během prvních 8 dnů života dospělců slunéčka východního může opět vycházet ze životní strategie druhu. Dospělci jsou poměrně dlouho žijící zvířata s výbornou schopností přezimování a možností vytvoření až tří generací za sezonu. Jelikož se druh spoléhá na svou dlouhověkost, mohlo by se mu vyplatit během prvních dní života dospělců investovat do tvorby hemocytů a zvýšit tak svou budoucí fitness (Hodek et al. 2012). Toto tvrzení by mohla podpořit i studie šídlatky velké (*Lestes viridis* Vander Linden, 1825). Dospělci této šídlatky jsou známy extrémně dlouhým obdobím pohlavní zralosti a v rané fázi života dospělců byl u tohoto druhu také zaznamenán postupný nárůst koncentrace hemocytů (Sternberg et Buchwald 1999, Rolff 2001).

Hemolymfa, podobně jako bílkoviny obsažené v ní, má mnoho fyziologických funkcí, například ukládání živin, hormonální regulace či imunitní reakce chránící tělo před případným patogenem (Kodrík 2004). Cílem proto bylo sledovat rozdíly v koncentraci bílkovin v průběhu ontogeneze *H. axyridis*. Recentní studie zkoumaly závislost koncentrace bílkovin v hemolymfě na hladovění (Handke et al. 2013) či stresu vyvolaným nedostatkem vody (Wilson - Rich et al. 2008), ale téměř neexistují studie, které řeší možný vliv ontogeneze přímo na koncentraci bílkovin. Výsledky mé studie naznačují, že koncentrace bílkovin se významně mění v průběhu ontogeneze. Například zvýšení koncentrace proteinů v prepupálním období je známo i u jiných druhů hmyzu s proměnou dokonalou (*Bombyx mori* Linnaeus, 1758; Wyatt et al. 1956). Rychlý pokles koncentrace bílkovin v hemolymfě, ke kterému došlo po vylíhnutí dospělců, může souviset s výraznou přestavbou těla během stádia kukly. Proces metamorfózy je totiž doprovázen řadou hormonálních změn, které zároveň zvyšují energetické náklady pro organismus (Nation 2015). Při porovnání koncentrace bílkovin *H. axyridis* s jinými zástupci hmyzu lze z literatury zjistit, že je srovnatelná s úrovní pozorovanou u *Galleria mellonella* (konečná larvální stádia cca 80 - 100 mg/ml; Wyatt et al 1956), ale je vyšší než u *Apis mellifera* (cca 2 - 40 mg/ml; Wilson - Rich et al 2008) či u *Bombyx mori* (larvy a kukla dosahují hodnot cca 12 - 52 mg/ml; Wyatt et al. 1956).

Výsledky studie dále ukazují extrémně vysokou konstitutivní antimikrobiální aktivitu hemolymfy *H. axyridis*, která převyšuje i některé jiné druhy slunéček (např.

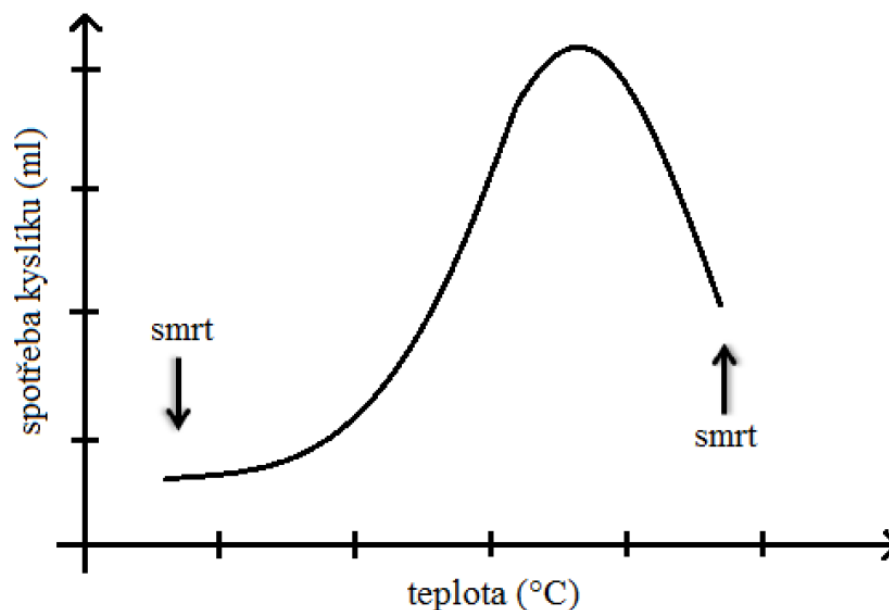
Coccinella septempunctata; Gross et al. 2010; Schmidtberg et al. 2013). Účinnost proti gramnegativním bakteriím *Escherichia coli* (K12) byla dokonce přibližně čtyřnásobně vyšší v larválním stádiu v porovnání s druhem *Bombyx mori* a až pětinašobně vyšší u dospělců (Vojtek et al. 2014). V hemolymfě *H. axyridis* bylo totiž popsáno vícero faktorů s aktivitou vůči gramnegativním bakteriím, například: attaciny, coleoptericiny či silný alkaloid harmonin (Roehrich et al. 2012, Vilcinskas et al. 2013, Beckert et al. 2015, Vogel et al. 2017). Pro lepší srovnání měřené antimikrobiální aktivity proti *Escherichia coli* (K12) bohužel v literatuře chybí podrobnější studie. Pouze Schmidtberg et al. (2013) zjistili významně vyšší antimikrobiální aktivitu proti *Escherichia coli* u dospělců *H. axyridis* v porovnání s larvami blíže nespecifikovaného věku. Naproti tomu Gross et al. (2010) zase zjistili, že dospělci *H. axyridis* mají podobnou přirozenou antimikrobiální aktivitu proti *Escherichia coli* jako larvy 4. instaru. Výsledky mého experimentu zaměřeného na ontogenezi imunitního systému *H. axyridis* naznačují, že rozdíl ve výsledcích výše uvedených studií může být způsoben porovnáním různých ontogenetických stádií. Pro budoucí experimenty je z hlediska antimikrobiální aktivity proti *Escherichia coli* velmi důležité znát přesné stáří jednotlivých zkoumaných jedinců. Sledování změn v antimikrobiální aktivitě v průběhu ontogeneze larev však existuje například pro *Drosophila melanogaster*. V tomto případě obecně platí, že exprese genů antimikrobiálních peptidů je stabilní nebo se mírně zvyšuje v průběhu larválního vývoje a v prepupální fázi nastává podstatné zvýšení exprese (Benešová et al. 2009, Laughton et al. 2011).

Ačkoliv pohlavní dimorfismus u imunitního systému a obsahu proteinů v hemolymfě je u hmyzu velmi častý (McKean et Nunney 2005, Nunn et al. 2009, Schwenke et al. 2016), nebyly v případě dospělců *H. axyridis* mezi samcem a samicí statisticky průkazné rozdíly. Možným vysvětlením je fakt, že optimální standardizované podmínky chovu neumožňují naplno projevit případné rozdíly v pohlavní identitě, ale v přirozených podmínkách naopak mohou být tyto rozdíly naplno realizovány (McKean et Nunney 2005). Rozdíly mezi pohlavním mohou být například pozorovány až po napadení patogenem. V tomto případě pravděpodobnost nákazy patogenem v laboratorních podmínkách je mnohonásobně nižší než ve volné přírodě (Freitak et al. 2012, Koegel et al. 2012, Moreno - Garcia et al. 2015, Khan et al. 2016).

3.3 Vliv teploty během stádia kukly na koncentraci cirkulujících hemocytů u 24 hodin a jeden týden starých dospělců *Harmonia axyridis*

3.3.1 Uvedení do problematiky

Teplota je jedním z nejvýznamnějších abiotických faktorů, který ovlivňuje fyziologické vlastnosti hmyzu včetně fungování jeho imunitního systému. Zástupci hmyzu jsou ektotermními (poikilotermními) organismy a nejsou tedy schopni přímo řídit svou teplotu těla. Hmyz je pouze schopný v krátkých časových intervalech využívat fyziologické a behaviorální termoregulace, z dlouhodobého hlediska jsou podobné mechanismy pro organismus však neudržitelné. Obecně lze říci, že s rostoucí teplotou prostředí roste intenzita metabolismu, proto také stoupá spotřeba kyslíku. Pokud intenzita metabolismu dosáhne svého maxima a teplota se dále zvyšuje, dojde k destrukčním procesům buněčných struktur (tzv. denaturace). Celý proces může končit až smrtí jedince. K obdobným destrukčním procesům samozřejmě dochází i při extrémním snižování teploty, dojde totiž k překonání kritické chladové zóny (Chown et Nicolson 2004, Kodrík 2004, Kuhrt et al. 2005, McCue et Santos 2012, obrázek 7).



Obrázek 7: Graf vyjadřující závislost mezi okolní teplotou prostředí a intenzitou metabolismu vyjádřenou spotřebou kyslíku (ml). V extrémních hodnotách teplot dochází ke smrti druhu. Zdroj: Kodrík, 2004.

Rozsah teplot, ve kterých jsou jednotliví zástupci hmyzu schopni žít je velmi různorodý, důvodem je odlišná adaptace druhů na okolní prostředí. Schopnost druhu přežít v určitém teplotním rozpětí lze vyjádřit pomocí tzv. vitální zóny jednotlivých druhů. Uvnitř zóny lze najít pásmo optimální teploty, typické optimálním průběhem fyziologických procesů, horní mez (kritická tepelná zóna) a spodní mez (kritická chladová zóna). V kritických mezních hodnotách jsou životní procesy druhů již narušeny, a pokud dojde k výraznější odchylce od kritických zón, dochází ke smrti jedince. Jelikož jednotlivé faktory ovlivňující fyziologické procesy jsou často synergické, je přesné vymezení teplotních zón v praxi velmi obtížné (Kodrík 2004).

Existují přímo studie dokazující, že teplota okolního prostředí může ovlivňovat imunitní systém hmyzu, a to humorální i buněčnou část (Catalán et al. 2012). Adamo et Lovet (2011) se ve studii provedené na cvrčkovi (*Gryllus texensis* Cade et Otte, 2000) zabývali humorálními faktory imunity. Bylo zjištěno, že lehce vyšší teplota okolního prostředí odchýlená od optima vitální zóny zvýšila aktivitu fenoloxidázové kaskády a dokonce i výskyt enzymů s podobnou funkcí jako lysozym. Při výraznějším snížení či zvýšení teploty, přesahující už rozpětí vitální zóny druhů je způsoben fyziologický stres, který vede naopak ke snížení imunitních reakcí (Karl et al. 2011). Například studie na bourci morušovém dokazuje snižování aktivity imunitního systému u významně vysokých teplot. Kukly motýla byly rozděleny do dvou skupin. První skupina zažívala optimální teplotu (26 °C) pro vývoj. Druhá skupina kukel byla naopak vystavena extrémní teplotě pro vývoj (38 °C). Ve studii zjistili, že koncentrace hemocytů byla výrazně nižší právě u jedinců, kteří prodělali vývoj v extrémní teplotě (Kuhrt et al. 2005). U larev *Galleria mellonella* byla také zjištěna snížená imunitní aktivita při vystavení extrémní teplotě (40 °C). Zajímavé však ve studii bylo zjištění, že v rozpětí teplot 4 °C až 37 °C byl prokázán pozitivní vliv zvyšující se teploty na koncentraci hemocytů. Pravděpodobně toto rozpětí ještě nepředstavovalo významnější odchýlení od vitální zóny, naopak teplota 40 °C již ano (Ghasemi et al. 2013).

Metabolismus druhu *Harmonia axyridis* je samozřejmě také ovlivněn okolní teplotou prostředí. Katabolické procesy druhu jsou nejvyšší kolem 5 °C, naopak anabolické jsou maximální při teplotě 25 - 30 °C. Spodní hranice pro vývoj larev je kolem 11 °C (Stathas et al. 2011). Vitální zóna druhu se nachází pravděpodobně v rozmezí teplot mezi 14 až 28 °C (Castro et al. 2011). Horní hranice pro vitální zónu je pak odhadována kolem teplot 33 až 38 °C, vše v závislosti na vývojovém stádiu (Knapp et Nedvěd 2013).

Na závěr úvodu do problematiky vlivu teploty na imunitní systém hmyzu je důležité ještě zmínit, že při imunitní odpovědi jedince na patogeny někdy dochází také k ovlivnění patogenu touto teplotou. Teplota okolního prostředí může totiž ovlivnit jeho virulentní schopnosti (Inglis et al. 1996).

3.3.2 Metodika - chov jedinců

Celá experimentální část práce byla provedena v laboratoři PřF JU v roce 2014 ve spolupráci s Ing. Michalem Knappem Ph.D. a doc. RNDr. Oldřichem Nedvědem CSc. Rodičovské páry sluněček připravené pro tuto studii pocházeli z jedinců sebraných v kampusu JU v Českých Budějovicích v témže roce. Následně bylo náhodně vybráno ze sebraných jedinců 7 rodičovských párů. Vybrané zakládající rodičovské páry byly krmeny kyjatkou hrachovou (*Acyrtosiphon pisum* Harris, 1776), mšicím byla podávána potrava v podobě bobu obecného (*Vicia faba* Linnaeus). Jednotlivé rodičovské páry byly ubytovány ve vlastní Petriho misce obsahující filtrační papír složený do harmoniky. Papír sloužil jako materiál pro kladení snůšek vajíček a jako případné místo určené k aplikaci potravy. Neomezené množství tekutin bylo zajišťováno jednak pomocí vody obsažené

v mšicích a z části též namočenou buničitou vatou, která měla vždy rozměr 2 cm x 2,5 cm. Pro dosažení režimu *ad libitum* bylo nutné kontrolovat a doplňovat potravu a vodu každý den. Rodičovská generace byla chována ve standardizovaných podmínkách v klimatických komorách (Sanyo MIR-155) při teplotě 26 °C, relativní vlhkosti vzduchu 70 % a fotoperiodě nastavené na dlouhý den (16L: 8D).

Snůšky vajec byly každý den kontrolovány a v případě vylíhnutí larev předány do nových misek. U všech čerstvě nakladených snůšek byl pak zaznamenán datum líhnutí a identita rodičovského páru. Potomci (vajíčka až prepupy) byli ponecháni ve standardizované teplotě 26°C a relativní vlhkosti 70%. Všechny larvy z jedné snůšky byly vždy ponechány v jediné Petriho misce až do třetího instaru. Po svléknutí larev do třetího larválního instaru nastalo přerozdělení jedinců přibližně po čtyřech kusech vždy do jediné Petriho misky. Takto byly larvy ponechány až do posledního larválního stadia a opět jim byl každodenně kontrolován přísun živin (příloha 10). Potomci (larvy) byli krmeni vajíčky zavíječe *Ephestia kuehniella*.

Během čtvrtého instaru došlo k rozdělení larev do samostatných Petriho misek a opět jim byly zajištěny stejné standardizované podmínky. Po přechodu larev do stadia prepupy byla důkladně vyčištěna celá Petriho miska od veškerých organických zbytků, aby nedocházelo k ovlivnění čerstvě líhnutých dospělců touto potenciální potravou.

Prepupy metamorfované v čerstvé kukly byly dále rozděleny na tři skupiny a umístěny do dalších klimaboxů nastavených na tři různé teplotní režimy (17 °C, 26 °C a 35 °C). Nejnižší nastavený teplotní režim pro vývoj kukel byl pouze několik stupňů nad spodním teplotním vývojovým prahem druhu. Vývoj v 17 °C je proto nejdélsí, metabolické procesy nejpomalejší a melanizace kutikuly u nově vylíhlých dospělců největší. Teplota 26°C reprezentuje prostředí uvnitř optimální vitální zóny druhu, proto i vývoj kukly v těchto podmínkách by měl být nejméně komplikovaný. Horní teplotní režim (35°C) je na hranici vitální zóny a přežití druhu v těchto podmínkách je již značně komplikované. Kuklám byla do Petriho misky pravidelně dodávána voda, aby netrpěly případným vysycháním (obzvláště v teplotě 35°C).

Ve všech nastavených teplotních režimech byla každý den ráno a večer prováděna kontrola kukel, aby bylo zaznamenáno líhnutí čerstvých dospělců. Nově vylíhnutí dospělci byli přeneseni do standardizované teploty 26 °C. Každý vylíhnutý jedinec obdržel ihned specifický identifikační kód s datem vylíhnutí a identitou rodičů, který byl druhý den doplněn ještě o určení pohlaví. Následně byli brouci rozděleni na několik částí pro vlastní experimenty. V případě zjišťování koncentrace cirkulujících hemocytů v 1μl hemolymfy bylo zapotřebí brouky rozdělit do dvou skupin. První skupina byla analyzována 24 hodin po vylíhnutí dospělců a druhá skupina byla analyzována po týdnu života brouků. Brouci ponecháni po týden v laboratorních podmínkách byli krmeni vajíčky zavíječů, byla jim poskytnuta voda, klimaboxy byly nastaveny na 26°C a dlouhý den (16L: 8D). Jeden den před odběrem hemolymfy pro měření koncentrace hemocytů byli již brouci ponecháni bez přístupu k jídlu, ponechána jim byla pouze voda.

3.3.3 Metodika - odběr hemolymfy a zjišťování koncentrace hemocytů

Koncentrace cirkulujících hemocytů obsažených v 1 μ l hemolymfy byla opět zjišťována pomocí Bürkerovy počítací komůrky. Nejprve byl za odborné pomoci doc. RNDr. Oldřicha Nedvěda CSc., připraven fosfátový pufr (PBS). Funkce pufru byla převážně ředící a částečně antikoagulační, nicméně v současné době již fosfátový pufr nahrazujeme sofistikovanějším s výrazně vyšší antikoagulační schopností, který je zároveň schopen do určité doby i imunitní buňky vyživovat.

Odběr hemolymfy z těla sluněček byl zajišťován vlastní metodou odběru. Jedinci byli opatrně uchyceni mezi ukazováčkem a palcem levé ruky, následně došlo za pomoci sterilizované jehly k „šetrnému“ narušení hrudní části těla, obvykle v oblasti předohrudí. Vyroněná hemolymfa pak byla pomocí kapilárních sil nasáta do skleněné mikrokapilární trubičky (značka: Hirschmann, Německo; příloha 3 a 11). Objem hemolymfy uvnitř mikrokapiláry byl zjištěn pomocí posuvného měřítka. Vzorek hemolymfy byl dále přesunut z mikrokapilární trubičky do předpřipravené zkumavky obsahující 200 μ l antikoagulačního pufru. Naředěná směs hemolymfy a PBS byla nakonec stejnoměrně promíchána.

Koncentrace cirkulujících hemocytů byla zjištěna pod světelným mikroskopem (Arsenal). Na Bürkerovu počítací komůrku byl u všech vzorků nanášen objem 25 μ l zředěné hemolymfy s PBS. Každý vzorek byl počítán dvakrát ve všech velkých čtvercích komůrky, výsledný počet byl zjištěn střední hodnotou pomocí aritmetického průměru z těchto dvou měření. Přesný postup započítávání hemocytů je k nahlédnutí v příloze 12. Zjištěný průměr byl nakonec přepočítán na koncentraci hemocytů v 1 μ l čisté hemolymfy, vztah pro výpočet je k nahlédnutí v příloze 13.

3.3.4 Metodika - analýza dat

Data pro jednodenní i týden staré dospělé byla společně analyzována pomocí zobecněných lineárních modelů se smíšenými efekty (GLMM) s quasi-poissonovým rozdělením chyb. Koncentrace hemocytů v hemolymfě byla závislou proměnnou, teplota během stádia kukly (17°C, 26°C či 35°C), pohlaví, stáří jedince (1 či 7 dní) a všechny možné interakce mezi těmito proměnnými byly použity jako proměnné nezávislé. Po nafitování maximálního modelu obsahujícího všechny možné nezávislé proměnné byl model následně zjednodušen (procesem „backward selection“) na finální model obsahující pouze proměnné s průkazným efektem. Identita rodičovského páru byla v modelu použita jako náhodný efekt. Za účelem přehledné prezentace dat byl dále proveden post-hoc test (Tukey), který ukazuje signifikanci rozdílu mezi jednotlivými kombinacemi faktorů (teplota x pohlaví x stáří; viz obrázek 8). Analýza dat byla provedena ve statistickém programu R verze 3.0.3. (R Core Team 2014) s využitím balíčků MASS, nlme a multcomp.

Nulové hypotézy byly pro model stanoveny následovně:

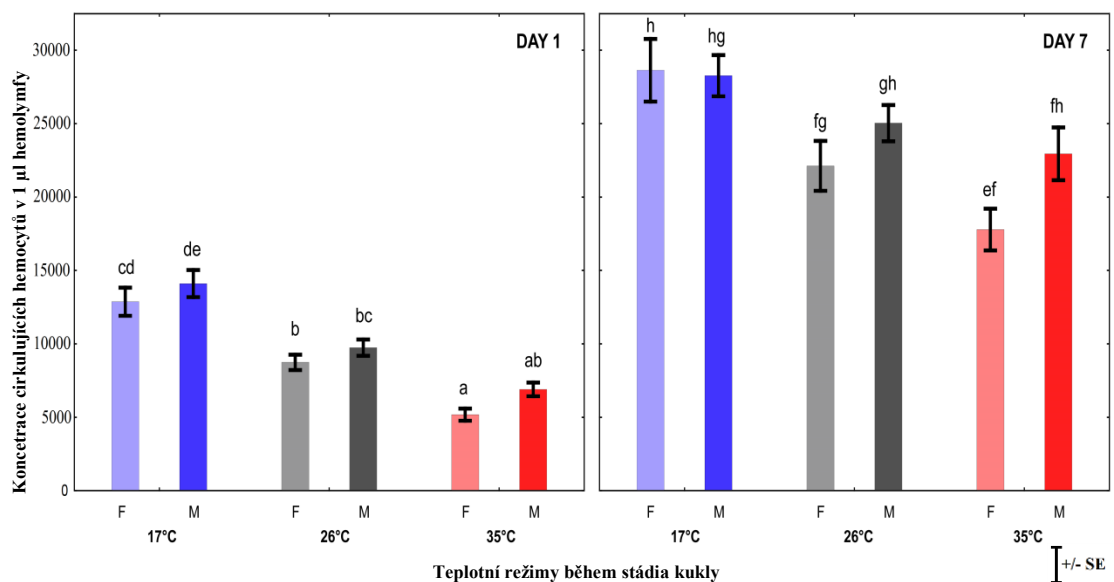
H_{01} : Koncentrace hemocytů v hemolymfě nezávisí na teplotě zažité během stádia kukly.

H₀₂: Koncentrace hemocytů v hemolymfě nezávisí na pohlaví jedince.

H₀₃: Koncentrace hemocytů v hemolymfě nezávisí na stáří jedinců.

3.3.5 Výsledky

Teplota během stádia kukly významně ovlivnila koncentraci hemocytů v hemolymfě dospělců (GLMM: $F = 26,17$; $P < 0,001$). Strmý propad koncentrace hemocytů s rostoucí teplotou během stádia kukly je patrný především u jednodenních brouků (interakce teplota:stáří jedince; GLMM: $F = 8,95$; $P < 0,001$). Dále byl prokázán také významný rozdíl v koncentraci hemocytů mezi samci a samicemi (GLMM: $F = 8,55$; $P = 0,004$). Rozdíl mezi pohlavími se zvětšoval s rostoucí teplotou, které byli jedinci vystaveni během stádia kukly (interakce teplota: sex; GLMM: $F = 3,05$; $P = 0,049$). Koncentrace hemocytů se také významně lišila mezi hemolymfou odebranou první a sedmý den života brouků (GLMM: $F = 462,67$; $P < 0,001$). V průběhu ontogenetického vývoje dospělců totiž došlo k nárůstu koncentrace hemocytů a byl tak částečně smazán rozdíl mezi jednotlivými teplotami zažitými během stádia kukly. Graficky jsou výsledky shrnuty v obrázku 8.



Obrázek 8: Vývoj koncentrace hemocytů v hemolymfě *H. axyridis* u 24 hodin a jeden týden starých dospělců v závislosti na teplotě zažité během stádia kukly. Sloupečky, které spolu nesdílejí stejné písmeno, vykazují statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$; Tukey post-hoc test). V grafu jsou zobrazeny průměrné hodnoty, doplněné o střední chybu průměru (\pm SE). Data jsou ukázána samostatně pro jednotlivá pohlaví (M) a (F).

3.3.6 Diskuze

Teplota během stádia kukly významně ovlivnila zkoumanou část buněčné imunity dospělců. Ovlivnění imunitního systému hmyzu teplotou prostředí potvrzuje řada nedávných studií zabývajících se fyziologickými či imunitními reakcemi v závislosti na teplotě prostředí (Tiwari et Shukla 2000, Kodrík 2004, Adamo et Lovett 2011, Triggs et Knell 2012). V mé studii s rostoucí teplotou během stádia kukly klesá koncentrace cirkulujících hemocytů v hemolymfě brouků. Tento trend je v jistém rozporu se studii zkoumající různé složky imunitního systému v závislosti na teplotě. Vyšší teplota prostředí zpravidla zvyšuje aktivitu imunitního systému hmyzu u humorální i buněčné části (Tiwari et Shukla 2000, Pandey et al. 2010, Adamo et Lovett 2011). Důvodem odlišnosti může být fakt, že výše uvedené studie vždy zkoumaly rovnou dané stádium hmyzu vystavené určité teplotě prostředí. Naproti tomu můj výše prezentovaný manipulativní experiment byl jiný, k ovlivnění teplotou docházelo ve stádiu kukly, načež zkoumaní dospělci zažívali vždy už pouze jedinou teplotu a to 26 °C. Jedincům aklimatizovaným na 17 °C mohla tato teplota připadat vysoká, jedincům aklimatizovaným na 35 °C naopak nízká. Dalším případným vysvětlením opačného trendu koncentrace hemocytů v závislosti na teplotě prostředí je nemožnost aktivního příjmu potravy během stádia kukly. Lze předpokládat, že vyšší teplota prostředí má za následek urychlení činnosti metabolismu organismu a zvýšení energetických příjmů (Kodrík 2004, Triggs et Knell 2012). Je tedy možné, že nemožnost aktivního příjmu potravy u jedinců vystavených vysokým teplotám snižuje funkčnost imunitního systému, podobně jako je popsáno v recentní studii u larev zavíječe paprikového (*Plodia interpunctella* (Hübner, 1813); Triggs et Knell 2012).

Na rozdíl od prvního a druhého experimentu z této diplomové práce, v tomto experimentu vyšel průkazný rozdíl v koncentraci hemocytů mezi samci a samicemi. Je možné, že se čerstvě vylíhnutí dospělci liší v koncentraci hemocytů mezi pohlavími a v průběhu ontogeneze je tento efekt postupně mazán (viz výsledky předchozí studie). Dále bývají imunitní rozdíly mezi pohlavním u hmyzu často pozorovány při napadením patogenem a podobný vliv na imunitní systém by mohl vyvolávat i jiný stres, např. extrémní teplota prostředí (viz kukly v 35 °C; Freitag et al. 2012, Koegel et al. 2012, Moreno - Garcia et al. 2015, Khan et al. 2016).

V průběhu vývoje dospělců, od prvního do sedmého dne života došlo k zhruba dvojnásobnému nárůstu koncentrace hemocytů a byl částečně smazán rozdíl mezi jednotlivými teplotami zažitými během stádia kukly. Zvyšující se koncentrace hemocytů od prvního do sedmého dne dospělosti *H. axyridis* je v souladu s výsledky druhého experimentu a opět v určitém rozporu se studii provedenými na včelách, komárech či cvrčcích (Hillyer et al. 2005, Wilson - Rich et al. 2008, Park et al. 2011, King et Hillyer 2013). Částečné zmenšení rozdílů v počtech hemocytů mezi jedinci zažívajícími ve stádiu kukly teplotu 17 °C, 26 °C či 35 °C po týdnů života ve 26 °C může být způsobeno přizpůsobením se teplotě prostředí, přičemž překvapením je

spíše to, že rozdíly nejsou rychle úplně smazány a přetrvávají i po týdnů života ve standardizované teplotě.

Ohledně absolutních naměřených hodnot koncentrací hemocytů je důležité zmínit, že tento experiment byl realizován již na jaře roku 2014 a byl použit jiný antikoagulační pufr (PBS), jiná technika odběru hemolymfy z těl slunéček a jiný způsob zacházení se vzorky než později v ontogenetickém experimentu realizovaném v roce 2015. Důvodem odlišnosti experimentu oproti ontogenetickému proto může být jak rozdílnost použité metodiky, tak genetická odlišnost zkoumaných jedinců (populace z Prahy vs. populace z Českých Budějovic).

4. Závěr

Výborně fungující imunitní systém je jeden z klíčových faktorů pro přežívání většiny organismů. V případě hmyzu, lze imunitu dělit podle povahy imunitní obrany na buněčnou a látkovou. Uvedené dělení totiž tvoří důležitý základ znalostí pro experimentální část práce. V úvodu práce byl blíže představen zkoumaný druh *Harmonia axyridis* a pozornost byla věnována také imunitnímu systému či fyziologickým zajímavostem čeledi slunéčkovitých.

Experimentální části byly logicky řazeny od experimentů zkoumajících metodiku odběru hemolymfy po výzkum vybraných faktorů ovlivňujících fungování imunitního systému hmyzu. V diplomové práci jsem ukázal, že ze slunéček využívající reflexního krvácení k obraně před predátorem je možné odebírat hemolymfu pro fyziologické a imunologické analýzy, aniž by bylo potřeba brouky uměle zraňovat. Metoda odběru hemolymfy z reflexního krvácení se navíc velmi hodí i pro experimenty vyžadující opakované odebírání vzorků hemolymfy ze stejných jedinců.

Během ontogenetického experimentu jsem prokázal vliv stáří jedinců *H. axyridis* na hodnoty měřených fyziologických a imunitních parametrů. Opět i v této části práce lze vysledovat významný metodologický dopad studie. V experimentech zkoumajících vlivy nejrůznějších faktorů na fyziologii či imunitní systém hmyzu by měli být porovnávání vždy jedinci stejného (známého) stáří.

V poslední experimentální části jsem ukázal, že teplota během stádia kukly může ovlivňovat koncentraci cirkulujících hemocytů u čerstvých dospělců (24 hodin starých) a tento efekt nezmizí ani u dospělců starých jeden týden. Překvapením je, že slunéčka *H. axyridis* prožívající stádium kukly v nízké teplotě mají vyšší koncentrace hemocytů v hemolymfě. Všechny experimentální části dohromady potvrzují, že slunéčko východní má výborně fungující imunitní systém.

Ve výzkumu *H. axyridis* bych rád v budoucnu pokračoval v rámci své disertační práce a snažil se tak dalšími poznatky přispět k možnému boji s tímto nepříjemným invazním druhem. Zajímavé by například bylo sledovat imunitní parametry pro větší množství druhů slunéček, aby bylo možné mít lepší představu o síle imunitního systému *H. axyridis* v porovnání s mnoha zástupci čeledi slunéčkovitých. Dále plánuji se svým vedoucím Ing. Michalem Knappem, Ph. D., přezimovací experimenty, které by sledovaly přežívání *H. axyridis* při přezimování v prostředí s různým teplotním režimem.

Zároveň doufám, že v nejbližší době bude přijat náš manuskript vědeckého článku nazvaný: Ontogeny of protein content, hemocyte concentration and antimicrobial activity against *Escherichia coli* in invasive harlequin ladybird, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae, příloha 20), který je v současné době v recenzním řízení v časopise *Physiological Entomology*.

5. Přehled literatury a použitých zdrojů

S. A. Adamo, M. M. E. Lovett, 2011: Some like it hot: the effects of climate change on reproduction, immune function and disease resistance in the cricket *Gryllus texensis*. *The Journal of Experimental Biology* 214: 1997-2004.

H. Agaisse, 2007: An adaptive immune response in *Drosophila*? *Cell Host Microbes* 1: 91-93.

D. Andreu, L. Rivas, 1998: Animal antimicrobial peptides: An overview. *Biopolymers* 47 (6): 415-433.

T. Anggraeni, N. A. Ratcliffe, 1991: Studies on cell-cell cooperation during phagocytosis by purified haemocyte populations of the wax moth *Galleria mellonella*. *Journal of Insect Physiology* 37: 453-460.

T. Asano, M. Ashida, 2001: Cuticular pro-phenoloxidase of the silkworm, *Bombyx mori*. Purification and demonstration of its transport from hemolymph. *The Journal of biological chemistry* 276 (14): 11100-11112.

P. W. Bateman, P. A. Fleming, 2009: There will be blood: autohaemorrhage behavior as part of the defence repertoire of an insect. *Journal of Zoology* 278: 342 - 348.

A. Beckert, J. Wiesner, A. Baumann, A. K. Poppel, H. Vogel, A. Vilcinskas, 2015: Two c-type lysozymes boost the innate immune system of the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *Developmental and Comparative Immunology* 49: 303 - 312.

J. Benešová, P. Dobeš, P. Hyršl, 2009: Developmental changes in phenol - oxidizing activity in the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Bulletin of Insectology* 62: 237 – 243.

D. Bergin, E. P. Reeves, J. Renwick, F. B. Wientjes, K. Kavanagh, 2005: Superoxide production in *Galleria mellonella* hemocytes: Identification of proteins homologous to the NADPH oxidase complex of human neutrophils. *Infection and Immunity* 73: 4161 - 4170.

J. L. Boevé, U. Schaffner, 2003: Why does the larval integument of some sawfly species disrupt so easily? The harmful hemolymph hypothesis. *Oecologia* 134: 104 – 111.

M. F. Braconier, J. C. Braekman, D. Daloz, M. J. Pasteels, 1985: - 1, 17 - Diamino-octadec - 9 - ene, a novel aliphatic diamine from Coccinellidae. *Experientia* 41: 519 – 520.

- N. Browne, M. Heelan, K. Kavanagh, 2013:** An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence* 4: 597 - 603.
- A. A. A. Bugila, J. C. Franco, E. B. da Silva, M. Branco, 2014:** Defense Response of Native and Alien Mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) Against the Solitary Parasitoid *Anagyrus* sp. Nr. *Pseudococci* (Girault) (Hymenoptera: Encyrtidae). *Journal of Insect Behavior* 27 (4): 439 – 453.
- J. C. Castillo, A. E. Robertson, M. R. Strand, 2006:** Characterization of hemocytes from the mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 12: 891-903.
- C. F. Castro, L. M. Almeida, S. R. C. Penteado, 2011:** The impact of temperature on biological aspects and life table of *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae). *The Florida Entomologist* 94: 923–932.
- T. P. Catalán, A. Wozniak, H. M. Niemeyer, A. M. Kalergis, F. Bozinovic, 2012:** Interplay between thermal and immune ecology: Effect of environmental temperature on insect immune response and energetic costs after an immune challenge. *Journal of Insect Physiology* 58: 310-317.
- R. F. Chapman, 2013:** *The Insects Structure and Function*. Cambridge University Press.
- S. L. Chown, S. W. Nicolson [eds], 2004:** *Insect physiological ecology*. Oxford University Press.
- M. Crozatier, J. M. Ubeda, A. Vincent, M. Meister, 2004:** Cellular immune response to parasitization in *Drosophila* requires the EBF orthologue *collier*. *Plos Biology* 2: e196.
- P. W. Dejong, G. J. Holloway, P. M. Brakefield, H. de Vos, 1991:** Chemical defense in ladybird beetles (Coccinellidae). II. Amount of reflex fluid, the alkaloid adaline and individual variation in defence in 2 - spot ladybirds (*Adalia bipunctata*). *Chemoecology* 2: 15 – 19.
- A. F. G. Dixon, 2000:** *Insect Predator - Prey Dynamics: Ladybird Beetles and Biological Control*. Cambridge University Press, Cambridge.
- C. M. Dmitriew, 2011:** The evolution of growth trajectories: what limits growth rate? *Biological Reviews* 86: 97 – 116.
- P. Dobeš, 2007:** Humorální imunita bezobratlých – bakalářská práce. Masarykova univerzita, Brno.
- P. Dobeš, 2009:** Fenoloxidázová kaskáda u hmyzu – diplomová práce. Masarykova univerzita, Brno.
- K. Drilling, K. Dettner, 2010:** First insights into the chemical defensive system of the erotylid beetle, *Tritoma bipustulata*. *Chemoecology* 20: 243 – 253.

- T. Eisner, M. Eisner, M. V. S. Siegler, 2005:** Secret weapons: defenses of insects, spiders, scorpions, and other many-legged creatures. Harvard University Press, Cambridge
- J. A. Endler, 1986:** Defense against predators. Predator-prey Relationships: Perspectives and Approaches from the Study of Lower Invertebrates. University of Chicago Press, Chicago.
- H. Feldhaar, R. Gross, 2008:** Immune reactions of insects on bacterial pathogens and mutualists. *Microbes and Infection* 10: 1082-1088.
- M. Ferenčík, J. Rovenský, Y. Shoenfeld, V. Mat'ha, 2005:** Imunitní systém informace pro každého. Grada Publishing, Praha.
- D. Ferrandon, J. L. Imler, C. Hetru, J. A. Hoffman, 2007:** The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signaling during bacterial and fungal infections. *Nature Reviews Immunology* 7: 862- 874.
- A. Firlej, P. A. Girard, M. Brehélin, D. Coderre, G. Boivin, 2012:** Immune Response of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) Supports the Enemy Release Hypothesis in North America. *Annals of the Entomological Society of America* 105: 328-338.
- E. Foley, P. H. O'Farrell, 2003:** Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to gram-negative bacteria in *Drosophila*. *Genes & Development* 17: 115 - 125.
- D. Freitak, E. Knorr, H. Vogel, A. Vilcinskas, 2012:** Gender - and stressor - specific microRNA expression in *Tribolium castaneum*. *Biology Letters* 8: 860 - 863.
- H. Gaetschenberger, K. Azzami, J. Tautz, H. Beier, 2013:** Antibacterial Immune Competence of Honey Bees (*Apis mellifera*) Is Adapted to Different Life Stages and Environmental Risks. *Plos One* 8.
- E. M. M. Gardiner, M. R. Strand, 2000:** Hematopoiesis in larval *Pseudoplusia includens* and *Spodoptera frugiperda*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 43: 147 – 164.
- G. S. Glenn, 1991:** A systematic revision of *Enyaliopsis* Karsh 1887 (Orthoptera, Tettigoniidae, Heterodinae). *Transactions of the American Entomological Society* 1: 46 - 144.
- A. P. Gupta, 2001:** Immunology of invertebrates: Humoral. *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley and Sons, London.
- A. D. Higginson, J. Delf, G. D. Ruxton, M. P. Speed, 2011:** Growth and reproductive costs of larval defence in the aposematic lepidopteran *Pieris brassicae*. *Journal of Animal Ecology* 80 (2): 384 – 392.
- J. F. Hillyer, S. L. Schmidt, J. F. Fuchs, J. P. Boyle, B. M. Christensen, 2005:** Age-associated mortality in immune challenged mosquitoes (*Aedes aegypti*) correlates with a decrease in haemocyte numbers. *Cellular Microbiology* 7: 39 - 51.

- I. Hodek, H. F. Emden, A. Honek [eds], 2012:** Ecology and behaviour of the ladybird beetles (Coccinellidae). John Wiley & Sons, Oxford.
- V. Ghasemi, S. Moharramipour, J. J. Sendi, 2013:** Circulating hemocytes of Mediterranean flour moth, *Ephesia kuchiella* Zell. (Lep: Pyraledae) and their response to thermal stress. *ISJ – Invertebrate Survival Journal* 10: 128-140.
- C. P. Grill, A. J. Moore, 1998:** Effects of a larval antipredator response and larval diet on adult phenotype in an aposematic ladybird beetle. *Oecologie* 114: 274 – 282.
- D. Grimaldi, M. S. Engel, 2005:** Evolution of the Insects. Cambridge University Press.
- P. S. Gross, W. Z. Al-Sharif, L. A. Clow, L. C. Smith, 1999:** Echinoderm immunity and the evolution of the complement system. *Developmental and Comparative Immunology* 23 (4-5): 429-442.
- J. Gross, A. Eben, I. Müller, A. Wensing, 2010:** A well protected intruder: the effective antimicrobial defense of the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *Journal of Chemical Ecology* 36: 1180-1188.
- A. P. Gupta, 2001:** Immunology of invertebrates: Humoral. John Wiley and Sons, New Jersey.
- A. P. Gupta, 2009:** Insect Hemocytes. Cambridge University Press, New York.
- B. Handke, I. Poernbacher, S. Goetze, C. H. Ahrens, U. Omasits, F. Marty, N. Simigdala, I. Meyer, B. Wollscheid, E. Brunner, E. Hafen, C. F. Lehner, 2013:** The Hemolymph Proteome of Fed and Starved *Drosophila* Larvae. *Plos One* 8.
- V. Hořejší, J. Bartůňková, T. Brdička, R. Špíšek, 2013:** Základy imunologie. Triton, Praha.
- G. D. Inglis, D. L. Johnson, M. S. Goettel, 1996:** Effects of temperature and thermoregulation on mycosis by *Beauveria bassianain* grasshoppers. *Biological Control* 7: 131- 139.
- P. Jiravanichpaisal, B. L. Lee, K. Söderhäll, 2006:** Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonozation. *Immunobiology* 211: 213-236.
- P. Jolivet, G. Poinar, 2007:** Parasites, commensals and phoretics of *Timarcha* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Genus* 18: 589–596.
- J. C. Jones, 1962:** Current concepts concerning insect hemocytes. *American Zoologist* 2: 209-246.
- M. R. Kanost, H. Jiang, X. Q. Yu, 2004:** Innate immune responses of lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunological Reviews* 198: 97-105.
- I. Karl, R. Stoks, M. De Block, S. A. Janowitz, K. Fischer, 2011:** Temperature extremes and butterfly fitness: conflicting evidence from life history and immune function. *Global Change Biology* 17: 676 – 687.

- A. Kasystinou, A. P. M. Thomas, H. Roy, 2004:** Presence of haemocyte-like cells in coccinellid reflex blood. *Physiological Entomology* 29: 94 – 96.
- G. A. Kerkut, L. I. Gilbert [eds], 1985:** Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology. Pergamon press, Oxford.
- I. Khan, N. G. Prasad, 2013:** The Aging of the Immune Response in *Drosophila melanogaster*. *Journals of Gerontology Series a - Biological Sciences and Medical Sciences* 68: 129 – 135.
- I. Khan, A. Prakash, D. Agashe, 2016:** Immunosenescence and the ability to survive bacterial infection in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Journal of Animal Ecology* 85: 291 – 301.
- J. G. King, J. F. Hillyer, 2013:** Spatial and temporal in vivo analysis of circulating and sessile immune cells in mosquitoes: hemocyte mitosis following infection. *Bmc Biology* 11.
- M. Knapp, O. Nedvěd, 2013:** Gender and Timing during Ontogeny Matter: Effects of a Temporary High Temperature on Survival, Body Size and Colouration in *Harmonia axyridis*. *PLoS ONE* 8.
- M. Knapp, 2014:** Emergence of sexual size dimorphism and stage-specific effects of elevated temperature on growth rate and development rate in *Harmonia axyridis*. *Physiological Entomology* 39: 341 – 347.
- D. Kodrík, 2004:** Fyziologie hmyzu. Entomologický ústav Akademie věd České republiky, České Budějovice.
- S. Koegel, A. Eben, Ch. Hoffmann, J. Gross, 2012:** Influence of Diet on Fecundity, Immune Defense and Content of 2- Isopropyl-3-Methoxy pyrazine in *Harmonia axyridis* Pallas. *Journal of Chemical Ecology* 38: 854-864.
- J. Krzemien, M. Crozatier, A. Vincent, 2010:** Ontogeny of the *Drosophila* larval hematopoietic organ, hemocyte homeostasis and the dedicated cellular immune response to parasitism. *International Journal of Developmental Biology* 54: 1117 - 1125.
- U. Kuhrt, J. Samietz, S. Dorn, 2005:** Thermoregulation behaviour in codling moth larvae. *Physiological Entomology* 30: 54-61.
- G. Labrie, E. Lucas, D. Coderre, 2006:** Can developmental and behavioral characteristics of the multicolored Asian lady beetle *Harmonia axyridis* explain its invasive success? *Biological Invasions* 8: 743 – 754.
- A. M. Lackie, 1988:** Haemocyte behaviour. *Advances in insect physiology* 21: 85-178.
- R. Lanot, D. Zachary, F. Holder, M. Meister, 2001:** Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Developmental Biology* 230: 243-257.

- A. M. Laughton, M. Boots, M. T. Siva - Jothy, 2011:** The ontogeny of immunity in the honey bee, *Apis mellifera* L. following an immune challenge. *Journal of Insect Physiology* 57: 1023-1032.
- M. D. Lavine, M. R. Strand, 2002:** Insect hemocytes and their role in cellular immune responses. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32: 1237-1242.
- Y. Li, Q. Xiang, Q. Zhang, Y. Huang, Z. Su, 2012:** Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides* 37(2): 207 - 215.
- E. Lombaert, T. Guillemaud, J. M. Cornuet, T. Malausa, B. Facon, A. Estoup, 2010:** Bridgehead Effect in the Worldwide Invasion of the Biocontrol Harlequin Ladybird. *PLoS ONE* 5.
- J. Majumder, D. Ghosh, B. K. Agarwala, 2016:** Haemocyte morphology and differential haemocyte counts of giant ladybird beetle, *Anisolemnia dilatata* (F.) (Coleoptera: Coccinellidae): a unique predator of bamboo woolly aphids. Department of Zoology, Tripura University.
- M. D. McCue, R. De Los Santos, 2012:** Upper thermal limits of insects are not the result of insufficient Oxygen delivery. *Physiological and Biochemical Zoology* 86: 257-265.
- K. A. McKean, L. Nunney, 2005:** Bateman's principle and immunity: Phenotypically plastic reproductive strategies predict changes in immunological sex differences. *Evolution* 59: 1510 - 1517.
- M. L. Milks, I. Burnstyn, J. H. Myers, 1998:** Influence of larval age on the lethal and sublethal effects of the nucleopolyhedrovirus of *Trichoplusia ni* in the cabbage looper. *Biological Control* 12: 119 – 126.
- K. A. Moore, D. D. Williams, 1990:** Novel strategies in the complex defense repertoire of a stonefly (*Pteronarcys dorsata*) nymph. *Oikos* 57: 49 – 56.
- M. Moreno – Garcia, V. Vargas, I. Ramirez – Bello, G. Hernandez – Martinez, H. Lanz – Mendoza, 2015:** Bacterial Exposure at the Larval Stage Induced Sexual Immune Dimorphism and Priming in Adult *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Plos One* 10.
- A. J. Nappi, E. Ottaviani, 2000:** Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *BioEssays* 22: 469-480.
- A. J. Nappi, E. Vass, F. Frey, Y. Carton, 2000:** Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* 4: 423 – 430.
- J. L. Nation, 2015:** *Insect Physiology and Biochemistry*. CRC Press, Boca Raton.
- O. Nedvěd, J. Háva, D. Kulíková, 2011:** Record of the invasive alien ladybird *Harmonia axyridis* (Coleoptera, Coccinellidae) from Kenya. *Zoo Keys* 106: 77-81.

- O. Nedvěd, 2014:** Slunéčko východní (*Harmonia axyridis*) – pomocník v biologickém boji nebo ohrožení biodiverzity? Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.
- O. Nedvěd, 2015:** Brouci čeledi slunéčkovití (Coccinellidae). Academia, Praha.
- T. Nedvědová, M. Awad, D. Ungerová, O. Nedvěd, 2013:** Characteristics of ladybird *Harmonia axyridis* during autumn migration. IOBC-WPRS Bulletin 94: 117-122.
- R. E. Nelson, L. I. Fessler, Y. Takagi, B. Blumberg, D. R. Keene, P. F. Olson, C. G. Parker, J. H. Fessler, 1994:** Peroxidase: A novel enzyme- matrix protein of *Drosophila* development. The EMBO Journal 13: 3438-3447.
- S. W. Nicolson, 1994:** Water replenishment following reflex bleeding in the blister beetle *Decapotoma lunata* Pallas (Coleoptera: Meloidae). African Entomology 2: 21–33.
- T. A. Novgorodova, 2015:** Role of social and individual experience in interaction of the meadow ant *Formica pratensis* (Hymenoptera: Formicidae) with ladybird imagines and hoverfly larvae. Insect Science 22: 440 – 450.
- V. Novotný, Y. Basset, S. E. Miller, G. D. Weiblen, B. Bremer, L. Čížek, P. Drozd, 2002:** Low host specificity of herbivorous insects in a tropical forest. Nature 416: 841 – 844.
- C. L. Nunn, P. Lindenfors, E. R. Pursall, J. Rolff, 2009:** On sexual dimorphism in immune function. Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences, 364: 61 - 69.
- J. P. Pandey, P. K. Mishra, D. Kumar, B. M. K. Singh, B. C. Prasad, 2010:** Effect of temperature on hemocytic immune responses of tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D. Research Journal of Immunology 3: 169-177.
- J. P. Pandey, R. K. Tiwari 2012:** An Overview of Insect Hemocyte Science and its Future Application in Applied and Biomedical Fields. American Journal of Biochemistry and Molecular Biology 2: 82 - 105.
- Y. Park, Y. Kim, D. Stanley, 2011:** CELLULAR IMMUNOSENESCENCE IN ADULT MALE CRICKETS, *Gryllus assimilis*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 76: 185 – 194.
- L. N. Pham, M. S. Dionne, M. Shirasu- Hiza, D. S. Schneider, 2007:** A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes. PLoS Pathogens 3: e26.
- K. M. Ponnuel, M. Yamakawa, 2002:** Immune responses against bacterial infection in *Bombyx mori* and regulation of host gene expression. Current Science 83 (4): 447 - 454.
- R Core Team, 2014:** A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

- C. Ribeiro, M. Brehelin, 2006:** Incest haemocytes: What type of cell is what? *Journal of Insect Physiology* 52: 417-429.
- Ch. R. Roehrich, Ch. J. Ngwa, J. Wiesner, H. Schmidtberg, T. Degenkolb, Ch. Kollwe, R. Fischer, G. Pradel, A. Vilcinskas, 2012:** Harmonine, a defence compound from the harlequin ladybird, inhibits mycobacterial growth and demonstrates multi-stage antimalarial activity. *Biology Letters* 8: 308-311.
- J. Rolff, 2001:** Effects of age and gender on immune function of dragonflies (Odonata, Lestidae) from a wild population. *Canadian Journal of Zoology - Revue Canadienne De Zoologie* 79: 2176 - 2180
- M. Rowell - Rahier, J. M. Pasteels, 1986:** Economics of chemical defense in Chrysomelinae. *Journal of Chemical Ecology* 12: 1189–1203.
- S. Sato, K. Kushibuchi, H. Yasuda, 2009:** Effect of reflex bleeding of a predatory ladybird beetle, *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae), as a means of avoiding intraguild predation and its cost. *Applied Entomology and Zoology* 44: 203 – 206.
- M. T. Siva - Joty, Y. Moret, J. Rolff, 2005:** Insect immunity: an evolutionary ecology perspective. *Advances in Insect Physiology* 32: 1 - 48.
- O. Schmidt, U. Theopold, M. R. Strand, 2001:** Innate immunity and evasion by insect parasitoids. *BioEssays* 23: 344-351.
- H. Schmidtberg, Ch. Röhrich, H. Vogel, A. Vilvinskas, 2013:** A switch from constitutive chemical defence to inducible innate immune responses in the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *Biology Letters* 9: 20130006.
- R. A. Schwenke, B. P. Lazzaro, M. F. Wolfner, 2016:** Reproduction-Immunity Trade-Offs in Insects. *Annual Review of Entomology* 61.
- D. W. Stanley, J. S. Miller, 2006:** Eicosanoid actions in insect cellular immune functions. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 119: 1-13.
- G. J. Stathas, D. C. Kontodimas, F. Karamaouna, S. Kampouris, 2011:** Thermal requirements and effect of temperature and prey on the development of the predator *Harmonia axyridis*. *Environmental Entomology* 40: 1541–1545.
- K. Sternberg, R. Buchwald, 1999:** Libellen Baden-Württembergs. Stuttgart, Ulmer.
- T. M. Stoepler, J. C. Castillo, J. T. Lill, I. Eleftherianos, 2013:** Hemocyte Density Increases with Developmental Stage in an Immune - Challenged Forest Caterpillar. *Plos One* 8.
- M. R. Strand, M. H. Beck, M. D. Lavine, 2006:** *Microplitis demolitor* bracovirus inhibits phagocytosis by hemocytes from *Pseudoplusia includens*. *Insect Biochemistry and Physiology* 61: 134-145.
- M. R. Strand, 2008:** The insect cellular immune response. *Insect Science* 15: 1 – 14.

- M. Sugumaran, 2002:** Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment Cell Research* 15 (1): 2 - 9.
- A. Suhail, M. D. Gogi, M. J. Arif, M. Arshad, M. Rana, A. M. Sarfraz, 2007:** Effect of various treatments of azadirachtin, spinosad and abamectin on the haemogram of *Coccinella septempunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae). *Pakistan Entomologist* 29: 151 – 164.
- B. Szymas, A. Jedruszuk, 2003:** The influence of different diets on haemocytes of adult worker honey bees, *Apis mellifera*. *Apidologie* 34: 97 - 102.
- P. Šíma, I. Trebichavský, 2001:** Léčivé látky z živočišné říše, antimikrobiální peptidy. *Živa* 2: 73 – 74.
- J. Tan, M. Xu, K. Zhang, X. Wang, S. Chen, T. Li, Z. Xiang, H. Cui, 2013:** Characterization of hemocytes proliferation in larval silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology* 59: 595 – 603.
- U. Theopold, O. Schnidt, K. Söderhäll, M. S. Dushay, 2004:** Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing. *TRENDS in Immunology* 25 (6): 289-294.
- R. K. Tiwari, R. S. Shukla, 2000:** Effect of certain stresses and 20-hydroxyecdysone injection on total haemocyte count in lemon-butterfly, *Papilio demoleus* L. (Lepidoptera). *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B* 70: 243-254.
- A. Triggs, R. J. Knell, 2012:** Interactions between environmental variables determine immunity in the Indian meal moth *Plodia interpunctella*. *Journal of Animal Ecology* 81: 386-394.
- R. J. Turner [ed], 1994:** Immunology – a comparative approach. John Wiley and Sons, Chichester.
- A. Vilcinskas, K. Mukherjee, H. Vogel, 2013:** Expansion of the antimicrobial peptide repertoire in the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *Proceedings of the Royal Society B* 280: 20122113.
- A. Vilcinskas, H. Schmidtberg, A. Estoup, A. Tayen, B. Facon, H. Vogel, 2014:** Evolutionary ecology of microsporidia associated with the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *Insect Science*: 1-12.
- P. Vilmos, É. Kurucz, 1998:** Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunology Letters* 62: 59-66.
- H. Vogel, H. Schmidtberg, A. Vilcinskas, 2017:** Comparative transcriptomics in three ladybird species supports a role for immunity in invasion biology. *Developmental and Comparative Immunology* 67: 452 – 456.

- L. Vojtek, P. Dobeš, E. Buyukguzel, J. Atosuo, P. Hyršl, 2014:** Bioluminescent assay for evaluating antimicrobial activity in insect haemolymph. *European Journal of Entomology* 111: 335-340.
- G. T. Wyatt, T. C. Loughheed, S. S. Wyatt, 1956:** THE CHEMISTRY OF INSECT HEMOLYMPH - ORGANIC COMPONENTS OF THE HEMOLYMPH OF THE SILKWORM, BOMBYX MORI, AND 2 OTHER SPECIES. *Journal of General Physiology* 39: 853-868.
- M. J. Williams, 2007:** *Drosophila* hemopoiesis and cellular immunity. *The Journal of Immunology* 178: 4711-4716.
- K. Wilson, S. C. Cotter, A. F. Reason, J. K. Pell, 2008:** Melanism and disease resistance in insects. *Ecology Letters* 4: 637-649.
- N. Wilson - Rich, S. T. Dres, P. T. Starks, 2008:** The ontogeny of immunity: development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology* 54: 1392-1399.
- S. Yokoo, P. Goetz, S. Tojo, 1995:** Phagocytic activities of haemocytes separated by two simple methods from larvae of two lepidopteran species, *Agrotis segetum* and *Galleria mellonella*. *Applied Entomology and Zoology* 30: 343-350.
- E. L. Zvereva, M. Kozlov, 2016:** The costs and effectiveness of chemical defenses in herbivorous insects: a meta-analysis. *Ecological Monographs* 86: 107 – 124.

6. Přílohy

Seznam příloh:

Příloha 1: Petriho misky vybavené filtračním papírem a potravou.

Příloha 2: Upravená část petriho misky, slouží pro lepší možnost odběru hemolymfy (experiment č. 1 a 2).

Příloha 3: Odběr hemolymfy s pomocí skleněné mikrokapiláry (experiment č. 1 a 2).

Příloha 4: Bürkerova komůrka pro počítání hemocytů.

Příloha 5: Ilustrační fotografie hemocytů při počítání pod Bürkerovou komůrkou (experiment č. 1 a 2).

Příloha 6: Ilustrační fotografie hemocytů s výraznými pseudopodii, barvení pomocí Alexafluoro – phalloidinu.

Příloha 7: Ilustrační fotografie hemocytů, barvení pomocí DAPI.

Příloha 8: Postup počítání hemocytů (experiment č. 1 a 2).

Příloha 9: Vztah výpočtu koncentrace hemocytů v 1 μl neředěné hemolymfy (experiment č. 1 a 2).

Příloha 10: Třídění a krmení larev třetího instaru (experiment č. 3).

Příloha 11: Odběr hemolymfy (experiment č. 3).

Příloha 12: Postup počítání hemocytů (experiment č. 3).

Příloha 13: Vztah výpočtu koncentrace hemocytů v 1 μl neředěné hemolymfy (experiment č. 3).

Příloha 14: Počítání hemocytů pod světelným mikroskopem (experiment č. 3).

Příloha 15: Práce v laboratoři (experiment č. 1).

Příloha 16: Klimatické komory (experiment č. 3).

Příloha 17: Vědecký příspěvek na konferenci Zoologické dny 2016.

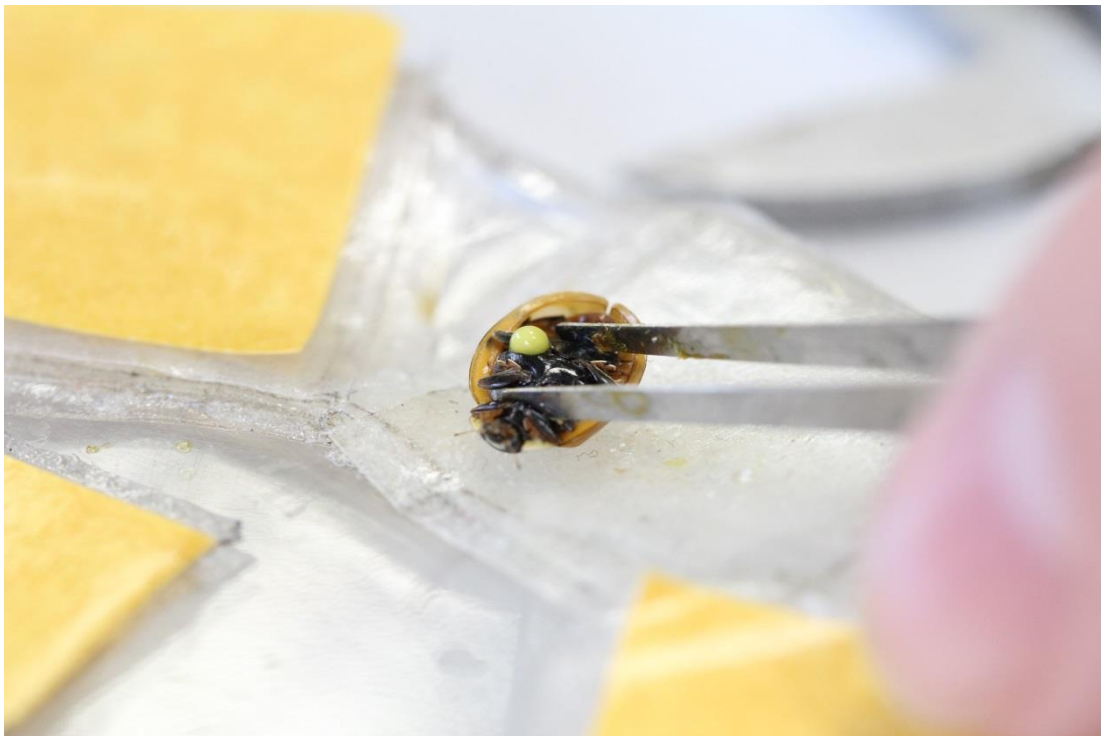
Příloha 18: Vědecký příspěvek na konferenci Kostelecké inspirování 2016.

Příloha 19: Vědecký příspěvek na konferenci Zoologické dny 2017.

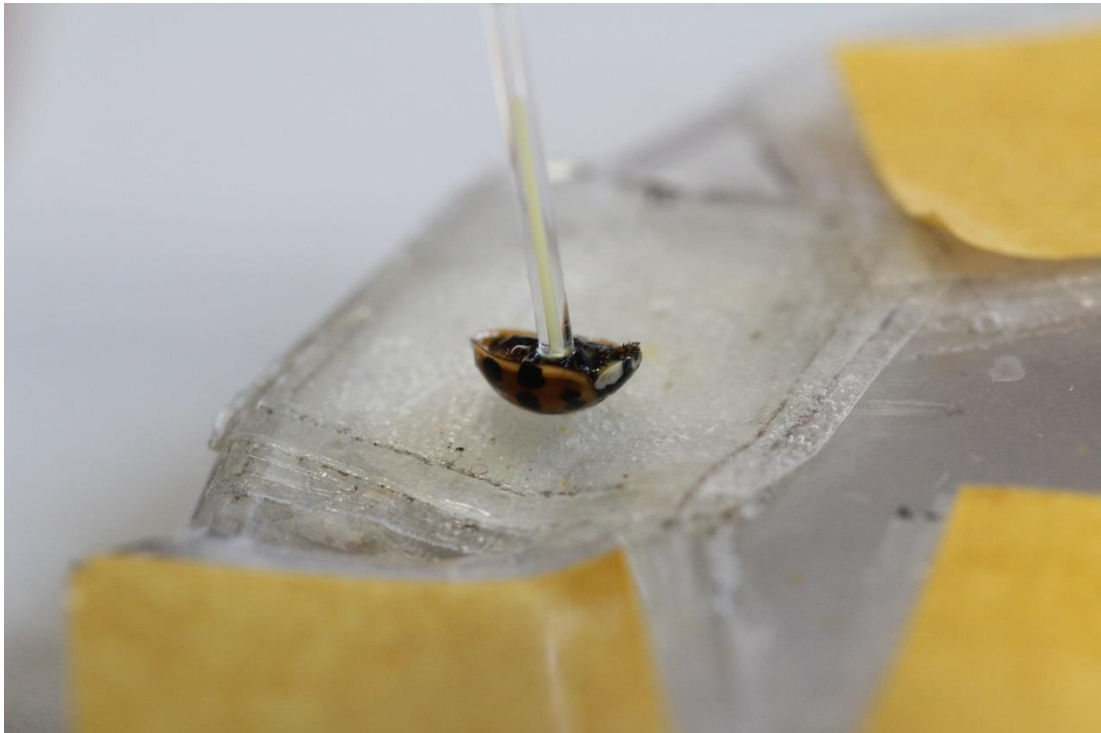
Příloha 20: Manuskript vědeckého článku nazvaný: Ontogeny of protein content, hemocyte concentration and antimicrobial activity against *Escherichia coli* in invasive harlequin ladybird, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae).



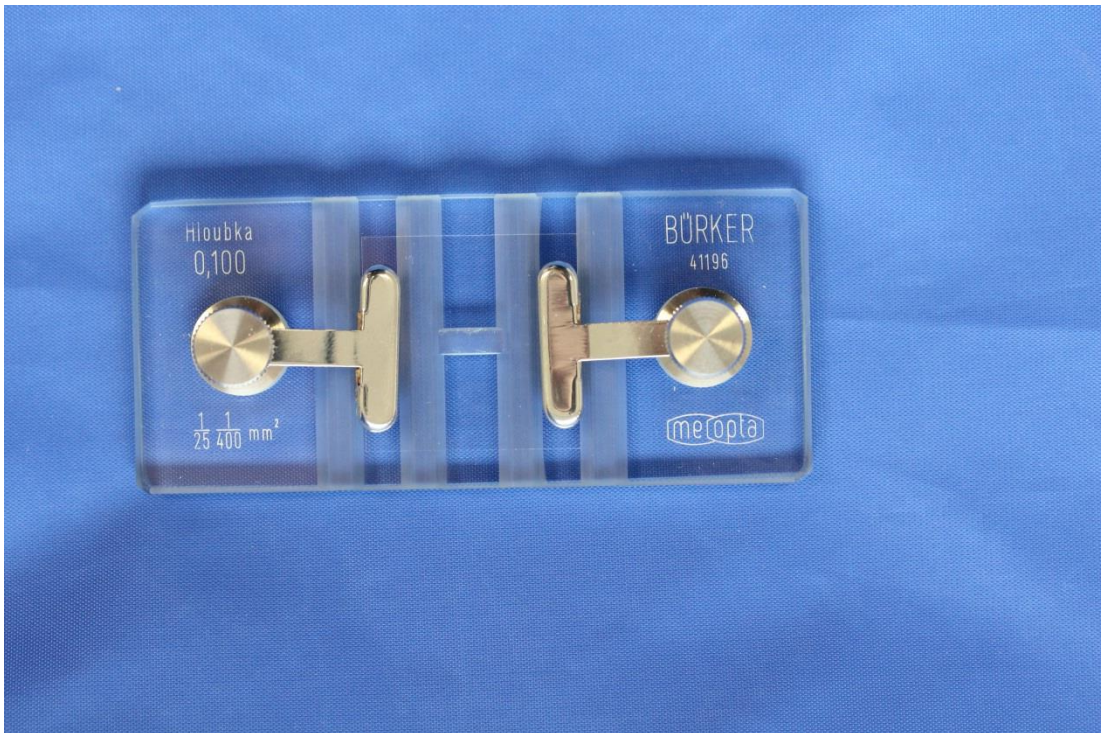
Příloha 1: Petriho misky vybavené filtračním papírem a potravou.



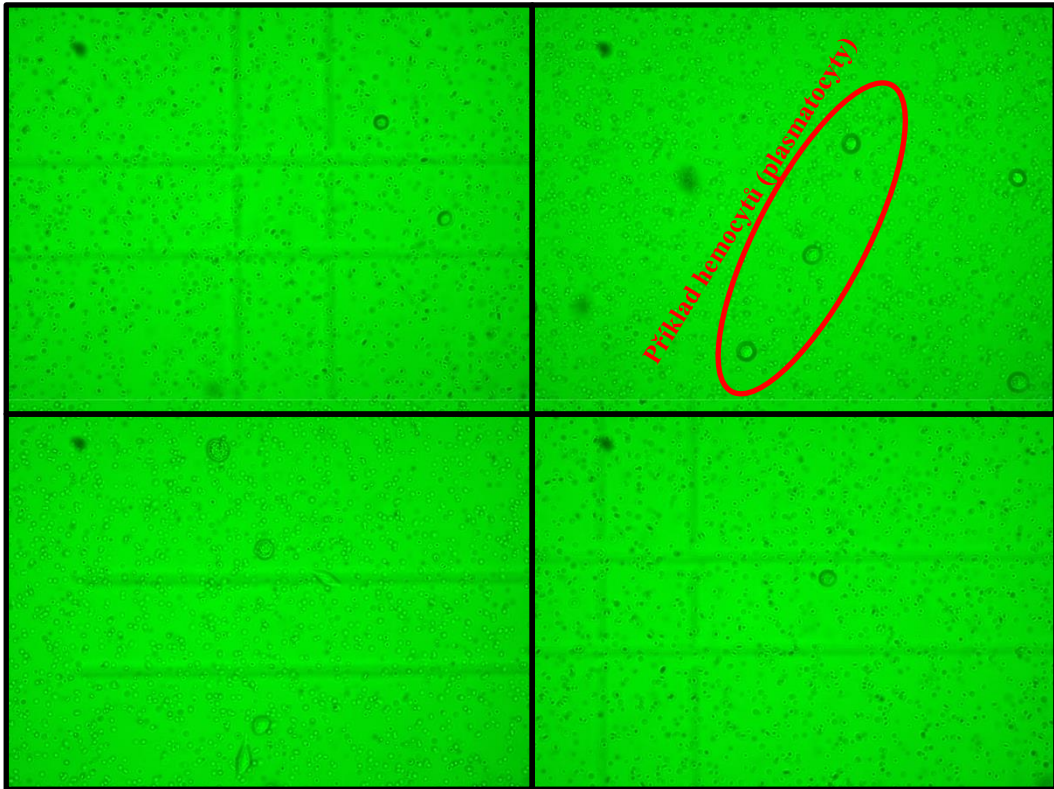
Příloha 2: Upravená část petriho misky, slouží pro lepší možnost odběru hemolymfy (experiment č. 2 a 3).



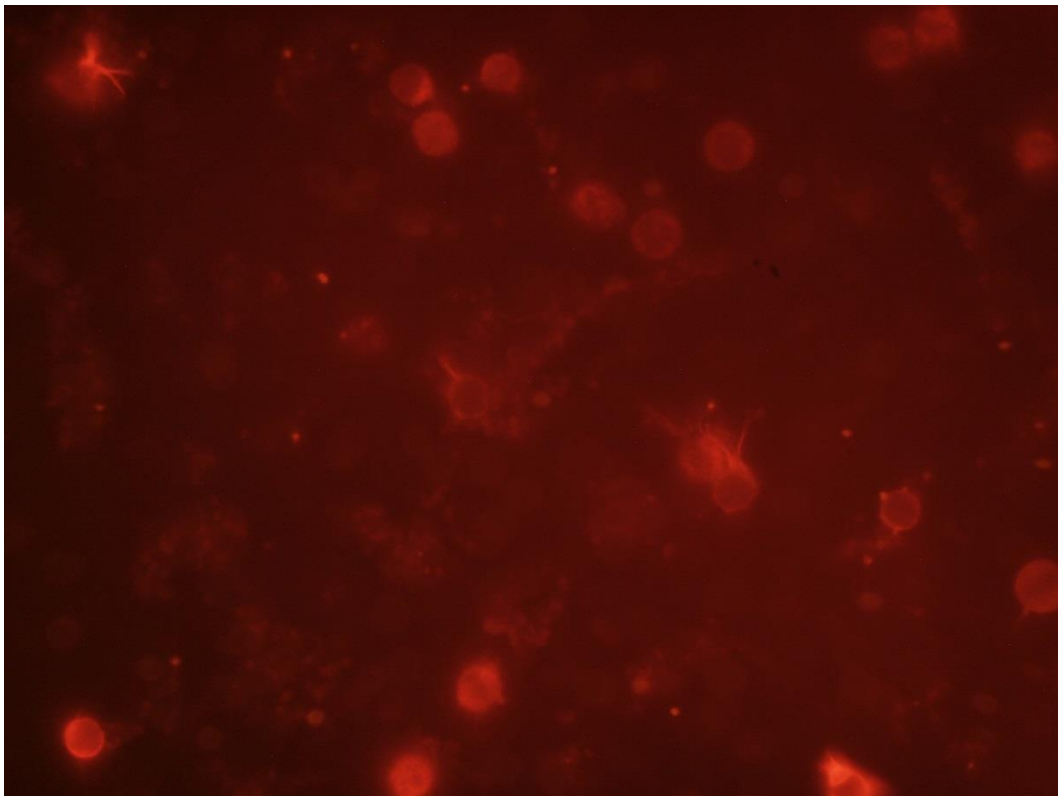
Příloha 3: Odběr hemolymfy s pomocí skleněné mikrokapiláry (experiment č. 2 a 3).



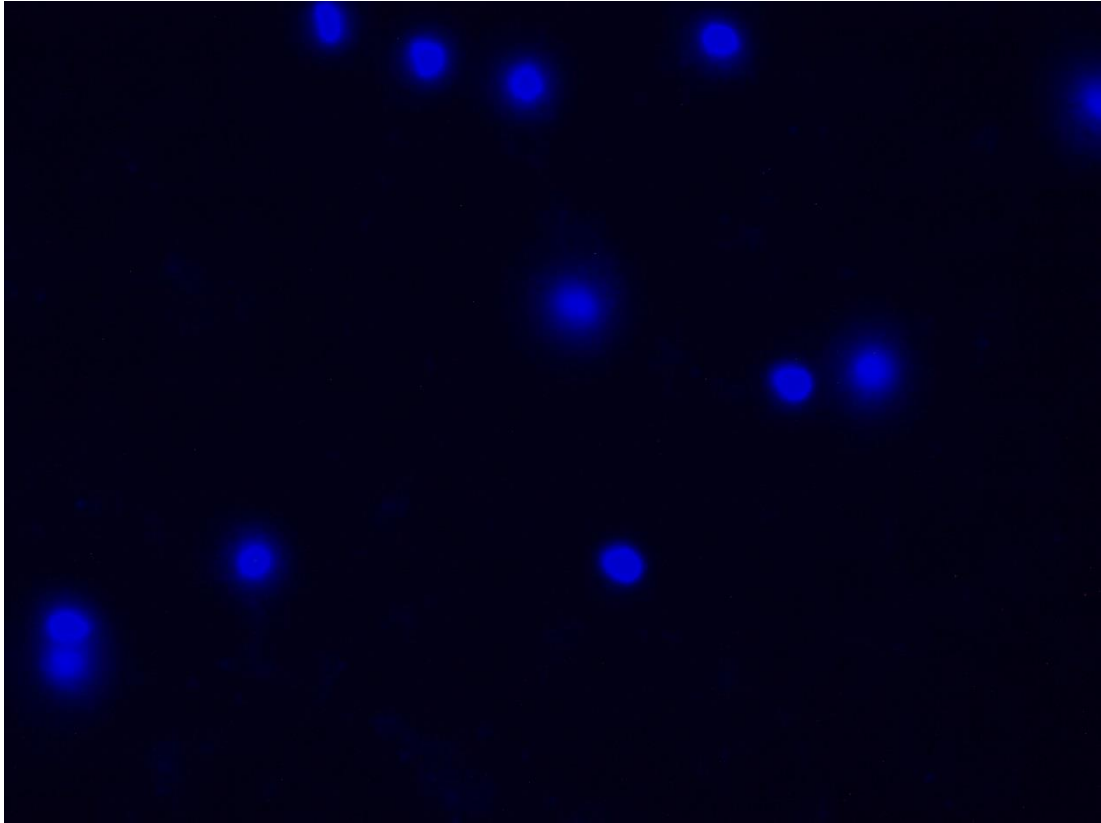
Příloha 4: Bürkerova komůrka pro počítání hemocytů.



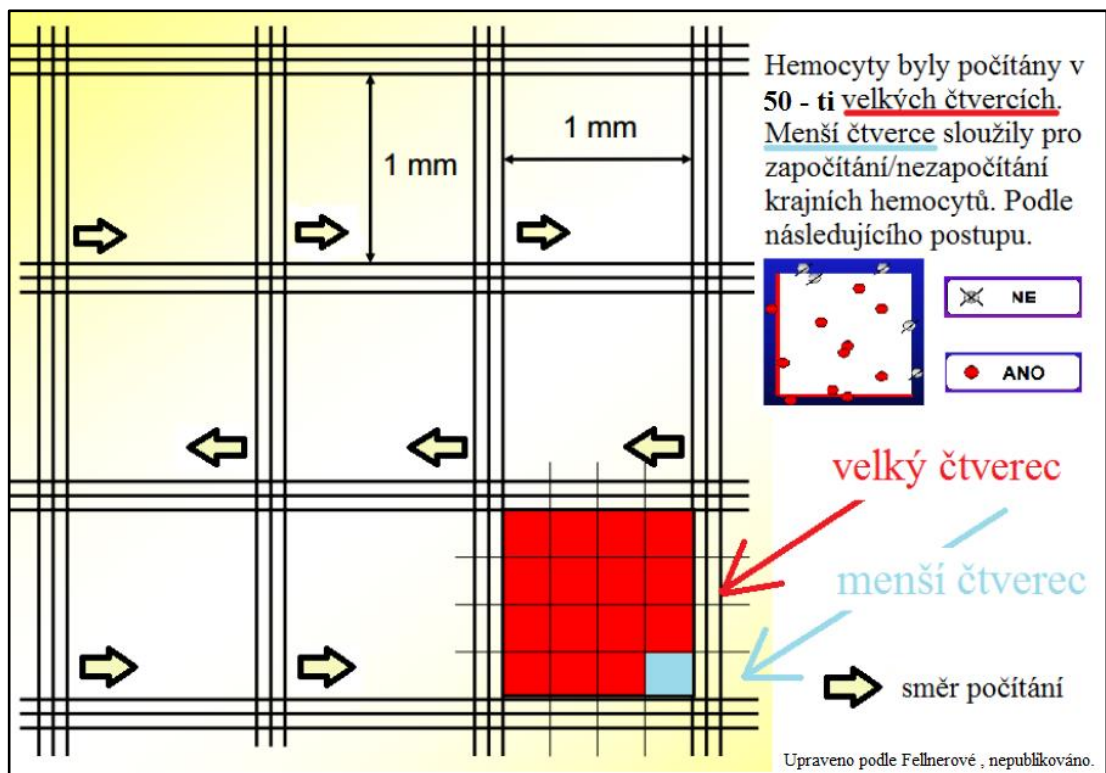
Příloha 5: Ilustrační fotografie hemocytů při počítání pod Bürkerovou komůrkou (experiment č. 1 a 2).



Příloha 6: Ilustrační fotografie hemocytů s výraznými pseudopodii, barvení pomocí Alexafluoro – phalloidinu.



Příloha 7: Ilustrační fotografie hemocytů, barvení pomocí DAPI.



Příloha 8: Postup počítání hemocytů (experiment č. 1 a 2).

$$x = \frac{n}{0,2} \times 101$$

kde x je koncentrace hemocytů v 1 μl neředěné hemolymfy

n je počet hemocytů v 50 – ti velkých čtvercích

0,2 je objem, který vyplní ředěná hemolymfa s pufrům v 50 – ti velkých čtvercích

101 je objem ředění (tj. 1 μl hemolymfy ku 100 μl pufru)

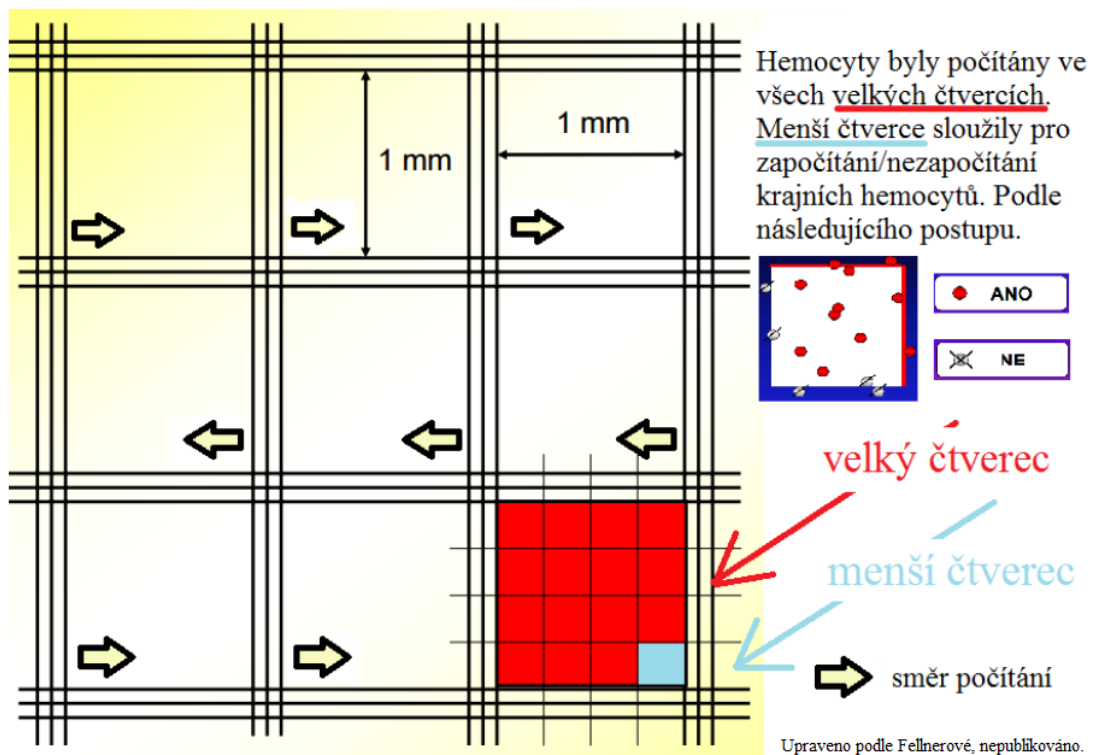
Příloha 9: Vztah výpočtu koncentrace hemocytů v 1 μl neředěné hemolymfy (experiment č. 1 a 2).



Příloha 10: Třídění a krmení larev třetího instaru (experiment č. 3).



Příloha 11: Odběr hemolymfy (experiment č. 3).



Příloha 12: Postup počítání hemocytů (experiment č. 3).

$$x = \frac{n}{0,4} \times \text{ředění}$$

kde x je koncentrace hemocytů v 1 μl neředěné hemolymfy

n je počet hemocytů ve 100 velkých čtvercích

$0,4$ je objem, který vyplní ředěná hemolymfa s pufrem ve všech (100) velkých čtvercích

Příloha 13: Vztah výpočtu koncentrace hemocytů v 1 μl neředěné hemolymfy (experiment č. 3).



Příloha 14: Počítání hemocytů pod světelným mikroskopem (experiment č. 3).



Příloha 15: Práce v laboratoři (experiment č. 1).



Příloha 16: Klimatické komory (experiment č. 3).

Ontogeneze imunitního systému invazního sluněčka *Harmonia axyridis*

Michal Řeřicha (1), Michal Knapp (1), Pavel Dobeš (2), Pavel Hyršl (2)

(1) Katedra ekologie, Fakulta životního prostředí, ČZU, Praha
(2) Ústav experimentální biologie PřF MU, Brno



Standardizované podmínky chovu:



Odběry hemolymfy:



3. instar



4. instar



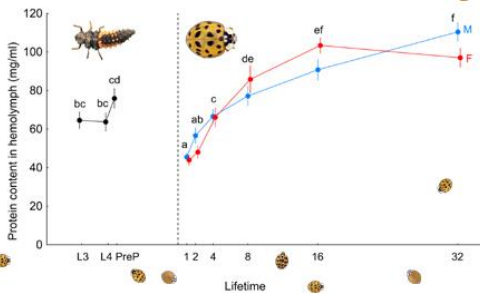
prepupa



dospělci stáří 1, 2, 4, 8, 16, 32 dní



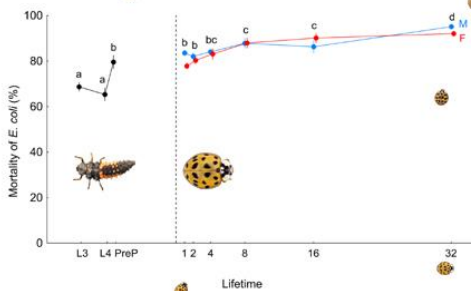
Obr. 1: Experimentální design.



Obr. 2: Vývoj celkové koncentrace proteinů v hemolymfě *H. axyridis* v průběhu ontogeneze.

Koncentrace hemocytů v hemolymfě sluněčka *H. axyridis* se průkazně liší v průběhu ontogeneze (GLMM-gamma: $F = 30.40$; $P < 0.001$). Během larválního vývoje se koncentrace příliš nemění a je celkově docela nízká (cca 5500 hemocytů v 1 μ l hemolymfy). Jeden den starí dospělci mají v průměru 11500 hemocytů v 1 μ l hemolymfy. Koncentrace hemocytů dále roste až do 8. dne stáří dospělce (v průměru 30000 hemocytů v 1 μ l hemolymfy). Během dalšího života dospělci (do 32. dne stáří) již zůstávají koncentrace hemocytů v hemolymfě víceméně konstantní (Obr. 3).

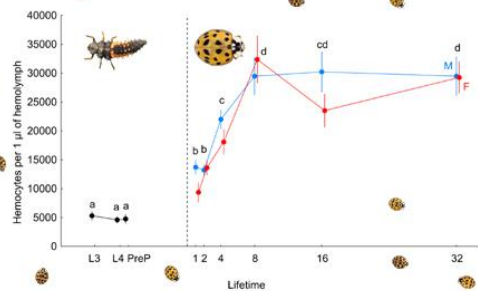
Antimikrobiální aktivita hemolymfy proti bioluminiscenční *Escherichia coli* K12 se také průkazně liší v průběhu ontogeneze (GLMM-binomické: $F = 29.82$; $P < 0.001$). Úbytek viability bakterií ve srovnání s kontrolními bakteriemi byl nejvyšší u nejstarších dospělci (mortalita bakterií cca 95%). Naopak hemolymfa larválních stádií dovoila přežití podstatné části bakterií (Obr. 4).



Obr. 4: Vývoj antibakteriální aktivity hemolymfy *H. axyridis* v průběhu ontogeneze.

Sluněčko *Harmonia axyridis* předurčuje k roli úspěšného invazního druhu vedle jiných vlastností i jeho výkonný imunitní systém. Přes výrazný recentní boom studii zaměřených na výzkum biologie tohoto druhu je jeho imunitní systém oblasti probádanou jen částečně. Rozhodli jsme se proto zaměřit svou pozornost na vývoj imunitního systému *H. axyridis* během ontogeneze. Sledovali jsme vývoj imunitního systému jedinců od 3. larválního instaru až po 32 denní dospělce. Konkrétně jsme zjišťovali celkový obsah proteinů v hemolymfě, koncentraci hemocytů v hemolymfě a antimikrobiální aktivitu hemolymfy proti gramnegativním bakteriím.

Celkové množství proteinů obsažených v hemolymfě se průkazně lišilo mezi jednotlivými měřenými stádii života (GLMM-gamma: $F = 31.06$; $P < 0.001$). Čerstvě vyhlídlí dospělci měli nižší obsah proteinů v hemolymfě než larvální stádia. Velmi významný nárůst je pak vidět v průběhu života dospělci až do 32. dne stáří (Obr. 2).



Obr. 3: Vývoj koncentrace hemocytů v hemolymfě *H. axyridis* v průběhu ontogeneze.

Larvální stádia hmyzu s proměnou nedokonalou mají často srovnatelné koncentrace hemocytů s dospělci. Naproti tomu některé druhy s proměnou dokonalou mají vyšší koncentrace hemocytů během larválního vývoje než v dospělosti (Chapman 2013; Wilson-Rich et al. 2008). Koncentrace hemocytů se může skokově měnit během metamorfózy, kdy jsou vytvářeny specifické druhy hemocytů. Je zajímavé, že *H. axyridis* se trochu vymyká převládajícím hmyzím trendům i ontogenetickým vývojem své imunity, když preimaginální stádia mají výrazně nižší koncentrace hemocytů v hemolymfě než dospělci. Vliv pohlaví na koncentraci hemocytů nám nevyšel signifikantní, což by korespondovalo s publikovanou meta-analýzou (Nunn et al. 2008). Celkové množství proteinů bylo také nižší v preimaginálních stádiích než u starších dospělci. Ovšem pro některé jiné studované druhy hmyzu má trend množství proteinů spíše opačný průběh (Wilson-Rich et al. 2008). Antimikrobiální aktivita proti gramnegativním bakteriím měla podobný průběh jako předěšlá dva sledované parametry imunitního systému a dokresluje obrázek zvyšující se výkonnosti imunitního systému *H. axyridis* během prvního měsíce života dospělci.

Wilson-Rich N, Dres ST, Starik PT. 2008. The ontogeny of immunity: development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology* 54: 1302-1309.

Chapman RF. 2013. *The Insects: Structure and Function*. Cambridge University Press.

Nunn CL, Lindenferms P, Pursall ER, Roff J. 2008. On sexual dimorphism in immune function. *Philosophical transactions of the royal society* 364: 61-69.

Ontogeneze imunitního systému invazního slunéčka *Harmonia axyridis*

Michal Řeřicha¹, Michal Knapp¹, Pavel Dobeš², Pavel Hyršl²

¹ Katedra ekologie, FŽP-ČZU v Praze, Praha 6 - Suchbátka

² Ústav experimentální biologie PřF MU, Brno

Slunéčko *Harmonia axyridis* předurčuje k roli úspěšného invazního druhu vedle jiných vlastností i jeho výkonný imunitní systém. Přes výrazný recentní boom studií zaměřených na výzkum biologie tohoto druhu je jeho imunitní systém oblastí probádanou jen částečně. Rozhodli jsme se proto zaměřit svou pozornost na vývoj imunitního systému *H. axyridis* během ontogeneze. Zkoumali jsme vývoj koncentrace hemocytů v hemolymfě od 2. larválního instaru až po 32 denní dospělce. Larvální stádia hmyzu s proměnou nedokonalou mají často srovnatelné koncentrace hemocytů s dospělci. Naproti tomu některé druhy s proměnou dokonalou mají vyšší koncentrace hemocytů během larválního vývoje než v dospělosti. Koncentrace hemocytů se může skokově měnit během metamorfózy, kdy jsou vytvářeny specifické druhy hemocytů. Koncentrace hemocytů v hemolymfě slunéčka *H. axyridis* se v průběhu larválního vývoje příliš nemění, spíše klesá směrem ke stádiu prepupy a je celkově docela nízká (cca 5500 hemocytů v 1 μ l hemolymfy). Jeden den staří dospělci mají v průměru 11500 hemocytů v 1 μ l hemolymfy. Koncentrace hemocytů dále roste až do 8. dne stáří dospělce (v průměru 30000 hemocytů v 1 μ l hemolymfy). Během dalšího života dospělců (do 32. dne stáří) již zůstává koncentrace hemocytů v hemolymfě víceméně konstantní. Je zajímavé, že *H. axyridis* se trochu vymyká převládajícím hmyzím trendům i ontogenetickým vývojem svého imunitního systému, když preimaginální stádia mají výrazně nižší koncentrace hemocytů v hemolymfě než dospělci. Na posteru by již měla být prezentována i data pro ontogenetický vývoj humorální složky imunitního systému *H. axyridis*.

Příloha 17: Vědecký příspěvek na konferenci Zoologické dny 2016.

Ontogeneze vybraných imunitních a fyziologických parametrů u invazivního slunéčka *Harmonia axyridis*

Michal Řeřicha (1), Pavel Dobeš (2), Pavel Hyršl (2), Michal Knapp (1)

(1) Katedra ekologie, FŽP-ČZU v Praze, Praha 6 – Suchbátka

(2) Ústav experimentální biologie PřF MU, Brno

Slunéčko východní (*Harmonia axyridis* Pallas, 1773) je považováno za úspěšný invazní druh hmyzu. Jeden z mnoha faktorů, které mohou vysvětlovat úspěšnou invazi je výborně fungující imunitní systém. Zkoumali jsme vliv ontogeneze na koncentraci proteinů, koncentraci cirkulujících hemocytů a antimikrobiální aktivitu proti gramnegativní bakterii *Escherichia coli*. Vliv ontogeneze na vybrané imunitní mechanismy byl zkoumán od 3. larválního instaru až po ranou dospělost. Koncentrace proteinů rostla během prvních 32 dnů života dospělce a v larválních stádiích dosahovala střední hodnoty. Koncentrace hemocytů byla nízká v larvách a strmě stoupala během prvních 8 dní života dospělce. Účinnost hemolymfy proti růstu *E. coli* byla nejnižší v larválních instarech a prudce vzrostla v prepupální části života. Během života dospělců se účinnost pouze lehce zvyšovala. Obecně lze říci, že ontogeneze sledovaných imunitních a fyziologických parametrů u *H. axyridis* je rozdílná než u jiných zástupců z třídy hmyzu. Rozdíly v průběhu ontogeneze u měřených fyzioimunitních parametrů mají také významné metodologické důsledky, ve srovnávacích studiích by vždy měli být porovnáváni stejně staří jedinci. Z metodologických důvodů byl v práci též testován vliv metody odběru hemolymfy z těla slunéček na koncentraci proteinů a koncentraci cirkulujících hemocytů. Pro slunéčka totiž existují dvě základní možnosti odběru hemolymfy – reflexní krvácení a punkce. Výsledky ukazují, že mezi metodami není signifikantní rozdíl v žádném z měřených parametrů. Slunéčka tedy reflexně krvácejí stejnou hemolymfu, jako jim koluje uvnitř těla a při reflexním krvácení tak ztrácejí cenné hemocyty a bílkoviny.

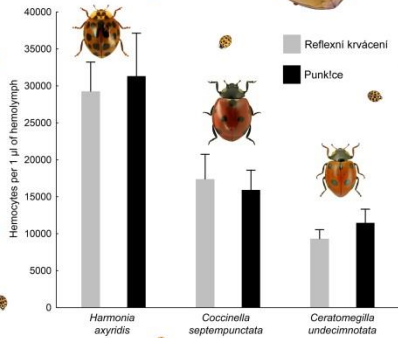
Klíčová slova: *Harmonia axyridis*, imunitní systém, ontogeneze, antimikrobiální aktivita, hemocyty, proteiny, reflexní krvácení, punkce

Příloha 18: Vědecký příspěvek na konferenci Kostelecké inspirování 2016.

Porovnání vlastností hemolymfy sluněček pocházející z tělní dutiny a z reflexního krvácení

Michal Řeřicha (1), Pavel Dobeš (2), Pavel Hyršl (2), Michal Knapp (1)

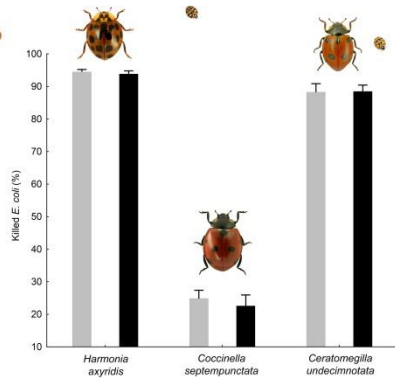
(1) Katedra ekologie, Fakulta životního prostředí, ČZU, Praha
(2) Ústav experimentální biologie PŘF MU, Brno



Obr. 1: Vliv metody odběru hemolymfy (punkce vs. reflexní krvácení) na koncentraci hemocytů v hemolymfě tří druhů sluněček.

Metodika

Pro tři druhy sluněček (*Harmonia axyridis*, *Coccinella septempunctata* a *Ceratomegilla undecimnotata*) jsme ověřovali, zda obsah hemocytů v hemolymfě vykrváčené je stejný jako v hemolymfě kolující uvnitř těla. Stejně tak jsme porovnávali obsah bílkovin a antimikrobiální aktivitu hemolymfy proti *E. coli*. Hemolymfa z tělní dutiny byla odebrána metodou punkce, tedy vpichem entomologickým špendlíkem o průměru 0,35 mm do těla v oblasti zadoprsí. Data byla analyzována pomocí zobecněných lineárních modelů s náhodnými efekty, kde identita zvířete byla použita jako náhodný efekt a metoda odběru hemolymfy (punkce či reflexní krvácení) jako nezávislá proměnná.

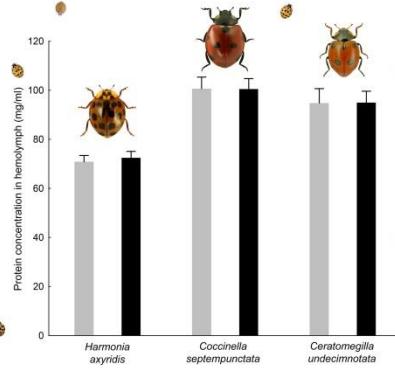


Obr. 3: Vliv metody odběru hemolymfy (punkce vs. reflexní krvácení) na antimikrobiální aktivitu hemolymfy proti *E. coli* u tří druhů sluněček.

Tento výzkum byl podpořen vnitřním grantem FŽP-ČZU v Praze s názvem "Výzkum biologie člověku prospěšných druhů brouků z čeledi střívkovitých a sluněčkovitých".

Úvod

Reflexní krvácení je jeden ze způsobů chemické obrany některých bezobratlých vůči predátorům. Hemolymfa sluněček obsahuje páchnoucí, nechutné a často pro predátory přímo toxické látky, především různé alkaloidy. U dospělých sluněček je reflexní krvácení realizováno především z kolenních kloubů a u larev z otvorů na hřbetní straně zadečkových článků. Reflexní krvácení samo o sobě může být pro sluněčka fyziologicky nákladné. Může znamenat ztrátu cenných bílkovin, hemocytů, vody atd. Nabízí se proto evoluční hypotéza, že mechanismy omezující tyto ztráty by měly zvyšovat fitness sluněček. Cílem naší studie bylo ověřit možnou existenci takových mechanismů.



Obr. 2: Vliv metody odběru hemolymfy (punkce vs. reflexní krvácení) na koncentraci bílkovin v hemolymfě tří druhů sluněček.

Výsledky

Výsledky ukazují, že koncentrace hemocytů ($F = 0,77$; $P = 0,38$; Obr. 1), bílkovin ($F = 0,20$; $P = 0,66$; Obr. 2) ani antimikrobiální aktivita ($F = 2,26$; $P = 0,14$; Obr. 3) se neliší mezi hemolymfou z tělní dutiny a tou reflexně vykrváčenou pro žádné ze zkoumaných druhů. Jsou zde však patrné rozdíly ve všech měřených parametrech mezi druhy: hemocyty ($F = 16,00$; $P < 0,001$), bílkoviny ($F = 16,19$; $P < 0,001$) a antimikrobiální aktivita ($F = 186,33$; $P < 0,001$).

Diskuze

Výsledek má jak metodologické souvislosti (možnost odběru hemolymfy pro imunologické analýzy bez traumatizace zvířat jejich poraňováním), tak praktické důsledky pro život sluněček (s plnohodnotnou hemolymfou obsahující velké množství hemocytů je třeba Setřít). Naše studie navíc ukazuje zajímavé mezidruhové rozdíly v základních parametrech hemolymfy sluněček. Například invazivní sluněčko *Harmonia axyridis* má významně vyšší koncentraci hemocytů než dva zkoumané druhy našich původních sluněček. Překvapením je vysoká antimikrobiální aktivita u druhu *Ceratomegilla undecimnotata*, která je téměř srovnatelná s antimikrobiální aktivitou invazivního sluněčka *Harmonia axyridis*, které bylo dosud považováno za imunitního supermana mezi sluněčky.

Porovnání vlastností hemolymfy slunéček pocházející z tělní dutiny a z reflexního krvácení

Michal Řeřicha (1), Pavel Dobeš (2), Pavel Hyršl (2), Michal Knapp (1)

(1) Katedra ekologie, FŽP-ČZU v Praze, Praha 6 – Suchbátka

(2) Ústav experimentální biologie PřF MU, Brno

Reflexní krvácení je jeden ze způsobů chemické obrany některých bezobratlých vůči predátorům. Hemolymfa slunéček obsahuje páchnoucí, nechutné a často pro predátory přímo toxické látky, především různé alkaloidy. U dospělců slunéček je reflexní krvácení realizováno především z kolenních kloubů a u larev z otvorů na hřbetní straně zadečkových článků. Reflexní krvácení samo o sobě může být pro slunéčka fyziologicky nákladné. Může znamenat ztrátu cenných bílkovin, hemocytů, vody atd. Nabízí se proto evoluční hypotéza, že mechanismy omezující tyto ztráty by měly zvyšovat fitness slunéček. Cílem naší studie bylo ověřit možnou existenci takových mechanismů. Pro tři druhy slunéček (*Harmonia axyridis*, *Coccinella septempunctata* a *Ceratomegilla undecimnotata*) jsme ověřovali, zda obsah hemocytů v hemolymfě vykrváčené je stejný jako v hemolymfě kolující uvnitř těla. Stejně tak jsme porovnávali obsah bílkovin a antimikrobiální aktivitu hemolymfy proti *E. coli*. Hemolymfa z tělní dutiny byla odebrána metodou punkce, tedy vpichem entomologickým špendlíkem o průměru 0,35 mm do těla v oblasti zadoprší. Předběžné výsledky ukazují, že koncentrace hemocytů a bílkovin se neliší mezi hemolymfou z tělní dutiny a tou reflexně vykrváčenou pro žádný ze zkoumaných druhů. Výsledek má jak metodologické souvislosti (možnost odběru hemolymfy pro imunologické analýzy bez traumatizace zvířat jejich poraňováním), tak praktické důsledky pro život slunéček (s plnohodnotnou hemolymfou obsahující velké množství hemocytů je třeba šetřit). Naše studie navíc ukazuje zajímavé mezidruhové rozdíly v základních parametrech hemolymfy slunéček. Například invazní slunéčko *Harmonia axyridis* má významně vyšší koncentraci hemocytů než dva zkoumané druhy našich původních slunéček.

Klíčová slova: imunitní systém, punkce, reflexní krvácení, antimikrobiální aktivita, hemocyty, proteiny, chemická obrana

Příloha 19: Vědecký příspěvek na konferenci Zoologické dny 2017.

Ontogeny of protein content, hemocyte concentration and antimicrobial activity against *Escherichia coli* in invasive harlequin ladybird, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae)

MICHAL ŘEŘICHA¹, PAVEL DOBEŠ², PAVEL HYRŠL², MICHAL KNAPP^{1*}

¹ Department of Ecology, Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Prague, Czech Republic

² Department of Animal Physiology and Immunology, Institute of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

* Correspondence:

Michal Knapp, Department of Ecology, Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, Praha 6 – Suchbát, 165 21, Czech Republic. Tel. +420 22438 3853 e-mail: knapp@fzp.czu.cz

Running Header: Ontogeny of basic immune parameters

Word count (total): 6960

Word count (main body): 4555

Abstract

The harlequin ladybird is considered to be one of the most successful invasive insect species. Its invasive success is among the other traits thought to be caused also by a powerful immune system. Here we investigated ontogenic profile of protein concentration, circulating hemocyte count and constitutive antimicrobial activity against *Escherichia coli* in *Harmonia axyridis* hemolymph during late larval development and early adult life. Protein concentration increased during the first 32 days of adult life from 45 to 100 mg per ml of hemolymph and reached intermediate values during larval stages. Concentration of circulating hemocytes was very low, 5,000 hemocytes per μl of hemolymph, in late larval stages and increased strongly during first eight days of adult life to values around 30,000 hemocytes per μl of hemolymph. The killing efficiency of hemolymph against *E. coli* was lowest in larval stages, rapidly increased in the prepupal stage and then steadily grown during the whole investigated period of adult life. There were no significant effects of sex on any of the investigated physiological or immune parameters. In general, patterns observed for *H. axyridis* contrast with many results that have been reported for other insects, e.g., bees, fruit flies, crickets or mosquitoes. Possible explanation is contrasting life history of *H. axyridis* with fast preimaginal development and long adult lifespan linked to long reproductive period. Substantial variation in physiological and immune parameters during ontogeny has also important methodological implications, as individuals of exactly the same stage/age have to be employed for comparative studies.

Key Words:

ageing, antimicrobial activity, hemocyte concentration, innate immunity, invasive species, ontogenetic stage, sexual dimorphism, total protein

Introduction

The harlequin ladybird, *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773), investigated in this study is considered to be one of the most invasive insect species (Brown et al., 2011, Lombaert et al., 2011). *H. axyridis* is native to East Asia, particularly to areas with temperate and subtropical climate (Brown et al., 2008). During the last decades it has been introduced to many European countries and to North America many times (Brown et al., 2011, Lombaert et al., 2010). The harlequin ladybird has been used there as biological control agent in orchards, as this aphidophagous species is known for its high voracity and high fertility (Raak-van den Berg et al., 2012, Tayeh et al., 2015, Pell et al., 2008). Invasive populations probably originated in the eastern US by hybridisation between two Asian subspecies, subsequently crossed the ocean to the Europe, where European invasive populations emerged by hybridisation between US invasive populations and biocontrol strains reared locally in orchards (Lombaert et al., 2010). The speed of range expansion in a novel environment is extremely fast, as in 15 years (2000-2015) the species spread over almost the whole of Europe (Ukrainsky and Orlova-Bienkowskaja, 2014, Brown et al., 2011). Moreover, this species has the potential to cause a decline of native ladybird species through its superiority in intra-guild predation (Raak-van den Berg et al., 2012, Roy et al., 2012).

Rapid spread, high densities of established populations and the potential risk for native species resulted in extremely intensive research efforts, which focused on various aspects of *H. axyridis* biology (for example see Sloggett et al., 2011, Pell et al., 2008, Brown et al., 2008, Dmitriew, 2011, Firlej et al., 2012, Hodek et al., 2012, Knapp and Nédved, 2013, Lombaert et al., 2010, Roehrich et al., 2012, Vilcinskis et al., 2013a). The powerful immune system of *H. axyridis* seems to be one of several possible causes of this successful invasion (Vogel et al., in press). Previous research has revealed several interesting findings (see below), however some areas are still unexplored. *H. axyridis* hemolymph contained much higher antimicrobial activity than hemolymph of *Coccinella septempunctata*, which is the most common and abundant ladybird species native to Europe (Gross et al., 2010). Partially responsible for this pattern could be a specific alkaloid called harmonine that has also the potential to be used in human medicine as it shows antimalarial activity (Roehrich et al., 2012, Schmidtberg et al., 2013). Interestingly, the constitutive chemical defence

of *H. axyridis* based on alkaloid harmonine is lowered by immune challenge, followed by enhanced production of antimicrobial peptides (Schmidtberg et al., 2013). *H. axyridis* is characterised by an extremely diverse antimicrobial peptide repertoire comprising of more than 50 various antimicrobial peptides from seven gene families, some of them are present constitutively and others induced after immune challenge (Vilcinskas et al., 2013a). Moreover, the cooperation of harmonine and antimicrobial peptides, specifically coleopterins and C-type lysozyme, resulting in a potentiated antimicrobial effect was described in this species (Beckert et al., 2015). An additional difference between *H. axyridis* and other ladybird species is the high load of *Nosema* microsporidia present in the former species without any noticeable detrimental effects (Vilcinskas et al., 2013b). Microsporidia were suggested to function as biological weapons during intraguild predation events (Vilcinskas et al., 2013b); however there is still controversy regarding the ecological relevance of Microsporidia in coccinellid interactions (de Jong et al., 2013, Sloggett, 2013). Knowledge of cellular immunity of *H. axyridis* is quite scarce. Firlej et al. (2012) identified five types of hemocytes (plasmatocytes, granulocytes I and II, oenocytes and spherule cells) and described their role in nodulation and encapsulation.

The insect immune system has to face various challenges during particular developmental phases which is especially evident in holometabolous taxa with substantial discrepancy in the preimaginal and adult way of life (Wilson-Rich et al., 2008, Nation, 2015). In addition, the pupal stage represents a period of dramatic tissue reorganisation that is expected to also affect the function of immune system (Nation, 2015). As maintenance of the immune system is energetically costly, competition for resources between the immune system and other life-history traits is supposed to occur within organisms and resource allocation could differ during ontogeny (Wilson-Rich et al., 2008, Khan et al., 2016, Schwenke et al., 2016). Despite supposed variations in immune functions during insect life, only a limited number of studies have investigated the ontogeny of the insect immune system and its ageing. Knowledge is limited mainly to insect model taxa such as fruit flies (Khan and Prasad, 2013, Krzemien et al., 2010, Lanot et al., 2001), medically important taxa such as mosquitoes (Hillyer et al., 2005, King and Hillyer, 2013), taxa providing valuable ecosystem services such as bees (Gaetschenberger et al., 2013, Laughton et

al., 2011, Wilson-Rich et al., 2008), crop pests including moths (Tan et al., 2013, Gardiner and Strand, 2000, Milks et al., 1998, Stoepler et al., 2013) and pests of stored products such as flour beetles (Khan et al., 2016). To our best knowledge, information on ontogeny of immune system in invasive insect species and specifically in ladybirds is limited to a single study performed by Schmidtberg *et al.* (Schmidtberg et al., 2013), who compared only the egg stage, one larval stage and adults of unspecified age. The well-defined ontogeny of the immune system, especially its constitutive part which is responsible for primary response to pathogens, is not only interesting from the perspective of insect ecology and evolutionary biology, but also represents an important methodological issue. Variation in immune system parameters during ontogeny needs to be taken into account when designing comparative studies, e.g., inter population or inter specific comparisons, where the exactly same developmental stages must be compared.

Evolutionary theory postulates possible sex specific investment into immune system (McKean and Nunnery, 2005, Rolff, 2002, Schwenke et al., 2016). Limited evidence indicates that females outperform males at least for some immune parameters (Lindsey and Altizer, 2009, Nunn et al., 2009) and such sex specific differences could be enhanced under resource deficiency, when competition for resources is increased (McKean and Nunnery, 2005). As fitness benefits resulting from increased longevity differ between sexes, investment into immune systems during aging is predicted to be sex specific (Rolff, 2002). To our best knowledge, only a single study performed by Koegel et al. (2012) compared sex differences in immune system (specifically antimicrobial activity) of several days old adult ladybirds. There is no study investigating the effect of interaction between sex and age on any immune parameter in ladybirds.

The aim of this study was to investigate the ontogeny of principal physiological (total protein concentration in hemolymph) and immune parameters (concentration of circulating hemocytes and constitutive antimicrobial activity against *Escherichia coli*) during late preimaginal stages (3rd larval instar, 4th larval instar and pupal stage) and early adult life (from 1 day to 32 days old adults) in *Harmonia axyridis*. In addition, the effect of sex as well as the interaction between sex and adult age were investigated.

Materials and Methods

Insect rearing and sampling of hemolymph

The parental individuals used in the present study were collected in August 2015 from shrubs and lime trees near university campus in Czech University of Life Sciences Prague, Czech Republic (GPS: 50°8' N, 14°21' E; 300 m a.s.l.). No specific permissions were required for collecting *H. axyridis* as this common invasive species is not protected by Czech law. After transportation to the laboratory, beetles were sexed and parental pairs were formed. Each couple was placed onto a separate Petri dish (9 cm in diameter) containing crumpled filter paper strips, which provides suitable substrate for egg laying. Beetles were bred in a long day photoperiod (16L:8D) at constant temperature 26°C. The relative humidity was kept at 70 %. Beetles were fed ad libitum with eggs of *Ephestia kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae) and provided with honey dissolved in water. *Ephestia* eggs were produced by Andermatt Biocontrol AG, Switzerland. Food and water were changed daily and at the same time laid egg clutches were checked. After several days, three fecund parental pairs were selected and their offspring was used in the laboratory experiment investigating ontogenetic development of *H. axyridis* immune system.

Egg clutches and subsequently hatched larvae and adults were kept under the same conditions as parental pairs (16L:8D, 26 °C, 70 % humidity, food and water ad libitum) with the exception of omitting honey dissolved in water. The first and second instar larvae were reared together (complete clutch) in one Petri dish. When larvae moulted to the third instar, they were assigned randomly to new Petri dishes (four to five individuals in each) to reduce encounters between these larger larvae. After laying, egg clutches were assigned at random to one of nine ontogenetic stages: 3rd larval instar, 4th larval instar, prepupal stage, newly hatched adult (1 day old), 2 days old adult, 4 days old adult, 8 days old adult, 16 days old adult and 32 days old adult. Ten individuals per parental pair were sampled from each of the preimaginal stages – half of them were used to determine hemocyte concentration and the rest for other immune and physiological analyses (see below). Newly hatched adults were sexed and four individuals per sex and parental pair were sampled for hemolymph at age of 1, 2, 4, 8, 16 and 32 days and processed likewise the samples from

preimaginal stages. Small body size resulting in insufficient amount of hemolymph precluded sampling of the youngest larval stages for purposes of this study.

To sample hemolymph, animals were glued by their back to stick tape and stimulated by an entomological pin to perform reflex bleeding. A drop of fresh hemolymph (ca 0.5 – 1.2 μ l) was aspirated using a glass microcapillary (Hirschmann, Germany) and the amount of hemolymph was measured by digital calliper with precision to 0.01 mm. A volume of 1 μ l corresponds to 15 mm of microcapillary tube length. The hemolymph from individual animals was diluted in anticoagulant buffer (62 mM NaCl, 100 mM glucose, 10 mM EDTA, 30 mM trisodium citrate, and 26 mM citric acid) according to Firlej *et al.* (Firlej et al., 2012) and immediately used to count hemocytes or frozen at -25 °C for further analyses. Note that samples for several individuals are missing in the final dataset (for details see S1 Dataset) due to technical complications that occur during hemolymph sampling (fast hemolymph clotting precluded proper sampling).

Determination of physiological and immune parameters

Protein concentration in the hemolymph was measured colorimetrically by a Bradford protein assay (Bio-Rad, USA) according to manufacturer instructions. Serial dilution of control serum Bio-La-Test® LYONORM (Erba Lachema, Czech Republic) was used as a standard.

The hemocyte concentration was counted from hemolymph of individual animals in a Bürker chamber under the microscope Olympus CX31 (Japan).

The antimicrobial activity of hemolymph towards Gram-negative bacteria was measured luminometrically using bioluminescent *Escherichia coli* K12, which contains luxABCDEamp plasmid for expression of bacterial luciferase and its substrate, according to Vojtek *et al.* (Vojtek et al., 2014). Briefly, 40 μ l of hemolymph diluted in anticoagulant buffer (100x dilution) was mixed in reaction well with 120 μ l of bacteria working solution containing 100,000 bacterial cells in phosphate buffer (pH 7). The luminescence signal, which is positively correlated with viability of *E. coli* K12 was recorded by luminometer Chameleon V™ (Hidex, Finland) in counts per second (CPS). The antimicrobial effect of hemolymph was expressed as mortality of the bacterial suspension caused by diluted hemolymph of

individual animals 10 min after beginning of the measurement. There is dose-dependent relationship between the volume of insect haemolymph used for the assay and the number of killed bacteria as described previously (Vojtek et al., 2014). The luminescence signal of control (40 µl of anticoagulant buffer + 120 µl of bacterial working solution) marked 100 % viability and was used to quantify the decrease caused by antimicrobial effect of hemolymph (bacterial mortality). The antimicrobial activity was verified by plating the reaction mixture in serial dilution on agar plates after the end of luminometric measurement for subset of samples. The plates were incubated overnight at 30 °C and number of colony forming units counted.

Statistical analyses

To analyse ontogenetic changes in immune and physiological parameters, generalised linear mixed models (GLMMs) were applied using “glmmPQL” function implemented in the “nlme” package (Pinheiro et al., 2013) for R (R Development Core Team, 2016). Separate models were performed for all particular parameters, namely protein concentration in hemolymph, hemocyte concentration and antimicrobial activity towards *E. coli*. Parental pair identity was used as random effect in all analyses. To analyse differences between particular ontogenetic stages (3rd larval instar; 4th larval instar; prepupa; 1 day old adult; 2, 4, 8, 16, 32 days old adults) in measured parameters, the ontogenetic stage was used as fixed effect. Tukey’s HSD tests were employed to test for significant differences between particular ontogenetic stages using “glht” function as implemented in the package “multcomp” (Hothorn et al., 2008). To analyse potential sexual dimorphism in particular immune parameters, models including sex, adult age and interaction between sex and adult age as fixed effects were performed for dataset limited to adult stages. It is not possible to distinguish between sexes based on morphological characters in preimaginal stages. To analyse the effects of protein concentration in hemolymph and hemocyte concentration, GLMMs with a gamma distribution of errors and logarithmic link function were used. To analyse effects of antimicrobial activity towards Gram-negative bacteria, GLMMs with a binomial distribution of errors were employed. All raw data serving as input for the above-mentioned analyses are available in Supporting information Table S1 - Dataset.

Results

Protein concentration in hemolymph differed during ontogenetic development of *H. axyridis* from 3rd larval instar to 32 days old adults (GLMM: $F = 31.06$, $P < 0.001$; Fig. 1). Protein concentration was intermediate during preimaginal development (ca 70 mg per ml of hemolymph). The lowest concentration of proteins in hemolymph was observed in newly hatched adults (ca 45 mg per ml of hemolymph) and then it steadily increased along with the age of adult *H. axyridis*. The protein concentration was highest in more than 8 days old adults (ca 100 mg per ml of hemolymph).

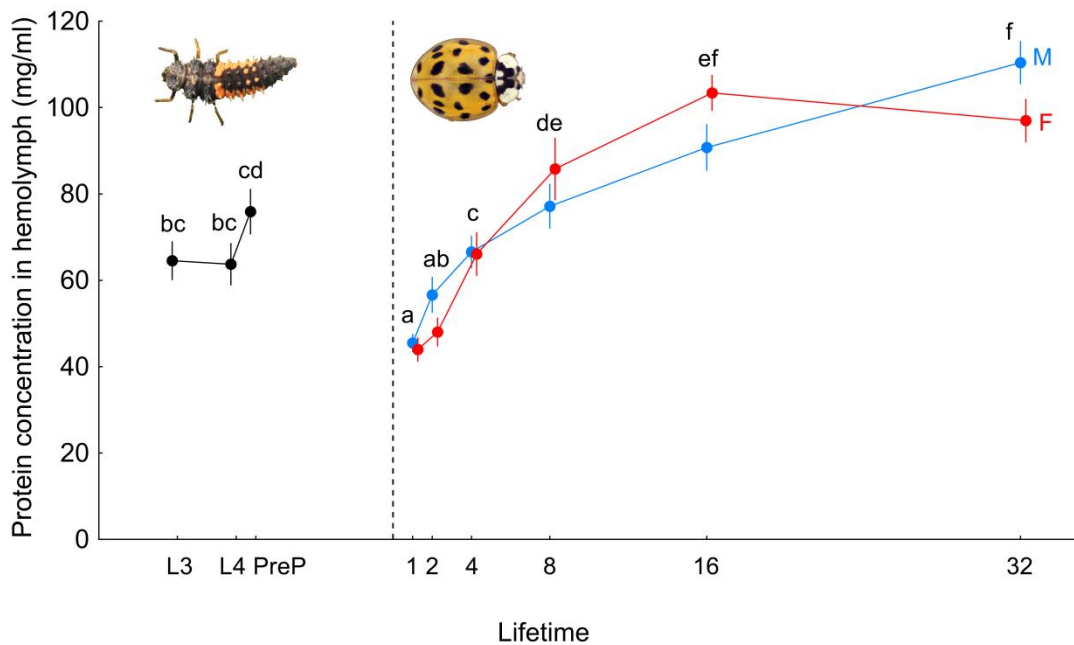


Fig. 1. Effect of ontogenetic stage on total protein concentration in hemolymph of *Harmonia axyridis*. Lifetime is presented in days since eclosion for adult beetles (right of the dashed line). Preimaginal stages are labelled as follows: L3 = 3rd larval instar, L4 = 4th larval instar and PreP = prepupal stage. Significant differences ($P < 0.05$) in total protein concentration among particular ontogenetic stages are indicated by unshared letters above them. Mean values \pm SE are shown separately for adult males (M) and females (F).

Total hemocyte concentration differed significantly during ontogenetic development of *H. axyridis* (GLMM: $F = 30.40$, $P < 0.001$; Fig. 2). Total hemocyte concentrations were very low in preimaginal stages (ca 5,000 hemocytes per μl of hemolymph), but increased sixfold during early adult life and from eight day of adult life onwards hemocyte concentration stayed constant until one month of adult age (ca 30,000 hemocytes per μl of hemolymph).

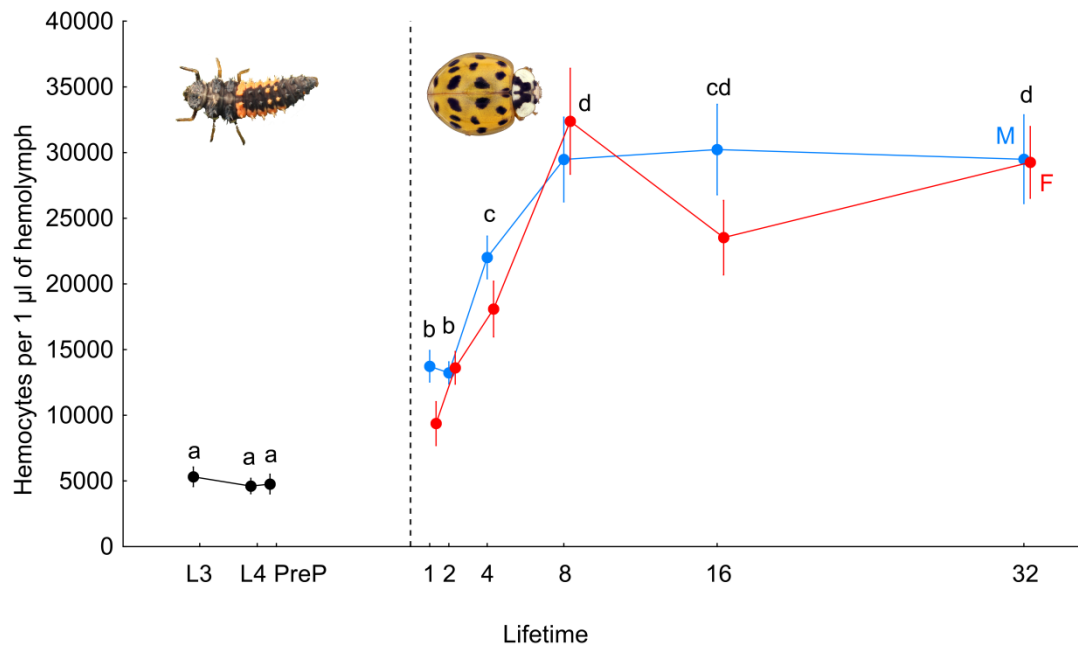


Fig. 2. Effect of ontogenetic stage on concentration of circulating hemocytes in hemolymph of *Harmonia axyridis*. Lifetime is presented in days since eclosion for adult beetles (right of the dashed line). Preimaginal stages are labelled as follows: L3 = 3rd larval instar, L4 = 4th larval instar and PreP = prepupal stage. Significant differences ($P < 0.05$) in hemocyte concentration among particular ontogenetic stages are indicated by unshared letters above them. Mean values \pm SE are shown separately for adult males (M) and females (F).

The constitutive antimicrobial activity of hemolymph towards *E. coli* changed significantly during ontogenetic development of *H. axyridis* (GLMM: $F = 29.82$, $P < 0.001$; Fig. 3). The efficiency of hemolymph against *E. coli* was lowest in larval stages (60 to 70 % bacterial mortality) and rapidly increased in prepupal stage (80 % bacterial mortality). The hemolymph of young adults retained its activity from the prepupal stage and slightly increased during adult life to more than 90 % bacterial mortality caused by hemolymph of one month old adults. The results of cultivation corresponded to changes of bacterial viability observed by luminometry (data not shown).

There were no significant effects ($P < 0.05$) of sex and interaction between sex and adult age on any of the investigated physiological or immune parameters. However, effects of interaction between sex and adult age were marginally significant (P -values between 0.07 and 0.14) for all investigated parameters (for details see Supporting information Table S2).

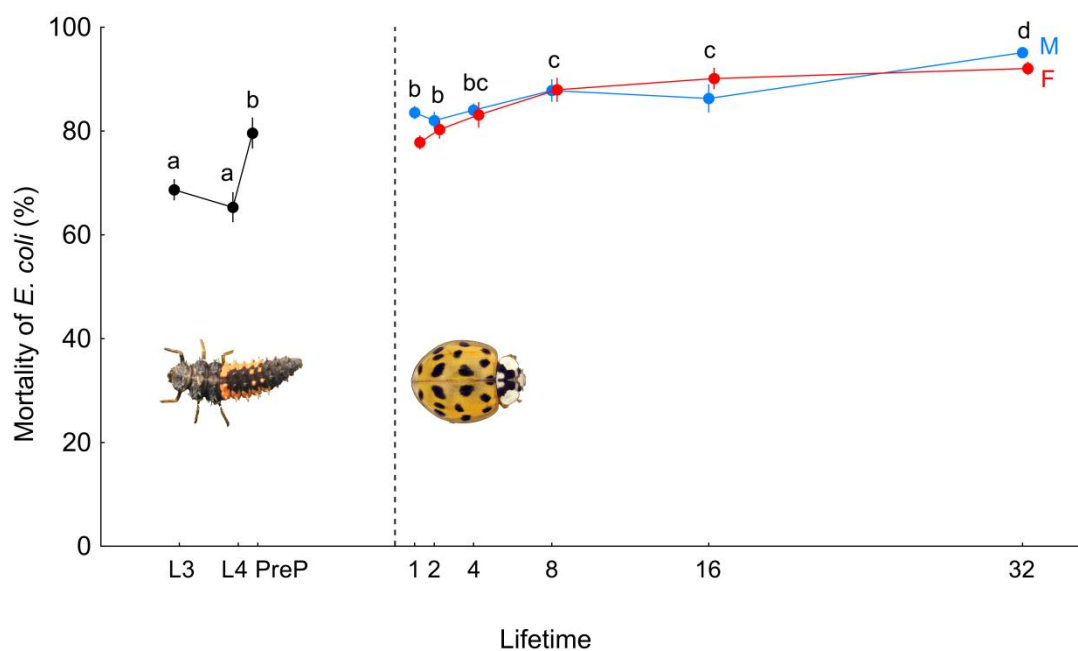


Fig. 3. Effect of ontogenetic stage on constitutive antimicrobial activity of *Harmonia axyridis* hemolymph against *Escherichia coli*. Activity of antimicrobial factors present in *H. axyridis* haemolymph is expressed as the percentage of *E. coli* killed by 0.4 μ l of undiluted hemolymph. Lifetime is presented in days since eclosion for adult beetles (right of the dashed line). Preimaginal stages are labelled as follows: L3 = 3rd larval instar, L4 = 4th larval instar and PreP = prepupal stage. Significant differences ($P < 0.05$) in mortality of *E. coli* among applications of hemolymph originating from particular *H. axyridis* ontogenetic stages are indicated by unshared letters above the stages. Mean values \pm SE are shown separately for adult males (M) and females (F).

Discussion

In the present study, we report substantial changes in physiological and immune parameters dependent on developmental stage and age of *H. axyridis*, a species proposed as a model for invasive insects. Significant variation in physiological and immune parameters during ontogeny has important evolutionary consequences and methodological implications for immunological studies. Furthermore, our results provide additional support to previously published data indicating the existence of very efficient immune system in *H. axyridis* which is supposedly responsible for exceptional invasive success of this ladybird species. It is of note that the efficiency of *H. axyridis* hemolymph against *Escherichia coli* was very potent even without prior immune challenge and activation of induced antimicrobials that would further boost animal resistance.

The hemolymph as well as proteins diluted in hemolymph plasma have a multiple functions ranging from the physiological roles, such as storage of nutrients or hormonal regulation, to the immune processes mediating response of insect to potential pathogens. We observed significant variation in total hemolymph proteins during ontogeny of *H. axyridis*. As the protein concentration in hemolymph is substantially influenced by starvation (Handke et al., 2013) and dehydration of insect (Wilson-Rich et al., 2008), we provided ladybirds with food and water ad libitum to ensure that the observed variation in protein level depends solely on development. The protein concentration tends to be higher in the prepupal stage than in early 4th larval instar which is consistent with early observations in another holometabolous insect species, *Bombyx mori*, in which the increase of hemolymph proteins precedes the spinning period (Wyatt et al., 1956). Not surprisingly, a rapid drop of hemolymph proteins occurred in the pupal stage of *H. axyridis*, when the insect undergoes the transformation accompanied by hormonal changes and increased energy costs (Nation, 2015). The total protein concentration in hemolymph of 16 days old foragers of *Apis mellifera* was lower compared to larvae and pupae (Wilson-Rich et al., 2008) contrasting with *H. axyridis* where the protein concentration increased during adult life and its maximum exceeded the protein level in larvae. The concentration of proteins in *H. axyridis* hemolymph (app. 50 - 100 mg/ml) is higher than in *A. mellifera* (app. 2 - 40 mg/ml; Wilson-Rich et al., 2008), *B. mori* (app. 12 - 52 mg/ml in larvae and pupae; Wyatt et al., 1956) or *Drosophila*

melanogaster (third larval instar app. 30 mg/ml; personal observation), resembling more the level of proteins observed in Lepidopteran model species such as *Galleria mellonella* (final larval instar app. 80 - 100 mg/ml; Wyatt et al., 1956).

In general, studies investigating the ontogeny of innate cellular immune systems in insects report an increase in hemocyte numbers during larval development (Gardiner and Strand, 2000, Lanot et al., 2001, Strand, 2008, Tan et al., 2013, Wilson-Rich et al., 2008) and a decrease in hemocyte numbers during adulthood (Hillyer et al., 2005, King and Hillyer, 2013, Park et al., 2011, Wilson-Rich et al., 2008). Our results for *H. axyridis* indicate that the possible increase in total circulating hemocyte numbers during late larval development is driven solely by increase in total hemolymph volume as hemocyte concentration remains constant. A contrasting pattern was observed for the moths *Pseudoplusia includens* and *Spodoptera frugiperda* by Gardiner and Strand (2000), who recorded an increase in both hemocyte concentration and hemolymph volume during larval development. Increasing numbers of hemocytes during early adulthood in *H. axyridis* contrasts with the pattern reported for bees, mosquitoes and crickets (Hillyer et al., 2005, King and Hillyer, 2013, Park et al., 2011, Wilson-Rich et al., 2008). This could be due to the fact that adult ladybirds are relatively long living animals, overwintering adults could live for almost a year, males repeatedly fertilize females, which are able to lay eggs for a period of several months, and thus it could be advantageous for both sexes to invest into the immune system after emergence (Hodek et al., 2012). A similar pattern of hemocyte increase during early adulthood was reported for dragonfly species *Lestes viridis* (Rolf, 2001), whose adults are known for their extremely long period of sexual maturation lasting more than a month (Sternberg and Buchwald, 1999). Interestingly, *H. axyridis* larvae have substantially lower hemocyte concentration than adults, which contrasts with the trend observed in bees and fruit flies (Lanot et al., 2001, Wilson-Rich et al., 2008). A possible explanation lies in the life history of aphidophageous ladybirds. Larvae need to exploit ephemeral food sources and often suffer from substantial intraguild predation and cannibalism when aphids are exploited (Hodek et al., 2012). Ladybird larvae thus need to invest into fast growth and preimaginal development, which could be compensated by a lower investment into innate cellular immune system (Dmitriew, 2011, Knapp, 2014, Labrie et al., 2006).

Our results further confirm the previously reported extremely high constitutive antimicrobial activity of *H. axyridis* hemolymph that outperformed even some other ladybird species (e.g., *Coccinella septempunctata*; Gross et al., 2010, Schmidtberg et al., 2013). The activity against Gram-negative *E. coli* K12 was found to be approximately fourfold and fivefold higher in larvae and adults of *H. axyridis*, respectively, compared to traditional insect model species *G. mellonella* and *B. mori* (Vojtek et al., 2014). The hemolymph of *H. axyridis* was described to contain multiple factors with the activity towards Gram-negative bacteria, including attacins, coleopterins and the alkaloid harmonine (Beckert et al., 2015, Roehrich et al., 2012, Vilcinskas et al., 2013a). It is of note that some other immune effectors, that have not been described in *H. axyridis* yet, can contribute to the observed antibacterial effect. For instance, reactive oxygen and nitrogen species were identified as mediators of early immune response in insects (Bergin et al., 2005, Foley and O'Farrell, 2003, Nappi et al., 2000) and the study of their production in coccinellids would be of great interest. Comparisons of antimicrobial activity of *H. axyridis* larvae and adults against *E. coli* have been previously performed by Schmidtberg et al. (2013) and Gross et al. (2010). Unfortunately both studies investigated adults of unspecified age and Schmidtberg et al. (2013) did not specify nor the investigated larval stage. Schmidtberg et al. (2013) discovered significantly higher innate antimicrobial activity against *E. coli* in adults, whereas Gross et al. (2010) found that adults have similar innate antimicrobial activity against *E. coli* as larvae of 4th instar. Our results show that the discrepancy in results of above mentioned studies could be caused by comparison of different ontogenetic stages. If late 4th instar larvae near to pupation are compared to fresh adults, no difference in antimicrobial activity is observed. If 3rd instar larvae are compared to older adults, significant difference in antimicrobial activity is observed. Thus the precise staging of experimental animals could have an impact on study results and precise knowledge on ontogeny of various physiological parameters are crucial.

Investigations of changes in antimicrobial activity during ontogeny are missing in coccinellids, but similar studies have been performed in other insects. Generally, the expression of antimicrobial peptide genes is stable or mildly increases during larval development of *D. melanogaster* (the expression data for particular antimicrobial peptides are available at FlyBase.org) which is followed by substantial

increase of expression in prepupae. The increase of activity during larval stages and adulthood was described also regarding other immune parameters that might contribute to the antimicrobial activity, such as phenoloxidase activity (Benešová et al., 2009, Laughton et al., 2011). Consistent with the increase of activity against *E. coli* observed in our study, an increase in antimicrobial peptides at the first day of pupae was described in *B. mori* (Hou et al., 2016). It was suggested that the higher demands for antimicrobial defence compensates impaired barrier function of cuticle following each molt and protects insects at this vulnerable phase of life. An increase in the innate antimicrobial activity concurrent with increasing age was previously found in bee workers but no such trend was observed for drones where it was compensated by an increase in phenoloxidase activity (Laughton et al., 2011). A decrease in innate antimicrobial activity with increasing adult age was reported for *Tribolium castaneum* females but not males (Khan et al., 2016). However, comparisons between studies and species are complicated as time scales could differ. It is possible that just early adult phase is investigated in the present study and innate antimicrobial activity decrease in following months, when real senescence takes place. On the other hand, as mentioned previously, ladybirds substantially increase their fitness with increasing longevity and thus investment into immune system even in older age is possible (Hodek et al., 2012). This issue represents a promising area for future research.

Although sexual dimorphism in immune system and protein content in hemolymph seems to be quite common in insects (McKean and Nunney, 2005, Nunn et al., 2009, Schwenke et al., 2016), no significant differences between adult *H. axyridis* males and females were observed in this study. A possible explanation is that optimal rearing conditions do not allow to manifest trade-offs that could be sex specific (McKean and Nunney, 2005). Sexual dimorphism in immune function is frequently observed when insects are challenged by pathogens, whereas several cases where no such difference was observed have been reported for unchallenged insects (Freitak et al., 2012, Khan et al., 2016, Koegel et al., 2012, Moreno-Garcia et al., 2015). As maintenance of the immune system is energetically challenging and costs of reproduction frequently differ between sexes, because egg production is a more energy demanding process than sperm production, sexual dimorphism in immune parameters is supposed to manifest more strongly in reproducing adults (McKean

and Nunney, 2005, Schwenke et al., 2016). In this study unmated individuals were investigated and thus investigation of mated beetles could be a proper issue for a future study focused on sexual dimorphism in immune and physiological parameters of *H. axyridis*.

In conclusion, all investigated physiological and immune parameters varied significantly during late larval development and/or early adult life. Patterns observed in *Harmonia axyridis* are in many cases contrasting to those reported for other insects, e.g., bees, fruit flies, crickets or mosquitoes, which could be given by specific life strategy consisting of relatively fast larval development followed by long period of adult life. Our findings indicate that *H. axyridis* could be an interesting species for future investigation of trade-offs between immune system and other physiological processes as well as the proper species for inclusion into comparative interspecific studies. Significant variation in physiological and immune parameters during ontogeny has also important methodological implications. Individuals of exactly the same stage/age have to be compared in comparative studies, to omit bias caused by ontogenetic signal.

Acknowledgements

We are grateful to Radek Svoboda for his help with laboratory rearing of ladybirds, to Oldřich Nedvěd for sharing his knowledge of *Harmonia axyridis* biology and to Ulrich Theopold for valuable comments to early draft of the manuscript. The study was supported by grant no. 42110/1312/3123 awarded by the Internal Grant Agency of the Czech University of Life Sciences Prague.

REFERENCES

- BECKERT, A., WIESNER, J., BAUMANN, A., POPPEL, A.-K., VOGEL, H. & VILCINSKAS, A. 2015. Two c-type lysozymes boost the innate immune system of the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *Developmental and Comparative Immunology*, 49, 303-312.
- BENEŠOVÁ, J., DOBEŠ, P. & HYRŠL, P. 2009. Developmental changes in phenol-oxidizing activity in the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Bulletin of Insectology*, 62, 237-243.
- BERGIN, D., REEVES, E. P., RENWICK, J., WIENTJES, F. B. & KAVANAGH, K. 2005. Superoxide production in *Galleria mellonella* hemocytes: Identification of proteins homologous to the NADPH oxidase complex of human neutrophils. *Infection and Immunity*, 73, 4161-4170.
- BROWN, P. M. J., ADRIAENS, T., BATHON, H., CUPPEN, J., GOLDARAZENA, A., HAGG, T., KENIS, M., KLAUSNITZER, B. E. M., KOVAR, I., LOOMANS, A. J. M., MAJERUS, M. E. N., NEDVED, O., PEDERSEN, J., RABITSCH, W., ROY, H. E., TERNOIS, V., ZAKHAROV, I. A. & ROY, D. B. 2008. *Harmonia axyridis* in Europe: spread and distribution of a non-native coccinellid. *Biocontrol*, 53, 5-21.
- BROWN, P. M. J., THOMAS, C. E., LOMBAERT, E., JEFFRIES, D. L., ESTOUP, A. & HANDLEY, L.-J. L. 2011. The global spread of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae): distribution, dispersal and routes of invasion. *Biocontrol*, 56, 623-641.
- DE JONG, P. W., VAN LENTEREN, J. C. & RAAK-VAN DEN BERG, C. L. 2013. Comment on "Invasive Harlequin Ladybird Carries Biological Weapons Against Native Competitors". *Science*, 341.
- DMITRIEW, C. M. 2011. The evolution of growth trajectories: what limits growth rate? *Biological Reviews*, 86, 97-116.
- FIRLEJ, A., GIRARD, P.-A., BREHELIN, M., CODERRE, D. & BOIVIN, G. 2012. Immune Response of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) Supports the Enemy Release Hypothesis in North America. *Annals of the Entomological Society of America*, 105, 328-338.
- FOLEY, E. & O'FARRELL, P. H. 2003. Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to gram-negative bacteria in *Drosophila*. *Genes & Development*, 17, 115-125.
- FREITAK, D., KNORR, E., VOGEL, H. & VILCINSKAS, A. 2012. Gender- and stressor-specific microRNA expression in *Tribolium castaneum*. *Biology Letters*, 8, 860-863.
- GAETSCHENBERGER, H., AZZAMI, K., TAUTZ, J. & BEIER, H. 2013. Antibacterial Immune Competence of Honey Bees (*Apis mellifera*) Is Adapted to Different Life Stages and Environmental Risks. *Plos One*, 8.
- GARDINER, E. M. M. & STRAND, M. R. 2000. Hematopoiesis in larval *Pseudoplusia includens* and *Spodoptera frugiperda*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 43, 147-164.
- GROSS, J., EBEN, A., MUELER, I. & WENSING, A. 2010. A Well Protected Intruder: The Effective Antimicrobial Defense of the Invasive Ladybird *Harmonia axyridis*. *Journal of Chemical Ecology*, 36, 1180-1188.
- HANDKE, B., POERNBACHER, I., GOETZE, S., AHRENS, C. H., OMASITS, U., MARTY, F., SIMIGDALA, N., MEYER, I., WOLLSCHIED, B.,

- BRUNNER, E., HAFEN, E. & LEHNER, C. F. 2013. The Hemolymph Proteome of Fed and Starved Drosophila Larvae. *Plos One*, 8.
- HILLYER, J. F., SCHMIDT, S. L., FUCHS, J. F., BOYLE, J. P. & CHRISTENSEN, B. M. 2005. Age-associated mortality in immune challenged mosquitoes (*Aedes aegypti*) correlates with a decrease in haemocyte numbers. *Cellular Microbiology*, 7, 39-51.
- HODEK, I., HONĚK, A. & VAN EMDEN, H. F. 2012. *Ecology and Behaviour of the Ladybird Beetles (Coccinellidae)*, Chichester, UK, Willey-Blackwell.
- HOTHORN, T., BRETZ, F. & WESTFALL, P. 2008. Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical Journal*, 50, 346-363.
- HOU, Y., ZHANG, Y., GONG, J., TIAN, S., LI, J. W., DONG, Z. M., GUO, C., PENG, L., ZHAO, P. & XIA, Q. Y. 2016. Comparative proteomics analysis of silkworm hemolymph during the stages of metamorphosis via liquid chromatography and mass spectrometry. *Proteomics*, 16, 1421-1431.
- KHAN, I., PRAKASH, A. & AGASHE, D. 2016. Immunosenescence and the ability to survive bacterial infection in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Journal of Animal Ecology*, 85, 291-301.
- KHAN, I. & PRASAD, N. G. 2013. The Aging of the Immune Response in *Drosophila melanogaster*. *Journals of Gerontology Series a-Biological Sciences and Medical Sciences*, 68, 129-135.
- KING, J. G. & HILLYER, J. F. 2013. Spatial and temporal in vivo analysis of circulating and sessile immune cells in mosquitoes: hemocyte mitosis following infection. *Bmc Biology*, 11.
- KNAPP, M. 2014. Emergence of sexual size dimorphism and stage-specific effects of elevated temperature on growth rate and development rate in *Harmonia axyridis*. *Physiological Entomology*, 39, 341-347.
- KNAPP, M. & NĚDVED, O. 2013. Gender and Timing during Ontogeny Matter: Effects of a Temporary High Temperature on Survival, Body Size and Colouration in *Harmonia axyridis*. *Plos One*, 8, e74984.
- KOEGEL, S., EBEN, A., HOFFMANN, C. & GROSS, J. 2012. Influence of Diet on Fecundity, Immune Defense and Content of 2-Isopropyl-3-Methoxypyrazine in *Harmonia axyridis* Pallas. *Journal of Chemical Ecology*, 38, 854-864.
- KRZEMIEN, J., CROZATIER, M. & VINCENT, A. 2010. Ontogeny of the *Drosophila* larval hematopoietic organ, hemocyte homeostasis and the dedicated cellular immune response to parasitism. *International Journal of Developmental Biology*, 54, 1117-1125.
- LABRIE, G., LUCAS, E. & CODERRE, D. 2006. Can developmental and behavioral characteristics of the multicolored Asian lady beetle *Harmonia axyridis* explain its invasive success? *Biological Invasions*, 8, 743-754.
- LANOT, R., ZACHARY, D., HOLDER, F. & MEISTER, M. 2001. Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Developmental Biology*, 230, 243-257.
- LAUGHTON, A. M., BOOTS, M. & SIVA-JOTHY, M. T. 2011. The ontogeny of immunity in the honey bee, *Apis mellifera* L. following an immune challenge. *Journal of Insect Physiology*, 57, 1023-1032.
- LINDSEY, E. & ALTIZER, S. 2009. Sex differences in immune defenses and response to parasitism in monarch butterflies. *Evolutionary Ecology*, 23, 607-620.
- LOMBAERT, E., GUILLEMAUD, T., CORNUET, J.-M., MALAUSA, T., FACON, B. & ESTOUP, A. 2010. Bridgehead Effect in the Worldwide Invasion of the Biocontrol Harlequin Ladybird. *Plos One*, 5.

- LOMBAERT, E., GUILLEMAUD, T., THOMAS, C. E., HANDLEY, L. J. L., LI, J., WANG, S., PANG, H., GORYACHEVA, I., ZAKHAROV, I. A., JOUSSELIN, E., POLAND, R. L., MIGEON, A., VAN LENTEREN, J., DE CLERCQ, P., BERKVEN, N., JONES, W. & ESTOUP, A. 2011. Inferring the origin of populations introduced from a genetically structured native range by approximate Bayesian computation: case study of the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *Molecular Ecology*, 20, 4654-4670.
- MCKEAN, K. A. & NUNNEY, L. 2005. Bateman's principle and immunity: Phenotypically plastic reproductive strategies predict changes in immunological sex differences. *Evolution*, 59, 1510-1517.
- MILKS, M. L., BURNSTYN, I. & MYERS, J. H. 1998. Influence of larval age on the lethal and sublethal effects of the nucleopolyhedrovirus of *Trichoplusia ni* in the cabbage looper. *Biological Control*, 12, 119-126.
- MORENO-GARCIA, M., VARGAS, V., RAMIREZ-BELLO, I., HERNANDEZ-MARTINEZ, G. & LANZ-MENDOZA, H. 2015. Bacterial Exposure at the Larval Stage Induced Sexual Immune Dimorphism and Priming in Adult *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Plos One*, 10.
- NAPPI, A. J., VASS, E., FREY, F. & CARTON, Y. 2000. Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry*, 4, 423-430.
- NATION, J. L. 2015. *Insect Physiology and Biochemistry*, Boca Raton, CRC Press.
- NUNN, C. L., LINDENFORS, P., PURSALL, E. R. & ROLFF, J. 2009. On sexual dimorphism in immune function. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 364, 61-69.
- PARK, Y., KIM, Y. & STANLEY, D. 2011. CELLULAR IMMUNOSENESCENCE IN ADULT MALE CRICKETS, *Gryllus assimilis*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 76, 185-194.
- PELL, J. K., BAVERSTOCK, J., ROY, H. E., WARE, R. L. & MAJERUS, M. E. N. 2008. Intraguild predation involving *Harmonia axyridis*: a review of current knowledge and future perspectives. *Biocontrol*, 53, 147-168.
- PINHEIRO, J., BATES, D., DEBROY, S., SARKAR, D. & R DEVELOPMENT CORE TEAM 2013. *nlme: linear and nonlinear mixed effects models*. R package version 3.1-107.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM 2016. *R: A language and environment for statistical computing.*, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org>.
- RAAK-VAN DEN BERG, C. L., DE LANGE, H. J. & VAN LENTEREN, J. C. 2012. Intraguild Predation Behaviour of Ladybirds in Semi-Field Experiments Explains Invasion Success of *Harmonia axyridis*. *Plos One*, 7.
- ROEHRICH, C. R., NGWA, C. J., WIESNER, J., SCHMIDTBERG, H., DEGENKOLB, T., KOLLEWE, C., FISCHER, R., PRADEL, G. & VILCINSKAS, A. 2012. Harmonine, a defence compound from the harlequin ladybird, inhibits mycobacterial growth and demonstrates multi-stage antimalarial activity. *Biology Letters*, 8, 308-311.
- ROLFF, J. 2001. Effects of age and gender on immune function of dragonflies (Odonata, Lestidae) from a wild population. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie*, 79, 2176-2180.
- ROLFF, J. 2002. Bateman's principle and immunity. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 269, 867-872.
- ROY, H. E., ADRIAENS, T., ISAAC, N. J. B., KENIS, M., ONKELINX, T., SAN MARTIN, G., BROWN, P. M. J., HAUTIER, L., POLAND, R., ROY, D. B.,

- COMONT, R., ESCHEN, R., FROST, R., ZINDEL, R., VAN VLAENDEREN, J., NEDVED, O., RAVN, H. P., GREGOIRE, J.-C., DE BISEAU, J.-C. & MAES, D. 2012. Invasive alien predator causes rapid declines of native European ladybirds. *Diversity and Distributions*, 18, 717-725.
- SCHMIDTBERG, H., ROEHRICH, C., VOGEL, H. & VILCINSKAS, A. 2013. A switch from constitutive chemical defence to inducible innate immune responses in the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *Biology Letters*, 9.
- SCHWENKE, R. A., LAZZARO, B. P. & WOLFNER, M. F. 2016. Reproduction-Immunity Trade-Offs in Insects. In: BERENBAUM, M. R. (ed.) *Annual Review of Entomology, Vol 61*.
- SLOGGETT, J. J. 2013. Comment on "Invasive Harlequin Ladybird Carries Biological Weapons Against Native Competitors". *Science*, 341.
- SLOGGETT, J. J., MAGRO, A., VERHEGGEN, F. J., HEMPTINNE, J. L., HUTCHISON, W. D. & RIDDICK, E. W. 2011. The chemical ecology of *Harmonia axyridis*. *Biocontrol*, 56, 643-661.
- STERNBERG, K. & BUCHWALD, R. 1999. *Libellen Baden-Württembergs, Band 1*, Stuttgart, GER, Ulmer.
- STOEPLER, T. M., CASTILLO, J. C., LILL, J. T. & ELEFThERIANOS, I. 2013. Hemocyte Density Increases with Developmental Stage in an Immune-Challenged Forest Caterpillar. *Plos One*, 8.
- STRAND, M. R. 2008. The insect cellular immune response. *Insect Science*, 15, 1-14.
- TAN, J., XU, M., ZHANG, K., WANG, X., CHEN, S., LI, T., XIANG, Z. & CUI, H. 2013. Characterization of hemocytes proliferation in larval silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, 59, 595-603.
- TAYEH, A., HUFBAUER, R. A., ESTOUP, A., RAVIGNE, V., FRACHON, L. & FACON, B. 2015. Biological invasion and biological control select for different life histories. *Nature Communications*, 6.
- UKRAINSKY, A. S. & ORLOVA-BIENKOWSKAJA, M. J. 2014. Expansion of *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae) to European Russia and adjacent regions. *Biological Invasions*, 16, 1003-1008.
- VILCINSKAS, A., MUKHERJEE, K. & VOGEL, H. 2013a. Expansion of the antimicrobial peptide repertoire in the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 280.
- VILCINSKAS, A., STOECKER, K., SCHMIDTBERG, H., ROEHRICH, C. R. & VOGEL, H. 2013b. Invasive Harlequin Ladybird Carries Biological Weapons Against Native Competitors. *Science*, 340, 862-863.
- VOGEL, H., SCHMIDTBERG, H. & VILCINSKAS, A. in press. Comparative transcriptomics in three ladybird species supports a role for immunity in invasion biology. *Developmental and Comparative Immunology*.
- VOJTEK, L., DOBES, P., BUYUKGUZEL, E., ATOSUO, J. & HYRSL, P. 2014. Bioluminescent assay for evaluating antimicrobial activity in insect haemolymph. *European Journal of Entomology*, 111, 335-340.
- WILSON-RICH, N., DRES, S. T. & STARKS, P. T. 2008. The ontogeny of immunity: Development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*, 54, 1392-1399.
- WYATT, G. R., LOUGHHEED, T. C. & WYATT, S. S. 1956. THE CHEMISTRY OF INSECT HEMOLYMPH - ORGANIC COMPONENTS OF THE

HEMOLYMPH OF THE SILKWORM, BOMBYX MORI, AND 2 OTHER SPECIES. *Journal of General Physiology*, 39, 853-868.

Příloha 20: Manuskript vědeckého článku nazvaný: Ontogeny of protein content, hemocyte concentration and antimicrobial activity against *Escherichia coli* in invasive harlequin ladybird, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae).