

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
PEDAGOGICKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOLOGIE

**Chladová odolnost hladinatky *Velia caprai*: vliv aklimace a věkové
třídy na bod podchlazení**

diplomová práce

Iveta Novotná

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Tomáš Ditrich, Ph.D.

2012

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě Pedagogickou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledky obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Datum: 24. 4. 2012

Podpis studenta:

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce RNDr. Tomáši Ditrichovi Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, za ochotu a čas, který mi po celou dobu této práce věnoval. Dále děkuji Mirce Krovové za poskytnutí technického zázemí ve školních prostorách. Poděkování patří také mé rodině za trpělivost při psaní práce.

Abstrakt

Novotná I. 2012: Chladová odolnost hladinatky *Velia caprai*: vliv aklimace a věkové třídy na bod podchlazení. Diplomová práce, PF JU, České Budějovice. 45 s.

Chladová odolnost se v poslední době stává stále běžnějším tématem ve vědeckých článcích. Pokud se zaměříme na řád Heteroptera, najdeme mnoho studií zabývajících se chladovou odolností či bodem podchlazení (SCP) a faktory, které je ovlivňují. Všeobecné pravidlo je, že aklimace v nízkých teplotách zvyšuje chladovou odolnost. Proto hlavním cílem této práce bylo zjistit, zda aklimace také zvyšuje chladovou odolnost hladinatky *Velia caprai* Tamanini, 1947 (Veliidae) se záměrem změřit SCP hladinatek z různých aklimačních teplot a při různé délce expozice.

Pro vysokou mortalitu (z celkového počtu cca 1300 jedinců zůstalo naživu cca 284) a technické potíže při měření SCP (změřeno jen 36 jedinců) bylo nutno modifikovat původní plány a testovat tak vliv aklimace (po dobu jednoho měsíce vs. jednoho týdne) a rozdílných teplot (0°C, 5°C, 10°C) na bod podchlazení *V. caprai*. Užití přitom byli jedinci odchyceni v průběhu r. 2010 a jedinci sbíraní v březnu 2011.

Výsledky této práce nepotvrzují pravidlo, že aklimace při nízké teplotě zvyšuje chladovou odolnost. Hodnoty SCP jedinců aklimovaných při vyšší teplotě jsou průkazně nižší, než hodnoty jedinců aklimovaných při nízkých teplotách. Jedinci přezimující poprvé mají pravděpodobně vyšší chladovou odolnost, než jedinci přezimující podruhé. Příčina těchto výsledků je pravděpodobně fakt, že hladinatka *V. caprai* nevstupuje na podzim do diapauzy a přezimuje v kviescenci.

Klíčová slova: chladová odolnost, bod podchlazení, SCP, aklimace, přezimování, diapauza, *Velia caprai*

Vedoucí práce: RNDr. Tomáš Ditrich Ph.D

Abstract

Novotná I. 2012: Cold resistance of the water cricket *Velia caprai*: the influence of acclimation age class and food availability on the supercooling point. Diploma thesis, PF JU, České Budějovice. 45 pp.

Recently, the cold resistance becomes a common topic in scientific articles. If we focus on order Heteroptera, we can find a lot of studies dealing with the cold resistance or with the supercooling point (SCP) and also with the factors that influence them. According to the general rule, the acclimation at low temperatures increases the cold resistance. Therefore, the main goal of this thesis is to find out, whether the acclimation also increases the cold resistance of the water cricket *Velia caprai* Tamanini, 1947 (Veliidae), with the intention to measure SCP of the water crickets depending on the acclimation temperature and the length of exposure.

Due to the high mortality (the 284 individuals remained alive of total 1300) and due to the technical difficulties in measuring of SCP (measured only 36 individuals) it was necessary to modify the original goal of the thesis. The new goal was to test the influence of acclimation (during one month vs. one week) and the influence of different temperatures (0°C, 5°C, 10°C) on SCP of *V. caprai*. The individuals used for this measurement were collected during the year 2010 and in March 2011.

The results of this thesis did not confirm the hypothesis that the acclimation at low temperatures increases the cold resistance. The individuals who were acclimated at a higher temperature have the values of SCP demonstrably lower than the individuals who were acclimated at low temperatures. The individuals who overwinter for the first time have arguably higher cold resistance than the individuals who overwinter for the second time. Probable cause of these results is the fact that the water cricket *V. caprai* does not start with diapause in the fall but it overwinters in quiescence.

Key words: cold resistance, supercooling point, SCP, acclimation, overwintering, diapause, *Velia caprai*

Supervisor: RNDr. Tomáš Ditrich Ph.D

Obsah

1 Úvod	1
2 Literární přehled	2
2.1 Chladová odolnost hmyzu	2
2.1.1 Působení nízkých teplot na vodný roztok	2
2.1.1.1 Bod tání (melting point, MP)	3
2.1.1.2 Podchlazení	3
2.1.2 Obecné působení chladu na hmyz	4
2.2 Strategie přežití nízkých teplot	6
2.2.1 Druhy netolerující chlad	6
2.2.1.1 Přímé poškození	7
2.2.1.2 Nepřímé poškození	7
2.2.2 Druhy netolerující zmrznutí	7
2.2.3 Druhy zmrznutí tolerující	9
2.2.4 Další kategorizace a strategie	12
2.2.4.1 Kryoprotektivní dehydratace	15
2.2.4.2 Vitifikace	16
2.3 Faktory ovlivňující chladovou odolnost	16
2.3.1 Diapauza	17
2.3.2 Aklimace	19
2.4 Chladová odolnost semiakvatických ploštic se zaměřením na <i>Velia caprai</i>	21
3 Materiál a metodika	24
3.1 Studovaný organismus	24
3.2 Experimentální design	24
3.3 Měření bodu podchlazení (SCP)	26
3.4 Analýza dat	27
4 Výsledky	28
5 Diskuse a závěry	38
5.1 Závěr	39
6 Seznam použité literatury	41

1 Úvod

Chladová odolnost hmyzu a způsoby přežívání nízkých teplot jsou tradičními objekty zájmu mnoha výzkumníků. Z pochopitelných důvodů se v tomto ohledu nejvíce zkoumají ekonomicky významné druhy, o mnoha skupinách hmyzu nejsou k dispozici žádné nebo pouze velmi kusé informace. Jednou z těchto skupin jsou semiakvatické ploštice (Heteroptera: Gerromorpha), o kterých je v tomto ohledu pouze málo informací. Dvě recentní práce zabývající se běžnou semiakvatickou plošticí, hladinatkou člunohřbetou (*Velia caprai*) (Ditrich a kol., 2009; Ditrich a Košťál, 2011), referují o různé míře chladové odolnosti tohoto druhu, přičemž nejpodstatnějším rozdílem v těchto studiích byla aklimační teplota.

Z tohoto důvodu bylo pro řešení diplomové práce vybráno zhodnocení ovlivnění chladové odolnosti tohoto druhu při různých aklimačních teplotách, rozdílné době expozice a porovnání chladové odolnosti jedinců první a druhé generace.

Téma této diplomové práce jsem si vybrala především proto, že mě již samotný název zaujal a chtěla jsem se o této problematice dovědět více. Zároveň jsem chtěla poskytnout užitečné výsledky pro další vědecké bádání.

Diplomová práce by měla zodpovědět tyto otázky:

- Závisí chladová odolnost *V. caprai* na teplotě aklimace?
- Závisí chladová odolnost *V. caprai* na délce expozice aklimační teploty?
- Liší se hodnoty bodu podchlazení mezi jedinci prvního a druhého přezimování?

2 Literární přehled

2.1 Chladová odolnost hmyzu

Naprostá většina hmyzu patří mezi poikilotermní ektotermní organismy – produkce vnitřního tepla je většinou zanedbatelná (ačkoli u aktivních jedinců není nulová), proto jejich tělesná teplota úzce sleduje teplotu okolí (Chown a Nicolson, 2004). Hmyzí organismus tedy v mírném a arktickém pásu každoročně během zimy podstupuje období nízkých tělesných teplot. Protože nízké tělesné teploty obecně bývají pro organismy škodlivé až letální, u většiny druhů se vyvinuly mechanismy zajišťující vyrovnání se s nízkými teplotami a přežití tohoto nepříznivého období. Zimní období se tak stává pro tyto organismy zkouškou odolnosti, která rozhoduje o přežití jedinců a tím o jejich výskytu. Vzhledem k nesmírné rozmanitosti a druhové bohatosti hmyzu i jejich habitatů není divu, že i mechanismy chladové odolnosti jsou u hmyzu velice různorodé.

V této kapitole bude popsáno obecné působení chladu na vodný roztok i na hmyzí organismus, různé strategie hmyzu vyrovnání se s nízkými teplotami a faktory ovlivňující chladovou odolnost hmyzu. Zvláštní zřetel bude potom kladen na chladovou fyziologii hladinatky *V. caprai* a vliv aklimace na její chladovou odolnost.

2.1.1 Působení nízkých teplot na vodný roztok

Z hlediska chladové fyziologie lze hmyzí organismus do jisté míry považovat za kapku roztoku s rozpuštěnými metabolity. Je proto nutné seznámit se s účinkem nízkých teplot na kapku vodného roztoku.

Při ochlazování kapaliny klesá rychlost pohybu molekul a více se uplatňují přitažlivé síly. Tyto molekuly začínají v krystalizačních jádrech (iniciačních jádrech, nukleátorech) vytvářet zárodky krystalu (Vanovič a kol., 1969). Krystalová mřížka nejspíše vzniká v přítomnosti nukleátorů, na které se nabalují molekuly vody. Jako nukleátor slouží nejrůznější pevné částice – drobné nečistoty, ale i některé makromolekuly či bakterie. Pokud nejsou ve vzorku přítomny nukleátory, kapalina se může tzv. podchládit (viz dále) až na -40°C , aniž by voda zmrzla v led (Denlinger a Lee, 2010). Při krystalizaci kapalných látek – fázovém přechodu z kapalné látky na pevnou – se uvolňuje energie ve formě tepla. Toto teplo se označuje jako skupenské teplo tuhnutí (Vanovič a kol., 1969).

2.1.1.1 Bod tání (melting point, MP)

Bod tání je teplota, při které pevná látka přechází v kapalinou. Pokud přijme pevná látka (např. led) teplo, zvýší se její teplota. Roste pohybová energie částic, až při určité teplotě (v případě čisté vody je tato teplota 0°C) dojde k uvolnění těchto částic z pevných vazeb krystalové mřížky. Látka se stává kapalinou – už nemá pevný tvar a taje. Při dosažení této teploty tání (a nadále dodávaným teplem) se však nemění teplota látky, přijaté teplo se „spotřebovává“ na uvolnění vazeb krystalické mřížky (Vanovič a kol., 1969). Hodnota MP vodného roztoku závisí na koncentraci rozpuštěných látek – osmolalitě. Osmolalita označuje celkové látkové množství osmoticky aktivních částic jednotce hmotnosti rozpouštědla, nejčastěji se udává v jednotkách mOsm/kg. Díky osmolalitě roztoku se MP snižuje o 1,86°C na každý osmol rozpuštěných látek (Zachariassen, 1985). Vodný roztok o osmolalitě 1500 mOsm/kg má tedy bod tání -2,79°C.

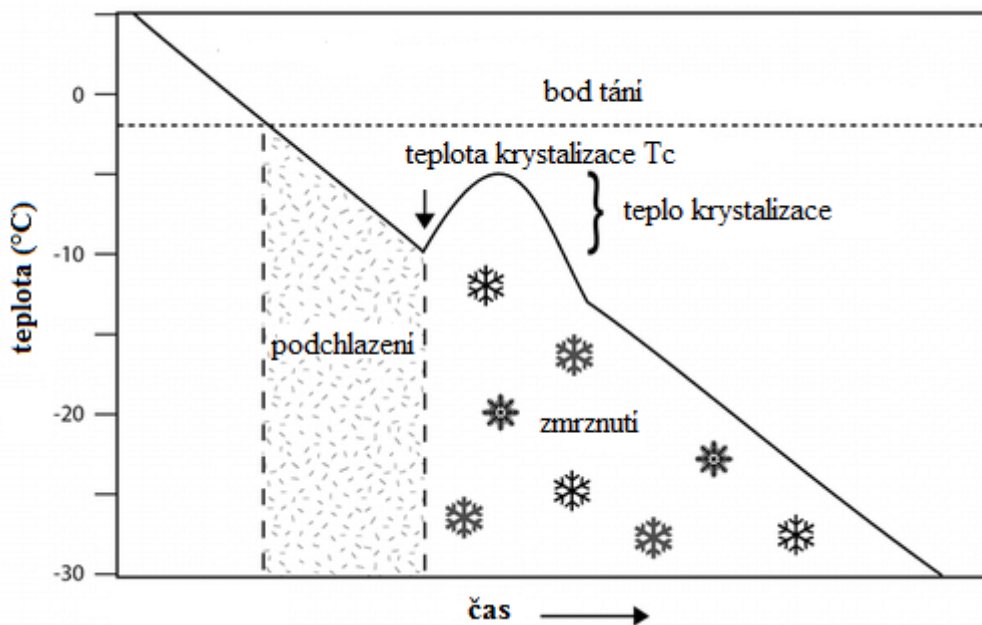
2.1.1.2 Podchlazení

Podchlazení je z fyzikálního hlediska proces, kdy se kapalina zchladí pod její bod tání a nedojde ke zmrznutí (obr. 1). Při kontinuálním chlazení roztoku totiž roztok nezmrzne při teplotě bodu tání, ale zůstává kapalným a podchlazuje se. Skutečná teplota, při níž roztok mrzne, se označuje jako bod podchlazení (supercooling point, SCP) či teplota krystalizace (T_c). Teprve při dosažení SCP se náhle uvolní teplo krystalizace, ve vzorku začíná růst ledových krystalů a zvětšuje se jeho objem.

Kapacita podchlazení (rozsah teplot, při kterých je vzorek podchlazený) závisí na objemu vzorku a přítomnosti nukleátorů. Čím menší je chlazený vzorek, tím je větší kapacita podchlazení (tedy nižší SCP). Přítomnost nukleátorů ve vzorku zvyšuje pravděpodobnost růstu ledových krystalů, a tím kapacitu podchlazení snižuje.

Aktivitu nukleátorů snižují kryoprotektanty, což jsou většinou malé, netoxické a stabilní molekuly, které jsou velmi dobře rozpustné ve vodě a mají nízkou teplotu tuhnutí (Nedvěd, 1996; Denlinger a Lee, 2010). Konkrétně se jako kryoprotektanty (ve vztahu k živým systémům) označují především polyoly (vícesytné alkoholy) jako např. glycerol, mannitol, sorbitol, a dále cukry, jako např. glukóza a trehalóza či aminokyseliny (především prolin a alanin) a další molekuly (Chown a Nicolson, 2004;

Denlinger a Lee, 2010; Košťál a kol., 2011). Kryoprotektanty tedy snižují teplotu krystalizace (tuhnutí) roztoku.



Obr. 1. Průběh teploty kontinuálně chlazeného vzorku s teplotou tání pod 0°C. Roztok po dosažení teploty tání nemění skupenství, ale podchlazuje se. Při dosažení teploty krystalizace (bodu podchlazení, SCP) dojde ke zmrznutí a uvolní se teplo krystalizace – teplota vzorku se tedy zvýší, ale zůstává pod bodem tání. Při kontinuálním chlazení dále klesá teplota již zmrzlého vzorku. Převzato a upraveno podle Lee (1989); Sandro a Lee (2006).

2.1.2 Obecné působení chladu na hmyz

Denlinger a Lee (2010) připodobňují reakci hmyzího těla na působení nízkých teplot k malým nádobám s vodou (vodným roztokem). V kontinuálně chlazeném těle hmyzu probíhají všechny procesy a změny, které byly popsány výše u obecného vodného roztoku. Celková reakce hmyzu na chlad je ale samozřejmě mnohem složitější. Nepříznivé účinky nízkých teplot začínají u mnohých druhů vysoko nad 0°C. Termín „chlad“ totiž zahrnuje teploty tak nízké, ve kterých nemůže probíhat normální vývoj hmyzu (Salt, 1961). Toto chlazení bez mrznutí tělních tekutin bylo nazváno „chilling“ (český ekvivalent by mohl být např. „chlazení“, v praxi se však nepoužívá. Dále v textu

tedy bude proto užíván jen odborný termín chilling). Chilling se vyskytuje zejména u hmyzu, který se běžně neseťkává s chladem a trvale žije v teplotách nad 0°C (např. tropický hmyz). Protože nejsou zvyklí na chlad, nejsou schopni ho tolerovat. Naproti tomu hmyz, který přezimuje v mírných a chladnějších klimatech, musí často po dlouhou dobu snášet široké rozmezí nízkých teplot pod 0°C (Salt, 1961). I v těchto teplotách je účinek chladu na hmyz různý. Téměř žádný hmyz nepromrzá při teplotách rovnovážného tuhnutí tělních tekutin, ale podchlazuje se. Kapacita podchlazení se u různých druhů podstatně liší. Zmrznutí tělních tekutin je sice pro mnohé druhy letální, ale mnoho jiných druhů úspěšně promrznutí přežívá. V následující části je popsáno, jak obecně chlad negativně působí na živé organismy, resp. hmyz.

Vlivem působení chladu dochází k mechanickému poškození hmyzího organismu. K poškození chladem bez vzniku ledových krystalů, může docházet již při teplotách 10-15°C a samozřejmě i nižších (Denlinger a Lee, 2010). Zejména se mění vlastnosti membrány – buněčná membrána se v organismu poškozuje zejména vlivem fázových přechodů membránových lipidů. Kromě toho se mění i prostorová struktura bílkovin a enzymů a dochází tak k metabolické nerovnováze a ztrátě selektivní propustnosti membrány. Mohou se tak hromadit toxické látky a zplodiny metabolismu (Nedvěd, 1996; Denlinger a Lee, 2010). Vlivem změn propustnosti membrán dochází také ke ztrátě iontů z hemolymfy. Zejména ubývá sodíkových a hořečnatých iontů a přibývá iontů draselných a ztrácí se elektrochemický potenciál buněčné membrány (Košťál a kol., 2004; Denlinger a Lee, 2010).

Celkově se ale o příčinách poškození hmyzího organismu bez vzniku ledových krystalů ví málo. Více příčin je známo u poškození organismu při vzniku a růstu ledových krystalů. Růst krystalů obvykle začíná v hemolymfě nebo uvnitř střeva. Velké krystaly zvětšují svůj objem oproti vodě, a tak mechanicky narušují buňky a tkáně. Pokud růst krystalů začíná v intracelulárním (vnitrobuněčném) prostoru, vnitrobuněčná voda zvětší svůj objem a dochází k roztržení buněčné membrány. Vytvoření ledu uvnitř buněk je proto letální¹ (Nedvěd, 1996; Denlinger a Lee, 2010).

Když se led vytvoří v extracelulárním prostoru, voda v hemolymfě (nyní vázaná v ledu) se stává osmoticky neaktivní a pro organismus nepoužitelnou. Vlivem osmotického tlaku dochází proto k čerpání vody z intracelulárních do extracelulárních prostorů, kde

¹ Přežívání i vnitrobuněčného promrznutí však bylo prokázáno u hlístice *Panagrolaimus davidi* (Wharton a Ferns, 1995).

se však molekuly vody znovu připojují k růstu ledové mřížky. Tělní tekutiny se tak zahušťují, koncentrace metabolitů může dosahovat až toxických úrovní a roste celkový osmotický stres organismu. Zvyšující se koncentrace tělních tekutin může vést k denaturaci bílkovin, změně pH a propustnosti membrán. Ztráta vody z buněk může být tak velká, že dojde k překročení minimálního objemu buněk. Kromě toho ztráta kapalné vody vede k zamezení transportu látek v organismu (Nedvěd, 1996; Chown a Nicolson, 2004; Denlinger a Lee, 2010). K poškození až popraskání buněčné membrány může dojít i zpětným zvýšením teploty při rozmrzání, kdy buňka nasává vodu z mezibuněčného prostoru (Steponkus a Lynch, 1989). Poškození organismu při vzniku ledových krystalů mohou zamezit tzv. kryoprotektanty. Jejich hromaděním v tělních tekutinách se nejen snižuje aktivita nukleátorů (viz kap. 2.1.1), ale snižuje se i bod tání a stabilizují se membrány a proteiny (Chown a Nicolson, 2004). Glycerol i některé ostatní molekuly snadno procházejí buněčnou membránou a pomáhají tak vyrovnávat osmotický tlak a omezovat ztrátu vody z buněk (Denlinger a Lee, 2010).

2.2 Strategie přežití nízkých teplot

V závislosti na toleranci a odolnosti vůči působení nízkých teplot lze různé druhy hmyzu rozdělit do několika kategorií. Nejhrubší rozdělení na druhy 1) nesnášející promrznutí (freeze intolerant; freeze avoidant) a 2) tolerující promrznutí (freeze tolerant) není dostatečné k popsání komplexity přizpůsobení hmyzu nízkým teplotám (Lee, 1991; Somme, 1999). Přesto i v tomto základním rozdělení strategie přežívání nízkých teplot lze nalézt obecně platná pravidla. Jak uvádí Chown a Nicolson (2004), druhy nesnášející zmrznutí nemohou přežít vznik ledu uvnitř těla, a proto vyvinuly sadu opatření, aby zabránily tvorbě ledu. Naproti tomu druhy zmrznutí tolerující mají sadu mechanismů, které zajišťují kontrolovaný růst ledových krystalů v extracelulárních prostorech. V současnosti se rozeznávají tři hlavní kategorie chladové odolnosti hmyzu (Denlinger a Lee, 2010) (obr. 2).

2.2.1 Druhy netolerující chlad

Druhy netolerující chlad (chilling intolerant) podlehnou účinku nízkých teplot bez utvoření ledu v těle. V závislosti na druhu může k poškození chladem dojít v teplotách nad nebo pod 0°C. Všechny tyto druhy mají spodní letální hranici přežití

(LLT = Lower lethal temperature) vyšší než SCP. Tato kategorie je rozdělena ještě na přímé a nepřímé poškození.

2.2.1.1 Přímé poškození

K přímému poškození (direct chilling injury) neboli chladovému šoku (cold shock) dochází již po několika minutách následkem rychlého poklesu teploty. Míra poškození vzrůstá s rychlostí zchlazení a poklesem absolutní hodnoty teploty. Poškození je způsobeno především rychlými fázovými přechody buněčných membrán a následnou změnou propustnosti.

2.2.1.2 Nepřímé poškození

K nepřímému poškození chladem (indirect chilling injury) dojde až po delší době (po několika dnech až týdnech) a vyskytuje se u celé řady rostlin a živočichů. K tomuto typu poškození může dojít už při relativně vysokých teplotách pod nulou až k 10-15°C. Přestože nejsou známy přesné mechanismy způsobující nepřímé poškození chladem, minimálně částečně je poškození znovu způsobeno ztrátou selektivní propustnosti buněčných membrán a jejich celkovým poškozením.

U nepřímého poškození stojí za zmínku to, že škody takto způsobené lze opravit zvýšením teploty během krátkých intervalů. Některý hmyz takto obnoví iontové gradient nebo odstraní nahromaděné toxické metabolity (Denlinger a Lee, 2010).

2.2.2 Druhy netolerující zmrznutí

Druhy netolerující zmrznutí (freezing-intolerant or avoidant) netolerují zmrznutí, ale dokáží přežít v nízkých teplotách, někdy hluboko pod 0°C. Tento hmyz (včetně mnoha vodních ploštic) dokáže tolerovat teploty pod nulou tím, že přežívá v podchlazeném stavu. Jejich LLT je proto vyšší nebo přibližně roven SCP, ale není nižší. V zimě spoléhají tyto druhy na různé mechanismy, kterými zvyšují svou chladovou toleranci. Většina druhů hledá pro přezimování úkryty a vybírá si mikrohabitaty chráněné před extrémně nízkými teplotami. Některé druhy schované ve štěrbinách stromů však zůstávají vystaveny mrazivému vzduchu a přežívají díky fyziologickým adaptacím na chlad a mráz (Nedvěd, 1996). Tyto adaptace zahrnují hlavně snahu o snížení SCP. Zvýšení kapacity podchlazení bývá důsledkem vyloučení ledově nukleačních činidel (INA = ice nucleating agents) ze střeva a hemolymfy

a akumulací kryoprotektantů. Velmi důležitým nukleárním faktorem je přítomnost environmentálního ledu. Pokud je ledový krystal v přímém kontaktu s tělem hmyzu, působí jako účinný nukleátor a způsobí růst ledových krystalů, nejen prostřednictvím tělních otvorů, ale i přes kutikulu. Hmyz v přímém kontaktu s ledem tak díky tzv. inokulativnímu zmrznutí (inoculative freezing) promrzá v teplotách těsně pod bodem tání a vůbec neprojde podchlazeným stavem (Lee, 2010).

Kapacita podchlazení u hmyzu se definuje jako rozdíl mezi MP hemolymfy a SCP. Hmyz, který má nízký SCP, bude mít vysokou kapacitu podchlazení. Toto je zřejmé například u hmyzu s MP $-1,5^{\circ}\text{C}$ a SCP $-22,5^{\circ}\text{C}$, který by měl tuto kapacitu 21°C (Denlinger a Lee, 2010).

Kapacita podchlazení se obecně zvětšuje při hromadění nízkomolekulárních rozpuštěných látek, se snižováním velikostí těla a obsahu tělních tekutin (Ditrich a Košťál, 2011). Hmyz obecně, zejména malé druhy, má tak schopnost existovat v podchlazeném stavu neohledně na ročním období. Míra kapacity podchlazení je u různých druhů hmyzu rozdílná. Hmyz netolerující zmrznutí většinou v zimě zvětšuje kapacitu podchlazení. Naopak hmyz tolerující zmrznutí tuto kapacitu snižuje.

Některé druhy produkují „protimrznoucí“ proteiny (AFP = antifreeze proteins, nebo proteiny termální hystereze). Tyto proteiny byly původně popsány u polárních ryb, jsou však přítomny u zástupců různých řádů hmyzu, chvostoskoků, pavouků i stonožkovic (Duman a kol., 2004). Tyto proteiny se nabalují na právě vzniklé ledové krystalky a tím zabraňují růstu těchto krystalů (a tedy rychlému promrznutí) i rekrystalizaci. Svou aktivitou snižují teplotu krystalizace nekoligativním způsobem (nezávisle na počtu molekul), mají tedy významnou aktivitu i při nízkých koncentracích. Svou aktivitou se podílí na rozrůznění teploty rovnovážného bodu tání a teploty krystalizace. Velikost intervalu mezi těmito teplotami se nazývá termální hystereze, a u některých druhů může nabývat až 8°C (Lee, 2010). Z tohoto důvodu se AFP někdy nazývají proteiny termální hystereze. Je však nutno podotknout, že všechny AFP nemusí být nutně proteinové povahy. V praxi se totiž často přítomnost AFP zjišťuje existencí termální hystereze. Termální hysterezi však nemusí způsobovat pouze proteiny, jak nedávno ukázal Walters a kol. (2009).

Přes vrozenou tendenci hmyzu k podchlazení, se při neustále klesající teplotě vždy nakonec vytvoří led. Při vzniku ledové mřížky teplo krystalizace zvyšuje o několik stupňů teplotu těla (obr. 1). Těto skutečnosti se využívá při detekci SCP (viz kapitola 3).

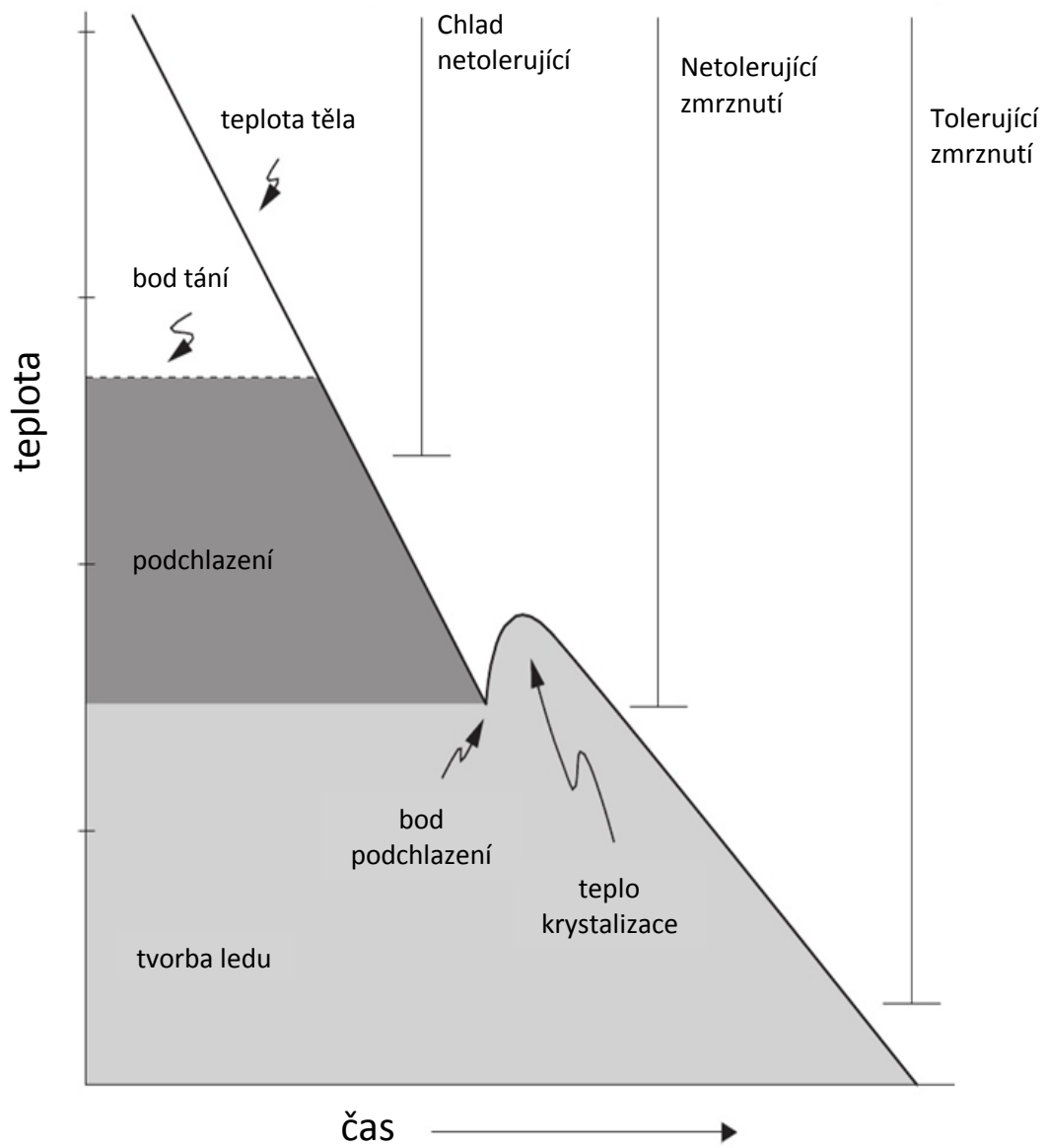
2.2.3 Druhy zmrznutí tolerující

Druhy zmrznutí tolerující (freezing-tolerant) dokážou přežít zmrznutí vody v těle. Druhy tolerující promrznutí mají tedy nižší LLT než SCP. Rozdíl mezi LLT a SCP je přitom různý – některé druhy hynou již v teplotách několik stupňů pod SCP, některé i několik desítek stupňů. V extrémních případech některé druhy v promrzlém stavu přežijí teploty kolem -200°C . Například diapauzující larvy octomilky *Chymomyza costata* mají SCP mezi -15°C až -25°C , ale jsou schopné přežít i ponoření do tekutého dusíku (-196°C) (Košťál a kol., 2011). Podle Denlinger a Lee (2010) byly u druhů tolerujících zmrznutí zjištěny různé typy ledově-nukleačních látek: 1) ledově-nukleační proteiny, 2) směsi krystaloidů a 3) ledově-nukleační mikroorganismy. Aktivita těchto endogenních vysoce účinných nukleátorů se pohybuje v rozmezí teplot od -2 až -5°C .

Většina hmyzu tolerující promrznutí potřebuje, aby led v jejich těle vznikal pomalu a v mimobuněčných prostorech. Pomalý růst ledu umožní buňkám vyrovnat se s narůstajícím osmotickým stresem a jejich částečnou dehydrataci. Přednostní zajištění růstu ledu mimo buňky je pro hmyz naprosto zásadní, protože v jiném případě by mohlo dojít i k letálnímu promrznutí obsahu buněk². Většina hmyzu tolerující zmrznutí proto aktivně hromadí nukleátory v hemolymfě již při relativně vysokých podnulových teplotách, a takto tedy růst ledu kontrolují – určují místo krystalizace, rychlost krystalizace a množství vytvořeného ledu (tedy koncentraci metabolitů a míru dehydratace buněk) (Chown a Nicolson, 2004). Jako tyto nukleátory slouží především proteinové a lipoproteinové molekuly, ale i krystalky uhličitanu vápenatého, fosforečnanu vápenatého i dalších jednoduchých molekul (Lee a Costanzo, 1998; Lee, 2010). Některé druhy jako nukleátory využívají mikroorganismy, které mohou zajistit růst ledových krystalů i v teplotách pod -1°C (Lee, 2010). Například motýl, západníček polní (*Plutella xylostella*), má mutualistický vztah s bakterií *Erwinia herbicola*, která významně zvyšuje jeho SCP. Jiný motýl, zavíječ *Chilo suppressalis*, má podobný mutualistický vztah s houbou *Fusarium sp.*, která zajistí zvýšení SCP z -20°C až na -

² Některé druhy ale tolerují vytvoření ledu v buňkách tukového tělesa (Denlinger a Lee, 1998).

5°C (Tsumuki a kol., 1992). Růst ledových krystalů při vysokých teplotách mnoho druhů zajišťuje kontaktem s externím ledem, tedy inokulativním zmrznutím (Chown a Nicolson, 2004). Samozřejmě ale všechny tyto druhy akumulují nejrozličnější kryoprotektanty jako je trehalóza, prolin, glycerol, sorbitol a další (Chown a Nicolson, 2004).



Obr. 2. Klasifikace chladové odolnosti hmyzu. Převzato a upraveno dle Denlinger a Lee (2010).

2.2.4 Další kategorizace a strategie

Existují jemnější a podrobnější kategorizace, založené především na porovnání SCP a LLT (Bale, 1996; Sinclair, 1999), na příčinách úhynu (Nedvěd, 2000) a jiné strategie jako kryoprotektivní dehydratace a vitrifikace.

Bale (1993; 1996) in Chown a Nicolson (2004) navrhl následující třídění kategorií v rámci mráz netolerujících druhů (obr. 3):

- 1) Mrazu se vyhýbající druhy (FA) (freeze avoiding). Tyto druhy nepřežijí teploty nad jejich SCP. Přežijí dlouhodobé vystavení chladu, ale nepřežijí zmrznutí tělních tekutin. Zahrnují druhy některých vodních ploštic jako například hladinatky (*V. caprai*, *V. saulii*), bruslařky (*A. paludum*, *G. odontogaster*) a další (Ditrich a Košťál, 2011). Mimo jiné sem patří i druhy: obaleče *Epiblema soudderiana*, vajíčka píďalky *Epirrita autumnata* (Rickards a kol., 1987 in Bale, 1996; Bale, 1996), brouci žijící na Aljašce – lesák *Cucujus clavipes puniceus* (Carrasco a kol., 2011) a jeho larvy (Sformo a kol., 2011). Hmyz „freeze avoiding“ musí podle Bale (1996) splňovat tyto kritéria:
 - vyhnout se zmrznutí obrovským podchlazením
 - SCP jako důkaz chladové odolnosti
 - přežít podchlazení po dlouhou dobu
 - žádná úmrtnost nad SCP
- 2) Vysoce chlad tolerující (HCT) (highly chill tolerant) druhy jsou schopné přežít nízké teploty pod nulou. U těchto druhů byla i zaznamenána úmrtnost nad jejich bodem podchlazení (SCP). Příkladem u této kategorie lze uvést chvostoskoka, *Cryptopygus antarcticus*. Jeho SCP se blíží hodnotě -25°C, ale velká část populace nepřežije zimu (více než 20 %). Bale (1996) pro druhou kategorii mráz netolerujících druhů uvádí tyto obecné charakteristiky:
 - zmrznutí je zabráněno podchlazením
 - mortalita vzrůstá nad jejich SCP v teplotách pod 0°C
 - v závislosti na teplotě mohou v podchlazeném stavu přežít po dobu několika měsíců (3-6)
 - SCP je nejistým ukazatelem chladové odolnosti
- 3) Druhy lehce tolerující chlad (M) (moderately chill tolerant). Jen málo těchto druhů přežije v teplotách nad jejich SCP. Tyto druhy mají poměrně nízký SCP.

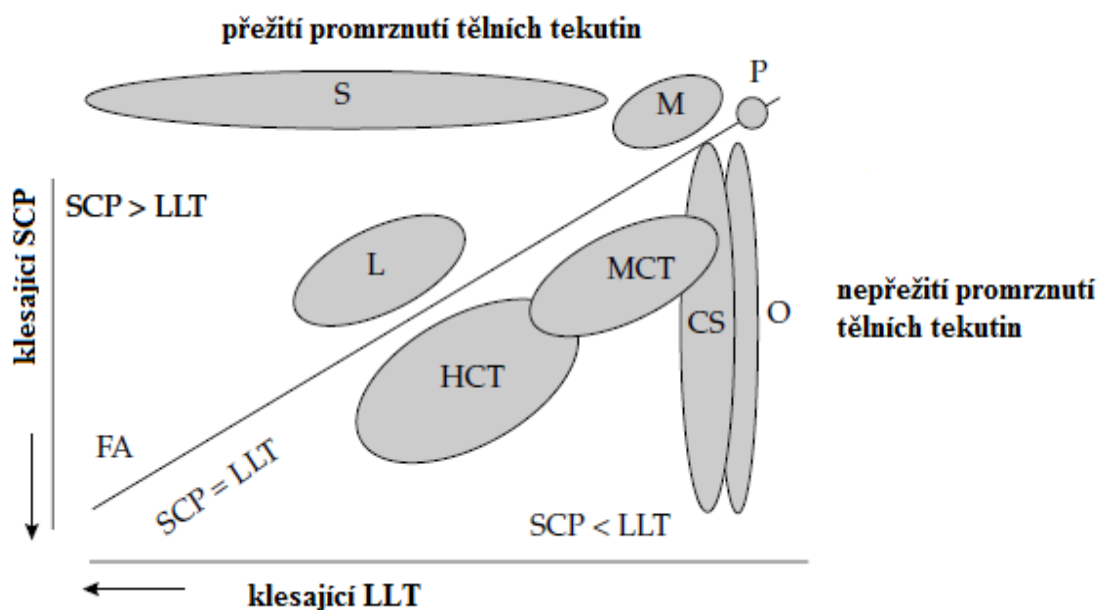
Mezi takto průměrně tolerující druh patří *Rhynchaenus fagi* (Coleoptera). Bod podchlazení má -25°C , ale po 50 dnech vystavování v teplotě -15°C přežije méně než 30 % populace tohoto druhu (Bale, 1993 in Chown a Nicolson, 2004). Bale (1996) pro druhy lehce tolerující chlad uvádí kritéria shodná jako pro HCT s tím rozdílem, že na rozdíl od nich přežívá dlouhou dobu v podchlazeném stavu jen malá část populace.

4) Na chlad citlivé (CS) (chill susceptible) druhy mohou přeživat na místech, kde se teplota pohybuje kolem 0°C a neklesá hluboko pod nulu (Nedvěd, 1996). Tyto druhy mohou mít relativně nízký SCP, ale většina jich hyne při teplotách vyšších než SCP. Například mšice *Myzus persicae*, *Sitobion avenae* a *Rhopalosiphum padi* mají SCP kolem -25°C , ale jejich LLT_{50} většinou neklesá pod -10°C (Bale, 1996). Hmyz „chill susceptible“ musí podle Bale (1996) splňovat tyto obecná kritéria:

- tyto druhy mohou mít rozsáhlé podchlazení
- přežijí v $0\text{-}5^{\circ}\text{C}$
- chladová odolnost a mortalita v zimě nesouvisí s SCP
- k úmrtí dochází po krátkém vystavení v teplotách od -5°C do -15°C

5) Druhy přízpůsobivé (O) (opportunistic) se vyhýbají chladnému prostředí s nízkými teplotami, které neumožňují normální vývoj (Nedvěd, 1996). Tyto druhy umírají, pokud jsou vystaveni teplotě blížící se 0°C , proto vyhledávají teplejší oblasti se stálým klimatem (Bale, 1996). Mezi druhy přízpůsobivé patří například včela medonosná nebo tropické druhy (Nedvěd, 1996). Bale (1996) uvádí obecné charakteristiky:

- tyto druhy mohou mít rozsáhlé podchlazení
- nepřežijí v jiných teplotách než v teplotě vhodné pro normální metabolismus
- rámci přízpůsobení dokáží přežít v příznivých místech př. *Musca domestica*
- chladová odolnost a mortalita v zimě nesouvisí s SCP



Obr. 3. Třídění kategorií chladové odolnosti mráz netolerujících druhů.

Kategorie tolerující mráz (freeze-tolerant) mají SCP větší než LLT tzn., že přežijí promrznutí tělních tekutin, zatímco druhy netolerující mráz (freeze-intolerant) hynou vždy před vytvořením ledu uvnitř těla. Všechny druhy nad diagonálou jsou freeze-tolerant, druhy pod diagonálou jsou freeze-intolerant.

SCP (supercooling point) = bod podchlazení, **LLT** (lethal temperature limits) = letální teploty, **P** (partial freezing tolerance) = částečná tolerance mrazu, **FA** (freeze avoiding) = vyhýbání mrazu, **O** (opportunistic) = oportunisti, **CS** = (chill susceptible) citlivost na chlad, **M** = (moderate freezing tolerance) = lehká tolerance mrazu, **L** (freezing tolerant with low SCP) = tolerance mrazu s nízkým SCP, **HCT** (highly chill tolerant) = vysoká tolerance chladu, **MCT** (moderate chill tolerant) = lehká tolerance chladu, **S** (strong freezing tolerance) = velká tolerance mrazu. Převzato a upraveno dle Chown a Nicolson (2004) a Sinclair (1999).

Kategorizací chladové odolnosti hmyzu existuje ještě mnohem více. Sinclair (1999) na základě vztahu LLT a SCP rozeznal čtyři skupiny hmyzu zmrznutí tolerující: 1) částečně zmrznutí tolerující, 2) průměrně zmrznutí tolerující, 3) silně zmrznutí tolerující a 4) zmrznutí tolerující s nízkým SCP (obr. 3).

Nedvěd (2000) zavedl jinou klasifikaci na základě příčin poškození chladem. Rozeznává tři hlavní příčiny mortality hmyzu: 1) zmrznutí tělních tekutin, 2) vzrůstající poškození chladem a 3) šok chladem. Podle Nedvěda by měla být každá strategie hmyzu charakterizována spolu s mechanismy fyziologickými a mechanismy chování.

2.2.4.1 Kryoprotektivní dehydratace

Podle Denlingera a Lee (2010) bylo po mnoho let rozdělení hmyzí strategie na mráz tolerující a mráz netolerující. V současné době, byla popsána u několika půdních bezobratlých třetí strategie, kryoprotektivní dehydratace (Holmpstrup a kol., 2002). Půdní bezobratlí z arktických oblastí prokazatelně přežívají velice nízké teploty, ačkoli jejich SCP se obvykle pohybuje mezi -5°C – -12°C a většinou netolerují promrznání tělních tekutin. Tito půdní živočichové (např. roupice, hlístice, chvostoskoci) mají velice propustný tělní povrch, který nedokáže zabránit vyschnutí. Při postupném promrznání půdy je parciální tlak vodní páry uvnitř jejich těl vyšší, než tlak ve vnějším prostředí. Jejich tělní voda proto uniká, zvyšuje se koncentrace rozpuštěných látek a tím se snižuje bod tání (rovnovážná teplota tuhnutí) jejich tělních tekutin. Tento proces probíhá až do doby vyrovnání tlaku páry tělní tekutiny a okolního ledu. V tomto stádiu není organismus podchlazený, protože teplota tání jejich tělních tekutin je v rovnováze s okolní teplotou, nehrozí tedy promrznutí tělních tkání. Jedná se tedy o zvláštní strategii, která není založena ani na podchlazení, ani na toleranci promrznutí, a která je podmíněna přítomností snadným vysycháním. Takto může např. larvénka *Onychiurus arcticus* (Collembola) či žížala *Dendrobaena octaedra* (Annelida: Lumbricidae) úspěšně přežít i teploty pod -60°C , aniž by došlo k promrznání či podchlazení jejich tělních tekutin (Holmpstrup a kol., 2002). Tolerance vysychání je základem i chladové odolnosti mnoha dalších druhů – např. želvušky *Echiniscus jenningsi*, *Macrobiotus furciger* a *Diphyscon chilense* jsou schopné v dehydratovaném stavu přežít teploty nižší než -180°C (Somme a Meier, 1995). Jejich schopnost vstoupit do anhydrobiózy jim umožňuje přežít i extrémní podmínky panující ve vesmíru (Persson a kol., 2011). Podobně i larvy pakomára, *Polypedilum vanderplanki*, jsou schopné přežít v dehydrovaném stavu ponoření do teploty -270°C tekutého helia po dobu 5 minut (Hinton, 1960).

2.2.4.2 Vitřifikace

Odlišný způsob, kdy při velmi nízkých teplotách nedojde k poškození těla utvořením ledu, je vitřifikace („sklovatění“). Vitřifikovaný roztok připomíná pevné skupenství, ale ponechává si fyzikální vlastnosti kapaliny.

Jak popisuje Denlinger a Lee (2010), vitřifikovaná voda se vykytuje v amorfním stavu a její viskozita se podobá sklu. Vitřifikace je vhodný způsob pro kryokonzervaci, protože, rozpuštěné látky, voda i ionty při ní zůstávají v jejich původním umístění – vnitrobuněčném i mimobuněčném. Koncentrace metabolitů tím pádem zůstávají zachovány a nedochází k jejich zvýšení až k toxickým hodnotám. Kromě toho se netvoří led a nedochází k mechanickému poškození buněk a tkání. Nutnou podmínkou pro vitřifikaci je zřejmě významná dehydratace a akumulace kryoprotektantů, jako je glycerol či trehalóza.

Vitřifikace byla několikrát potvrzena v rostlinné říši (Hirsh, 1987), v poslední době však i u hmyzu – u lesáka *Cucujus clavipes* (Sformo a kol., 2010), octomilky *Chymomyza costata* (Košťál a kol., 2011) a pakomára *Polypedilum vanderplanki* (Sakurai a kol., 2008 in Denlinger a Lee, 2010).

2.3 Faktory ovlivňující chladovou odolnost

Různé druhy hmyzu jsou samozřejmě různě chladově odolné. I v rámci jednoho druhu ale existuje velká variabilita v konkrétním způsobu, jak na stejné teplotní podmínky reagují různí jednotlivci či kohorty. V minulosti proběhlo (a v současnosti probíhá) mnoho výzkumů, odhalujících chladovou odolnost vybraných druhů hmyzu.

V současnosti je známo několik faktorů nepochybně ovlivňujících chladovou odolnost. Některé experimenty jsou popsány v kapitole 2.3.2. Celkově lze říci, že u konkrétního druhu hmyzu záleží na jednotlivé etapě jeho životního cyklu – v létě je chladová odolnost obecně nižší než v zimě. Kromě toho přežití významně ovlivňuje momentální fyziologický stav určitého jedince (např. záleží na obsahu střev, kousky potravy totiž slouží jako nukleátory, kolem kterých se tvoří led, a tím vzniká růst krystalů ledu uvnitř těla).

2.3.1 Diapauza

Velký podíl na zvýšení chladové odolnosti má diapauza. Toto, do jisté míry klidové stádium vývoje mnoha druhů, slouží jako únik v čase před nepříznivými podmínkami, protože větší část roku temperátních a severských oblastí není pro vývoj hmyzu příznivá. Klesá metabolismus a celkový vývoj organismu je zastaven. Před vstupem do diapauzy hledá hmyz vhodné prostředí, kde podstupuje metabolické změny, aby zabránil ztrátám vody, a byl tak chráněn před nízkými teplotami. Vstup do diapauzy je ovlivněn vnějšími podmínkami (fotoperiodou, vlhkostí, teplotou) a může nastat v kterékoli fázi životního cyklu. U těch druhů, kteří mají jen jednu generaci za rok (univoltinních), je diapauza obligátní – např. u motýlů (*Lepidoptera*) a suchozemských ploštic (*Pyrrhocoris apterus*). U většiny druhů hmyzu je vstup do diapauzy ovlivněn podmínkami a vlivem prostředí a není tedy pevně stanoven. Diapauza umožňuje hmyzu dokončit či zastavit vývoj (Košťál, 2006).

Proces diapauzy je nejvíce známý u hmyzu, ale vyskytuje se i u dalších bezobratlých jedinců, mezi které patří hlístice (*Nematoda*), vířníci (*Rotifera*) a další. (pro přehled viz Košťál 2006).

Jak popisuje Košťál (2006) samotná diapauza má několik fází: pre-diapauzu, diapauzu a post-diapauzu a ty pak vlastní fáze nebo jednotlivé etapy (obr. 4).

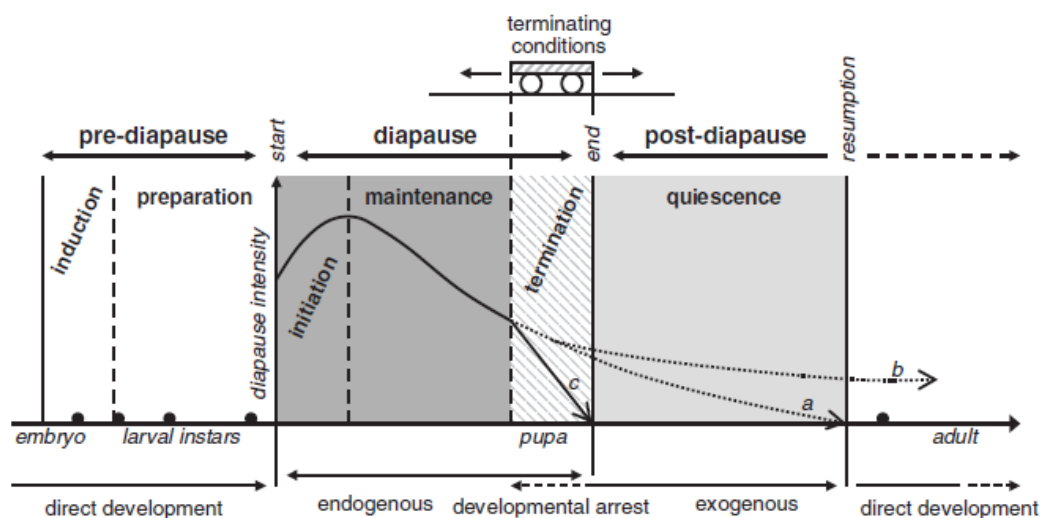
V pre-diapauze ontogenetický vývoj pokračuje. Mezi první fázi pre-diapauzy patří indukční fáze (induction phase). Tato fáze se objevuje během senzitivního („citlivého“) období ontogenetického vývoje hmyzu. Hmyz reaguje a vnímá vnější podmínky prostředí, transdukuje je a zastavuje přímý ontogenetický vývoj. Připravuje se na diapauzu.

Následuje přípravná fáze (preparation phase), která nastává mezi fázemi vyvolání diapauzy (indukční fáze) a spuštění diapauzy (zahájení). Jedinci jsou v této fázi „skrytě připraveni“ na pozdější projev diapauzy. V této fázi probíhají behaviorální a fyziologické přípravy.

Diapauza trvá přibližně od listopadu do ledna. Během diapauzy je přímý vývoj (morfo-genetický) zastaven, ale fyziologické pochody pokračují podle podmínek životního prostředí. Diapauzu lze rozlišit na tři vývojové etapy: 1) zahájení (initiation), 2) udržování (maintenance) a 3) ukončení (termination).

- 1) Zahájení: Během zahajování diapauzy dochází k hledání vhodného mikrohabitatu, přijímání potravy a ukládání energetických rezerv. Nastává zastavení morfo-genetického vývoje, což je spjato s řízeným potlačováním metabolismu.
- 2) Udržování: V této etapě přetrvává zastavení morfo-genetického vývoje, i když okolní podmínky mohou být příznivé pro to, aby vývoj pokračoval. Rychlost metabolismu je nízká a konstantní. Postupně klesá intenzita diapauzy a narůstá citlivost na vnímání podmínek pro ukončení diapauzy.
- 3) Ukončení: Terminační etapa je pokračováním poklesu intenzity diapauzy na základě změn podmínek přírody. Pokud jsou vhodné podmínky, vývoj je obnoven a může pokračovat. Jestliže podmínky nejsou přijatelné, vývoj nemůže být uskutečněn a nastává post-diapauza.

Post-diapauza: Do post-diapauzního klidu (post-diapause quiescence) se organismus dostává v případě, že i po terminační etapě stále přetrvávají nevhodné podmínky. Tato fáze je řízena exogenně na rozdíl od endogenní diapauzy.



Obr. 4. Fáze a etapy diapauzy. Bližší vysvětlení viz text. Převzato z Košťál (2006).

Objevují se názory, že diapauza je nutnou podmínkou pro vznik chladové odolnosti, ale veškerá studia tyto názory nepotvrzují, viz přehled podle Hodkové

a Hodka (1997). V hmyzí kryobiologii je tedy vztah mezi diapauzou a chladovou odolností kontroverzní téma.

Dle Asahina (1969) a Ushatinskaya (1957) in Hodková a Hodek (1997) je diapauza nutností pro navození chladové odolnosti, zatímco Salt (1961) in Hodková a Hodek (1997) tvrdí, že jsou tyto dva jevy na sobě zcela nezávislé.

Obecně však platí, že u druhů oblastí mírného pásu dochází před zimou ke vzestupu chladové odolnosti na základě diapauzy a nejnižším teplotám je hmyz vystaven v době, kdy má diapauza velmi nízkou intenzitu nebo je již ukončena (tedy během kviescence).

Pro výzkum vlivu diapauzy na chladovou odolnost dobře posloužila ruměnice bezkřídlá (*Pyrrhocoris apterus*). Tento druh nepřežívá zmrznutí tělních tekutin a jeho bod podchlazení (SCP) je nižší během diapauzy než SCP nediapauzujících jedinců. U neaklimovaných (venkovních) druhů, *Pyrrhocoris apterus*, je na začátku pre-diapauzy hodnota SCP $-6,5^{\circ}\text{C}$, ale během diapauzy se snižuje o $4-5^{\circ}\text{C}$. V září (na podzim) se SCP postupně snižoval, poklesl až na -15°C a poté se udržoval konstantní do konce listopadu, kdy se jeho hodnota zvýšila. Od prosince do konce ledna SCP opět výrazně poklesl. Na začátku února SCP vzrůstal k jarním hodnotám. Proto je diapauza nezbytná pro snížení SCP o $5-6^{\circ}\text{C}$ pro zvýšení chladové odolnosti (Hodková a Hodek, 1997).

2.3.2 Aklimace

Významným způsobem je chladová odolnost konkrétního jedince ovlivněna jeho individuální minulostí, zejména co se týče teplot. Postupné „navykání“ na nízké teploty vystavením se přirozenému postupnému ochlazení v přírodě se označuje termínem aklimatizace; pokud jde o vystavení uměle regulovaným teplotám v laboratoři, používá se termín aklimace. Z pochopitelných důvodů je snadnější zkoumat aklimaci než aklimatizaci, proto se ve většině vědeckých výzkumů objevuje právě aklimace a tímto způsobem zjištěné výsledky se druhotně vztahují na přirozené populace. Aklimace je jedním z významných mechanismů, kterému se ektotermní organismy přizpůsobují teplotním změnám prostředí. Některé druhy zlepšují pomocí aklimace svoji chladovou odolnost, protože aklimace ovlivňuje reakce hmyzu na nízké teploty (Salt, 1961; Denlinger a Lee, 2010). Zde budou popsány některé konkrétní výsledky výzkumů vlivu aklimace.

Hiisaar a kol. (2009) zkoumali v sérii pěti pokusů faktory, které ovlivňují chladovou odolnost dřepčíka polního (*Phyllotreta undulata*). Tyto mandelinky jsou škůdci na brukvovitých rostlinách v Estonsku. Estonsko, jakožto oblast severní Evropy, během dne často provází kolísání teplot, a to nejen v zimě. Teploty pod nulou se mohou objevit i v květnu. Brouci tohoto druhu jsou univoltinní (mají jen jednu generaci za rok) a přezimují tak ve stádiu dospělého. Předmětem zkoumání byli:

- 1) účinek potravy a hladovění přezimujících dřepčíků; přezimovavší brouci byli nasbíráni v červnu 2006 z hořčice, řepky a zelí. Byly změřeny jejich SCP, které ukazovaly nižší hodnoty u jedinců získaných z řepky a zelí. Teprve po čtyřdenním hladovění v pokojové teplotě (kdy se vyprázdnil obsah střeva) se hodnoty SCP téměř vyrovnaly a výrazně poklesly. To značí, že obsah střeva má vliv na podchlazení a chladovou odolnost.
- 2) vliv aklimace přezimujících brouků na podchlazení; dřepčíci byli nasbíráni v červnu 2007 a rozděleni do dvou skupin. Jedna skupina byla vystavena teplotě 22°C a druhá 0°C po dobu osmi dnů bez podávání potravy. Skupina autorů zjistila rychlejší pokles SCP u brouků vystavených k teplotě 22°C. Nejspíš proto, že s vyšší teplotou stoupá metabolismus, rychleji se vyprazdňuje střevo a probíhá dehydratace.
- 3) účinek teploty pod 0°C na SCP a vliv aklimace přezimujících brouků; po dobu sedmi dnů byli v laboratoři dřepčíci vystaveni teplotě 0°C. Jedinci, kteří byli odebráni z pole v červnu 2007, nebyli aklimováni. Měření a srovnání hodnot SCP a LLT₅₀ ukázalo, že týdenní aklimace v 0°C zvýšila schopnost přežít teploty pod nulou ve srovnání s neaklimovanými jedinci. U obou skupin nebyla zaznamenána mortalita v -6°C. Velké rozdíly v mortalitě u aklimovaných a neaklimovaných jedinců byly v teplotě od -6°C do -16°C. V -18°C uhynuli všichni neaklimovaní brouci, kdežto několik aklimovaných tuto teplotu přežilo. Srovnáním hodnot SCP a LLT₅₀ se zjistilo, že aklimovaní brouci měli o 3°C nižší SCP (-16,5°C) i LLT₅₀ (-13,0°C) než neaklimovaní (-13,5°C) a (-10,6°C).
- 4) vliv doby sběru na SCP; před zimou tedy i před přezimováním byli brouci jednou týdně sbíráni od srpna do září po dobu pěti týdnů. Hodnoty SCP byly ihned měřeny a postupně klesaly od -14 °C v polovině srpna až k -18 °C

v polovině září. Pokles SCP mohla způsobit příprava na přezimování a nepřijímání potravy.

- 5) vliv doby trvání aklimace na SCP v 0°C; brouci nasbíraní v polovině srpna byli vystaveni teplotě 0°C po dobu 33 dnů. K nejnižšímu SCP (-21,3°C) došlo po 18 dnech. Hodnoty SCP u aklimovaných jedinců jsou nižší než u neaklimovaných jedinců z experimentu 4. Delší aklimace tedy způsobila vzestup chladové odolnosti.

Šlachta a kol., (2002) se zabývali vlivem diapauzy a aklimace na chladovou odolnost a fyziologickými změnami kněžice páskované (*Graphosoma lineatum*). Tento druh je běžný v Evropě a vyskytuje se ve dvou generacích (je bivoltinní). Nová generace dospělců se objevuje až na přelomu července a srpna, nerozmnožuje se, ale vstoupí do diapauzy a přezimuje. Pokusy ukázaly, že samotná diapauza zamezí zvýšení SCP o cca 5,5°C – tento nárůst SCP je spojen s přechodem do reprodukčního období nediapauzujících jedinců. Kromě toho však diapauza umožnila kněžicím aklimovat – reagovat na postupné snižování teplot z 25°C na 0°C. Nediapauzní jedinci měli vysoké SCP a nebyli schopni přežít teploty pod -5°C ani po aklimaci; diapauzující jedinci chovaní v konstantní teplotě 25°C přežívali o něco nižší teploty, avšak ne nijak výrazně. Teprve pokud byli aklimováni diapauzující jedinci, dosáhla jejich chladová odolnost maxima. Z pokusů lze vyvodit, že diapauza je nutnou, nikoli však dostačující podmínkou pro dosažení maximální chladové odolnosti. Pro dosažení tohoto maxima je nutné, aby diapauza byla doprovázena právě chladovou aklimací.

2.4 Chladová odolnost semiakvatických ploštic se zaměřením na *Velia caprai*

Hladinatka člunohřbetá (*Velia caprai*) patří mezi semiakvatické ploštice (Heteroptera: Gerromorpha). Tento druh je bivoltinní a pravidelně přezimuje ve stádiu vajíčka i dospělé, zatímco ostatní semiakvatické ploštice přezimují jen v dospělé formě nebo ve stádiu vajíčka. *V. caprai* tedy vajíčka klade před nebo během zimy a pak znovu na jaře. Toto přezimování bylo označeno jako strategie rozdělení rizik (risk-spreading; bet-hedging). *V. caprai* je bezkřídlý hmyz, který se nemůže přemísťovat na příznivější místa pro přezimování. Proto je pro ni chladová odolnost nezbytná. Zimu přečkává blízko břehů v suchozemských podmínkách. Podle prvních pokusů zjišťující chladovou

odolnost *V. caprai*, kdy byli dospělci aklimováni při teplotě 10-13°C, je jejich SCP i LLT kolem -7°C (Ditrich a kol., 2009).

Ditrich a Košťál (2011) srovnávali chladovou odolnost a fyziologický stav v rámci přezimování devíti druhů semiakvatických ploštic, zahrnujících pět druhů bruslařkovitých (Gerridae), tři druhy hladinatek (Veliidae) (včetně *V. caprai*) a jednu vodoměrku (Hydrometridae). Pokusy byly provedeny na dospělci všech druhů, pouze u *V. caprai* byla sbírána i vajíčka těsně před začátkem zimy. Protože semiakvatické ploštice zimují často pod kameny a kmeny stromů, byly všechny nasbírané vzorky umístěné v prosinci do nádob a vystaveny podobným podmínkám jako při přezimování – konstantní teplota 0°C, stálá tma a vysoká vlhkost. V těchto podmínkách byly aklimovány během ledna a února 2010.

Autoři měření SCP zjistili, že bod podchlazení dospělců *V. caprai* je vysoký (-3,6°C) a blíží se hodnotě LLT₅₀, nicméně tolerance promrznutí nebyla prokázána. Všechny druhy mimo r. *Velia* měly medián SCP a LLT₅₀ pod nebo těsně nad -10°C (tab. I). Dospělci hladinatek r. *Velia* mají tedy nízkou chladovou odolnost a velká část populace pravděpodobně nepřežívá zimu, při holomrazech (a tedy bez ochranného vlivu sněhové pokrývky) může být dokonce ohrožena existence celých populací. *V. caprai* a pravděpodobně i *V. saulii* chladné zimy přežívají díky přezimujícím vajíčkům, která mají SCP okolo -20°C a líhnivost cca -13°C.

Z hlediska fyziologických parametrů autoři přišli na to, že přezimující samice bruslařek, vodoměrky *Hydrometra stagnorum* a hladinatky *M. reticulata* neměly vyvinuté vaječníky, tzn., že samice byly v diapauze. Samice *V. caprai* a *V. saulii* měly vaječníky plné zralých vajíček a diapauza u nich nebyla prokázána.

Na základě těchto výzkumů a zjištěných hodnot vyplývá, že dospělci *V. caprai* nejsou fyziologicky přizpůsobeni přežití nízké teploty a chladné zimy. Z uvedených druhů mají nejmenší chladovou odolnost. Přežití populací mírného pásu není zajištěno fyziologickou, ale ekologickou adaptací. Velká část této populace (dospělci) je každoročně ohrožena zmrznutím.

Tab. I. Srovnání SCP s LLT některých druhů vodních ploštic z následujících čeledí: bruslařkovití (Gerridae) a hladinatkovití (Veliidae) a vodoměrkovití (Hydrometra).

Gerromorpha (vodní ploštice)	SCP (°C)	LLT₅₀ (°C)
<i>Velia caprai</i>	-3,6	-4,1
vajíčka <i>V. caprai</i>	-20,0	-11,8
<i>Microvelia reticulata</i>	-17,9	-13,9
<i>Aquarius paludum</i>	-10,3 * -7 – -17	-8,9 * -3
<i>Gerris gibbifer</i>	-11,0	-9,7
<i>Gerris argentatus</i>	-17,6	-13,2
<i>Gerris odontogaster</i>	-20,5	-15,8
<i>Gerris lacustris</i>	-17,3	-13,4
<i>Hydrometra stagnorum</i>	-11,8	-7,5

Poznámka: LLT₅₀ hodnoty jsou vyšší než hodnoty SCP. Výjimku tvoří dospělci *Velia caprai*, kde je však rozdíl malý (na hranici přesnosti stanovení obou hodnot) a tolerance promrznutí nebyla prokázána. Všechny údaje jsou z článku Ditrich a Košťál (2011) kromě označených údajů (*) z článku Harada (2003).

3 Materiál a metodika

3.1 Studovaný organismus

Pro zjištění vlivu aklimace na chladovou odolnost byl vybrán druh semiakvatické ploštice, hladinatka člunohřbetá *Velia caprai* Tamanini 1947. *V. caprai* (Hemiptera: Heteroptera: Veliidae) je hojně rozšířená v Evropě, obývající lesní potoky a menší vodní toky. Potravu *V. caprai* tvoří převážně hmyz či jiní členovci, kteří se ocitnou na vodní hladině. Hladinatka člunohřbetá je křídelně dimorfní druh se silně převažující bezkřídlo (apterní) morfolou, nedokáže se na zimu významně přemísťovat a zimu tak přečkává blízko břehů ve vhodnějších podmínkách. Stejně jako většina ostatních ploštic má hladinatka *V. caprai* pět larválních stádií (označované jako nymfy). Samice kladou svá vajíčka do vhodných míst, která jsou několik decimetrů vzdálená od vodních toků a přilepují je na různé lodyžky mechů či stonky trav. Líhnoucí se potomci jsou tak chráněni před jarním vzestupem hladiny vody (Ditrich a Papáček, 2008).

3.2 Experimentální design

Podle původního plánu bylo zamýšleno zjistit vliv aklimace trvající jeden, dva a tři měsíce při teplotách 0, 5, 10, 15 a 20°C (skupiny A0, A5, A10, A15, A20). Pokud by v každé experimentální skupině mělo být alespoň 20 jedinců, bylo nutné mít ve finální fázi experimentu (tedy po proběhlé aklimaci) alespoň 300 živých dospělců. V ideálním případě by k dispozici byl tento počet jak jedinců přezimujících první zimu, tak jedinců přezimujících podruhé. Protože LLT hladinatek *V. caprai* velmi dobře koreluje s hodnotou SCP a nebyl zjištěn významný rozdíl mezi pohlavími (Ditrich a Košťál, 2011), nebylo při plánování experimentálního designu rozlišováno pohlaví jedinců a zjišťování chladové odolnosti bylo omezeno na relativně snadno získatelnou hodnotu SCP.

Se záměrem výše popsaného designu byl proveden odchyt jedinců: od dubna do června 2010 byl proveden sběr dospělců přezimovavší generace (G0) v okolí Českých Budějovic a v potocích Novohradských hor. Vzorky byly sbírány z hladiny vod cedníkem a vloženy pomocí pinzety do plastové láhve s trochou vody a navlhčeným mechem. Po sběru byli jedinci vyjmuti z láhví a přemístěni do plastových boxů s vodou, mechem a větvičkami. Potrava v podobě octomilek (*Drosophila melanogaster*)

a ostatního hmyzu (hlavně z řádu Diptera) byla podávána několikrát týdně a voda i s uhynulými jedinci měněna dle potřeby. Všechny boxy byly umístěny ven na školní dvorek PF JU pod přístřešek, který je chránil před přímým sluncem. Přezimovavší generace G0 bylo nasbíráno cca 700 jedinců. Ke konci června a během července 2010 probíhal sběr nymf 5. instaru nové generace (G1) v oblasti potoků Novohradských hor – jen díky sběru nedospělých stádií bylo možno zajistit, že mezi jedinci jsou skutečně pouze jedinci G1. Se vzorky G1 generace bylo zacházeno stejným způsobem jako s jedinci G0 generace. Nabíraných G1 jedinců bylo cca 600. Na podzim (na konci října 2010) byli přeživší dospělci G0 i G1 generace přemístěni z venkovních podmínek do laboratoře, kde byli chováni v teplotě 10°C. Po dobu cca jednoho měsíce byly vzorky v této teplotě aklimovány a potrava byla podávána *ad libitum*. Po uplynutí této doby aklimace byli živí jedinci na konci listopadu 2010 rozděleni do experimentálních skupin a umístěni podle generací cca po dvaceti dospělých do plastových krabiček s filtračním papírkem navlhčeným vodou, bez podávání potravy. Z celkového počtu odchycených jedinců cca 1300 jich však již při rozdělení do experimentálních skupin (koncem listopadu 2010) bylo naživu jen 284 (G0 a G1). Bylo proto rozhodnuto vytvořit skupiny jen pro různé aklimační teploty 0, 5, 10 a 15°C (skupiny A0, A5, A10) při konstantní délce aklimace cca 1 měsíc.

I z těchto 284 jedinců se však vinou vysoké mortality a technických obtíží při měření SCP v lednu 2011 podařilo získat data jen z 36 dospělců ze skupin A0 (4 jedinci), A5 (24) a A10 (8). Tyto experimentální skupiny jsou označovány jako série I.

Bylo proto přikročeno k náhradnímu experimentálnímu designu: *Velia caprai* zůstávají i přes zimu aktivní i schopné rozmnožovat se a často se objevují na hladině vod i během zimy (Ditrich a Košťál, 2011). Proto v okamžiku oteplení a zaznamenání aktivity hladinatek jich bylo v polovině března 2011 co nejvíce odchycáno. Lze předpokládat, že po prvním jarním oteplení mohou přijít krátkodobé mrazy, a proto ačkoliv v březnu hmyz již nebývá maximálně chladově odolný, do jisté míry by měl být schopen přežít mrazové teploty. Pro odchyt jedinců byl vybrán potok v oblasti Českých Budějovic mezi obcemi Třebín, Mokré a Kaliště u Lipí (cca 48° 57' SŠ a 14°23' VD). Nasbíráno bylo celkem 118 jedinců a tito dospělci byli rozděleni do krabiček s filtračním papírkem a aklimováni po dobu jednoho týdne v teplotě 0, 5, 10 a 15°C (skupiny B0, B5, B10, B15). Potrava nebyla podávána. Z tohoto počtu odchycených

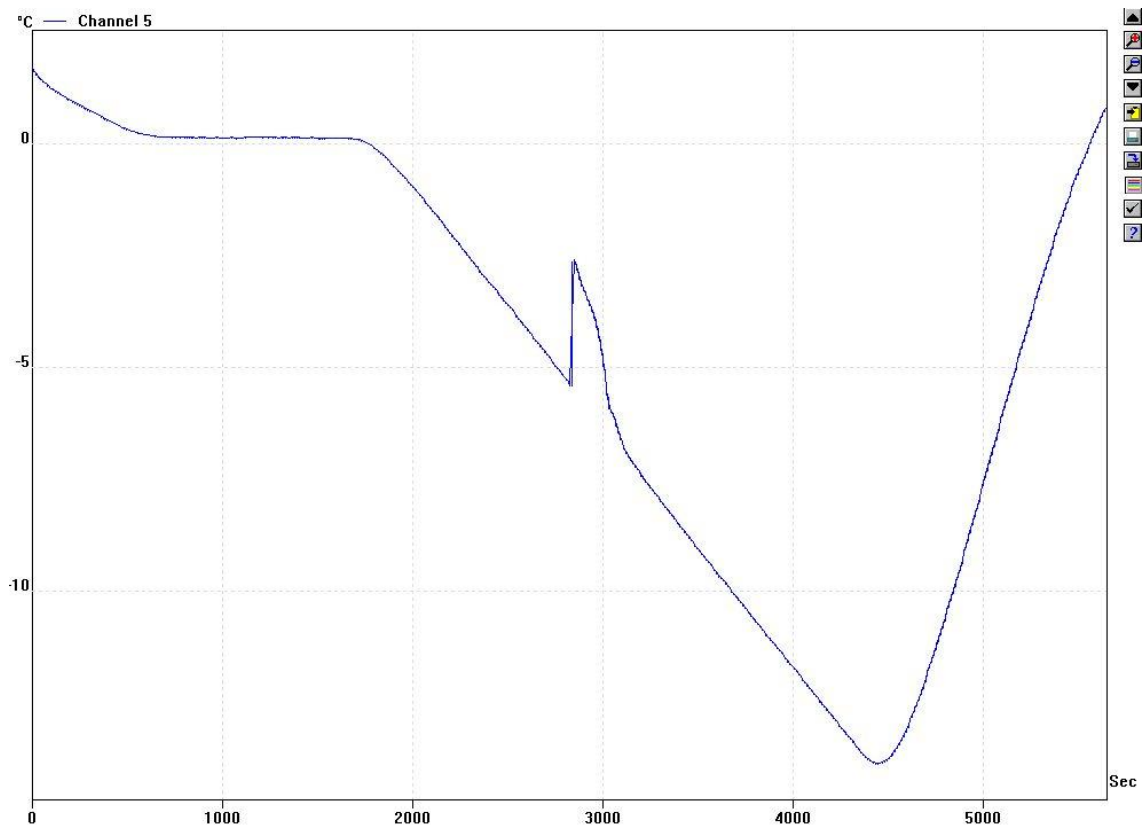
hladinetek se podařilo na konci března 2011 změřit SCP u 115 dospělců ze skupin B0 (28 jedinců), B5 (28), B10 (32), B15 (27). Skupiny byly označeny jako série II. Série I a II se tedy lišily různou dobou (měsíc vs. týden), po kterou byli jedinci vystaveni aklimační teplotě.

Kromě toho byl 19. 1. 2011 proveden odchyt *V. caprai* ve stejné oblasti (oblast Českých Budějovic mezi obcemi Třebín, Mokré a Kaliště u Lipí). Sběr byl proveden pro účely získání dat kontrolní skupiny – pro zjištění, zda se hodnoty experimentálních jedinců neliší od hodnot přirozeně přezimujících jedinců. Nasbíráno bylo dvanáct dospělců, kteří byli drženi venku – bez aklimace po dobu jednoho týdne a následně u osmi z nich změřen SCP (skupina označena jako zimní kontrola). Výsledky byly konfrontovány i s letní kontrolní skupinou – 11. 8. 2010 bylo SCP změřeno u celkem 16 jedinců generací G0 a G1 (letní kontrola).

3.3 Měření bodu podchlazení (SCP)

Měření bodu podchlazení (SCP) bylo provedeno standardním způsobem pomocí stanovení exotermy – tepla uvolněného v okamžiku promrznutí tělních tekutin. Při tomto způsobu je kontinuálně měřena teplota každého jedince prostřednictvím kontaktu s termočlánkem při plynulém zchlazování. V okamžiku, kdy teplota těla měřeného jedince dosáhne SCP, jeho tělo promrzne a uvolní se teplo tání – teplota jedince tedy mírně stoupne. Na záznamu teploty se proto objeví tzv. exoterma (obr. 5) a teplota vzorku posléze dále klesá. Nejnižší teplota před exotermou je odečtena a zaznamenána jako SCP.

V tomto konkrétním výzkumu byl každý dospělec *V. caprai* fixován (pomocí vaty) v platové tubě tak, aby jeho tělo bylo v přímém kontaktu s hrotem termočlánku. Plastová tuba byla uzavřena korkovou zátkou, čímž došlo k upevnění a stabilizaci termočlánku. Vždy osm plastových tub (každá s jedním dospělcem) bylo vloženo do aluminiového bloku, který byl umístěn do kapalinového termostatu F32-ME (Julabo, Německo) s počáteční teplotou 0°C. Tato teplota byla konstantní po dobu 20 minut a poté snižována na -15°C po dobu 45 minut. Teploty všech osmi termočlánků byly průběžně zaznamenány do počítače pomocí dataloggeru TC-08 (Pico Technology, UK) a programu PicoLogger, z kterého byla následně odečtena hodnota SCP.



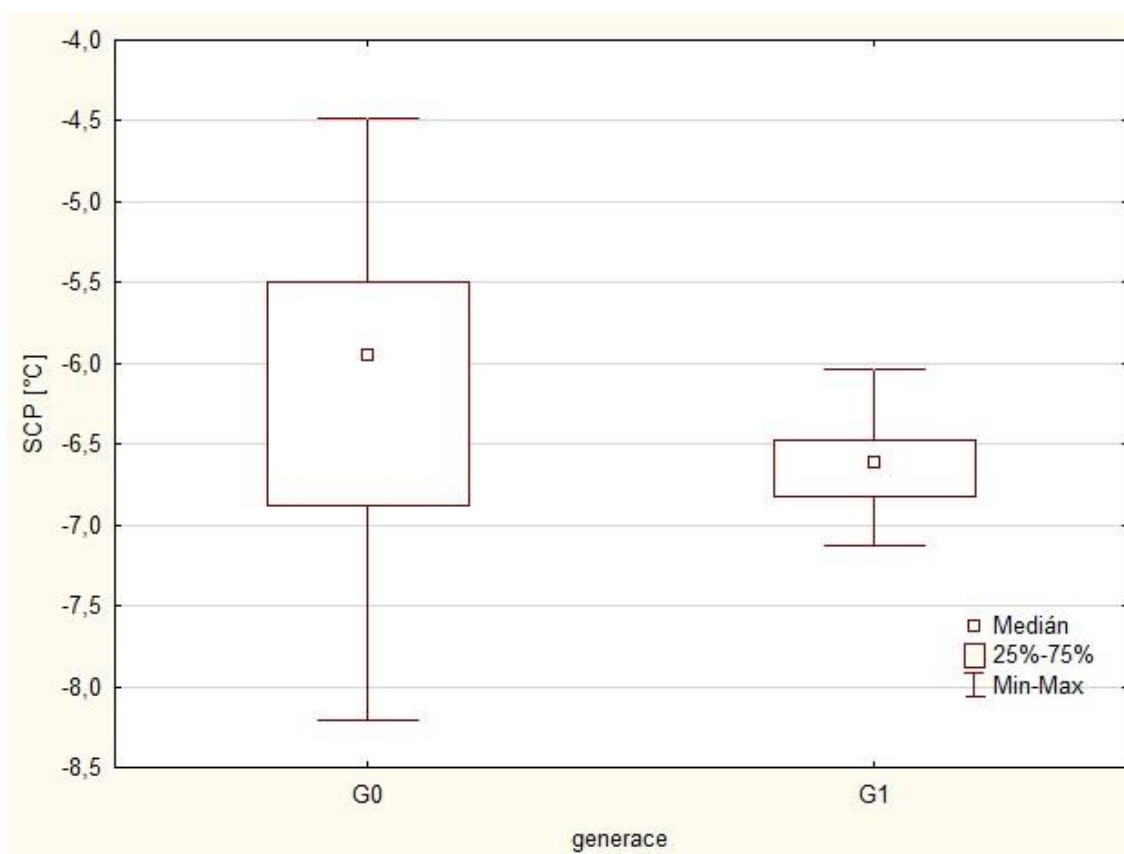
Obr. 5. Záznam teploty (s exotermou) plošnice s SCP -5.43.

3.4 Analýza dat

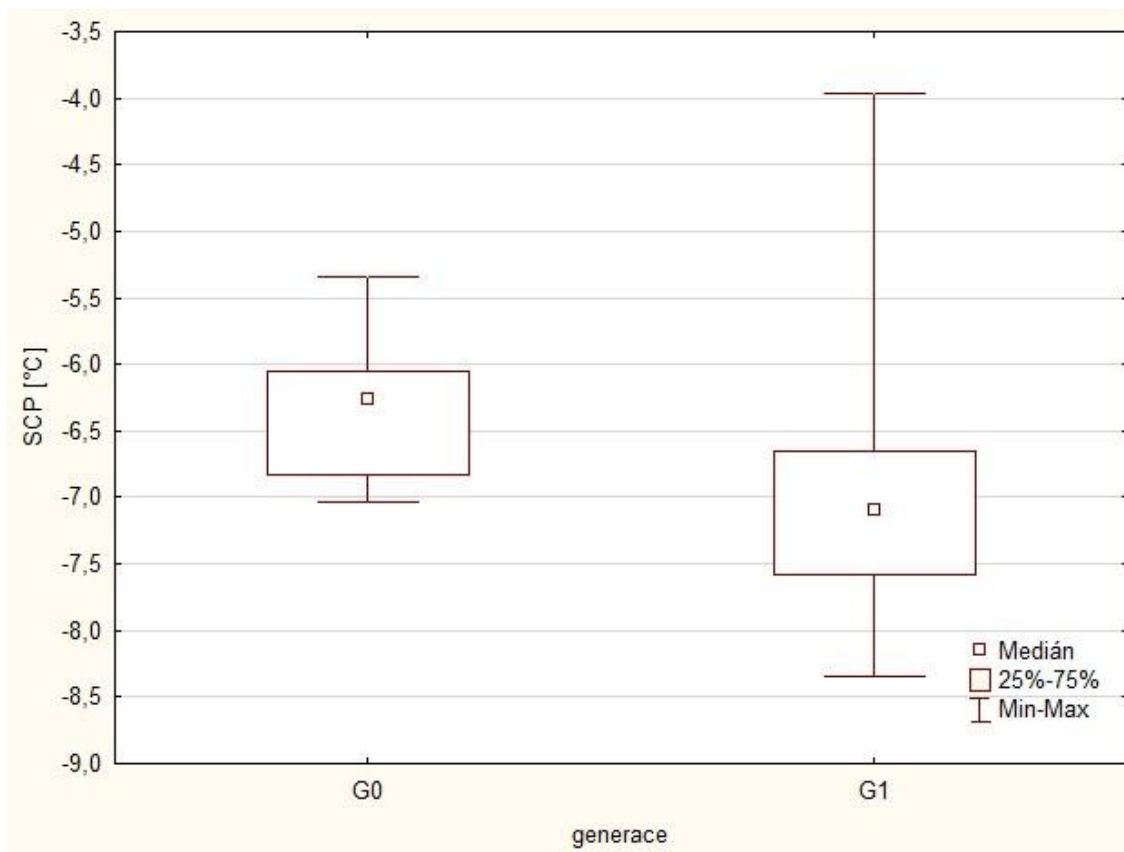
Získaná data byla zpracována pomocí programu „STATISTICA“, verze 9.1. Na výsledky byl použit neparametrický test (Mann-Whitney), přičemž byly vždy zaznamenány hodnoty testové statistiky (U) a pravděpodobnost náhodnosti výsledků (p). Na grafy pro srovnání série I a série II byla použita jednoduchá lineární regrese s uvedením koeficientu determinace = variability (R^2) a pravděpodobnost náhodnosti výsledků (p).

4 Výsledky

Protože nebyl zjištěn signifikantní rozdíl mezi SCP samic a samců žádné experimentální skupiny (Mann-Whitney; všechna $p > 0,23$), byla obě pohlaví nadále analyzována dohromady. Z důvodu vysoké mortality v chovu experimentálních jedinců nebylo možné smysluplně analyzovat zvlášť jedince generací G0 a G1. Pouze ve dvou skupinách – letní kontrola a skupina A5 série I bylo dostatečné množství jedinců pro tuto analýzu (G0: 8 a G1: 8, resp. G0: 12 a G1: 12). V letní kontrole nebyl zjištěn statisticky průkazný rozdíl mezi generacemi ($U = 21$; $p = 0,27$; obr. 6), ve skupině A5 série I však měli jedinci G1 signifikantně nižší SCP, než jedinci G0 ($U = 33$; $p = 0,03$; obr. 7). Protože však tento rozdíl je pouze marginální, byly všech při dalších analýzách obě generace analyzovány dohromady.

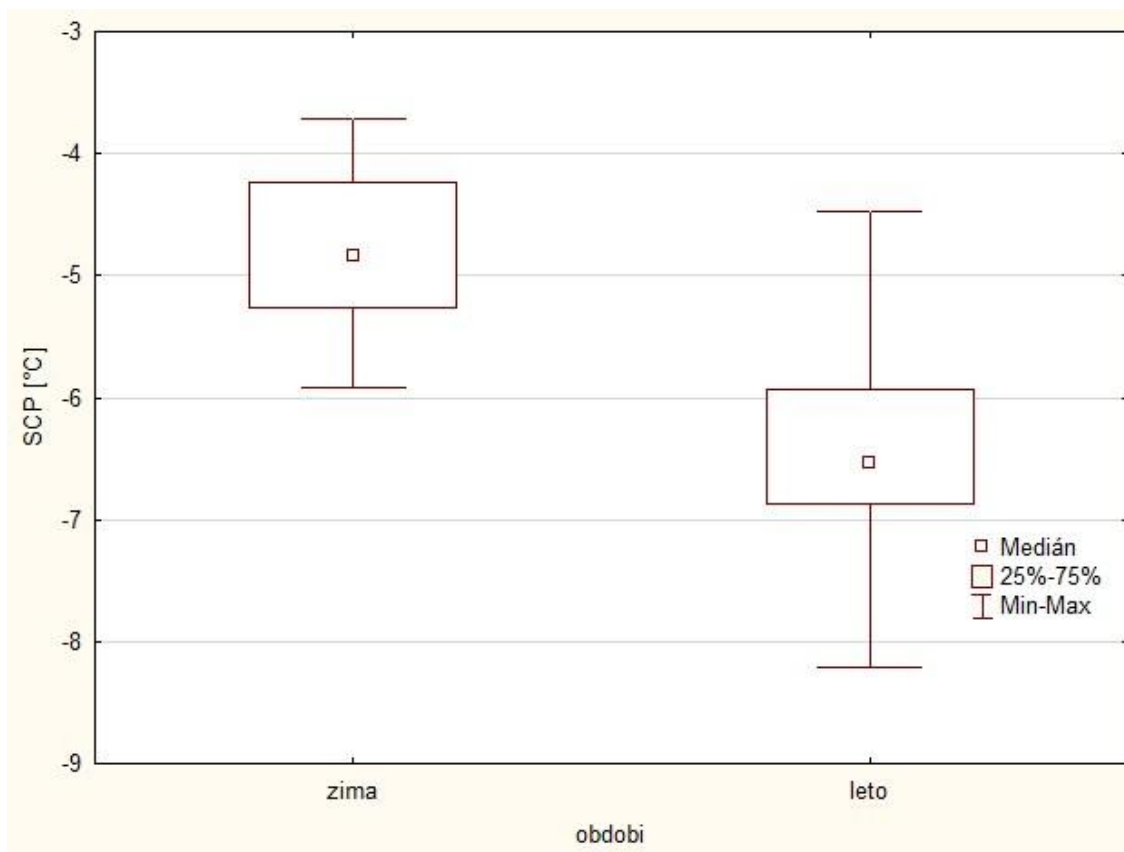


Obr. 6. Srovnání SCP mezi přezimovavší generací (G0) a letní generací (G1) při letní kontrole. Rozdíl není statisticky průkazný.



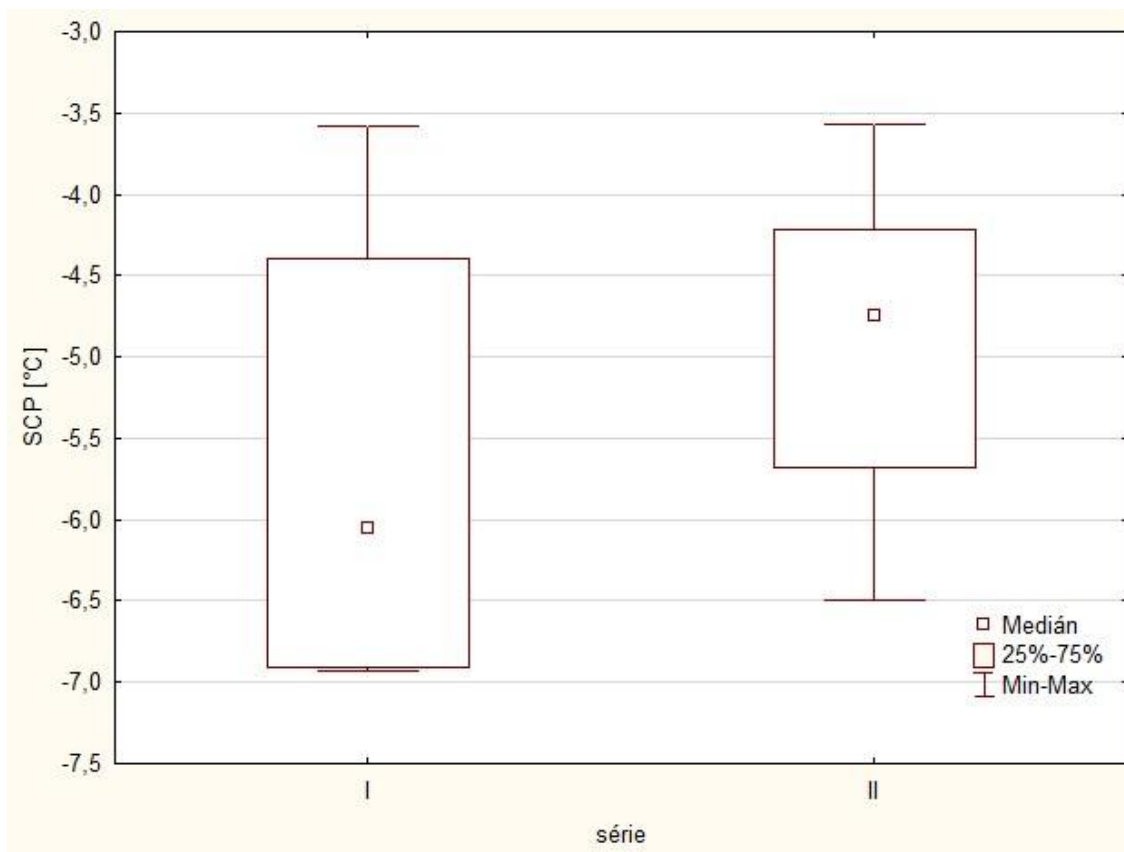
Obr. 7. Srovnání SCP mezi přezimovavší generací (G0) a letní generací (G1) ve skupině I. série aklimované při teplotě 5°C (A5). Jedinci G1 měli SCP průkazně nižší.

Dále bylo zjišťováno, zda se liší SCP neaklimovaných jedinců z letní a zimní kontrolní skupiny. Jedinci letní kontroly (odebrání 11. 8. 2010) měli medián SCP -6,5°C (n = 16), jedinci zimní kontroly (z terénu odebrání 19. 1. 2011, SCP měřeno 26. 1. 2011) měli medián SCP -4,8°C (n = 8). Rozdíl mezi oběma kontrolními skupinami byl statisticky průkazný ($U = 8$; $p < 10^{-3}$; obr. 8).



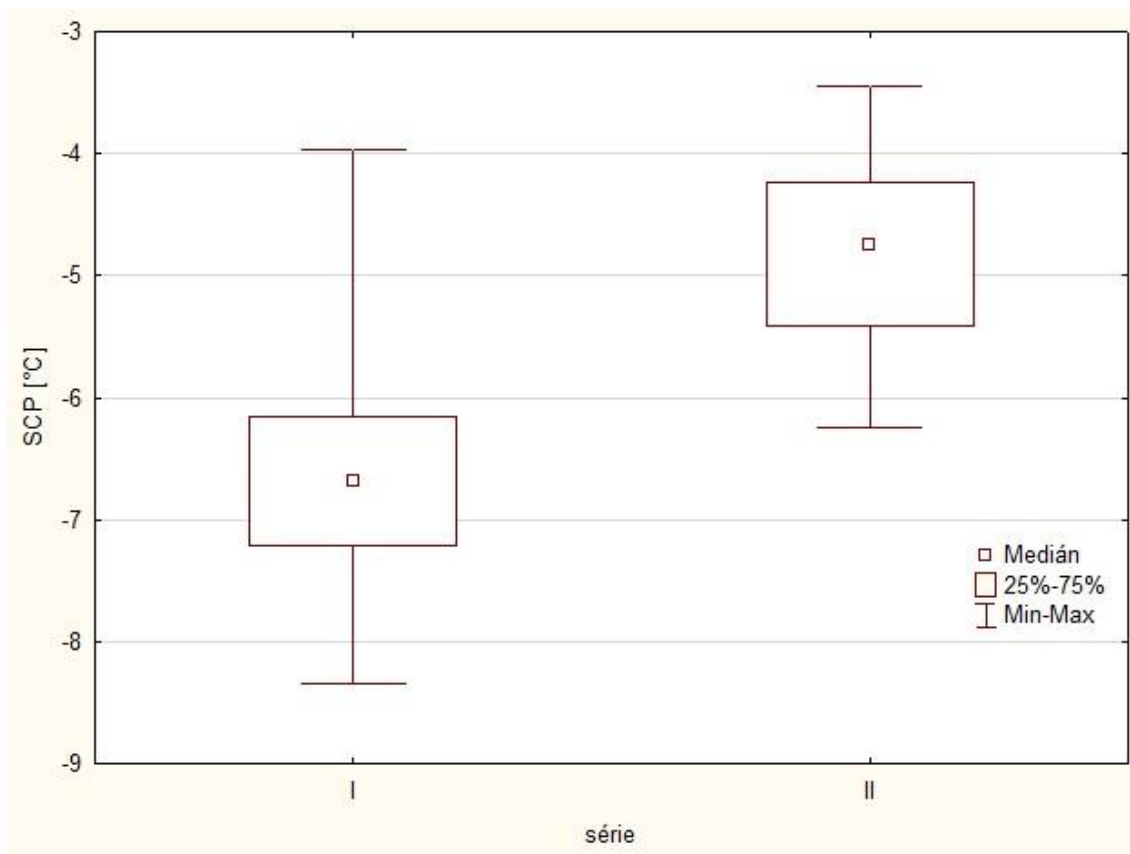
Obr. 8. Srovnání SCP mezi neaklimovanými jedinci zimní a letní kontrolní skupiny. Jedinci zimní skupiny měli SCP výrazně vyšší. Rozdíl byl statisticky průkazný.

Vzhledem k rozdílné expozici jedinců sérií I a II bylo zjišťováno, zda jedinci aklimovaní při stejných teplotách budou mít rozdílné SCP. Vzájemně byla proto srovnána hodnota SCP mezi jedinci obou sérií, aklimovanými při shodné teplotě. Rozdíl v SCP skupiny A0 ($n = 4$; medián = $-6,05^{\circ}\text{C}$) a B0 ($n = 28$; medián = $-4,7^{\circ}\text{C}$) nebyl statisticky průkazný ($U = 38$; $p = 0,31$; obr. 9).

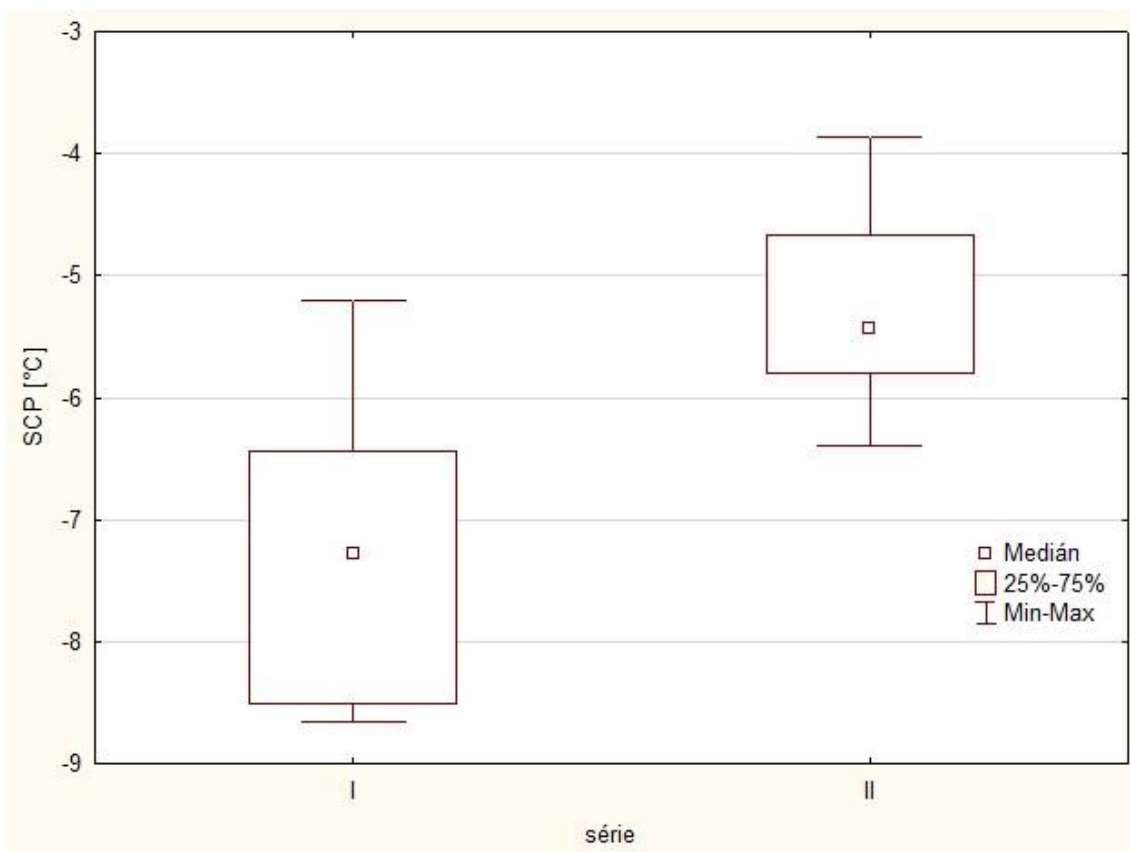


Obr. 9. Srovnání SCP mezi sériemi I a II při aklimační teplotě 0°C. Rozdíl není statisticky průkazný.

Rozdíly mezi jedinci obou sérií aklimovaných v dalších teplotách však průkazný byl – při aklimační teplotě 5°C byla hodnota SCP jedinců skupiny A5 ($n = 24$, medián = $-6,69^{\circ}\text{C}$) významně nižší než SCP jedinců skupiny B5 ($n = 28$, medián = $-4,75^{\circ}\text{C}$) ($U = 44$; $p < 10^{-7}$; obr. 10). Podobně i při teplotě 10°C byla hodnota SCP skupiny A10 ($n = 8$; medián = $-7,28^{\circ}\text{C}$) nižší než skupiny B10 ($n = 32$, medián = $-5,44^{\circ}\text{C}$) (obr. 11). I tento rozdíl byl statisticky průkazný ($U = 25$; $p < 10^{-3}$).

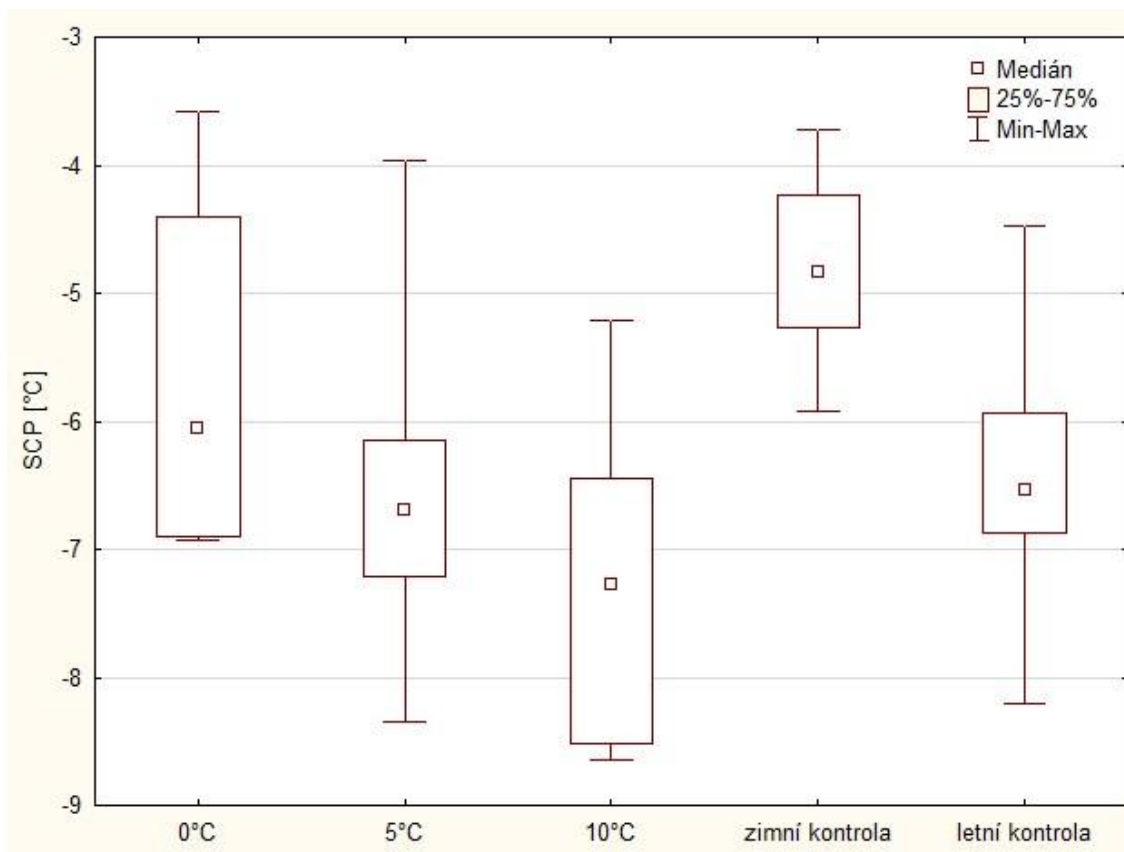


Obr. 10. Srovnání SCP mezi jedinci ve skupině aklimované při teplotě 5°C v sérii I a sérii II. Jedinci v sérii I měli SCP průkazně nižší.



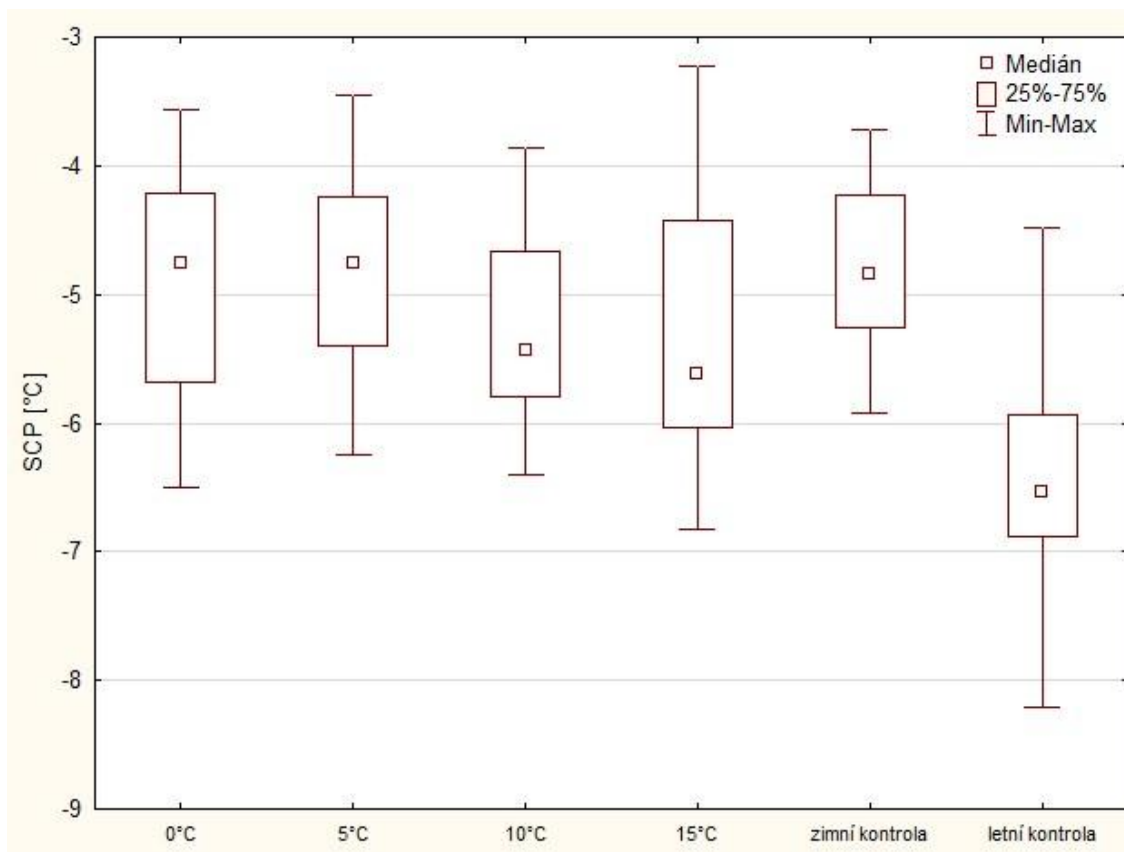
Obr. 11. Srovnání SCP mezi jedinci ve skupině aklimované při teplotě 10°C v sérii I a sérii II. Rozdíl je statisticky průkazný.

Kvůli statisticky průkaznému rozdílu hodnot SCP mezi jedinci obou sérií byly obě série analyzovány zvlášť. Celkové rozložení hodnot SCP jedinců série I se pohybovalo od -3,58°C do -8,65°C, přičemž vyšší hodnoty se obecně vyskytovaly u jedinců aklimovaných při nižších teplotách. Tento trend odpovídá i rozložení SCP jedinců letní a zimní kontroly (obr. 12).



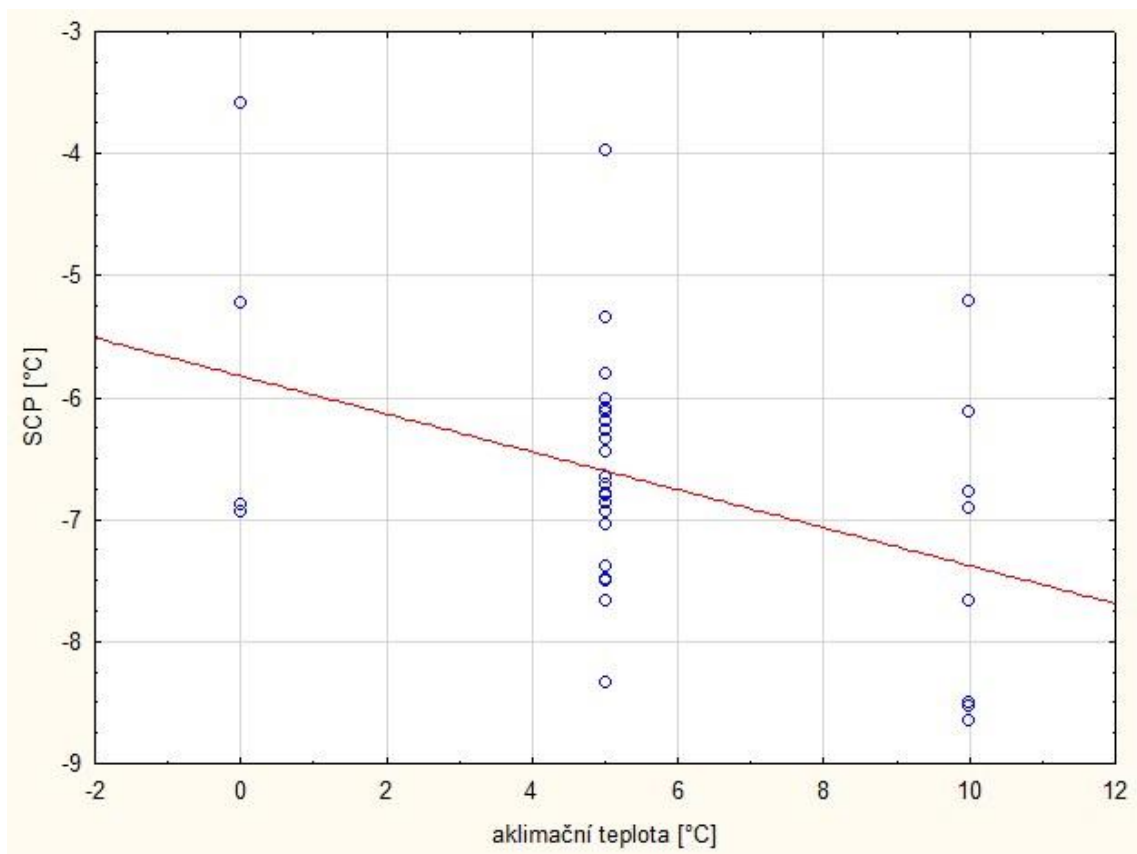
Obr. 12. Celkové rozložení hodnot SCP při různých aklimačních teplotách série I a zimní a letní kontrole.

Celkové rozložení hodnot SCP jedinců série II se pohybovalo v rozmezí od $-3,22^{\circ}\text{C}$ do $-6,82^{\circ}\text{C}$, přičemž vyšší hodnoty se obecně vyskytovaly u jedinců aklimovaných při nižších teplotách (jako je tomu i v sérii I). Tento trend odpovídá i rozložení SCP jedinců letní a zimní kontroly (obr. 13).

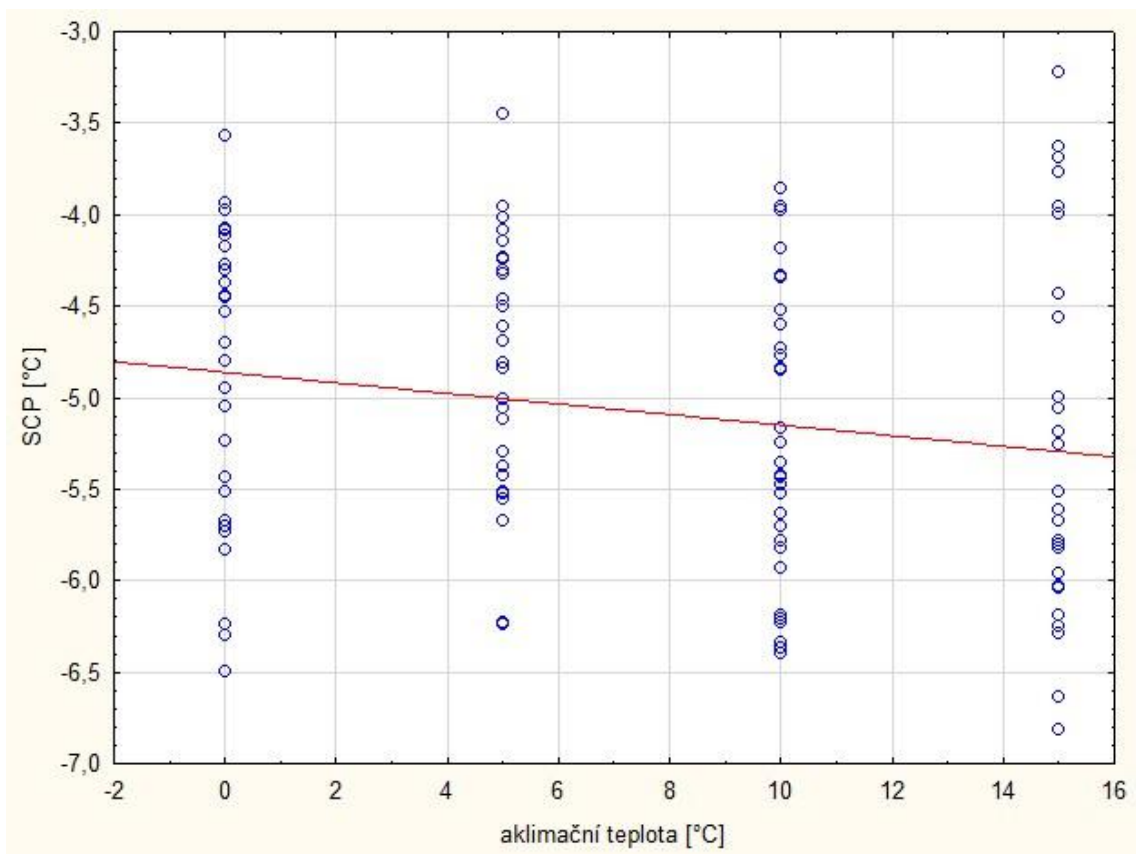


Obr. 13. Celkové rozložení hodnot SCP při různých aklimačních teplotách série II a zimní a letní kontrole.

Lineární regresí byla zjišťována závislost hodnoty SCP na aklimační teplotě. Při délce expozice jeden měsíc (série I) bylo SCP jedinců negativně závislé na aklimační teplotě podle rovnice $SCP = -5,82 - 0,16t$ (obr. 14). Tato negativní závislost byla statisticky průkazná ($p = 0,02$) a změna aklimační teploty vysvětlila 15 % celkové variability SCP. Podobná, avšak slabší negativní závislost byla zjištěna i při délce expozice jeden týden, při výsledné rovnici regrese $SCP = -4,86 - 0,03t$ (obr. 15). I tato závislost byla statisticky průkazná ($p = 0,046$) při 3,5 % variability SCP vysvětlené aklimační teplotou.



Obr. 14. Hodnota SCP v závislosti na aklimační teplotě jedinců série I (expozice jeden měsíc). Závislost je statisticky průkazná.



Obr. 15. Hodnota SCP v závislosti na aklimační teplotě jedinců série II (expozice jeden týden). Závislost je statisticky průkazná.

5 Diskuse a závěry

Celý zde prezentovaný výzkum je ovlivněn relativně malým počtem analyzovaných jedinců. Značně vysoká mortalita během udržovacích chovů nedovolila vyhodnotit dostatečný počet různých experimentálních skupin ani jedinců. Všechny výsledky a závěry je vzhledem k tomuto faktu nutno přijímat opatrně a kriticky.

Během tohoto výzkumu nebyl zjištěn průkazný rozdíl SCP samců a samic, což odpovídá výsledkům dřívějších studií (Ditrich a Košťál, 2011). Při zjišťování rozdílu SCP mezi různými generacemi hladinetek *V. caprai* (resp. mezi jedinci přezimujícími poprvé vs. podruhé) je interpretace zde dosažených výsledků značně ztížena malým počtem dostupných dat. Získané výsledky však naznačují, že SCP různých věkových kohort dospělců *V. caprai* se může lišit. Přestože tedy ve výsledkové části byly obě skupiny jedinců analyzovány dohromady (při letní kontrole nebyl rozdíl průkazný, rozdíl skupiny jedinců A5 byl marginálně významný), jedinci přezimující první zimu měli v obou případech nižší SCP (a tedy vyšší chladovou odolnost). To by mohlo být způsobeno faktem, že tito mladší jedinci jsou v lepší fyzické kondici než starší dospělci, přezimující již podruhé. Na druhou stranu při předpokládané variabilitě hodnot SCP v populaci a předpokládanému omezení přežívání danému právě chladovou odolností (viz Ditrich a Košťál, 2011) by první přezimování měli přežít spíše jedinci dostatečně chladově odolní. V kohortě poprvé zimujících jedinců by teoreticky měla potom být větší variabilita i se zastoupením velmi málo chladově odolných jedinců. Protože tomu (dle dosažených výsledků) tak spíše není, pravděpodobně je chladová odolnost závislá spíše na aktuální kondici každého jedince, než na jeho vrozeném fenotypu.

Statisticky průkazný rozdíl byl mezi neaklimovanými jedinci zimní a letní kontrolní skupiny. Jedinci zimní skupiny měli SCP výrazně vyšší. Z toho vyplývá, že jedinci v zimních měsících jsou méně chladově odolní než v letních měsících.

Z důvodu rozdílné expozice jedinců ze série I a II byly tyto série analyzovány zvláště pro shodné aklimační teploty. Výsledky při aklimaci jedinců ve shodné teplotě 0°C byly vzhledem k malému počtu dostupných dat ze skupiny A0 značně ztíženy a rozdíl mezi sériemi při této teplotě nebyl statisticky průkazný. I z tohoto malého počtu změřených jedinců lze konstatovat, že tito jedinci A0 měli nižší hodnoty SCP. Průkazný rozdíl však byl patrný z výsledků analyzování dat SCP jedinců skupiny aklimované při shodné teplotě 5°C ze sérii I a sérii II. Jedinci skupiny A5 měli hodnoty SCP průkazně

nižší. Statisticky průkazný rozdíl se ukázal i u skupin aklimovaných při teplotě 10°C, kdy jedinci ze série I. skupiny A10 měli hodnoty SCP také nižší než jedinci skupiny B10. I u této analyzované skupiny jsou výsledky značně diskutabilní pro malý počet získaných dat ze skupiny A10. Příčinou toho, že skupiny A0, A5 a A10 série I mají nižší hodnoty SCP než skupiny B0, B5 a B10 série II by mohla být právě rozdílná expozice jedinců série I (aklimace po dobu jednoho měsíce) v těchto teplotách než expozice jedinců série II. Tito jedinci série II byli sice sbíráni v březnu, což nezaručuje vyšší chladovou odolnost, ale byli aklimováni pouze po dobu jednoho týdne. Z těchto výsledků tedy plyne, že délka expozice by mohla mít vliv na pozitivní vliv na chladovou odolnost a snižovat SCP.

Mezi jedinci obou sérií byl statisticky průkazný rozdíl mezi hodnotami SCP, proto při zjišťování vlivu teplot na chladovou odolnost byly obě série analyzovány zvlášť. Hodnoty SCP jedinců ze série I se pohybovaly od -3,58°C do -8,65°C, hodnoty SCP jedinců ze série II se pohybovaly od -3,22°C do -6,82°C. V obou případech se vyšší hodnoty SCP vyskytovaly u jedinců aklimovaných při nižších teplotách, což potvrdila statisticky průkazná lineární regrese v obou sériích. Tomu odpovídá i rozložení hodnot SCP zimní a letní kontroly. Na základě těchto výsledků lze tvrdit, že čím vyšší teplota aklimace, tím nižší hodnota SCP. Z toho vyplývá, že na zvýšení chladové odolnosti *V. caprai* má vliv vyšší teplota. Pravděpodobný mechanismus by mohla být závislost SCP na celkové fyzické kondici jedinců a nepřímém poškození chladem v nízkých teplotách.

Pravidlo, že aklimace zvyšuje chladovou odolnost, nebylo tímto experimentem prokázáno. Může to být způsobeno pravděpodobně tím, že *V. caprai* nevstupuje do diapauzy (viz kapitola 2.3.1). Tak by se potvrdil názor Hodkové a Hodka (1997) i Šlachty a kol. (2002), že diapauza a chladová odolnost jsou spolu úzce svázány a že diapauza je nutná pro dosažení chladové odolnosti.

5.1 Závěr

Tato práce přispěla novými poznatky, které přispívají k porozumění zvláštního přezimování hladinatky *Velia caprai* a mohou být využity pro další studie. Bylo zodpovězeno na následující dílčí otázky:

- Závisí chladová odolnost *V. caprai* na teplotě aklimace?

Ano, teplota aklimace má významný vliv na SCP a tím i na chladovou odolnost. Tento vliv je však opačný, než u většiny druhů – aklimace při nižší teplotě zvyšuje SCP a tím snižuje chladovou odolnost. Nejvyšší chladové odolnosti dosahovali jedinci aklimovaní při teplotě 10°C či jedinci z letní kontroly.

- Zavisí chladová odolnost *V. caprai* na délce expozice aklimační teploty?
Pravděpodobně ano, prodloužená expozice zvyšuje chladovou odolnost. Tato otázka však nemůže být s určitostí zodpovězena, protože testované skupiny se lišily nejenom délkou expozice, ale i dalšími neznámými faktory.
- Liší se hodnoty bodu podchlazení mezi jedinci prvního a druhého přezimování?
Pravděpodobně ano, jedinci přezimující poprvé jsou více chladově odolní. Spolehlivě však tato otázka nemůže být zodpovězena pro celkově malý počet analyzovaných jedinců.

Nezvyklá „pozitivní“ závislost chladové odolnosti na aklimační teplotě (čím nižší aklimační teplota, tím nižší chladová odolnost) je velice pravděpodobně neadaptivní a zřejmě důsledek toho, že hladinatka *V. caprai* nevstupuje do diapauzy a přezimuje v kviescenci.

6 Seznam použité literatury

- Asahina E., 1969: Frost resistance in insects. *Advances Insect Physiology*, 6, str. 1-49.
- Bale J. S., 1993: Classes of insect cold hardiness. *Functional Ecology*, 7, str. 751-753.
- Bale J. S., 1996: Insect cold hardiness: A matter of life and death. *European Journal of Entomology*, 93, str. 369-382.
- Carrasco M. A., Buechler S. A., Arnold R. J., Sformo T., Barnes B. M., Duman J. G., 2011: Investigating the deep supercooling ability of an Alaskan beetle, *Cucujus clavipes puniceus*, via high throughput proteomics. *Journal of Proteomics*, 75, str. 1220-1234.
- Denlinger D. L., Lee R. E., 1998: Physiology of cold sensitivity. In: *Temperature Sensitivity in Insects and Application in Integrated Pest Management* (Eds. G. J. Hallman & D. L. Denlinger). Boulder: Westview Press, str. 55-95.
- Denlinger D. L., Lee R. E., 2010: *Low Temperature Biology of Insects*. Cambridge: Cambridge University Press, 390 s.
- Ditrich T., Košťál V., 2011: Comparative analysis of overwintering physiology in nine species of semi-aquatic bugs (Heteroptera: Gerromorpha). *Physiological Entomology*, 36, str. 261-270.
- Ditrich T., Nedvěd O. a Papáček M., 2009: Bet-hedging overwintering strategy as a result of low cold hardiness. 3rd International Symposium of Environmental Physiology of Ectotherms and Plants (ISEPEP3), Book of abstracts, 24.-28. 8. 2009, Tsukuba Japonsko, str. 50.
- Ditrich T., Papáček M., 2008: Obyčejná i neobyčejná hladinatka. *Živa*, 5, str. 218-219.
- Duman J. G., Bennett V., Sformo T., Hochstrasser R. a Barnes B. M., 2004: Antifreeze proteins in Alaskan insects and spiders. *Journal of Insect Physiology*, 50, str. 259-266.
- Harada T., 2003: Hardiness to low temperature and drought in a water strider, *Aquarius paludum* in comparison with other insect groups. *Trends in Entomology*, 3, str. 29-41.

- Hiisaar K., Williams I., Luik A., Metspalu L., Muljar R., Jogar K., Karise R., Mand M., Svilponis E. a Ploomi A., 2009: Factors affecting cold hardiness in the small striped flea beetle, *Phyllotreta undulata*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 131, str. 278-285.
- Hinton H. E., 1960: A fly larva that tolerates dehydration and temperatures of -270°C to +102°C. *Nature*, 188, str. 333-337.
- Hirsh A. G., 1987: Vitrification in plants as a natural form of cryoprotection. *Cryobiology*, 24, str. 214-228.
- Hodková M., Hodek I., 1997: Temperature regulation of supercooling and gut nucleation in relation to diapause of *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Heteroptera). *Cryobiology*, 34, str. 70-79.
- Holmstrup M., Bayley M. a Ramlov H., 2002: Supercool or dehydrate? An experimental analysis of overwintering strategies in small permeable arctic invertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 99, str. 5716-5720.
- Chown S., Nicolson S. W., 2004: *Insect physiological ecology: mechanism and patterns*. Oxford: Oxford University Press, 243 s.
- Košťál V., 2006: Eco-physiological phases of insect diapause. *Journal of Insect Physiology*, 52, str. 113-127.
- Košťál V., Vambera J. a Bastl J., 2004: On the nature of pre-freeze mortality in insects: water balance, ion homeostasis and energy charge in adults of *Pyrrhocoris apterus*. *The Journal of Experimental Biology*, 207, str. 1509-1521.
- Košťál V., Zahradníčková H. a Šimek P., 2011: Hyperprolinemic larvae of the drosophilid fly, *Chymomyza costata*, survive cryopreservation in liquid nitrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 108(32), str. 13041-13046.
- Lee R. E., 1989: Insect cold-hardiness: to freeze or not to freeze. *Bioscience*, 39(5), str. 308-313.

- Lee R. E., 1991: Principles of insect low temperature tolerance. In: Insects at Low Temperature (Eds. R. E. Lee & D. L. Denlinger). New York and London: Chapman & Hall, str. 17-46.
- Lee R. E., 2010: A primer on insect cold tolerance. In: Low Temperature Biology of Insects (Eds. D. L. Denlinger and R. E. Lee). Cambridge: Cambridge University Press, str. 3-34.
- Lee R. E., Costanzo J. P., 1998: Biological ice nucleation and ice distribution in cold-hardy ectothermic animals. *Annual Review of Physiology*, 60, str. 55-72.
- Nedvěd O., 1996: Chladová odolnost hmyzu a tropy. *Vesmír*, 75, 669 s.
- Nedvěd O., 2000: Snow white and the seven dwarfs: a multivariate approach to classification of cold tolerance. *Cryo-Letters*, 21, str. 339-348.
- Persson D., Halberg K. A., Jorgensen, A., Ricci C., Mobjerg N. a Kristensen R. M., 2011: Extreme stress tolerance in tardigrades: surviving space conditions in low earth orbit. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 49(S1), str. 90-97.
- Rickards J., Kelleher M. J. a Storey K. B., 1987: Strategies of freeze avoidance in larvae of the goldenrod gall moth *Epiblemma scudderiana*: winter profiles of a natural population. *Journal of Insect Physiology*, 33, str. 443-450.
- Sakurai M., Furuji T., Akao K., Tanaka D., Nakahara Y., Kikawada T., Watanabe M. a Okuda T., 2008: Vitrification is essential for anhydrobiosis in an African chironomid, *Polypedilum vanderplanki*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 105, str. 5093-5098.
- Salt R. W., 1961: Principles of insect cold- hardiness. *Annual Review of Entomology*, 6, str. 55-74.
- Sandro L. H., Lee R. E., 2006: Winter biology & freeze tolerance in the goldenrod gall fly. *The American Biology Teacher*, 68(1), str. 29-35.
- Sformo T., McIntyre J., Walters K. R., Barnes B. M. a Duman J., 2011: Probability of freezing in the freeze-avoiding beetle larvae *Cucujus clavipes puniceus*

- (Coleoptera: Cucujidae) from interior Alaska. *Journal of insect physiology*, 57, str. 1170-1177.
- Sformo T., Walters K., Jeannet K., Wowk B., Fahy, G. M., Barnes B. M. a Duman J. G., 2010: Deep supercooling, vitrification and limited survival to -100 degrees C in the Alaskan beetle *Cucujus clavipes puniceus* (Coleoptera: Cucujidae) larvae. *Journal of Experimental Biology*, 213(3), str. 502-509.
- Sinclair B. J., 1999: Insect cold tolerance: how many kind frozen? *European Journal of Entomology*, 96, str. 157-164.
- Sømme L., 1999: The physiology of cold hardiness in terrestrial arthropods. *European Journal of Entomology*, 96, str. 1-10.
- Sømme L., Meier T., 1995: Cold tolerance in Tardigrada from Dronning-Maud-Land, Antarctica. *Polar Biology*, 15, str. 221-224.
- Steponkus P. L., Lynch D. V., 1989: Freeze/thaw-induced destabilization of the plasma membrane and the effects of cold acclimation. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 21, str. 21-41.
- Šlachta M., Vambera J., Zahradníčková H. a Košťál V., 2002: Entering diapause is a prerequisite for successful cold-acclimation in adult *Graphosoma lineatum* (Heteroptera : Pentatomidae). *Journal of Insect Physiology*, 48, str. 1031-1039.
- Tsumuki H., Konno H., Maeda T. a Okamoto Y., 1992: An ice-nucleating active fungus isolated from the gut of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera, Pyralidae). *Journal of Insect Physiology*, 38, str. 119-125.
- Ushatinskaya R. S., 1957: Principles of Insect Cold Hardiness. Moskva: Izdanie Akademii Nauk SSSR. [rusky].
- Vanovič J., Sokol E., Thern L. a Vlach B., 1969: Fyzika pro II. ročník střední všeobecně vzdělávací školy. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 246 s.
- Walters K. R., Serianni A. S., Sformo T., Barnes B. M. a Duman J. G., 2009: A nonprotein thermal hysteresis-producing xylomannan antifreeze in the freeze-tolerant Alaskan beetle *Upis ceramboides*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 106(48), str. 20210-20215.

Wharton D. A., Ferns D. J., 1995: Survival of intracellular freezing by the antarctic nematode *Panagrolaimus davidi*. *The Journal of Experimental Biology*, 198, str. 1381-1387.

Zachariassen K. E., 1985: Physiology of cold tolerance in insects. *Physiological Reviews*, 65, str. 799-832.