

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie

Termální polymorfismus zlatohlávka *Pachnoda iskuulka*

Diplomová práce

Autor: Bc. Oto Petřík
Studijní program: N0588A030001 - Biologie a ekologie
Studijní obor: Biologie a ekologie - spec. biologie živočichů

Vedoucí práce: doc. Mgr. Petr Bogusch, Ph.D.
Odborný konzultant: Mgr. Petr Šípek, Ph.D.
Univerzita Karlova



Zadání diplomové práce

Autor: Bc. Oto Petřík

Studium: S21BI013NP

Studijní program: N0588A030001 Biologie a ekologie

Studijní obor: Biologie živočichů

Název diplomové práce: Termální polymorfismus zlatohlávka *Pachnoda iskuulka*

Název diplomové práce AJ: Thermal polymorphism of *Pachnoda iskuulka*

Cíl, metody, literatura, předpoklady:

O termálním polymorfismu u brouků toho není příliš známo. U nedávno popsáného druhu *Pachnoda iskuulka* byl zaznamenán polymorfismus u imag, jehož důvod není dosud prokázán. Cílem práce je chovem larev tohoto druhu zlatohlávka při různých teplotách prokázat či vyvrátit hypotézu, že teplota ovlivňuje výslednou barevnou kresbu dospělců tohoto druhu.

BOUVET, S. & DAVIES, L. & VERNON, P. All-year reproduction and possible thermal melanism in *Amblystogenium pacificum* (Coleoptera: Carabidae) on the sub-Antarctic Ile de la Possession (Iles Crozet). *Polar Biology*, 2007, 30: 253-260. Dostupné online: doi.org/10.1007/s00300-006-0240-4

DAVIS, A. L. V. & BRINK, D. J. & SCHOLTZ, C. H. & PRINSLOO, L. C., DESCHODT, C. M. Functional implications of temperature-correlated colour polymorphism in an iridescent, scarabaeine dung beetle. *Ecological Entomology*, 2008, 33: 771-779. Dostupné online: doi.org/10.1111/j.1365-2311.2008.01033.x

STANBROOK, R. A. & HARRIS, W. E. & WHEATER, C. & JONES, M. Evidence of phenotypic plasticity along an altitudinal gradient in the dung beetle *Onthophagus proteus*. *PeerJ*, 2021, 9: e10798. Dostupné online: doi.org/10.7717/peerj.10798

Zadávací pracoviště: Katedra biologie,
Přírodovědecká fakulta

Vedoucí práce: doc. Mgr. Petr Bogusch, Ph.D.

Datum zadání závěrečné práce: 24.1.2020

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedl všechny prameny, ze kterých jsem vycházel.

V Hradci Králové dne

Oto Petřík

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji tímto vedoucímu diplomové práce doc. Mgr. Petru Boguschovi, Ph.D. a odbornému konzultantovi práce Mgr. Petru Šípkovi, Ph.D. za jejich čas, vstřícný přístup a trpělivé a odborné vedení. Děkuji i Mgr. Ondřeji Šebestovi za digitální zpracování a vyhodnocení fotografií. Dále bych chtěl poděkovat rodině, přátelům a přítelkyni za velkou podporu při tvorbě této práce.

ANOTACE

PETŘÍK, O. *Termální polymorfismus zlatohlávka Pachnoda iskuulka*. Hradec Králové, 2023. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí diplomové práce doc. Mgr. Petr Bogusch, Ph.D. 59 s.

O termálním polymorfismu u brouků toho není příliš známo. U nedávno popsaneho druhu *Pachnoda iskuulka* byl zaznamenán polymorfismus dospělců, jehož důvod není dosud vysvětlen. Cílem práce je za pomoci manipulativního chovu při různých teplotách testovat hypotézu, že teplota ovlivňuje výslednou barevnou kresbu dospělců tohoto druhu. Rovněž byl sledován vliv teploty na délku vývoje a výslednou hmotnost dospělců.

Klíčová slova

Pachnoda iskuulka, termální polymorfismus, zbarvení, abiotické faktory, teplota, polymorfismus, melanismus, Cetoniinae

ANNOTATION

PETŘÍK, O. *Thermal polymorphism of Pachnoda iskuulka*. Hradec Králové, 2023. Master Thesis at Faculty of Science, University of Hradec Králové. Thesis Supervisor doc. Mgr. Petr Bogusch, Ph.D. 59 s.

A little is known about thermal polymorphism in beetles. A polymorphism of adults has been reported in the recently described species, *Pachnoda iskuulka*, for which the reason has not yet been found. The aim of this work is to test the hypothesis that temperature in the the larvae develop affects the colour pattern of adult beetles. The effects of temperature on the length of development and the resulting weight of adults were also investigated.

Keywords

Pachnoda iskuulka, thermal polymorphism, abiotic factors, temperature, polymorphism, melanism, Cetoniinae

OBSAH

Úvod	8
1. Literární přehled.....	10
1.1. O termálním polymorfismu	10
1.2. Studovaný druh.....	18
2. Metodika	20
2.1. Chov.....	20
2.2. Získávání dat.....	22
3. Výsledky	25
3.1. Sledování vývoje	25
3.2. Analýza zbarvení štítu a krovek.....	28
3.3. Tabulky dat.....	33
4. Diskuze	36
4.1. Vliv teploty na růstové charakteristiky.....	36
4.2. Teplotně podmíněná variabilita zbarvení	37
4.3. Problematika zbarvení <i>Pachnoda iskuulka</i>	38
Závěr	40
Literatura	41
Přílohy.....	51
I. Skript pro převod měřítka.....	51
II. Skript pro převod velikosti z pixelů na milimetry	52
III. Skript pro měření pravděpodobnostní mapy barev	53
IV. Skript pro měření pravděpodobnostní mapy barev ve formátu TIF	56

Úvod

Polymorfismus je jev, kdy jeden druh živočicha může existovat v různých formách (Klein, 1969). Tato variabilita může mít více příčin: dědičnost, sezonalita, sexualita (tzv. sexuální dimorfismus či dichroismus), kryptose a mnohé další. Polymorfismus může být zapříčiněn i abioticky – například nadmořskou výškou a s ní související rozdílnou teplotou, při které se vyvíjí juvenilní jedinec (Danks, 1994; Lo et al., 2011).

Pro hmyz je typická variabilita sexuální – pohlavní dimorfismus, který se projevuje rozdíly ve velikosti, zbarvení, tvaru končetin apod. Dobře známou formou pohlavního dimorfismu je i přítomnost tzv. sexuálních excesivních struktur. Jedná se o sekundární pohlavní znaky, které neposkytují obvykle žádnou výhodu v přežívání, naopak spíše překáží a jsou nápadné (např. ocasní pera samce páva). Mohou ale udávat způsob pohlavního výběru – jedinec s vyvinutějšími sekundárními pohlavními znaky se samici může jevit jako atraktivnější - a tím i biologickou zdatnost jedince, tedy potenciální počet potomků (Andersson, 1994; Emlen et al., 2007). U nejedné skupiny hmyzu lze nalézt polymorfismus kryptický – např. u potěnkovitých (Wanatabe et al., 2002) nebo u nočního motýla drsnokřídlce březového (jehož polymorfismus je nicméně častěji uváděn jako tzv. industriální melanismus, viz. Kettlewell, 1961 nebo Cook & Saccheri, 2013). Variabilita hmyzu může být ovlivněna i abiotickými faktory; typicky se setkáváme např. s geografickými formami různých druhů živočichů (např. McLean & Stuart-Fox, 2014).

Abiotické faktory ovlivňující vzhled živočichů zřejmě obvykle nefungují samostatně, ale vzájemně se doprovázejí. Je-li vedoucím faktorem teplota, označujeme variabilitu živočicha jako **termální polymorfismus**. Ten se obvykle projevuje melanismem, tedy výrazně zvýšenou pigmentací těla, či naopak jejím potlačěním (Kingsolver & Wiernasz, 1991; Clusella-Trullas et al., 2007). Termální melanismus je strategií, jakou se organismy potýkají s chladnějším prostředím. Tmavý povrch těla jim totiž umožňuje rychleji prohřát tělo působením slunečního záření a udržet si vyšší tělesnou teplotu i při relativně nižší teplotě okolí. Tato strategie se nicméně vyplatí zpravidla pouze v místech s dostatečným dopadem slunečního záření (Clusella-Trullas et al., 2007; Forsman, 2011) a má největší význam pro ektotermní živočichy, kteří větší podíl tělesného tepla získávají z okolního prostředí. Jejich evoluční úspěšnost je nemalým dílem závislá na optimalizaci využití dostupné energie. Melanické zbarvení těla však může znamenat také ztrátu původní kryptické či aposematické pigmentace, a s ním vyšší míru predace (Clusella-Trullas et al., 2007). Tento trade-off je dobře známý například u zmije obecné (*Vipera berus* Linnaeus, 1758), která melanismem přichází o své současně kryptické i aposematické zbarvení (Andrén & Nilson, 1981).

U hmyzu lze na termální polymorfismus narazit v několika případech. Saranče stěhovavá (*Locusta migratoria* Linnaeus, 1758) a saranče pustinná (*Schistocerca gregaria* Forskål, 1775) mohou nabývat různých odstínů podle teploty a barvy okolí, při velmi nízké teplotě se zbarvují až téměř černě. Nymfy těchto sarančí mohou být různě zbarvené podle abiotických podmínek, pokud se líhnou při nižší populační hustotě (Tanaka et al., 2016). V gregační fázi, kdy je jejich populační hustota naopak velmi vysoká, jsou nymfy zbarvené většinou tmavě až černě. To umožňuje tmavším jedincům rychlejší prohřátí a vyšší letuschopnost (Sugahara et al., 2016). U saranče obecné (*Pseudochorthippus parallelus* Zetterstedt, 1821) bylo navíc u tmavších forem zjištěno

zmenšování některých výstupků těla (křídla, končetiny atd.), což odpovídá Allenovu pravidlu (Köhler et al., 2017). Jako další příklad lze uvést pěnodějku obecnou (*Philaenus spumarius* Linnaeus, 1758), u které bylo popsáno celkem jedenáct různých barevných forem s různou mírou melanismu. Ve vyšších polohách byl zaznamenán procentuální nárůst tmavších forem (Berry & Willmer, 1986). Samice jsou přitom v průměru tmavší než samci, což jim může poskytovat výhodu při unikání predáčnickému tlaku; preferovanou kořistí se spíše stanou světlejší, pomalejší samci (Quartau & Borges, 1997). Jihoamerický vosík *Agelaia pallipes* (Olivier, 1791) má ve vyšších polohách tmavěji zbarvené mesoscutum (hřbetní štítek středohrudi), pod kterým se nachází létací svalstvo. U ostatních částí přitom nebyla tendence k termálnímu melanismu pozorována (De Souza et al., 2020). Z řádu brouků je dokumentováno nejvíce případů termálního polymorfismu u čeledi sluněčkovitých (Coccinellidae), dále mandelinkovitých (Chrysomelidae) a již podstatně méně z vrubounovitých (Scarabaeidae). Konkrétní případy zaznamenaného termálního polymorfismu jsou u brouků rozepsány v literárním přehledu.

Chov v živočichů v zajetí nám mimo jiné umožňuje sledovat, jak se v průběhu času a jednotlivých generací mění biologické charakteristiky jednotlivých druhů (např. Fletcher, 2001; Driscoll et al., 2009; Jakubec, 2016; Jakubec et al., 2020). Totéž může platit u chovu hmyzu – například Vendl et al. (2018) nebo Vendl & Šípek (2016).

V České republice se chovem brouků zabývá poměrně mnoho lidí již řadu let. Tato tradice vedla již ke vzniku nejedné publikace na toto téma (např. Čuřík, 1998; Klátil & Vrána, 2008). V průběhu chovů byl u některých druhů pozorován sklon k postupné melanizaci zbarvení (*Pachnoda fasciata* Fabricius, 1775, *Pachnoda interrupta* Olivier, 1789 – P. Šípek pers. observ.) Proto byla i v této práci využita možnost sledovat vliv teploty na zbarvení v kontrolovaném chovu u čerstvě importovaného, pro vědu doposud neznámého druhu. U zlatohlávka *Pachnoda iskuulka* Král, Sommer & Šípek 2019 byl v průběhu chovu v první generaci zaznamenán polymorfismus ve zbarvení dospělců, se specifickými proměnlivými znaky na předohrudi i na krovkách. Chování brouci představovali potomky exemplářů z typové série druhu. Tento materiál mohl být použit pro sledování vlivu teploty, ve které se vyvíjely larvy, na variabilitu ve zbarvení a délce vývoje. Cílem této práce je sledovat, zda a jak teplota během vývoje larev ovlivňuje výslednou velikost, hmotnost, zastoupení pohlaví, rychlost vývoje a zejména barevnou kresbu dospělců tohoto druhu.

Práce je rozdělena do čtyř částí. První částí je literární přehled, kde jsou shrnuty relevantní informace o různých typech termálního polymorfismu u hmyzu a specificky pak u brouků; v samostatné podkapitole je zde pak představen studovaný druh. Následuje metodická část, kde je podrobně popsán průběh experimentálních chovů a způsob zaznamenávání, měření a sběru dat pro výzkum. Třetí část tvoří výsledky zpracované ze získaných dat; nejprve vyhodnocení změn hmotnosti a rychlosti vývoje, zastoupení pohlaví a mortalita larev. Samostatně je přístupováno k měření zastoupení jednotlivých barev. Ve třetí podkapitole výsledků je pak obsažen i souhrn zpracovaných statistických dat. Čtvrtou část tvoří diskuze, kde jsou výsledky vyhodnoceny a srovnány s předešlými pracemi zabývajícími se termálním polymorfismem. Je zde také polemizováno o dalších faktorech, které mohly mít vliv na výsledek práce, a byly vzneseny návrhy na vylepšení případného dalšího výzkumu v této oblasti.

1. Literární přehled

1.1. O termálním polymorfismu

Polymorfismus je jevem, kdy jeden druh organismu může existovat ve více rozdílných formách. Z hlediska genetiky se jedná o přítomnost dvou či více genů pro stejný znak; organismus jako druh tedy může nabývat více fenotypů (Leimar, 2005). Někdy je tato definice konkretizována jako „více forem v jednom habitatu,“ čímž vylučuje případ geografického polymorfismu, nebo „více forem v jedné populaci“ (McLean & Stuart-Fox, 2014).

Polymorfismus jako fenomén lze rozlišit do několika typů. Již zmíněný geografický polymorfismus je vázaný na odlišné podmínky habitatů (biotické či abiotické) druhu v důsledku geografického oddělení. Pokud je variabilita geograficky podmíněna, může poměrně snadno vést ke speciaci a vzniku geografických variant či poddruhů (McLean & Stuart-Fox, 2014). Vůbec nejčastějším typem polymorfismu v živočišné říši je pohlavní dimorfismus (Danks, 1994), tedy jev, kdy se mezi sebou jednotlivá pohlaví liší. To se může projevit řadou způsobů; např. rozdílem ve velikosti, kdy je jedno pohlaví výrazně větší nežli druhé. U řady druhů (včetně hmyzu) jsou větší samice (Danks, 1994). To může být dáno potřebou klást velké snůšky či zabezpečit potomstvo. Příkladem může být obrovský pavouk rodu *Nephila* Leach, 1815, u kterého je samice mnohonásobně větší oproti samci (Higgins, 2002). Naopak u druhů, kde mezi sebou soupeří samci o přístup k samicím, jsou často výrazně větší samci. Frayer & Wolpoff, 1985; Danks, 1994). U těchto druhů skupin pak často dochází i ke vzniku sexuálních excesivních struktur (např. rohy či zvětšená kusadla), které slouží nikoliv pouze k odlišení samců od samic, ale zejména jako demonstrace genetické kvality a biologické zdatnosti jedince. Často tyto struktury neposkytují přímou výhodu při přežívání, spíše naopak (velké překážející rohy, ztráta krypte kvůli nápadnému zbarvení apod.), nicméně mohou sloužit k „poměřování“ nebo vnitrodruhovým soubojům o potenciálního sexuálního partnera (Andersson, 1994, Emlen et al., 2007).

U nejedné skupiny hmyzu lze nalézt sexuální dimorfismus ve formě redukce či úplné absence křídel u samic. Tento trade-off dává samicím výrazně vyšší reprodukční schopnost za cenu nízké schopnosti disperze potomstva i celkové schopnosti pohybu. Tomuto jevu se říká disperzní polymorfismus (Zera & Denno, 1997). Ten můžeme najít i například u některých roztočů. Cross et al. (1981) ve své práci popisují polymorfismus roztočů rodu *Pyemotes* s výskytem agilnější formy se štíhlejším tělem a formy zavalitější. Štíhlá forma je popisována jako disperzní, se zvýšenou schopností foréze (přemísťování na tělech jiných organismů) za cenu nižší fekundity.

Sexuální variabilita ve zbarvení, případně sexuální dichroismus, je z hmyzu zřejmě zdaleka nejnápadnější u motýlů (Allen et al., 2011). Jako příklad lze uvést nočního motýla hrotnořídlece chmelového (*Hepialus humuli* Linnaeus, 1758), kde sameček je obvykle svítivě bílý a samička pískově oranžovohnědá; někdy je však sameček zbarven stejně jako samička či ještě o něco tmavší. Tito méně nápadní samci mají pak větší zastoupení v lokalitách s intenzivní predací ptáky (Kaaber et al., 2009). U čeledi běláskovitých (Pieridae) může být zbarvení odlišné mimo viditelné spektrum, takže ačkoliv lidskému oku se obě pohlaví např. u japonského poddruhu běláška řepového (*Pieris rapae crucivora* Boisduval, 1836) zdají stejně zbarvená, oko motýla (dobře

vnímající UV záření) vidí samičku jako mnohem světlejší, protože zmnožený pigment pterin v jejích šupinách způsobuje zvýšenou odrazivost ultrafialového světla (Giraldo & Stavenga, 2007). U motýlů, ale i jiných skupin hmyzu, lze nalézt sexuální dimorfismus očí. Například samci severoamerické babočky *Asterocampa leilia* (W.H. Edwards, 1874) využívají své relativně větší složené oči k lepší orientaci v prostředí a zlepšení schopnosti najít potravu či samici (Ziemba & Rutowski, 2000). Relativně větší složené oči lze najít i u samců mnoha skupin dvoukřídlého hmyzu (Zeil, 1983; Sukontason et al., 2008). Byla zde dokumentována častá přítomnost zvětšených ommatidií na svrchní straně očí (v případě muchnice obecné, kterou se zabývá práce Zeil, 1983, pak byla zvětšená ommatidia na „svrchním“ složeném oku). Důvodem pro tento sexuální dimorfismus může být optická výhoda samců při pronásledování samice při zasnubném letu (Sukontason et al., 2008).

Zvláštním případem je sezónní polyfenismus, který lze nalézt u babočky sítkované (*Araschnia levana*). Tento jev je příčinou tvorby odlišných forem, vázaných na roční generace, které se vyvíjejí při odlišné délce světelné fáze dne. Výsledkem jsou jedinci téhož druhu stejné populace se zcela odlišným zbarvením (červenohnědá f. *levana* na jaře, tmavá f. *prosa* v létě a jakýsi mezistupeň na podzim u případné třetí podzimní generace f. *porima*). Jednotlivé formy jsou od sebe natolik odlišné, že dříve byly uváděny jako samostatné druhy. Tyto generace se mohou i překrývat a tvořit tak téměř plynulý přechod barevných forem (Fric & Konvička, 2002; Lohmann, 2006, Baudach & Vilcinskas, 2021).

Dobře zkoumán je i fenomén zvaný industriální melanismus. Ten byl pozorován nočního motýla drsnokřídlice březového (*Biston betularia* Linnaeus, 1758), který se přirozeně vyskytuje v bílé formě s drobnými černými skvrnami a ve formě zcela černé. Za dob průmyslové revoluce na území Anglie v důsledku znečištění ovzduší zcela vymizely epifytní lišejníky na kmenech stromů, na kterých tito motýli přes den odpočívají, což mělo za následek ztrátu kryptického zbarvení světlé formy a evoluční prosazení tmavé formy (Kettlewell, 1961; True, 2003; Cook & Saccheri, 2013).

Dalším typem je polymorfismus kryptický, který umožňuje živočichovi lépe splynout s okolím, obvykle rostlinou, která např. v suchém letním období může ztratit část chlorofylu, a jasně zelená strašilka či pakobylka by se na seschlé rostlině stala nápadnou. V rámci jednotlivých instarů proto mohou své zbarvení částečně přizpůsobovat (Yang et al., 2021). Podobně fungují i někteří potěnkovití brouci, zahrabávajících se do písku – brouci přizpůsobují své zbarvení barvě pláže, na které žijí (Wanatabe et al., 2002). Příným opakem je polymorfismus aposematický, kdy se naopak živočich snaží být co nejvíce nápadný, buď aby upozornil na vlastní jedovatost (aposematismus), nebo se snaží napodobit jiného jedovatého živočicha (müllerovské či batesovské mimikry). Dobře známým příkladem jsou jihoamerické babočky rodu *Heliconius* Kluk, 1780. Většina druhů z této skupiny je nepalatabilních; tomu odpovídá i jejich výstražné zbarvení. Některé druhy přímo benefitují ze sdílení habitatu s jinými nepalatabilními druhy motýlů (např. rod *Melinaea*) a snaží se napodobit jejich zbarvení. V tomto případě se jedná o müllerovské mimikry (Langham, 2004). Zde je pak možné pozorovat projev konvergence, kdy se stejný výstražný vzor vyskytne u několika často nepříbuzných druhů motýlů, z nichž všichni napodobují stejný aposematický vzor (Brower, 1994). Naopak sami motýli rodu *Heliconius* mohou být vzorem pro výstražné zbarvení palatabilních otakárků *Papilio zagreus* Doubleday, 1847.

V tomto případě se naopak jedná o batesovské mimikry (Bossart, 1995). U tropických pralesniček byla pozorována fenotypová plasticita tohoto aposematismu v závislosti na predátorech, kteří se orientují pomocí zraku; zejména ptáky (Noonan & Comeault, 2009). Asi nejzvláštnějším typem polymorfismu je kastovní polymorfismus. Ten lze najít u eusociálního hmyzu – např. termitů, společenských včel nebo mravenců, u nichž odlišnou výživou ve stadiu larvy vzniká dělnice či královna, popř. další kasty podle konkrétních skupin (Traniello & Rosengaus, 1997). Polymorfismus může vznikat i v rámci jediné kasty, aby se kolonie lépe vypořádala např. s různě velkými predátory nebo různorodou potravou (Retana & Cerdá, 1994).

Často je variabilita živočichů ovlivněna abiotickými faktory. To platí dvojnásob pro ektotermní organismy, jejichž teplota se odvíjí primárně od okolních podmínek. Tato variabilita přitom nemusí být dědičná (v opačném případě může jít o již zmíněný geografický polymorfismus), jednoduše se projeví podle stávajících podnebných podmínek habitatu. Z abiotických faktorů jsou nejvýraznějšími činiteli nadmořská výška, teplota, množství dopadajícího slunečního záření, vlhkost prostředí a zeměpisná šířka. Tyto proměnné zpravidla fungují společně (např. ve vyšších nadmořských polohách bývá chladněji a více vlhko, blíže rovníku tepleji), obvykle tudíž nelze s jistotou označit polymorfismus za ovlivněný jen jedním z těchto faktorů (např. Martínez-Freiría et al., 2020). Obecně se má za to, že účelem polymorfismu vázaného na komplex těchto abiotických faktorů může být snaha o optimalizaci vlastních termoregulačních procesů (Clusella-Trullas et al., 2009). To se v zásadě děje dvěma způsoby; změnou barvy povrchu těla za účelem regulace absorpce slunečního záření (Endler, 1978) a změnou velikosti těla, resp. poměru velikosti povrchu a objemu, čímž přímo ovlivňuje výdej tepla do okolí (např. Köhler et al., 2017). Zde se uplatňuje Allenovo pravidlo, které je většinou spojované s endotermními živočichy, někdy je však aplikováno i na hmyz (Bidau & Martí, 2008). Například u rovnokřídlých se může projevit zmenšováním výběžků těla (končetin, tykadel, křídel) při nižších teplotách, čímž efektivně zmenšují vlastní povrch těla (Köhler et al., 2017).

Nejčastějším projevem termálního polymorfismu je melanismus. Ten je způsoben zvýšenou koncentrací melaninu, pigmentu způsobující tmavé zbarvení (většinou hnědé až černé). Na rozdíl od obratlovců, u kterých je mechanismus vzniku melanismu poměrně dobře znám, je nicméně molekulární podstata vzniku melanismu u hmyzu dosud nedostatečně prozkoumána (True, 2003). Důsledkem melanismu je tmavší povrchová barva a vyšší míra pohlcení slunečního záření. Ačkoliv tímto živočich často pozbývá jinak kryptického či aposematického zbarvení (jako je tomu např. u černě zbarvených zmijí; viz Andrén & Nilson, 1981; Martínez-Freiría et al., 2020), přírodním výběrem se tyto formy v určitých podmínkách prosazují. Fenomén termálního melanismu si lze vyložit i opačně; v teplých oblastech s velkou intenzitou slunečního záření je pro organismy výhodnější světlejší a lesklejší povrch těla, který co největší množství sluneční energie odrazí a nepřehřál se (Clusella-Trullas et al., 2008). Melanické zbarvení často může fungovat i jako ochrana před UV zářením, proto lze naopak ve slunnějších oblastech někdy nalézt tmavší formy (to se týká i např. člověka). Tento jev lze očekávat u organismů, kde potřeba optimalizovat termoregulaci je upozaděna potřebou chránit se proti nepříznivým složkám slunečního záření (Hessen, 1996; De Souza et al., 2020).

Melanické zbarvení však není vždy teplotně závislé. Obvykle je jeho mechanismus jednoduše dědičný a může se tudíž v populaci organismu vyskytnout náhodně či jako mutace

(např. King, 2003). Protože melanismus není zdaleka vždy výhodný, objevuje se u mnohých živočichů jako projev fenotypové plasticity (Drent & Piersma, 2003); nicméně i tehdy je třeba brát v potaz více proměnných (slunečnost, vlhkost, způsob držení těla, doba aktivity apod.), než jen teplotu okolí.

Všeobecně se má za to, že nižší teplota má za následek větší velikost v dospělosti a naopak – je možné narazit na spojení „temperature–size rule“ (TSR; např. Verberk et al., 2021). Protože téměř všechny fyziologické procesy jsou závislé na teplotě, dal by se však předpokládat opak – při vyšší teplotě větší velikost dospělců za stejnou dobu vývoje. Odpovědí může být Bergmannovo pravidlo, podle kterého je pro organismy ve vyšších teplotách výhodnější menší velikost a naopak, kvůli lepšímu poměru objem – povrch. Ačkoliv je toto pravidlo spojováno zpravidla s teplokrevnými živočichy, zřejmě platí i pro velkou většinu ektotermních organismů (Walters & Hassall, 2006), a to nezávisle na taxonu či abiotických faktorech, což může znamenat velmi primitivní fyziologický mechanismus (Klok & Harrison, 2013). Tento jev byl zkoumán například u motýlic (Odonata: Zygoptera), kdy průměrná sezónní teplota negativně koreluje s délkou křídel dospělců. Dospělci vylíhnutí později v létě jsou tudíž menšího vzrůstu (Wonglersak et al., 2020).

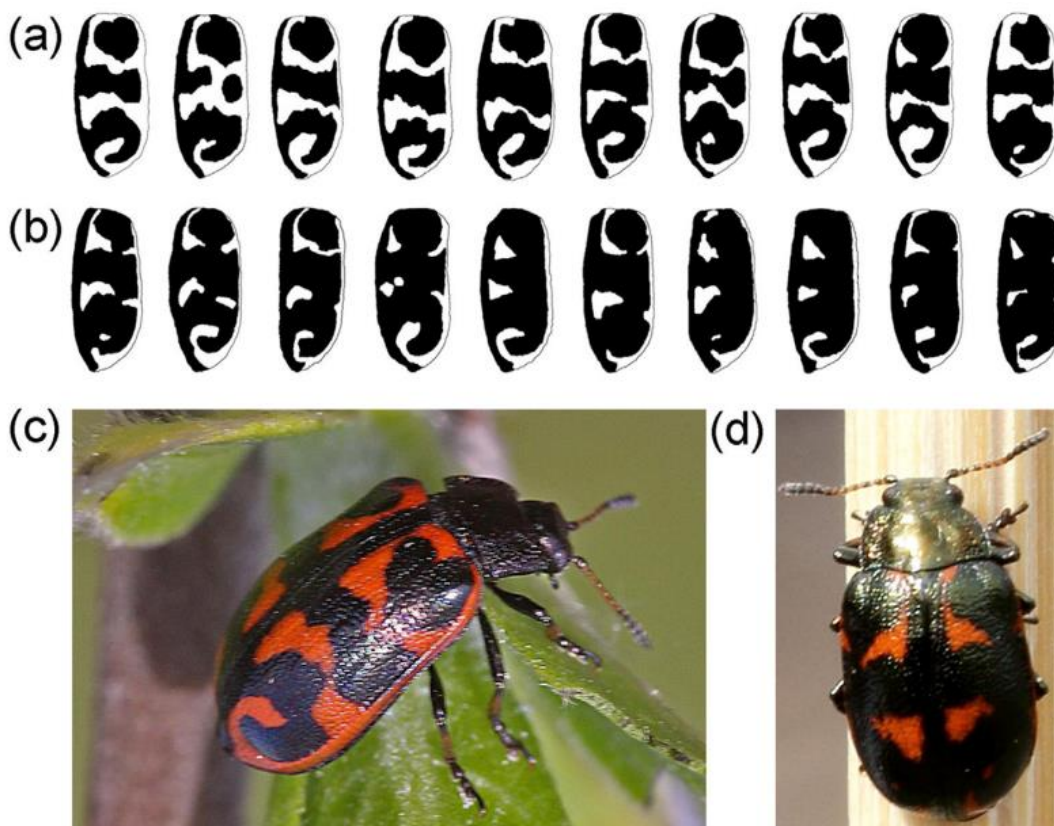
Obvykle také platí, že v rámci teplotní valence organismu má vyšší teplota za následek rychlejší míru vývoje i růst (Gilbert & Raworth, 1996). Vyšší teplota má za následek zejména rychlejší metabolismus; alespoň za předpokladu stejné přístupnosti potravy (Clissold & Simpson, 2015). Další proměnnou je nerovnoměrný vztah teploty vůči růstu a vývoji, který se navíc může měnit v průběhu ontogeneze. V případě ektotermních organismů „dodržujících“ pravidlo TSR se tedy dá předpokládat, že při vyšší teplotě se výrazně více zrychlí míra vývoje a dospívání nežli samotný růst, což má za následek dospělé menší velikosti, ale s rychlejším vývojem (Forster & Hirst, 2012).

Z řádu Coleoptera je asi nejlépe zdokumentován termální polymorfismus u slunéček (Coccinellidae), zejména pak u slunéčka dvojtečného (*Adalia bipunctata* Linnaeus, 1785) a slunéčka východního (*Harmonia axyridis* Pallas, 1773), např. Brakefield, 1984a; Brakefield, 1984b; Brakefield & Willmer, 1985; Michie et al., 2010; Honek et al., 2020. Termální polymorfismus, respektive melanismus, se u slunéček projevuje rozsahem černých skvrn; v extrémních případech jejich absencí či naopak úplných pokrytím povrchu tmavou barvou (Stuart-Fox et al., 2017). Slunéčko východní, *H. axyridis*, dokonce vykazuje termální polymorfismus kukly, která je u slunéček „odhalená“ přírodním vlivům – není zahrabaná v zemi ani v kokonu či komůrce, místo toho je zavěšená obvykle na listu – a pro optimalizaci termoregulace je zbarvení kukly odlišné podle teploty prostředí v posledním stadiu larvy. Zbarvení ani barevný vzor kukly však nekoreluje se zbarvením dospělého (Nedvěd, 2011).

Samotný melanismus je v případě slunéček výhodný zejména v zimním období; tmavší jedinci pohlcují mnohem více slunečního záření a podle práce Brakefield & Willmer (1985) tak teplota těla melanicky zbarvených *A. bipunctata* může být v průměru až o 2,1 °C vyšší než u světle zbarvených jedinců při stejných podmínkách. V oblastech, které jsou více vystaveny slunečnímu záření, lze naopak předpokládat světleji zbarvená slunéčka a méně jejich melanických forem (Asiri & Foster, 2022). Důležitou proměnnou ve velké variabilitě ve zbarvení však může být i nenáhodné páření dospělců; světlejší samci f. *succinea* jsou u samic populárnější než samci

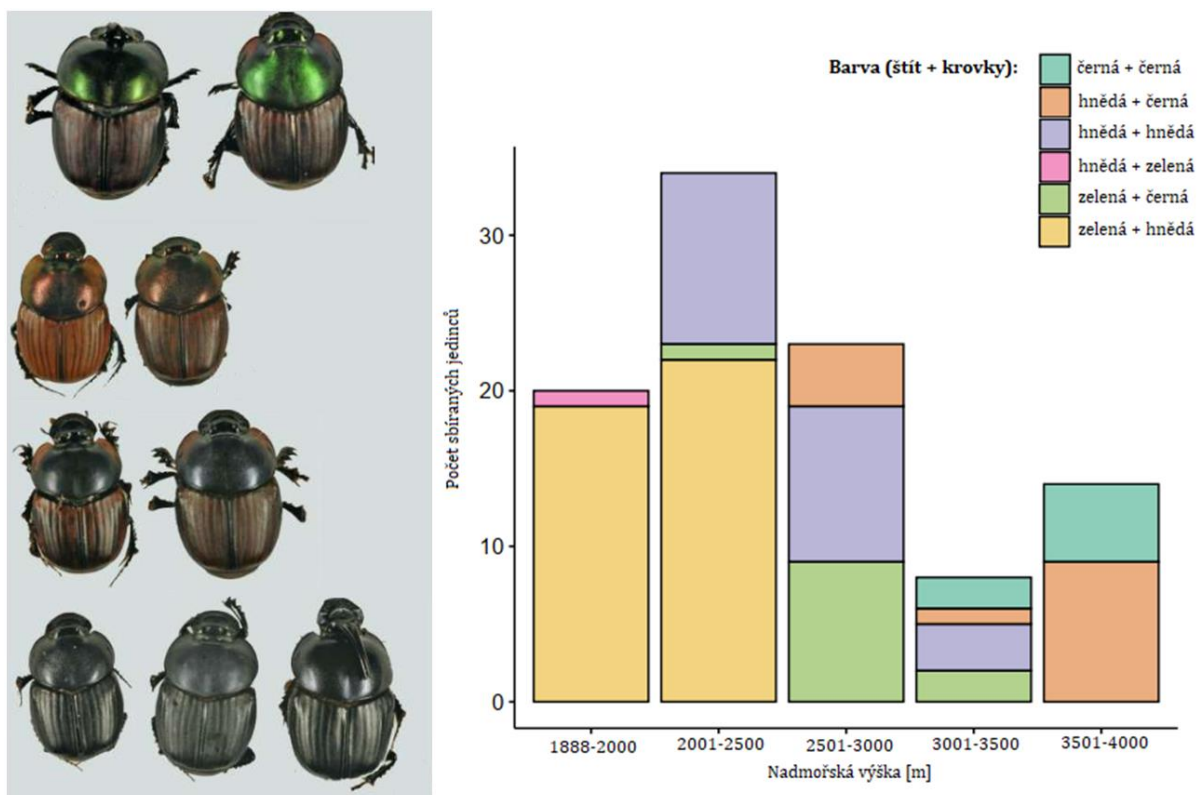
relativně malém území), která je patrná u původních asijských populací, se u evropských či amerických populací nevyskytuje vůbec (Honek et al., 2020).

Polymorfismus ve zbarvení lze nalézt i u mandelinky *Chrysomela lapponica* Linnaeus, 1758, která má svůj areál rozšíření ve střední a severní Evropě. Práce Gross et al. (2004) odhalila, že rozsah černě zbarvených skvrn na jinak červených krovkách brouků je u populací z finského Laponska (68 % plochy krovek) vyšší oproti České republice (51 %). Variabilita zbarvení je ilustrována **obrázkem č. 2**. Tmavší barva umožňuje laponským populacím výrazně vyšší aktivitu za nižších teplot. Je nicméně nutno vzít v potaz odlišnou zeměpisnou šířku výskytu těchto populací, což může mít za následek jistou izolovanost populací a jejich geografické odlišení. Fenotypová plasticita melanismu ale nebyla v případě *C. lapponica* zkoumána (například chovem brouků z laponské populace v podmínkách ekvivalentních české populaci a naopak), a je tudíž těžké říci, že se skutečně jedná o termální polymorfismus. Nicméně Gross et al. (2004) také uvádějí výskyt melanické formy této mandelinky ve vyšších polohách Francouzském středohoří, ačkoliv geograficky blízké neizolované populace (Německo a Polsko) žijící v nižších polohách jsou světleji zbarvené. Tyto populace se nicméně liší i živnou rostlinou; horské populace se živí na vrbách (*Salix spp.*), zatímco nížinné středoevropské populace se živí břízou (*Betula spp.*). Nížinné populace se světlejším zbarvením jsou také vystaveny obvykle mnohem větším výkyvům teplot během roku (Zvereva et al., 1995; Zverev et al., 2018).



Obrázek č. 2: Mandelinka *Chrysomela lapponica*. Ukázka klasifikace (a) světlých a (b) tmavých forem a příklady světle (c) a tmavě (d) zbarvených jedinců. Převzato z: Zverev et al., 2018.

V případě vrubounovitých (Scarabaeidae), kam se taxonomicky řadí i *Pachnoda iskuulka*, byl termální polymorfismus dosud zkoumán jen v několika málo případech. Jako příklad lze uvést jihoafrického chrobáka *Gymnopleurus humanus* MacLeay, 1821 nebo lejnožrouta *Onthophagus proteus* D'Orbigny, 1902. Oba tyto druhy mají tzv. iridescentní zbarvení, jehož výsledná barva mění odstín podle úhlu pozorování (Mason, 1927). Lidskému oku se tak jejich barva jeví jako kovově modrá, zelená, měděná či leskle černá. *Gymnopleurus humanus* tvoří různé barevné populace s víceméně plynulým přechodem výskytu podle zeměpisné šířky. Na relativně chladnějším jihu Afriky převládají brouci s modrým odleskem, který pomáhá dospělcům rychleji se prohřát na slunci a udržet si relativně vyšší tělesnou teplotu. V teplejších částech areálu výskytu směrem k rovníku jsou pak běžnější zeleně nebo měděně zbarvení jedinci. Zajímavé je, že v lokalitách se střední teplotou je možné nalézt jedince tohoto chrobáka všech barevných variant ve víceméně vyrovnaném poměru (Davis et al., 2008). Víceméně podobně se projevuje zbarvení u lejnožrouta *Onthophagus proteus*, který je ale horským druhem - nalézá se pouze ve vysokých polohách Ugandy, Keni a Tanzanie – a jeho barevná variabilita je tak svázána hlavně s nadmořskou výškou, ve které se vyskytuje. Ta se pohybuje od 2 500 do asi 4 000 m n. m. Stanbrook et al. (2011) popsal celkem šest barevných forem, které sestávají z různých kombinací zelené, hnědé a černé. V nejvyšších polohách brouci výrazně tmavnou (v podstatě už se zde nalézají už jen černí a černo-hnědí brouci). Příklady barevných forem a graf jejich zastoupení napříč měnicí se nadmořskou výškou jsou znázorněny v **obrázku č. 3**.



Obrázek č. 3: Příklady zkoumaných barevných forem *O. proteus* (vlevo) a jejich zastoupení v různých nadmořských výškách (vpravo). Převzato z: Stanbrook et al., 2021 (upraveno).

Polymorfismus těchto brouků je velmi pravděpodobně ovlivněn přinejmenším geograficky (zeměpisnou šířkou u *G. humanus*; viz Davis et al., 2008), popřípadě topograficky (u *O. proteus* zbarvení přímo koreluje se změnou nadmořské výšky; Stanbrook et al., 2021). V obou případech je však zřejmá tendence optimalizovat termoregulaci při trvale nižších teplotách. Mimo to je ovšem nutné podotknout, že zbarvení těchto brouků je strukturální, a jeho vznik a funkce se tudíž může lišit od dosud probíraných skupin. Ačkoliv strukturální zbarvení může mít za správných podmínek stejně dobrý termoregulační efekt jako pigmentové zbarvení, podle práce Schultz & Headley (1987) mívá obecně hmyz se strukturálně utvářeným zbarvením nižší teplotu těla než stejně barevný hmyz s pigmentově utvářeným zbarvením ve stejných podmínkách. To je zřejmě způsobeno vysokým leskem kovových strukturálních barev. Mason (1925) také uvádí skutečnost, že existence hned několika vrstev chitinu lámající a odrážející světlo může sloužit jako účinný světelný reflektor.

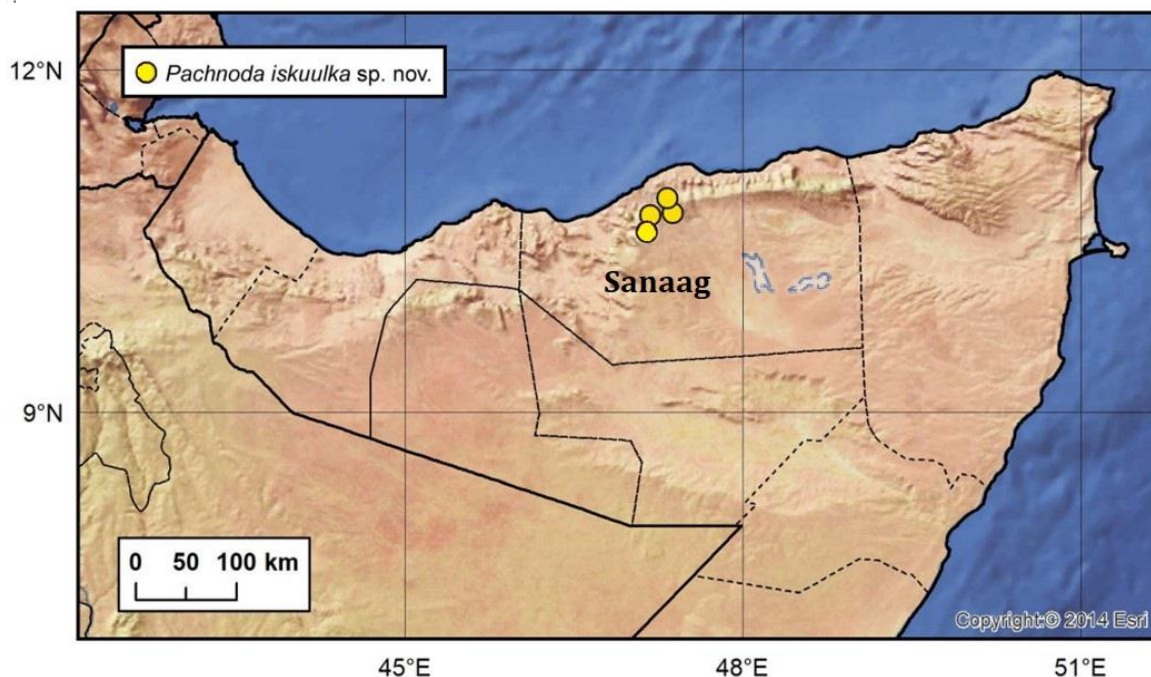
Dalším příkladem polymorfismu ve zbarvení je listokaz *Pelidnota punctata* (podčeleď Rutelinae), který má areál rozšíření přes většinu území Severní Ameriky, od Kanady až po Floridu a Texas. Severnější populace mají vždy dobře patrné skvrny na krovkách a předohrudi (na které odkazuje i druhové jméno) a tmavé končetiny. Populace z jižních částí Spojených států amerických naopak skvrny často úplně pozbývají a končetiny nabírají světlé barvy. Variabilita ve zbarvení je natolik velká i v malých regionech, že jednotlivé formy byly v minulosti považovány za samostatné druhy. Není známo, co je příčinou tohoto polymorfismu, nicméně Moore et al. (2017) přisuzují velký vliv výživě larvy, podmínkám během vývoje a době strávené v larválním stadiu.

Z podčeledi zlatohlávkovití (Cetoniinae), ačkoliv se jedná o barevně velmi rozmanitou a atraktivní skupinu a polymorfismus jako takový zde není výjimkou (Tesař, 1935; Wu et al., 2022), dosud nemáme žádné potvrzené ani známé řádně zkoumané případy termálního polymorfismu.

1.2. Studovaný druh

Zlatohlávek *Pachnoda iskuulka* je zástupce podčeledi Cetoniinae, čeledi Scarabaeidae. Rod *Pachnoda* je nejhojněji zastoupen v tropické Africe, několik druhů je však možno nalézt v Sahelu (přechodovém území oddělující Saharu od afrických savan a tropických pralesů) a dokonce na jižní části Arabského poloostrova, zasahuje tedy geograficky poměrně daleko mimo tropický podnebný pás (Baraud, 1985; Bezděk, 2016; Desborders, 2016). Rod *Pachnoda* v oblastech původních areálů výskytu považován za zemědělského škůdce, zejména na čiroku (Bengtsson et al., 2009), prosu (Sastawa & Lale, 2000) či ledvinovníku (Muntala et al., 2021) V akademickém poli je zřídka využíván pro laboratorní chov (např. Donaldson, 1984) nebo biochemický výzkum spojený zejména s metabolismem létacích svalů (např. Zebe & Gäde, 1993; Auerswald & Gäde, 1999; Auerswald & Gäde, 2002).

Pachnoda iskuulka pochází ze Somálska, konkrétně z oblasti Sanaag na severovýchodě země Somaliland či Somálijsko (viz **obrázek č. 4**). V současnosti je znám pouze ze západní části pohoří Cal Madow v nadmořské výšce 1400-2180 m n. m (Král et al., 2019).



Obrázek č. 4: Mapa severního Somálska s vyznačením známého výskytu *Pachnoda iskuulka*. Převzato z: Král et al., 2019 (upraveno).

Pohlavní dimorfismus tohoto brouka je nevýrazný, samci se od samice liší jen mělkou rýhou na ventrální straně zadečkových článků. Velikost se pohybuje mezi 24-28 mm. Na základě studií u jiných druhů rodu lze předpokládat existující, nicméně nesignifikantní rozdíl ve velikosti samců a samic (Vendl et al., 2016; případně i Vendl et al., 2018). Brouci vykazují barevnou variabilitu dorsální strany, respektive předohrudi a krovek (hlava je vždy černá). Na zadní části předohrudi se nachází vždy černá skvrna, která má různý tvar i velikost a v extrémním případě může přecházet přes celou délku pronota až k hlavě. Největší proměnlivost lze pozorovat ve

velikosti a tvaru žlutých skvrn na přední části a červeno-černého lemování na střední a zadní části krovek. Vzácnější je mírná variabilita ventrální strany. (Král et al., 2019).



Obrázek č. 5: Dospělec *Pachnoda iskuulka*. Vlevo dorsální strana, vpravo ventrální. Autor: Oto Petřík

Pachnoda iskuulka byl poprvé pozorován týmem českých vědců z Karlovy Univerzity v Somálském regionu Sanaag ve vesnici Buq v nadmořské výšce asi 1730 m n. m. na podzim roku 2018. Jeho druhové jméno je odvozeno od místa jeho nálezu; okolí místní školy („iskuulk“ v somálsčině). Brouci se nacházeli v korunách akácií a byli aktivní i za teplot okolo 40 °C (Král et al., 2019). Za účelem popisu larev bylo celkem dovezeno a úspěšně rozmnoženo sedm brouků (tři samci a čtyři samice). Díky podobnosti chovu s běžně chovanými zlatohlávkami rodu *Pachnoda* se druhu daří v tuzemských amatérských chovech a dnes se jedná o jednoho z nejčastěji chovaných zlatohlávků ve střední Evropě.

2. Metodika

2.1. Chov

K chovu a následnému výzkumu bylo v dubnu roku 2020 poskytnuto celkem 10 čerstvých párů *Pachnoda iskuulka* druhé filiální generace po dospělých odchycených v přírodě (F2). Brouci byli neaktivní, a tudíž ještě nespáření. Jedinci mateřské generace byli chováni společně ve faunáriu Exo Terra o objemu 20 litrů a rozměrech 37 x 22 x 24,5 cm s dostatečným svrchním větráním (viz **obrázek č. 6**). V dalších generacích byli brouci chováni odděleně podle teploty, ve které byli inkubováni, tj. dospělci z 24 °C v jednom faunáriu, dospělci z 27 °C v dalším atd. Tento způsob rozdělení byl aplikován po celou zbývající dobu výzkumu. Boxy byly přibližně do dvou třetin vyplněny drcenou listovou hrabankou pro chov zlatohlávků. Všechny boxy byly každý den od 9.00 do 19.00 osvětleny LED páskem pro simulaci slunečního svitu. Pro všechny tři boxy byly podmínky nastaveny stejně.

Chovné podmínky byly zřízeny podle klasického vzoru chovu brouků rodu *Pachnoda*; vlhkost substrátu byla zvolena střední až mírně sušší (nebylo měřeno) a doplňována mírným postřikem vodou každý den. Teplota byla ponechána pokojová – 22 °C. V dalších generacích byl v návaznosti na poznámku v původním článku (vyšší aktivita i při teplotách okolo 40 °C) přidán ještě výhřevný prvek ve formě topného kamene, který lokálně zvýšil teplotu v místě styku až na 35 °C a výrazně zvýšil míru kladení samic, aby bylo zajištěno dostatečné množství potomků pro další chov a výzkum. Brouci byli krmeni obden zralým banánem, který byl pravidelně vyměňován a pro zpestření na základě doporučení dalších chovatelů střídán salátovou okurkou.



Obrázek č. 6: Faunárium s chovem dospělců *P. iskuulka*. Autor: Oto Petřík

Chovné boxy byly jednou týdně prohledávány a vylíhlé larvy separovány kvůli riziku kanibalismu, který je u larev rodu *Pachnoda* častým jevem. Z důvodu omezené kapacity inkubátorů i vhodnějšího rozložení práce byl chov rozdělen do fází, které kopírovaly odchované generace brouků. Počet nakladených vajíček byl zprvu nízký, zřejmě kvůli chybějícímu lokálnímu výhřevu, a tudíž příliš nízké teplotě. Z toho důvodu bylo v první generaci inkubováno pouze 69 larev. V dalších generacích byla tato chyba opravena a počet larev v jedné generaci výzkumu byl omezen již pouze kapacitou inkubátorů.

Výzkum probíhal formou kontrolovaného chovu larev ve třech inkubátorech při rozdílných teplotách: 24 °C, 27 °C a 30 °C. Použity byly inkubátory Lucky Reptile Herp Nursery II, které byly osazeny lepšími termostaty a dalšími prvky pro přesnější držení teploty a lepší inkubaci. Vlhkost v inkubátorech nebyla regulována. Larvy byly rozděleny po jedné do perforovaných plastových vaniček o objemu 250 ml. Jako krmení byla použita drcená ztuhlá listová hrabanka s hlavním podílem dubu. Hrabanka pocházela ze stejného zdroje (okolí Chvaletic, asi 220 m n. m.) po celou dobu chovu. Boxy jí byly naplněny přibližně do 90% objemu. Hrabanka byla měněna ve chvíli, kdy byly viditelně spotřebovány alespoň dvě třetiny hrabanky, aby nebyla omezena možnost pro larvu substrát požírat. K tomu docházelo přibližně jednou za měsíc; ke konci vývoje, kdy je larva větší a rychleji spotřebovává potravu, bylo třeba individuálně měnit substrát i častěji. Současně byla vždy alespoň jedna čtvrtina objemu staré hrabanky při výměně ponechána a larva umístěna do ní, aby se předešlo případnému stresu larvy z odlišné teploty či vlhkosti nové hrabanky. Současně tak byla zachována přítomnost původního edafonu, který se účastní rozkladných procesů substrátu. Kontrola a zápis dat (instary, kuklení, úhyny) byly prováděny jednou týdně.

Larvy se kuklily v kokonech ze směsi hrabanky a exkrementů a obvykle byly nalepeny na stěnu boxu. Pro přehlednost byly kokony umístěny naležato na povrch substrátu ve vaničce a do stěny byl pinzetou utvořen otvor o průměru přibližně 2 mm, kterým byl kontrolován vývoj larvy uvnitř. Toto bylo prováděno minimálně dva týdny po nalezení kokonu, aby se zabránilo rušení prepupálního stadia larvy v kokonu, která by na vyrušení mohla reagovat opuštěním kokonu. Po zakuklení byla mírně snížena vlhkost v boxu, aby se předešlo vzniku plísní, které by byly pro kuklu letální. V některých případech kokon larvy z části přímo tvořila stěna vaničky, takže bylo možno skrz průhledný plast dobře sledovat proměnu larvy v kuklu a posléze v brouka, aniž by došlo k narušení mikroklimatu kokonu. V takových případech nebylo s kokonem až do vylíhnutí dospělce nijak manipulováno.

Vylíhnutí dospělci byli po viditelném zatvrdnutí a dokončení zbarvení krovek vyjmuti z kokonů a zváženi na analytických vahách. Tento postup byl aplikován, neboť bylo pozorováno, že jedinci, kteří se po aktivaci dostali z kokonu samovolně, již mohli vypudit ze zadečku tekutinu, která vznikla hromaděním metabolitů ve stadiu kukly (tzv. mekonium). K tomuto výronu dochází, ale také nemusí dojít při prvním ohrožení brouka (tedy i při první manipulaci s aktivním broukem), který se tak snaží sám odlehčit. Vzniká tak výrazný úbytek hmotnosti (odhadem asi o 150-200 mg), který způsobí značnou odchylku ve vztahu velikosti, hmotnosti a teplotě inkubace. Po změření byli brouci umístěni do chovných boxů a využiti pro další chov.

2.2. Získávání dat

Hlavní částí sběru dat bylo pořizování detailních snímků dorsální strany dospělých brouků. K tomu byl použit fotoaparát Canon 550D s objektivem Canon MP-E 65mm f/2.8 1-5x Macro, umístěný na stativu. Fotografovaný brouk byl osvětlen bodovými světly ze dvou stran (tzv. „husí krky“ - OMLED-DP8W LED Dual Gooseneck Light). U těchto snímků byla dále digitálně zpracována data o poměru tří základních barev: černé, červené a žluté. Poměr jejich zastoupení na povrchu krovek a předohrudi byl stěžejní proměnnou pro pozorování termálního polymorfismu u zlatohlávka *Pachnoda iskuulka*. K pořízeným fotografiím bylo vyfotografováno současně i měřítko, pomocí kterého bylo možno změřit rozměry brouka a celkovou plochu krovek a předohrudi.

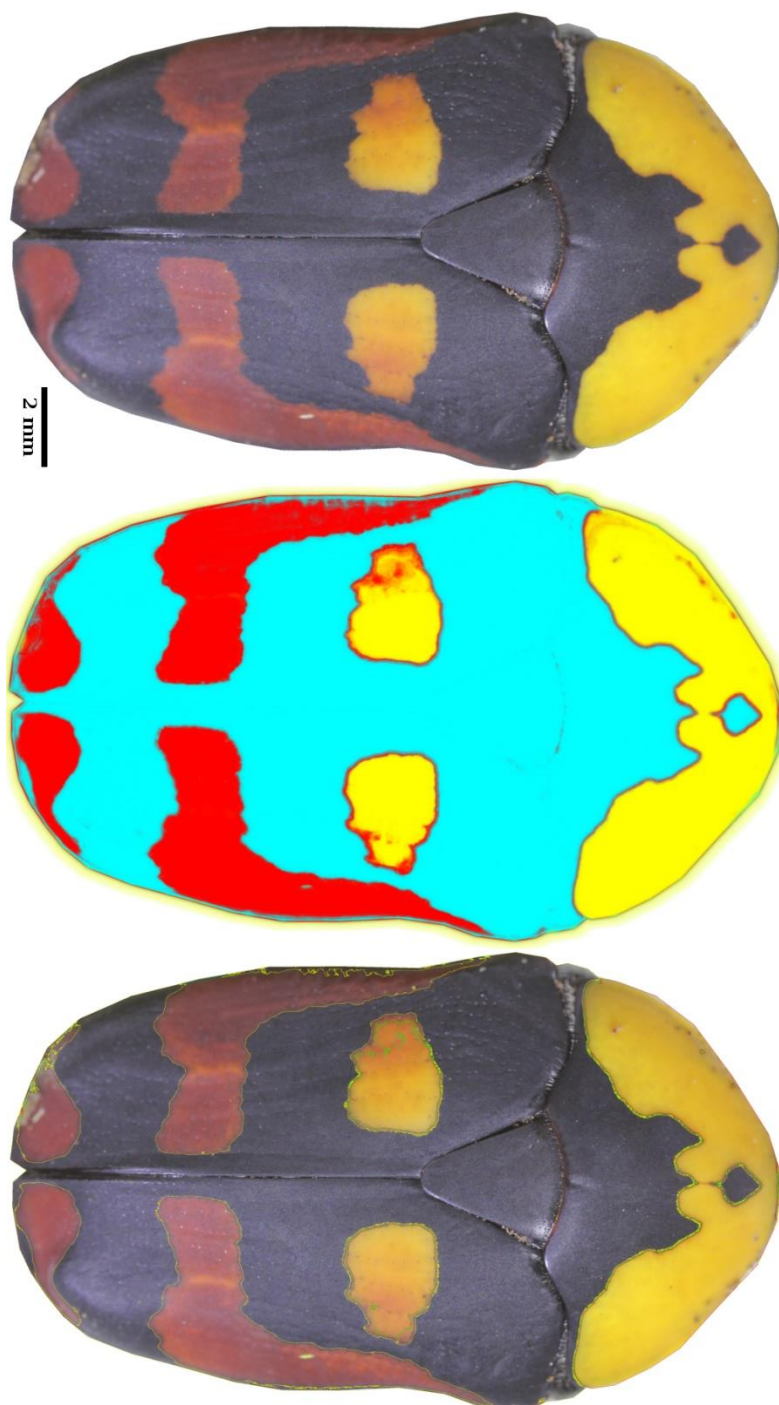
Fotografie brouků na bílém pozadí byly ručně ořezány od vyčnívajících končetin, tykadel a problematického stínu. Všechny fotografie byly natočeny hlavou brouka jedním směrem. Velikost pixelu jednotlivých fotografií bylo nastaveno podle vyfocených měřítek (skripty v přílohách). Následně byla část náhodně vybraných fotografií použita k natrénování machine learning algoritmu k pixelové klasifikaci tak, aby byly co nejlépe klasifikovány černé a barevné části brouka a bílé pozadí. K tomu byl použit open-source software Ilastik verze 1.3.3post3. Výstupem této klasifikace byla pravděpodobnostní mapa, podle které bylo možné segmentovat barevné skvrny, černé části a celého brouka (viz **obrázek č. 7**; skript v přílohách). Byla měřena plocha těchto oblastí a vypočítáno procentuální zastoupení žlutých, červených a černých ploch. K segmentaci pravděpodobnostních map a měření ploch byl použit open-source software FIJI [Is Just Image] verze 1.53t (Rueden et al., 2017) s pluginem „ilastik4ij“ (<https://github.com/ilastik/ilastik4ij>). Pro hromadné zpracování fotografií byly napsány skripty na míru, které jsou součástí příloh této práce.

Zatímco černá barva je na povrchu brouka vždy ostře ohraničena, červená barva přechází ve žlutou místy téměř plynule, a je nutno tento faktor zohlednit kvůli možné chybovosti digitálního měření barvy (červená mohla být v místě přechodu zaznamenána jako žlutá a naopak). Variabilita tvaru a členitosti skvrny na předohrudi nebyla hodnocena. Polymorfismus ve zbarvení se projevoval rozsahem černé bazální skvrny na jinak žluté předohrudi a poměrem zastoupení černé, červené a žluté barvy na krovkách. Poměr pokryvu jednotlivých barev byl měřen z obou částí jako jednoho celku (nebylo vyhodnoceno zvlášť pronotum ani krovky). Ventrální strana nebyla z hlediska variability hodnocena.

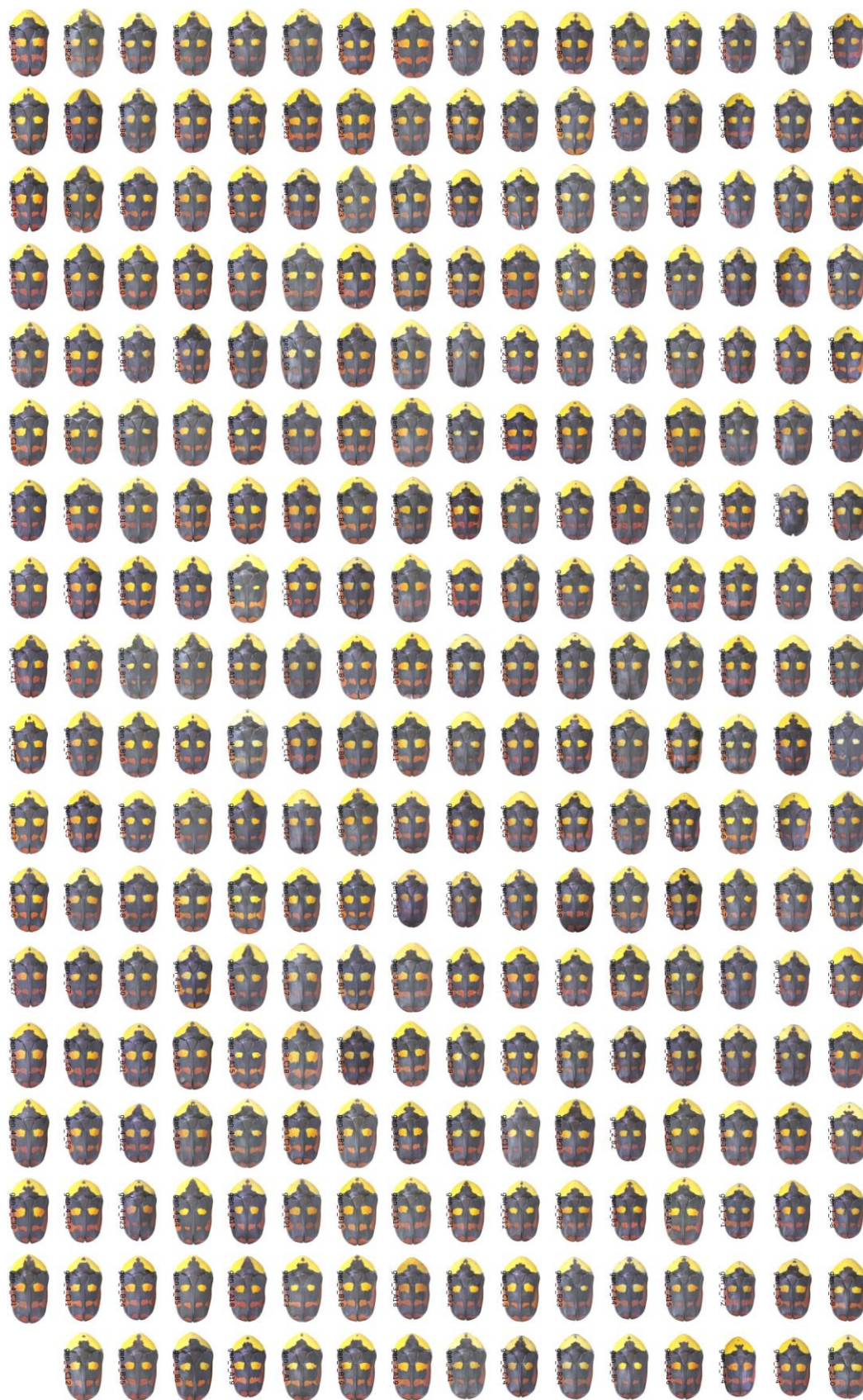
Kromě dat o barevné variabilitě byla během chovu průběžně sbírána doprovodná data ohledně samotné inkubace larev a kokonů. Byla sledována celková doba vývoje, rozestup mezi jednotlivými instary, doba strávená v kokonu (nikoliv však ve stadiu kukly, jejíž čas utvoření nebylo možno přesně určit) a mortalita. Protože do inkubátorů byly vkládány průběžně larvy prvního až druhého instaru (tedy larvy nalezené v boxu s kladoucími dospělci), bylo s jistotou možno změřit pouze délku průběhu třetího instaru larvy („L3“) a doba strávená v kokonu. Tuto dobu strávily všechny larvy již v inkubátoru. Tato data byla sbírána jednou týdně, je proto třeba počítat s mírnou odchylkou dat od reality (např. brouk vyproštěný z kokonu při týdenní kontrole se mohl vylíhnout už o několik dní dříve. Aby byla tato odchylka zmírněna, bylo v zápisu dat „zaokrouhlováno“; např. při kontrole kukly, ze které se měl viditelně do pár hodin vylíhnout

brouk, byl jedinec zapsán jako „vylíhnutý“, ale změřen byl až v týdnu následujícím. Každý vylíhnutý brouk byl ihned po vyproštění z kokonu pohlavně určen a zvážen na analytických vahách Mettler Toledo XSR105 s přesností na miligramy.

Získaná data byla zpracována do tabulek v Microsoft Excel. Grafy byly vytvořeny v programu Sigma Plot 11.0 a statistické vyhodnocení (ANOVA a neparametrické testy) bylo vytvořeno v programu PAST 4.3.



Obrázek č. 7: Ilustrační obrázek z průběhu analýzy barev. Nahoře původní fotografie oříznutá na měřený povrch (štit + krovky), uprostřed pravděpodobnostní mapa (segmentace tří měřených barev), dole vyznačeny hranice ploch žluté, červené a černé (ohraničeno zeleně). Autor: Ondřej Šebesta



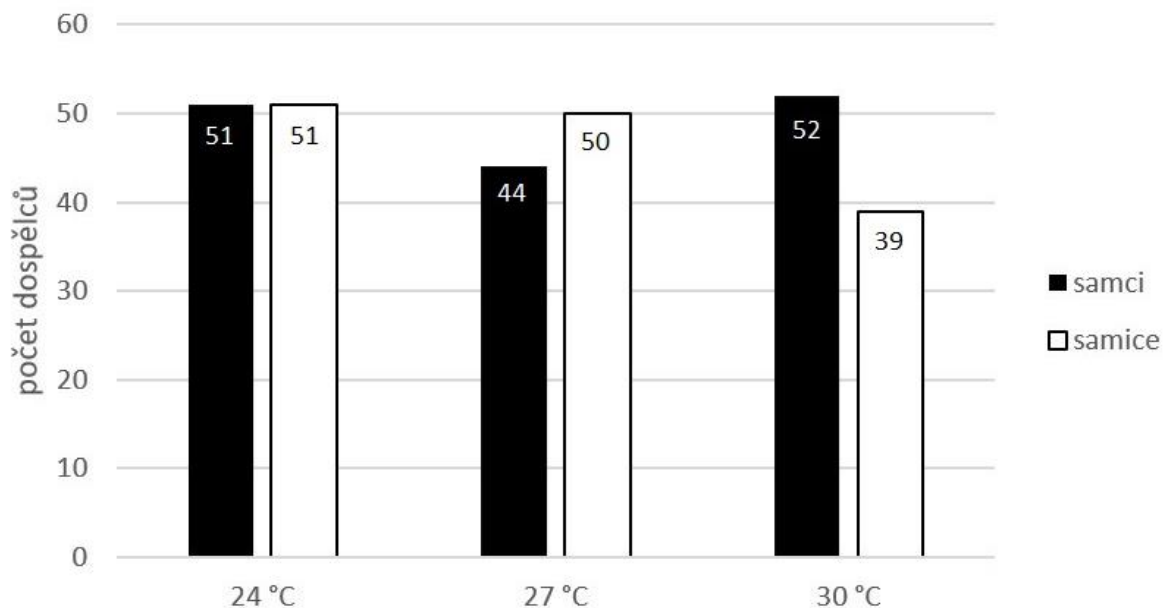
Obrázek č. 8: Koláž kompletního vzorku dospělců *P. iskuulka* po oříznutí měřeného povrchu. Autor: Ondřej Šebesta

3. Výsledky

Do kontrolovaného chovu v inkubátorech bylo celkem umístěno 333 larev a úspěšně bylo odchováno a změřeno 287 dospělců, z toho 147 samců a 140 samic. Materiál z teploty 24 °C tvořilo 102 brouků, z teploty 27 °C 94 brouků a z teploty 30 °C 91 brouků. Chov probíhal od dubna roku 2020 do listopadu roku 2022 celkem ve čtyřech generacích dospělců. K tomuto rozdělení došlo z důvodu nedostatečné kapacity inkubátorů (do každého se vešlo jen asi 30 boxů s larvami, tedy nejvíce asi 90 larev na generaci). Během chovu byla průběžně byla zapisována data o růstu larev (resp. změně instarů) a každý odchovaný dospělec byl po vyjmutí z kokonu zvážen a vyfocen. Výsledky zpracovaných dat jsou zobrazeny v první části této kapitoly. Druhá část je zaměřena na jádro výzkumu – měření a vyhodnocení změn barvy brouků.

3.1. Sledování vývoje

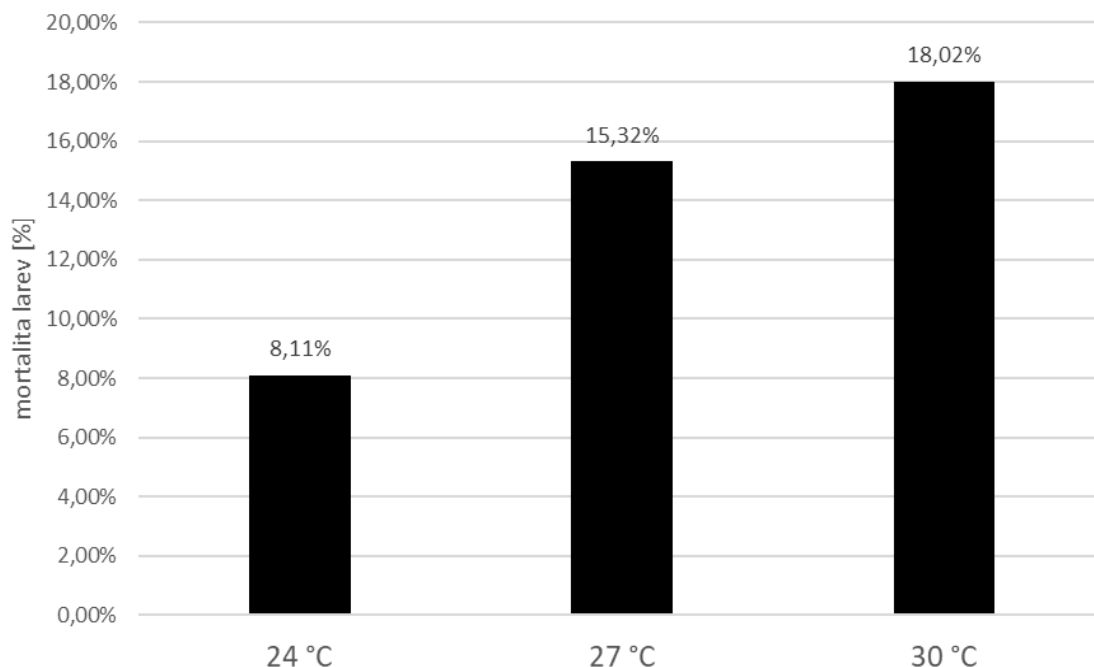
Poměr zastoupení samců a samic byl v rámci generací i teplot inkubace kolísavý, nicméně nevykazoval zřejmou závislost na měnící se teplotě. Ačkoliv u některých živočichů může být pohlaví přímo podmíněno inkubační teplotou při vývoji embrya (např. Janzen, 1994), pro správné testování teplotní závislosti poměru pohlaví u druhu *P. iskuulka* by byl zcela jistě nutný větší vzorek dospělců. Konkrétní zastoupení samců a samic v jednotlivých teplotách vyobrazuje graf č. 1.



Graf č. 1: Zastoupení samců a samic podle teploty inkubace.

Z celkem 333 inkubovaných larev jich během vývoje 46 uhynulo. Přesnou příčinu těchto úmrtí je těžké určit, většinou však šlo o úhyn ve třetím instaru („L3“), a to buď před tvorbou kokonu, nebo přímo v kokonu; k úmrtí došlo v důsledku neúspěšného svleku larvy v kuklu. Podrobnější data o mortalitě nebyla evidována.

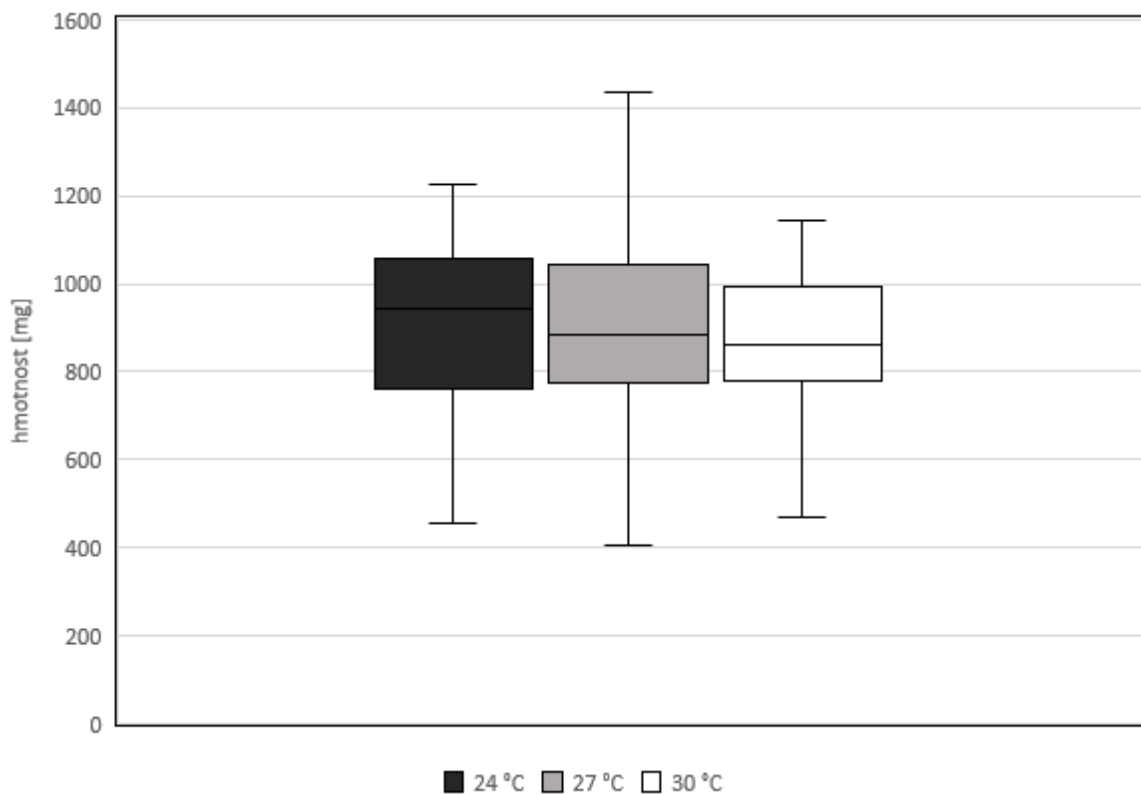
V každé teplotě bylo inkubováno 111 larev. Jejich mortalita se výrazně lišila podle nastavené teploty; při 24 °C uhynulo 9 larev, při 27 °C pak 17 larev a při 30 °C se dospělosti nedožilo 20 larev. Vyšší teplota tedy má za následek poměrně značně vyšší mortalitu larev, jak ukazuje i přiložený **graf č. 2**.



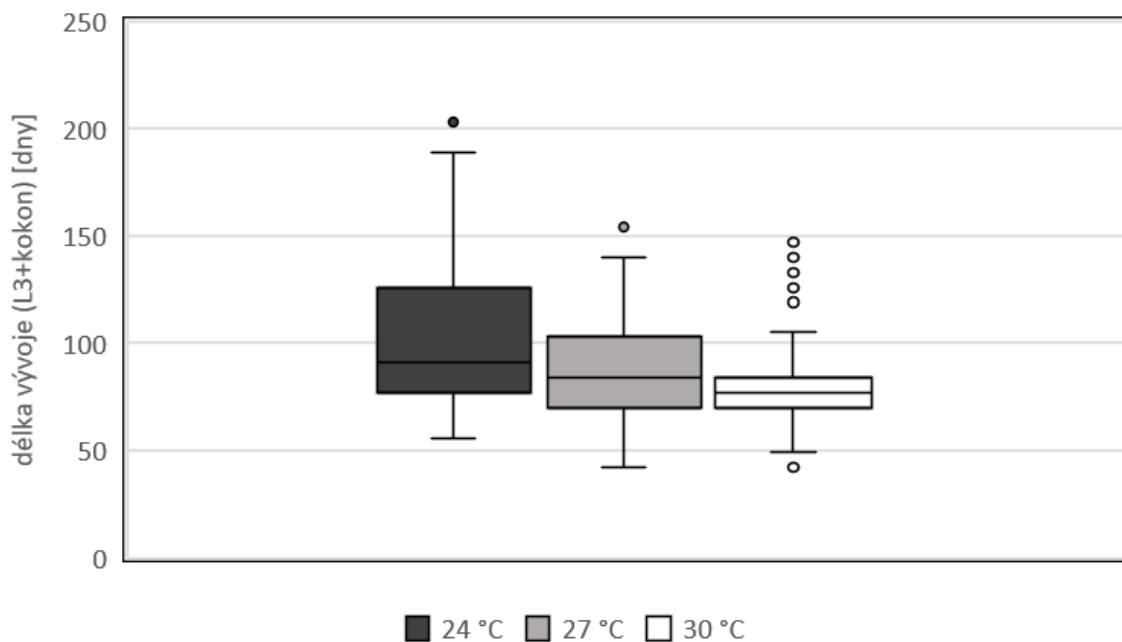
Graf č. 2: Mortalita larev při inkubaci v odlišných teplotách.

U odchovaných dospělců bylo rovněž možno pozorovat změny hmotnosti podle teploty, ve které byli inkubováni. Hmotnost dospělců velmi kolísala, nejlehčí jedinec vážil pouze 407 mg. Naopak nejtěžší vážil 1437 mg. Průměrná hmotnost vážených brouků byla 891,7 mg. Jak ukazuje **graf č. 3**, brouci odchovaní z larev inkubovaných v nižší teplotě mají průměrně vyšší hmotnost. Zatímco imaga inkubovaná při 24 °C měla průměrnou hmotnost 903,8 mg, jedinci z 27 °C jen 901,9 mg. Brouci z inkubátoru nastaveného na 30 °C pak vážila průměrně 867,7 mg. Jednocestná analýza rozptylu zde nicméně neukázala signifikantní závislost teploty a hmotnosti ($p = 0,3032$).

Zatímco broukům chovaným při 24 °C trval vývoj (resp. doba strávená ve třetím instaru a vývoj v kokonu; více rozvedeno v metodice) průměrně 101 dnů, při 27 °C už jen 88 dnů a při 30 °C 77 dnů. Testování jednocestným ANOVA testem ukázala signifikantní vztah teploty a délky vývoje ($p = 2,231 \times 10^{-10}$). Grafické zobrazení délky vývoje při různých teplotách demonstruje **graf č. 4**.



Graf č. 3: Hmotnosti brouků inkubovaných v odlišných teplotách ($p = 0,3032$).

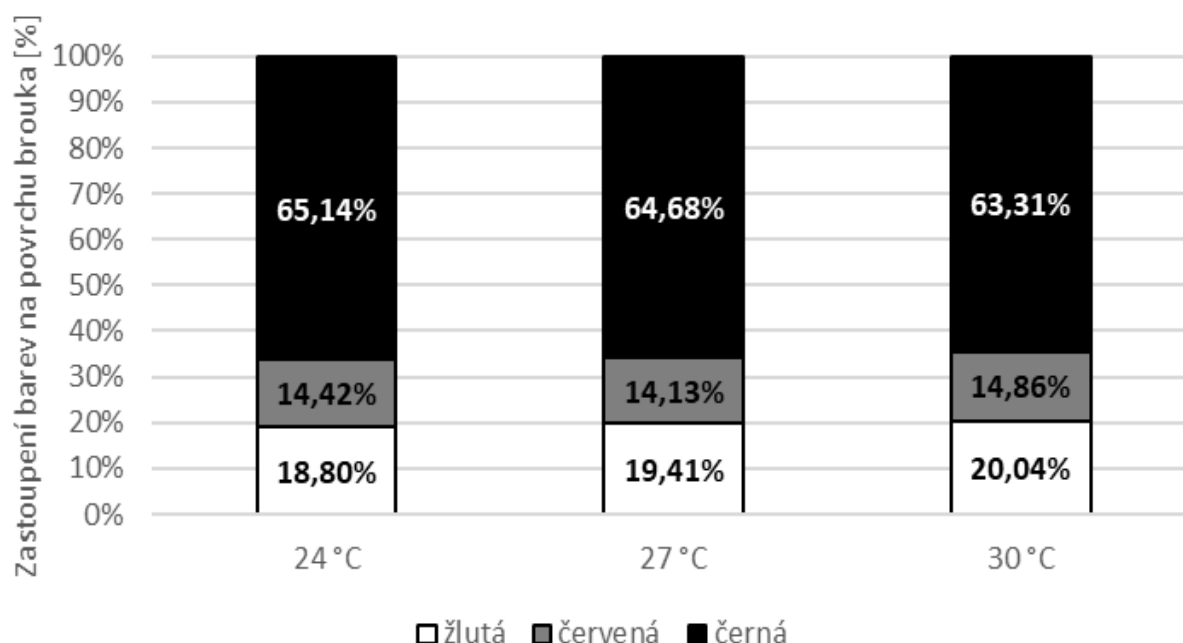


Graf č. 4: Délka vývoje brouků (od svleku do L3 do vylíhnutí dospělé) při různých teplotách ($p = 2,231 \times 10^{-10}$).

3.2. Analýza zbarvení štítu a krovek

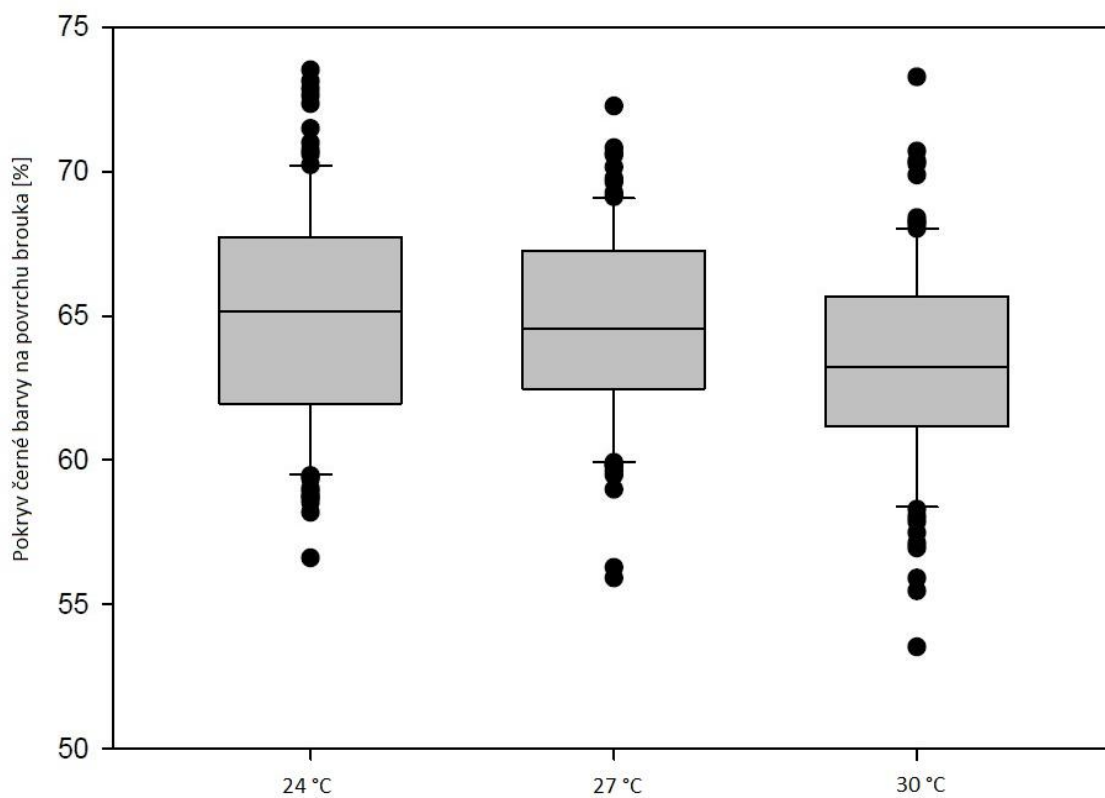
Protože hlava imaga *Pachnoda iskuulka* je vždy černá, nebyla součástí výřezu, ze kterého probíhala u každého jedince analýza barev. Zabarvení bylo tudíž sledováno pouze na dorsálních částech předohrudi a krovkách.

Měřený povrch brouků měl průměrnou plochu 191,9 mm², s nejmenší zaznamenanou hodnotou 131,53 mm² a největší pak 248,45 mm². Největší plochu pokrývala černá barva – průměrně 64,4 % celkového měřeného povrchu; vzhledem k variačnímu koeficientu CV= 0,057 se jednalo o nejstabilněji zastoupenou barvu. Žlutá barva představovala průměrně 14,46 % a červená barva průměrně 19,39 % povrchu krovek a předohrudi. Tyto dvě barvy ve vlastním zastoupení mnohem více kolísaly; žlutá o ± 36,0 % vlastního pokryvu (CV = 0,119) a červená o ± 52,7 % (CV = 0,182) oproti černé barvě (± 15,5 %).

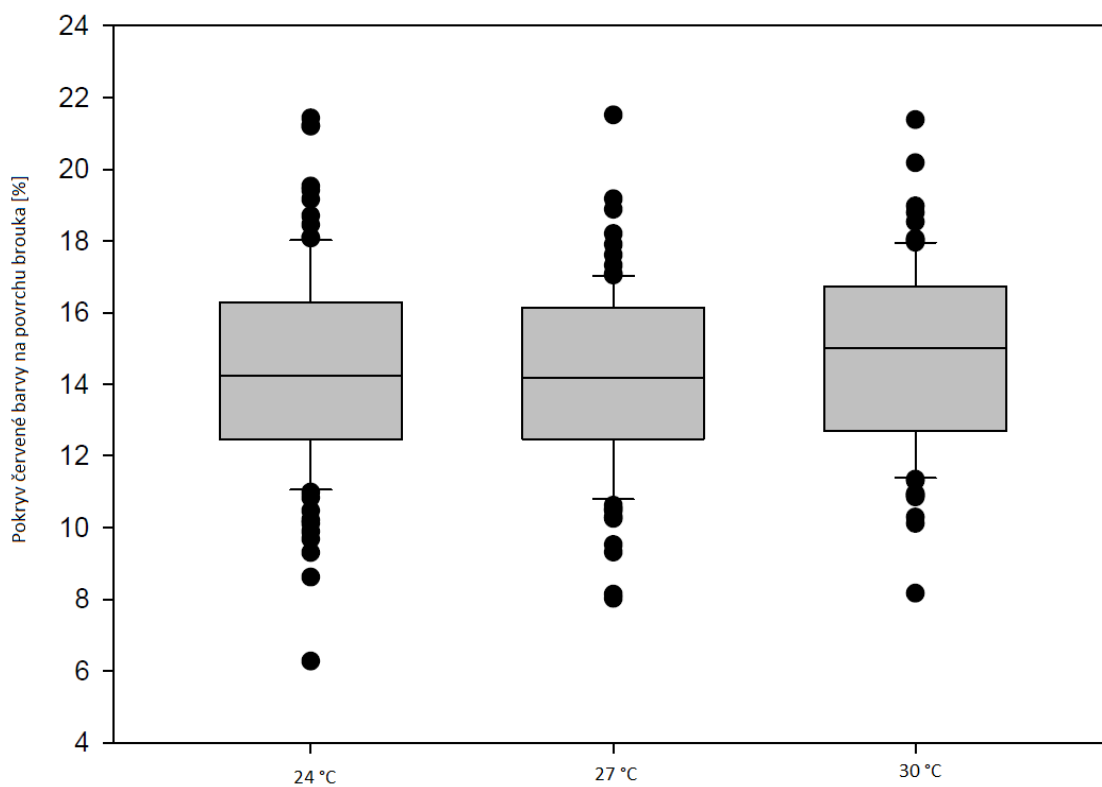


Graf č. 5: Průměrné zastoupení jednotlivých barev na povrchu brouků podle teploty inkubace.

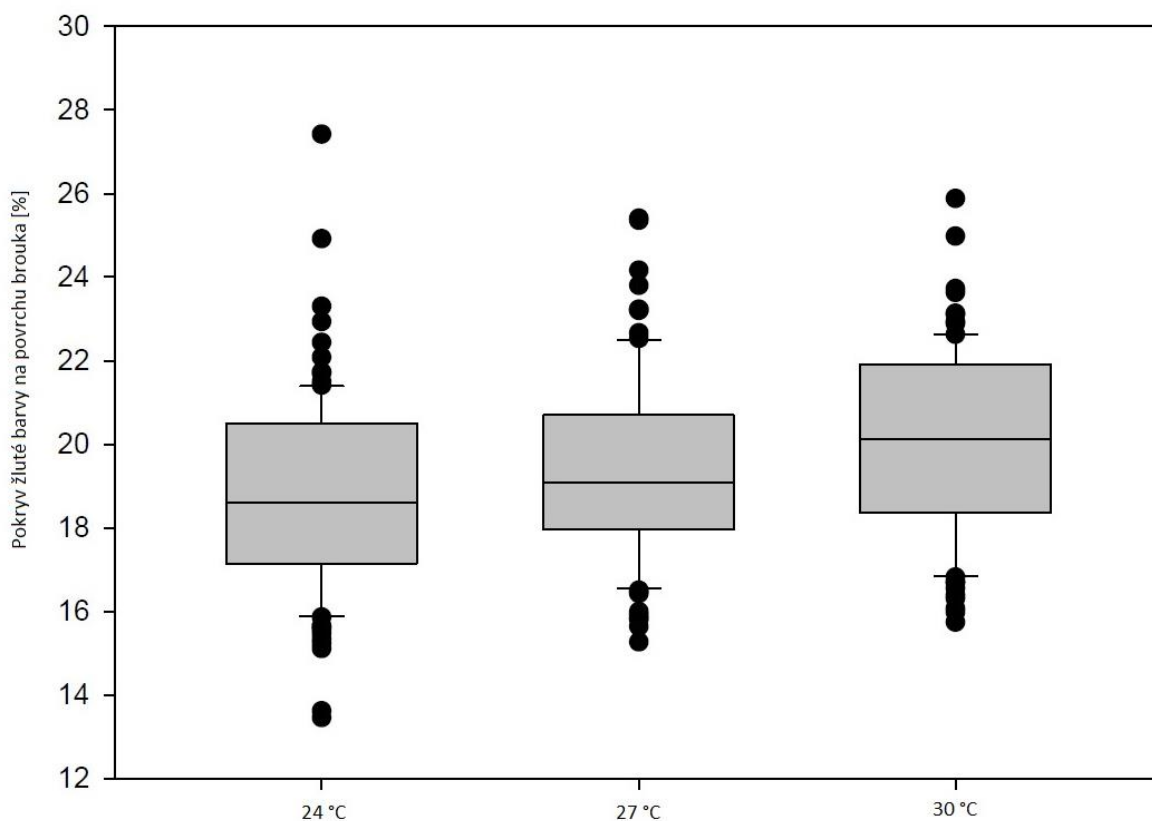
Ze získaných dat je patrné nižší průměrné zastoupení černé barvy, a naopak vyšší zastoupení žluté barvy při vyšších teplotách (viz **graf č. 5**). Červená barva oproti tomu nevykazuje korelaci s teplotou a její průměrný pokryv na krovkách je napříč rozdílnými teplotami víceméně stabilní; ve 24 °C 14,42 %, ve 27 °C 14,13 % a ve 30 °C 14,86 %.



Graf č. 6: Pokryvnost černé barvy na povrchu brouků inkubovaných v odlišných teplotách ($p = 0,01555$).



Graf č. 7: Pokryvnost červené barvy na povrchu brouků inkubovaných v odlišných teplotách ($p = 0,1669$).

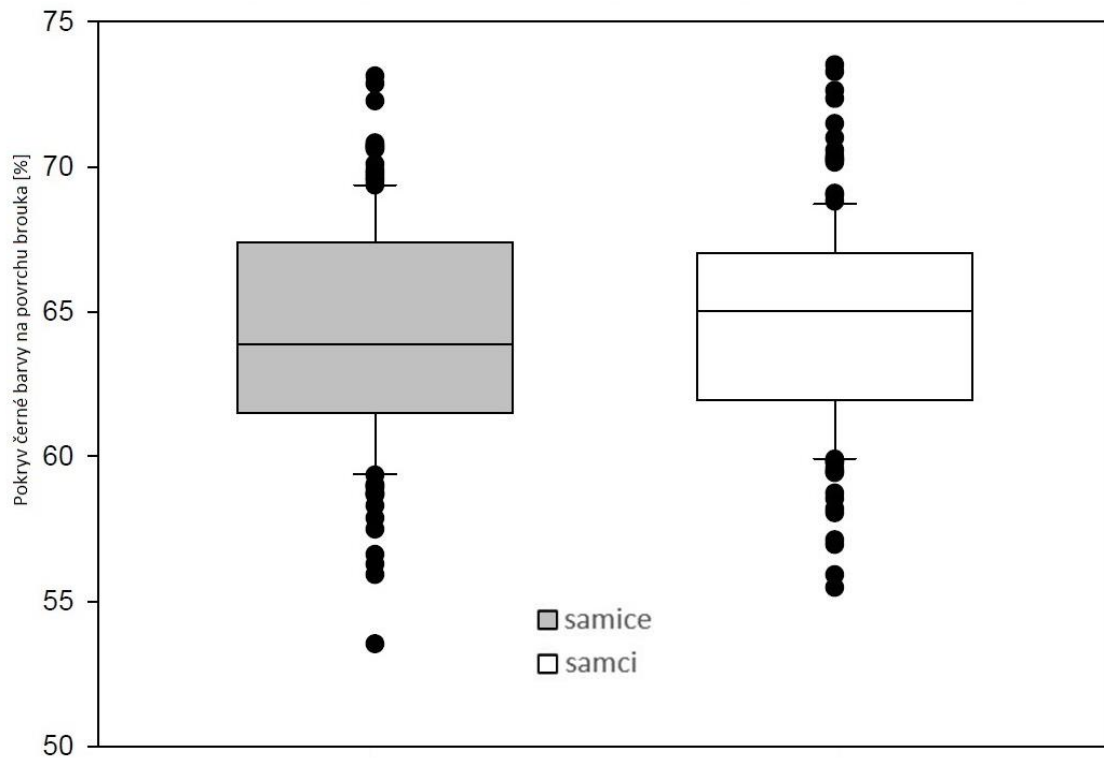


Graf č. 8: Pokryvnost žluté barvy na povrchu brouků inkubovaných v odlišných teplotách ($p = 0,00907$).

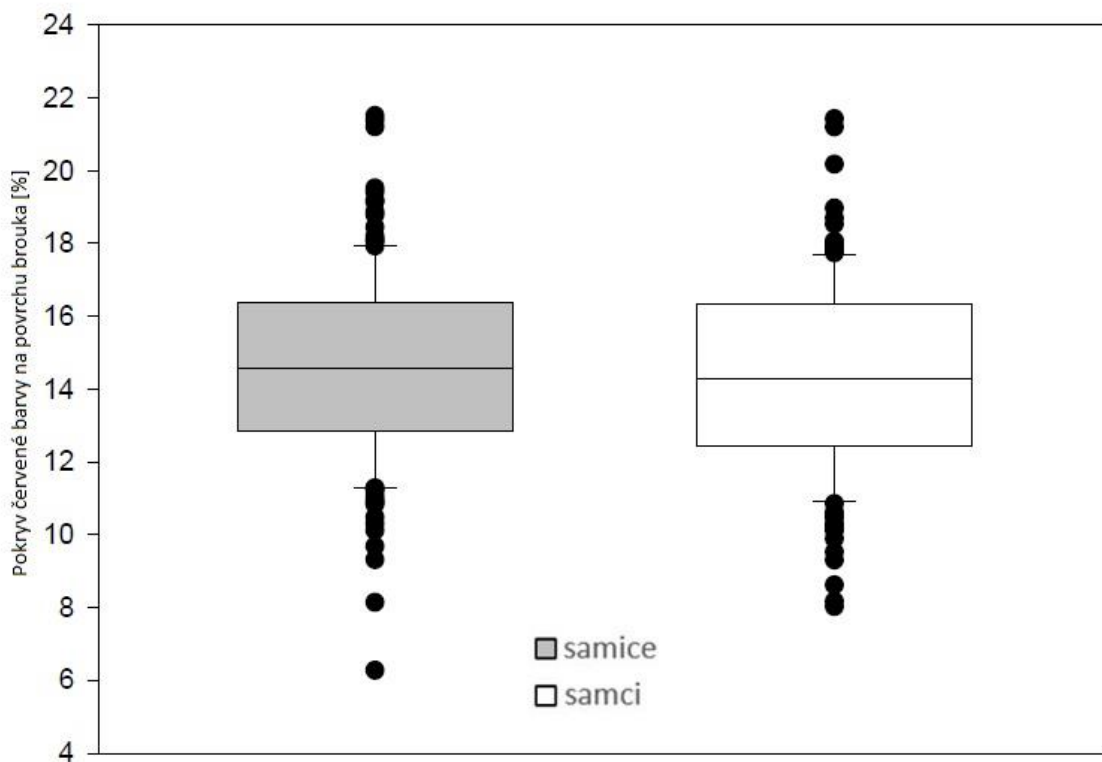
Jak je patrné z **grafu č. 6**, černá barva měla vyšší zastoupení u brouků inkubovaných při nižší teplotě a naopak. Tato tendence je výrazná zejména u teploty 30 °C, kde černé barvy výrazně ubylo oproti dvěma nižším teplotám. Hodnoty kolísaly od 53,53 % do 73,52 %, s mediány 65,18 % u 24 °C, 64,54 % u 27 °C a 63,22 % u 30 °C. Graf ukazuje signifikantní vztah teploty a rozsahu černého zbarvení ($p = 0,01555$). Tukeyho test ukázal výrazný rozdíl rozsahu černé barvy u brouků chovaných ve 30 °C oproti 27 °C ($p = 0,001308$) i oproti 24 °C ($p = 0,02279$).

Červená barva, znázorněná v **grafu č. 7**, měla z pozorovaných barev nejmenší procentuální zastoupení, s hodnotami od 6,27 % do 21,5 %. Střední hodnoty byly 14,24 % u 24 °C, 14,19 % u 27 °C a 15,00 % u 30 °C. Jednocestná analýza rozptylu zde neukázala signifikantní korelaci ($p = 0,1669$).

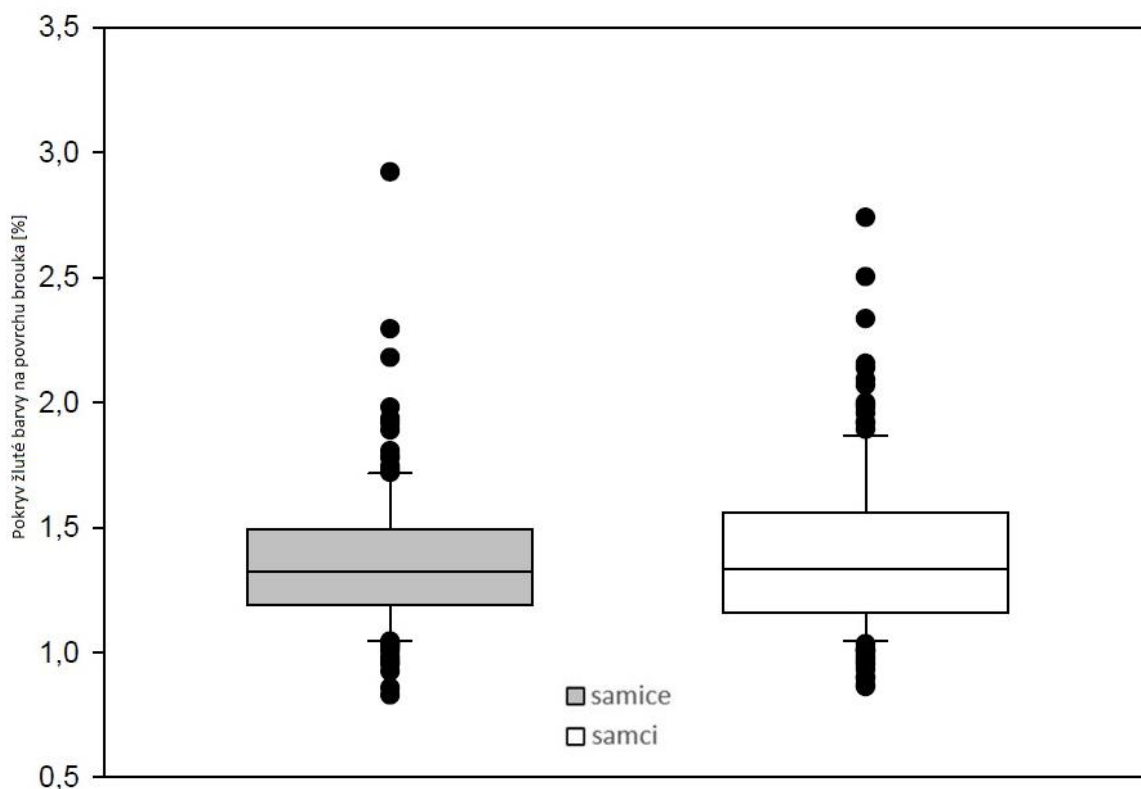
Graf č. 8 znázorňuje procentuální zastoupení žluté barvy. Hodnoty kolísaly od 13,45 % do 27,42 %, medián 24 °C je 18,61 %, u 27 °C 19,07 % a u 30 °C 20,11 %. I zde byla zjištěna signifikantní korelace teploty s rozsahem žluté barvy ($p = 0,00907$). Tukeyho test ukázal výrazný rozdíl materiálu z 24 °C a 30 °C ($p = 0,000485$).



Graf č. 9: Pokryvnost černé barvy na povrchu brouků (odděleně pro samce a samice bez ohledu na teplotu inkubace) ($p = 0,3051$).



Graf č. 10: Pokryvnost červené barvy na povrchu brouků (odděleně pro samce a samice bez ohledu na teplotu inkubace) ($p = 0,28$).



Graf č. 11: Pokryvnost žluté barvy na povrchu brouků (odděleně pro samce a samice bez ohledu na teplotu inkubace) ($p = 0,7131$).

Hodnocen byl i rozdíl zbarvení samců a samic bez ohledu na rozdílnou teplotu inkubace. Rozdíl procentuálního pokryvu černé barvy samců a samic ukazuje **graf č. 9**. Průměrný pokryv černé u samic (levý box) byl 64,2 % a u samců (pravý box) 64,6 %. Střední hodnota u samic pak činila 63,9 % a u samců 65,0 %. Samci tedy vykazovali celkově větší zastoupení černé barvy oproti samicím. Tato korelace nicméně nebyla statisticky signifikantní ($p = 0,3051$).

Vztah pohlaví a červené barvy znázorňuje **graf č. 10**. Průměrný pokryv červené u samic (levý box) byl 14,64 % a u samců (pravý box) 14,29 %, mediány pak činily 14,57 % u samic a 14,27 % u samců. Jednocestná analýza rozptylu neukázala signifikantní korelaci ($p = 0,28$).

Obdobný vztah, avšak pro žlutou barvu, vizuálně demonstruje **graf č. 11**. Průměrně tvořila žlutá barva u samic (levý box) 19,45 % povrchu a u samců (pravý box) 19,33 %. Střední hodnoty činily 19,48 % u samic a 19,19 % u samců. Korelace se ani v tomto případě neukázala jako signifikantní ($p = 0,7131$).

Rozložení kvartilů a mediánu a blízkost hodnot mediánů a průměrů naznačuje víceméně normální rozložení. Jednocestná analýza rozptylu však neukázala signifikantní korelaci žádné ze zkoumaných barev ve vztahu k pohlaví dospělců.

Testovány byly i rozdíly mezi červenou a žlutou u každé teploty a také závislost teploty a zastoupení barev se zohledněním pohlaví (tedy celkem šest skupin dat pro každou barvu). Aplikovaný Tukeyho test párů zde však neukázal žádnou signifikantní korelaci, nebyly už tudíž v této práci zahrnuty.

3.3. Tabulky dat

Tabulka č. 1: Přehled počtu inkubovaných jedinců, poměru pohlaví a procentuální mortality larev podle teploty.

		24 °C	27 °C	30 °C	Celkem
Celkem inkubováno [ks]		102	94	91	287
Poměr pohlaví	samci	51	44	52	147
	samice	51	50	39	140
Mortalita larev		8,11%	15,32%	18,02%	13,81%

Tabulka č. 2: Přehled hmotností brouků inkubovaných při různých teplotách. Doplněno o jednocestný ANOVA test a Tukeyho test párů.

		24 °C	27 °C	30 °C
Hmotnost [mg]	průměr	908,8	901,9	867,7
	min	407		
	max	1437		
One-way ANOVA		$p(0,05) = 0,3032$		
Tukeyho test		24 °C	27 °C	30 °C
	24 °C	 	0,9968	0,3452
	27 °C	1,086	 	0,3867
	30 °C	1,968	1,86	

Tabulka č. 3: Přehled délky vývoje brouků inkubovaných při různých teplotách. Doplněno o jednocestný ANOVA test a Tukeyho test párů.

		24 °C	27 °C	30 °C
Délka vývoje [dny] (L3 + kokon)	průměr	101	88	77
	min	42		
	max	203		
One-way ANOVA		$p(0,05) = 2,231 \times 10^{-10}$		
Tukeyho test		24 °C	27 °C	30 °C
	24 °C	 	0,00045	$2,175 \times 10^{-5}$
	27 °C	5,363	 	0,00638
	30 °C	9,683	4,32	

Tabulka č. 4: Přehled zastoupení černé barvy na měřeném povrchu brouků podle teplot. Doplněno o jednocestný ANOVA test a Tukeyho test párů.

		24 °C	27 °C	30 °C
Zastoupení černé barvy (%)	min	56,62	55,92	53,53
	max	73,52	72,28	73,28
	průměr	65,14	64,68	63,31
	medián	65,18	64,55	63,22
	rozptyl	14,54	11,05	13,43
	směr. odchylka	3,81	3,32	3,66
	25 percentil	61,97	62,49	61,16
	75 percentil	67,73	67,27	65,69
	šikmost	0,04	-0,12	0,00
	špičatost	-0,55	-0,28	0,15
	One-way ANOVA	p(0,05) = 0,001555		
Tukeyho test		24 °C	27 °C	30 °C
	24 °C	 	0,6566	0,00131
	27 °C	1,236	 	0,02279
	30 °C	4,965	3,729	

Tabulka č. 5: Přehled zastoupení červené barvy na měřeném povrchu brouků podle teplot. Doplněno o jednocestný ANOVA test a Tukeyho test párů.

		24 °C	27 °C	30 °C
Zastoupení červené barvy (%)	min	6,27	8,02	8,17
	max	21,43	21,51	21,38
	průměr	14,42	14,13	14,86
	medián	14,24	14,19	15,00
	rozptyl	8,07	6,25	6,24
	směr. odchylka	2,84	2,50	2,50
	25 percentil	12,45	12,47	12,69
	75 percentil	16,29	16,15	16,74
	šikmost	0,13	0,03	-0,14
	špičatost	0,13	0,09	-0,23
	One-way ANOVA	p(0,05) = 0,1669		
Tukeyho test		24 °C	27 °C	30 °C
	24 °C	 	0,7172	0,4887
	27 °C	1,099	 	0,1335
	30 °C	1,614	2,713	

Tabulka č. 6: Přehled zastoupení žluté barvy na měřeném povrchu brouků podle teplot. Doplněno o jednocestný ANOVA test a Tukeyho test párů.

		24 °C	27 °C	30 °C
Zastoupení žluté barvy (%)	min	13,45	15,27	15,74
	max	27,42	25,41	25,88
	průměr	18,80	19,41	20,04
	medián	18,61	19,07	20,11
	rozptyl	5,39	4,92	4,90
	směr. odchylka	2,32	2,22	2,21
	25 percentil	17,14	17,95	18,36
	75 percentil	20,51	20,70	21,92
	šířka	0,48	0,46	0,04
	špičatost	1,09	-0,02	-0,54
One-way ANOVA	p(0,05) = 0,000907			
Tukeyho test		24 °C	27 °C	30 °C
	24 °C	 	0,1522	0,00049
	27 °C	2,622	 	0,133
	30 °C	5,337	2,715	

4. Diskuze

4.1. Vliv teploty na růstové charakteristiky

Kromě polymorfismu ve zbarvení byl zkoumán i vliv teploty na hmotnost, rychlost vývoje, poměr pohlaví a mortalitu při vývoji. Z odchovaných 287 dospělců bylo 147 samců a 140 samic, jejich zastoupení v jednotlivých teplotách však neukázalo korelaci s teplotou při vývoji. Ačkoliv teplotně determinované určení pohlaví (v literatuře často pouze jako „TDS“) je relativně častým jevem u plazů (např. Ferguson & Joanen, 1983; Schroeder et al., 2016), u bezobratlých dosud tento jev nebyl řádně zkoumán, náhodné rozložení pohlaví napříč teplotami u *P. iskuulka* tedy není překvapením. Pro testování hypotézy TDS u brouků by byl nicméně rozhodně třeba větší vzorek.

Mortalita larev vzrůstala s teplotou. Zatímco při 24 °C uhynulo 8,11 % larev, při 27 °C už 15,32 % a při 30 °C pak 18 % larev). Ačkoliv průměrné teploty v Somálijsku kolísají během roku od 28 do 48 °C ve dne a 20 a 31 °C v noci (podle Worlddata.info, 2023), larvy žijící v zemi se budou pravděpodobně pohybovat v teplotě nižší, než je teplota ovzduší. Teplota půdy se mění i podle hloubky, ve které se nachází, takže mohou snadno nalézt své teplotní optimum, které jim v chovech nemohlo být poskytnuto. Velký skok mortality byl mezi teplotami 24 °C (zde uhynulo 9 larev) a 27 °C (17 larev). Je pravděpodobné, že teploty vyšší než 21 °C jsou již suboptimální pro vývoj larev; vyšší teploty s sebou často nesou vyšší míru mortality pro většinu hmyzích larev žijících v zemi (Régnière et al., 2012). Během chovu bylo také pozorováno, že boxy s larvami mají ve vyšší teplotě mnohem větší tendenci se zapářit, zejména po doplnění vody nebo výměně hrabanky. Ve vyšší teplotě ale také substrát mnohem rychleji vysychal. Toto prudké kolísání vlhkosti mohlo být také jedním z faktorů vyšší úmrtnosti.

Brouci odchovaní ve vyšších teplotách měli rychlejší vývoj. Ten trval broukům inkubovaným ve 24 °C průměrně 101 dnů, ve 27 °C 88 dnů a ve 30 °C jen 77 dnů. Jednocestná analýza rozptylu ukázala signifikantní závislost délky vývoje na teplotě ($p = 2,231 \times 10^{-10}$). Tento výsledek potvrzuje často probírané téma (např. Li & Jackson, 1996; Forster & Hirst, 2012; Khaliq et al., 2014) rychlejšího vývoje (a fyziologických procesů obecně) při vyšších teplotách. Brouci odchovaní ve vyšších teplotách měli také menší hmotnost; při 24 °C průměrně 903,8 mg, při 27 °C pak 901,9 mg a při 30 °C pouze 867,7 mg. Závislost hmotnosti na teplotě však nebyla signifikantní ($p = 0,3032$). Podle dříve zmíněného pravidla TSR („temperature–size rule“) larvy ve vyšší teplotě rychleji prošly všemi stadii a strávily kratší dobu jako kukla, míra růstu se ale úměrně nezvětšila. Výsledkem byli rychleji vyvinutí, průměrně však menší brouci. Souvislost teploty prostředí s rychlostí vývoje (za předpokladu dostatku potravy) u ektotermních živočichů již byla vědecky zkoumána (např. Lee & Roh, 2010, Verberk et al., 2011) avšak výsledky ze sbíraných dat testované jednocestným ANOVA testem tento jev u *P. iskuulka* nepotvrdily, ačkoliv trend změn hmotnosti je pozorovatelný z naměřených dat. Navzdory rychlejšímu vývoji nebyl pozorován rozdíl ve spotřebě hrabanky u larev v rozdílných teplotách (v tomto směru však nebyla sbírána žádná data). Zde je třeba upozornit na fakt, že vývoj byl měřen pouze od chvíle svleku do třetího instaru („L3“) do vylíhnutí dospělého, resp. jeho asistovanému vyproštění z kokonu (+/- 5 dnů). Ačkoliv první dva instary larvy *P. iskuulka* trvají relativně krátkou dobu (oba dohromady asi 5-8 týdnů), je nutno vzít tento faktor v potaz. Růst larvy rodu *Pachnoda* se nezdá být exponenciální, jak je u hmyzích

larev často implikováno; ve třetím instaru se míra růstu zpomaluje (Vendl et al., 2018). Je tedy možné, že při inkubaci od raného prvního instaru či od vajíčka by bylo dosaženo odlišných výsledků.

4.2. Teplotně podmíněná variabilita zbarvení

Černě zbarvené části tvoří největší podíl měřeného povrchu dorsální strany (krovek a štítu) brouků - průměrně 64,4 % s rozptylem $\sigma^2 = 13,5 \text{ \%}^2$. Její rozsah byl u měřeného vzorku brouků relativně nejstabilnější; variační koeficient $CV = 0,057$. Rozsah žluté i červené mnohem více kolísal ve vlastním rozsahu; pro žlutou barvu $CV = 0,119$, pro červenou barvu $CV = 0,182$. Testováním pomocí jednocestného ANOVA testu na hladině významnosti 5 % ($p = 0,05$) byla nalezena signifikantní závislost teploty a rozsahu černé a žluté barvy (jednocestná ANOVA, $p=xy$, respektive $p=xx$). Zatímco rozsah červené s nejvyšší pravděpodobností teplotou ovlivněn nebyl ($p=XYZ$). Zejména při 30 °C bylo pozorováno světlejší zbarvení, kdy na měřeném povrchu bylo větší zastoupení žluté a menší zastoupení černé barvy. Rozsah červeného zbarvení se nicméně mezi jednotlivými teplotami signifikantně neměnil. Pro každou barvu byl proveden Tukeyho test párů, který odhalil signifikantní rozdíly zejména mezi nejnižší a nejvyšší teplotou.

Následně proběhlo srovnání vztahu zastoupení barev a pohlaví (viz grafy 9, 10 a 11) bez ohledu na teplotu inkubace, které by mohlo odhalit případný sexuální dichroismus. Ačkoliv průměrně byli samci *P. iskuulka* tmavší než samice, signifikantní rozdíl neprokázala ANOVA u žádné z barev ani vzdáleně (pro černou $p(0,05) = 0,3051$; červená $p(0,05) = 0,28$ a žlutá $p(0,05) = 0,7131$). Testovány byly i rozdíly mezi červenou a žlutou u každé teploty a dále vztah teploty a zastoupení barev se zohledněním pohlaví (tedy celkem šest skupin dat pro každou barvu). Tukeyho test párů zde však neukázal žádnou signifikantní korelaci, nebyly tudíž v této práci zahrnuty.

Zvětšující se podíl žlutého zbarvení a zmenšující se podíl černého zbarvení ve vyšší teplotě tedy podporuje hypotézu termálního polymorfismu, resp. melanismu zlatohlávka *P. iskuulka*. Průměrné zastoupení těchto dvou barev je nejméně odlišené v nejvyšší teplotě 30 °C, zatímco materiál z 24 °C a 27 °C je si podobnější. Je možné, že při nižší teplotě (například 21 °C nebo i 18 °C) by odchovaní brouci měli mnohem větší podíl černé barvy a menší podíl žluté barvy. Soubor dat obohacený o brouky odchované v ještě nižší teplotě by tak mohl vypovědět lepší výsledky. Případná vyšší teplota pro potenciální další výzkum už by pravděpodobně znamenala poměrně vysokou mortalitu larev.

Povaha termálního polymorfismu u zlatohlávka *P. iskuulka* se podle zjištěných dat zdá být obdobnou, jako je tomu u většiny bezobratlých, kde byl tento fenomén již pozorován. Pouhým okem je tato variabilita těžko pozorovatelná, zřejmě z důvodu velké variability i v rámci jednotlivých teplot. Termální polymorfismus *P. iskuulka* vykazuje velmi podobné výsledky, jako například často zkoumaná mandelinka *Chrysomela lapponica*. Dospělci tohoto brouka vylíhnutí při nižších teplotách jsou tmavší a naopak (Zvereva et al., 1995; Zvereva et al., 2002; Gross et al., 2004; Zverev et al., 2018; Kozlov et al., 2022). Problematika melanismu *Ch. lapponica* je často spojována s možností geografické variability a specializace tohoto druhu. V případě *P. iskuulka* je

tato možnost nepravděpodobná, protože v přírodě obývá tento brouk poměrně velmi malý areál. Podobnost lze nalézt i s případem termálního melanismu různých forem slunéček *A. bipunctata* a *H. axyridis* (Brakefield, 1984a; Brakefield, 1984b; Brakefield & Willmer, 1985; Michie et al., 2010; Knapp & Nedvěd, 2013; Su et al., 2013; Honek et al., 2020; Asiri & Foster, 2022). U *H. axyridis* komplikuje výzkum termálního melanismu skutečnost nenáhodného křížení dospělců a existence geneticky více ustálených barevných forem (f. *axyridis*, f. *conspicua*, f. *spectabilis*, f. *succinea*). U *P. iskuulka* dosud nebyly žádné formy popsány, vzhledem k relativně nízké vnitrospecifické barevné variabilitě je ale pravděpodobnost tohoto fenoménu v případě tohoto druhu nízká.

4.3. Problematika zbarvení *Pachnoda iskuulka*

Hlavní signifikanci ukázaly černá a žlutá barva. Vzhledem k tomu je vhodné zvážit možnost výskytu výraznějšího termálního polymorfismu pouze v oblasti předohrudi, která je tvořena těmito dvěma barvami. V této oblasti se rozsah černých bazálních skvrn výrazně liší. Variabilitu ve zbarvení omezenou na určité segmenty těla lze ostatně nalézt i u jiných skupin hmyzu (např. De Souza et al., 2020). Samotná černá skvrna vykazuje velkou variabilitu i svým tvarem a členitostí. Protože však nebyl nalezen vhodný způsob kategorizace obrazců černé barvy na jinak zcela žluté předohrudi, nebyla tato metoda nakonec realizována. Je také možné, že při větším vzorku by mezi teoretickými „typy“ skvrn vznikly takřka plynulé přechody.

Při plánování metodiky této práce byla brána v potaz i míra dědičnosti zbarvení dospělců. Pro zdárné ověření této hypotézy by nicméně byl třeba mnohem větší vzorek larev od určených rodičovských párů, aby jich byl statisticky významný počet rozdělitelný do tří teplot; realisticky však od každého páru bylo průměrně získáno asi 30 larev, což by znamenalo 10 larev od jednoho páru pro každou teplotu. Z těchto důvodů nebyla tato hypotéza testována.

Při pohledu na variabilitu zbarvení je třeba zohlednit, že celá evropská populace *P. iskuulka* rozšířená ve vědeckých i amatérských chovech je potomstvem pouhých čtyř samic, které byly importovány ze Somálie. Celá populace si tak prošla výrazným efektem hrdla láhve, což mohlo mít za následek genetický drift a změnu průměrného zbarvení i jeho vlastností v populaci (např. Maruyama & Fuerst, 1985). Zjištěné výsledky tak nemusí dokonale reflektovat vlastnosti brouků v původním areálu. *P. iskuulka* je nicméně zlatohlávkem přirozeně žijícím na relativně velmi malém území (zejména v porovnání s dalšími druhy rodu *Pachnoda*; např. Clark & Crowe, 2001) přirozeně méně početná, a tudíž málo genotypově variabilní (Willi et al., 2006).

P. iskuulka je v místě svého výskytu přítomen zpravidla společně s jedovatými majkovitými brouky rodu *Hycleus*. Srovnání barevného vzoru těchto dvou brouků je demonstrováno na **obrázku č. 9**. S velkou pravděpodobností se zde jedná o případ batesovských mimiker ze strany *P. iskuulka* a vzor jeho zbarvení by při dalším výzkumu mohl ukázat korelaci s výskytem určitých druhů právě přítomných jedovatých brouků rodu *Hycleus* (P. Šípek pers. observ.). Je tu také možnost omezení barevné variability právě mimikrami, protože přílišná odchylka od běžného zbarvení za účelem lepší termoregulace (např. zcela černý brouk v chladném prostředí) by zapříčinila potenciální ztrátu mimeze.



Obrázek č. 9: *Pachnoda iskuulka* (autor: Oto Petřík) a *Hycleus lugens* (autor: Muhammad Mahdi Karim) - srovnání barevného vzoru.

Nakonec je třeba zmínit problematiku samotného vzniku melanismu u hmyzu. Protože metabolismus jeho vzniku je (na rozdíl od obratlovců) dodnes velice spoře zkoumán (True, 2003), je ještě obtížnější určit jeho vznik jako projev fenotypové plasticity v případě právě termálního polymorfismu. Podle práce Knapp & Nedvěd (2013) je v případě slunéčka východního pro determinaci konečného zbarvení kritické stadium prepupální a pupální. V případě slunéčka se však jedná o larvu i kuklu zcela vystavenou přírodním vlivům, zatímco larva i kukla *P. iskuulka* je ukrytá poměrně hluboko v zemi v relativně stabilním prostředí.

Areál rozšíření zlatohlávka *P. iskuulka* tvoří západní část pohoří Cal Madow v poměrně velké nadmořské výšce okolo 2000 m n. m. Je proto možné, že termální melanismus poskytuje nebo v minulosti poskytoval tomuto broukovi evoluční výhodu v termoregulaci. Je možné, že extrémní případy projevu termální polymorfismu u tohoto druhu již daly za vznik sesterským druhům díky geografické speciaci; například velmi podobné druhy *P. massajae* Gestro, 1881 nebo *P. wernerii* Beinhundner, 1992. Oba tyto druhy jsou tmavěji zbarvené a svůj hlavní areál výskytu mají v Etiopii, která se Somálskem přímo sousedí, a panují zde nižší průměrné teploty (až o 10 °C podle Worlddata.info, 2023). Fylogeneze rodu *Pachnoda* však není dosud objasněna, jedná se tudíž pouze o spekulaci.

Závěr

V literárním přehledu této práce byly shrnuty dostupné informace o známých typech polymorfismu u různých skupin živočichů, zejména však hmyzu. Zahrnut je i vliv teploty na další aspekty života bezobratlých (například délku vývoje a růst, které se obvykle jako projev polymorfismu nedefinují). Samostatná podkapitola je zde pak věnována studovanému druhu *Pachnoda iskuulka*, kde byly zmíněny dostupné informace relevantní pro tuto práci. V metodice byl do nejmenších podrobností popsán chov dospělců i larev v inkubátorech a následné získávání veškerých dat. Třetí kapitolu tvoří graficky zpracované výsledky zpracovaných dat a souhrn tabulek relevantních dat z výzkumu. V diskuzi byly tyto výsledky vyhodnoceny a srovnány s dalšími případy termálního polymorfismu u jiných skupin hmyzu. Bylo také polemizováno o faktorech vedoucích k možnému odchýlení výsledků od skutečnosti a byly vzneseny návrhy pro případné zlepšení postupu dalšího výzkumu na toto téma.

Kontrolovaným chovem v inkubátorech bylo odchováno 287 dospělců (147 samců a 140 samic). Získaná a zpracovaná data odhalila mimo jiné signifikantní negativní korelaci teploty prostředí s délkou vývoje ($p = 2,231 \times 10^{-10}$). Dospělci inkubovaní při 24 °C se vyvíjeli 101 dnů, při 27 °C již pouze 88 dnů a při 30 °C pak 77 dnů. Signifikantní závislost hmotnosti na teplotě naopak prokázána nebyla ($p = 0,3032$). Vyšší teplota však pozitivně koreluje s mírou mortality; při 24 °C uhynulo v průběhu inkubace 9 larev (8,11 % larev z dané teploty), ve 27 °C 17 larev (15,32 %) a ve 30 °C 20 larev (18,02 %). Různá teplota inkubace neukázala vliv na zastoupení pohlaví; poměry počtu samců a samic byly následující: pro 24 °C 1 : 1, ve 27 °C 0,88 : 1 a ve 30 °C pak 1,33 : 1. Pro signifikantní určení vlivu teploty na poměr pohlaví se však jedná o poměrně malý vzorek.

Kvantitativní měření zastoupení barev a vyhodnocení dat jednocestným ANOVA testem ukázalo signifikantní vliv teploty na rozsah žluté a černé barvy. Jedinci při vyšších teplotách měli menší zastoupení černé barvy ($p = 0,01555$) a větší zastoupení žluté barvy ($p = 0,00907$). Červená barva naopak zůstávala napříč rozdílnými teplotami poměrně stabilně zastoupená a vliv teploty zde nebyl průkazný ($p = 0,1669$). Vliv pohlaví na zbarvení (viz grafy č. 9, 10 a 11) ani rozdíl zbarvení pohlaví při různých teplotách formou Tukeyho testu párů (není součástí finální práce) nebyl signifikantní. Signifikantní závislost zbarvení na teplotě při vývoji tedy podporuje hypotézu termálního polymorfismu *P. iskuulka*.

Je málo pravděpodobné, že by se termální polymorfismus vyskytoval z celého rodu *Pachnoda* jen u druhu *P. iskuulka*. Variabilitu ve zbarvení s dosud nezkoumanou příčinou vykazují i blízce příbuzné druhy, např. *P. interrupta* (Olivier, 1789) nebo *P. fasciata* (Fabricius, 1775). Pro další výzkum termálního polymorfismu brouků této skupiny by bylo vhodné tímto směrem pokračovat.

Literatura

- ALLEN, C. E. & ZWAAN, B. J. & BRAKEFIELD, P. M. *Evolution of Sexual Dimorphism in the Lepidoptera*. Annual Review of Entomology, 2011, **56** (1): 445–464. Dostupné online: doi.org/10.1146/annurev-ento-120709-144828
- ANDERSSON, M. *Sexual Selection*. Princeton University Press, 1994. ISBN 9780691000572
- ANDRÉN, C. & NILSON, G. *Reproductive success and risk of predation in normal and melanistic colour morphs of the adder, Vipera berus*. Biological Journal of the Linnean Society, 1981, **15** (3): 235–246. Dostupné online: doi.org/10.1111/j.1095-8312.1981.tb00761.x
- ASIRI, A. & FOSTER, C. *Temporal and climatic variation in the colour forms of Adalia bipunctata and Harmonia axyridis (Coleoptera: Coccinellidae) populations in the United Kingdom*. European Journal of Entomology, 2022, **119**: 250-259. Dostupné online: doi.org/10.14411/eje.2022.027
- AUERSWALD, L. & GÄDE, G. *The fate of proline in the African fruit beetle Pachnoda sinuata*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1999, **29** (8), 687–700. Dostupné online: doi.org/10.1016/s0965-1748(99)00045-4
- AUERSWALD, L. & GÄDE, G. *Physiological and biochemical aspects of flight metabolism in cocoon-enclosed adults of the fruit beetle, Pachnoda sinuata*. Journal of Insect Physiology, 2002, **48** (2), 239–248. Dostupné online: doi.org/10.1016/s0022-1910(01)00169-x
- BARAUD, J. *Coléoptères Scarabaeoidea: faune du Nord de l'Afrique, du Maroc au Sinaï*. Lechevalier, Paris, 1985. 546 pp.
- BAUDACH, A. & VILCINSKAS, A. *The European Map Butterfly Araschnia levana as a Model to Study the Molecular Basis and Evolutionary Ecology of Seasonal Polyphenism*. Insects, 2021, **12**: 325. Dostupné online: doi.org/10.3390/insects12040325
- BENGTSSON, J. M. & WOLDE-HAWARIAT, Y & KHBAISH, H. & NEGASH, M. & JEMBERE, B. & SEYOUM, E. & HANSSON, B. S. & LARSSON, M. C. & HILBUR, Y. *Field Attractants for Pachnoda interrupta Selected by Means of GC-EAD and Single Sensillum Screening*. Journal of Chemical Ecology, 2009, **35**(9): 1063-1076. ISSN 0098-0331. Dostupné online: doi.org/10.1007/s10886-009-9684-7
- BERRY, A. J. & WILLMER, P. G. *Temperature and the colour polymorphism of Philaenus spumarius (Homoptera: Aphrophoridae)*. Ecological Entomology, 1986, **11**: 251-259. Dostupné online: doi.org/10.1111/j.1365-2311.1986.tb00301.x
- BEZDĚK, A. *Subfamily Cetoniinae*. In: Löbl, I. & Löbl, D. (Eds.), *Catalogue of Palaearctic Coleoptera. Vol. 3. Scarabaeoidea, Scirtoidea, Dascilloidea, Buprestoidea, Byrrhoidea. Revised and updated edition*. Brill, Leiden, 2016. pp. 367–412.
- BIDAU, C. J. & MARTÍ, D. A. *A test of Allen's rule in ectotherms: the case of two south American Melanopline Grasshoppers (Orthoptera: Acrididae) with partially overlapping geographic ranges*. Neotropical Entomology, 2008, **37**: 370–380. Dostupné online: doi.org/10.1590/s1519-566x2008000400004

BOSSART, J. L. *Swallowtail Butterflies of the Americas: A Study in Biological Dynamics, Ecological Diversity, Biosystematics, and Conservation*. The Quarterly Review of Biology, 1995, **70** (4): 522–523. Dostupné online: doi.org/10.1086/419219

BRAKEFIELD, P. M. *Ecological studies on the polymorphic ladybird Adalia bipunctata in the Netherlands. I. Population biology and geographical variation of melanism*. The Journal of Animal Ecology, 1984a, **53**: 761-774. Dostupné online: doi.org/10.2307/4658

BRAKEFIELD, P. M. *Ecological studies on the polymorphic ladybird Adalia bipunctata in the Netherlands. II. Population dynamics, differential timing of reproduction and thermal melanism*. The Journal of Animal Ecology, 1984b, **53**: 775-790. Dostupné online: doi.org/10.2307/4659

BRAKEFIELD, P. M. & WILLMER, P. G. *The basis of thermal melanism in the ladybird Adalia bipunctata: Differences in reflectance and thermal properties between the morphs*. Heredity, 1985, **54**: 9-14. Dostupné online: doi.org/10.1038/hdy.1985.3

BROWER, A. V. *Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly Heliconius erato inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994, **91**: 6491–6495. Dostupné online: doi.org/10.1073/pnas.91.14.6491

CLARK, R. & CROWE, T. J. *The genus Pachnoda in Ethiopia: Identification, pest status and control of the species*. Institute of Agricultural Research: Addis Ababa, 2001. Dostupné online: publication.eiar.gov.et:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/2300/R.O.S%20Clark%20and%20T.J.CROWE.pdfabbhyyy.pdf?sequence=1&isAllowed=y

CLISSOLD, F. J. & SIMPSON, S. J. *Temperature, food quality and life history traits of herbivorous insects*. Current Opinion in Insect Science, 2015, **11**: 63–70. Dostupné online: doi.org/10.1016/j.cois.2015.10.011

CLUSELLA-TRULLAS, S. & VAN WYK, J. H. & SPOTILA, J. R. *Thermal melanism in ectotherms*. Journal of Thermal Biology, 2007, **32** (5): 235-245. Dostupné online: doi.org/10.1016/j.jtherbio.2007.01.013.

CLUSELLA-TRULLAS, S. & WYK, J. H. & SPOTILA, J. R. *Thermal benefits of melanism in cordylid lizards: a theoretical and field test*. Ecology, 2009, **90** (8): 2297–2312. Dostupné online: doi.org/10.1890/08-1502.1

COOK, L. M. & SACCHERI, I. J. *The peppered moth and industrial melanism: evolution of a natural selection case study*. Heredity, 2013, **110**: 207–212. Dostupné online: doi.org/10.1038/hdy.2012.92

CROSS, E. A. & MOSER, J. C. & RACK, G. *Some new forms of Pyemotes (Acarina: Pyemotidae) from forest insects, with remarks on polymorphism*. International Journal of Acarology, 1981, **7** (1-4): 179–196. Dostupné online: doi.org/10.1080/01647958108683260

ČUŘÍK, P. *Živé drahokamy v teráriích*. Úvaly, Ratio, 1998. ISBN 80-902312-4-1.

- DANKS, H. V., ed. *Insect Life Cycle Polymorphism: Theory, Evolution and Ecological Consequences for Seasonality*. Springer Science & Business Media, 1994, 378 s. ISBN 9780792328285.
- DAVIS, A. L. V. & BRINK, D. J. & SCHOLTZ, C. H. & PRINSLOO, L. C., DESCHODT, C. M. *Functional implications of temperature-correlated colour polymorphism in an iridescent, scarabaeine dung beetle*. *Ecological Entomology*, 2008, **33**: 771-779. Dostupné online: doi.org/10.1111/j.1365-2311.2008.01033.x
- DESBORDERS, L. *Les Cétoines du Yémen récoltées par Roger Naviaux (Coleoptera, Cetoniidae)*. *Arvernsis, Bulletin de l'Association Entomologique d'Auvergne*, 2016, No. 73-74, 1-12.
- DE SOUZA, A. R & MAYORQUIN, A. Z. & SARMIENTO, C. E. *Paper wasps are darker at high elevation*. *Journal of Thermal Biology*, 2020, **89**: 102535. Dostupné online: doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102535.
- DONALDSON, J. M. I. *Observations on Pachnoda sinuata var. flaviventris and other Cetoniinae (Coleoptera: Scarabaeidae) in compost heaps*. *Phytophylactica*, 1984, 16 (1): 57-60. Dostupné online: doi.org/10.10520/AJA03701263_924
- DRENT, J. & PIERSMA, T. *Phenotypic flexibility and the evolution of organismal design*. *Trends in Ecology & Evolution*, 2003, **18**: 228-233. Dostupné online: doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00036-3
- DRISCOLL, C. A. & MACDONALD, D. W. & O'BRIEN, S. J. *From wild animals to domestic pets, an evolutionary view of domestication*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, **106** (1): 9971-9978. Dostupné online: doi.org/10.1073/pnas.0901586106
- EMLÉN, D.J. & CORLEY LAVINE, L. & EWEN-CAMPEN, B. *On the origin and evolutionary diversification of beetle horns*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, **104**: 8661-8668. Dostupné online: doi.org/10.1073/pnas.0701209104
- ENDLER, J. A. *A predator's view of animal colour patterns*. HECHT, M. K. & STEERE, W. C. & WALLACE, B., eds. *Evolutionary Biology*, 1978, **11**: 319-364. Dostupné online: doi.org/10.1007/978-1-4615-6956-5_5
- FERGUSON, M. W. J. & JOANEN, T. *Temperature-dependent sex determination in Alligator mississippiensis*. *Journal of Zoology*, 1983, **200** (2): 143-177. Dostupné online: doi.org/10.1111/j.1469-7998.1983.tb05781.x
- FLETCHER, T. J. *Farmed deer: new domestic animals defined by controlled breeding*. *Reproduction, Fertility and Development*, 2001, **13**: 511-516. Dostupné online: doi.org/10.1071/RD01094
- FORSMAN, A. *Rethinking the thermal melanism hypothesis: rearing temperature and coloration in pygmy grasshoppers*. *Evolutionary Ecology*, 2011, **25**(6): 1247-1257. Dostupné online: doi.org/10.1007/s10682-011-9477-7
- FORSTER, J. & HIRST, A.G. *The temperature-size rule emerges from ontogenetic differences between growth and development rates*. *Functional Ecology*, 2012, **26**: 483-492. Dostupné online: doi.org/10.1111/j.1365-2435.2011.01958.x

- FRAYER, D. W. & WOLPOFF, M. H. *Sexual Dimorphism*. Annual Review of Anthropology, 1985, **14**: 429–473. Dostupné online: doi.org/10.1146/annurev.an.14.100185.002241
- FRIC, Z. & KONVIČKA, M. *Generations of the polyphenic butterfly *Araschnia levana* differ in body design*. Evolutionary Ecology Research, United States: Evolutionary Ecology, 2002, **4**: 1017–1032. Dostupné online: <http://www.evolutionary-ecology.com/issues/v04n07/hhar1446.pdf>
- GILBERT, N. & RAWORTH, D. A. *Forum: Insects and temperature – a general theory*. The Canadian Entomologist, 1996, **128** (1): 1–13. Dostupné online: doi.org/10.4039/ent1281-1
- GIRALDO, M. A. & STAVENGA, D. G. *Sexual dichroism and pigment localization in the wing scales of *Pieris rapae* butterflies*. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2007, **274**: 97–102. Dostupné online: doi.org/10.1098/rspb.2006.3708
- GROSS, J. & SCHMOLZ, E. & HILKER, M. *Thermal Adaptations of the Leaf Beetle *Chrysomela lapponica* (Coleoptera: Chrysomelidae) to Different Climes of Central and Northern Europe*. Environmental Entomology, 2004, **33** (4): 799–806. Dostupné online: doi.org/10.1603/0046-225X-33.4.799
- HESSEN, D. O. *Competitive trade-off strategies in Arctic *Daphnia* linked to melanism and UV-B stress*. Polar Biology, 1996, **16**: 573–579. Dostupné online: doi.org/10.1007/BF02329054
- HIGGINS, L. *Female gigantism in a New Guinea population of the spider *Nephila maculata**. Oikos, 2002, **99** (2): 377–385. Dostupné online: doi.org/10.1034/j.1600-0706.2002.990220.x
- HONEK, A. & BROWN, P. M. J. & MARTINKOVA, Z. & SKUHROVEC, J. & BRABEC, M. & BURGIO, G. & EVANS, E. W. & FOURNIER, M. & GREZ, A. A. & KULFAN, J. & LAMI, F. & LUCAS, E. & LUMBIERRES, B. & MASETTI, A. & MOGILEVICH, T. & ORLOVA-BIENKOWSKAJA, M. & PHILLIPS, W. M. & PONS, X. & STROBACH, J. & VIGLASOVA, S. & ZACH, P. & ZAVIEZO, T. *Factors determining variation in colour morph frequencies in invasive *Harmonia axyridis* populations*. Biological Invasions, 2020, **22**: 2049–2062. Dostupné online: doi.org/10.1007/s10530-020-02238-0
- JAKUBEC, P. *Thermal summation model and instar determination of all developmental stages of necrophagous beetle, *Sciodrepoides watsoni* (Spence) (Coleoptera: Leiodidae: Cholevinae)*. PeerJ, 2016, **4**: e1944. Dostupné online: doi.org/10.7717/peerj.1944
- JAKUBEC, P. & QUBAIOVÁ, J. & NOVÁK, M. & RŮŽIČKA, J. *Developmental Biology of Forensically Important Beetle, *Necrophila (Calosilpha) brunnicollis* (Coleoptera: Silphidae)*. Journal of Medical Entomology, 2020, **20** (10): 1–7. Dostupné online: doi.org/10.1093/jme/tjaa170
- JANZEN, F. J. *Climate change and temperature-dependent sex determination in reptiles*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994, **91**: 7487–7490. Dostupné online: doi.org/10.1073/pnas.91.16.7487
- KAABER, S. & KRISTENSEN, N.P. & SIMONSEN, T. J. *Sexual dimorphism and geographical male polymorphism in the ghost moth *Hepialus humuli* (Lepidoptera: Hepialidae): Scale ultrastructure and evolutionary aspects*. European Journal of Entomology, 2009, **106**: 303–313. Dostupné online: doi.org/10.14411/eje.2009.036

- KETTLEWELL, H. B. D. *The Phenomenon of Industrial Melanism in Lepidoptera*. Annual Review of Entomology, 1961, **6**(1): 245–262. Dostupné online: doi.org/10.1146/annurev.en.06.010161
- KHALIQ, A. M. & JAVED, M. & SOHAIL, M. & SAGHEER, M. *Environmental effects on insects and their population dynamics*. Journal of Entomology and Zoology studies, 2014, **2** (2): 1-7. Dostupné online: www.entomoljournal.com/archives/2014/vol2issue2/PartA/32.pdf
- KING, R. B. *Mendelian inheritance of melanism in the garter snake *Thamnophis sirtalis**. Herpetologica, 2003, **59** (4): 484-489. Dostupné online: doi.org/10.1655/02-93
- KINGSOLVER, J. G. & WIERNASZ, D. C. *Seasonal Polyphenism in Wing-Melanin Pattern and Thermoregulatory Adaptation in *Pieris* Butterflies*. The American Naturalist, 1991, **137** (6): 816–830. Dostupné online: www.jstor.org/stable/2462402
- KLÁTIL, L. & VRÁNA, T. *Chov zlatohlávků a nosorožníků*. Rudná u Prahy, Robimaus, 2008. ISBN 978-80-903357-6-9.
- KLEIN, E. *A Comprehensive Etymological Dictionary of the English Language*. Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1969. ISBN 978-0444409300.
- KLOK, C. J. & HARRISON, J. F. *The Temperature Size Rule in Arthropods: Independent of Macro-Environmental Variables but Size Dependent*. Integrative and Comparative Biology, 2013, **53** (4): 557–570. Dostupné online: doi.org/10.1093/icb/ict075
- KNAPP, M. & NEDVĚD, O. *Gender and Timing during Ontogeny Matter: Effects of a Temporary High Temperature on Survival, Body Size and Colouration in *Harmonia axyridis**. PLOS ONE, 2013, **8** (9): e74984. Dostupné online: doi.org/10.1371/journal.pone.0074984
- KÖHLER, G. & SAMIETZ, J. & SCHNIELZETH, H. *Morphological and colour morph clines along an altitudinal gradient in the meadow grasshopper *Pseudochorthippus parallelus**. PLOS ONE, 2017, **12**: 1–13. Dostupné online: doi.org/10.1371/journal.pone.0189815
- KOZLOV, M. V. & OUDENDIJK, Z. & FORSMAN, A. & LANTA, V. & BARCLAY, M. V. L. & GUSAROV, V. I. & GUSTAFSSON, B. & HUANG, Z-Z. & KRUGLOVA, O. Y. & MARUSIK, Y. M. & MIKHAILOV, Y. E. & MUTANEN, M. & SCHNEIDER, A. & SEKERKA, L. & SERGEEV, M. E. & ZVEREV, V. & ZVEREVA, E. L. *Climate shapes the spatio-temporal variation in colour morph diversity and composition across the distribution range of *Chrysomela lapponica* leaf beetle*. Insect Science, 2022, **93** (3): 942-955. Dostupné online: doi.org/10.1111/1744-7917.12966
- KRÁL, D & HRŮZOVÁ, L. & ŠÍPEK, P. & AWALE, A. I. & HURRE, A. A. & SOMMER, D. *Pachnoda iskuulka (Coleoptera: Scarabaeidae)*. Zootaxa, 2019, **4604**(3), 482-496. ISSN 1175-5334. Dostupné online: doi.org/10.11646/zootaxa.4604.3.5
- LANGHAM, G. M. *Specialized avian predators repeatedly attack novel color morphs of *Heliconius* butterflies*. Evolution, 2004, **58** (12): 2783–2787. Dostupné online: doi.org/10.1111/j.0014-3820.2004.tb01629.x

- LEE, K. P. & ROH, C. *Temperature-by-nutrient interactions affecting growth rate in an insect ectotherm*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2010, **136**(2): 151–163. Dostupné online: doi.org/10.1111/j.1570-7458.2010.01018.x
- LEIMAR, O. *The Evolution of Phenotypic Polymorphism: Randomized Strategies versus Evolutionary Branching*. *The American Naturalist*, 2005, **165** (6): 669–681. Dostupné online: doi.org/10.1086/429566
- LI, D. & JACKSON, R. R. *How temperature affects development and reproduction in spiders: A review*. *Journal of Thermal Biology*, 1996, **21** (4): 245–274. Dostupné online: doi.org/10.1016/0306-4565(96)00009-5
- LO, N. & SIMPSON, S. J. & SWORD, G. A. *Polyphenism in Insects*. *Current Biology*, 2011, **21**: 18: 738-749. Dostupné online: doi.org/10.1016/j.cub.2011.06.006
- LOHMANN, M. *Motýli: průvodce naší přírodou*. Praha: Beta, 2006, s. 46-47. ISBN 80-7306-239-9.
- MARTÍNEZ-FREIRÍA, F. & TOYAMA, K. S. & FREITAS, I. & KALIONTZOPOULOU, A. *Thermal melanism explains macroevolutionary variation of dorsal pigmentation in Eurasian vipers*. *Scientific Reports*, 2020, **10**: 16122. Dostupné online: doi.org/10.1038/s41598-020-72871-1
- MARUYAMA, T. & FUERST, P. A. *Population bottlenecks and nonequilibrium models in population genetics. II. Number of alleles in a small population that was formed by a recent bottleneck*. *Genetics*, 1985, **111** (3): 675–689. Dostupné online: doi.org/10.1093/genetics/111.3.675
- MASON, C. W. *Structural Colors in Insects. I*. *The Journal of Physical Chemistry*, 1925, **30** (3): 383–395. Dostupné online: doi.org/10.1021/j150261a009
- MASON, C. W. *Structural Colors in Insects II. J*. *The Journal of Physical Chemistry*, 1927, **31**: 321–354. Dostupné online: doi.org/10.1021/j150273a001
- MCLEAN, C. & STUART-FOX, D. *Geographic variation in animal colour polymorphisms and its role in speciation*. *Biological Reviews*, 2014, **89**(4): 860-873. ISSN 14647931. Dostupné online: doi.org/10.1111/brv.12083
- MICHIE, L. J. & MALLARD, F. & MAJERUS, M. E. N. & JIGGLINS, F. M. *Melanic through nature or nurture: genetic polymorphism and phenotypic plasticity in *Harmonia axyridis**. *Journal of Evolutionary Biology*, 2010, **23** (8): 1699-1707. Dostupné online: doi.org/10.1111/j.1420-9101.2010.02043.x
- MOORE, M. R. & JAMESON, M. L. & GARNER, B. H. & AUDIBERT, C. & SMITH, A. B. T. & SEIDEL, M. *Synopsis of the pelidnotine scarabs (Coleoptera, Scarabaeidae, Rutelinae, Rutelini) and annotated catalog of the species and subspecies*. *ZooKeys*, 2017, **666**: 1–349. Dostupné online: doi.org/10.3897/zookeys.666.9191
- MUNTALA, A. & KWADWO GYASI, S. & MAWUENYEGAN NORSHIE, P. & LARBI-KORANTENG, S. & KWEKUCHER ACKAH, F. & AFREH NTIAMOAH, D. & ATEF MOHAMED, M. *Diseases and Insect Pests associated with Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Orchards in Ghana*. *European Journal of*

- Agriculture and Food Sciences, 2021, **3**: 23–32. Dostupné online: doi.org/10.24018/ejfood.2021.3.5.357
- NEDVĚD, O. *Jak „se dělá“ tečkování u sluněček*. Živa, 2011, **1**: 34–37. Dostupné online: <https://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/jak-se-dela-teckovani-u-slunecek.pdf>
- NOONAN, B. P. & COMEAULT, A. A. *The role of predator selection on polymorphic aposematic poison frogs*. Biology Letters, 2009, **5**: 51–54. Dostupné online: doi.org/10.1098/rsbl.2008.0586
- QUARTAU, J. A. & BORGES, P. A. *On the colour polymorphism of Philae-nus spumarius (L.) (Homoptera, Cercopidae) in Portugal*. Miscel-lania Zoologica, 1997, **20**: 19–30. ISSN 0211-6529.
- RÉGNIÈRE, J. & POWELL, J. & BENTZ, B. & NEALIS, V. *Effects of temperature on development, survival and reproduction of insects: Experimental design, data analysis and modeling*. Journal of Insect Physiology, 2013, **58** (5): 634–647. Dostupné online: doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.01.010
- RETANA, J. & CERDÁ, X. *Worker Size Polymorphism Conditioning Size Matching in Two Sympatric Seed-Harvesting Ants*. Oikos, 1994, **71** (2): 261. Dostupné online: doi.org/10.2307/3546274
- RUEDEN, C. T. & SCHINDELIN, J. & HINER, M. C. & DEZONIA, B. E. & WALTER, A. E. & ARENA, E. T. & ELICEIRI, K. W. *ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data*. BMC Bioinformatics, 2017, **18** (1). Dostupné online: doi.org/10.1186/s12859-017-1934-z
- SASTAWA, B. M. & LALE ,N.E.S. *Efficacy of host plant resistance, sowing date modification and intercropping as methods for the control of Pachnoda interrupta (Olivier) in pearl millet in the Nigerian Sudan savanna*. Journal of Arid Environments, 2000, **46**(3): 249–262. ISSN 01401963. Dostupné online: doi.org/10.1006/jare.2000.0671
- SCHROEDER, A.L. & METZGER, K.J. & MILLER, A. & RHEN, T. *A Novel Candidate Gene for Temperature-Dependent Sex Determination in the Common Snapping Turtle*. Genetics, 2016, **203**: 557–571. Dostupné online: doi.org/10.1534/genetics.115.182840
- SCHULTZ, T. D. & HADLEY, N. F. *Structural Colors of Tiger Beetles and Their Role in Heat Transfer Through the Integument*. Physiological Zoology, 1987, **60**: 737–745. Dostupné online: doi.org/10.1086/physzool.60.6.30159990
- STANBROOK, R. A. & HARRIS, W. E. & WHEATER, C. & JONES, M. *Evidence of phenotypic plasticity along an altitudinal gradient in the dung beetle Onthophagus proteus*. PeerJ, 2021, **9**: e10798. Dostupné online: doi.org/10.7717/peerj.10798
- STUART-FOX, D. & NEWTON, E. & CLUSELLA-TRULAS, S. *Thermal consequences of colour and near-infrared reflectance*. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2017, **372**: 20160345. Dostupné online: doi.org/10.1098/rstb.2016.0345
- SU, W. & MICHAUD, J.P. & XIAOLING, T. & MURRAY, L. & FAN, Z. *Melanism in a Chinese Population of Harmonia axyridis (Coleoptera: Coccinellidae): A Criterion for Male Investment with Pleiotropic*

Effects on Behavior and Fertility. Journal of Insect Behavior, 2013, **26**: 679–689. Dostupné online: doi.org/10.1007/s10905-013-9384-6

SUGAHARA, R. & TANAKA, S. & JOURAKU, A. & SHIOTSUKI, T. *Functional characterization of the corazonin-encoding gene in phase polyphenism of the migratory locust, Locusta migratoria (Orthoptera: Acrididae)*. Applied Entomology and Zoology, 2016, **51** (2): 225-232. Dostupné online: doi.org/10.1007/s13355-015-0391-2

SUKONTASON, K.L. & CHAIWONG, T. & PIANGJAI, S. & UPAKUT, S. & MOOPHAYAK, K. & SUKONTASON, K. *Ommatidia of blow fly, house fly, and flesh fly: implication of their vision efficiency*. Parasitology Research, 2008, **103** (1): 123–131. Dostupné online: doi.org/10.1007/s00436-008-0939-y

TANAKA, S. & SAEKI, S. & NISHIDE, Y. & SUGAHARA, R. & SHIOTSUKI, T. *Body-color and behavioral responses by the mid-instar nymphs of the desert locust, Schistocerca gregaria (Orthoptera: Acrididae) to crowding and visual stimuli*. Entomological Science, 2016, **19** (4): 391–400. Dostupné online: doi.org/10.1111/ens.12193

TESAŘ, Z. *Mecynorrhina machulkai spec. n. (Col. Ceton.)*. Sborník entomologického oddělení Národního muzea v Praze, 1935, **8**(116): 101.

TRANIELLO, J. F. A. & ROSENGAUS, R. B. *Ecology, evolution and division of labour in social insects*. Animal behaviour, 1997, **53**(1): 209-213. Dostupné online: doi.org/10.1006/anbe.1996.0289

TRUE, J. R. *Insect melanism: the molecules matter*. Trends in Ecology & Evolution, 2003, **18** (12), 640–647. Dostupné online: doi.org/10.1016/j.tree.2003.09.006

VENDL, T. & KRATOCHVÍL, L. & ŠÍPEK, P. *Ontogeny of sexual size dimorphism in the hornless rose chafer Pachnoda marginata (Coleoptera: Scarabaeidae: Cetoniinae)*. Zoology, 2016, **119** (6): 481–488. Dostupné online: doi.org/10.1016/j.zool.2016.07.002

VENDL, T. & ŠÍPEK, P. *Immature stages of giants: morphology and growth characteristics of Goliathus Lamarck, 1801 larvae indicate a predatory way of life (Coleoptera, Scarabaeidae, Cetoniinae)*. Zookeys, 2016, **27**(619): 25-44. Dostupné online: doi.org/10.3897/zookeys.619.8145.

VENDL, T. & ŠÍPEK, P. & KOUKLÍK, O. & KRATOCHVÍL, L. *Hidden complexity in the ontogeny of sexual size dimorphism in male-larger beetles*. Sci Rep, 2018, **8**: 5871. Dostupné online: doi.org/10.1038/s41598-018-24047-1

VERBERK, W. C. E. P. & ATKINSON, D. & HOEFNAGEL, K. N. & HIRST, A. G. & HORNE, C. R. & SIEPEL, H. *Shrinking body sizes in response to warming: explanations for the temperature–size rule with special emphasis on the role of oxygen*. Biological Reviews, 2021, **96**: 247–268. Dostupné online: doi.org/10.1111/brv.12653

WALTERS, R. J. & HASSALL, M. *The Temperature-Size Rule in Ectotherms: May a General Explanation Exist after All?* The American Naturalist, 2006, **167** (4): 510–523. Dostupné online: doi.org/10.1086/501029

- WANATABE, T. & TANIGAKI, T. & NISHI, H. & USHIMARU, A. & TAKEUCHI, T. *A quantitative analysis of geographic color variation in two Geotrupes dung beetles*. *Zoological Science*, 2002, **19** (3): 351-358. Dostupné online: doi.org/10.2108/zsj.19.351
- WILLI, Y. & VAN BUSKIRK, J. & HOFFMANN, A. A. *Limits to the Adaptive Potential of Small Populations*. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 2006, **37** (1): 433-458. Dostupné online: doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110145
- WONGLERSAK, R. & FENBERG, P. B. & LANGDON, P. G. & BROOKS, S. J. & PRICE, B. W. *Temperature-body size responses in insects: a case study of British Odonata*. *Ecological Entomology*, 2020. Dostupné online: doi.org/10.1111/een.12853
- WU, L.-W. & CHEN, M.-Y. & LI, C.-L. *Phylogenetic position and morphological polymorphism of the chafer, Clinterocera nigra (Coleoptera: Scarabaeidae: Cetoniinae) from Taiwan*. *Mitochondrial DNA Part B*, 2022, **7**: 1513-1515. Dostupné online: doi.org/10.1080/23802359.2022.2109438
- YANG, H. & SHI, C. & ENGEL, M. S. & ZHAO, Z. & REN, D. & GAO, T. *Early specializations for mimicry and defense in a Jurassic stick insect*. *National Science Review*, 2021, **8** (1): nwaa056. Dostupné online: doi.org/10.1093/nsr/nwaa056
- ZEBE, E. & GÄDE, G. *Flight metabolism in the African fruit beetle, Pachnoda sinuata*. *Journal of Comparative Physiology B*, 1993, **163**: 107-112 Dostupné online: doi.org/10.1007/BF00263594
- ZERA, A. J. & DENNO, R.F. *Physiology and ecology of dispersal polymorphism in insects*. *Annual Review of Entomology*, 1997, **42**: 207-230. Dostupné online: doi.org/10.1146/annurev.ento.42.1.207
- ZEIL, J. *Sexual dimorphism in the visual system of flies: The compound eyes and neural superposition in bibionidae (Diptera)*. *Journal of Comparative Physiology A*, 1983, **150** (3): 379-393. Dostupné online: doi.org/10.1007/bf00605027
- ZIEMBA, K. S. & RUTOWSKI, R. L. *Sexual Dimorphism in Eye Morphology in a Butterfly (Asterocampa leilia; Lepidoptera, Nymphalidae)*. *Psyche: A Journal of Entomology*, 2000, **103** (1-2): 25-36. Dostupné online: doi.org/10.1155/2000/54503
- ZVEREV, V. & KOZLOV, M. V. & FORSMAN, A. & ZVEREVA, E. L. *Ambient temperatures differently influence colour morphs of the leaf beetle Chrysomela lapponica : Roles of thermal melanism and developmental plasticity*. *Journal of Thermal Biology*, 2018, **74**: 100-109. Dostupné online: doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.03.019
- ZVEREVA, E. & KOZLOV, M. & KRUGLOVA, O. *Colour polymorphism in relation to population dynamics of the leaf beetle, Chrysomela lapponica*. *Evolutionary Ecology*, 2002, **16**: 523-539. Dostupné online: doi.org/10.1023/A:1021656829629
- ZVEREVA, E. L. & KOZLOV, M. V. & NEUVONEN, S. *Decrease in feeding niche breadth of Melasoma lapponica (Coleoptera: Chrysomelidae) with increase in pollution*. *Oecologia*, 1995, **104** (3): 323-329. Dostupné online: doi.org/10.1007/bf00328368

Climate details in Ethiopia. World Data: The world in numbers (nedatováno) [citováno 21. 4. 2023]. Dostupné online: www.worlddata.info/africa/ethiopia/climate.php

Climate: Somaliland in Somalia. World Data: The world in numbers (nedatováno) [citováno 21. 4. 2023]. Dostupné online: www.worlddata.info/africa/somalia/climate-somaliland.php

Přílohy

I. Skript pro převod měřítka

```
//open("/home/schebique/Obrázky/Oto Petlák/First test/230120/RAW/5.9.2022/mÄlÄtko
5.9.2022.JPG");
//selectWindow("mÄlÄtko 5.9.2022-1.JPG");
title=getTitle();
getPixelSize(unit, pixelWidth, pixelHeight);
if (is("global scale") || (unit!="pixels")) {
    //setVoxelSize(1, 1, 1, "pixels");
    run("Properties...", "pixel_width=1.0000 pixel_height=1.0000 voxel_depth=1.0000");
}
if (!is("grayscale")) {
    run("16-bit");
}
run("Duplicate...", "title=blur");
run("Gaussian Blur...", "sigma=250");
imageCalculator("Divide create 32-bit", title,"blur");
image=getImageID();
close("blur");
run("Median...", "radius=10");
//run("Brightness/Contrast...");
resetMinAndMax();
setOption("ScaleConversions", true);
run("16-bit");
setAutoThreshold("Mean dark");
run("Analyze Particles...", "size=10000-Infinity pixel circularity=0.00-1.0 show=Masks exclude");
mask=getImageID();
if (is("Inverting LUT")) run("Invert LUT");
setAutoThreshold("Mean dark");
run("Create Selection");
run("To Bounding Box");
run("Invert");
run("Gaussian Blur...", "sigma=25");
profile=getProfile();
maximas=Array.findMaxima(profile, 50, 1);
Array.sort(maximas);
//Array.print(maximas);
Plot.create("Detecting Maxima", "X", "Y", profile);
Plot.show;
dif=newArray(maximas.length-2);
for (d=maximas.length-1; d>0; d--) {
    dif[d-1]=(maximas[d]-maximas[d-1]);
}
Array.getStatistics(dif, min, max, mean, stdDev);
print(title+" scale is "+mean+" pixels/mm");
selectImage(title);
run("Set Scale...", "distance="+mean+" known=1 pixel=1 unit=mm");
makeLine(getWidth()/2, getHeight()/2, getWidth()/2+mean, getHeight()/2);
run("Measure");
waitForUser;
close("");
```

II. Skript pro převod velikosti z pixelů na milimetry

```
pxsize=261.5;
unit="mm";
while (nImages>0) {
    selectImage(nImages);
    run("Set Scale...", "distance="+pxsize+" known=1 unit="+unit);
    run("Save");
    close();
}
```

III. Skript pro měření pravděpodobnostní mapy barev

```
getIlastikPlugin("ilastik"); //check if ilastik plugin is installed
//variables
imageExt=".tif";
segmentsExt=".h5";
//Folder="/home/schebique/Obrázky/Oto Petl™Á-k/First test/220923/generace_2/";
Folder=getDirectory(".H5 data folder");
//prepare
run("Set Measurements...", "area area_fraction stack limit display redirect=None decimal=3");
run("Clear Results");
//get file list
file=getFileList(Folder);
for (f = 0; f < file.length; f++) {
    if (endsWith(file[f], imageExt) && indexOf(file[f], "Probabilities")==-1) { //&&
File.exists(Folder+name+"_Probabilities."+segmentsExt) {
        roiManager("reset");
        name=replace(file[f], imageExt, "");
        //open(Folder+file[f]);
        //calibrate
        //run("Properties...", "pixel_width=0.00425 pixel_height=0.00425
voxel_depth=0.00425");
        //import spots probability masks
        run("Import HDF5", "select=["+Folder+name+"_Probabilities"+segmentsExt+"]
datasetname=/exported_data axisorder=yxc");
        //calibrate
        //run("Properties...", "pixel_width=0.00425 pixel_height=0.00425
voxel_depth=0.00425");
        run("Make Composite", "display=Color");
        for (s=1; s<=nSlices; s++){
            Stack.setChannel(s);
            if (s==1) {
                setAutoThreshold("Li");
                //setAutoThreshold("Shanbhag");
                run("Create Selection");
                roiManager("Add");
                whole_body=roiManager("count")-1;
                roiManager("Select", whole_body);
                roiManager("Rename", name);
                roiManager("Select", whole_body);
                run("Measure");
                run("Grays");
            }
            else {
                roiManager("select", whole_body);
                Stack.setChannel(s);
                setAutoThreshold("Intermodes dark");
                run("Measure");
                run("Create Selection");
                roiManager("Add");
                if (s==2) {
                    yellow=roiManager("count")-1;
                    roiManager("Select", yellow);
                    roiManager("Rename", "yellow");
                    run("Yellow");
                }
            }
        }
    }
}
```

```

        if (s==3) {
            roiManager("count")-1;
            roiManager("Select", red);
            roiManager("Rename", "red");
            run("Red");
        }
        if (s==4) {
            black=roiManager("count")-1;
            roiManager("Select", black);
            roiManager("Rename", "black");
            run("Cyan");
        }
    }
    Stack.setDisplayMode("composite");
    run("RGB Color");
    saveAs("Tiff", Folder+name+"_Probabilities.tif");
    close();

    //save zip
    roiManager("Deselect");
    roiManager("Save", Folder+name+"_RoiSet.zip");

    //close all relevant images
    print(name);
    close();
    //close("*");
    //end if .tif
} //end of cycle above files
//save results
selectWindow("Results");
saveAs("Results", Folder+"Results.txt");
//***** Functions *****
function measure(indexes) {
    for (i=0; i<indexes.length; i++) {
        roiManager("Select", indexes[i]);
        run("Measure");
    }
}
function labelRois (label, index0, index1) {
    if (index1-index0 == 0) indexes=1;
    else indexes=index1-index0;
    R=newArray(indexes);
    for (r=0; r<R.length; r++) {
        R[r]=r0+r;
        roiManager("select", R[r]);
        roiManager("Rename", label);
    }
    //Array.print(R);
    return R;
}
function getIlastikPlugin(pluginName){
    pluginsFolder=getDirectory("plugins");
    f=getFileList(pluginsFolder);
    i=0;
    found=false;

```

```
while (!found && i<f.length-1) {
    ilasticFile=f[i];
    if (startsWith(lasticFile, pluginName)) found=true;
    else found=false;
    i++;
}
if (!found) {
    run("Update..");
    showMessage("Please, install the ilastik plugin from update sites and restart FIJI.");
}
}
```

IV. Skript pro měření pravděpodobnostní mapy barev ve formátu TIF

```
getIlastikPlugin("ilastik"); //check if ilastik plugin is installed
//variables
imageExt=".tif";
segmentsExt=".h5";
//Folder="/home/schebique/Obrázky/Oto Petl™-k/First test/220923/generace_2/";
Folder=getDirectory("measured data folder");
//prepare
run("Set Measurements...", "area mean standard modal min centroid center perimeter bounding fit
shape feret's integrated median skewness kurtosis area_fraction stack limit display redirect=None
decimal=3");
run("Clear Results");
//get file list
file=getFileList(Folder);
//setBatchMode(true);
for (f = 0; f < file.length; f++) {
    if (endsWith(file[f], imageExt) && indexOf(file[f], "Probabilities.tif")==-1 && indexOf(file[f],
"RoiSet.tif")==-1) { //&& File.exists(Folder+name+"_Probabilities."+segmentsExt) {
        roiManager("reset");
        name=replace(file[f], imageExt, "");
        open(Folder+file[f]);
        //get calibration
        getPixelSize(unit, pixelWidth, pixelHeight);
        //get whole body selection
        run("Make Composite");
        originalTif=getImageID();
        run("Z Project...", "projection=[Average Intensity]");
        avgImage=getTitle();
        run("Median...", "radius=5");
        setAutoThreshold("Triangle");
        run("Create Selection");
        roiManager("Add");
        close(avgImage);
        whole_body=roiManager("count")-1;
        roiManager("Select", whole_body);
        roiManager("Set Color", "yellow");
        roiManager("Rename", name);
        //roiManager("Select", whole_body);
        //measureRGB();
        //run("Properties...", "pixel_width=0.00425 pixel_height=0.00425
voxel_depth=0.00425");
        //import spots probability masks
        run("Import HDF5", "select=["+Folder+name+"_Probabilities"+segmentsExt+"
datasetname=/exported_data axisorder=yxc");
        //calibrate
        run("Properties...", "pixel_width="+pixelWidth+" pixel_height="+pixelHeight+"
voxel_depth="+pixelWidth);
        run("Make Composite", "display=Grayscale");
        probabilityImage=getImageID();
        run("Misc...", "divide=Infinity hide run save"); //hide sprocess stack
        for (s=1; s<=nSlices; s++){
            Stack.setChannel(s);
            if (s==1) {
                /*setAutoThreshold("Intermodes");
                //setAutoThreshold("Li");
```



```

//setAutoThreshold("Shanbhag");
run("Create Selection");
//run("Enlarge...", "enlarge=-0.03");
roiManager("Add");
whole_body=roiManager("count")-1;
roiManager("Select", whole_body);
roiManager("Rename", name);
*/
selectImage(originalTif);
roiManager("Select", whole_body);
measureRGB();
selectImage(probabilityImage);
run("Grays");
}
else {
roiManager("select", whole_body);
Stack.setChannel(s);
setBackground(0, 0, 0);
run("Clear Outside");
setAutoThreshold("Intermodes dark");
//run("Measure");
run("Create Selection");
roiManager("Add");
if (s==2) {
yellow=roiManager("count")-1;
roiManager("Select", yellow);
roiManager("Rename", "yellow");
roiManager("Set Color", "red");
run("Yellow");
selectImage(originalTif);
roiManager("Select", yellow);
measureRGB();
selectImage(probabilityImage);
}
if (s==3) {
red=roiManager("count")-1;
roiManager("Select", red);
roiManager("Rename", "red");
roiManager("Set Color", "green");
run("Red");
selectImage(originalTif);
roiManager("Select", red);
measureRGB();
selectImage(probabilityImage);
}
if (s==4) {
black=roiManager("count")-1;
roiManager("Select", black);
roiManager("Rename", "black");
roiManager("Set Color", "yellow");
run("Cyan");
selectImage(originalTif);
roiManager("Select", black);
measureRGB();
selectImage(probabilityImage);
}
}

```

```

        }
    }
    run("Misc...", "divide=Infinity run save"); //enable sprocess stack

    //close();
    selectImage(originalTif);
    Property.set("CompositeProjection", "Sum");
    Stack.setDisplayMode("composite");
    roiManager("show all without labels");
    run("Flatten");
    saveAs("Tiff", Folder+name+"_RoiSet.tif");
    //close();

    //selectImage(probabilityImage);
    selectImage(probabilityImage);
    Stack.setDisplayMode("composite");
    run("RGB Color");
    saveAs("Tiff", Folder+name+"_Probabilities.tif");
    //close();

    //save zip
    roiManager("Deselect");
    roiManager("Save", Folder+name+"_RoiSet.zip");

    //close all relevant images
    print(name);
    //close();
    close("*");

    //close("*");
} //end if .tif
} //end of cycle above files
//save results
selectWindow("Results");
saveAs("Results", Folder+"Results.txt");
//setBatchMode(false);
//***** Functions *****
function measure(indexes) {
    for (i=0; i<indexes.length; i++) {
        roiManager("Select", indexes[i]);
        run("Measure");
    }
}
function labelRois (label, index0, index1) {
    if (index1-index0 == 0) indexes=1;
    else indexes=index1-index0;
    R=newArray(indexes);
    for (r=0; r<R.length; r++) {
        R[r]=r0+r;
        roiManager("select", R[r]);
        roiManager("Rename", label);
    }
    //Array.print(R);
    return R;
}
function getIlastikPlugin(pluginName){

```

```

pluginsFolder=getDirectory("plugins");
f=getFileList(pluginsFolder);
i=0;
found=false;
while (!found && i<f.length-1) {
    ilasticFile=f[i];
    if (startsWith(lasticFile, pluginName)) found=true;
    else found=false;
    i++;
}
if (!found) {
    run("Update...");
    showMessage("Please, install the ilastik plugin from update sites and restart FIJI.");
}
}
function measureRGB() {
    Property.set("CompositeProjection", "null");
    Stack.setDisplayMode("grayscale");
    for (ch=1; ch<=3; ch++) {
        Stack.setChannel(ch);
        run("Measure");
    }
}
}

```