

**ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE**

**FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ**

**KATEDRA EKOLOGIE**



**Fenomén reflexního krvácení u hmyzu**

**Reflex bleeding phenomenon in insects**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Diplomant: Bc. Dana Židlická**

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

2018

# ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Dana Židlická

Ochrana přírody

Název práce

Fenomén reflexního krvácení u hmyzu

Název anglicky

Reflex bleeding phenomenon in insects

---

### Cíle práce

Cílem diplomové práce bude vypracovat literární rešerši na téma "reflexní krvácení u hmyzu". Detailnější pozornost by v rešerši měla být věnována slunéčkům (Coleoptera: Coccinellidae) a problematice možných negativních dopadů reflexního krvácení pro hmyz. Praktická část diplomové práce bude tvořena laboratorním experimentem, při kterém bude zkoumán dopad opakovaného reflexního krvácení v kombinaci s různou úrovní fyziologického stresu (hlad, žízeň) na kondici slunéček.

### Metodika

Rešerše bude založena především na informacích z vědeckých článků nalezených na Web of Knowledge a v anglicky psaných odborných knihách. Praktický experiment bude realizován na modelovém druhu *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). Slunéčka budou vystavena různé úrovni fyziologického stresu (žádný, hladovění, hladovění spojené s nedostatkem vody). Polovina jedinců bude navíc 2x týdně vyprovokována k reflexnímu krvácení. Cílem experimentu bude porovnat dopady opakovaného reflexního krvácení při různé úrovni fyziologického stresu na přežívání slunéček a jejich fyziologický stav (fungování imunitního systému, energetické zásoby). Dále bude měřen vývoj ochoty jedinců reagovat na nebezpečí reflexním krvácením, případně vývoj množství vykrváčené hemolymfy. Data budou analyzována pomocí zobecněných lineárních modelů (GLM).

Doporučený rozsah práce  
cca 40 stran textu + přílohy dle potřeby

**Klíčová slova**

fyziologické náklady, fyziologický stress, reflexní krvácení, slunéčka, trade-off

---

**Doporučené zdroje informací**

- Bateman PW, Fleming PA (2009) There will be blood: autohaemorrhage behaviour as part of the defence repertoire of an insect. *Journal of Zoology* 278: 342-348.
- Higginson AD, Delf J, Ruxton GD, Speed MP (2011) Growth and reproductive costs of larval defence in the aposematic lepidopteran *Pieris brassicae*. *Journal of Animal Ecology* 80: 384-392.
- Hodek I, Honěk A, van Emden HF (2012) *Ecology and Behaviour of the Ladybird Beetles (Coccinellidae)*. Chichester, UK: Willey-Blackwell.
- Novgorodova TA (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.
- Sato S, Kushibuchi K, Yasuda H (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.
- 

**Předběžný termín obhajoby**

2017/18 LS – FŽP

**Vedoucí práce**

Ing. Michal Knapp, Ph.D.

**Garantující pracoviště**

Katedra ekologie

**Konzultant**

Ing. Michal Řeřicha

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 26. 03. 2018

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Ing. Michala Knappa, Ph.D. a že jsem uvedla všechny literární prameny, ze kterých jsem čerpala.

V Praze dne 5.4. 2018

.....

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat celé své rodině za podporu a trpělivost během mého studia. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Pavlu Dobešovi, Ph.D. za změření parametrů hemolymfy a Bc. Michalu Řeřichovi za odbornou pomoc při experimentech. Nejvíce bych chtěla poděkovat svému školiteli Ing. Michalu Knappovi, Ph.D. za jeho velmi vstřícný přístup a ochotu při poskytování rad a řešení problémů během mé práce.

## Abstrakt

Jedním z nejučinnějších obranných chování hmyzu proti predátorům je reflexní krvácení, které lze zařadit mezi obranu chemickou. S reflexním krvácením jsou často spojené energetické náklady, které jsou do takové obrany vloženy. V této diplomové práci jsem v rámci dvou experimentů zkoumala vliv reflexního krvácení na fyziologický stav slunéček východních (*Harmonia axyridis*).

V prvním experimentu byl zkoumán vliv reflexního krvácení a nedostatku potravy na přežívání slunéček po přezimování, jejich reprodukci a základní fyziologické a imunologické parametry. Slunéčka (samci i samice) byla rozdělena do dvou skupin (krmena / nekrmena) a vždy polovina jedinců byla podrobována reflexnímu krvácení každé 3 – 4 dny po dobu 17 dní (celkem 5 odběrů). Nedostatek potravy měl vliv nejen na přežívání, ale i na tělesnou hmotnost slunéček a stav jejich imunitního systému. Hladovění i reflexní krvácení aditivně negativně ovlivnily koncentraci hemocytů a proteinů v hemolymfě a také způsobily nižší aktivitu hemolymfy proti bakteriím *Escherichia coli* a *Micrococcus luteus*. Krmené samice, které byly nuceny reflexně krvácet, nakladly nižší počet snůšek než krmené samice bez krvácení. Hladovění samic vedlo k nulové reprodukci krátce po přezimování.

Druhý experiment se zabýval vlivem reflexního krvácení na počet nakladených vajíček samicemi v průběhu vegetační sezóny. Po prvních pár dnech kladení snůšek (kontrolní perioda) byla polovina samic denně podrobována reflexnímu krvácení a následně byl počítán počet nakladených vajíček během dvou šesti denních period. V průběhu času docházelo k poklesu počtu nakladených vajíček samicemi. Největší rozdíl je vidět mezi kontrolní a druhou periodou. Vliv reflexního krvácení je v datech částečně pozorovatelný, statistický test však vyšel neprůkazně.

Zdá se, že reflexní krvácení kromě efektivní obrany proti predátorům s sebou přináší i opravdu vysoké náklady, které se mohou projevit i ve fitness slunéček. Výrazný je vliv opakovaného reflexního krvácení na fungování imunitního systému. Výsledky mých experimentů tak podávají další důkaz, že reflexní krvácení, s nímž je spojena ztráta podstatného objemu hemolymfy je pro slunéčka energeticky nákladnou aktivitou.

**Klíčová slova:**

Fyziologické náklady, fyziologický stress, reflexní krvácení, sluněčka, trade-off

## **Abstract**

One of the most effective defence mechanisms insects have against predators is reflex bleeding, which can be classified as chemical defence. There are certain energy requirements often associated with such defence mechanisms. In this thesis two experiments were conducted to examine the effects of reflex bleeding on the physiology of Asian ladybeetles (*Harmonia axyridis*).

The first experiment assessed the effect reflex bleeding and lack of nutrition had on the ladybeetle's survival after hibernation, on their reproduction, and on their basic physiological and immunological parameters. The ladybeetles (male and female) were separated into two groups (fed / not fed) and half of them underwent reflex bleeding every three to four days over a seventeen-day period (5 samples collected). Lack of nutrition affected not only the survival rate, but the ladybeetles' body mass and the state of their immune system as well. Malnutrition and reflex bleeding cumulatively had a negative effect on haemocyte and protein concentrations in haemolymph and decreased the haemolymph's activity against *Escherichia coli* and *Micrococcus luteus* bacteria. All fed females that underwent reflex bleeding laid fewer eggs than fed females that did not undergo reflex bleeding. Shortly following hibernation, the starved females showed no signs of reproduction.

The second experiment evaluated the impact that reflex bleeding had on the number of eggs laid by the females throughout the growing season. Following the first few days of egg laying (control period), half of the females underwent reflex bleeding daily and, subsequently, the number of eggs laid was counted for two six-day periods. Over the course of time a decrease in the number of laid eggs can be observed. The greatest difference was between the control period and the second period of counting. The impact of reflex bleeding can be partially observed in the acquired data but the statistical test was inconclusive.

It appears that aside from being an effective defence mechanism, reflex bleeding carries along a significant cost and may have an impact on the ladybeetles' fitness. Especially significant is the effect reflex bleeding has on the immune system. The results these experiments produced are more proof of the fact that reflex bleeding, which is accompanied by considerable haemolymph loss, is energetically demanding for ladybeetles.



**Keywords:**

Physiological costs, physiological stress, reflex bleeding, ladybeetles, trade-off

## Obsah

1	Úvod.....	12
	1.1 Predátor a kořist .....	12
	1.1.1 Obrana proti predátorovi .....	13
	1.1.2 Behaviorální obrana .....	13
	1.1.3 Morfologická obrana.....	15
	1.1.4 Chemická obrana.....	18
	1.2 Rozmanitost chemické obrany .....	18
	1.2.1 Ochrana před predací uvnitř potravní gildy .....	20
	1.2.2. Externalizovaná obrana .....	21
	1.2.3 Reflexní krvácení .....	23
	1.2.4 Reflexní krvácení u slunéček .....	24
	1.2.5 Alergická reakce.....	26
	1.3 Náklady na chemickou obranu .....	27
	1.3.1 Náklady na vyvrhování .....	28
	1.3.2 Náklady na reflexní krvácení .....	29
	1.4 Cíl práce .....	31
2	Metodika .....	32
	2.1 Studovaný druh .....	32
	2.1.1 Invaze a rozšíření .....	33
	2.1.2 Využití slunéčka v lékařství .....	35
	2.2 Popis experimentu č. 1 - Vliv opakovaného reflexního krvácení na fyziologickou kondici slunéčka východního ( <i>Harmonia axyridis</i> ).....	35
	2.2.1 Příprava slunéček .....	35
	2.2.2 Průběh odebírání hemolymfy v dalších dnech .....	38
	2.2.3 Analýza dat.....	40
	2.2.4 Výsledky .....	41
	2.3 Popis experimentu č. 2 – Vliv opakovaného reflexního krvácení na počet vajíček nakladených slunéčkem východním ( <i>Harmonia axyridis</i> ).....	48
	2.3.1 Založení experimentu.....	48
	2.3.2 Průběh počítání vajíček a odběru hemolymfy.....	49
	2.3.3 Analýza dat.....	49
	2.3.4 Výsledky .....	51
3	Diskuse.....	52
4	Závěr .....	56

5	Přehled literatury a použitých zdrojů .....	57
6	Přílohy .....	65

# 1 Úvod

## 1.1 Predátor a kořist

Pojem přirozený nepřítel je často používán k označení organismu, který čerpá výživu z jiného organismu, jako je například predátor, parazitoid, parazit nebo patogen. Tento pojem lze chápat i v širším slova smyslu, tedy že se jedná o organismy, které zabíjejí, snižují reprodukční potenciál nebo jiným způsobem snižují početnost jiných organismů (Hodek et al. 2012).

Predace je primární hnací silou v evoluci hmyzu, nicméně i environmentální podmínky během vývoje hmyzu mohou ovlivnit fenotyp dospělců (Grill et Moore 1998, Boeve et al. 2013). Například nedospělí jedinci, mající relativně nízkou kvalitu či kvantitu jídla, s velkou pravděpodobností budou mít sníženou velikost těla ve stádiu dospělce. Efekty environmentálních podmínek v jakékoli životní fázi hmyzu mohou kaskádovat i do následujících stádií (Grill et Moore 1998).

Velká velikost těla dospělce úzce souvisí s jeho vyšším reprodukčním potenciálem. Dosažení větší tělesné velikosti však v sobě může nést riziko vyšší úmrtnosti během larválního vývoje. Dorůst do větší velikosti znamená potřebu zvýšit příjem potravy a zvýšená aktivita při shánění potravy je považována za nebezpečnou, protože je pravděpodobné, že kořist bude snáze detekována predátorem. Růst do větší velikosti dále typicky vyžaduje prodloužení období juvenilního růstu a vystavuje tak jedince predátorům po delší dobu (Berger et al. 2006). Řada mechanismů může pozměňovat reakci kořisti na predační riziko. Kořist musí řešit trade – off mezi predačním rizikem a rizikem hladovění. Existuje několik teorií, jak se v takové situaci mají živočichové chovat. Lze sem zařadit například následující hypotézy: (i) Behaviorální hypotéza predačního rizika (Behavioural hypothesis for predation risk effects) říká, že kořist dospěje do menší velikosti a bude se snažit o rovnováhu mezi reprodukcí a růstem. Studie na motýlicích a pulcích jako kořisti potvrzuje, že chemické signály indikující přítomnost predátorů mění chování kořisti, jako je například její pohybová aktivita. Snížená aktivita vede ke sníženému příjmu potravy a snížený příjem potravy snižuje velikost při dospívání a často je to spojeno i se zpožděným dospíváním. Ovšem v tomto případě predátor není velikostně selektivní. Na druhé straně je (ii) fyziologická hypotéza (Physiological hypothesis), kdy je predátor velikostně selektivní a kořist, která vykazuje prostřední růst (není

dostatečně velká ani malá), nemusí čelit časovým omezením během juvenilního vývoje. Teorie je často spojována s argumenty o změnách během životní historie, které jsou řízeny přímo chemickými podněty, spíše než by byly zprostředkovány chováním či snížením příjmu potravy. Dle toho, zda predátor upřednostňuje malou či velkou kořist (pokud je velikostně selektivní) lze předpovědět vzor chování kořisti. Výběr malé kořisti predátorem by měl upřednostňovat investice do růstu před reprodukcí, což má za následek pozdější zralost ve větší velikosti. Výběr velké kořisti predátorem by měl upřednostňovat investice do reprodukce před růstem, což má za následek předčasnou pohlavní zralost při malé velikosti těla (Beckerman et al. 2007).

### **1.1.1 Obrana proti predátorovi**

Selektivní tlak predátorů je natolik rozsáhlý, že strategie vedoucí k redukcí mortality způsobené predátory jsou dobře rozvinuté, ale přitom velmi rozmanité napříč taxony. Specifické obranné strategie se mění během ontogeneze a vztahují se k přizpůsobení fenologie, chování, morfologie i fyziologie hmyzu (Higginson et Ruxton 2009, Boeve et al. 2013). Hmyzí obranné strategie proti predátorům lze rozdělit do tří kategorií: (i) vlastnosti, které snižují pravděpodobnost setkání s predátorem, (ii) behaviorální a morfologická obrana, (iii) fyziologická obrana (chemická obrana, Greeney et al. 2012). Primární obrana je taková, která se snaží o snížení pravděpodobnosti setkání s predátorem. Sekundární obranou se poté chápe zvýšená pravděpodobnost přežití kořisti po setkání s predátorem. Obrana související s barvou (maskování či aposematismus) je obranou využívanou proti vizuálně se orientujícím predátorům (např. ptáci, vosy či kudlanky). Morfologická a behaviorální obrana je obranou, která je přizpůsobena i pro nevizuálně se orientující predátory, jako jsou například predátoři bezobratlých (mravenci; Greeney et al. 2012, Sendoya et Oliveira 2017).

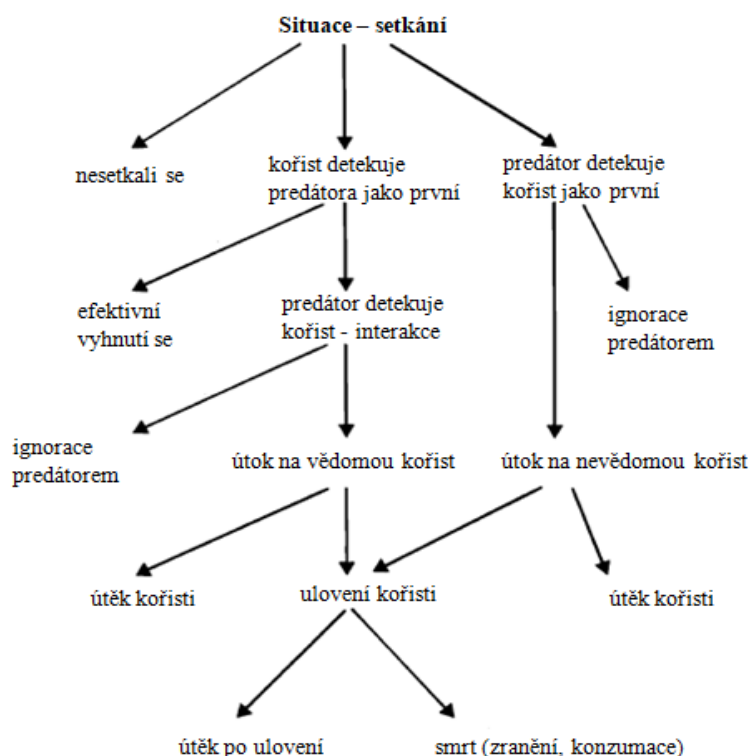
### **1.1.2 Behaviorální obrana**

Behaviorální obranné strategie jsou všudypřítomné a velmi různorodé. Většina druhů vykazuje větší množství různých typů obranného chování, což můžeme vidět například u housenek druhu *Urbanus esmeraldus* patřících do čeledi soumráčníkovití (Hesperiidae). Housenky si staví architektonicky náročné úkryty a upravují rostlinné pletivo, zejména pak barvu, tak aby jejich úkryt byl více kryptický a fekální pelety

hází dále od těla. Odhozením fekálních pelet dojde ke snížení pravděpodobnosti jejich detekce predátorem, který předpokládá, že kořist bude v blízkosti pelet (Greeney et al. 2012, Moraes et al. 2012).

Behaviorální obrana může být vyhýbavá nebo agresivní – kousání, chrlení toxické tekutiny či produkce odpuzujících chemických látek (Greeney et al. 2012). Většina slunéčkovitých brouků (Coleoptera: Coccinellidae) má také určitou formu behaviorální obrany proti predátorovi. Pro mobilní stádia, jako jsou larvy, by první reakcí na vnímanou hrozbu mohl být útěk (Obrázek č. 1). Další obranné taktiky zahrnují pád z hostitelské rostliny, jestliže se potencionální dravec přibližuje, případně přesun na nové místo (Ware et Majerus 2008).

Blaustein (1999) a Rieger et al. (2004) předpokládají, že druhy, které postrádají individuální ochranu nebo únikové mechanismy v larválních stádiích jsou nuceny obsadit habitaty bez predátorů. Vodní hmyz a obojživelníci si vyvinuli vysoce specifické behaviorální reakce na chemické stopy přítomnosti predátora. V experimentu Andrade et al. (2017), zkoumali obranné reakce druhů z čeledi komárovití (Culicidae) *Culex mollis*, *Limatus durhami* a *Aedes albopictus* při kladení vajíček v prostředí se stopami přítomnosti predátora *Toxorhynchites theobaldi* (Culicidae). Samice *Culex mollis* se vyhýbala kladení vajíček do vody se stopy predátora, což dále naznačuje, že dospělé samice jsou schopny detekovat chemické látky produkované predátory. Naproti tomu samice druhů *Limatus durhami* a *Aedes albopictus* nevykazovaly žádnou reakci na tytéž stopy predátora.



Obrázek č. 1: Průběh možného setkání kořist – predátor. Zdroj: Lima et Dill 1990

Behaviorální obrana snižuje pravděpodobnost napadení či detekce predátorem, ovšem za určitou cenu. Změna chování, která snižuje pravděpodobnost napadení predátorem, obvykle přichází za cenu ztracených příležitostí ke krmení se, nalezení vhodného sexuálního partnera či vyhnutí se jiným predátorům. To vše může mít velké důsledky pro celkový reprodukční úspěch (Andrade et al. 2017).

### 1.1.3 Morfologická obrana

Morfologické charakteristiky mohou fungovat jako obrana, ať už se jedná o kutikulární trny, chloupky, zesílený exoskelet, krovky či jasné zbarvení (aposematické) či vizuálně kryptické (Greeney et al. 2012, Hodek et al. 2012, Uemura et al. 2017). Tuhý či zhuštěný exoskelet, může zabránit úspěšnému útoku predátora na housenky některých druhů motýlů. Například u rodu *Menander* jsou housenky dorso-ventrálně zploštělé. Toto zploštění umožňuje housenkám těsně se přitisknout k povrchu listu a chránit tak exponované přívěsky, které by jinak mohly být napadeny (Greeney et al. 2012).

Larvy rodu *Scymnus* patřící do čeledi slunéčkovití (Coccinellidae) jsou pokryty voskovým povlakem, který poskytuje účinnou obranu proti mravencům nebo larvám pestřenek (Ware et Majerus 2008). Mnoho druhů hmyzu, zejména pak larvy motýlů

využívají krypse. Krypse umožňuje jedinci splynout s okolím, ve kterém se vyskytují, díky čemuž se sníží pravděpodobnost odhalení a detekce predátorem (Greeney et al. 2012).

Aposematické (varovné) zbarvení, jak již bylo řečeno výše, je důležité pro vizuálně se orientující predátory (Greeney et al. 2012). Funkcí aposematického zbarvení je upozornovat potencionální predátory, že nositel je nepoživatelný, toxický nebo živinově chudý (Hodek et al. 2012). Predátor se naučí rozeznávat barevný vzor (jasný a nápadný) s účinky toxinu a začne se takovému hmyzu vyhýbat. Větší velikost těla, může zvýšit varovný efekt, což kořist činí ještě méně přijatelnou pro predátora (Sillén - Tullberg et Bryant 1983, Marples et al. 1994, Rimmel et Tammaru 2009). Kromě barevného vzoru mohou mít náznaky i formu zvuku, vůně nebo chuti. Chuť a vzhled mohou být důležité pro ptáky, kteří se postupně naučí vyhýbat toxické kořisti (Marples et al. 1994).

Dospělci mnoha druhů slunéčkovitých brouků jsou nápadně zbarveni, často s kontrastními červenými, černými nebo žlutými vzory na jejich krovkách. I jejich larvy mohou být na povrchu aposematicky zbarveny pomocí tmavých a světlých ploch. Nejen varovné zbarvení, ale také vzor a obecný vzhled slunéčka (oválný a konvexní tvar těla) mohou být signálem kořisti o neprospěšnosti pro opticky orientované predátory z řad obratlovců, jako je například sýkora koňadra (*Parus major*; Hodek et al. 2012).

Ve studii Rimmel et Tammaru (2009) chtěli objasnit vztah mezi velikostí, krypsí a aposematickým zbarvením. Jako kořist byly použity uměle vyrobené larvy, které napodobovaly larvy motýlů. Napodobeniny byly různých velikostí a barev. Byly zbarvené do zelena (krypse) nebo černě a žlutě (nápadně – aposematicky). Výsledky ukázaly, že predace sýkorou koňadrou (*Parus major*) byla závislá na velikosti umělých larev jak u kryptických, tak i u nápadně zbarvených umělých larev. Z hlediska denní úmrtnosti byly největší kryptické larvy napadeny 1,5 krát častěji než menší larvy a největší nápadně zbarvené larvy asi 3 krát častěji než ty nejmenší. Nápadně zbarvené larvy byly napadány častěji než larvy kryptické. Z výsledků této studie vyplývá, že aposematické zbarvení nemusí vždy zajišťovat plnou ochranu.



U mnoha aposematických druhů se vyvinul agregovaný způsob života. Jednou z možných výhod seskupení výstražně zbarvených druhů je, že činí aposematické signály efektivnější při odrazování predátorů (Gamberale et Tullberg 1998). Gamberale et Tullberg (1998) použili domestikovaná kuřata (*Gallus gallus domestica*) a aposematicky zbarvené larvy ploštičky tolitové (*Tropidothorax leucopterus*). Výsledky ukázaly, že pravděpodobnost útoku klesala se zvyšující se velikostí skupin ploštiček. Pro účinnost aposematického zbarvení jsou důležité 3 vlastnosti: (i) vypadat co nejvíce odlišně od krypticky zbarvené kořisti, kterou predátoři loví nejčastěji, (ii) být kontrastní proti pozadí, což slouží jako ochrana před napadením predátorem (iii) využívat barvy (intenzity a odstíny), které jsou samy o sobě pro predátory odstrašující bez ohledu na pozadí (lépe funguje v různých podmínkách prostředí; Gamberale et Tullberg 1998).

Pro zbarvení druhů jsou důležité karotenoidy, které patří do skupiny tetraterpenoidů. Zbarvení způsobené karotenoidy poskytuje informaci pro predátora o jedovatosti nositele, u hmyzu se jedná nejčastěji o mimodruhovou signalizaci. Karotenoidy jsou důležitým pigmentem, který živočichové musí získat ze své stravy. Napomáhají zbarvení od žlutého po červené a hrají i důležitou roli jako antioxidanty nebo imunostimulanty. Karotenoidní zbarvení a tím i signál o „poctivosti“ bývá často používán k výběru partnera. Jasně zbarvení jedinci signalizují potencionálnímu partnerovi své silné schopnosti získat potravu, dobrou kondici a zdravý imunitní systém (Bezzerrides et al. 2007, Nedvěd 2008).

Bezzerrides et al. (2007) zjišťovali pro slunéčko východní (*Harmonia axyridis*), zda je zbarvení krovek způsobeno pigmenty karotenoidů anebo pigmenty pterinovými, které mohou za červené, oranžové nebo žluté zbarvení u některých druhů hmyzu, obojživelníků nebo ptáků. Dále chtěli zjistit, zda existuje vztah mezi zbarvením a obsahem obranných sloučenin v těle. U obou pohlaví slunéčka východního zjistili, že červenější slunéčka ukládají větší množství karotenoidů do svých krovek než světlejší jedinci. Samci měli v průměru vyšší procento svých krovek pokrytých červeným zbarvením oproti samicím. Ovšem černé skvrny na krovkách samic byly signifikantně tmavší než skvrny u samců. Z hlediska obsahu alkaloidů zjistili, že jedinci s více červenou (méně černou) barvou na krovkách byli bohatší na alkaloidy, tento vztah byl zvláště silný u samic. Výsledky naznačují, že barva krovek, způsobená karotenoidy, má potenciál odhalit informaci o chemické

obraně pro partnery nebo predátory. Zbarvení by se tedy dalo také použít jako indikátor chutnosti (Greeney et al. 2012).

#### **1.1.4 Chemická obrana**

Chemická obrana proti predátorům je v živočišné říši velmi rozšířená. Vyvinula se u mnoha terestrických členovců, mořských bezobratlých, ryb a obojživelníků. Nejběžnější je chemická obrana u býložravého hmyzu, zejména pak u řádu motýli (*Lepidoptera*), brouci (*Coleoptera*) a blanokřídlí (*Hymenoptera*; Higginson et al. 2011).

Obranné toxiny se používají k odvrácení útoků nepřátel, jako jsou například predátoři a paraziti (Speed et al. 2012). Mnoho druhů hmyzu disponuje nechutnými, toxickými chemickými látkami, které snižují pravděpodobnost útoku predátory. Predátoři konzumují různorodou kořist a musí se často vyrovnat s částí její chemické obrany. Z tohoto důvodu je metabolismus predátora přizpůsoben pro řešení širokého spektra potencionálních toxinů kořisti (Skelhorn et Rowe 2006, Katsanis et al. 2017).

Hmyz svou chemickou obranu může propagovat pomocí aposematického zbarvení. Jedním z důležitých způsobů, jak může hmyz zlepšit rychlost, s jakou predátoři detekují jejich chemické látky je pomocí obranné sekrece. Mnoho aposematického hmyzu, když je napaden potencionálním predátorem vylučuje chemické látky ven z těla. Objem vylučovaných obranných chemikálií se liší jak v rámci druhů, tak i mezi jednotlivými druhy a může záviset také na míře napadení predátorem (Skelhorn et Rowe 2006).

Někdy mohou být morfologické znaky spojeny s chemickými, jako je tomu u larev druhu *Ochrogaster lunifer* (*Lepidoptera*: *Thaumetopoeidae*). Tyto larvy si vyvinuly efektivní obranné strategie ve formě chemických složek v chlupech, štětinách a exoskeletu. Díky této obraně jsou chráněny před dravým mravencem *Rhytidoponera metallica*. Chemické napuštěné štětiny způsobují při poranění zdravotní komplikace i člověku (např. kopřivku; Uemura et al. 2017).

#### **1.2 Rozmanitost chemické obrany**

Chemické látky, nezávisle na taxonu, hrají významnou roli v mezidruhových vztazích, a jsou to stejné látky, jako ty, které organismy využívají například k trávení či vylučování se nazývají sekundární metabolity. Sekundární metabolity jsou odvozeny od metabolitů, které se účastní primárních procesů. U hmyzu je mnoho

obránných sekrecí odvozených ze stejných aminokyselin, které jsou používány ke konstrukci proteinů (mezi ně patří např. chinony odvozené od tyrosinu, které jsou u mnoha brouků či švábů, nebo kyselina mravenčí u mravenců odvozená od serinu). Přítomnost sekundárních metabolitů v organismu je obecně charakterizována specializovanou syntézou, transportem anebo skladováním. Sekundární chemické látky lze považovat za obranné pouze tehdy, když chrání své producenty před životohrožujícími aktivitami jiného organismu. Obranná látka je látka vyráběna s cílem snížit riziko ublížení na zdraví (Berenbaum 1995). Účinky obrany mohou záviset na charakteristických obranných látkách. Obranné sloučeniny jsou často klasifikované jako toxické (skutečně jedovaté pro predátory), obecně neškodné těkavé repelenty nebo jako odstrašující. Toxické sloučeniny se obvykle nachází v těle kořisti, zatímco obecně neškodné sloučeniny jsou vylučovány žlázami a dráždí chemické receptory predátorů (Zvereva et Kozlov 2016).

Chemické látky používané hmyzem mohou být získávány de novo (autogenně) nebo jsou získávány z potravy a uzavřeny v tkáních hmyzu (Stocks 2008, Mason et Bowers 2017). Způsob, kterým hmyz prezentuje svoje obranné sloučeniny je různorodý. Aby chemická obrana dobře fungovala, musí hmyz předložit potencionálnímu útočníkovi buď toxickou chemickou látku, nebo důkaz že obsahuje toxin. V ideálním případě to proběhne ještě před tím, než je hmyz zraněn nebo zabit (Stocks 2008). Chemické látky mohou být vylučovány ze žláz do vnějšího prostředí jako odpověď na útok predátora (externalizovaná ochrana). Cílem těchto látek je predátora odradit od útoku nebo útok narušit.

Další možností může být, že se predátor musí setkat s obrannými sloučeninami v těle kořisti (tzn., že kořist nevyklučuje chemické látky do vnějšího prostředí; internalizovaná ochrana). V tomto případě ovlivňuje lokalizace sloučenin v těle hmyzu jak pravděpodobnost, že se s predátorem potkají, tak i to, že kořist přežije útok (Mason et Bowers 2017).

Brower et Glazier (1975) testovali hypotézu, o rozložení kardenolidů v těle monarchy stěhovavého (*Danaus plexippus*). Tato hypotéza tvrdí, že rozložení odráží adaptivní strategie obrany proti predátorovi. Předpokládali, že kardenolidy by měly být koncentrovány v křídlech motýla silněji než v jakékoliv jiné části těla. Tento předpoklad byl založen na následující logice: U dospělých motýlů jsou chemické látky umístěny v kutikule křídel, tedy v místě, za které je chytají ptáci (Higginson et

Ruxton 2009). Když ptáci při lovu motýlů ochutnají hořké sloučeniny v křídlech, tak motýla pustí bez smrtelného zranění. V souladu s touto hypotézou obsahovala křídla monarchů téměř trojnásobek koncentrace těchto hořkých látek (Brower et Glazier, 1975).

Jaká je distribuce obranných sloučenin známých jako iridoidní glykosidy (IG) v tělních částech zkoumali Mason et Bowers (2017) na dvou druzích motýlů, *Euphydryas anicia* a *Euphydryas phaeton*, patřících do čeledi babočkovití (Nymphalidae). Nejvyšší koncentrace IG byla nalezena na hlavě obou druhů, i když absolutní hodnoty byly malé. Pravděpodobně proto, že i hlavy těchto jedinců jsou malé. *Euphydryas anicia* měl relativně vysoké koncentrace IG ve svém zadečku a nízké koncentrace IG ve svých křídlech oproti *Euphydryas phaeton*, který je měl v křídlech vysoké. Studie ukázala, že lokalizace chemické obrany se může lišit a to i mezi úzce příbuznými druhy.

### 1.2.1 Ochrana před predací uvnitř potravní gildy

Jak z hlediska predace uvnitř gildy, tak i z hlediska kanibalismu se zdá být konzumace vajíček slunéček výhodná, jelikož dochází ke snížení konkurence a zároveň slouží jako zdroj potravy. Na druhé straně kořist ze stejné gildy není pro slunéčka příliš kvalitním zdrojem potravy. I proto se larvy slunéček uchylují k této predaci pouze, pokud jim chybí jejich primární zdroj potravy například červci či mšice (Hemptinne et al. 2000, Sato et al. 2009).

Každý druh slunéčka preferuje určitý biotop a vykazuje různé stupně překrývání s ostatními druhy. Tyto druhy, jejichž larvy a vajíčka se pravidelně vyskytují spolu, jsou dobře chráněny pomocí povrchových chemikálií, které jim pomohou rozpoznat jiné druhy slunéček. Pokud jsou mšice omezeny, konzumují hladové larvy i kořist ze stejné gildy, což naznačuje, že povrchová ochrana je neúčinným prostředkem v takových situacích (Hemptinne et al. 2000, Sato et al. 2009).

Hemptinne et al. (2000) provedli experiment, kde použili slunéčko dvojtečné (*Adalia bipunctata*) a slunéčko sedmítečné (*Coccinella septempunctata*) a nabízeli jim vajíčka jak stejného, tak druhého druhu. Hladové larvy slunéčka dvojtečného odmítaly jíst vajíčka slunéčka sedmítečného a zdráhavě i své. Slunéčko sedmítečné jedlo své vlastní vajíčka a vyhýbalo se vajíčkám slunéčka dvojtečného, ale pouze

dokud nebylo opravdu hladové. Vajíčka slunéčka dvojtečného jsou chráněna před kanibalismem a predací ze stejné gildy, zatímco vajíčka slunéčka sedmitečného jsou silně chráněna proti predaci rámci stejné gildy, ale již ne tak dobře proti kanibalismu.

Pro lepší pochopení chemické obrany a rizika predace u rodu *Calvia* (Coleoptera: Coccinellidae) testovali Katsanis et al. (2017) chutnost vajíček a jejich náchylnost k predaci larvami slunéčka východního (*Harmonia axyridis*). V umělých podmínkách odchovali vajíčka *Calvia quatuordecimguttata* a *Calvia decemguttata* a také larvy a vajíčka slunéčka východního. Neomytá vajíčka *Calvia quatuordecimguttata* byla méně náchylná k predaci a méně chutná než vajíčka zbylých dvou druhů. Neomytá i omytá vajíčka slunéčka východního byly pro larvy téhož druhu velmi chutná. Vajíčka *Calvia decemguttata* byla nejnáchylnější na predaci novorozenými larvami slunéčka východního. Analýza povrchových chemikálií u vajíček obou druhů rodu *Calvia* ukázala, že množství obranných sloučenin je mnohem vyšší u druhu *Calvia quatuordecimguttata*.

### 1.2.2. Externalizovaná obrana

Velmi efektivní vnější chemickou obranou je vyvrhování (zvracení), které je běžné zejména u larev motýlů (Lepidoptera) a širopasých blanokřídlých (Hymenoptera: Symphyta). Při vyvrhování dochází k vyvržení částečně stráveného materiálu, který obsahuje obranné sloučeniny, které jsou uschovány ve specializovaném divertikulárním střevě. Vyvrhování je rychlou reakcí na kutikulární stimulaci, která odrazuje predátory od konzumace a je využita před nebo v raných fázích útoku. (Higginson et Ruxton 2009, Higginson et al. 2011).

Prskavci (Brachininae) je podčeleď brouků z čeledi střevlíkovití (Carabidae), též nazývaná jako „bombardérští“ brouci. Tito brouci mají pozoruhodnou schopnost výbušně vypouštět horké chinony ze žlázového otvoru v blízkosti jejich zadečku. Tento odvozený systém představuje extrémní specializaci jednoduchých spárovaných pygidiálních obranných žláz. Pygidiální obranné žlázy se skládají ze sekrečních buněk, sběrného kanálku a zásobní komory. Systém obranných žláz těchto brouků je jedinečný v tom, že má druhou vysoce sklerotizovanou komoru (tzv. reakční komora), která je od zásobní komory oddělena chlopní. Reakční komora je spojena se sekrečními buňkami, které produkují katalázy a peroxidázy, které jsou v této komoře uloženy. Když jsou brouci obtěžováni, tak pomocí svalů, které obklopují

zásobní komoru, může dojít k přesunu hydrochinnu a peroxidu vodíku (uložených v zásobní komoře) přes chlopeň do reakční komory. V reakční komoře dojde k smíchání těchto látek s katalázou a peroxidázou. Výsledkem tohoto procesu je výbušná exotermická reakce, která produkuje benzochinony, volný kyslík a vodu ohřátou na 100 °C a celý mechanismus je ještě doprovázen charakteristickým praskavým zvukem. Tato obrana je známa ještě u jedné podčeledi z čeledi střevlíkovitých brouků (Carabidae: Paussinae). Obě podčeledi mají velmi podobný systém, avšak fylogenetický vztah mezi nimi není jasný (Di Giulio et al. 2015).

Další obranný mechanismus se nazývá reflexní krvácení a společně s toxicitou v krvi to může být velmi efektivní forma obrany. Reflexní krvácení by se dalo považovat za fyziologický a behaviorální jev. K této obraně dochází při rozrušení nebo napadení hmyzu. Hmyz začne uvolňovat hemolymfu, která je pro predátora buď chemicky nebo mechanicky odpuzující, skrz specializované kutikulární struktury nebo trhliny (Karystinou et al. 2004, Stocks 2008, Bateman et Fleming 2009). Tím dochází ke snížení pravděpodobnosti napadení kořisti predátorem a zvyšuje se pravděpodobnost přežití kořisti, zvláště je-li reflexní krvácení použito v kombinaci s jinou obranou jako je pach či varovné zbarvení (Grill et Moore 1998). Uvolněná hemolymfa může mít více obranných rolí. Může působit jako fyzický, mechanický (lepivý) nebo chemický odstrašující prostředek, jehož účinek může být posilován pachem (Peck 2000).

Mezi cykasy patřící do čeledi zamiovité (Zamiaceae) a aposematicky zbarvenými brouky podčeledi Aulacoscelinae existuje starodávný vztah. Cykasorosty obsahují toxické azoxyglykosidy (AZG), což jsou obranné sloučeniny proti herbivorům, které mají společný aglykon a methylazoxymethanol. Dospělci brouků vykazují mechanismus reflexního krvácení. Při vyrušení uvolní kapku hemolymfy přes kolenní klouby. Barva hemolymfy se pohybuje od čiré po žlutou s pronikavým zápachem. Stopové množství AZG bylo detekováno u dospělců, v hlavě, hrudníku, zadečku, nohách. Přítomnost vyšší koncentrace AZG v reflexní hemolymfě naznačuje, že tyto sloučeniny jsou přijímány do hemolymfy přímo ze střeva pomocí transportního mechanismu (Prado et al. 2011).

### 1.2.3 Reflexní krvácení

Obranné využití krve (hemolymfy) hmyzu bylo objeveno u 35 čeledí z 9 řádů (Peck 2000): brouci (Coleoptera), dvoukřídli (Diptera), ploštice (Heteroptera), stejnokřídli (Homoptera), blanokřídli (Hymenoptera), motýli (Lepidoptera), rovnokřídli (Orthoptera), strašilky (Phasmatodea), pošvatky (Plecoptera). Tyto skupiny mohou krvácet z různých míst a lze najít i vnitrodruhové rozdíly mezi samci a samicemi.

Způsob uvolnění hemolymfy se liší i mezi samci a samicemi například u světlušky *Pyrocoelia pectoralis*, čímž se zabýval Fu et al. (2006). Pokud byli samci světlušky vyrušeni, uvolňovali tekutinu podél krovek, z okrajů štítu a kolem báze tykadel. Naproti tomu samice uvolňovaly tekutinu pouze z okrajů štítu a kolem báze tykadel. Obě pohlaví mohla občas vypouštět tekutinu také z konečníku. Uvolněná tekutina byla lepkavá, světlé nebo mléčné barvy a vždy byla uvolněná z místa, které bylo nejbližší místu stimulace. Hemolymfa byla bohatá na stejné typy hemocytů (imunitní buňky), ať už byla uvolněná z jakéhokoliv místa. Hlavičku při stimulaci schovávaly světlušky pod štít a začaly i lehce svítit.

Hemocyty zprostředkovávají mimo jiné imunitní odpověď hostitele vůči cizímu materiálu (parazit, parazitoid atd.). Mohou pomáhat například při zapouzdření vajíček parazitoidů uvnitř těla hostitele. Buňky pokryjí vajíčko a vytvoří kapsli (pouzdro), které způsobí smrt parazitoida – nejčastěji udušením (Firlej et al. 2012). U slunéčka vychodního (*Harmonia axyridis*) bylo nalezeno 5 typů hemocytů (Firlej et al. 2012). Jednalo se o plazmocyty, granulární hemocyty I a II, oenocytoidy a kulovité buňky. Poslední dva typy buněk se nepodílejí na zapouzdřování.

Experimentální práce ukázaly, že dva druhy pošvatek *Pteronarcys proteus* a *Peltoperla maria* při rozrušení krvácejí z intersegmentální membrány kyčelních a kolenních kloubů. Uvolněná hemolymfa je žlutooranžová, obsahuje hemocyty, a rychle koaluguje při kontaktu s útočníkem. U těchto druhů může být hemolymfa násilně vyloučena tak, že je slyšet praskající zvuk a rozprašující tekutina může dosáhnout až do vzdálenosti 25 cm (Stocks 2008).

Reflexní krvácení se také vyskytuje u rovnokřídých, kde je ale několik odlišností od ostatních druhů hmyzu. *Dictyophora spumans* a *Phymateus leprosus* patří do čeledi Pyrgomorphidae, uvolňují hemolymfu jako pěnu, která obsahuje

srdeční glykosidy. *Eugaster* spp. z čeledi kobylkovití (Tettigoniidae) například hemolymfu vyfoukne z „trysek“ nebo švů pojivové tkáně, kterou má u základu každé nohy. Druh kobylky *Enyaliopsis nyala* může hemolymfu stříkat až do vzdálenosti 25 cm (Bateman et Fleming 2009).

Nedobrovolné reflexní krvácení ukazuje motýl *Heliconius himera* z čeledi babočkovití (Nymphalidae). Jedná se o druh motýla, který je nejčastěji nakupován na motýlích výstavách. V roce 2002 začaly jeho skleníkové kolonie vykazovat známky onemocnění, které zdecimovalo celou kolonii. Jednalo se o virovou infekci kožního epitelu, která způsobila oslabení špiček trnů u larev, což vedlo k reflexnímu krvácení. Pokud došlo k náhodnému kontaktu nemocných larev s kleštěmi, začaly ihned reflexně krváčet. U zdravých larev vůbec při takovém náhodném kontaktu nedocházelo k reflexnímu krvácení. Krom spouštění reflexního krvácení docházelo i ke zpomalení pohybu larev a krmení se larev (zejména v závěrečné fázi onemocnění). Pokud se housenky dožily fáze kuklení, tak se v jeho průběhu vysušily a zčernaly. Původce choroby postihující tento druh motýla zatím není přesně znám (Hay-Roe et al. 2003).

#### **1.2.4 Reflexní krvácení u slunéček**

Reflexní hemolymfa slunéčkovitých brouků (Coccinellidae) silně zapáchá, je hořká a u většiny druhů obsahuje toxické alkaloidy, které napomáhají obraně proti predátorům. U slunéčkovitých bylo indentifikováno přes 50 různých alkaloidů. Tyto alkaloidy jsou v hemolymfě slunéček a díky tomu jsou distribuovány po celém jejich těle. Reflexní krvácení je běžně používané dospělci u mnoha druhů, kteří uvolňují tekutinu (hemolymfu) z kolenních kloubů. Hemolymfa může mít barvu od bílé (průhledné) až po červenou. (Hodek et al. 2012). Larvy mohou uvolňovat hemolymfu ze zadečkových článků na hřbetní straně. Hemolymfa různých druhů slunéček vzbuzuje různé odezvy útočníků a škodlivost jejích účinků pro predátory se liší. To je dáno rozdíly ve složení alkaloidů (Schroder et al 1998, Hodek et al. 2012). Různé druhy slunéček obsahují různé druhy alkaloidů, ale příbuzné druhy často obsahují podobné druhy (Laurent et al. 2003, Haulotte et al. 2012). Obecně existuje vždy jen jeden hlavní alkaloid: Například u rodu *Adalia* je hlavním alkaloidem adalin, coccinellin je hlavní alkaloid u rodu *Coccinella* a harmonin u rodu *Harmonia* (Schroder et al. 1998, Patočka 2004). Reflexní hemolymfa také obsahuje pyraziny, které se podílejí na obraně slunéčka. Na rozdíl od alkaloidů, pyraziny jsou těkavé,



takže mohou být detekovány predátory. Tato sloučenina je zodpovědná za zápach, který krom aposematického zbarvení působí jako signál o nevhodnosti slunéčka jako potravy (Hodek et al. 2012).

Hnízda sýkory modřinky (*Cyanistes caeruleus*) trpí vážnou mortalitou, pokud potrava pro mláďata obsahuje slunéčko sedmitečné (*Coccinella septempunctata*). Jestliže potrava obsahuje slunéčko dvojtečné (*Adalia bipunctata*) není pozorován žádný negativní účinek. Rozdíl mezi reakcí sýkory modřinky byl způsoben rozdílným hlavním alkaloidem mezi sluněčkem sedmitečným (coccinellin) a sluněčkem dvojtečným (adalin; Hodek et al. 2012).

Holloway et al. (1991) se zabývali reflexním krvácením u slunéčka sedmitečného (*Coccinella septempunctata*). Zjistili, že slunéčka byla schopna uvolňovat hemolymfu ze všech šesti nohou, respektive z jejich kolenních kloubů. Hemolymfa se často ukazovala jen z nohy, která byla právě stimulována. Vzhledem k tomu, že zásoby hemolymfy se mohou vyčerpat, v průběhu několika odebrání se barva hemolymfy většinou změnila z citronové či oranžové na průsvitnější. Coccinellin byl přítomen v celém těle, ale nejkoncentrovanější byl v hemolymfě. Samice produkovaly o 28 % více obranné hemolymfy než samci, což bylo způsobeno odlišnou tělesnou hmotností mezi pohlavími. Množství produkované hemolymfy pozitivně korelovalo s čerstvou tělesnou hmotností. Z pohledu samic nebyl zjištěn žádný vliv mezi počty vajíček a množstvím produkované hemolymfy nebo množstvím coccinellinu. Zajímavé je, že některá slunéčka s parazity (*Dinocampus coccinellae*) produkovala pozoruhodně velké množství hemolymfy před imobilizací parazitem. Tento účinek mohl být ovlivněn parazitem, který zřejmě způsobil rozsáhlé vnitřní poškození. Slunéčka, která byla stimulována ihned po zimní hibernaci, produkovala velmi malé množství hemolymfy (Holloway et al. 1991). Stimulací po hibernaci se zabývali také de Jong et al. (1991), kteří pro výzkum použili slunéčko dvojtečné (*Adalia bipunctata*). Pokud byla slunéčka stimulována ihned po hibernaci, neprodukovala velké množství hemolymfy, ale hemolymfa byla velmi koncentrovaná z hlediska adalinu. Množství hemolymfy se zvýšilo, když byla slunéčka napita a nakrmena. I zde zjistili, že samice produkovaly více hemolymfy než samci, jelikož jsou větší. Nebyl také zjištěn žádný vliv mezi počtem vajíček a množstvím hemolymfy nebo množstvím adalinu. Je pravděpodobné, že nejen výroba obranných látek, ale i zimní hibernace je energeticky velmi náročná. Zdá se, že fyziologická

flexibilita umožňuje hibernujícím slunéčkům resorbovat a metabolizovat tekutinu vyrobenou během předchozího podzimu, což se zdá být selektivně výhodnou volbou. Pokud by došlo k resorpci, může coccinellin popřípadě adalin zůstat ve žlázách a následně se velmi koncentrovat. Výsledkem by byla výroba velmi malé, ale vysoce koncentrované obrany (Holloway et al. 1991).

Sloggett (2010) zjistil, že jeden druh pavouka je přizpůsoben i na velmi chemicky bráněné slunéčko. Jedná se o křížáka obecného (*Araneus diadematus*), který snadno pozřel jak původní slunéčko sedmítečné (*Coccinella septempunctata*), tak i exotické slunéčko východní. Na křížákovi nebyly pozorovány žádné negativní účinky při a ani po konzumaci. Tento predátor generalista má velmi silné detoxikační mechanismy proti různé chemické obraně kořisti, které byly účinné i proti nové obranné chemii, jež představovalo slunéčko východní. Silná chemická obrana u slunéčka východního (*Harmonia axyridis*) způsobuje, že je méně zranitelné ze strany přirozených nepřátel v nové oblasti, kterou kolonizuje.

### 1.2.5 Alergická reakce

Na počátku roku 1916 bylo z Asie do Spojených států dovezeno slunéčko východní (*Harmonia axyridis*). První „divoká“ populace slunéčka byla hlášena z Louisiany v roce 1988. Slunéčko východní je dravý nepřítel zemědělských škůdců, který začal vytvářet početné populace a rozšiřovat se napříč severní Amerikou. Následně se stal i škůdcem pro majitele domů a vinařské podniky (Goetz 2008). Na podzim, když dochází ke zkracování dnů, vyhledávají slunéčka vhodné místo k hibernaci a dochází k jejich agregaci. Nejčastějšími místy k hibernaci jsou domy (preferují světlé budovy), respektive jejich podkroví, stěny nebo další chráněné prostory. V horských oblastech dospělci migrují do vyšších nadmořských výšek. Zde pak přezimují v mělkých jeskynních, štěrbinách nebo ve skalních prasklinách (Sloggett et al. 2011).

Při pohybu za sebou slunéčka mohou zanechávat nažloutlý „prach“, který je částečně výsledkem jejich reflexního krvácení. Reflexní krvácení přivede hemolymfu a její alergeny na povrch. Hlavní alkaloid obsažený v reflexním krvácení je 2 – isopropyl 3 – methoxy pyrazin a harmonin. Alkaloid 2 – isopropyl 3 – methoxy pyrazin obsahují i další druhy hmyzu, ale ne v takovém množství jako slunéčko východní. Tento alkaloid je také možné najít potravinách jako například

čedar, paprika, káva, kterým poskytuje zemitou nebo praženou vůni. Hemolymfa sluněčka, je tedy primární zdroj alergenu (Goetz 2008).

Od 90. let 20. století začaly být hlášeny první alergické reakce na sluněčko východní, především z východního pobřeží, severozápadu a středozápadu Spojených států amerických (zde se totiž sluněčko nejvíce rozšiřovalo). Může dojít k vyvolání celé řady alergických reakcí včetně astmatu, kopřivky anebo anafylaxe (Goetz 2008). Sharma et al. (2006) zkoumali 167 domácností v Kentucky, v době nejtěžšího „napadení“ lidí sluněčkem. Alergická reakce byla hlášena v 77 domácnostech. Z toho 50 % hlásilo slzení očí jako první spouštěč alergie a 19 % hlásilo kontaktní alergii, která se projevila kopřivkou a zánětem spojivek.

### **1.3 Náklady na chemickou obranu**

Chemická obrana kořisti proti predátorovi často zahrnuje vyloučení tekutiny, jako je hemolymfa (reflexní krvácení) nebo vyprázdnění střev (vyvrhování). Každý pokus predátora, který je kořisti odvrácen vede ke snížení účinnosti chemické obrany kořisti a k nákladům spojeným s obnovením účinnosti chemické obrany. Pokud se v blízké době útok opakuje, je možné, že kořist již není schopna se bránit kvůli příliš krátké době na doplnění chemické obrany (Higginson et Ruxton 2009).

K vytvoření a udržení jakékoliv chemické obrany, neodmyslitelně patří i náklady na obranu. Jedná se především o energetické náklady na tvorbu chemické obrany. Energetické náklady jsou nepřímo měřitelné z hlediska rychlosti růstu a velikosti dospělců. Změnou těchto dvou veličin může dojít k negativnímu ovlivnění budoucího přežití dospělců a jejich reprodukčního úspěchu (Higginson et al. 2011, Lagos et Herberstein 2017). Jelikož je kořist schopna kontrolovat rozsah svých reakcí, dala by se očekávat existence trade – off mezi investicí do obrany a do dalších aktivit. Kořist tedy musí například volit mezi odrazením současné hrozby a potřebou udržovat obranu proti budoucím hrozbám a zároveň si uchovávat energii pro další základní aktivity. Obrany, do kterých investují larvy hmyzu, se často vytvářejí v průběhu času a někdy mohou být uchovány i do dospělosti. Množství dostupných obranných látek po vykuknutí ovlivňuje reprodukční úspěch u mnoha druhů hmyzu. Kvalitní chemická obrana snižuje riziko predace dospělců a zvyšuje jejich úspěšnost při páření a přežití jejich potomků, pokud jsou vajíčka chemicky chráněna (Higginson et Ruxton 2009).

### 1.3.1 Náklady na vyvrhování

Vyvrhování, stejně jako další obranné sekrety, funguje jako krátkodobá odpověď na hrozby způsobené predátorem. V důsledku vyvrhování často dochází ke ztrátě tekutin a k nutnosti nákladného doplňování obrany (Speed et al. 2012). Vyvrhování je nejběžnější u řádu motýlů (Lepidoptera). Vyvrhováním a následnou ztrátou částečně natrávené potravy, tekutin a střevního materiálu, dochází ke snížení rychlosti růstu jedince. Snížená míra růstu může vést k delšímu larválnímu vývoji a tím paradoxně k většímu ohrožení predátory během dalšího života. Může také dojít ke snížení kondice jedince. Kořist vystavena vysokému stupni predace neustále čelí nutnosti širokého kompromisu mezi zvýšením své zranitelnosti a fitness dospělého (Higginson et al. 2011).

Higginson et al. (2011) usoudili, že vhodným druhem pro studium životní historie spojené s následky obrany proti predátorům je bělásek zelný (*Pieris brassicae*). Bělásek je společný škůdce brukvovitých plodin (Brassicaceae) po celém světě a proto jsou jeho interakce s predátory dobře studovány. Bělásek transportuje glukosinoláty produkované brukvovitými plodinami přes střevní stěnu a ukládá si je. Pokud je vyrušen (kutikulární stimulace) predátorem, brání se vyvrhnutím, které je pro predátory odporné. Vyvržením dojde ke ztrátě živin, tekutin a toxinů z housenky, což má za následek, že při další stimulaci se zpomalí růst a sníží se hmotnost kukel a dospělců. Autoři zjistili, že při umělé stimulaci larev běláška se přežití snižovalo se zvyšující se frekvencí stimulace. Dále zjistili, že počet zralých vajíček u samic byl pozitivně vztažen k hmotnosti kukel.

Skupinové žití je v přírodě běžné navzdory možným negativním důsledkům, jako je zvýšená konkurence o zdroje nebo větší nápadnost pro predátora. Na druhé straně by skupinové žití mohlo znamenat menší investici do nákladů jedince do obrany. Intuitivně by se dalo očekávat, že ochota jednotlivce využít nákladnou obranu by se měla měnit s velikostí skupiny. Například housenky, které se brání vyvrhováním a žijí ve větší skupině, by mohly být méně ochotné vyvrhovat obsah střev, než kdyby žily jako jednotlivci. Snížení investic do obrany lze vidět dvěma způsoby: (i) jedinci, kteří se brání, mohou tak činit méně energeticky nákladně. To vede k tomu, že průměrná investice jednotlivé kořisti klesá s tím, jak se zvyšuje velikost skupiny, (ii) někteří jedinci mohou švindlovat a nebudou do obrany investovat nic (Daly et al. 2012). Daly et al. (2012) s využitím běláška zelného

ukázali, že při skupinovém žití jedinci méně často vyvrhovali. Jedním z vysvětlení může být i to, že skupinové žití s sebou nese dodatečné náklady (např. vyšší konkurence o zdroje) a tak dochází ke snížení obrany jednotlivce.

### 1.3.2 Náklady na reflexní krvácení

Množství ztracené hemolymfy v důsledku reflexního krvácení může tvořit významný podíl z tělesné hmotnosti jedince. U slunéčkovitých se může jednat až o ztrátu 20 % tělesné hmotnosti a přitom podíl obranných alkaloidů v hemolymfě může činit až 70 % z celkového obsahu alkaloidů v těle. U hemolymfy hmyzu je známo, že funguje jako rezerva vody a reflexní krvácení je extravagantním použitím takové vody (Nicolson 1994, Higginson et Ruxton 2009). Kvůli vysokým energetickým nákladům a ztrátě vody, je reflexní krvácení používáno až když ostatní obranné strategie selžou (de Jong et al. 1991, Majerus 1994).

Jaký je vztah mezi reflexním krvácením a následným doplněním vody zkoumal Nicolson (1994). Pro odpověď využil brouka *Decapotoma lunata* z čeledi májkovití (Meloidae). Tito brouci reflexně krváčí z koleních kloubů a uvolněná hemolymfa obsahuje vedle značného podílu vody i kantaridin (terpenoidní jed). Májkovití brouci byli stimulováni pomocí pinzety a vypouštěli žlutou hemolymfu. Ztráta hmotnosti v důsledku krvácení byla průměrně  $16,5 \pm 1,6$  mg, což v průměru představovalo 7,4 % živé hmotnosti jedince. Jedna skupina 7 brouků krvácela třikrát po minutových intervalech. Docházelo k postupnému poklesu objemu uvolněné hemolymfy ( $17,7 \pm 3,8$  mg,  $11,8 \pm 1,7$  mg a poslední  $4,1 \pm 1,1$  mg). Brouci před krvácením vodu odmítali, ale po něm někteří brouci vypili i velké množství vody. Objem vypité vody po krvácení závisel na hmotnosti ztracené hemolymfy. Při reflexním krvácení dochází tedy ke ztrátě vody, kterou je nutné doplnit pro možnost další obrany.

V dalším výzkumu byla hodnocena účinnost hemolymfy coby obrany proti predaci v rámci stejné gildy a náklady na reflexní krvácení (Sato et al. 2009). Pro výzkum autoři využili dva druhy slunéček: slunéčko sedmítečné (*Coccinella septempunctata*) a slunéčko východní (*Harmonia axyridis*). Predace ve stejné gildě většinou nastává v případě, kdy larvy nemají k dispozici mšice jako svůj hlavní a výživný zdroj potravy. Porovnán byl růst larev, které byly nuceny k reflexnímu krvácení s těmi kontrolními. Reflexní hemolymfa ze slunéčka východního, které bylo jedenkrát denně stimulováno štětcem, aby uvolnilo hemolymfu, byla natřena na

vajíčka slunéček sedmitečných. Autoři zjistili, že při přítomnosti hemolymfy slunéčka východního na vajíčkách slunéčka sedmitečného se snížila predace až o 20 %. Tedy hemolymfa slunéčka východního zvýšila ochranu vajíček slunéčka sedmitečného. Z hlediska hmotnosti zde byl rozdíl hmotnosti u samců slunéčka východního. Hmotnost těla byla v průměru  $32,8 \pm 1,3$  mg, když reflexně nekrvácela. Pokud byla slunéčka stimulována, aby reflexně krvácela, hmotnost signifikantně klesla o 15 % ( $27,6 \pm 1,1$  mg). U samic byla hmotnost těla, pokud nekrvácely  $35,3 \pm 0,9$  mg, ale nebyl zde signifikantní rozdíl s hmotností pokud ke krvácení došlo. V důsledku reflexního krvácení během larválního vývoje, které je využito k obraně před predátorem, může tedy docházet i ke snížení výsledné hmotnosti dospělých jedinců (Sato et al. 2009).

## 1.4 Cíl práce

Cílem experimentální části této práce je na základě dvou laboratorních experimentů zkoumat možné negativní dopady reflexního krvácení na slunéčko východní (*Harmonia axyridis*). V prvním experimentu je reflexní krvácení studováno společně s vlivem dalšího fyziologického stresu (hladu). Cílem tohoto experimentu je zkoumat dopady opakovaného reflexního krvácení a hladu na fyziologické parametry hemolymfy slunéček (koncentrace hemocytů, antimikrobiální aktivita hemolymfy, obsah bílkovin), změnu tělesné hmotnosti slunéček, reprodukci a přežívání zkoumaných slunéček. Použit je kompletně faktoriální design experimentu, tedy všechny možné vzájemné kombinace obou studovaných faktorů (reflexní krvácení a hladovění). Ve druhém experimentu je studován vliv opakovaného reflexního krvácení na počet nakladených vajíček při standardizovaných (optimálních) podmínkách. Hypotézou pro druhý experiment je očekávání, že s postupujícím časem budou stresované samice slunéček (podrobené opakovanému reflexnímu krvácení) postupně snižovat produkci vajíček, tedy energetickou investici do reprodukce. Dohromady by experimenty měly odhalit i možný negativní dopad reflexního krvácení na fyziologický stav jedince, jeho přežívání, účinnost imunitního systému a fitness (počet nakladených vajíček).

## 2 Metodika

### 2.1 Studovaný druh

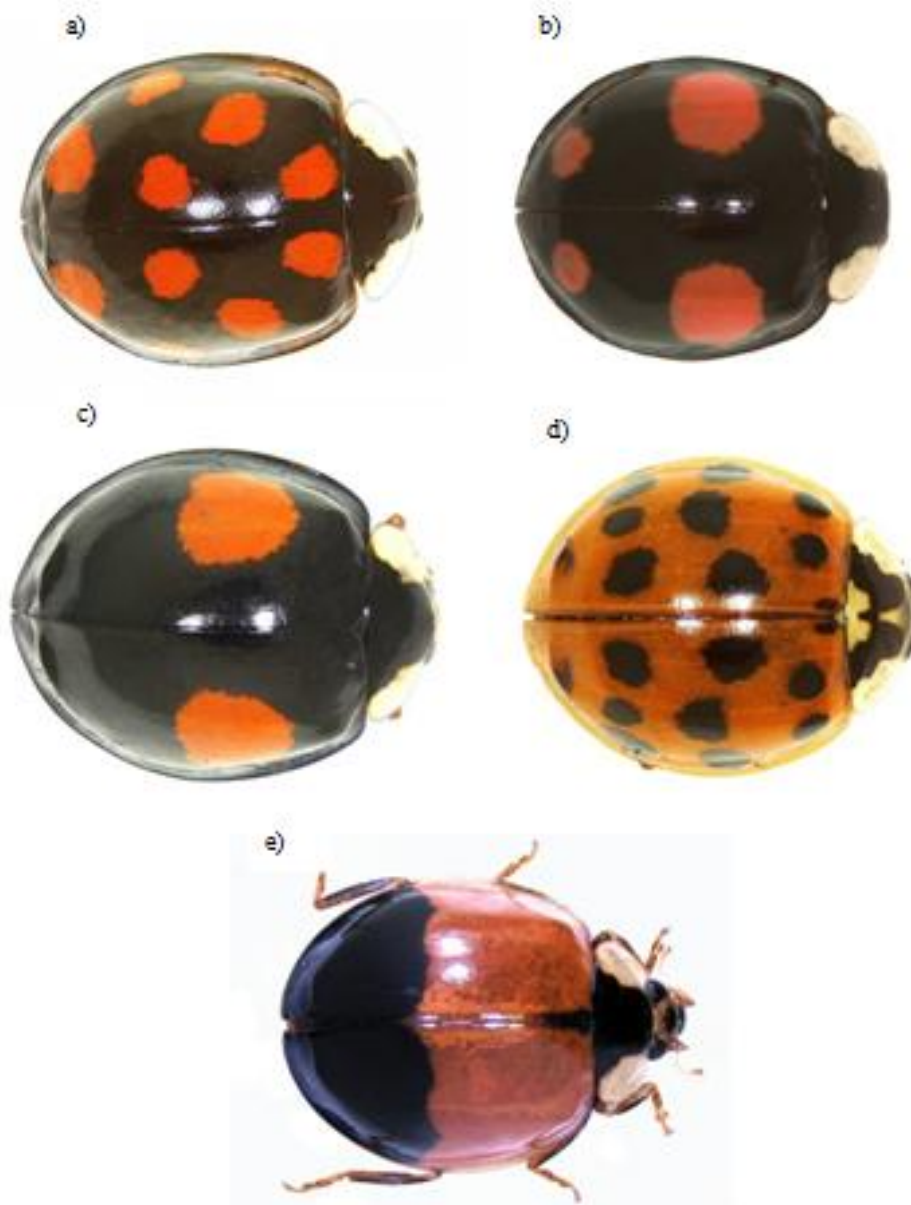
Slunéčko východní *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) patří do čeledi slunéčkovití (Coleoptera: Coccinellidae). Jedná se o dravé slunéčko, které pochází z východní Asie (např. Rusko, Mongolsko, Čína, Korea, Japonsko), živící se především mšicemi. Dospělci slunéčka východního jsou nejméně 5 mm dlouzí a od druhého druhu stejného rodu (*Harmonia quadripunctata*) se poznají dle štítku 12 – 15 x užšího než tělo. Pro rozpoznání pohlaví může pomoci horní pysk a přední okraj hlavy, který je u samců bílý, zatímco u samic je s různě velkou černou skvrnou. Jednoznačnou morfologickou determinaci pohlaví pak umožňuje specifický tvar posledního sternitu. Vajíčka pokládají vzpřímeně, kdy jsou jedním koncem přilepená k podkladu. Jsou eliptického tvaru, barvu mají žlutooranžovou a jsou kladeny v těsných snůškách většinou v počtu 20 – 70 vajíček na snůšku (Nedvěd 2014).

Slunéčko východní má teplotní optimum, ale i limity pro svůj vývoj posunuty k nižším hodnotám oproti slunéčku sedmítečnému (*Coccinella septempunctata*). Pro vajíčka a kukly je horní práh vývoje 36 °C. Pro srovnání slunéčko sedmítečné se při této teplotě vyvíjí dobře (Krengel et al. 2012). V průběhu larválního vývoje slunéčka východního, je důležitá i vlhkost. Při nízké vzdušné vlhkosti se zvyšuje podíl přeživších samců, zatímco při vysoké vlhkosti přežívají lépe samice (Nedvěd et Kalushkov 2012).

Zbarvení slunéčka východního je vysoce polymorfní, co se zbarvení krovek týče, a mírně proměnlivé ve zbarvení předohruď. Existuje několik barevných forem slunéčka východního, které můžeme dělit na melanické (tmavé) a nemelanické (světlé) formy (Obrázek č. 2). Mezi melanické formy (černý podklad s červenými puntíky) patří: i) *axyridis* – na každé krovce má šest červených skvrn, tuto formu tvoří až 90 % jedinců populace v západní části jejich původního areálu, ii) *spectabilis* – každá krovka nese dvě červené skvrny, a tvoří ji ve středoevropských populacích asi 9 % jedinců (včetně kříženců), iii) *conspicua* – na každé krovce nese jednu červenou skvrnu, a tato forma tvoří asi 3 % středoevropských jedinců (včetně kříženců). Mezi nemelanické formy (červený podklad s černými skvrny) patří forma *succinea*, která nese obvykle deset černých skvrn na každé krovce. Počet skvrn však může být proměnlivý dle podmínek prostředí. Převládá v invazivních populacích



v severní Americe a Evropě, ale i v původním areálu rozšíření v Číně. V České republice tato forma tvoří cca 88 % jedinců. Existují i vzácné formy jako je například *equicolor* (Dobzhansky 1993, Nedvěd 2014).



Obrázek č. 2: Barevné formy sluněčka východního (*Harmonia axyridis*), a) *axyridis*, b) *spectabilis*, c) *conspicua*, d) *succinea*, e) *equicolor*. Zdroj: Nedvěd 2014

### 2.1.1 Invaze a rozšíření

Sluněčko východní bylo vypuštěno nejen v USA, jako zbraň proti drobným hmyzím škůdcům (1916), ale docházelo k vypouštění sluněčka i v evropských zemích jako jsou Ukrajina (1964), Bělorusko (1968) Francie (1982), Portugalsko (1984), Řecko (1994), Španělsko (1995), Švýcarsko a Holansko (1996), Německo a

Belgie (1997), Itálie (90. léta) a Dánsko (počátek 21. století). Avšak žádná z provedených introdukcí nevedla k trvalému udržení populace v Evropě. Celoevropské invazi sluněčka východního dala základ až následná introdukce do Nizozemska a Belgie. Zde došlo ke zkřížení sluněčka východního s invazivní populací ze severní Ameriky, která byla na toto území náhodně zavlečena (Brown et al. 2011, Nedvěd 2014)

Postupem času se ze sluněčka východního stalo nejinvazivnější sluněčko na světě. Na otázku proč k tomu došlo, dávají odpověď genetické analýzy. Analýzy ukazují, že k vysoké míře invaznosti přispělo nejen zkřížení dvou vzdálených populací (poddruhů), ale i genetická mutace v populaci introdukované do severní Ameriky. To vše pomohlo sluněčku k výborným invazivním schopnostem v Evropě i v severní Americe (Lombaert et al. 2010, Facon et al. 2011, Turgeon et al. 2011).

V České republice bylo sluněčko východní introdukováno až v roce 2003, avšak bez trvalého uchycení jeho populace (Brown et al. 2011). První nález invazního jedince na našem území byl zjištěn v roce 2007 ve starém třešňovém sadu v Českém středohoří na úpatí vrchu Oblík. Od roku 2007 docházelo k šíření sluněčka v rámci České republiky jednak od severozápadu a poté kruhově do okolí od velkých měst (Špryňar 2008, Nedvěd 2009). Pomocí genetických analýz bylo zjištěno, že sluněčko východní do České republiky přišlo z Belgie a Nizozemska přes Německo (Nedvěd 2014).

V rámci Evropy se sluněčko východní šíří z centra v Beneluxu na východ rychlostí zhruba 200 km/rok. V roce 2011 bylo zaznamenáno ve 26 evropských zemích (Nedvěd 2014). Pomaleji se ovšem šíří na sever, pravděpodobně kvůli chladnému počasí a zachovalému přírodnímu rázu krajiny. Ve středomoří sluněčko ohrožují naopak vysoké teploty v letních měsících (Kontodimas et al. 2008).

Sluněčko východní si konkuruje spíše s druhy z jiných rodů než ze stejného rodu (Roy et al. 2012). Předpokládá se, že nepůvodní druhy predátorů na rozdíl od původních užívají zdroje (především mšice) méně ohleduplně. Tím dochází k znevýhodnění původního druhu, který je adaptován na určitou početnost kořisti (Crowder et Snyder 2010). V důsledku vysoké konkurence o potravu a kvůli přímé predaci, zřejmě dochází k snížení početnosti některých původních druhů sluněček v Evropě (Nedvěd 2014).

### 2.1.2 Využití slunéčka v lékařství

Slunéčko východní se lehce šíří zřejmě i díky své rezistenci proti celé řadě patogenů. Některé mechanismy imunitní obrany slunéček by bylo možné využít i v humánní medicíně. Jedná se kupříkladu o alkaloid harmonin, který je přítomen v hemolymfě slunéčka východního a ukazuje širokospektrální antimikrobiální aktivitu. Jedná se např. o kmeny bakterií, které jsou odpovědné za tuberkulózu (*Mycobacterium tuberculosis*). Využití harmoninu v lékařství se zatím pouze zvažuje, protože je zde jistá obava z jeho použití, neboť je lehce toxický i pro samotné lidské buňky (Rohrich et al. 2012, Nedvěd 2014).

## 2.2 Popis experimentu č. 1 - Vliv opakovaného reflexního krvácení na fyziologickou kondici slunéčka východního (*Harmonia axyridis*)

### 2.2.1 Příprava slunéček

Pro tento pokus byla použita čerstvě přezimovaná slunéčka, která nakonec nebyla využita v přezimovacích experimentech realizovaných kolegou Michalem Řeřichou. Slunéčka byla na podzim roku 2016 sebrána během naletování na zimoviště (domy v obci Konětopy). Následně byla hromadně přezimována ve sklenici umístěné ve venkovních podmínkách v areálu ČZU v Praze. V polovině dubna roku 2017 byla přezimovaná slunéčka rozdělena v laboratoři do Petriho misek, kde měla dostatek vody a potravy, kterou představovala vajíčka zavíječe moučného (*Ephestia kuehniella*).

Po týdnu, kdy měla slunéčka dostatečný čas, na zlepšení svého fyziologického stavu po přezimování, se začalo s dvoudenní přípravou experimentu (Příloha 1). Na začátku přípravy bylo potřeba nachystat 80 Petriho misek, jelikož pro experiment bylo dohromady použito 80 slunéček. Do všech misek byly umístěny kuličky mokrého papíru jako zdroj vody. Pouze do poloviny Petriho misek (40 misek) byla umístěna i potrava (vajíčka zavíječů *Ephestia kuehniella*). Ta slunéčka, která měla v Petriho miskách pouze vodu, představovala skupinu hladem stresovaných slunéček, zatímco slunéčka, která měla i potravu, byla z pohledu potravy nestresovanou skupinou. Nestresovaná i stresovaná skupina z hlediska potravy (každá po 40 slunéčkách) byla dále rozdělena na dvě podskupiny. A to na kontrolní (nekrvácející) jedince a jedince stresované opakovaným reflexním krvácením (každá skupina obsahovala 20 slunéček), přičemž vždy 10 slunéček byli samci a 10 slunéček samice.

Jednotlivé Petriho misky byly popsány identifikačními kódy (viz Tabulka č. 1; Příloha 2).

Jednotlivá sluněčka byla na počátku experimentu zvážena, bylo určeno jejich pohlaví a byla jednotlivě umístěna do Petriho misky s identifikačním číslem. Dalším krokem bylo nachystat antikoagulační pufr kvůli pozdějším odběrům hemolymfy. Složení pufru podle Firlej et al. (2012) je následující: 62 mM chloridu sodného, 100 mM glukózy, 30 mM citronanu sodného a 26 mM kyseliny citrónové. Pro odebrání hemolymfy bylo potřeba použít Petriho misku s oboustrannou lepící páskou, na kterou byla sluněčka pomocí pinzety zafixována krovkami dolů. Pomocí jemného dráždění entomologickým špendlíkem u kolenních kloubů došlo k reflexnímu krvácení, které se projevilo uvolněním kapičky hemolymfy (Příloha 3). Když sluněčka hemolymfu uvolnila, pomocí skleněné mikrokapiláry byla čerstvá hemolymfa odsáta (Příloha 6). Objem hemolymfy v mikrokapiláře byl změřen pomocí šupléry a vzorek byl vyfouknut do připravených a označených eppendorfek (velikosti 0,5 ml), ve kterých již bylo připraveno 50  $\mu$ l antikoagulačního pufru. Bylo nutné, aby sluněčka uvolnila aspoň 0,75 cm hemolymfy (tj. 0,5  $\mu$ l hemolymfy, jeden dílek = 1  $\mu$ l = 1,5 cm) z důvodu pozdějších měření fyziomunitních parametrů ze zmražených vzorků kolegy v Brně. Poté byl odebraný vzorek hemolymfy naředěn do konečného poměru 1  $\mu$ l čisté hemolymfy ku 100  $\mu$ l pufru (ředění 101 krát). Posledním krokem bylo spočítání hemocytů v 1  $\mu$ l hemolymfy pomocí mikroskopu a Bürkerovy komůrky. Do Bürkerovy komůrky bylo postupně pro každý vzorek, pomocí pipety vloženo 0,75  $\mu$ l roztoku hemolymfy s antikoagulačním pufrem. Poté byla komůrka vložena pod mikroskop a byl počítán počet hemocytů v prvních 50 velkých čtvcích při celkovém zvětšení 400 krát.

Zbytek vzorků v eppendorfkách, který nebyl analyzován pod mikroskopem, byl zmrazen kvůli dalšímu měření fyziomunitních parametrů hemolymfy, které prováděli kolegové v Brně. Veškeré údaje byly zaznamenávány do připravených zápisníků. Sluněčka, která neuvolnila při iniciaci experimentu dostatečný objem hemolymfy, nebyla do experimentu zařazena. Stejně tomu bylo, když sluněčka neměla žádné hemocyty při počítání jejich koncentrace pod Bürkerovou komůrkou – taková sluněčka se zřejmě vyskytují v extrémním fyziologickém stavu.

**Tabulka č. 1: Tabulka ukazuje rozdělení slunéček dle péče, která jim byla poskytnuta či neposkytnuta. (F – samice; M – samci)**

ID slunéčka	Pohlaví	Péče	
W01C	F	voda, bez potravy	kontrolní
W02C	F	voda, bez potravy	kontrolní
W03C	F	voda, bez potravy	kontrolní
W04C	F	voda, bez potravy	kontrolní
W05C	F	voda, bez potravy	kontrolní
W06C	F	voda, bez potravy	kontrolní
W07C	F	voda, bez potravy	kontrolní
W08C	F	voda, bez potravy	kontrolní
W09C	F	voda, bez potravy	kontrolní
W10C	F	voda, bez potravy	kontrolní
W11C	M	voda, bez potravy	kontrolní
W12C	M	voda, bez potravy	kontrolní
W13C	M	voda, bez potravy	kontrolní
W14C	M	voda, bez potravy	kontrolní
W15C	M	voda, bez potravy	kontrolní
W16C	M	voda, bez potravy	kontrolní
W17C	M	voda, bez potravy	kontrolní
W18C	M	voda, bez potravy	kontrolní
W19C	M	voda, bez potravy	kontrolní
W20C	M	voda, bez potravy	kontrolní
W21R	F	voda, bez potravy	krvácející
W22R	F	voda, bez potravy	krvácející
W23R	F	voda, bez potravy	krvácející
W24R	F	voda, bez potravy	krvácející
W25R	F	voda, bez potravy	krvácející
W26R	F	voda, bez potravy	krvácející
W27R	F	voda, bez potravy	krvácející
W28R	F	voda, bez potravy	krvácející
W29R	F	voda, bez potravy	krvácející
W30R	F	voda, bez potravy	krvácející
W31R	M	voda, bez potravy	krvácející
W32R	M	voda, bez potravy	krvácející
W33R	M	voda, bez potravy	krvácející
W34R	M	voda, bez potravy	krvácející
W35R	M	voda, bez potravy	krvácející
W36R	M	voda, bez potravy	krvácející
W37R	M	voda, bez potravy	krvácející
W38R	M	voda, bez potravy	krvácející
W39R	M	voda, bez potravy	krvácející
W40R	M	voda, bez potravy	krvácející

ID slunéčka	Pohlaví	Péče	
A41C	F	voda, potrava	kontrolní
A42C	F	voda, potrava	kontrolní
A43C	F	voda, potrava	kontrolní
A44C	F	voda, potrava	kontrolní
A45C	F	voda, potrava	kontrolní
A46C	F	voda, potrava	kontrolní
A47C	F	voda, potrava	kontrolní
A48C	F	voda, potrava	kontrolní
A49C	F	voda, potrava	kontrolní
A50C	F	voda, potrava	kontrolní
A51C	M	voda, potrava	kontrolní
A52C	M	voda, potrava	kontrolní
A53C	M	voda, potrava	kontrolní
A54C	M	voda, potrava	kontrolní
A55C	M	voda, potrava	kontrolní
A56C	M	voda, potrava	kontrolní
A57C	M	voda, potrava	kontrolní
A58C	M	voda, potrava	kontrolní
A59C	M	voda, potrava	kontrolní
A60C	M	voda, potrava	kontrolní
A61R	F	voda, potrava	krvácející
A62R	F	voda, potrava	krvácející
A63R	F	voda, potrava	krvácející
A64R	F	voda, potrava	krvácející
A65R	F	voda, potrava	krvácející
A66R	F	voda, potrava	krvácející
A67R	F	voda, potrava	krvácející
A68R	F	voda, potrava	krvácející
A69R	F	voda, potrava	krvácející
A70R	F	voda, potrava	krvácející
A71R	M	voda, potrava	krvácející
A72R	M	voda, potrava	krvácející
A73R	M	voda, potrava	krvácející
A74R	M	voda, potrava	krvácející
A75R	M	voda, potrava	krvácející
A76R	M	voda, potrava	krvácející
A77R	M	voda, potrava	krvácející
A78R	M	voda, potrava	krvácející
A79R	M	voda, potrava	krvácející
A80R	M	voda, potrava	krvácející

### 2.2.2 Průběh odebírání hemolymfy v dalších dnech

První odběr hemolymfy pomocí reflexního krvácení byl proveden pátý den ode dne přípravy experimentu. Další odběry proběhly každý třetí či čtvrtý den, tedy 2x týdně. Celkově byly provedeny čtyři průběžné odběry a pátý odběr při ukončování experimentu.

Ve dny, kdy probíhaly odběry, byli podrobováni dráždění entomologickým špendlíkem všichni jedinci přiřazení do režimu „reflexní krvácení“. Kromě entomologického špendlíku bylo potřeba připravit si pinzetu, Petriho misku s oboustrannou lepící páskou, skleněné mikrokapiláry a šupléru (Příloha 4). Postup při odebírání hemolymfy byl podobný jako v přípravné části experimentu. Sluněčko bylo pomocí pinzety položeno na Petriho misku s oboustrannou lepící páskou, díky které bylo znehybněno. Dále pomocí entomologického špendlíku došlo k dráždění sluněček v oblasti kolenních kloubů po několik vteřin. Pokud během této doby sluněčka uvolnila hemolymfu, byla hemolymfa odebrána pomocí skleněné kapiláry. Kapilára se poté přiložila k šupléře pro změření odebraného množství (objemu) hemolymfy.

Mimo odběrů hemolymfy, bylo nutné sluněčkám dle příslušného označení doplňovat vodu, případně i potravu (sluněčka nestresovaná hladem) a dle stavu Petriho misky ji vyčistit. Zaznamenáváno do zápisníku bylo v případě samic také to, zda sluněčka nakladla snůšku vajíček. Pokud byla nalezena mrtvá sluněčka, byla smrt jedince zaznamenána a sluněčka byla umístěna do eppendorfků, které byly popsány příslušným identifikačním číslem jedince a byly uloženy do mrazáku. Tento postup byl aplikován vždy u všech nalezených mrtvých těl sluněček.

Poslední den (ukončení experimentu) byl postup podobný jako u přípravných prací. Sluněčka, která přežila, byla zvážena (živá hmotnost), přichystal se antikoagulační pufr (stejný postup jako v předchozí přípravě) a živým sluněčkám byla odebírána hemolymfa. Hemolymfa byla stejným způsobem doředěna v eppendorfkách a popsána příslušným identifikačním kódem. Opět bylo nutné, aby bylo odebráno aspoň 0,5  $\mu$ l čisté hemolymfy. Tentokrát byla k získání hemolymfy použita i metoda punkce, když sluněčka nebyla ochotna reflexně vykrváčet dostatečné množství hemolymfy. Mikroskopovány nebyly vzorky, u nichž jedinci neuvolnili dostatečné množství hemolymfy ani po píchnutí (punkci). Počítání

hemocytů probíhalo stejným způsobem jako při přípravných pracích. Veškeré zbylé vzorky v eppendorfkách byly zmrazeny, stejně jako slunéčka a vše bylo popsáno příslušnými identifikačními kódy. Zmražené vzorky byly poté poslány do Brna pro provedení dalších analýz (měření koncentrace proteinů a antibakteriální aktivity proti *Micrococcus luteus* a *Escherichia coli*).

Pro měření celkové koncentrace proteinů byl použit komerční kit (Bradford protein assay; Bior – Rad, USA): použito bylo vždy 5  $\mu$ l vzorku hemolymfy (101 x ředěn), 25  $\mu$ l reagentu A a 200  $\mu$ l reagentu B. Poté došlo k promíchání a po dobu 15 minut se kit nechal inkubovat v laboratorní teplotě. Po uplynutí doby inkubace bylo změřené množství absorbovaného světla ve spektrofotometru ( $\lambda = 700 - 750$  nm). Následně byla z absorbance vytvořena kalibrační křivka a dle ní byl dopočítán obsah proteinů v měřených vzorcích.

Antibakteriální aktivita proti *Escherichia coli* byla měřena pomocí metody bioluminiscence. Pro analýzy byly použity geneticky modifikované „svítící“ bakterie *E. coli* K 12. V luminometru byl následně měřen pokles svítivosti bakterií, tedy jejich přežívání pod vlivem působení hemolymfy. Kvůli menšímu objemu vzorků, bylo použito i méně bakterií než je popsáno v metodologickém článku (Vojtek et al. 2014). Bylo použito vždy 20  $\mu$ l vzorku (101 krát ředěného) a 60  $\mu$ l suspenze bakterií (přes 50 000 bioluminiscenčních *E. coli* K 12). Pro kontroly se místo vzorku dalo 20  $\mu$ l čistého antikoagulačního pufru. Při vyhodnocení byla spočítána integrální bioluminiscence za hodinu měření a poté byla data vždy kalibrována pomocí porovnání mezi „ostrými“ vzorky a kontrolními vzorky, obsahujícími jen antikoagulační pufr, uvnitř dané sady měření. Přežívání bakterií v kontrolních vzorcích představovalo 100% přežívání.

Antimikrobiální aktivita hemolymfy proti bakteriím *Micrococcus luteus* byla měřena pomocí metody radiální difuze. Pro měření antibakteriální aktivity hemolymfy proti bakteriím *M. luteus* bylo zapotřebí připravit LB agar (40 g na litr vody): 10 g NaCl, 5 g kvasničního extraktu, 10 g tryptonu a 15 g agaru. Poté došlo k tání 42 – 45 ml agaru v mikrovlné troubě, ochlazení, a bylo do něj přidáno 100  $\mu$ l bakteriální kultury a vše bylo důkladně mícháno po dobu několika minut. Poté byl na připravený agar s vyraženými dírkami pipetován vzorek hemolymfy (5  $\mu$ l s ředěním 101 krát). Následně se nechal *M. luteus* přes noc kultivovat při teplotě 25 °C v klimatický komorách. Druhý den po kultivaci byly změřeny průměry oblastí

vzniklých zón v oblastech, kde se projevil světlý kruh kolem vyražené jamky, což znamená, že se projevila antibakteriální aktivita proti *M. luteus*. Pro vyjádření míry antibakteriální aktivity ve vzorcích byla použita kalibrace pomocí lysozomu (účinnost hemolymfy byla vyjádřena jako ekvivalentní množství lysozomu v mg/ml).

### 2.2.3 Analýza dat

K analýze přežívání byl použit Coxův model relativního rizika. Přežívání jedince při dané kontrole bylo použito jako závislá proměnná a pohlaví jedince, příslušnost jedince k danému režimu stresu z hladu (ano/ne) a stresu z opakovaného reflexního krvácení (ano/ne) byly použity jako nezávislé proměnné. K otestování statistické významnosti jednotlivých nezávislých proměnných byly použity z-testy.

K analýze reprodukčního úsilí samic přiřazeným k jednotlivým stresovým režimům byla použita dvoucestná analýza variance (ANOVA), kde stres z hladu (ano/ne) a stres z opakovaného reflexního krvácení (ano/ne) byly použity jako nezávislé proměnné. Jako závislá proměnná byl použit počet vyprodukovaných snůšek vajíček. K otestování statistické významnosti jednotlivých nezávislých proměnných byly použity F-testy.

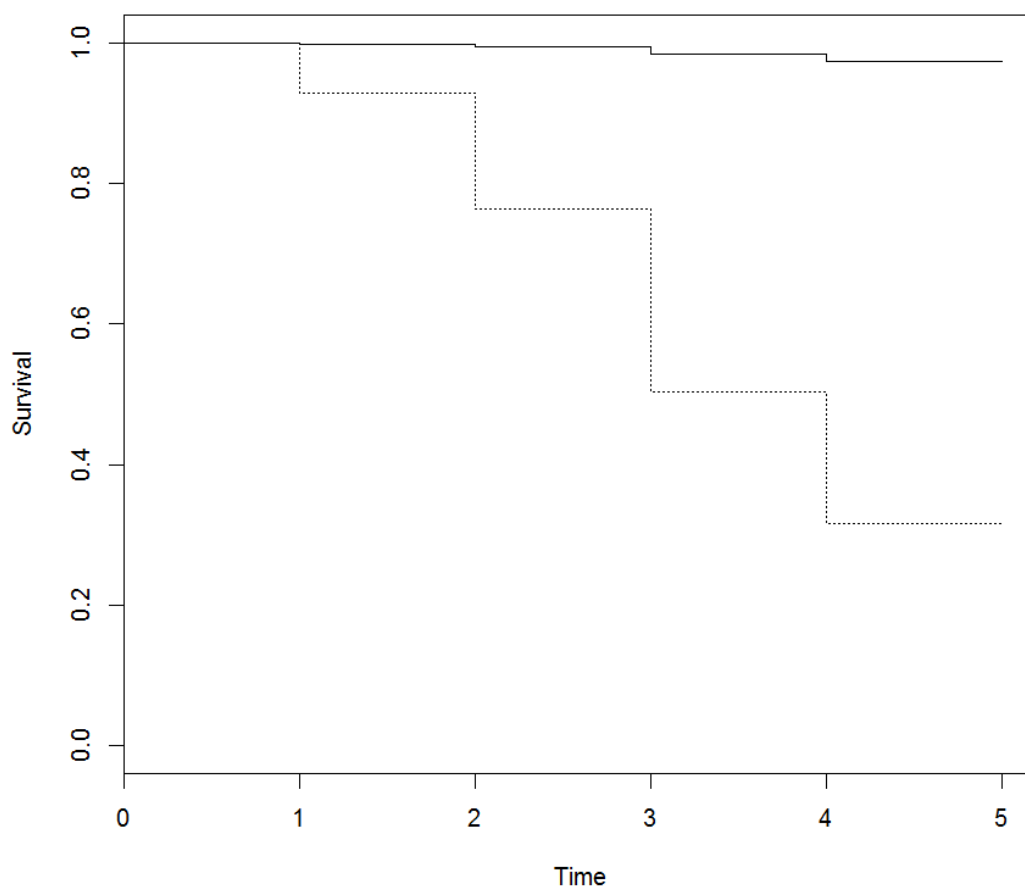
K analýze dat porovnávajících stav dané proměnné na počátku a na konci experimentu byly jako datové body použiti jedinci, pro které existovala relevantní data z konce experimentu. Jako proměnná byl použit rozdíl hodnot „začátek – konec“, tedy záporná hodnota reprezentuje pokles a kladná hodnota reprezentuje růst daného parametru během experimentu. Pro analýzu dat byla použita třícestná analýza variance (ANOVA). Pro jednotlivé parametry, použité jako závislé proměnné v modelech, tedy: rozdíl v tělesné hmotnosti, rozdíl v koncentraci hemocytů v hemolymfě, rozdíl v koncentraci bílkovin v hemolymfě, rozdíl v antimikrobiální aktivitě hemolymfy proti *E. coli* a rozdíl v antimikrobiální aktivitě hemolymfy proti *M. luteus* byl sestaven vždy samostatný model. Jako nezávislá proměnná bylo použito pohlaví jedince, režim stresu z hladu (ano/ne) a režim stresu z opakovaného reflexního krvácení (ano/ne). K otestování statistické významnosti jednotlivých nezávislých proměnných byly použity F-testy.

Všechny statistické analýzy byly provedeny v programu R (R Development Core Team 2017).



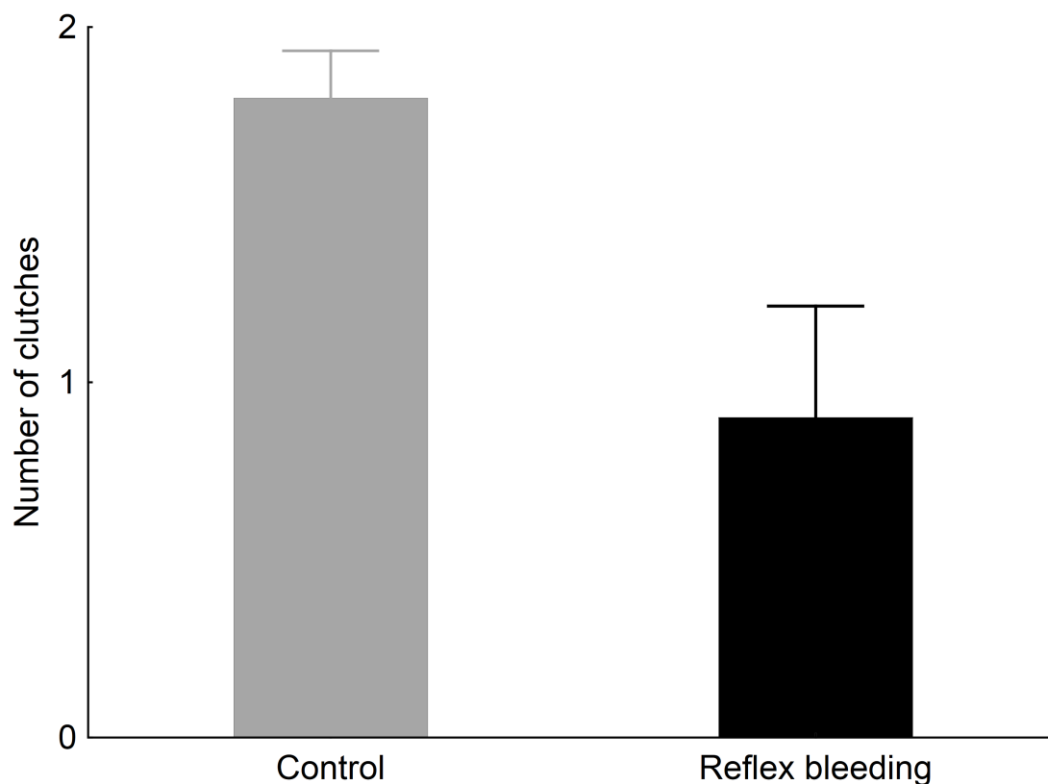
## 2.2.4 Výsledky

Přežívání slunéček se významně liší v závislosti na dostupnosti potravy ( $z = 3,76$ ;  $P < 0,001$ ). Slunéčka, která nebyla krmena, ukazují mnohem větší úmrtnost, než slunéčka, která krmena byla (Obrázek č. 3). Nebyl pozorován žádný průkazný vliv opakovaného reflexního krvácení na přežívání slunéček během experimentu ( $z = -1,16$ ;  $P = 0,25$ ).



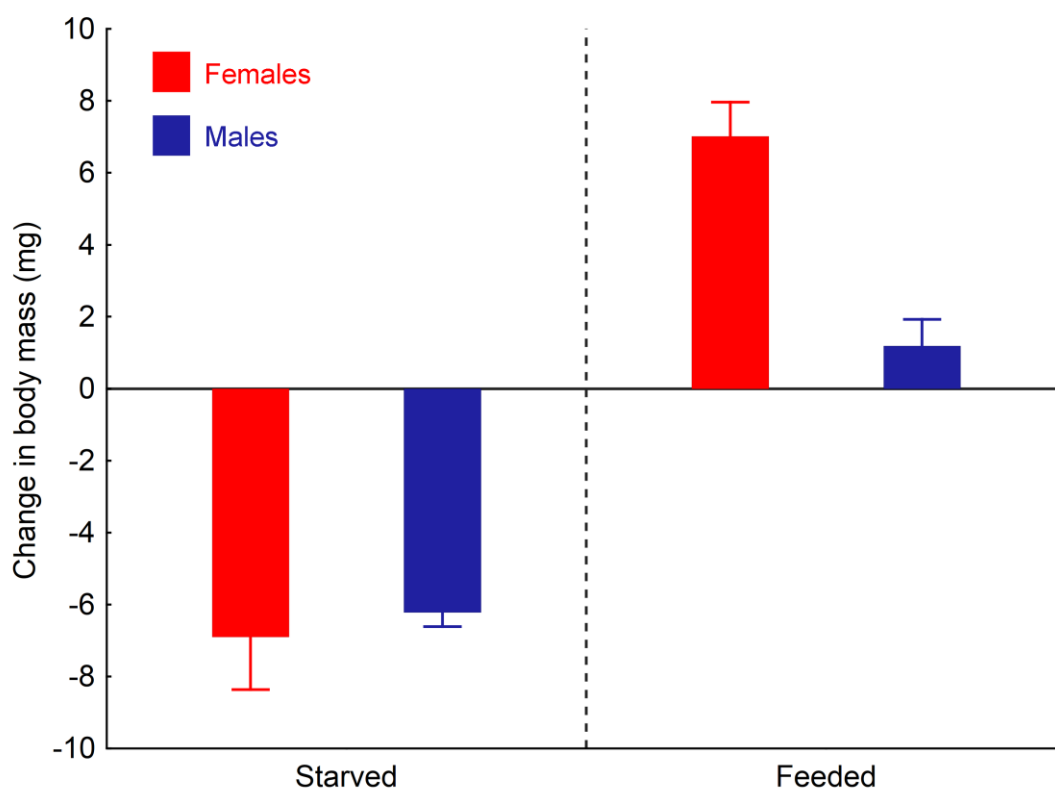
**Obrázek č. 3:** Přežívání slunéček východních, *Harmonia axyridis*, v závislosti na dostupnosti potravy (krmena / nekrmena). Plná čára představuje slunéčka, která byla krmena, a tečkovaná čára představuje slunéčka, která nebyla krmena. Time = čas / pořadí kontroly (0 = začátek experimentu, 5 = konec experimentu), Survival = podíl přežívajících jedinců.

Počet nakladených snůšek vajíček se na první pohled liší mezi krmenými samicemi slunéčka východního, jelikož hladovějící samice nenakladly žádná vajíčka. Pozorován byl i vliv opakovaného reflexního krvácení u krmených samic ( $F = 6,94$ ;  $P = 0,017$ ). Samičky, které nebyly podrobeny reflexnímu krvácení, vyprodukovaly větší počet snůšek (Obrázek č. 4).



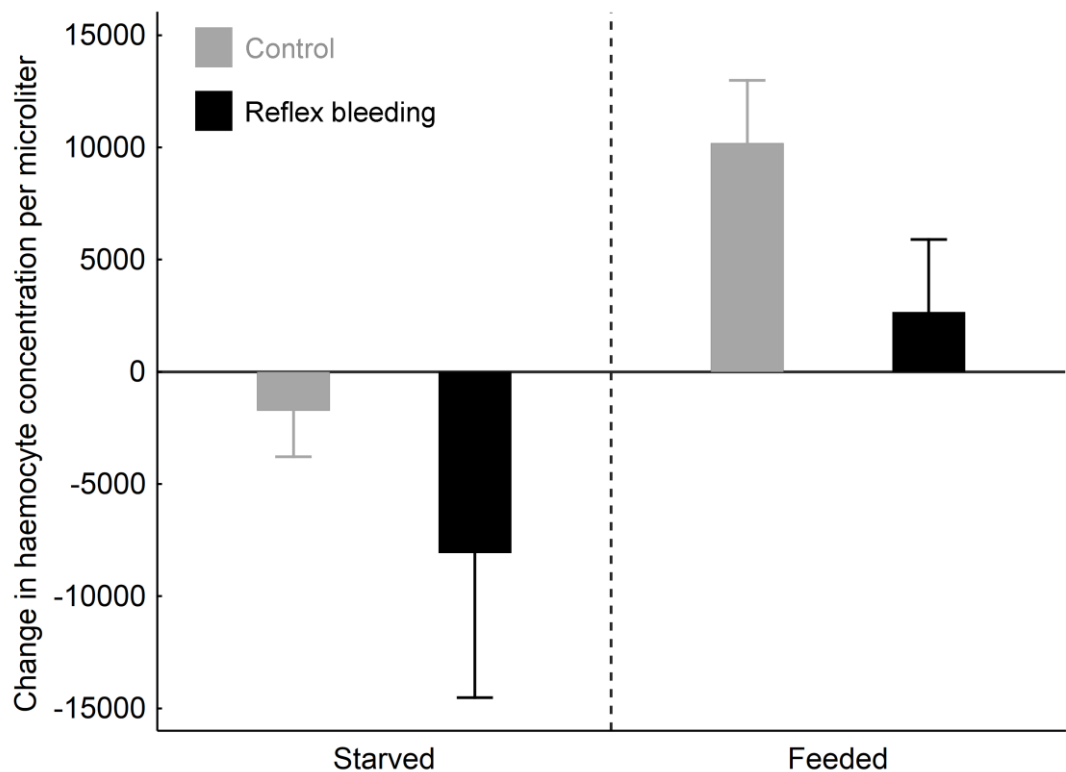
**Obrázek č. 4:** Průměrný počet (+SEM) nakladených snůšek krmenými samicemi slunéčka východního. Nekrmené samice nenakladly ani jednu snůšku, proto jsou zde zohledněny pouze krmené samice. Šedá barva znázorňuje kontrolní slunéčka (bez krvácení) a černá barva znázorňuje reflexně krvácející slunéčka.

Vývoj hmotnosti slunéček východních během experimentu se významně liší mezi pohlavími ( $F = 24,89$ ;  $P < 0,001$ ), tak i mezi dostupností potravy (krmena / nekrmena;  $F = 79,49$ ;  $P < 0,001$ ). Samice, které byly krmeny, ukazují mnohem větší nárůst hmotnosti než samci, kteří měli stejné podmínky. Hladovějící jedinci obou pohlaví pak jednoznačně ztrácejí tělesnou hmotnost (Obrázek č. 5). Nebyl pozorován žádný vliv opakovaného reflexního krvácení na tělesnou hmotnost slunéček ( $F = 0,18$ ;  $P = 0,67$ ).



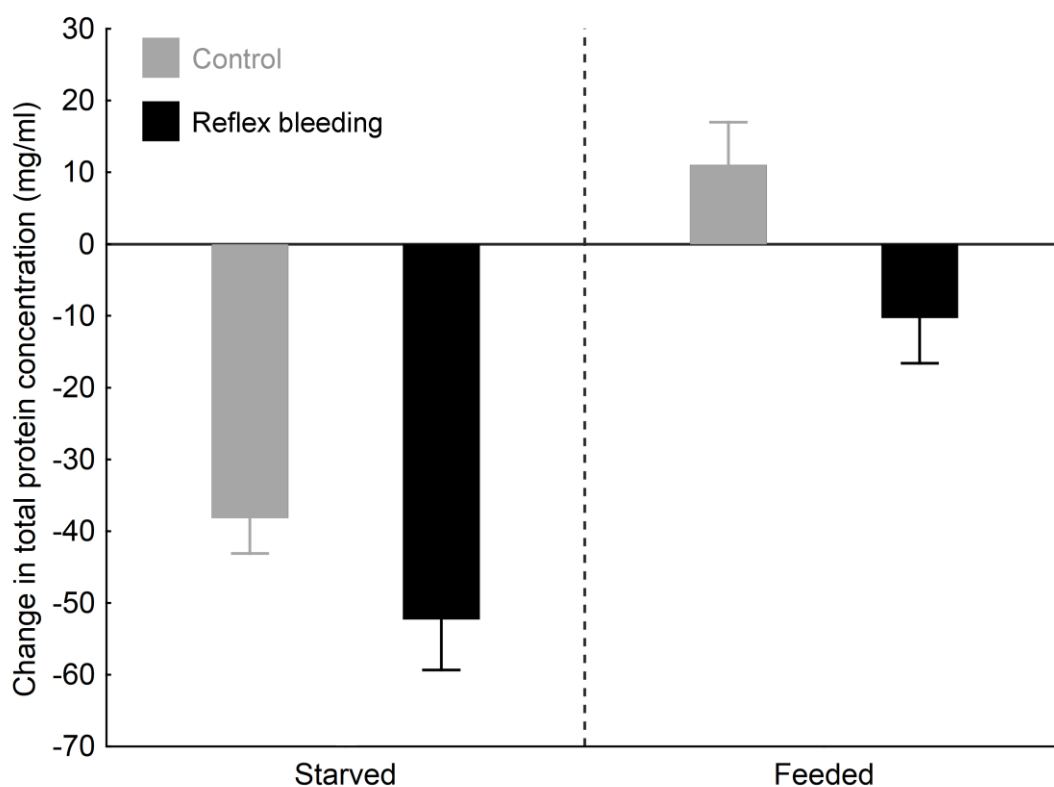
**Obrázek č. 5:** Změna tělesné hmotnosti slunéčka východního, *Harmonia axyridis*, během experimentu. Čerchovaná čára rozděluje jedince podle toho, zda nebyli / byli krmeni (starved / fed). Samci (males) jsou znázorněni modře a samice (females) jsou znázorněny červeně. Zobrazeny jsou průměrné hodnoty + SEM.

Změna v koncentraci hemocytů na 1  $\mu$ l hemolymfy slunéčka východního se liší podle toho, zda měla slunéčka dostupnou potravu (krmena / nekrmena;  $F = 6,60$ ;  $P = 0,014$ ) a zda byla nucena reflexně krvácet či ne ( $F = 4,37$ ;  $P = 0,04$ ). Slunéčka, která byla krmena a zároveň nebyla podrobována reflexnímu krvácení, ukazují největší nárůst v koncentraci hemocytů na rozdíl od slunéček, která byla bez potravy a byla ještě nucena ke krvácení (Obrázek č. 6). Jak hladovění, tak opakované reflexní krvácení tedy vede ke snížení koncentrace hemocytů v hemolymfě slunéček.



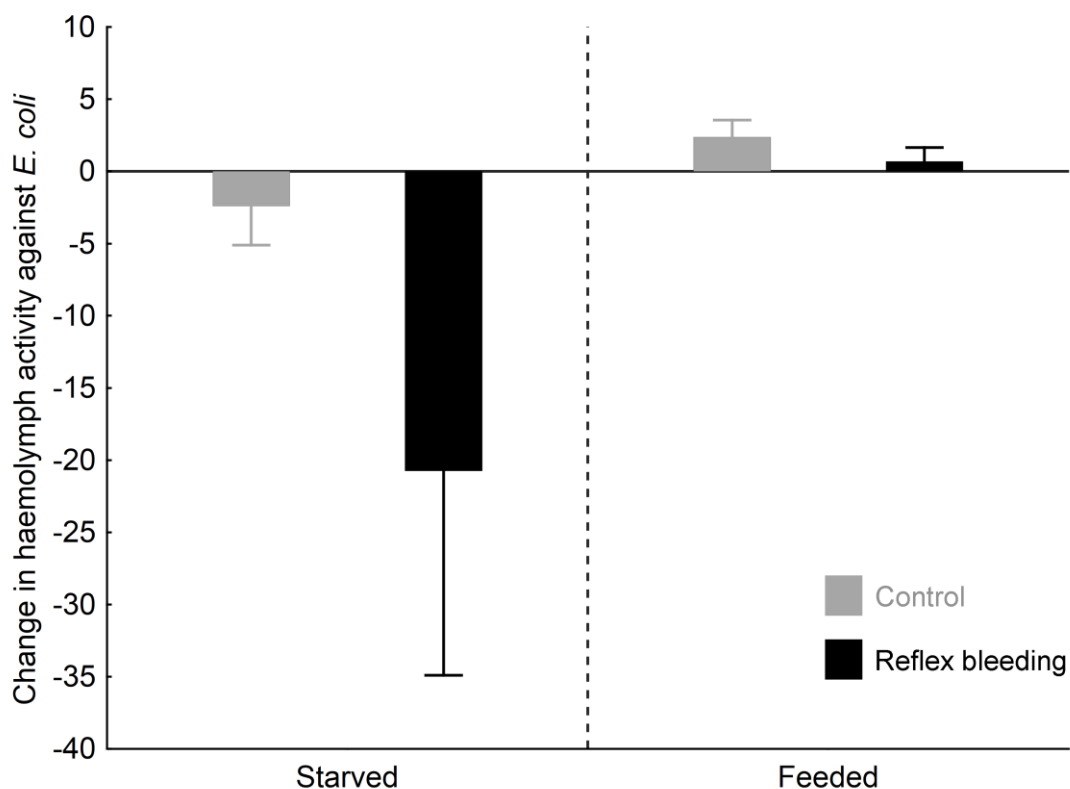
**Obrázek č. 6:** Změna koncentrace hemocytů v 1  $\mu$ l hemolymfy slunéčka východního, *Harmonia axyridis*. Šedá barva znázorňuje kontrolní slunéčka (bez krvácení) a černá barva znázorňuje reflexně krvácející slunéčka. Čerchovaná čára dále rozděluje slunéčka podle toho, zda nebyla / byla v průběhu experimentu krmena (starved / feded). Zobrazeny jsou průměrné hodnoty + SEM.

Koncentrace bílkovin v hemolymfě slunéčka východního byla ovlivněna jak opakovaným reflexním krvácením ( $F = 9,47$ ;  $P = 0,004$ ), tak hlavně dostupností potravy ( $F = 34,72$ ;  $P < 0,001$ ). Slunéčka, která nebyla krmena, mají mnohem větší pokles v koncentraci proteinů než slunéčka, která krmena byla (ta mají koncentraci bílkovin +/- zachovánu na původní hladině). Na první pohled je vidět, že slunéčka, která nekrvácela a byla krmena, mají na konci experimentu dokonce vyšší koncentraci proteinů v hemolymfě, než měla na začátku experimentu (Obrázek č. 7).



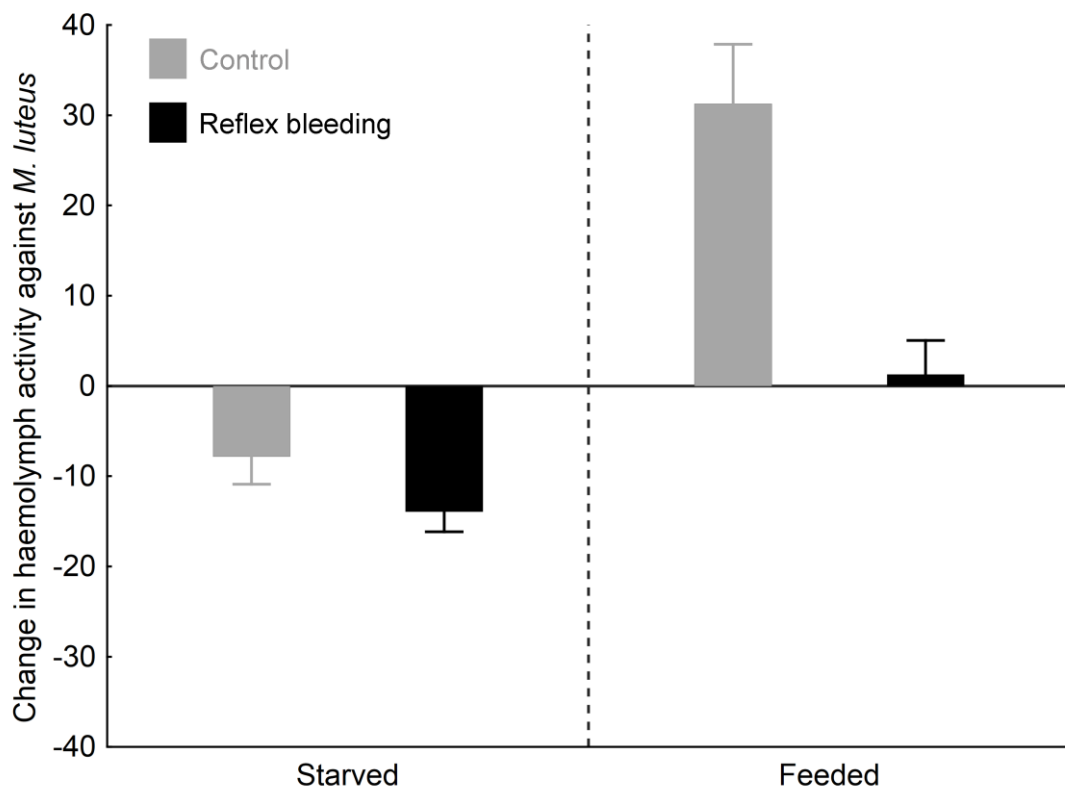
**Obrázek č. 7:** Změna v koncentraci proteinů v hemolymfě v průběhu experimentu. Šedá barva znázorňuje kontrolní slunéčka (bez krvácení) a černá barva znázorňuje reflexně krvácející slunéčka. Čerchovaná čára dále rozděluje jedince podle toho, zda nebyli / byli krmeni (starved / feeded). Zobrazeny jsou průměrné hodnoty + SEM.

Změna v antibakteriální aktivitě hemolymfy sluněčka východního proti *Escherichia coli* je ovlivněna dostupností potravy ( $F = 6,89$ ;  $P = 0,016$ ) a částečně také tím, zda byla sluněčka nucena opakovaně reflexně krvácet či nikoli ( $F = 3,29$ ;  $P = 0,08$ ). Nejvyšší pokles antibakteriální aktivity hemolymfy proti *E. coli* vykazují sluněčka, která nebyla krmena a ještě k tomu byla nucena reflexně krvácet (Obrázek č. 8).



**Obrázek č. 8:** Změna v antibakteriální aktivitě hemolymfy sluněčka východního, *Harmonia axyridis*, proti bakteriím *Escherichia coli*. Šedá barva znázorňuje kontrolní sluněčka (bez krvácení) a černá barva znázorňuje reflexně krvácející sluněčka. Čerchovaná čára dále rozděluje sluněčka podle toho, zda nebyla / byla krmena (starved / fed). Zobrazeny jsou průměrné hodnoty + SEM.

Změna v antibakteriální aktivitě hemolymfy slunéčka východního proti bakteriím *Micrococcus luteus* je významně ovlivněna dostupností potravy ( $F = 13,18$ ;  $P < 0,001$ ), tak i tím, zda byla slunéčka nucena opakovaně reflexně krvácet či nikoli ( $F = 15,16$ ;  $P < 0,001$ ). Nejvyšší nárůst aktivity hemolymfy proti bakteriím *M. luteus* je vidět u slunéček, která byla krmena a zároveň nebyla nucena reflexně krvácet. Nejvyšší pokles antimikrobiální aktivity proti bakteriím *M. luteus* naopak ukazují slunéčka, která nebyla krmena a k tomu byla nucena reflexně krvácet (Obrázek č. 9).



**Obrázek č. 9:** Změna v antibakteriální aktivitě hemolymfy slunéčka východního, *Harmonia axyridis*, proti bakteriím *Micrococcus luteus*. Šedá barva znázorňuje kontrolní slunéčka (bez krvácení) a černá barva znázorňuje reflexně krvácející slunéčka. Čerchovaná čára dále rozděluje slunéčka podle toho, zda nebyla / byla krmena (starved / fed). Zobrazeny jsou průměrné hodnoty + SEM.

## 2.3 Popis experimentu č. 2 – Vliv opakovaného reflexního krvácení na počet vajíček nakladených sluněčkem východním (*Harmonia axyridis*)

### 2.3.1 Založení experimentu

Sluněčka byla pro experiment sebrána na začátku srpna na úhoru nedaleko Řeporyjí a v kukuřičném poli v lokalitě Slatina (Praha-Dubeč). Celkem bylo pro experiment sebráno 146 jedinců, ale hodně sluněček bylo parazitováno vosičkou *Dinocampus coccinellae* (nakonec 44 sluněček), což způsobovalo problémy během realizace experimentu. Po sběru byla sluněčka převezena do laboratorních podmínek, kde experiment dále probíhal. Sluněčka byla umístěna do Petriho misek v počtu cca 10 – 12 sluněček. Do Petriho misek byla přidána voda (mokrý toaletní papír), vajíčka zavíječe moučného (*Ephestia kuehniella*) a nastříhané harmoniky z papíru pro kladení vajíček (Příloha 5).

Během prvních čtyř dnů pobytu v laboratorních podmínkách bylo určeno pohlaví jednotlivých sluněček a bylo založeno 63 párů sluněček. Každý pár byl umístěn do vlastní Petriho misky, kam mu byla přidána voda, potrava a papírová harmonika. Ze začátku byl do Petriho misek přidáván i plátek hroznového vína, aby došlo k nabuzení samic ke kladení vajíček (zdroj cukru). V tomto experimentu, měla sluněčka po celou dobu standardizované „optimální“ podmínky, tedy přístup k neomezené potravě a zdroji vody. Pokud sluněčko zemřelo (nebo bylo parazitováno vosičkou), ještě před zařazením do experimentu, bylo v rámci rodičovského páru nahrazeno náhradním jedincem. Pro jednotlivé páry samotný experiment začal tím, že v dané Petriho misce byla opakovaně nalezena vajíčka. Cca po pěti dnech kladení začala pro daný pár kontrolní perioda (pre-bleeding), kdy po dobu dalších 6 dní byla všechna sluněčka vystavena optimálním podmínkám a žádnému reflexnímu krvácení. Cílem této kontrolní periody bylo pro každý pár stanovit „přirozenou“ produkci vajíček. Tato produkce vajíček se liší mezi jedinci z důvodu rozdílů v jejich velikosti, stáří, zdravotním stavu atd. Po první periodě byly rodičovské páry rozděleny do dvou režimů: 1) optimální podmínky, 2) opakované reflexní krvácení (každý den). Následovně byla pro všechny páry měřena produkce vajíček v dalších dvou periodách (bleeding), každá trvala 6 dní. Celkem byla nakonec získána data pro 13 párů v kontrolním (optimálním) režimu a 13 párů v režimu opakovaného reflexního krvácení.



### 2.3.2 Průběh počítání vajíček a odběru hemolymfy

Slunéčka byla kontrolována každý den. Hlavním důvodem kontroly bylo zjistit, zda daná samička nakladla vajíčka. Kromě kontroly vajíček byl také kontrolován dostatek vody, potravy, a zda není potřeba vyměnit papírovou harmoniku či umýt Petriho misku (trus, plíseň). Pokud při kontrole byla objevena vajíčka, byl pod binokulární lupou spočítán přesný počet vajíček v dané snůšce. Většinou byla vajíčka nakladena přímo na papírové harmoniky, a tak bylo nutné po spočítání vajíček umístit do Petriho misek harmoniky nové.

Pro páry v režimu reflexního krvácení byla hemolymfa odebírána pouze samičkám, samci zůstali neovlivnění. Odběry byly prováděny pomocí entomologického špendlíku, pinzety, Petriho misky s oboustrannou lepící páskou, skleněné mikrokapiláry a šupléry pro měření množství odebrané hemolymfy (Příloha 4). Slunéčko bylo pomocí pinzety znehybněno na Petriho misce s oboustrannou lepící páskou a za použití entomologického špendlíku bylo drážděno v blízkosti kolenních kloubů po několik vteřin (Příloha 3). Pokud během této doby slunéčko uvolnilo skrz reflexní krvácení hemolymfu, tak byla odebrána pomocí skleněné mikrokapiláry (Příloha 6). Mikrokapilára byla poté přiložena k šupléře pro změření uvolněného objemu hemolymfy. U kontrolních slunéček se pouze denně počítal počet nakladených vajíček a reflexnímu krvácení nebyli vystaveni ani samci ani samice (Příloha 7, 8).

Pokud před ukončením experimentu byla nalezena mrtvá samice slunéčka, byla vložena do eppendrofky, popsána identifikačním číslem a vložena do mrazáku pro případné další zkoumání příčin smrti. Páry, kde samice zemřela v průběhu experimentu, nebyly zahrnuty do finálního datasetu. Celkově byl experiment ukončen po 48 dnech. Samečci, kteří přežili, byli zpět vypuštěni do volné přírody, samičky byly uschovány pro případná další měření (např. velikost těla).

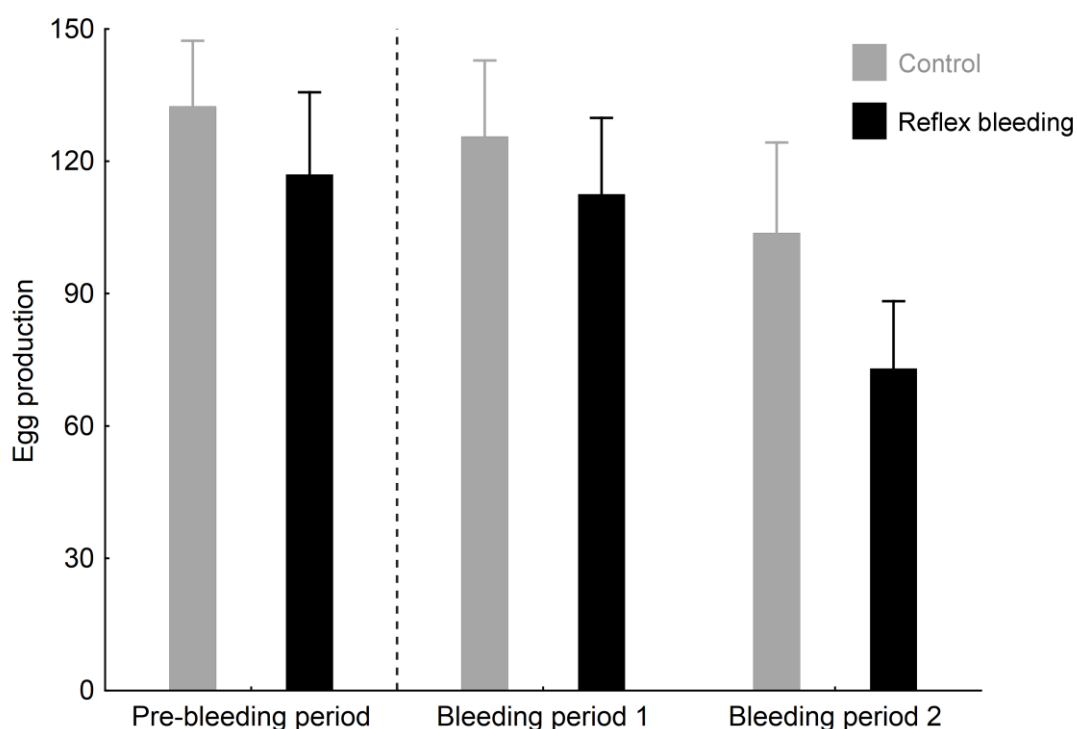
### 2.3.3 Analýza dat

Vliv opakovaného reflexního krvácení na produkci vajíček samicemi *Harmonia axyridis* byl analyzován pomocí zobecněných lineárních modelů s náhodnými efekty (GLMM). Jako závislá proměnná byl použit počet vajíček vyprodukovaný během dané 6-ti denní periody, jako nezávislá proměnná do modelu vstupovala identita periody (pre-bleeding, bleeding 1 či bleeding 2), režim, kterému

byla daná samice vystavena (optimální podmínky či opakované reflexní krvácení během period bleeding 1 a bleeding 2) a interakce mezi identitou periody a režimem. Jako náhodný efekt do modelu vstupovala identita rodičovského páru (aby byla produkce vajíček porovnávána napříč periodami uvnitř daného páru). Vyprodukované počty vajíček nemají normální rozdělení, a tudíž byl použit model s Poissonovým rozdělením chyb. Statistická průkaznost jednotlivých nezávislých proměnných byla testována pomocí F-testů. Rozdíly v produkci vajíček mezi konkrétními periodami byly nakonec testovány pomocí post-hoc testu (Tukey test). Analýza dat byla provedena v programu R (R Development Core Team 2017).

### 2.3.4 Výsledky

Produkce vajíček sluněčka východního se průkazně lišila mezi jednotlivými periodami ( $F = 4,83$ ;  $P = 0,012$ ). Největší rozdíl v počtu nakladených vajíček byl pozorován mezi kontrolní periodou (pre-bleeding), kdy nedocházelo k reflexnímu krvácení a druhou periodou reflexního krvácení ( $P = 0,005$ ). Menší rozdíl byl vidět mezi první a druhou periodou reflexního krvácení ( $P = 0,021$ ). Statisticky neprůkazný rozdíl v počtu nakladených vajíček byl mezi periodou, kdy nedocházelo k reflexnímu krvácení (pre-bleeding) a první periodou reflexního krvácení ( $P = 0,892$ ). Celkově lze konstatovat, že produkce vajíček klesala v čase v průběhu experimentu (Obrázek č. 10). Opakované reflexní krvácení ( $F = 0,81$ ;  $P = 0,38$ ) ani interakce mezi periodou a reflexním krvácením ( $F = 64$ ;  $P = 0,53$ ) neměly průkazný vliv na produkci vajíček. Přesto je z grafu (Obrázek č. 10) vidět jistá tendence k snížení produkce vajíček v druhé periodě reflexního krvácení (bleeding 2) u samic, které byly vystavené opakovanému reflexnímu krvácení.



**Obrázek č. 10:** Vliv opakovaného reflexního krvácení na produkci vajíček v jednotlivých částech experimentu. Jedna perioda představuje vždy období šesti dní. První perioda označuje prvních šest dní před prvním reflexním krvácením (pre – bleeding period). Druhá perioda označuje druhých šest dní, kdy už docházelo k reflexnímu krvácení (bleeding period 1) u samic přiřazených do režimu krvácení a třetí perioda označuje posledních šest dní měření produkce vajíček, kdy docházelo k reflexnímu krvácení již delší dobu (7. – 12. den reflexního krvácení; bleeding period 2). Šedá barva znázorňuje kontrolní samice (bez krvácení) a černá barva znázorňuje samice vystavené opakovanému reflexnímu krvácení. Znázorněn je průměrný počet vyprodukovaných vajíček za období 6-ti dní + SEM.

### 3 Diskuse

Z mých dosažených výsledků prvního experimentu je viditelné, že slunéčka, která byla nucena reflexně krvácet a zároveň neměla dostatek potravy, měla největší pokles v koncentraci hemocytů, bílkovin a antibakteriální aktivitě proti dvěma druhům bakterií (*Micrococcus luteus* a *Escherichia coli*). Naopak slunéčka, která nebyla nucena reflexně krvácet a měla k dispozici dostatek potravy, více prospívala a dosahovala spíše zvýšených hodnot měřených parametrů, ovšem stále byla reflexním krvácením negativně ovlivněna v porovnání s nekrvácejícími krmenými jedinci. Výsledky, kterých jsem dosáhla, nejsou v rozporu s všeobecným předpokladem, že s reflexním krvácením jsou spojeny i vysoké fyziologické náklady, které je potřeba do takovéto chemické obrany investovat.

Dostupný zdroj potravy je důležitý pro všechny organismy a život bez něj je po delší dobu nemožný. Proto není žádným překvapením, že slunéčka, která neměla k dispozici potravu, nedokázala dlouho přežít. I přes nedostatek potravy v průběhu celého experimentu dokázalo 10 slunéček přežít do ukončení experimentu. Z těchto 10 slunéček byla 3 slunéčka ze skupiny, která byla navíc podrobována reflexnímu krvácení. Jak je ovšem vidět z výsledků, reflexní krvácení nemělo na přežívání slunéček vliv. Toto zjištění je dle mého názoru zajímavé, protože by se dalo očekávat, že reflexní krvácení bude slunéčka oslabovat a projeví se jeho vliv společně s hladem. Jak se zdá, tak pro slunéčka i přes nucené reflexní krvácení bylo nejvíc stresující, že neměla dostatek potravy a právě toto omezení mělo velmi významný vliv na jejich přežívání.

Rozdíl v počtu nakladených snůšek se projevil mezi samicemi, které byly krmeny, podle toho, zda byly nebo nebyly reflexně krváceny. Opět se zde jedná pravděpodobně o kompromis, kdy se samice, které byly reflexně krváceny, musely rozhodnout, co upřednostní. Jednalo se o volbu mezi obranou vlastního těla před predátorem a vyprodukovaním nových potomků. Když samice použijí reflexní krvácení, pak jim již nezbyde energie na tak časté kladení vajíček, jako u samic, které reflexně nekrvácelly a neměly tak jiné náklady než na reprodukci, na kterou se mohly soustředit. Zdá se, že v rozporu s mými výsledky by mohla být studie Holloway et al. (1991), kde se zabývali slunéčkem sedmítečným (*Coccinella septempunctata*), které podrobovali reflexnímu krvácení a sledovali počet

nakladených vajíček, ale v opačném vztahu než byl můj výzkum (tedy tím, jak produkce vajíček ovlivňuje objem uvolněné hemolymfy). Avšak nezjistili vliv počtu vajíček na množství hemolymfy uvolněné pomocí reflexního krvácení. Toto jejich zjištění je zajímavé, neboť hemolymfa jako obranný mechanismus je metabolicky velmi drahá (Stocks 2008). Proto by se, dle mého názoru, dalo předpokládat, že slunéčko uvolní více obranné hemolymfy a poté naklade méně vajíček. Pro potvrzení tohoto předpokladu by bylo vhodné, experiment, který jsem prováděla zopakovat a počítat vždy počet nakladených vajíček samicemi. Sledovat počet vajíček v prvním experimentu však nebylo tím hlavním, co se zde sledovalo, proto se zaznamenávaly pouze nakladené snůšky.

Je zajímavé, že změna hmotnosti slunéček se lišila mezi pohlavími a dle dostupnosti potravy, ale nebyl zde pozorován vliv reflexního krvácení. Sato et al. (2009) ukázali, že pokud během čtvrtého instaru zažilo slunéčko východní (*Harmonia axyridis*) reflexní krvácení, pak dospělci vzeší z těchto larev měli nižší hmotnost. Kromě toho ukázali, že pokles v hmotnosti byl viditelný zejména u samců, kteří byli dříve reflexně krváceni. Ve svém experimentu, kde reflexnímu krvácení byli podrobeni až dospělci, nebyl vliv reflexního krvácení prokázán. Zde je dle mého názoru rozdíl ve vlivu reflexního krvácení způsoben odlišným stádiem. V průběhu čtvrtého instaru, kdy docházelo k obraně pomocí reflexního krvácení, musí jedinec investovat maximum získané energie do rychlého růstu (larvální vývoj slunéček je velmi rychlý; Hodek et al. 2012), když tuto energii nemá, projeví se to menší velikostí v dospělosti. Kromě toho krvácení pro nedospělá slunéčka mohlo být mnohem více stresující než pro dospělá. Obecně platí, že náklady na chemickou obranu u larev slunéčka východního vedou k snížené vývojové rychlosti, menší velikosti a nižší hmotnosti v dospělosti (Sloggett et al. 2011). Dospělá slunéčka také mohou mít lepší schopnost kompenzovat ztráty hemolymfy jejím zředěním, jejich hmotnost je tedy kompenzována doplněním vody do organismu.

Koncentrace hemocytů v hemolymfě není stálá. Může se zejména měnit v závislosti na fyziologické kondici jedince (Kodrík 2004). Jedinci, kteří se vyvíjejí za příznivých podmínek, mají svůj imunitní systém v lepším stavu, než jedinci kteří se vyvíjejí za nepříznivých podmínek (např. méně stravy, paraziti, infekce, nevhodná teplota). Hladovějící hmyz má proto často sníženou funkci imunitního systému a i počet hemocytů (Triggs et Knell 2012). V rozporu s tímto tvrzením nejsou ani mé

dosažené výsledky. Slunéčka, která neměla dostatek potravy, ukazují propad v koncentraci hemocytů ve své hemolymfě. Je patrné, že nedostatek potravy je pro ně více stresující, než vystavení reflexnímu krvácení, jelikož i slunéčka, která nebyla reflexně krvácena, ukazují snížení koncentrace hemocytů. Samotné reflexní krvácení také vede ke ztrátě hemocytů (Knapp et al. 2018) a jelikož množství hemolymfy ztracené během reflexního krvácení může být značné (přes 10 % tělesné hmotnosti slunéčka; Holloway et al. 1991, de Jong et al. 1991), není překvapivé, že lze pozorovat snížení koncentrace hemocytů v důsledku opakovaného reflexního krvácení i v mém experimentu. Je zřejmé, že spojení hladovění s reflexním krvácením je pro slunéčka velmi stresující, což se očekávalo.

Z hlediska dalších měřených fyziologických parametrů hemolymfy, mělo reflexní krvácení společně s nedostatkem potravy negativní vliv na koncentraci proteinů a antibakteriální aktivitu proti *Escherichia coli* a *Micrococcus luteus*. Handke et al. (2013) zkoumali vliv krmených / nekrmených larev rodu *Drosophila* na množství proteinů v hemolymfě a zjistili, že koncentrace proteinů v hemolymfě je závislá na výživovém stavu larev. Larvy, které nebyly krmeny, měly mnohem menší koncentrace proteinů. Tento výsledek je v souladu i s výsledky, kterých bylo dosaženo v mé práci. Potrava je dle mého názoru velmi důležitá pro správné fungování celého organismu. Navíc dle výsledků je důležitá i pro tvorbu proteinů či pro funkční antibakteriální obranu. Hlad společně s vydáváním energie do reflexního krvácení jsou podle mne významnou zátěží pro slunéčka. Kvůli špatné kondici si slunéčka nezvládnou udržet imunitní systém v dobrém stavu a v důsledku tohoto faktu je snížena antibakteriální aktivita hemolymfy.

Z výsledků druhého experimentu je vidět, že až postupem času (6-12 dní) se začíná objevovat vliv reflexního krvácení na počet nakladených vajíček (efekt však zůstal v mém experimentu neprůkazný). Je zde však zvláštní, že i kontrolní samice, tedy samice, které nebyly podrobovány reflexnímu krvácení, postupně začaly méně klást. Jelikož měli všichni jedinci stejné podmínky, nabízí se jen jediné vysvětlení, které je potřeba zdůraznit. Na počátku experimentu byli jak samice, tak i samci, kteří zde byli použiti, nachytáni v průběhu sezóny ve volné přírodě na různých místech. Neměla jsem proto žádné informace o fyziologickém stavu slunéček, a nevěděla jsem, jestli jsou zdravá nebo ne. To se projevilo i na počátku experimentu, kdy větší počet jedinců byl parazitován vosičkou *Dinocampus coccinellae*. Tento předpoklad

by bylo vhodné vzít v potaz i v prvním experimentu, kde se také přesně nevědělo, jak jsou sluněčka stará a neexistovala ani informace o jejich fyziologickém stavu.

Pro odstranění pochybností z hlediska stáří jedinců, které mohlo ovlivňovat jejich reprodukční schopnost či úmrtí, se nabízí experiment zopakovat, ale ne s odchycenými jedinci z volné přírody, nýbrž s jedinci pocházejícími z laboratorního chovu. Pro zajištění standardizace dobrého stavu samců a samic, by bylo zapotřebí, první generaci nachytat ve volné přírodě, ale do experimentu použít až jejich potomky. Vajíčka by byla od začátku chována ve známých laboratorních podmínkách. Kromě zajištění stejných podmínek pro vývoj jedinců bych také dosáhla zamezení nakažení takto odchovaných jedinců parazitoidy či patogeny. Stáří všech jedinců by bylo standardizováno a mohl by být zkoumán i vliv reflexního krvácení během počátku života dospělého na počátek reprodukce. Lze předpokládat, že právě počátek reprodukce je energeticky nejnáročnější, protože mladý dospělec ještě investuje značné množství energie do výstavby svého těla (svaly, tukové těleso) a budování fungujícího imunitního systému (Řeřicha et al. 2018). Reflexní krvácení by tak mohlo oddálit počátek reprodukce u sluněček. Výsledky takto nastaveného experimentu by mohly být více průkazné a snáze interpretovatelné.

## 4 Závěr

V této práci byl v rámci dvou laboratorních experimentů zkoumán vliv reflexního krvácení na slunéčko východní (*Harmonia axyridis*). Předpokládaným výsledkem bylo, že slunéčka, která jsou podrobována reflexnímu krvácení, budou mít horší výsledky ve sledovaných fyziologických parametrech a sníženou reprodukční kapacitu a přežívání.

Po vyhodnocení výsledků z prvního experimentu, kde slunéčka byla vystavována i dalšímu fyziologickému stresu (hladu), se ukázalo, že reflexní krvácení má významný vliv na počet nakladených snůšek a na fyziologické parametry jejich hemolymfy. Kromě reflexního krvácení se zde projevilo i ovlivnění nedostatkem potravy, který je v kombinaci s krvácením pro slunéčka velmi stresující. Přežívání a změna hmotnosti slunéček se lišily dle dostupnosti potravy, ale u těchto sledovaných parametrů nebyl prokázán vliv reflexního krvácení. U změny hmotnosti slunéček byl navíc i rozdíl mezi pohlavími.

V druhém experimentu se po vyhodnocení dat ukázalo, že opakované reflexní krvácení má v průběhu experimentu jistý vliv na počet nakladených vajíček. Početnost vajíček se začala s postupem času a opakovaným reflexním krvácením lehce snižovat, ale není zde zjištěn průkazný vliv opakovaného reflexního krvácení na snížení počtu nakladených vajíček.

Tato diplomová práce ukázala negativní vliv reflexního krvácení na některé sledované parametry u slunéčka východního, zejména v prvním experimentu. Pro zpřesnění výsledků vlivu reflexního krvácení na počet nakladených vajíček, který byl zkoumán ve druhém experimentu, by bylo zapotřebí experiment zopakovat za standardizovanějších podmínek. Při novém experimentu by měla být slunéčka, která v něm budou použita, od začátku svého vývoje odchována v laboratorních podmínkách. V takto nastaveném pokusu by se měl vliv reflexního krvácení na počet nakladených vajíček projevit silněji, nemohl by být maskován vlivem neznámého fyziologického stavu sledovaných jedinců (nachytaných přímo z volné přírody).



## 5 Přehled literatury a použitých zdrojů

**Andrade M. R., Albeny-Simoes D., Breaux J. A., Juliano S. A., Lima E., 2017:** Are behavioural responses to predation cues linked across life cycle stages? *Ecological Entomology* 42: 77-85.

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

**Beckerman A. P., Wieski K., Baird D. J., 2007:** Behavioural versus physiological mediation of life history under predation risk. *Oecologia* 152: 335-343.

**Berenbaum M. R., 1995:** The chemistry of defense - theory and practice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 2-8.

**Berger D., Walters R., Gotthard K., 2006:** What keeps insects small? - Size dependent predation on two species of butterfly larvae. *Evolutionary Ecology* 20: 575-589.

**Bezzerides A. L., McGraw K. J., Parker R. S., Hussein J., 2007:** Elytra color as a signal of chemical defense in the Asian ladybird beetle *Harmonia axyridis*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 61: 1401-1408.

**Blaustein L., 1999:** Oviposition site selection in response to risk of predation: Evidence from aquatic habitats and consequences for population dynamics and community structure. In: Wasser S. P. (ed) *Evolutionary theory and processes: Modern perspectives*. Springer, Dordrecht: 441–456.

**Boeve J. L., Blank S. M., Meijer G., Nyman T., 2013:** Invertebrate and avian predators as drivers of chemical defensive strategies in tenthrinid sawflies. *BMC Evolutionary Biology*: 13.

**Brower L. P., Glazier S. C., 1975:** Localization of heart poisons in monarch butterfly. *Science* 188: 19–25.

**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.

**Crowder D. W., Snyder W. E., 2010:** Eating their way to the top? Mechanisms underlying the success of invasive insect generalist predators. *Biological Invasions* 12: 2857-2876.

**Daly D., Higginson A. D., Chen D., Ruxton G. D., Speed M. P., 2012:** Density-dependent investment in costly anti-predator defences: an explanation for the weak survival benefit of group living. *Ecology Letters* 15: 576-583.

**de Jong P. W., Holloway G. J., Brakefield P. M., de Vos H., 1991:** Chemical defence in ladybird beetles (Coccinellidae). II. Amount of reflex fluid, the alkaloid adaline and individual variation in defence in 2-spot ladybird (*Adalia bipunctata*). *Chemoecology* 2: 15 – 19.

**Di Giulio A., Muzzi M., Romani R., 2015:** Functional anatomy of the explosive defensive system of bombardier beetles (Coleoptera, Carabidae, Brachininae). *Arthropod Structure & Development* 44: 468-490.

**Dobzhansky T., 1993:** Geographical variation in lady-beetles. *American naturalist* 67: 97-126.

**Facon B., Crespin L., Loiseau A., Lombaert E., Magro A., Estoup A., 2011:** Can things get worse when an invasive species hybridizes? The harlequin ladybird *Harmonia axyridis* in France as a case study. *Evolutionary Applications* 4: 71-88.

**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.

**Fu X. H., Nobuyoshi O., Meyer-Rochow V. B., Wang Y. Y., Lei C. L., 2006:** Reflex-bleeding in the firefly *Pyrocoelia pectoralis* (Coleoptera : Lampyridae): Morphological basis and possible function. *Coleopterists Bulletin* 60: 207-215.

**Gamberale G., Tullberg B. S., 1998:** Aposematism and gregariousness: the combined effect of group size and coloration on signal repellence. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 265: 889-894.

**Goetz D. W., 2008:** *Harmonia axyridis* ladybug invasion and allergy. *Allergy and Asthma Proceedings* 29: 123-129.

**Greeney H. F., Dyer L. A., Smilanich A. M., 2012:** Feeding by lepidopteran larvae is dangerous: A review of caterpillars' chemical, physiological, morphological, and behavioral defenses against natural enemies. *Invertebrate Survival Journal* 9: 7-34.

**Grill C. P., Moore A. J., 1998:** Effects of a larval antipredator response and larval diet on adult phenotype in an aposematic ladybird beetle. *Oecologia* 114: 274-282.

**Handke B., Poernbacher I., Goetze S., Ahrens C. H., Omasits U., Marty F., Simigdala N., Meyer I., Wollscheid B., Brunner E., Hafen E., Lehner C. F., 2013:** The hemolymph proteome of fed and starved *Drosophila* larvae. *Plos One* 8: e67208.

**Haulotte E., Laurent P., Braekman J. C., 2012:** Biosynthesis of defensive coccinellidae alkaloids: incorporation of fatty acids in adaline, coccinelline, and harmonine. *European Journal of Organic Chemistry* 10: 1907-1912.

**Hay-Roe M. M., Boucias D. G., Shapiro A. M., Becriel J. J., 2003:** A newly discovered baculovirus induces reflex bleeding in the butterfly *Heliconius himera* (Nymphalidae : Heliconiinae). *Journal of Invertebrate Pathology* 84: 59-62.

**Hemptinne J. L., Lognay G., Gauthier C., Dixon A. F. G., 2000:** Role of surface chemical signals in egg cannibalism and intraguild predation in ladybirds (Coleoptera : Coccinellidae). *Chemoecology* 10: 123-128.

**Higginson A. D., Ruxton G. D., 2009:** Dynamic state-dependent modelling predicts optimal usage patterns of responsive defences. *Oecologia* 160: 399-410.

**Higginson A. D., Delf J., Ruxton G. D., Speed M. P., 2011:** Growth and reproductive costs of larval defence in the aposematic lepidopteran *Pieris brassicae*. *Journal of Animal Ecology* 80: 384-392.

**Hodek I., Honěk A., Van Emden H. F., 2012:** Ecology and behaviour of the ladybird beetles (Coccinellidae). Willey-Blackwell, Chichester, UK.

**Holloway G. J., de Jong P. W., Brakefield P. M., de Vos H., 1991:** Chemical defence in ladybird beetles (Coccinellidae). I. Distribution of coccinelline and individual variation in defence in 7 – spot ladybirds (*Coccinella septempunctata*). Chemoecology 2: 7 – 14.

**Karystinou A., Thomas A. P. M., Roy H. E., 2004:** Presence of haemocyte-like cells in coccinellid reflex blood. Physiological Entomology 29: 94-96.

**Katsanis A., Magro A., Ramon-Portugal F., Kenis M., Babendreier D., 2017:** Chemical defences of native European coccinellid eggs against intraguild predation by the invasive Asian coccinellid, *Harmonia axyridis* (Pallas). Biocontrol 62: 385-396.

**Knapp M., Dobeš P., Řeřicha M., Hyršl P., 2018:** Puncture vs. reflex bleeding: Haemolymph composition reveals significant differences among ladybird species (Coleoptera: Coccinellidae), but not between sampling methods. European Journal of Entomology: 115: 1 - 6

**Kodrík D., 2004:** Fyziologie hmyzu. Entomologický ústav Akademie věd České republiky, České Budějovice, 220 s.

**Kontodimas D. C., Stathas G. J., Martinou A. F., 2008:** The aphidophagous predator *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) in Greece, 1994-1999. European Journal of Entomology 105: 541-544.

**Krengel S., Stangl G. I., Brandsch C., Freier B., Klose T., Moll E., Kiowski A., 2012:** A comparative study on effects of normal versus elevated temperatures during preimaginal and young adult period on body weight and fat body content of mature *Coccinella septempunctata* and *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). Environmental Entomology 41: 676-687.

**Lagos P. A., Herberstein M. E., 2017:** Are males more scared of predators? Differential change in metabolic rate between males and females under predation risk. Physiology & Behavior 173: 110-115.

**Laurent P., Braekman J.-C., Daloze D., Pasteels J. M., 2003:** Biosynthesis of defensive compounds from beetles and ants. *European Journal of Organic Chemistry* 15: 2733–2743.

**Lima S. L., Dill L. M., 1990:** Behavioral decisions made under the risk of predation - a review and prospectus. *Canadian Journal of Zoology* 68: 619-640.

**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: e9743.

**Majerus M. E. N., 1994:** Ladybirds. No. 81, New Naturalist Series. Harper Collins, London.

**Marples N. M., Vanveelen W., Brakefield P. M., 1994:** The relative importance of color, taste and smell in the protection of an aposematic insect *Coccinella septempunctata*. *Animal Behaviour* 48: 967-974.

**Mason P. A., Bowers M. D., 2017:** Localization of defensive chemicals in two congeneric butterflies (Euphydryas, Nymphalidae). *Journal of Chemical Ecology* 43: 480-486.

**Moraes A. R., Greeney H. F., Oliveira P. S., Barbosa E. P., Freitas A. V. L., 2012:** Morphology and behavior of the early stages of the skipper, *Urbanus esmeraldus*, on *Urera baccifera*, an ant-visited host plant. *Journal of Insect Science* 12: 52.

**Nedvěd O., 2008:** Červené zbarvení indikuje míru jedovatosti slunéček. *Vesmír* 87: 476 – 477.

**Nedvěd O., 2009:** Spread and distribution of a non-native coccinellid *Harmonia axyridis* in Europe. In: Soldán T., Papáček M., Boháč J. (eds) Communications and abstracts, SIEEC 21. University of South Bohemia, České Budějovice, 64-65.

**Nedvěd O., 2014:** Slunéčko východní (*Harmonia axyridis*) - pomocník v biologické ochraně nebo ohrožení biodiverzity?: Certifikovaná metodika pro praxi. 2. dopl. vyd. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice. ISBN 978-80-7394-490-2.

**Nedvěd O., Kalushkov P., 2012:** Effect of air humidity on sex ratio and development of ladybird *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Psyche* 2012: article ID 173482, 5 pages, doi:10.1155/2012/173482.

**Nicolson S. W., 1994:** Water replenishment following reflex bleeding in the blister beetle *Decapotoma lunata* Pallas (Coleoptera, Meloidae). *African Entomology* 2: 21-23.

**Patočka R., 2004:** Slunéčko sedmítečné: Proč ho lidé milují a ptáci se mu vyhýbají? *Vesmír* 83: 632-634.

**Peck D. C., 2000:** Reflex bleeding in froghoppers (Homoptera : Cercopidae): Variation in behavior and taxonomic distribution. *Annals of the Entomological Society of America* 93: 1186-1194.

**Prado A., Ledezma J., Cubilla-Rios L., Bede J. C., Windsor D. M., 2011:** Two genera of aulacoscelinae beetles reflexively bleed azoxyglycosides found in their host cycads. *Journal of Chemical Ecology* 37: 736-740.

**R Development Core Team, 2017:** **R:** A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org>.

**Rommel T., Tammaru T., 2009:** Size-dependent predation risk in tree-feeding insects with different colouration strategies: a field experiment. *Journal of Animal Ecology* 78: 973-980.

**Rieger J. F., Binckley C. A., Resetarit W.J., 2004:** Larval performance and oviposition site preference along a predation gradient. *Ecology* 85: 2094–2099.

**Rohrich 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.

**Roy H. E., Adriaens T., Isaac N., 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., Nedvěd O., Ravn H. P., Grégoire 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.

**Řeřicha M., Dobeš P., Hyršl P., Knapp M. 2018:** Ontogeny of protein concentration, hemocyte concentration and antimicrobial activity against *Escherichia coli* in hemolymph of the invasive harlequin ladybird, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Physiological Entomology* 43: 51 – 59.

**Sato S., Kushibuchi K., Yasuda H., 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.

**Sendoya S. F., Oliveira P. S., 2017:** Behavioural ecology of defence in a risky environment: caterpillars versus ants in a neotropical savanna. *Ecological Entomology* 42: 553-564.

**Sharma K., Muldoon S. B., Potter M. F., Pence H. L., 2006:** Ladybug hypersensitivity among residents of homes infested with ladybugs in Kentucky. *Annals of Allergy Asthma & Immunology* 97: 528-531.

**Schroder F. C., Farmer J. J., Attygalle A. B., Smedley S. R., Eisner T., Meinwald J., 1998:** Combinatorial chemistry in insects: A library of defensive macrocyclic polyamines. *Science* 281: 428-431.

**Sillén-Tullberg B., Bryant E. H., 1983:** The evolution of aposematic coloration in distasteful prey - an individual selection model. *Evolution* 37: 993-1000.

**Skelhorn J., Rowe C., 2006:** Predator avoidance learning of prey with secreted or stored defences and the evolution of insect defences. *Animal Behaviour* 72: 827-834.

**Sloggett J. J., 2010:** Predation of ladybird beetles by the orb web spider *Araneus diadematus*. *BioControl* 55: 631–638.

**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.

**Speed M. P., Ruxton G. D., Mappes J., Sherratt T. N., 2012:** Why are defensive toxins so variable? An evolutionary perspective. *Biological Reviews* 87: 874-884.

**Stocks I., 2008:** Reflex bleeding (Autohemorrhage). In: Capinera J. L. (ed.): Encyclopedia of Entomology. 2. vyd., Springer, Berlin: 3132 – 3139.

**Špryňar P., 2008:** Faunistic records from the Czech Republic – 252. Coleoptera: Coccinellidae. Klapalekiana 44: 77–79.

**Triggs A., Knell R. J., 2012:** Interactions between environmental variables determine immunity in the Indian meal moth *Plodia interpunctella*. Journal of Animal Ecology 81: 386-394.

**Turgeon J., Tayeh A., Facon B., Lombaert E., De Clercq P., Berkvens N., Lundgren J. G., Estoup A., 2011:** Experimental evidence for the phenotypic impact of admixture between wild and biocontrol Asian ladybird (*Harmonia axyridis*) involved in the European invasion. Journal of Evolutionary Biology 24: 1044-1052.

**Uemura M., Perkins L. E., Zalucki M. P., Cribb B. W., 2017:** Predator - prey interaction between greenhead ants and processionary caterpillars is mediated by chemical defence. Animal Behaviour 129: 213-222.

**Vojtek L., Dobeš P., Büyükgüzel E., Atosuo J., Hyršl P., 2014:** Bioluminescent assay for evaluating antimicrobial activity in insect haemolymph. European Journal of Entomology 111: 335-340.

**Ware R. L., Majerus M. E. N., 2008:** Intraguild predation of immature stages of British and Japanese coccinellids by the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. Biocontrol 53: 169-188.

**Zvereva E. L., Kozlov M. V., 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:** Přípravné práce – vážení, odebrání hemolymfy, počítání hemocytů při zakládání experimentu (experiment č.1).

**Příloha 2:** Slunéčko v Petriho misce s identifikačním kódem (experiment č. 1).

**Příloha 3:** Uvolněná hemolymfa slunéčka, které je přichyceno na lepicí pásku na Petriho misce (experiment č. 1 a 2).

**Příloha 4:** Pomůcky pro odběr hemolymfy (experiment č. 1 a 2).

**Příloha 5:** Slunéčka umístěna v Petriho misce s potravou, vodou a papírovou harmonikou (experiment č. 2).

**Příloha 6:** Odebraná hemolymfa ve skleněné mikrokapiláře (experiment č. 1 a 2).

**Příloha 7:** Počítání vajíček pomocí binokulární lupy (experiment č. 2).

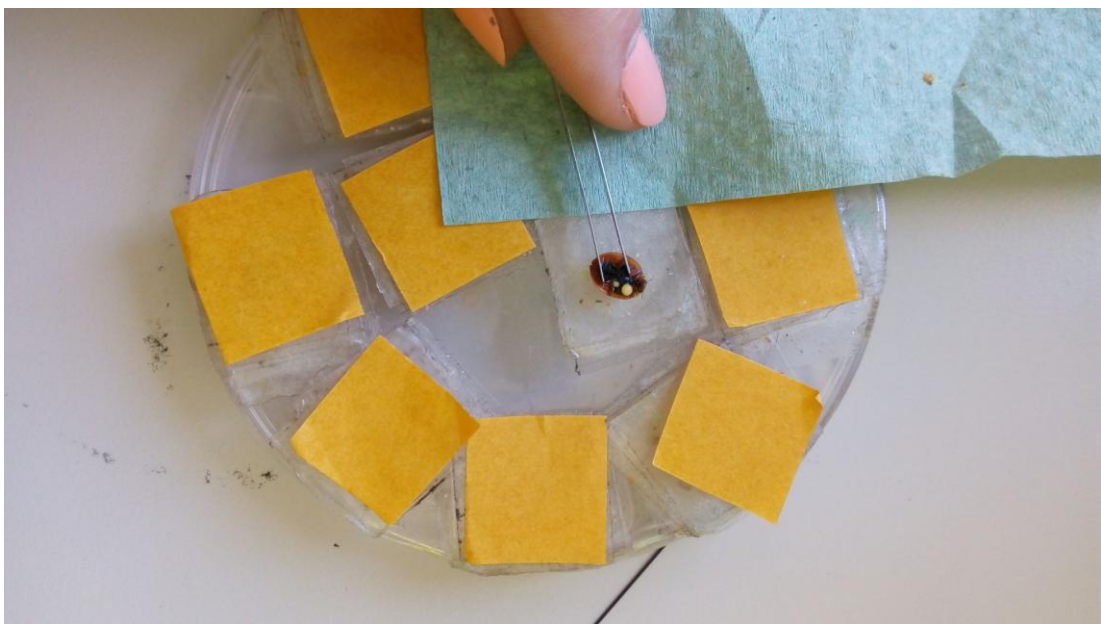
**Příloha 8:** Menší snůška vajíček (experiment č. 2).



**Příloha 1:** Přípravné práce – vážení, odebrání hemolymfy, počítání hemocytů při zakládání experimentu (experiment č.1).



**Příloha 2:** Sluněčko v Petriho misce s identifikačním kódem (experiment č. 1).



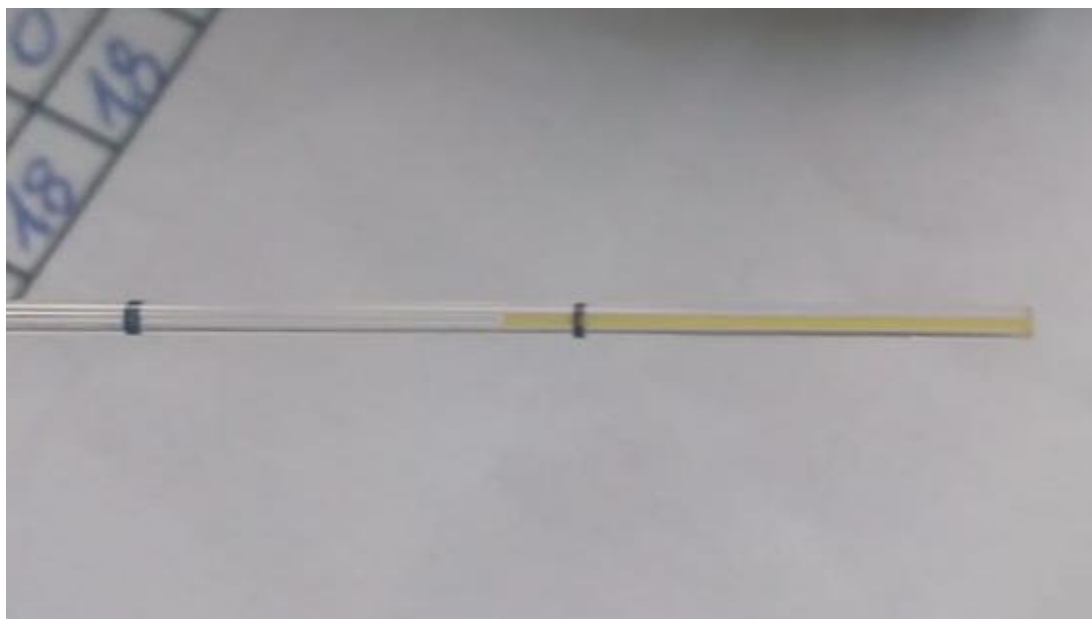
**Příloha 3:** Uvolněná hemolymfa sluněčka, které je přichyceno na lepící pásku na Petriho misce (experiment č. 1 a 2).



**Příloha 4:** Pomůcky pro odběr hemolymfy (experiment č. 1 a 2).



**Příloha 5:** Slunéčka umístěna v Petriho misce s potravou, vodou a papírovou harmonikou (experiment č. 2).



**Příloha 6:** Odebraná hemolymfa ve skleněné mikrokapiláře (experiment č. 1 a 2).



**Příloha 7:** Počítání vajíček pomocí binokulární lupy (experiment č. 2).



**Příloha 8:** Menší snůška vajíček (experiment č. 2).