

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

KATEDRA EKOLOGIE



Vliv parazitů na páření hmyzu

Effects of parasites on mating activity in insects

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Diplomant: Bc. Gabriela Vokálová

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

2021

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Gabriela Vokálová

Inženýrská ekologie
Ochrana přírody

Název práce

Vliv parazitů na páření hmyzu

Název anglicky

Effects of parasites on mating activity in insects

Cíle práce

Cílem rešeršní části práce bude shrnout existující poznatky o způsobech, jakými různí parazité mohou ovlivňovat páření hmyzu. Specificky by měl být řešen evoluční vztah mezi pohlavně se přenášejícími parazity a hmyzem. V praktické části práce bude proveden experiment zkoumající vliv nákazy houbou *Hesperomyces virescens* na chování slunéček východních (*Harmonia axyridis*) při páření. Pomocí výběrového experimentu (zdravá vs infikovaná samička) budou zkoumány preference zdravých i infikovaných samců, čas do startu páření a délka kopulace.

Metodika

Literární rešerše bude zpracována na základě vědeckých článků dohledaných v databázi Web of Knowledge. Praktický laboratorní experiment bude proveden v ekofyziologické laboratoři FŽP za využití dvou skupin slunéček posbíraných ve volné přírodě: 1) po přezimování a 2) během vrcholu vegetační sezóny. Slunéčka východní budou roztříděna dle výskytu houby *Hesperomyces virescens* na povrchu jejich těla na zdravá a infikovaná. Následně bude proveden výběrový experiment (choice experiment) v menších arénách (Petriho miskách), kam bude umístěn jeden samec a dvě samičky (zdravá vs infikovaná). Experiment bude zopakován se živými a čerstvě mrazem usmrčenými samičkami, přičemž usmrčení samiček má za úkol "vypnout" jejich chování a pozorován tak bude jen vliv infekce na chování samečků. Během každého pozorování bude detailně sledováno chování slunéček během prvních 15 minut experimentu a pak extenzivně zaznamenáváno jejich chování až do času 240 minut od startu experimentu.

Doporučený rozsah práce

cca 40-50 stran textu + přílohy dle potřeby

Klíčová slova

Harmonia axyridis, Hesperomyces virescens, manipulace chování, parazit, páření, pohlavně přenosné choroby, pohlavní výběr, sluněčka

Doporučené zdroje informací

- Clancy, L.M., Cooper, A.L., Griffith, G.W., Santer, R.D., 2017. Increased Male-Male Mounting Behaviour in Desert Locusts during Infection with an Entomopathogenic Fungus. *Scientific Reports* 7.
- Clancy, L.M., Cooper, A.L., Griffith, G.W., Santer, R.D., 2017. Increased Male-Male Mounting Behaviour in Desert Locusts during Infection with an Entomopathogenic Fungus. *Scientific Reports* 7.
- Haelewaters, D., De Kesel, A., Pfister, D.H., 2018. Integrative taxonomy reveals hidden species within a common fungal parasite of ladybirds. *Scientific Reports* 8. Haelewaters, D., Zhao, S.Y., Clusella-Trullas, S., Cottrell, T.E., De Kesel, A., Fiedler, L., Herz, A., Hesketh, H., Hui, C., Kleespies, R.G., Losey, J.E., Minnaar, I.A., Murray, K.M., Nedved, O., Pfliegler, W.P., Raak-Van Den Berg, C.L., Riddick, E.W., Shapiro-Ilan, D.I., Smyth, R.R., Steenberg, T., van Wielink, P.S., Viglasova, S., Zhao, Z.H., Ceryngier, P., Roy, H.E., 2017. Parasites of *Harmonia axyridis*: current research and perspectives. *Biocontrol* 62, 355-371.
- Hansen, A.N., Licht, H.H.D., 2019. Why are there so few examples of entomopathogenic fungi that manipulate host sexual behaviors? *Fungal Ecology* 38, 21-27.
- Keiser, C.N., Rudolf, V.H.W., Luksik, M.C., Saltz, J.B., 2020. Sex differences in disease avoidance behavior vary across modes of pathogen exposure. *Ethology* (in press).
- Haelewaters, D., De Kesel, A., Pfister, D.H., 2018. Integrative taxonomy reveals hidden species within a common fungal parasite of ladybirds. *Scientific Reports* 8.
- Haelewaters, D., Zhao, S.Y., Clusella-Trullas, S., Cottrell, T.E., De Kesel, A., Fiedler, L., Herz, A., Hesketh, H., Hui, C., Kleespies, R.G., Losey, J.E., Minnaar, I.A., Murray, K.M., Nedved, O., Pfliegler, W.P., Raak-Van Den Berg, C.L., Riddick, E.W., Shapiro-Ilan, D.I., Smyth, R.R., Steenberg, T., van Wielink, P.S., Viglasova, S., Zhao, Z.H., Ceryngier, P., Roy, H.E., 2017. Parasites of *Harmonia axyridis*: current research and perspectives. *Biocontrol* 62, 355-371.
- Hansen, A.N., Licht, H.H.D., 2019. Why are there so few examples of entomopathogenic fungi that manipulate host sexual behaviors? *Fungal Ecology* 38, 21-27.

Předběžný termín obhajoby

2020/21 LS – FŽP

Vedoucí práce

Ing. Michal Knapp, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra ekologie

Konzultant

Ing. Michal Řeřicha

Elektronicky schváleno dne 3. 3. 2021

prof. Mgr. Bohumil Mandák, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 4. 3. 2021

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Děkan

V Praze dne 16. 03. 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením Ing. Michala Knappa, Ph.D. a konzultováním s Ing. Michalem Řeřichou, a že jsem uvedla veškeré literární zdroje, které jsem použila.

Jsem si vědoma, že na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů, ve znění pozdějších předpisů, především ustanovení § 35 odst. 3 tohoto zákona, tj. o užití tohoto díla.

Jsem si vědoma, že odevzdáním diplomové práce souhlasím s jejím zveřejněním podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a to i bez ohledu na výsledek její obhajoby. Svým podpisem rovněž prohlašuji, že elektronická verze práce je totožná s verzí tištěnou a že s údaji uvedenými v práci bylo nakládáno v souvislosti s GDPR.

V Praze dne 31.3.2021

.....

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce Ing. Michalu Knappovi, Ph.D. za jeho odborné vedení a Ing. Michalu Řeřichovi, za jeho ochotu a čas, který mi věnoval během odborných konzultací. Dále všem, co se podíleli na sběru sluníčků, která byla použita v této práci a také děkuji Ing. Petru Chajmovi za pomoc při analýze dat.

Abstrakt

Slunéčko východní, *Harmonia axyridis*, je úspěšný invazivní druh brouka s původním areálem ve východní Asii. Mezi jeho parazity patří entomopatogenní houba *Hesperomyces virescens*, které je poslední době věnována značná vědecká pozornost. Doposud je známo jen velmi málo studií, které dokazují, že sexuálně přenosné entomopatogenní houby jsou schopné manipulovat pářícím chováním hostitele. Toto je první práce, která zkoumá vliv houby *Hesperomyces virescens* na sexuální chování slunéček, konkrétně druhu *Harmonia axyridis*.

Cílem této práce bylo zjistit, zda entomopatogenní houba *H. virescens* ovlivňuje výběr partnerů u druhu *H. axyridis* a jeho chování během páření. Experiment byl proveden ve dvou fenologických fázích za účelem porovnání chování slunéček během páření 1) po přezimování (duben) a 2) během vrcholu vegetační sezóny (srpen). V experimentu bylo pozorováno páření trojice slunéček umístěných do společné Petriho misky (jeden samec a dvě samice). Jedna ze samic byla vždy infikovaná houbou *H. virescens* a druhá byla neinfikovaná. Samec byl buď infikovaný anebo neinfikovaný. Abychom otestovali vliv samičího chování na preferenci samců během páření, byly každý druhý den použity čerstvé mrtvolky samic namísto živých.

V letním období velká většina neinfikovaných samců preferovala během páření infikované samice před neinfikovanými. V jarním období se zas samci pářili déle s infikovanými samicemi než s neinfikovanými. Na volbu samce nemělo žádný vliv, zda byla samice čerstvě mrtvá či živá. Výsledky naznačují, že infikované samice byly pro samce nějakým způsobem atraktivnější než ty neinfikované.

Výsledky práce mohou být přínosné pro další studie zkoumající entomopatogenní houby a jejich vliv na sexuální chování hostitele u hmyzu. Výzkum experimentální části může dále přispět novými informacemi k dosavadním znalostem o přirozených nepřítelích invazivního slunéčka *H. axyridis*.

Klíčová slova:

Harmonia axyridis, *Hesperomyces virescens*, manipulace chování, entomopatogenní houby, pohlavně přenosné choroby, pohlavní výběr, slunéčka

Abstract

Harlequin ladybird, *Harmonia axyridis*, is a successful invasive beetle species native to East Asia. *Hesperomyces virescens* is entomopathogenic fungus, which frequently parasitize *H. axyridis* and recently has received considerable scientific attention. To date, only few studies found a prove that sexually transmitted entomopathogenic fungi are able to manipulate host mating behaviour. This thesis is the first work investigating the effects of the fungus *Hesperomyces virescens* on the sexual behaviour of *H. axyridis*.

The aim of this work was to determine whether the entomopathogenic fungus *H. virescens* influences sexual partner selection in *H. axyridis* individuals and their mating behaviour. The experiment was performed during two contrasting phenological phases in order to compare the ladybird behaviour 1) after overwintering (April) and 2) during the peak of the growth season (August). Ladybird mating behaviour was observed using a choice experiment including three ladybirds per each trial (one male and two females). One female was always infected with *H. virescens* and the other one was uninfected. The male was either infected or uninfected. To test the effects of female behaviour on male mating preference and behaviour, fresh female cadavers were used instead of live females in half of replications.

In summer, most uninfected males preferred mating with infected females against uninfected ones. In spring, males mated infected females for a longer time than uninfected ones. The male's choice was not affected by the female status (dead or alive). The overall results suggest that infected females were more attractive to males than uninfected ones.

The outputs of this thesis may be useful for further studies investigating entomopathogenic fungi and their effect on sexual behavior in insect hosts. The experimental part extend the existing knowledge about the natural enemies of the invasive *H. axyridis* that can be utilized for its biological control.

Keywords:

Harmonia axyridis, *Hesperomyces virescens*, behavioural manipulation, entomopathogenic fungi, sexually transmitted diseases, sexual selection, ladybirds

Obsah

1. Úvod	10
2. Cíle práce.....	12
3. Literární rešerše	13
3.1 Parazitismus	13
3.2 Předpoklady manipulativního chování	15
3.3 Vliv entomopatogenních hub na chování hmyzu	16
3.3.1 Změny v chování hostitele	18
3.3.2 Změny v chování hostitele s důrazem na páření	19
3.4 Studovaný druh <i>Harmonia axyridis</i>	21
3.4.1 Rozmnožování slunéček.....	24
3.5 Přirození nepřátelé slunéčkovitých (Coccinellidae)	25
3.5.1 Parazitoidi	27
3.5.2 Patogeny	29
3.5.3 Houby.....	32
4. Metodika	39
4.1 Odchyt a chov slunéček	39
4.2 Experiment – pohlavní výběr samce mezi samicí infikovanou houbou <i>H. virescens</i> a neinfikovanou samicí	40
4.4 Analýza dat.....	42
5. Výsledky	44
6. Diskuze	49
7. Závěr.....	53
Přehled literatury a použitých zdrojů	55

1. Úvod

Parazitismus je velmi rozšířená životní strategie organismů, ve které dochází v průběhu evoluce ke zdokonalování obranných mechanismů hostitele a s nimi se vyvíjí i úsilí parazita proniknout hostitelovou obranou (Thompson, 2010). U některých druhů parazitů se v průběhu evoluce vyvinula schopnost pozměnit chování či vzhled svých hostitelů tak, aby došlo k přenosu na jiného hostitele nebo do prostředí vhodného pro reprodukci. Taková schopnost se označuje termínem „manipulace“. Lze ji obecně definovat jako změnu v chování hostitele, která má přínos pro fitness parazita, tudíž se infikovaní hostitelé chovají způsobem, který usnadňuje přenos a následné dokončení životního cyklu parazita (Poulin, 2010). Míra manipulace parazity se liší od nepatrných změn již existujícího chování po projevení nového chování, které se u zdravých jedinců nikdy nevyskytuje. Změny v chování způsobené parazitem vykazují hostitelé napříč celou živočišnou říší (Hampl, 2010). Například změna vzhledu a chování hostitele byla zjištěna u suchozemského plže jantarky obecné (*Succinea putris*), která je parazitována motolicí podivnou (*Leucochloridium paradoxum*). Parazit proniká do tykadlových očí hostitele, která následně změní barvu na kontrastně zeleno-bílo-černou a začnou pulzovat, aby nalákaly hmyzožravé ptactvo k pozření, a tak se parazit dostane do konečného hostitele. U parazitovaných mezihostitelů byly zjištěny také změny v podobě vyhledávání osvětlených míst vysoko na vegetaci, aby byli více viditelní pro ptactvo (Wesołowska et Wesołowski, 2014)

Pro sexuálně přenosné parazity je velmi důležité chování hostitele během páření (Thrall et al., 2000). Změny v sexuálním chování hmyzu se mohou projevovat různě. Například u cikád, které infikuje entomopatogenní houba *Massospora cicadina*, byla zjištěna změna ve frekvenci stridulace u infikovaných samců. Ti začali stridulovat v podobných frekvencích jako samice, a tím se stali atraktivními pro nenakažené samce, kteří se s nimi začali ochotně pářit (Cooley et al., 2018).

Slunéčko východní *Harmonia axyridis* je velmi úspěšný invazivní druh hmyzu s původním areálem ve východní Asii (Nedvěd, 2014). V Evropě byly invazní populace slunéčka poprvé zaznamenány v roce 2001 a to v Belgii (Adriaens et al., 2003). Dnes už je tento druh rozšířen téměř po celé ČR mimo horské oblasti (Nedvěd, 2014). Invazivní úspěch *H. axyridis* je často přičítán slabé kontrole jeho populací přirozenými nepřáteli (Roy et al., 2008). Parazitická houba *Hesperomyces virescens*

byla poprvé zaznamenána u *H. axyridis* v roce 2002 v Ohio (USA) (Garcés et Williams, 2004). Později začali vědci hledat tuto parazitickou houbu na *H. axyridis* v terénu. Ve Spojených státech byla objevena na mnoha lokalitách, přičemž bylo parazitováno až 80 % jedinců (Riddick et Schaefer, 2005; Nalepa et Weir, 2007; Riddick et Cottrell, 2010). V Evropě byla *H. virescens* poprvé zaznamenána na *H. axyridis* v roce 2007 v Belgii. V té době bylo cca 0,5 % jedinců infikováno *H. virescens*. O čtyři roky později (v zimě 2011) bylo na stejném místě zaznamenáno 96,5 % infikovaných jedinců (De Kesel, 2011). Za hlavní mechanismus přenosu infekce se považuje kontakt jedinců během páření (Riddick et Schaefer, 2005).

Tato diplomová práce je zaměřena na parazity a jejich vliv na chování hostitele (s důrazem na páření). Teoretická část představuje různé typy manipulace napříč živočišnou říší se zaměřením na vliv entomopatogenních hub na sexuální chování hostitele. Detailněji jsou řešeni přirození nepřátelé čeledi Coccinellidae, konkrétně modelového druhu *Harmonia axyridis*. Součástí je také vysvětlení ekologie a životní cyklus pohlavně přenosné parazitické houby *Hesperomyces virescens*, která je společně s *H. axyridis* předmětem experimentální části.

Experimentální část se věnuje vlivu parazitické houby *H. virescens* na sexuální chování slunéčka východního *H. axyridis*. Byla stanovena hypotéza: entomopatogenní houba *H. virescens* neovlivňuje pohlavní výběr slunéčka *H. axyridis*. Experiment zkoumal výběr pro páření u infikovaných a neinfikovaných samců mezi infikovanými a neinfikovanými samicemi. Abychom zjistili efekt samičího chování během páření, byly každý druhý den použity místo živých samic mrtvé samice z předchozího dne.

2. Cíle práce

Cílem literární rešerše je shrnout dosavadní poznatky o způsobech, jakými mohou parazité ovlivňovat chování hostitelů z třídy hmyzu s důrazem na změny v sexuálním chování hostitele. Rešerše je detailněji zaměřena na přirozené nepřátele slunéčkovitých (Coleoptera: Coccinellidae) s důrazem na experimentální druh *Harmonia axyridis*, který je součástí i praktické části diplomové práce.

V praktické části byl proveden experiment zkoumající vliv infekce houbou *Hesperomyces virescens* na chování slunéčka východního (*Harmonia axyridis*) během páření. Cílem bylo zjistit, zda infekce parazitem *H. virescens* ovlivňuje pohlavní výběr slunéček. Testovali jsme, zda samci upřednostní během kopulace infikovanou či zdravou samici. Nejprve byl experiment proveden s živými samicemi a poté byl proveden s mrtvými samicemi.

Vyšším smyslem práce je přispění novými informacemi k dosavadním znalostem o přirozených nepřátelích invazivního slunéčka *Harmonia axyridis*.

3. Literární rešerše

3.1 Parazitismus

Parazit je organismus, který získává živiny z jiného organismu a tím mu škodí. Organismus, kterému je způsobena škoda parazitem je nazýván hostitel. Většinou se jedná o škody v podobě sníženého fitness, avšak nemusí dojít k úmrtí hostitele. Parazit má obvykle menší velikost než jeho hostitel a je do určité míry přizpůsobený k parazitaci konkrétní skupiny hostitelů. Mezi parazity lze řadit prvoky, viry, bakterie, houby, rostliny, ale i červy a členovce (Hampl, 2010). Parazitoidi jsou organismy, kteří parazitují na svém hostiteli pouze v larválních stádiích a jako dospělci žijí volně mimo svého hostitele (Lanteren et Godfray, 2005 ex Godfray, 1994). Podle způsobu, kterým využívají hostitele se dělí na koinobionty a idiobionty. Vývoj koinobionta probíhá uvnitř nebo vně hostitele, který je schopen se sám krmit a pohybovat. Zatímco idiobiont svého hostitele paralyzuje anebo usmrcuje krátce poté, co ho napadne (Kaeslin et al., 2005). Další parazitickou skupinou jsou mikropredátoři, jenž své hostitele neusmrcují. Do této skupiny lze zařadit například komáry, kteří mají během života hned několik hostitelů. Pokud žije parazit volně a není závislý na svém hostiteli, ale občas si parazitismem přilepší, jedná se o fakultativního parazita. Pokud nemůže parazit bez svého hostitele žít nebo se rozmnožovat jedná se o obligátní parazitismus (Volf et al., 2007).

Vznik parazitismu je vysvětlován několika způsoby. Jedním z původců parazitismu může být komenzálismus, kdy ze vztahu plyne užitek pro jednoho z účastníků, avšak druhého to nijak neovlivňuje. Příkladem takového vztahu je foréze, kdy hostitel poskytuje transport jinému organismu. V průběhu času se může z foréze relativně snadno vyvinout obligátní parazitismus, kdy je parazit na svém hostiteli závislý a není bez něj schopen života nebo rozmnožování. V jiném případě mohlo dojít k náhodnému pozření potencionálního parazita, kdy se jedinec nejprve snaží adaptovat na prostředí, aby přežil průchod trávicím traktem, avšak později se naučí získávat živiny ze svého hostitele (Volf et al., 2007). Třetím původcem parazitismu může být mutualismus, což je vztah mezi dvěma organismy, který je prospěšný pro oba účastníky. Například bakterie *Escherichia coli*, která se vyskytuje ve střevní mikrobiotě člověka, může za určitých okolností způsobit člověku mnoho

nebezpečných chorob a tím se změni její mutualistický vztah v parazitický (Čepička et al., 2007).

Parazity lze rozdělit podle životní strategie na makroparazity a mikroparazity. Mikroparaziti se v těle hostitele rozmnožují, netvoří specifická infekční stádia a u hostitele způsobují akutní onemocnění zakončené buď smrtí hostitele nebo jeho zotavením. Makroparaziti se v těle hostitele nemnoží, ale tvoří infekční stádia, která se šíří na nové hostitele a způsobují hostiteli chronické onemocnění s nízkou úmrtností (Volf et al., 2007). Parazity lze rozlišovat i podle jejich hostitelské specifity. Euryxenní paraziti mají širokou hostitelskou specifitu, tudíž jsou schopni parazitovat několik vzájemně nepříbuzných druhů. Stenoxenní paraziti mají úzkou hostitelskou specifitu, tudíž jsou schopni cizopasit pouze na fylogeneticky příbuzných druzích (Flegr, 2009).

V průběhu evoluce dochází mezi hostitelem a parazitem ke koevolučnímu zápasu. Zatímco se hostitel snaží co nejvíce zefektivnit své obranné schopnosti před infekcí, parazit se snaží prolomit tyto obranné bariéry a úspěšně infikovat hostitele. V průběhu evolučního času se tak organismy vyvíjí v závislosti jeden na druhém. To však platí pouze pro jedince, kteří se pohlavně rozmnožují (Thompson, 2010). Tento jev popisuje teorie tzv. Red queen hypothesis (RQH: Van Valen, 1973). Hypotéza RQH předpokládá, že pohlavně rozmnožující se jedinci jsou díky vyšší genetické diverzitě odolnější vůči vysoké míře infekce na rozdíl od nepohlavně se rozmnožujících jedinců (klonů) (Jokela et al., 2009). Existuje alternativní koevoluční teorie tzv. Black queen hypothesis, která popisuje kooperaci mikroorganismů parazitujících na společném hostiteli. Podle této hypotézy ztratí parazitický mikrob životně důležitou funkci a nechá jiný mikrob, aby tuto funkci vykonával za něj. Díky spolupráci může mikroorganismus s redukováným genomem účinněji přežít i přes snížený počet genů. Tato hypotéza byla popsána na několika druzích bakterií jako jsou například *Salmonella enterica* a *Escherichia coli* (Morris et al., 2012).

Z hlediska krátkého časového horizontu mohou mít parazité významný vliv na regulaci velikosti populace hostitele. V případě, že dojde ke zvětšení populace hostitele, zvýší se i efektivita přenosu parazita z jednoho hostitele na druhého, a tím dojde k redukci populace hostitele na původní velikost. Regulační funkce parazitů zamezuje vyčerpání přírodních zdrojů v prostředí, kde dojde k náhodnému

přemnožení jedinců v hostitelské populaci. V lokálním měřítku mohou mít paraziti vliv na kompetici mezi dvěma příbuznými druhy živočichů. Takovému jevu se říká parazitární arbitráž. Jedná se o situaci, kdy je jeden z druhů zvýhodněn parazitem a druhý je naopak znevýhodněn (Volf et al., 2007). Příkladem může být střet potemníka hnědého (*Tribolium castaneum*) a potemníka skladištního (*Tribolium confusum*). Pokud se setkají zdraví jedinci těchto dvou druhů, silnějším konkurentem bude potemník skladištní. V případě, že jsou oba jedinci infikováni jednobuněčným parazitem *Adelina tribolii* (kmen *Apicomplexa*) bude zvýhodněn potemník hnědý (Park, 1948).

3.2 Předpoklady manipulativního chování

U infikovaných hostitelů dochází ke změnám chování, které mohou nastat jako důsledek infekce nebo se může jednat o manipulaci parazitem za účelem šíření na další potenciální hostitele. Změna chování hostitele může být také vedlejším účinkem infekce a jeho prospěch pro parazita může být čistě náhodný. Aby se mohly změny chování u hostitele považovat za manipulaci zprostředkovanou parazitem, musí splňovat několik předpokladů. Změny by měly být načasovány, tak aby probíhaly zároveň s vývojovým stadiem parazita, ve kterém pro něj budou nejvíce prospěšné. Například u strunovců (*Nematomorpha*), kteří parazitují na zástupcích z třídy hmyzu, dochází u hostitelů k sebevražedným skokům do vodního prostředí. Hostitele totiž parazit potřebuje pro pokračování svého životního cyklu ve vodním prostředí (Thomas et al., 2002). Dalším předpokladem je složitost změn v chování. Jednoduché změny v chování s větší pravděpodobností vzniknou náhodou jako vedlejší účinky infekce narozdíl od změn komplexích, které jsou organizačně provázané a díky tomu tvoří dokonalý mechanismus přenosu parazita (Poulin, 2010).

Zajímavým příkladem jsou mravenci *Cephalotes atratus*, kterým zčervená zadečková část, když jsou infikováni hlísticemi. Jejich červené zadečky se podobají zralým plodům v korunách tropických lesů a při chůzi je nápadně vystrkují, aby byli atraktivní pro plodožravé ptactvo, ve kterém má dojít k dokončení životního cyklu hlístice (Yanoviak et al., 2008). Změnu v chování může způsobit také motolice *Dicrocoelium dendriticum*, která potřebuje mravenčího mezihostitele, aby se dostala do konečného hostitele, kterým jsou přežvýkavci. Infikovaní mravenci vždy vylezli na

vrchol vegetace, kde se pevně zakousli do stébla trávy, aby je pozřela ovce či skot (Romig et al., 1980). Hostitelem manipulativních parazitů může být i člověk. Prvokem *Toxoplasma gondii* je infikována zhruba třetina lidské populace. Životní cyklus toxoplazmy se nejprve odehrává v meziphostiteli, kterým je jakýkoliv teplokrevný živočich včetně člověka. K pohlavnímu rozmnožování parazita může dojít pouze ve střevech kočkovité šelmy, která představuje finálního hostitele. U infikovaných lidí byly zaznamenány změny v chování jako je zpomalená reakce na jednoduchý podnět či změny čichových preferencí na kočičí moč. Stejně změny v chování byly zjištěny u myších meziphostitelů, které z nich následně činili snadnější kořist pro kočičího predátora (Flegr, 2016). Toxoplazma může mít také vliv na sexuální chování hostitele (Flegr et Markoš, 2014; Flegr et Kuba, 2016). U infikovaných hlodavců může pach kočičí moči v mozku aktivovat oblast amygdaly, která je odpovědná za sexuální chování (Flegr et Markoš 2014). Studie provedená na studentech ukázala, že toxoplazma zvýšila u infikovaných mužů množství testosteronu a také byli tito jedinci pro ženy vzhledově přitažlivější (Flegr et Kuba, 2016).

Je zajímavé, že se některé změny v chování hostitele shodují u nepříbuzných druhů parazitů. Během vývoje v podobných podmínkách mohou různé taxony řešit problémy s parazity analogickým způsobem. Například hlístice *Mermithidae* (*Nematoda*) a strunovci (*Nematomorpha*) patří k nepříbuzným kmenům, avšak nezávisle na sobě byl u nich vyvinut podobný životní cyklus. V obou skupinách musí suchozemský hostitel v určitém okamžiku vývoje parazita vstoupit do vodního prostředí nebo do vodou nasycené půdy, aby mohl parazit pokračovat ve svém životním cyklu (Hanelt et al., 2005; Thomas et al., 2002).

3.3 Vliv entomopatogenních hub na chování hmyzu

Ve vztahu parazit – hostitel se často střetávají houby a hmyz. Takové houby se nazývají entomogenní. Fakultativní a obligatorní parazitismus hub lze označit jako tzv. entomopatogenní houby. Nákaza se šíří nejčastěji pomocí houbových spor skrze vodu, vzduch, přes povrch těla hostitelů či pozřením propagulí, které se dostanou do trávicího traktu hostitele. Entomopatogenní infekce se dále projevuje jako změna chování hostitele, například nekoordinovaným pohybem, nepřijímáním potravy,

paralýzou nebo také úhynem jedince. Předpokládá se, že důvodem parazitické manipulace s hostitelem je snaha o přenos houby na zdravé (neinfikované) jedince. Skvělou příležitostí k šíření spor je sexuální chování hostitele, ke kterému dochází skrze fyzický kontakt mezi jednotlivci daného druhu (jedná se například o dvoření a páření) (Kubátová, 2017).

Entomopatogenní houby mohou zvýšit pravděpodobnost přenosu pomocí manipulace sexuálního chování hostitele, a to změnou jeho vizuální nebo chemické komunikace (Hansen et De Fine Licht, 2019). Změna vzhledu infikovaného hostitele se projevuje například zvětšením břišní oblasti nebo konkrétním postojem, kdy se jedinec jeví atraktivnější pro opačné pohlaví (Steinkraus et al., 2017). Takové signály jsou účinné pouze za denního světla, kdy jsou viditelné pro ostatní jedince. Většina zástupců hmyzu se při interakci s ostatními jedinci spoléhá na feromony. Jsou to chemické sloučeniny ve formě kutikulárních uhlovodíků, obranných sekretů, hormonů a mohou být použity k signalizaci nebezpečí, navedení ostatních jedinců k umístění potravy a sexuálnímu chování. Vzhledem k tomu, že sexuální feromony působí na dlouhé vzdálenosti (až 1,6 km u lýkožrouta smrkového) (Weslien et Lindelow, 1990) lze předpokládat, že by bylo pro parazita velice výhodné, kdyby skrze tyto látky dokázal manipulovat pářením hostitele (Hansen et De Fine Licht, 2019). Feromonová komunikace hmyzu probíhá také na krátké vzdálenosti skrze kutikulární uhlovodíky (CHC), které tvoří voskovou vrstvu na povrchu kutikuly. Tato uhlovodíková vrstva má vedle komunikační funkce také funkci ochrannou (impregnační) (Menzel et al., 2017). V mezidruhovém komunikaci slouží pro rozpoznání vlastního druhu a tím zamezuje mezidruhovému reprodukci (Howard et al., 2003; Hay-Roe et al., 2007). Bylo zjištěno, že CHC hrají klíčovou roli v sexuální komunikaci a přitažlivosti mezi jedinci stejného druhu. Simmons a spol. (2003) zkoumali význam CHC u včel (*Amegilla dawsoni*) a zjistili, že samice přestaly být pro samce atraktivní, když jim byla smyta uhlovodíková vrstva z kutikuly (Simmons et al., 2003). V jiné studii provedené na octomilkách (*Drosophila serrata*) samice upřednostňovaly samce, kteří měli vyšší množství 2-methyl alkanu ve složení CHC (Howard et al., 2003). Složení uhlovodíků se může u některých druhů lišit podle pohlaví. Hemptinne a spol. (1998) zkoumali vliv CHC na sexuální chování samců slunéčka dvojtečného (*Adalia bipunctata*). Nejprve byli samci pozorováni při páření s živými samicemi a samci. Když byli samci v Petriho misce s živou samicí, došlo během několika sekund k páření. Pokud ale byli samci

uzavření v misce s živými samci, došlo k průzkumnému kontaktu, ale ne k páření. Aby byl eliminován vliv chování jedinců na volbu samce, proběhla další část experimentu s figurkami pokrytými krovkami odebranými zmraženým samecům a samicím. Samci se pokusili pářit s figurkami, které na sobě měly samčí krovky ve stejné míře jako s figurkami, které na sobě měly samičí krovky. Když byly následně krovky na figurkách omyty chloroformem, tak se ani jeden ze sameců o páření nepokusil. Je pravděpodobné, že samci poznají samici podle jejich specifických pohybů, které se liší od samčích, ale nepoznají samici od samce podle složení CHC (Hemptonne et al., 1998).

Parazitické houby používají k proniknutí do kutikuly směs několika enzymů, které jsou vyloučeny poté, co se k pokožce připojí infekční konidie (Lovett et Leger, 2017). Mezi tyto enzymy patří cytochrom P450, který způsobuje změnu ve feromonových signálech už v důsledku samotné infekce (Pedrini et al., 2013). Infikovaní jedinci proto mohou být opačným pohlavím vnímáni jinak než zdraví jedinci. Není však doposud jasné, zdali se skutečně jedná o záměrnou manipulaci způsobenou parazitickými houbami anebo se jedná o vedlejší účinek infekce.

3.3.1 Změny v chování hostitele

Infekce patogenní houbou může způsobit změnu v chování hostitele, pravděpodobně proto, aby se zvýšila šance přenosu na nové jedince. V několika studiích bylo zpozorováno, že infikovaný hmyz zaujímá před smrtí velmi nápadné postoje, na rozdíl od hmyzu umírajícího na jiné příčiny. Tento postoj se většinou vyznačuje vyvýšenou polohou na rostlině, roztaženými křídly a vystrčenou břišní částí, kde se nachází konidiospory parazitické houby (Krasnoff et al., 1995; Maitland, 1994). Například studie na broucích *Chauliognathus pensylvanicus*, kteří jsou parazitováni houbou *Eryniopsis lampyridarum* zjistila, že infikovaní jedinci krátce před smrtí hledají vyvýšené místo na stonku rostliny a pevně sevrou kusadly květ, kde pomalu umírají. Poté co zahynou, tak se jim roztáhnou křídla a visí na rostlině zakousnutí s nafouknutým břichem pokrytým plodnými konidiospory parazitické houby. Na místo toho infikovaní jedinci, kteří na sobě měli klidové neplodné spory tento postoj nezaujali a místo toho padli na zem, kde se rozložili (Steinkraus et al., 2017). Podobné výsledky byly zjištěny ve studii na mouše domácí (*Musca domestica*), která byla

infikována patogenní houbou hmyzomorkou muší (*Entomophthora muscae*). Infikovaní jedinci těsně před smrtí vylezli na vyvýšené místo, kde se sosákem přichytili k podkladu, roztáhli křídla a následně vystrčili břišní část, kde měli produkující konidiospory parazitické houby (Krasnoff et al., 1995). Stejnou pozici zaujaly výkalnice hnojní (*Scathophaga stercoraria*) infikované také hmyzomorkou muší (*Entomophthora muscae*) (Maitland, 1994). Autoři se domnívají, že tento postoj umožňuje snadné šíření spor z nakaženého jedince, kdy se spory s pomocí větru uvolní a začnou padat dolů na níže rostoucí rostliny. Na povrchu nízké vegetace se obvykle vyskytují zdravé mouchy, které jsou pravděpodobně vystaveny sporám parazitické houby (Maitland, 1994).

Dalším hmyzím manipulátorem je parazit *Ophiocordyceps unilateralis*, známý také jako zombie houba. Tuto přezdívku si získala, protože infikuje thajské mravence (*Camponotus leonardi*), kteří následně vykazují neobvyklé chování v podobě zvláštního pohybu a opakovaných křečí, kvůli kterým padají z rostlin na zem a mají problém vylézt zpět. Jakmile se jim podaří na rostlinu opět vylézt, tak po ní malátně chodí, až se nakonec zakousnou do žilnatiny listu, dostanou atrofii a zahynou. V případě, že se k němu přiblížil jedinec jiného druhu, nedošlo k žádné reakci. Přitom zdraví jedinci vykazují agresivní chování, pokud se setkají u zdroje potravy s jiným druhem hmyzu (Hughes et al., 2011). Ke změně chování došlo i u mravenců rodu *Mirmica*, na kterých parazituje houba *Rickia wasmannii*. Očekávalo se, že parazitická houba bude manipulovat chováním hostitele za účelem šíření na ostatní zdravé jedince. Místo toho se infikovaní mravenci naopak stranili kontaktu s ostatními jedinci. V této studii se pravděpodobně jednalo o pouhý vedlejší efekt infekce namísto cílené manipulace houbou, protože by parazitická houba neměla žádný prospěch z izolace infikovaného jedince (Csata et al., 2017).

3.3.2 Změny v chování hostitele s důrazem na páření

Existuje málo studií, které zkoumaly, zda mohou entomopatogenní houby manipulovat chováním hostitele během páření. Změny v sexuální chování hostitele se mohou projevit v tom, jak budou infikovaní jedinci vnímáni opačným pohlavím, ale také se mohou projevit jako změny v sexuální chování infikovaného jedince (například změna v délce páření) (Hansen et De Fine Licht, 2019). Entomopatogenní parazité

mohou pozměnit vzhled hostitele, aby byl jedinec atraktivnější pro opačné pohlaví, čímž se zvýší šance fyzického kontaktu a přenosu parazita na nového jedince (Steinkraus et al., 2017).

Některé studie objevily změnu v sexuálním chování hostitele. Experiment na komárech tropických (*Aedes aegypti*) v Mexiku zkoumal vliv parazitické houby *Metarhizium anisopliae* na chování samců komárů. Houba se u těchto jedinců šíří prostřednictvím kontaktu nohou během páření. Bylo zjištěno, že infikovaní samci strávili pářením s neinfikovanou samicí mnohem delší čas než zdraví samci. Dále infikovaní jedinci projevili vyšší snahu o kopulaci. Komáři měli vyšší počet jak úspěšných, tak neúspěšných pokusů o kopulaci, přestože měli nižší produkci spermatu než zdraví jedinci (Garza-Hernández et al., 2015). Stejná parazitická houba infikuje potěmníky moučné (*Tenebrio molitor*). Reyes-Ramírez a spol. (2019) zjistili, že samice v páření upřednostňovaly infikované samce před zdravými samci.

Změnu v sexuálním chování hostitele zjistili také ve studii na cikádách nakažených entomopatogenní houbou *Massospora cicadina*. Samci, kteří na sobě měli klidová stádia konidiospor houby nevykazovali žádné změny v chování, avšak samci, kteří nesli produktivní konidiospory začali stridulovat v podobných frekvencích jako samice. Tato změna v chování učinila infikované samce atraktivní pro nenakažené samce, kteří se s nimi začali ochotně pářit (Cooley et al., 2018).

Trandem a spol (2015) zkoumali vliv patogenní houby *Neozygites floridana* na sexuální chování roztoče svlušky chmelové (*Tetranychus urticae*). Zjistili, že samci dávali přednost páření s mrtvými nakaženými samicemi před zdravými živými samicemi. Zajímavostí je, že mrtvé infikované samice byly upřednostňovány, když nebyly v infekční fázi produkujících konidiospor. Pokud byly mrtvé samice v infekční fázi, tak už upřednostňovány nebyly. Ve studii se očekávalo, že nejvíce přitažlivé budou samice v infekční fázi, aby se mohla houba šířit. Je pravděpodobné, že houba *N. floridana* může u hostitele ovlivňovat vizuální či chemické podněty, které zvyšují atraktivitu infikovaných mrtvých samic. Nicméně se zdá, že samci roztoče jsou schopni detekovat přítomnost vysoce infekčních konidií (Trandem et al., 2015).

Moller (1993) testoval, zda má parazit hmyzomorka muší (*Entomophthora muscae*) vliv na sexuální chování mouchy domácí (*Musca domestica*). Výsledky ukázaly, že samci mouchy domácí měli větší zájem o páření s infikovanou mrtvou

samicí než s neinfikovanou mrtvou samicí. Tento výsledek může být vysvětlen tím, že břicho infikovaných jedinců se v důsledku infekce výrazně zvětšilo. Vzhledem k tomu, že existuje silný vztah mezi velikostí těla samice a její potenciální plodností mohou být větší samice pro samce atraktivnější. Zajímavé je, že když byl proveden další experiment, kde měly mrtvé infikované samice stejnou velikost břicha jako neinfikované, byly pro samce opět atraktivnější infikované samice (Moller, 1993).

3.4 Studovaný druh *Harmonia axyridis*

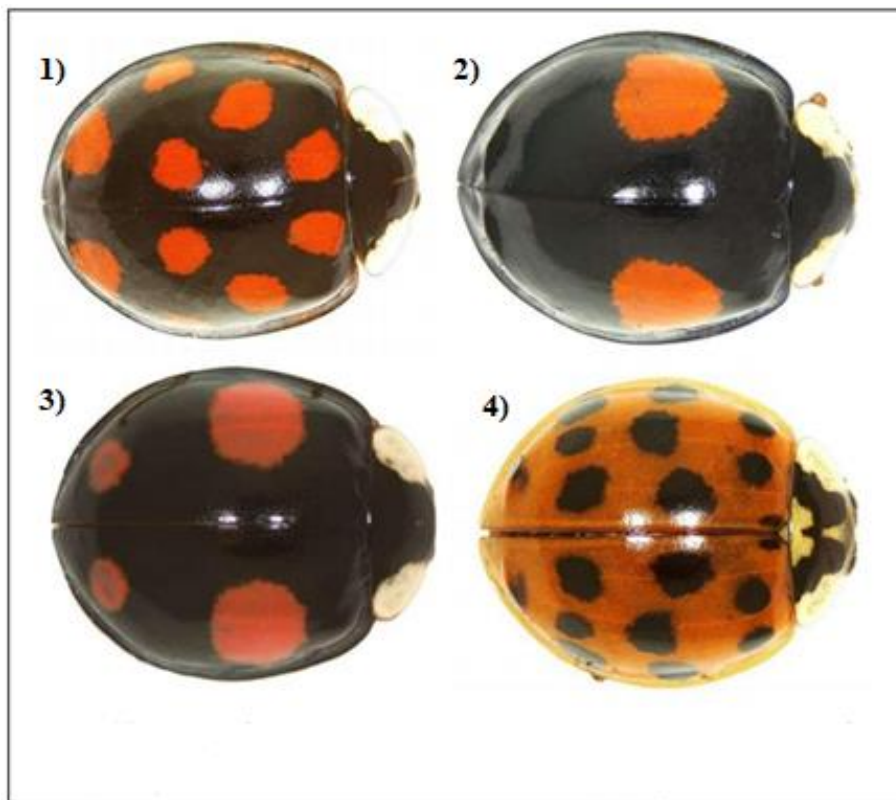
Slunéčko východní je polyfágní brouk, který se využíval pro biologickou kontrolu zemědělských škůdců a dnes je považován za invazivní druh (Kenis et al., 2008). Původním areálem *Harmonia axyridis* je východní Asie, oblast rozšíření tvoří státy od Japonska až po východní Kazachstán. V roce 1916 bylo *H. axyridis* poprvé vysazeno v Severní Americe a poté následovalo ještě minimálně 14 introdukcí za účelem biologické kontroly mšic v sadech (Gordon, 1985).

V Evropě byly invazní populace slunéčka poprvé zaznamenány v roce 2001 a to v Belgii (Adriaens et al., 2003). V roce 2008 už bylo hlášeno ve 12 ti evropských zemích jako běžný druh (Brown et al., 2008). V České republice byl invazivní druh slunéčka zaznamenán již v roce 2006 a od té doby se jeho početnost stále zvyšovala, v roce 2010 už byl k nalezení téměř po celé ČR mimo horské oblasti (Nedvěd, 2014).

Zbarvení krovek *H. axyridis* je variabilní a je dáno genetickou výbavou a teplotou během vývoje kukly. Barevná forma *axyridis* je typická černým podkladem s oranžovými až červenými skvrnami. Tato forma je dominantní od Kazachstánu po Mongolsko (až 90 % jedinců), avšak v České republice se vyskytuje jen vzácně. Ve střední Evropě se nejčastěji setkáváme se světlou formou *succinea* (Obr. 1). Ta je charakteristická žlutě, oranžově nebo červeně zbarvenými krovkami, které mohou obsahovat různý počet černých skvrn. V České republice má formu *succinea* až 88 % jedinců *H. axyridis*. U některých jedinců lze vidět tmavou formu *spectabilis* (9 % jedinců v ČR; Obr. 1) a nejtmaší formu *conspicua* (3 % jedinců v ČR; Obr. 1). Pohlaví jedince se určuje podle tvaru posledního zadečkového článku. Samice mají na posledním článku lehce vyklenutý povrch, zatímco samci mají na stejném článku

povrch vydutý. Dalším diferenciačním znakem mezi pohlavími je zbarvení tzv. klypeu, samci mají klypeus bílý a samice jej mají černý (Obr. 2; Nedvěd, 2014).

Obr. 1: Nejčastější formy dospělců slunéčka východního (1- *axyridis*, 2- *conspicua*, 3- *spectabilis*, 4- *succinea*; zdroj: Nedvěd, 2014)



Obr. 2: Bílý klypeus u samce *Harmonia axyridis* (zdroj: Pete Hillman)



Potravu *H. axyridis* tvoří především mšice. Alternativním zdrojem potravy mohou být mery svilušky, červci anebo vajíčka a larvy mandelínek, motýlů, nosatců či jiných druhů slunéček (Koch, 2003). Jeho strava může obsahovat rovněž ovoce jako jsou jablka v sadech, dýně, maliny nebo hroznové víno (Koch et al., 2004). Kvůli okusování ovocných plodů působí *H. axyridis* zároveň jako škůdce, a to především při produkci vína. Jedinci škodí tím, že konzumují šťávu z plodů, ale také se shromažďují ve štěrbinách mezi bobulemi a poté se dostávají do lisu společně s hrozny. Stávají se tak součástí výsledného moštu, čímž ovlivňují chuť a vůni vína (Ker et Pickering, 2006). Škody může způsobit i larvální stadium *H. axyridis*, protože ve třetím a čtvrtém instaru larvy okusují sazenice kukuřice (Moser et Obrycki, 2009). Další nepříjemností, kterou může *H. axyridis* způsobit je masivní vniknutí do lidských obydlí, když se dospělci chystají během podzimu na přezimování. V těchto místech zanechávají brouci skvrny od hemolymfy, kterou vypouštějí jako obranný mechanismus před predátory. U člověka může kousnutí jedincem *H. axyridis* vyvolat výjimečně alergickou reakci (Nedvěd, 2014). Dalším zaznamenaným negativním účinkem *H. axyridis* je snižování biologické rozmanitosti v podobě konkurence a potlačování

původních druhů slunéček. Řada rozsáhlých analýz zjistila, že poklesy původních slunéček negativně korelují s rozšířením *H. axyridis* a to jak v USA (Evans, 2004; Losey et al., 2014), tak i v Evropě (Roy et al. 2012). V literatuře se objevuje několik faktorů, které činí *H. axyridis* úspěšným a konkurenceschopným druhem. Například existuje teorie, že tato slunéčka mají extrémně účinný imunitní systém, který poskytuje silnější odolnost proti patogenům a parazitům ve srovnání s původními druhy slunéček *Adalia bipunctata* a *Coccinella septempunctata* (Roy et al., 2012). Jedinci *H. axyridis* často požírají vajíčka a larvy jiných slunéček. Tato mezidruhová predace byla uznána jako hlavní selektivní síla a studie dokazují, že je *H. axyridis* úspěšnější predátor než původní druhy slunéček v Evropě (Roy et al., 2012). Další výhodou invazivního slunéčka je vysoká plodnost (fekundita) a vyšší míra líhnutí potomků z vajec ve snůškách (Michaud, 2002).

3.4.1 Rozmnožování slunéček

Čeď slunéčkovitých (Coccinellidae) brouků se páří často, dlouho a jsou promiskuitní (Hodek et al., 2012). U *A. bipunctata* bylo nalezeno při kopulaci 20 % jedinců a u *H. axyridis* bylo zaznamenáno 17 % pářících se jedinců (Nedvěd, 2016). Délka kopulace se liší podle druhu slunéčka a pohybuje se v rozmezí 1-5 hodin. Výjimkou může být slunéčko *Aiolocaria hexaspilota*, které se dokáže pářit až několik dní (Hodek et al., 2012 ex Iwata, 1932). U jedinců *H. axyridis* vpraví samec během páření do samice spermatofor, jehož obal je složen z bílkovin. Samice 18-24 hodin po kopulaci obal vyloučí z pohlavního otvoru a následně ho požře (Obata et Hidaka, 1987). Běžně je oplozeno zhruba 80 % vajec ve snůšce a zbylých 20 % slouží jako potrava pro čerstvě vylíhnuté larvy (Nedvěd, 2016).

Slunéčkovití patří mezi iteroparní hmyz, tudíž jsou schopny klást vejce několikrát za život. Samčí pohlavní buňky mohou být funkční i několik měsíců, pokud jsou uschovány ve správném prostředí. Díky tomu mohou samice uložit sperma do spermatéky a naklást oplozená vejce i v období, kdy nedojde k páření. Celkový počet vajec produkovaných jednou samicí je druhově specifický a zvyšuje se s velikostí samice. Dále závisí na teplotě, množství a kvalitě potravy, a to jak během vývoje samice, tak i během reprodukce (Hodek et al., 2012). U většiny druhů naklade samice

za život několik stovek vajíček, ale u *H. axyridis* a *C. septempunctata* samice naklade až 2000 vajec. Počet generací za rok a délka života slunéčka závisí na klimatických podmínkách. Jedinci *H. axyridis* se mohou běžně dožít až tří let a klást vejce dokonce 2x ročně (Koch, 2003). Podobně aktivní druhy se označují jako multivoltinní a dochází u nich k překryvu několika generací (Ceryngier et Twardowska, 2013). Dlouhá doba a vysoká frekvence páření má pro jedince výhody i nevýhody. U některých druhů kladla samice více vajíček, když došlo k opakované kopulaci a také bylo vyšší zastoupení oplozených vajíček ve snůšce. Zároveň se zvyšujícím počtem páření klesala u samic délka života. *H. axyridis* se dožila 118 dní, když se spářila maximálně jednou, ale pokud došlo k opakované kopulaci, tak se dožila pouze 76 dní (Hodek et al., 2012). Páření může mít negativní dopad i na délku přežívání samců, kterým se snížila délka o více jak 50 % už po první kopulaci (Perry et Tse, 2013).

Stejně jako u většiny hmyzu je i u slunéček prekopulační chování řízeno vizuálními, hmatovými a chemickými signály (Sloggett et al., 2011). Nejvýznamnější z nich jsou chemické, díky kterým mohou jedinci komunikovat i na dlouhé vzdálenosti. Samci jsou přitahováni nejprve na dálku samičím pohlavním feromonem (Fassotte et al., 2014). Poté hrají významnou roli v sexuálním chování kutikulární uhlovodíky, které mohou ovlivnit výběr partnera (Legrand et al 2019). Složení kutikulárních uhlovodíků může informovat samce, zdali je samice pohlavně dospělá (Fassotte et al., 2016). Legrand a spol. (2019) zkoumali, zda samec *H. axyridis* preferuje panenské samice před již spářenými samicemi. Zároveň bylo analyzováno složení kutikulárních uhlovodíků u všech samic. Bylo zjištěno, že složení uhlovodíků se u samic neliší, ale byl rozdíl v koncentracích jednotlivých složek. Samice, které se dříve spářily se samci, měly v kutikulárních uhlovodících vyšší koncentrace alkenů než panenské samice. Přesto samci neprojevovali pohlavní preferenci ani pro jednu skupinu samic (Legrand et al., 2019).

3.5 Přirození nepřátelé slunéčkovitých (Coccinellidae)

Termín přirozený nepřítel se často používá k označení organismu, který čerpá výživu z jiného organismu, jako je predátor, parazitoid, parazit nebo patogen (Thacker, 2002). Coccinellidae mají několik obranných mechanismů, které je chrání před přirozenými nepřáteli. Tyto mechanismy lze rozdělit na behaviorální, fyziologické a morfologické.

Mezi behaviorální lze zařadit agresivní chování v podobě kousání, kterým se jedinec brání vůči ostatním, například: jiným druhům slunéček, dravému hmyzu nebo parazitoidům (Firlej et al., 2010). Obranným chováním jako je kousání, kopání zadními nohama či útěk může hostitel ovlivnit míru infekce parazitoidem. Hostitelé, kteří vyvinuli agresivnější obranu v sobě měli méně vajec parazitoidea než hostitelé se slabším obranným chováním (Gross, 1993).

Vrozený imunitní systém hmyzu se skládá z buněčných a humorálních mechanismů, které jsou spolu provázané a slouží k účinné obraně před patogeny (Feldhaar et Gross, 2008). Hranicí mezi humorální a buněčnou imunitou jsou koagulační a fenoloxidázová kaskáda (Hyršl, 2018b). Buněčný imunitní systém je zprostředkován buňkami - hemocyty, které zajišťují imunitní reakci hostitele na cizí materiál (parazity, patogeny). Pod tento typ imunitního systému lze zařadit reakce jako fagocytózu, nodulaci a enkapsulaci. Fagocytóza je základní imunitní reakce hmyzu, kdy dochází k pohlcení malého množství cizího materiálu specializovanou buňkou (fagocytem). Nodulace je imunitní reakce na vniknutí většího množství patogenů do těla organismu. Kolem bakterie nebo jiného cizorodého předmětu se vytvoří nodule, což je útvar vzniklý agregací hemocytů (Hyršl, 2018a). Enkapsulace je podobný proces jako nodulace, ale nastává při vniknutí větších cizorodých částic do těla organismu. Po rozpoznání cizorodého materiálu dochází pomocí hemocytů k tvorbě kapsule okolo patogenu a následně k jeho zneškodnění. Hemolymfa neboli krvomíza obsahuje toxické, po chuti hořké alkaloidy a páchnoucí metoxypyrazín (Nedvěd, 2014).

Humorální typ imunity je zprostředkován složkami jako jsou lysiny, lektiny a antimikrobiální peptidy. Známým zástupcem lysinů je enzym lysozym, který je hlavní složkou humorální imunity. Lysozym působí antimikrobiálně na grampozitivní bakterie (narušuje jejich buněčnou stěnu), ale na gramnegativní bakterie má jiné účinky (blokuje jejich růst a množení). Lektiny jsou proteiny, které se po zranění či infekci syntetizují v tucích a účastní se likvidace patogenů (Hyršl, 2018b). Další důležitou složkou humorální imunity jsou antimikrobiální peptidy, které mohou skrze narušení buněčné stěny patogenu způsobit jeho následné usmrcení (Feldhaar et Gross, 2008). U slunéčkovitých se vyskytují další obranné látky a to alkaloidy, které se liší podle druhu (Daloze et al., 1994). U *H. axyridis* se vyskytuje alkaloid harmonin, jehož silné účinky můžou částečně vysvětlit úspěch *H. axyridis* jako mezidruhového

predátora. Dalším obranným mechanismem na fyziologické úrovni je reflexní krvácení. Jedná se o přirozenou antipredační reakci, při které dochází k vypouštění kapek hemolymfy. Dospělci ji vylučují z kolenních kloubů a u larev je vypouštěna z otvorů na hřbetní straně zadečku (Nedvěd, 2014).

Slunéčkovití se mohou bránit i svými morfologickými vlastnostmi jako je zbarvení krovek. Aposematické zbarvení dává predátorovi najevo, že čím jsou krovky jedince intenzivněji zbarvené oranžově či červeně, tím je jedinec nechutnější. Podle některých studií zbarvení krovek reflektuje množství alkaloidů obsažených v jedinci. Bezzerides a spol (2007) zjistili, že jedinci s větším procentuálním zastoupením červeného zbarvení na krovkách obsahovali vyšší množství alkaloidů. Melanické zbarvení mělo také vliv na množství alkaloidů v těle jedinců. Zejména u samic *H. axyridis* bylo zjištěno, že světlejší černé skvrny na krovkách odpovídaly většímu množství harmoninu v těle brouka (Bezzerides et al., 2007).

3.5.1 Parazitoidi

Parazitoidi jsou organismy, kteří parazitují na svém hostiteli pouze v larválních stádiích a jako dospělci žijí volně mimo svého hostitele (Van Lenteren et Godfray, 2005 ex Godfray, 1994). Podle vývojové strategie je lze dělit na koinobionty a idiobionty. Vývoj koinobionta probíhá uvnitř nebo vně hostitele, který je schopen se sám krmit a pohybovat. Zatímco idiobiont svého hostitele paralyzuje anebo usmrcuje krátce poté, co ho napadne (Kaeslin et al., 2005).

Dinocampus coccinellae

Lumčík *Dinocampus coccinellae* je druh s kosmopolitním rozšířením a v literatuře se tvrdí, že parazituje na více než 50 ti druzích z čeledi Coccinellidae (Obr.3; Ceryngier et al., 2012). Úroveň parazitace *D. coccinellae* může značně kolísat v závislosti na lokalitě, ročním období a druhu hostitele. Prevalence může dosáhnout až 70 %, ale během přezimování to může být pouze 15 % (Ceryngier, 2000). Pro parazitoida je před naklazením vajíček do hostitele důležité, aby byl hostitel v aktivním pohybu, protože při chůzi má hostitel krovky mírně zvednuté a hlavu vytaženou dopředu, což lépe zpřístupňuje *D. coccinellae* naklást vajíčka do měkkých tkání mezi zadními břišními

segmenty nebo mezi hlavou a hrudníkem (Ceryngier et al., 2012 ex Ipertí, 1964). Když parazitoid naklade do dospělého brouka vajíčka, začne se vyvíjet larva, která projde čtyřmi larválními instary. Těsně předtím, než larva vyleze, tak je hostitel paralyzován pomocí RNA viru DcPV (Dinocampus coccinellae paralysis virus), který je vypuštěn parazitoidem a působí na hostitelovy nervové buňky. Zhruba po 20 ti dnech vyleze z hostitele larva a na břišní části mezi nohama upřede kokon. Po celou dobu kuklení parazitoida zůstává hostitel naživu a svírá kokon mezi nohama, čímž ho chrání před predací (Maure et al., 2011). Zhruba po týdnu (při teplotě 25°C) z kukly vyleze dospělý jedinec *D. coccinellae*. Někteří hostitelé se z ochrnutí způsobeného parazitoidem zotaví, a dokonce obnoví svoji reprodukční aktivitu (Maure et al., 2014).

Ceryngier et al. (2004) zkoumali vliv parazitace na sexuální aktivitu hostitele *C. septempunctata* a zjistili, že parazitované samice se pářily častěji a měly dříve dozrálé vaječníky než samice, které parazitované nebyly. U samců parazitace způsobuje snížení aktivity pohlavních žláz (Ceryngier et al., 2004). Vliv na míru parazitace má také obranný mechanismus jedinců. Bylo pozorováno obranné chování u invazivního slunéčka *H. axyridis* a původního slunéčka *Coleomegilla maculata* vůči *D. coccinellae*. *H. axyridis* vykazovalo defenzivnější chování (pohyby zadních končetin proti parazitoidovi) než *C. maculata* a také byla méně parazitovaná, na čemž se pravděpodobně podílel i imunitní systém *H. axyridis* (Firlej et al., 2010).

Obr.3: Lumčík (*Dinocampus coccinellae*) a jedinec *H. axyridis*, zdroj: Ing. Michal Řeřicha



3.5.2 Patogeny

Patogeny jsou parazitické organismy, které svým hostitelům způsobují infekci. Pod patogeny lze zařadit viry, bakterie, prvoky, houby, ale i parazitické červy (helminty), krevsající členovce či fytofágní hmyz (Votýpka et Modrý, 2018).

Parazity slunéčkovitých lze rozdělit na endoparazity, kam spadají hlístice (*Nematoda: Mermithidae, Allantonematidae*) a ektoparazity, kam řadíme roztoče (*Acarina: Podapolipidae*) a houby (*Laboulbeniales: Laboulbeniaceae*; Ceryngier et Hodek, 1996).

Hlístice

Parasitylenchus coccinellidae (*Nematoda: Allantonematidae*) je endoparazit dospělých slunéčkovitých. Byl objeven na broucích *Propylea quatuordecimpunctata*, *Adalia bipunctata*, *Oenopia conglobata*, *Hippodamia variegata* a *Ceratomegilla undecimnotata* v Evropě (Hodek et al., 2012 ex Iperti, 1964) a v Indii na slunéčkách *Menochilus sexmaculatus* a *Illeis indica*, přičemž v jednom hostiteli bylo nalezeno až 200 dospělců parazita. Úroveň parazitizmu hlístic *P. coccinellinae* se liší podle druhu hostitele, jelikož parazitovány byly především multivoltinní druhy (Hodek et al., 1996 ex Narsi Reddy et Narayan Rao, 1984).

Dalším parazitem z čeledi *Allantonematidae* je *Parasitylenchus bifurcatus* jehož hostitelem je *H. axyridis*. Původ této parazitické hlístice není znám, ale odhaduje se, že mohla přijít s *H. axyridis* z původního areálu rozšíření (Asie) nebo se přenesla z původních evropských slunéček (Poinar et Steenberg, 2012). Na *H. axyridis* byla *P. bifurcatus* nalezena v Dánsku (Poinar et Steenberg, 2012), Nizozemsku (Raak-van den Berg et al., 2014), České republice a Polsku (Haelewaters et al., 2017). Prevalence infikovaných dospělců v přírodě se pohybovala mezi 2 - 47 % a vzrostla až na 60 % po 30ti denní inkubaci v laboratoři (Haelewaters et al., 2017). Oplodněné infekční samice parazita pronikají do dospělého hostitele skrze průduchy nebo přes tenká místa v kutikule. Poté v těle hostitele tyto samice vyprodukují vajíčka, ze kterých se vyvinou nové samice druhé generace. Samice druhé generace porodí samce a samice, kteří dospívají a páří se v těle hostitele. Nově vzniklé infikované samice se následně přenesou na nového hostitele (Orlova-Bienkowskaja et al., 2018). Přesný mechanismus přenosu není dosud znám, ale je pravděpodobné, že k přenosu dochází

během páření hostitele. U infikovaných jedinců byly zaznamenány negativní účinky jako je snížená reprodukce samic, úbytek tukové tkáně a vyšší mortalita (Poinar et Steenberg, 2012). Díky vysoké prevalenci a negativním účinkům by *P. bifurcatus* mohl být potenciálním biologickým kontrolním prostředkem ke snížení invazních populací *H. axyridis*.

Hlístice z čeledi Mermithidae byly zaznamenány u šesti druhů slunéčkovitých, konkrétně u *Adonia variegata*, *Semiadalia undecimnotata*, *Propylea quatuordecimpunctata*, *Coccinella septempunctata*, *Aphidecta oblitterata* a *Epilachna paenulata* (Ceryngier et Hodek, 1996 ex Iperti, 1964; Reboredo et Camino, 2019). Infekce se na hostiteli projevuje především úbytkem tukové tkáně a zmenšením tělesné velikosti. U samic byly zjištěny i projevy v podobě nulové pářicí aktivity způsobené nefunkčností vaječníků a snížení příjmu potravy a hyperaktivity (Rhamhalinghan, 1986). V roce 2019 byl v Argentině objeven nový druh hlístice *Hexameris bonaerensis* parazitující slunéčko *Epilachna paenulata* (Reboredo et Camino, 2019) a v roce 2020 byla v Turecku poprvé zaznamenána hlístice z rodu *Hexameris* u slunéčka *C. septempunctata* (Tarla, 2020).

Roztoči

Roztoči z čeledi Podapolipidae jsou běžnými parazity brouků a živí se biotrofním způsobem života. Na Coccinellidae parazituje celkem 14 druhů z rodu *Coccipolipus* (Hodek et al., 1996). Většina z nich se vyskytuje na povrchu těla svého hostitele, a to zejména pod krovkami, kde nasávají hemolymfu hostitele (Hajiqanbar et al., 2007). Jako modelový druh pro studium dynamiky sexuálně přenosných parazitů je používán široce rozšířený roztoč *Coccipolipus hippodamiae*, který parazituje na čtyřech druzích slunéčkovitých včetně slunéčka dvojtečného (*Adalia bipunctata*) (Webberley et al., 2004). V hostitelské populaci může tento ektoparazit dosáhnout prevalence až 50 %. Infekce způsobená *C. hippodamiae* může mít několik negativních účinků na hostitele. U *A. bipunctata* byla zaznamenána nižší životnost infikovaných jedinců (Webberley & Hurst, 2002) a snížená plodnost infikovaných samic, a to do tří týdnů od infekce (Hurst et al., 1995). Zvýšenou úmrtnost u infikovaných jedinců autoři Webberley et Hurst (2002) vysvětlují tím, že parazit mnohem častěji infikoval starší jedince slunéčka

než mladé jedince. Z nakladených vajec parazita se líhnou pohyblivé larvy, které během páření migrují mezi hostiteli. Na novém hostiteli se larva zakousne ústním ústrojím a postupně se vyvine v dospěléce a poté žije na hostiteli přisedlým způsobem života (Rhule et al., 2010). V roce 2007 byl v USA *C. hippodamiae* poprvé zaznamenán u *H. axyridis* (Riddick, 2010), který je svými vlastnostmi ideální hostitel pro tohoto parazita. Promiskuitní způsob života, překrývající se generace a dlouhá životnost hostitele zjednodušují šíření *C. hippodamiae* skrze jednotlivé populace *H. axyridis* v přírodě. Vzhledem k jeho negativním účinkům na hostitele by mohl sloužit jako regulační prostředek ke snížení populace *H. axyridis* (Rhule et al., 2010). Ovlivnění chování hostitele při páření či pohlavní preference jedinců nejsou zatím v literatuře zjištěny.

Mikrosporidie

Mikrosporidie jsou vnitrobuněční obligátní parazité, kteří jsou vysoce specializovanými příbuznými hub. Hlavními hostiteli mikrosporidií jsou zástupci hmyzu, a proto jsou také někdy označovány jako hmyzomorky, avšak parazitují i na obratlovcích jako jsou ryby či někteří savci včetně člověka. Bylo popsáno celkem 2000 druhů mikrosporidií řazených do 200 rodů. V hostiteli se nacházejí v podobě jednoduše strukturovaných buněk, které se replikují, a nakonec mění ve spory. Stadium spory se vyskytuje volně (mimo hostitele) a jejím cílem je infikovat nového jedince. K infekci hostitele dochází pomocí organely tzv. injekční trubice, která vpraví obsah spory mikrosporidie do hostitelských buněk, a to během dvou vteřin. Mikrosporidie získávají z hostitele metabolity (ATP – adenosintrifosfát a zdroje energie) a také ovlivňují metabolismus hostitelských buněk například tak, že je zvětšují, spojují anebo usmrcují. Pro mikrosporidie je charakteristická tvorba různých typů spor, které mají zajistit dlouhodobou infekci hostitele. Některé z nich infikují hostitelské buňky hned po vypuštění, zatímco jiné jsou méně reaktivní a dostávají se ven z těla hostitele, přičemž následně infikují nové jedince (Vávra, 2017). Mikrosporidie *Nosema bombycis* parazitující housenky bource morušového (*Bombyx mori*) způsobila v polovině 19. století po celé Evropě rozsáhlé škody v hedvábnictví. Infikované housenky na sobě měly černé skvrny, které byly výsledkem imunitní reakce

zprostředkované pigmentem melaninem a masově hynuly (Eilenberg et al., 2015). Další mikrosporidie, které mohou zapříčinit velké škody jsou *Nosema apis* a *Nosema ceranae*, jejichž hostiteli jsou včely. Při silné infekci a nepříznivých vnějších podmínkách (počasí) může dojít až k hromadnému úhynu včelstev (Fries et al., 2013).

Mikrosporidie jsou také běžnými patogeny slunéček. Doposud bylo popsáno celkem pět druhů mikrosporidií z rodu *Nosema*, které parazitují na slunéčkovitých (Steele et Bjørnson, 2014). U infikovaných jedinců *Hippodamia Convergens* byly zaznamenány negativní vlivy infekce v podobě snížené produkce vajíček a kratší délky života, než tomu bylo u zdravých jedinců. Mikrosporidie byly nalezeny i ve vajíčkách infikovaných jedinců, proto se předpokládá, že se přenáší vertikálně (Saito et Bjørnson, 2008). Vilcinskas a kol. (2015) objevili velké množství mikrosporidií v hemolymfě *H. axyridis*. Jedinci nevykazovali žádné známky infekce, a to i přes vysoké koncentrace mikrosporidií, které u nich byly nalezeny. Mikrosporidie se vyskytovaly v hemolymfě všech jedinců *H. axyridis* shromážděných z různých míst v Německu, Číně, Japonsku a Koreji až po invazivní populace v Evropě a USA (Vilcinskas et al., 2015). Přítomnost mikrosporidií byla zjištěna u dalších 21 druhů střeoevropských slunéček (Knapp et Řeřicha, nepubl.). Pravděpodobně jsou mikrosporidie běžnějším parazitem slunéčkovitých než je v literatuře zmiňované.

3.5.3 Houby

Beauveria bassiana

Beauveria bassiana (Ascomycota: Hypocreales) je fakultativní patogen infikující většinu druhů hmyzu. Vyskytuje se především v půdě, ale byl zaznamenán také jako endofyt kukuřice nebo v kůře jilmu (Lewis et al., 1996). Slunéčka jsou houbovému patogenu nejvíce vystaveni během přezimování, kdy se mohou dostat do kontaktu s půdou obsahující houbové propagule (Roy et al., 2008 ex Ormond et al. 2006). *B. bassiana* je považována za hlavní biotický faktor způsobující úmrtnost slunéček během přezimování (Ceryngier et Hodek, 1996). Cottrell a Shapiro (2003) zkoumali míru prevalence *B. bassiana* u původního slunéčka *Olla v-nigrum* a invazního slunéčka *H. axyridis*. Zjistili, že jedinci původního druhu slunéčka byli běžně infikováni a následně usmrceni touto parazitickou houbou, zatímco jedinci invazního

slunéčka nebyli téměř vůbec infikováni (Cottrell et Shapiro-Ilan, 2003). Vysoká úmrtnost byla zaznamenána i u původních druhů slunéček jako je *Adalia bipunctata* a *Coccinella septempunctata*, kdy byla jedincům v laboratoři vpravena mírná dávka houbového patogenu *B. bassiana*, která pro ně byla smrtelná, zatímco k usmrcení *H. axyridis* bylo zapotřebí vyšší dávky patogenu (Helen Elizabeth Roy et al., 2008).

Hesperomyces virescens

Laboulbeniales neboli roztřepenkotvaré je řád ze skupiny vřeckovýtrusých hub (Ascomycota: Laboulbeniomycetes). Zástupci toho řádu parazitují především na hmyzu, nejvíce však na broucích (Coleoptera) (Hodek et al., 2012). Rod *Hesperomyces* zahrnuje pouze sedm objevených druhů, z nichž pět parazituje na slunéčkovitých včetně *Hesperomyces virescens* (Haelewaters et De Kesel, 2020). Tento druh byl poprvé popsán v roce 1891 Thaxterem na slunéčku *Chilocorus stigma* ve státu Kalifornie (USA; Thaxter, 1890). Jedná se o obligátního ektoparazita, který infikuje více než 30 druhů slunéčkovitých (Hodek et al., 2012). Přestože nezpůsobuje přímo smrt hostitele, bylo zaznamenáno několik negativních vlivů, které snižují fitness hostitele. Plodnice *H. virescens* se vyskytují i v oblasti krovek (Obr.4), proto může těžká infekce hostiteli bránit v letu anebo zvýšit náklady vynaložené na letovou aktivitu. Když se infekce houby nachází u jedinců v oblasti hlavy a tykadel, může být pro slunéčka obtížné nalézt a konzumovat potravu (Nalepa et Weir, 2007). Celý životní cyklus této parazitické houby probíhá na povrchu živého hostitele (De Kesel, 2011).

Obr.4: Plodnice houby *H. virescens* na krovkách jedince *H. axyridis*, zdroj: Ing. Michal Řeřicha



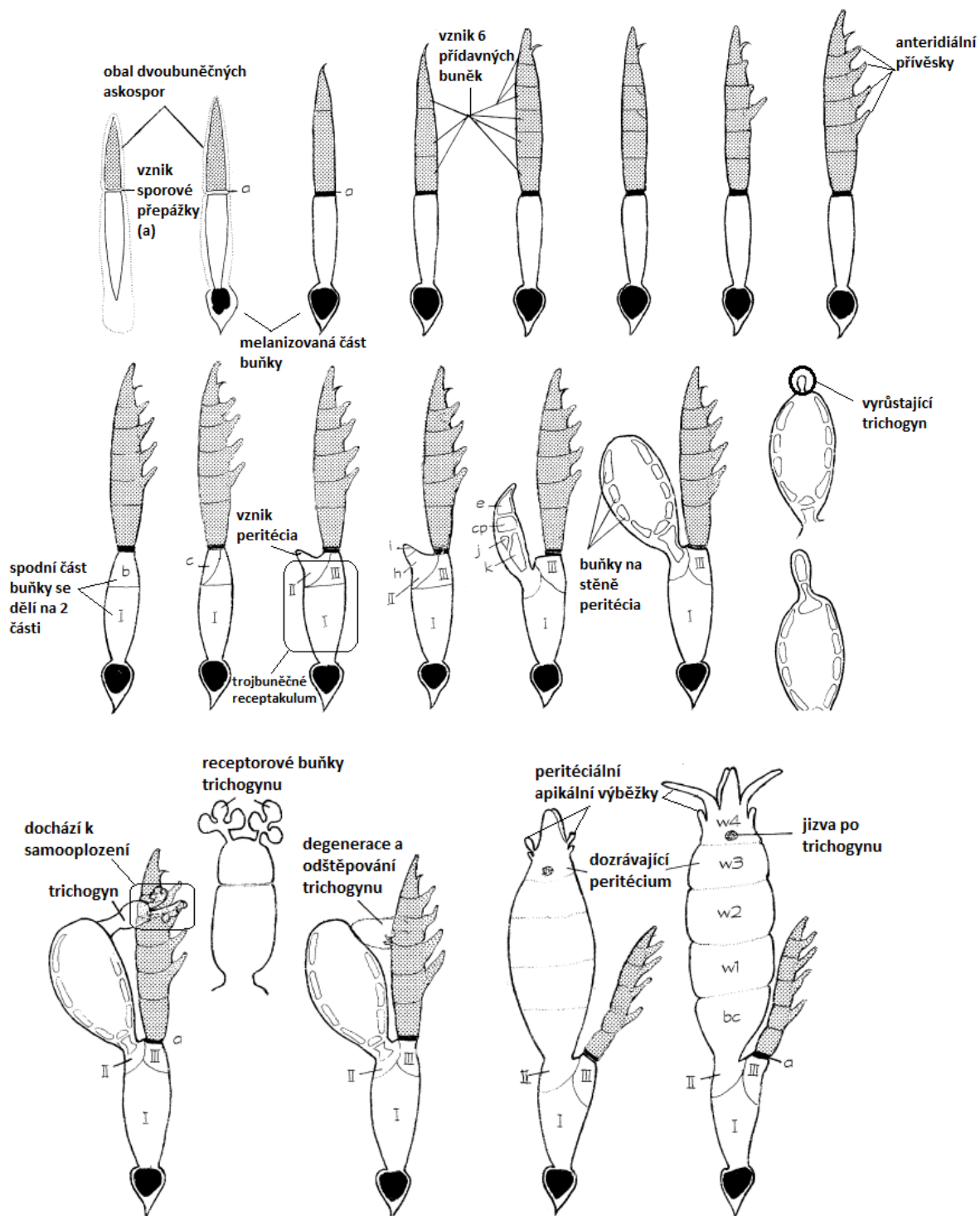
Životní cyklus

Hesperomyces virescens má žlutozelenou plodnici o velikosti 215-511 μm , která obsahuje bicelulární askospory, které jsou většinou rozděleny do párů a při kontaktu s kutikulou hostitele se prodlužují. U větší askospory dojde k nafouknutí její špičky, čímž zajistí prvotní přilnutí k hostiteli. Tato špička dále nabobtná až vznikne melanizovaná část buňky, která má připevňovací funkci. Tato melanizovaná část buňky se také nazývá „*circular appressorium*“ neboli haustoriální aparát, díky kterému dokáže *H. virescens* proniknout do hostitelovy kutikuly (Weir et Beakes 1996). Větší ze dvou askospor se poté rozdělí na peritécium a trojbuněčné receptakulum a menší buňka produkuje anteridiální přívěsky (Fiedler, 2016). Na receptakulu poblíž zralých anteridiálních výběžků vyrůstá trichogyn, který následně oplozují spermácie (Obr.5). Zralý trichogyn se později odlamuje a na peritéciu zanechává jen jizvu. V rostoucím peritéciu se tvoří vřecka s askosporami a na vrcholu se formují peritéciální apikální výběžky. Předpokládá se, že tyto výběžky na špičce

plodnice působí jako spouštěče, které iniciují vypouštění spor v reakci na fyzický kontakt (Weir a Beakes, 1996, Fiedler, 2016). Jakmile se zdravý hostitel dotkne zralého peritécia na infikovaném hostiteli, lepkavé spory se mechanicky uvolní a přilnou v místě kontaktu. Umístění parazita na těle nového hostitele proto ukazuje, kde došlo k vnitrodruhovému kontaktu, a tím naznačuje mechanismus přenosu infekce (Nalepa et Weir, 2007).

K vývoji z askospory na dospělou plodnici dochází při teplotách v rozmezí 10–30 ° C a trvá to 13–26 dní, v závislosti na druhu hostitele (Cottrell et Riddick 2012). Během letních podmínek mohou mít zralé plodnice životnost až 10 týdnů (De Kesel 1993). Prevalence *H. virescens* se významně liší mezi lokalitami, ročním obdobím a mezi jednotlivými roky (De Kesel, 2011). Sezónní rozdíly v prevalenci Laboulbeniales lze vysvětlit hlavně výskytem neinfikovaných jedinců nové generace, zatímco rozdíly mezi lokalitami jsou způsobeny stanovištěm a hustotou jedinců (De Kesel, 1996).

Obr.5: Vývoj plodnice *H. virescens* (zdroj: Weir et Beakes, 1996)



Přenos infekce

Šíření roztřípenek mezi hostiteli může probíhat jak přímým kontaktem mezi jedinci, tak nepřímo skrze kontakt s infikovanou půdou (De Kesel 1995 ex Scheloske 1969). Nepřímému šíření infekce se však neklade příliš velký význam, jelikož askospory mají v substrátu krátkou životnost (méně než týden v případě *Laboulbenia slackensis* - Cépède et Picard; De Kesel, 1993). Distribuce houby na těle hostitele odráží způsob jejího šíření. U samčího hostitele se infekce vyskytuje převážně ventro - posteriorně (zadní oblast břicha) a u samic dorso – posteriorně (zadní oblast zad), proto se páření považuje za hlavní mechanismus přenosu infekce mezi jedinci (Riddick et Schaefer, 2005). *H. virescens* lze tudíž považovat za sexuálně přenosnou parazitickou houbu (Welch et al, 2001). Po přezimování se u slunéček infekce nacházela na okrajích a předních částech krovek jedinců, což neodpovídá hypotéze o přenosu během páření. Slunéčka zimu přečkávají v podobě početných agregací, a tak dochází k přímému kontaktu skrze skupinu (Riddick et Schaefer, 2005; Riddick, 2006). Nalepa a Weir (2007) dospěli k závěru, že přenos této houby probíhá primárně pohlavním stykem hostitelů v období páření, ale významnou roli hraje také agregace během přezimování (Nalepa et Weir, 2007). Výběr stanovišť pro přezimování jednotlivých druhů slunéček se může překrývat, a proto může být agregace přezimujících slunéček heterospecifická. Taková situace zvyšuje příležitost pro interspecifický přenos infekce z původních druhů na nepůvodní a naopak (Haelewaters et al., 2016 ex Ceryngier, 2015).

V roce 2002 byla houba *H. virescens* poprvé zaznamenána jako parazit *Harmonia axyridis* v Ohio (USA) (Garce's et Williams 2004). Od té doby vědci začali hledat tuto parazitickou houbu na *H. axyridis* v terénu a později byla objevena na mnoha lokalitách ve Spojených státech, přičemž bylo parazitováno až 70–100 % jedinců (Riddick et Schaefer, 2005; Nalepa et Weir, 2007; Riddick et Cottrell, 2010). V zimě 2007 byla *H. virescens* poprvé zaznamenána na *H. axyridis* v Evropě (Belgie). V té době bylo cca 0,5 % jedinců infikováno *H. virescens*, avšak o čtyři roky později (v zimě 2011) bylo na stejném místě zaznamenáno 96,5 % infikovaných jedinců (De Kesel, 2011).

Rychlé šíření *H. virescens* a jeho lokálně vysoká prevalence parazitů na *H. axyridis* je zajímavým předmětem pro další výzkum týkající se účinků parazita na

hostitele (Haelewaters et al., 2016). Vzhledem k tomu, že je *H. axyridis* globálně invazivní druh, může být také užitečné prozkoumat potenciál *H. virescens* při regulaci invazivních populací slunéček.

4. Metodika

4.1 Odchyt a chov slunéček

Slunéčka východní (*Harmonia axyridis*) použitá pro tuto diplomovou práci byla odchycena na dvou lokalitách: obec Ohaře (GPS: 50° 5' S, 15° 17' V; 225 m n.m.; říjen 2019) a obec Úboč (GPS: 49° 26' S, 13° 5' V; 498 m n.m.; srpen 2020). Neinfikovaní a silně infikovaní brouci, kteří byli odchyceni na podzim 2019, byli rozděleni do několika podskupin (cca 40-50 jedinců). Podskupiny byly umístěny do skleněných nádob (objem 1 litr; perforované víčko) a vystaveny přirozeným venkovním podmínkám, aby napodobily přirozené přezimování. Sklenice byly umístěny venku pod křovinami v experimentální oblasti (Praha - Suchdol; GPS: 50 ° 7 '51 .1 "S, 14 ° 22 '15.4" Z). Na konci března 2020 byly sklenice přeneseny do ekofyziologické laboratoře D414 ČZU - FŽP, kde byli vytríděni přeživší jedinci a pomocí binokulární lupy (zvětšení 50x; značka Zeiss) bylo určeno jejich pohlaví a míra infekce houbou *Hesperomyces virescens*. Brouci byli po determinaci rozděleni samostatně do Petriho misek (průměr 9 cm) a poté bylo určeno jejich stáří podle zbarvení krovek jako zjednodušenou kategoriální proměnnou. Zbarvení krovek slunéčka východního (v ČR nejčastější forma *succinea*) je charakteristické černými skvrnami na světlém podkladu (Obr.1; Hodek et al., 2012). Světlá podkladová barva může mít žluté až červené zbarvení, které se mění se stárnutím dospělců (žlutá/oranžová – mladší, červená – starší) a je způsobené ukládáním karotenoidů do buněk pokožky. Po odhadu stáří jedinců dle zbarvení krovek byl do každé misky vložen malý kus papíru složený do tvaru harmoniky. Na papírky byla každý druhý den sypána vajíčka zavíječe moučného (*Ephestia kuehniella*), která slouží jako standardizovaná potrava pro slunéčka. Tekutiny byly jedincům poskytnuty v podobě vody smíchané s medem, která byla každý druhý den aplikována na kuličku vytvořenou z papírové utěrky.

4.2 Experiment – pohlavní výběr samce mezi samicí infikovanou houbou

H. virescens a neinfikovanou samicí

Testovali jsme, zda samci upřednostní během kopulace infikovanou či zdravou samici. Byl pozorován vliv infekce samců (infikovaný/neinfikovaný), období páření (jaro/léto), stav samic (živá/mrtvá) a infekce samic (infikovaná/neinfikovaná) na pářící aktivitu jedinců.

Experiment byl proveden ve dvou obdobích za účelem porovnání chování slunéčka během dvou různých fenologických fází: 1) bezprostředně po přezimování (duben) a 2) během reprodukčního období (srpen). První fáze experimentu probíhala (po zaškolení od Ing. Michala Řeřichy) v domácích podmínkách (kvůli situaci Covid-19) v dubnu 2020 po dobu osmi dní a druhá fáze probíhala v srpnu po dobu osmi dní vždy od 10 ti hodin dopoledne. Celkem bylo použito 192 samců a 192 samic slunéčka východního. Pro první fázi experimentu, která se uskutečnila na jaře byli použiti jedinci odchycení v obci Úboč a pro druhou fázi, která se konala v létě byli použiti jedinci z obce Ohaře.

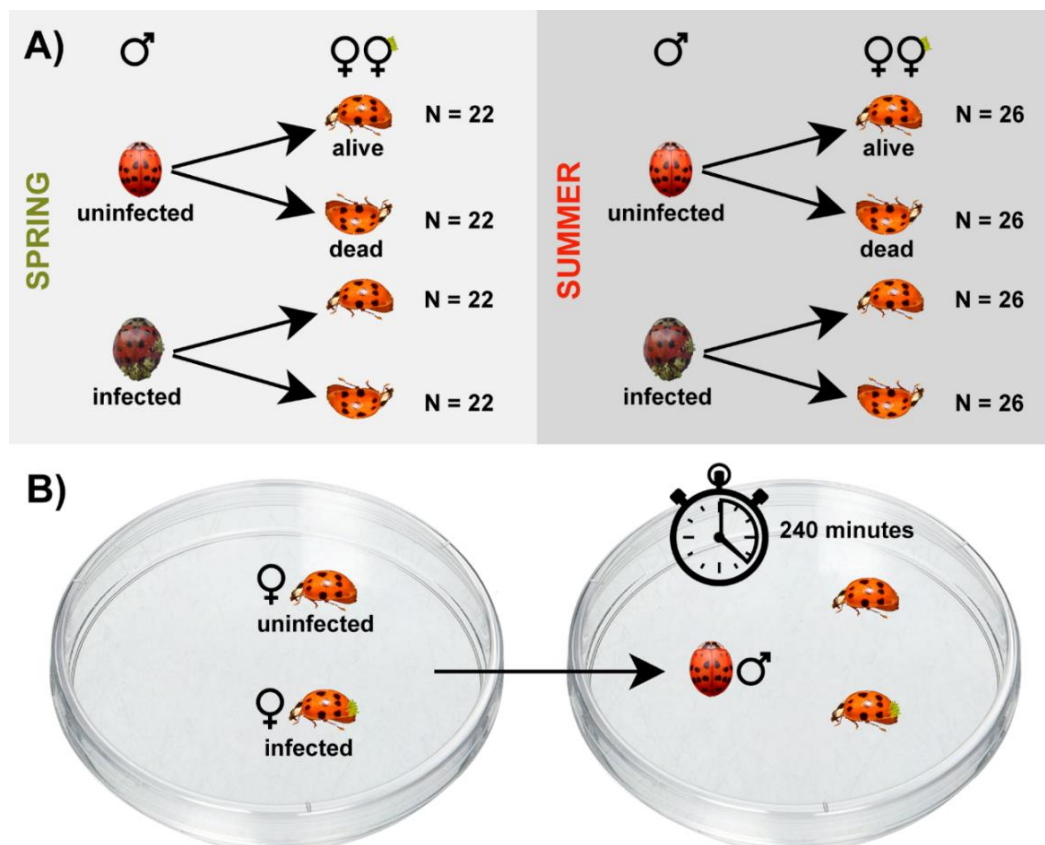
Čisté Petriho misky byly nadepsány identifikačními kódy, které značí pozorovanou trojici skládající se z 1 samce a 2 samic. Jedna ze samic byla vždy infikovaná a druhá byla neinfikovaná houbou *H. virescens*. Abychom prozkoumali význam samičího chování během páření, byly každý druhý den použity místo živých samic mrtvé samice z předchozího dne (určené dle kódů). Mrtvolly samic byly 12 hodin v mrazu a hodinu před začátkem experimentu ponechány při pokojové teplotě (22 ° C). Během jednoho dne bylo pozorováno celkem 12 misek z nichž 6 obsahovalo vždy infikovaného samce, zatímco zbylých 6 misek obsahovalo vždy neinfikovaného samce (Obr. 6). Pokud to bylo možné, byli jedinci v jedné misce ze stejné věkové kategorie (oranžová, červená).

Po zahájení behaviorálního experimentu byla slunéčka sledována patnáct minut a každou minutu bylo zaznamenáno, jestli dochází k páření mezi jedinci a preference mezi infikovanou nebo naopak neinfikovanou samicí. Po uplynutí patnácti minut se prodloužil interval nejprve o čtvrt hodinu a poté byli jedinci kontrolováni každých třicet minut až do limitu 240 minut. V případě, že se jedinci pářili i po dosažení časového limitu čtyř hodin, byli pro zajímavost nadále sledováni a

zaznamenávání každých 30 minut, rekord byl 12 hodin u živých samic a 10 hodin u mrtvých samic.

Do připravených formulářů byl u každé misky zaznamenán věk a infekčnost jedinců a následně i jejich pářicí aktivita v podobě 1 a 0, kdy 1 znamená, že v daný čas (interval) došlo k páření a 0, že k páření nedošlo. Po uplynutí časového limitu 240 minut byli samci a samice umístěni do uzavíratelných zkumavek (objem 1,5 ml) s identifikačním kódem a následně byli zmrazeni při teplotě -18°C pro pozdější analýzy kutikulárních uhlovodíků.

Obr.6: Grafické znázornění experimentu, zdroj: Ing. Michal Knapp, Ph.D.



4.4 Analýza dat

Analýza dat byla provedena pod vedením Ing. Petra Chajmy za konzultace s vedoucím práce Ing. Michalem Knappem, Ph.D.

Vztah mezi infekcí samců (infikovaný, neinfikovaný), obdobím páření (jaro, léto), stavem samic (živá, mrtvá) a aktivitou páření (0= ne, 1= ano) a jejich obousměrné interakce byly testovány pomocí zobecněných lineárních modelů (GLM) s binomickým rozdělením chyb, za využití funkce „logit link“.

U několika pokusů, při kterých došlo k páření, byl použit obdobný zobecněný lineární model (GLM) s binomickým rozdělením chyb. Tento model analyzoval vliv infekce samců, období páření, stav samic a veškeré jejich obousměrné interakce na preferenci infekce samice (0= infikovaná samice, 1= neinfikovaná samice).

K analýze vlivu infekce samců, infekce samic, období páření, stavu samic a všech jejich obousměrných interakcí v závislosti na proměnné „čas do zahájení kopulace“ byl použit obecný lineární model (LM) s gaussovým rozdělením chyb. Proměnná „čas do zahájení kopulace“ byla před analýzou logaritmičsky transformována. Obdobný lineární model (pouze bez transformace dat) byl použit k analýze délky páření.

Pro testované proměnné v modelech byla stanovena efektivní velikost jako medián a Bayesovský interval spolehlivosti na 95 % (95% konfidenční interval). Využito bylo přístupu zadní pravděpodobnosti pro 5 000 hodnot simulované pomocí „sim“ funkce v knihovně „arm“ programu R (Vehtari, Gelman, Gabry 2016).

Konfidenční interval (tj. rozsah mezi dolní a horní hodnotou), který nezahrnuje nulu, je statisticky významný. Predikce průměrných efektů použitých v grafech byla vypočtena jako zpětně transformovaný medián a 95% konfidenční interval pomocí regresních rovnic. Všechny statistické analýzy byly provedeny v R, ver. 4. 0. 3. (R Core Team. 2020).

Nulová hypotéza byla stanovena pro každý model zvlášť jako:

H0₁: Zkoumané faktory (infekce samců, období páření, stav samic) nemají vliv na pravděpodobnost páření.

H0₂: Zkoumané faktory (infekce samců, období páření, stav samic) nemají vliv na samčí preference mezi infikovanou a neinfikovanou samicí.

H0₃: Zkoumané faktory (infekce samců, infekce samic, období páření, stav samic) nemají vliv na délku doby co započatí páření.

H0₄: Zkoumané faktory (infekce samců, infekce samic, období páření, stav samic) nemají vliv na délku páření.

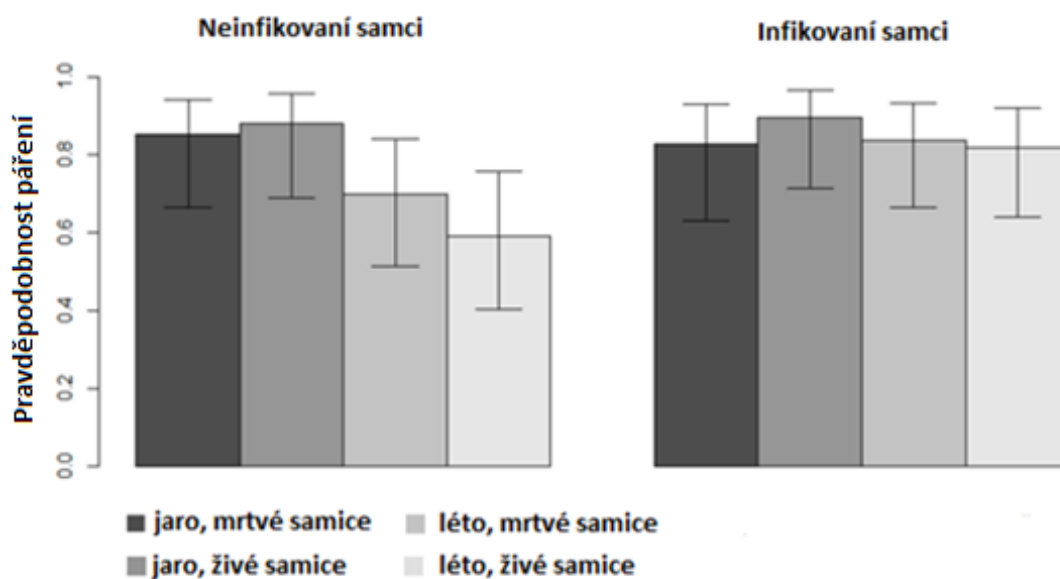
5. Výsledky

Zhruba 75 % samců vstupujících do experimentu se pářilo během stanoveného intervalu 240 minut. Žádná ze zkoumaných proměnných, tj. infekce samců, stav samic, období páření a párové interakce mezi hlavními efekty neměly statisticky významný vliv na pravděpodobnost páření samců (Tabulka 1). Data ukazují tendenci neinfikovaných samců ochotněji se pářit na jaře než v létě, avšak tento efekt není statisticky průkazný (Graf 1).

Konfidenční interval je rozsah mezi dolní a horní hodnotou zkoumaných proměnných. Pokud v něm není zahrnuta nula, je považován za statisticky významný. Žádná ze zkoumaných proměnných neměla vliv na pravděpodobnost páření.

Tabulka 1: Odhadované hodnoty zkoumaných proměnných a jejich vliv na pravděpodobnost páření.

Vysvětlovaná proměnná	Zkoumané proměnné	Odhad zkoumaného parametru	Konfidenční interval 95 %	
			Dolní hodnota	Horní hodnota
Pravděpodobnost páření	(Intercept)	1.76	0.68	2.82
	Infekce samců	-0.17	-1.55	1.21
	Období páření	-0.91	-2.20	0.39
	Stav samic	0.24	-1.19	1.61
	Infekce samců: Období páření	0.96	-0.61	2.54
	Infekce samců: Stav samic	0.36	-1.10	1.80
	Období páření: Stav samic	-0.72	-2.24	0.80

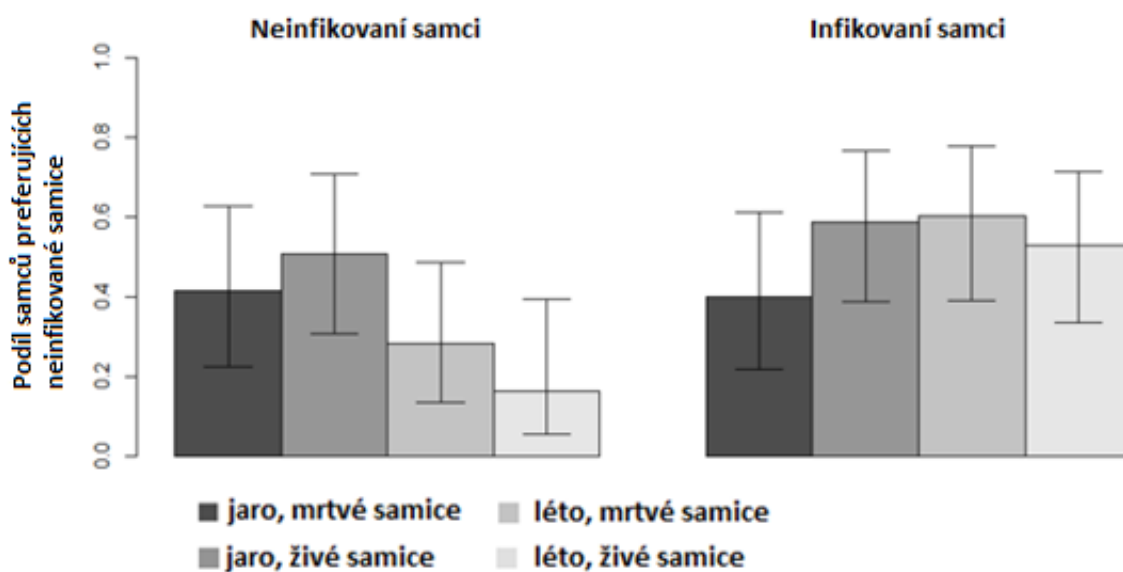


Graf 1: Vztah mezi pravděpodobností páření samců a zkoumanými proměnnými (infekce samců, období páření, stav samic).

Samčí preference k páření se s neinfikovanými samicemi byla významně ovlivněna interakcí mezi obdobími páření a infekcí samců (Tabulka 2). Na začátku jara nebyla pozorována žádná silná preference vůči neinfikovaným samicím ze strany infikovaných ani neinfikovaných samců. V létě však neinfikovaní samci významně upřednostňovali infikované samice před neinfikovanými (Graf 2). Podíl samců preferujících neinfikované samice nebyl ovlivněn jinými zkoumanými proměnnými (Tabulka 2).

Tabulka 2: Odhadované hodnoty zkoumaných proměnných a jejich vliv na podíl samců preferujících neinfikované samice.

Vysvětlovaná proměnná	Zkoumané proměnné	Odhad zkoumaného parametru	Konfidenční interval 95 %	
			Dolní hodnota	Horní hodnota
Podíl samců preferujících neinfikované samice	(Intercept)	-0.35	-1.24	0.52
	Infekce samců	-0.06	-1.21	1.12
	Období páření	-0.60	-1.76	0.55
	Stav samic	0.36	-0.77	1.53
	Infekce samců: Období páření	1.42	0.05	2.82*
	Infekce samců: Stav samic	0.40	-0.96	1.76
	Období páření: Stav samic	-1.08	-2.42	0.28

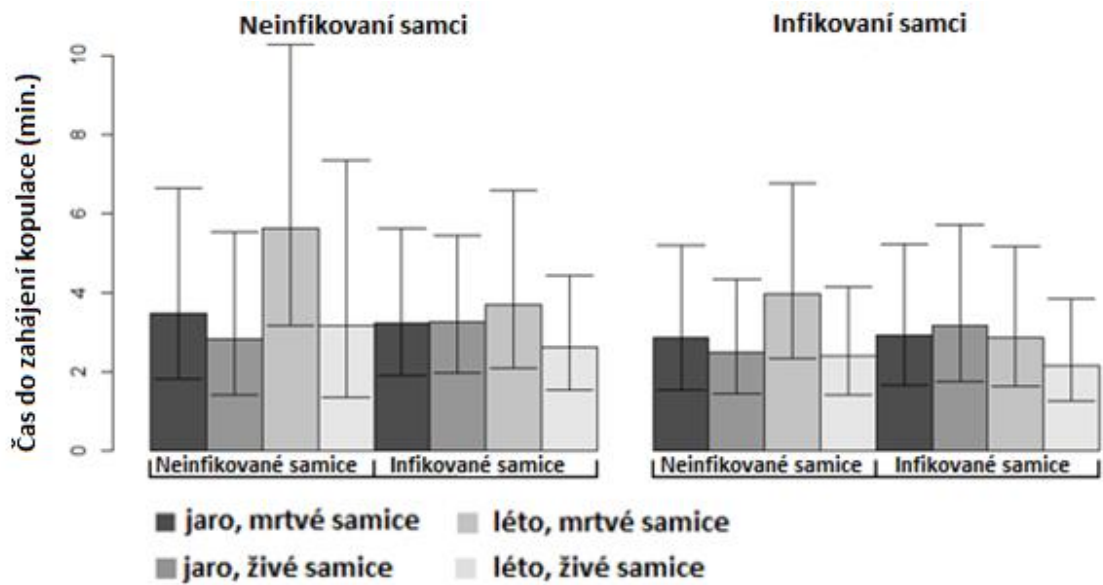


Graf 2: Vztah mezi podílem samců preferujících neinfikované samice a zkoumanými proměnnými (infekce samců, stav samic, období páření).

Čas do zahájení kopulace jedinců nebyl významně ovlivněn žádným ze zkoumaných faktorů (Tabulka 3; Graf 3).

Tabulka 3: Odhadované hodnoty zkoumaných proměnných a jejich vliv na čas do zahájení kopulace.

Vysvětlovaná proměnná	Zkoumané proměnné	Odhad zkoumaného parametru	Konfidenční interval 95 %	
			Dolní hodnota	Horní hodnota
Čas do zahájení kopulace	(Intercept)	1.24	0.59	1.90*
	Infekce samců	-0.20	-0.93	0.54
	Infekce samic	-0.07	-0.79	0.66
	Stav samic	-0.21	-1.00	0.59
	Období páření	0.48	-0.25	1.25
	Infekce samců: Infekce samic	0.09	-0.63	0.83
	Infekce samců: Stav samic	0.07	-0.65	0.81
	Infekce samců: Období páření	-0.15	-0.85	0.57
	Infekce samic: Stav samic	0.22	-0.51	0.96
	Infekce samic: Období páření	-0.35	-1.08	0.37
	Stav samic: Období páření	-0.36	-1.07	0.34

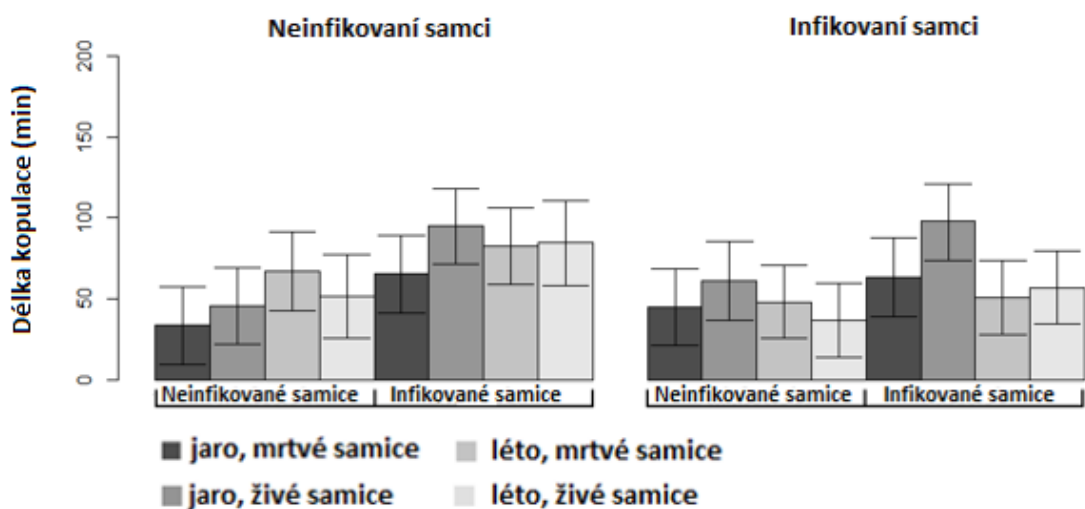


Graf 3: Vztah mezi časem do zahájení kopulace a zkoumanými proměnnými (infekce samců, infekce samic, stav samic, období páření).

Doba páření byla delší u párů, kde byla infikovaná samice bez ohledu na infekční status samce (Tabulka 4). Průkazný vliv na délku páření mělo také období páření, přičemž doba páření byla delší pro jedince zkoumané na jaře ve srovnání s jedinci zkoumanými během léta (Graf 4). Vliv sezóny (jaro vs. léto) byl dále závislý na infekčním statusu samce, přičemž délka jarního páření byla významně prodloužena především u infikovaných samců, a nikoliv u neinfikovaných (Tabulka 4; Graf 4). Ostatní zkoumané faktory neměly významný vliv na délku páření slunéček východních v našem experimentu (Tabulka 4).

Tabulka 4: Odhadované hodnoty zkoumaných proměnných a jejich vliv na délku páření.

Vysvětlovaná proměnná	Zkoumané proměnné	Odhad zkoumaného parametru	Konfidenční interval 95 %	
			Dolní hodnota	Horní hodnota
Délka páření	(Intercept)	33.44	9.31	57.77*
	Infekce samců	11.30	-17.81	10.18
	Infekce samic	31.97	3.12	60.46*
	Stav samic	11.86	-17.13	41.26
	Období páření	33.52	4.71	61.40*
	Infekce samců: Infekce samic	-12.67	-42.55	16.40
	Infekce samců: Stav samic	4.66	-23.89	32.82
	Infekce samců: Období páření	-30.97	-59.09	-1.57*
	Infekce samic: Stav samic	17.64	-11.65	46.39
	Infekce samic: Období páření	-15.75	-43.73	12.12
	Stav samic: Období páření	-28.00	-55.66	0.82



Graf 4: Vztah mezi délkou kopulace a zkoumanými proměnnými (infekce samců, infekce samic, stav samic, období páření).

6. Diskuze

Někteří parazité jsou schopni manipulovat chováním či vzhledem svého hostitele, aby došlo k jejich přenosu na nového jedince (Poulin, 2010). U pohlavně přenosných parazitů je sexuální kontakt hostitelů klíčovým mechanismem přenosu infekce (Kokko et al., 2002). Některé studie zjistily vliv entomopatogenních hub na sexuální chování hostitele (Moler, 1993; Cooley et al., 2018; Reyes-Ramírez et al., 2019). Taková změna v chování se projevila například v sexuální preferenci infikovaných jedinců (Moler 1993; Trandem et al., 2015; Reyes-Ramírez et al., 2019), délce kopulace s infikovanými jedinci (Garza-Hernández et al., 2015) nebo v jiné změně sexuálního chování infikovaného jedince (samci cikád stridulovali jako samice) (Cooley et al., 2018).

Hesperomyces virescens je ektoparazitická houba infikující slunéčkovité včetně invazivního slunéčka východního *Harmonia axyridis*. Za účelem otestovat možnou manipulaci houbou *H. virescens*, byli sledováni infikovaní i neinfikovaní jedinci *H. axyridis* během páření. V experimentu bylo zkoumáno několik faktorů: stav samic (mrtvá, živá), období páření (jaro, léto), infekce samců (infikovaný, neinfikovaný) a infekce samic (infikovaná, neinfikovaná). Očekávalo se, že samci budou v páření preferovat infikovanou samici před neinfikovanou. Pro neinfikované samce by bylo výhodné, kdyby dokázali detekovat infekci u samic a preferovali zdravé samice. Vyhnuli by se přenosu infekce a jejím pozdějším negativním účinkům na fitness jedince. Na druhou stranu je možné, že parazitická houba je v rámci evoluce vývojově dál než její hostitel, a tak dokáže obelstít její detekci.

Celkem se během experimentu pářilo 75 % samců. Studie zkoumající páření u slunéček *Coleomegilla maculata* zjistila, že 24 hodinová izolace mezi pohlavími před začátkem experimentu může mít vliv na frekvenci páření. Během laboratorního pozorování se ve smíšené skupině (samci + samice) pářilo během 24 hodin zhruba 16 % jedinců. Zatímco ve skupině, kde byli jedinci před experimentem od sebe odděleni se pářilo 67 % jedinců během 24 hodin. Vliv na frekvenci páření může mít i prostředí. Když byli jedinci shromážděni v terénu, tak se hned poté pářilo 50 - 95 % jedinců. Je patrné, že v terénu se jedinci ve smíšené skupině páří, jakmile mají příležitost, ale v laboratoři frekvence páření v průběhu času klesá, pokud od sebe nejsou samci a samice odděleni (Jason et al., 2008).

Neinfikovaní samci v letním období preferovali v páření infikované samice před neinfikovanými. V jarním období nebyla u samců zjištěna preference mezi samicemi. Zvýšená atraktivita infikovaných samic během léta mohla být způsobena chemickou manipulací houbou *H. virescens*. Podobné výsledky zjistila studie na mouše domácí, kterou infikuje houba hmyzomorka muší. Samci preferovali mrtvé infikované samice před mrtvými neinfikovanými. Moller (1993) výsledky vysvětloval nejprve tím, že infikované mrtvoly měly kvůli infekci zvětšenou břišní část a tím byly pro samce atraktivnější, protože velikost břicha může u samic značit míru plodnosti. Později byl proveden nový experiment, kde byly mrtvým samicím upraveny velikosti břišních částí, aby se eliminoval jejich vliv na volbu samce. Při druhém experimentu samci stále preferovali infikované mrtvé samice. To napovídá, že za zvýšenou atraktivitu nejsou zodpovědné vizuální změny samic, ale pravděpodobně změny na chemické úrovni (Moller, 1993). U infikovaných jedinců mohlo dojít ke změně ve složení kutikulárních uhlovodíků, které jsou pro hmyz při volbě partnera důležité. Parazitické houby používají k proniknutí do kutikuly směs několika enzymů, které jsou vyloučeny poté, co se k pokožce připojí infekční konidie (Lovett et Leger, 2017). Preference infikovaných samic mohla být také vedlejším účinkem infekce, jelikož jsou parazitované samice infekcí oslabeny mohou se kopulaci méně bránit. Odmítání kopulace je u zdravých samic běžným chováním, a to především, když nejsou pohlavně dospělé. Takové samice před samcem utíkají, snaží se ho setřást nebo ohýbají břišní část směrem nahoru (Obata, 1988; Omkar et Pervez, 2005).

Infikované samice byly samci preferovány pouze v letní období. Pokud parazit manipuluje chemickými látkami hostitele, lze tento výsledek vysvětlit tak, že po přezimování mohou být houby oslabené, což může narušovat jejich vliv na chemické látky slunéček. Naopak v průběhu vegetační sezóny jejich plodnice a infekčnost mohou růst a tím i vliv na hostitelovu chemickou komunikaci. V průběhu postupujícího času vegetační sezóny může tedy docházet ke změně toho, jak jsou infikovaní jedinci vnímáni jedinci opačného pohlaví.

Infikovaní i neinfikovaní samci se pářili s infikovanými samicemi výrazně déle než s neinfikovanými samicemi. Tento výsledek může být ukázkou manipulace pářícího chování hostitele, aby se parazit co nejefektivněji přenesl na nového jedince. Podobné výsledky zjistili Garza-Hernandéz a spol. (2015) ve studii na komárech *Aedes aegypti*, které infikuje parazitická houba *Metarhizium anisopliae*. Infikovaní samci

strávili pářením s neinfikovanou samicí mnohem delší čas než zdraví samci. Také zjistili, že infekce snížila u infikovaných samců produkci spermií o 87 %, což může vysvětlovat, proč se samci pářili déle. Houba *Metarhizium anisopliae* je pro svého hostitele smrtící, proto mohla být zvýšená snaha o kopulaci imunitní odpovědí umírajících samců (Garza-Hernández et al., 2015). U brouka potemníka moučného (*Tenebrio molitor*) bylo zjištěno, že samci investují více do reprodukce, pokud vnímají, že jim zbývá krátký čas do konce života (Kivleniece et al., 2010). Tato poslední strategie je známá jako terminální investice (Williams, 1966) a může být vyvolána nejen patogeny, ale také jakýmkoliv faktorem, který snižuje budoucí reprodukční potenciál jedince (Billman et Belk, 2014). Samcům potemníka byla opakovaně vyvolávána aktivace imunitního systému pomocí nylonových implantátů, které jim byly vloženy mezi břišní segmenty a po několika hodinách odstraněny. Aplikace nylonových implantátů a jejich následné odstranění spustí u jedince stejnou imunitní reakci, jako kdyby byl napaden parazity. Následně byl proveden experiment na pohlavní výběr mezi jedinci. Samice preferovaly samce, kteří měli aktivovaný imunitní systém před samci, kterým nebyla aktivována imunitní reakce. Autoři se domnívají, že za výsledek pravděpodobně může zvýšená investice do feromonové komunikace u zraněných samců (Kivleniece et al., 2010). Haelewaters a spol. (2020) zjistili, že parazit *H. virescens* může výrazně zvýšit úmrtnost u infikovaných jedinců *H. axyridis*. Proto je možné, že infikované samice *H. axyridis* mohou více investovat do reprodukce, aby se stihly rozmnožit dříve, než zahynou.

V jarních měsících se jedinci pářili ve vyšší míře než v létě. Tento výsledek může být způsoben tím, že po přezimování, chtějí samice doplnit samčí sperma do spermatéky nebo chtějí obnovit staré nefunkční sperma (Nedvěd, 2016). K podobným výsledkům dospěli Susset a spol. (2018) ve studii na sluněčku *Hippodamia undecimnotata*. V jarním období, kdy měli jedinci za sebou přezimování byla zaznamenána vyšší frekvence páření než v období před přezimováním (Susset et al., 2018).

Čas do zahájení kopulace se nelišil mezi infikovanými a neinfikovanými jedinci. To znamená, že infekce neměla vliv na rychlost započetí páření. Očekávalo se, že v případě detekce parazita by mohlo dojít k prodlevě ve volbě partnera nebo naopak by mohla případná změna ve složení kutikulárních uhlovodíků působit na jedince silnější přitažlivostí, což by urychlilo volbu a započetí páření.

Na samčí preferenci nemělo vliv, zda byla samice živá či mrtvá. Samičí chování dle výsledků nemá významný vliv na páření slunéček. Ke stejnému výsledku došli ve své studii i Okmar a Pervez (2005), kteří zkoumali pářící chování u slunéčka *Propylea dissecta*. Samci se pářili s mrtvými samicemi ve stejné míře jako s živými, pokud byly mrtvoly staré maximálně 7 dní. Jakmile byly samice starší než týden, množství pokusů samce o páření začalo klesat (Okmar et Pervez, 2005). Tyto výsledky potvrzuje i pozdější studie provedená na slunéčku *Coelophora saucia*. Samci se pářili se samicemi mrtvými až 10 dní ve stejné míře jako s živými samicemi. S mrtvými samicemi starých 20 dnů se nepokusil spářit ani jeden samec. Autoři výsledky interpretují tak, že u samic mrtvých do deseti dnů přetrvávají na těle sexuální feromony, které samce přitahují. Čím jsou však mrtvoly samic starší, tím více přestávají tyto látky plnit svou funkci, protože jsou aktivně vylučovány živými dospělci (Omkar et Singh, 2010).

Studie zkoumající entomopatogenní houby a jejich účinky na sexuální chování hostitele by se měly v budoucnu více zaměřit na chemické sloučeniny vylučované parazitickou houbou. Dále by mohly zkoumat pozměněné složení kutikulárních uhlovodíků u infikovaných jedinců a vliv této změny na pohlavní výběr. Využití analytické chemie a molekulární biologie k analýze chemických sloučenin by mohlo poodhalit jakým způsobem mění entomopatogenní houby chování hostitele (Hansen et De Fine Licht, 2019).

7. Závěr

Významným faktorem, který ovlivňuje chování hmyzu je infekce. Ta vzniká působením patogenů jako jsou prvoci, viry, bakterie a houby (Hampl, 2010). Zatím neexistuje mnoho studií, které dokazují, že entomopatogenní houby jsou schopné manipulovat chováním hostitele během páření. Vliv parazitických hub na sexuální chování hostitele se může projevit buď zvýšenou atraktivitou infikovaných jedinců nebo jako změna jejich sexuálního chování. Infikovaní jedinci mouchy domácí, potměníka moučného a svilušky chmelové byli atraktivnější pro opačné pohlaví než zdraví jedinci (Moler 1993; Trandem et al., 2015; Reyes-Ramírez et al., 2019). Jiná studie na komárech *Aedes aegypti* zjistila, že samci infikovaní parazitickou houbou se pářili se zdravými samicemi výrazně déle než zdraví samci (Garza-Hernández et al., 2015). Změnu v sexuálním chování infikovaných jedinců zjistili Cooley a spol. (2018) ve studii na cikádách. Infikovaní samci stridulovali v podobných frekvencích jako samice, čímž se stali atraktivními pro nenakažené samce a ti se s nimi poté začali pářit (Cooley et al., 2018).

Toto je první práce, která se věnuje vlivu houby *Hesperomyces virescens* na pářící chování slunéček *Harmonia axyridis*. *H. virescens* je ektoparazitická houba, která infikuje jedince z čeledi Coccinellidae včetně invazivního slunéčka východního *Harmonia axyridis* (Hodek et al., 2012). Hlavním mechanismem přenosu infekce je kontakt mezi jedinci během páření (Nalepa et Weir, 2007).

Cílem experimentální části práce bylo zjistit, jestli infekce parazitickou houbou *H. virescens* ovlivňuje pohlavní výběr jedinců *H. axyridis*. V experimentální části bylo pozorováno a zaznamenáváno celkem 192 samců a 192 samic slunéčka východního během páření. Konkrétně se testovalo, zdali infikovaní a neinfikovaní samci upřednostní během kopulace infikovanou či neinfikovanou samici. Abychom otestovali vliv samičího chování během páření, byly v polovině experimentu použity místo živých samic mrtvé samice. Výsledky ukazují, že neinfikovaní samci v letním období upřednostňovali infikované samice před neinfikovanými. Na volbu samců nemělo vliv, zda byly samice mrtvé či živé. Dále byl nalezen signifikantní vliv infekce samic na délku kopulace. Samci (infikovaní i neinfikovaní) se pářili déle s infikovanými samicemi. Tento výsledek byl ovlivněn i obdobím páření, trend byl silnější u jedinců, kteří do experimentu vstupovali na jaře. Zajímavé je, že pravděpodobnost páření nebyla významně ovlivněna žádnou testovanou proměnnou,

tj. infekcí houbou *H. virescens*, stavem samic (živá vs. mrtvá) ani obdobím páření (jaro vs. léto).

Výsledky této diplomové práce budou v budoucnu doplněny o data zjišťující množství a složení kutikulárních uhlovodíků (chemické látky důležité při páření hmyzu) u infikovaných a neinfikovaných slunéček. Bude zajímavé sledovat změnu ve složení a množství těchto chemických sloučenin v průběhu vegetační sezóny i porovnávat uhlovodíky mezi mrtvolami a živými samicemi. Z kompletních dat (této diplomové práce a analýzy kutikulárních uhlovodíků) plánují členové týmu ekologie hmyzu publikovat odborný článek v recenzovaném časopise.

Přehled literatury a použitých zdrojů

- Adriaens, T., Branquart, E., & Maes, D. (2003). The multicoloured Asian Ladybird *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae), a threat for native aphid predators in Belgium? *Belgian Journal of Zoology*, 133(2), 195–196.
- Bezzerides, A. L., McGraw, K. J., Parker, R. S., & Hussein, J. (2007). Elytra color as a signal of chemical defense in the Asian ladybird beetle *Harmonia axyridis*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 61(9), 1401–1408. <https://doi.org/10.1007/s00265-007-0371-9>
- Brown, P. M. J., Roy, H. E., Rothery, P., Roy, D. B., Ware, R. L., & Majerus, M. E. N. (2008). *Harmonia axyridis* in Great Britain: Analysis of the spread and distribution of a non-native coccinellid. *BioControl*, 53(1), 55–67. <https://doi.org/10.1007/s10526-007-9124-y>
- Ceryngier, P. (2000). Overwintering of *Coccinella septempunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) at different altitudes in the Karkonosze Mts, SW Poland. *European Journal of Entomology*, 97(3), 323–328. <https://doi.org/10.14411/eje.2000.049>
- Ceryngier, Piotr, Havelka, J., & Hodek, I. (2004). Mating and activity of gonads in pre-dormant and dormant ladybirds (coleoptera: Coccinellidae). *Invertebrate Reproduction and Development*, 45(2), 127–135. <https://doi.org/10.1080/07924259.2004.9652582>
- Ceryngier, Piotr, Roy, H. E., & Poland, R. L. (2012). Natural Enemies of Ladybird Beetles. *Ecology and Behaviour of the Ladybird Beetles (Coccinellidae)*, 375–443. <https://doi.org/10.1002/9781118223208.ch8>
- Ceryngier, Piotr, & Twardowska, K. (2013). *Harmonia axyridis* (coleoptera: Coccinellidae) as a host of the parasitic fungus *hesperomyces virescens* (ascomycota: Laboulbeniales, laboulbeniaceae): A case report and short review. *European Journal of Entomology*, 110(4), 549–557. <https://doi.org/10.14411/eje.2013.075>
- Cooley, J. R., Marshall, D. C., & Hill, K. B. R. (2018). A specialized fungal parasite (*Massospora cicadina*) hijacks the sexual signals of periodical cicadas (Hemiptera: Cicadidae: Magicicada). *Scientific Reports*, 8(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19813-0>
- Cottrell, T. E., & Shapiro-Ilan, D. I. (2003). Susceptibility of a native and an exotic lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae) to *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 84(2), 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2003.09.003>
- Csata, E., Bernadou, A., Rákósy-Tican, E., Heinze, J., & Markó, B. (2017). The effects of fungal infection and physiological condition on the locomotory behaviour of the ant *Myrmica scabrinodis*. *Journal of Insect Physiology*, 98, 167–172. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.01.004>
- Čepička, I., Kolář, F., Synek, P. (2007). Mutualismus - vzájemně prospěšná symbióza. *Národní institut dětí a mládeže MŠMT ČR. Sámova 3, 101 00, Praha 10.*
- Daloz, D., Braekman, J. C., & Pasteels, J. M. (1994). Ladybird defence alkaloids: Structural, chemotaxonomic and biosynthetic aspects (Col.: Coccinellidae). *Chemoecology*, 5–6(3–4), 173–183. <https://doi.org/10.1007/BF01240602>
- De Kesel, A. (2011). *Hesperomyces* (Laboulbeniales) and Coccinellid hosts. *Sterbeeckia*, 30(July), 32–37.

- Eilenberg, J., Vlak, J. M., Nielsen-LeRoux, C., Cappellozza, S., & Jensen, A. B. (2015). Diseases in insects produced for food and feed. *Journal of Insects as Food and Feed*, 1(2), 87–102. <https://doi.org/10.3920/jiff2014.0022>
- Evans, E. W. (2004). Habitat displacement of North American ladybirds by an introduced species. *Ecology*, 85(3), 637–647. <https://doi.org/10.1890/03-0230>
- Fassotte, B., Fischer, C., Durieux, D., Lognay, G., Haubruge, E., Francis, F., & Verheggen, F. J. (2014). First evidence of a volatile sex pheromone in lady beetles. *PLoS ONE*, 9(12), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115011>
- Fassotte, B., Francis, F., & Verheggen, F. J. (2016). The scent of love: how important are semiochemicals in the sexual behavior of lady beetles? *Journal of Pest Science*, 89(2), 347–358. <https://doi.org/10.1007/s10340-016-0735-x>
- Feldhaar, H., & Gross, R. (2008). Immune reactions of insects on bacterial pathogens and mutualists. *Microbes and Infection*, 10(9), 1082–1088. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.07.010>
- Firlej, A., Lucas, É., Coderre, D., & Boivin, G. (2010). Impact of host behavioral defenses on parasitization efficacy of a larval and adult parasitoid. *BioControl*, 55(3), 339–348. <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9262-5>
- Flegr, J., Lindová, J., & Kodym, P. (2008). Sex-dependent toxoplasmosis-associated differences in testosterone concentration in humans. *Parasitology*, 135(4), 427–431. <https://doi.org/10.1017/S0031182007004064>
- Flegr, Jaroslav. (1999). Ukaž mi své parazity a já ti povím , kdo jsi. *Vesmír*, 78, 667–669. <http://www.cts.cuni.cz/vesmir>
- Flegr, Jaroslav, & Kuba, R. (2016). The relation of toxoplasma infection and sexual attraction to fear, danger, pain, and submissiveness. *Evolutionary Psychology*, 14(3), 1–10. <https://doi.org/10.1177/1474704916659746>
- Flegr, Jaroslav, & Markoš, A. (2014). Masterpiece of epigenetic engineering - How *Toxoplasma gondii* reprogrammes host brains to change fear to sexual attraction. *Molecular Ecology*, 23(24), 5934–5936. <https://doi.org/10.1111/mec.13006>
- Fries, I., Chauzat, M. P., Chen, Y. P., Doublet, V., Genersch, E., Gisder, S., Higes, M., McMahon, D. P., Martín-Hernández, R., Natsopoulou, M., Paxton, R. J., Tanner, G., Webster, T. C., & Williams, G. R. (2013). Standard methods for *Nosema* research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1–28. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.14>
- Garcés, S., & Williams, R. (2004). First record of *Hesperomyces virescens* (Laboulbeniales, Ascomycota) on *Harmonia axyridis* (Coccinellidae, Coleoptera). *Acta Mycologica*, 51(1), 156–158. <https://doi.org/10.5586/am.1071>
- Garza-Hernández, J. A., Reyes-Villanueva, F., Russell, T. L., Braks, M. A. H., Garcia-Munguia, A. M., & Rodríguez-Pérez, M. A. (2015). Copulation Activity, Sperm Production and Conidia Transfer in *Aedes aegypti* Males Contaminated by *Metarhizium anisopliae*: A Biological Control Prospect. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(10), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004144>
- Gordon, R., D. (1985). The Coccinellidae (Coleoptera) of America North of Mexico. *J NY Entomol Soc* 93:1–912
- Gross, P. (1993). Insect behavioral and morphological defenses against parasitoids. *Annual Review of Entomology*. Vol. 38, 251–273. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.38.1.251>

- Haelewaters, D., & De Kesel, A. (2020). Checklist of thallus-forming laboulbeniomyces from Belgium and the Netherlands, including *hesperomyces halysiae* and *laboulbenia quarantena* spp. nov. *MycoKeys*, 86(71), 23–86.
<https://doi.org/10.3897/MYCOKEYS.71.53421>
- Haelewaters, D., Hiller, T., Kemp, E. A., van Wielink, P. S., Shapiro-Ilan, D. I., Catherine Aime, M., Nedvěd, O., Pfister, D. H., & Cottrell, T. E. (2020). Mortality of native and invasive ladybirds co-infected by ectoparasitic and entomopathogenic fungi. *PeerJ*, 8, 1–16. <https://doi.org/10.7717/peerj.10110>
- Haelewaters, D., Zhao, S. Y., Clusella-Trullas, S., Cottrell, T. E., De Kesel, A., Fiedler, L., Herz, A., Hesketh, H., Hui, C., Kleespies, R. G., Losey, J. E., Minnaar, I. A., Murray, K. M., Nedvěd, O., Pfliegler, W. P., Raak-van den Berg, C. L., Riddick, E. W., Shapiro-Ilan, D. I., Smyth, R. R., ... Roy, H. E. (2017). Parasites of *Harmonia axyridis*: current research and perspectives. *BioControl*, 62(3), 355–371.
<https://doi.org/10.1007/s10526-016-9766-8>
- Hajiqanbar, H., Husband, R. W., Kamali, K., Saboori, A., & Kamali, H. (2007). *Ovacarus longisetosus* n. sp. (acari: Podapolipidae) from *amara (paracelia) saxicola* zimm. (coleoptera: Carabidae) and new records of *coccipolipus, dorsipes, eutarsopolipus* and *tarsopolipus* from Iran. *International Journal of Acarology*, 33(3), 241–244.
<https://doi.org/10.1080/01647950708684528>
- Hanelt, B., Thomas, F., & Schmidt-Rhaesa, A. (2005). Biology of the phylum nematomorpha. *Advances in Parasitology*, 59(05), 243–305.
[https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(05\)59004-3](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(05)59004-3)
- Hansen, A. N., & De Fine Licht, H. H. (2019). Why are there so few examples of entomopathogenic fungi that manipulate host sexual behaviors? *Fungal Ecology*, 38, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.09.004>
- Hemptinne, J. L., Lognay, G., & Dixon, A. F. G. (1998). Mate recognition in the two-spot ladybird beetle, *Adalia bipunctata*: Role of chemical and behavioural cues. *Journal of Insect Physiology*, 44(12), 1163–1171. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(98\)00081-X](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(98)00081-X)
- Hodek, I., Honěk, A., Ceryngier, P., & Hodek, I. (1996). Enemies of Coccinellidae. *Ecology of Coccinellidae*, Hodek 1973, 319–350. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1349-8_8
- Hodek, I., Van Emden, H. F., Honěk, A. (2012). *Ecology and Behaviour of the Ladybird Beetles (Coccinellidae)*. Blackwell Publishing Ltd., UK.
- Howard, R. W., Jackson, L. L., Banse, H., & Blows, M. W. (2003). Cuticular hydrocarbons of *Drosophila birchii* and *D. serrata*: Identification and role in mate choice in *D. serrata*. *Journal of Chemical Ecology*, 29(4), 961–976.
<https://doi.org/10.1023/A:1022992002239>
- Hughes, D. P., Andersen, S. B., Hywel-Jones, N. L., Himaman, W., Billen, J., & Boomsma, J. J. (2011). Behavioral mechanisms and morphological symptoms of zombie ants dying from fungal infection. *BMC Ecology*, 11. <https://doi.org/10.1186/1472-6785-11-13>
- Hurst, G. D. D., Sharpe, R. G., Broomfield, A. H., Walker, L. E., Majerus, T. M. O., Zakharov, I. A., & Majerus, M. E. N. (1995). Sexually transmitted disease in a promiscuous insect, *Adalia bipunctata*. *Ecological Entomology*, 20(3), 230–236.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.1995.tb00452.x>
- Hyršl, P. (2018a). Imunita-Hmyzu-a-Dalsich-Bezobratlych-Zivocichu-1.živa 32–34. Nakladatelství Academia, SSČ AV ČR.

- Hyršl, P. (2018b). Imunita hmyzu a dalších bezobratlých živočichů 2 .živa 32–34. Nakladatelství Academia, SSČ AV ČR.
- Jokela, J., Dybdahl, M. F., & Lively, C. M. (2009). The maintenance of sex, clonal dynamics, and host-parasite coevolution in a mixed population of sexual and asexual snails. *American Naturalist*, 174(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1086/599080>
- Kaeslin, M., Pfister-Wilhelm, R., & Lanzrein, B. (2005). Influence of the parasitoid *Chelonus inanitus* and its polydnavirus on host nutritional physiology and implications for parasitoid development. *Journal of Insect Physiology*, 51(12), 1330–1339. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2005.08.003>
- Kenis, M., Roy, H. E., Zindel, R., & Majerus, M. E. N. (2008). Current and potential management strategies against *Harmonia axyridis*. *BioControl*, 53(1), 235–252. <https://doi.org/10.1007/s10526-007-9136-7>
- Ker, K. W., & Pickering, G. J. (2006). Biology and control of the novel grapevine pest – the Multicolored Asian Lady BIOLOGY AND CONTROL OF THE NOVEL GRAPEVINE PEST - THE. January, 991–997.
- Koch, R. L. (2003). The multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*: A review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts. *Journal of Insect Science*, 3(1971). <https://doi.org/10.1093/jis/3.1.32>
- Koch, R. L., Burkness, E. C., Wold Burkness, S. J., & Hutchison, W. D. (2004). Phytophagous preferences of the multicolored Asian lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae) for autumn-ripening fruit. *Journal of Economic Entomology*, 97(2), 539–544. <https://doi.org/10.1093/jee/97.2.539>
- Krasnoff, S. B., Watson, D. W., Gibson, D. M., & Kwan, E. C. (1995). Behavioral effects of the entomopathogenic fungus, *Entomophthora muscae* on its host *Musca domestica*: Postural changes in dying hosts and gated pattern of mortality. *Journal of Insect Physiology*, 41(10), 895–903. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(95\)00026-Q](https://doi.org/10.1016/0022-1910(95)00026-Q)
- Kubátová, A. (2017). Entomopatogenní houby – nerovný souboj. *Živa* 5/2017, 250-254. Nakladatelství Academia, SSČ AV ČR.
- Legrand, P., Vanderplanck, M., Lorge, S., Maesen, P., Lognay, G., Vilcinskas, A., Vogel, H., Estoup, A., Foucaud, J., Francis, F., Facon, B., & Verheggen, F. J. (2019). Cuticular hydrocarbon composition does not allow *harmonia axyridis* males to identify the mating status of sexual partners. *Entomologia Generalis*, 38(3), 211–224. <https://doi.org/10.1127/entomologia/2019/0552>
- Lewis, L. C., Berry, E. C., Obrycki, J. J., & Bing, L. A. (1996). Aptness of insecticides (*Bacillus thuringiensis* and carbofuran) with endophytic *Beauveria bassiana*, in suppressing larval populations of the European corn borer. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 57(1), 27–34. [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(95\)01011-4](https://doi.org/10.1016/0167-8809(95)01011-4)
- Losey, J. E., Allee, L. L., Stephens, E., Smyth, R. R., Priolo, P., Tyrrell, L., Chaskey, S., & Stellwag, L. (2014). Lady beetles in New York: Insidious invasions, erstwhile extirpations, and recent rediscoveries. *Northeastern Naturalist*, 21(2), 271–284. <https://doi.org/10.1656/045.021.0209>
- Lovett, B., & Leger, R. J. St. (2017). The Insect Pathogens. *The Fungal Kingdom*, 925–943. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0001-2016>
- Maitland, D. P. (1994). A parasitic fungus infecting yellow dungflies manipulates host perching behaviour. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 258(1352), 187–193. <https://doi.org/10.1098/rspb.1994.0161>

- Maure, F., Doyon, J., Thomas, F., & Brodeur, J. (2014). Host behaviour manipulation as an evolutionary route towards attenuation of parasitoid virulence. *Journal of Evolutionary Biology*, 27(12), 2871–2875. <https://doi.org/10.1111/jeb.12530>
- Maure, Fanny, Brodeur, J., Ponlet, N., Doyon, J., Firlej, A., Elguero, É., & Thomas, F. (2011). The cost of a bodyguard. *Biology Letters*, 7(6), 843–846. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2011.0415>
- Menzel, F., Blaimer, B. B., & Schmitt, T. (2017). How do cuticular hydrocarbons evolve? Physiological constraints and climatic and biotic selection pressures act on a complex functional trait. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1850). <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.1727>
- Michaud, J. P. (2002). Invasion of the Florida citrus ecosystem by *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) and asymmetric competition with a native species, *Cycloneda sanguinea*. *Environmental Entomology*, 31(5), 827–835. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-31.5.827>
- Moller, A. P. (1993). A fungus infecting domestic flies manipulates sexual behaviour of its host. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 33(6), 403–407. <https://doi.org/10.1007/BF00170255>
- Morris, J. J., Lenski, R. E., & Zinser, E. R. (2012). The black queen hypothesis: Evolution of dependencies through adaptive gene loss. *MBio*, 3(2), 1–7. <https://doi.org/10.1128/mBio.00036-12>
- Moser, S. E., & Obyrcki, J. J. (2009). Non-target effects of neonicotinoid seed treatments; mortality of coccinellid larvae related to zoophytophagy. *Biological Control*, 51(3), 487–492. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.09.001>
- Nalepa, C. A., & Weir, A. (2007). Infection of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) by *Hesperomyces virescens* (Ascomycetes: Laboulbeniales): Role of mating status and aggregation behavior. *Journal of Invertebrate Pathology*, 94(3), 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.11.002>
- Nedvěd, O. (2014). pomocník v biologické ochraně nebo ohrožení biodiverzity? Certifikovaná metodika pro praxi.
- OBATA, S. (1988). Mating refusal and its significance in females of the ladybird beetle, *Harmonia axyridis*. *Physiological Entomology*, 13(2), 193–199. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1988.tb00923.x>
- Obata, S., & Hidaka, T. (1987). Ejection And Ingestion Of The Spermatophore By The Female Ladybird Beetle, *Harmonia Axyridis* Pallas (Coleoptera:Coccinellidae). *The Canadian Entomologist, Department of Zoology, Faculty of Science, Kyoto Univ(606 Japan)*, 603–604.
- Omkar, & Pervez, A. (2005). Mating behavior of an aphidophagous ladybird beetle, *Propylea dissecta* (Mulsant). *Insect Science*, 12(1), 37–44. <https://doi.org/10.1111/j.1672-9609.2005.00006.x>
- Omkar, & Singh, S. K. (2010). Mating behaviour of the aphidophagous ladybird beetle *Coelophora saucia* (Coleoptera: Coccinellidae). *International Journal of Tropical Insect Science*, 30(1), 3–10. <https://doi.org/10.1017/S1742758409990403>
- Orlova-Bienkowskaja, M. J., Spiridonov, S. E., Butorina, N. N., & Bieńkowski, A. O. (2018). Coinvasion by the ladybird *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) and its parasites, *Hesperomyces virescens* (Ascomycota: Laboulbeniales) and *Parasitylenchus bifurcatus* (Nematoda: Tylenchida, Allantonematidae), in the Caucasus. *PLoS ONE*, 13(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202841>

- Park, T. (1948). Interspecies Competition in Populations of *Trilobium confusum* Duval and *Trilobium castaneum* Herbst Author (s): Thomas Park Source : Ecological Monographs , Vol . 18 , No . 2 (Apr . , 1948), pp . 265-307 Published by : Ecological Society of America Stab. Wiley on Behalf of the Ecological Society of America, 18(2), 265–307. <https://www.jstor.org/stable/1948641>
- Pedrini, N., Ortiz-Urquiza, A., Huarte-Bonnet, C., Zhang, S., & Keyhani, N. O. (2013). Targeting of insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: Hydrocarbon oxidation within the context of a host-pathogen interaction. *Frontiers in Microbiology*, 4(FEB), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00024>
- Perry, J. C., & Tse, C. T. (2013). Extreme costs of mating for male two-spot ladybird beetles. *PLoS ONE*, 8(12), 8–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081934>
- Poinar, G. O., & Steenberg, T. (2012). *Parasitylenchus bifurcatus* n. sp. (Tylenchida: Allantonematidae) parasitizing *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Parasites and Vectors*, 5(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-218>
- Poulin, R. (2010). Parasite Manipulation of Host Behavior: An Update and Frequently Asked Questions. In *Advances in the Study of Behavior* (1st ed., Vol. 41, Issue C). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0065-3454\(10\)41005-0](https://doi.org/10.1016/S0065-3454(10)41005-0)
- Reboredo, Guillermo and Camino, N. (2019). A new species of *Hexameris* Steiner , 1924 (Nematoda: Mermithidae) parasitizing *Epilachna paenulata*. 26(1), 21–26.
- Rhamhalinghan, M. (1986). Pathophysiological Effects on the Ovaries in *Coccinellimermis Rubtzov* (Nematoda: Mermithidae) infected *Coccinella septempunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae). Department of Zoology, Proc. Indian natn. Sci. Acad. B53 No1:pp 31-34.
- Rhule, E. L., Majerus, M. E. N., Jiggins, F. M., & Ware, R. L. (2010). Potential role of the sexually transmitted mite *Coccipolipus hippodamiae* in controlling populations of the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *Biological Control*, 53(2), 243–247. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.12.006>
- Riddick, E. W. (2010). Ectoparasitic mite and fungus on an invasive lady beetle: parasite coexistence and influence on host survival. *Bulletin of Insectology*, 63(1), 13–20.
- Romig, T., Lucius, R., & Frank, W. (1980). Cerebral larvae in the second intermediate host of *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) and *Dicrocoelium hospes* Looss, 1907 (Trematodes, Dicrocoeliidae). *Zeitschrift Für Parasitenkunde Parasitology Research*, 63(3), 277–286. <https://doi.org/10.1007/BF00931990>
- Roy, Helen E., Adriaens, T., Isaac, N. J. B., Kenis, M., Onkelinx, T., Martin, G. S., Brown, P. M. J., Hautier, L., Poland, R., Roy, D. B., Comont, R., Eschen, R., Frost, R., Zindel, R., Van Vlaenderen, J., Nedvěd, O., Ravn, H. P., Grégoire, J. C., de Biseau, J. C., & Maes, D. (2012). Invasive alien predator causes rapid declines of native European ladybirds. *Diversity and Distributions*, 18(7), 717–725. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2012.00883.x>
- Roy, Helen Elizabeth, Brown, P. M. J., Rothery, P., Ware, R. L., & Majerus, M. E. N. (2008). Interactions between the fungal pathogen *Beauveria bassiana* and three species of coccinellid: *Harmonia axyridis*, *Coccinella septempunctata* and *Adalia bipunctata*. *BioControl*, 53(1), 265–276. <https://doi.org/10.1007/s10526-007-9122-0>
- Saito, T., & Bjørnson, S. (2008). Effects of a microsporidium from the convergent lady beetle, *Hippodamia convergens* Guérin-Méneville (Coleoptera: Coccinellidae), on three non-target coccinellids. *Journal of Invertebrate Pathology*, 99(3), 294–301. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.08.005>

- Simmons, L. W., Alcock, J., & Reeder, A. (2003). The role of cuticular hydrocarbons in male attraction and repulsion by female Dawson's burrowing bee, *Amegilla dawsoni*. *Animal Behaviour*, 66(4), 677–685. <https://doi.org/10.1006/anbe.2003.2240>
- Sloggett, J. J., Magro, A., Verheggen, F. J., Hemptinne, J. L., Hutchison, W. D., & Riddick, E. W. (2011). The chemical ecology of *Harmonia axyridis*. In *BioControl* (Vol. 56, Issue 4, pp. 643–661). Kluwer Academic Publishers. <https://doi.org/10.1007/s10526-011-9376-4>
- Steele, T., & Bjørnson, S. (2014). *Nosema adaliae* sp. nov., a new microsporidian pathogen from the two-spotted lady beetle, *Adalia bipunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae) and its relationship to microsporidia that infect other coccinellids. *Journal of Invertebrate Pathology*, 115(1), 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.09.008>
- Steinkraus, D. C., Hajek, A. E., & Liebherr, J. K. (2017). Zombie soldier beetles: Epizootics in the goldenrod soldier beetle, *Chauliognathus pensylvanicus* (Coleoptera: Cantharidae) caused by *Eryniopsis lampyridarum* (Entomophthoromycotina: Entomophthoraceae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 148(February), 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.05.002>
- Susset, E. C., Hemptinne, J. L., Danchin, E., & Magro, A. (2018). Overwintering aggregations are part of *Hippodamia undecimnotata*'s (Coleoptera: Coccinellidae) mating system. *PLoS ONE*, 13(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197108>
- Tarla, G. (2020). *Hexameris* (Nematoda: Mermithidae) infecting coccinella septempunctata (Coleoptera: Coccinellidae) in overwintering areas in Turkey1. *Entomological News*, 129(1), 55–62. <https://doi.org/10.3157/021.129.0108>
- Thacker, J., R., M. (2002). *An Introduction to Arthropod Pest Control*. Cambridge University Press pp. 343, ISBN 0-521-56787-4. *Experimental Agriculture*, 39(3), 338-338. doi:10.1017/S0014479703301334
- Thaxter, B. R. (1890). On Some North American Species of Laboulbeniaceæ Author (s): Roland Thaxter Source : Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences , May , 1889 - May , Published by : American Academy of Arts & Sciences Stable URL : <https://www.jstor.org/stab.25>, 5–14.
- Thomas, F., Schmidt-Rhaesa, A., Martin, G., Manu, C., Durand, P., & Renaud, F. (2002). Do hairworms (Nematomorpha) manipulate the water seeking behaviour of their terrestrial hosts? *Journal of Evolutionary Biology*, 15(3), 356–361. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2002.00410.x>
- Thompson, J. N. (2010). Four Central Points about Coevolution. *Evolution: Education and Outreach*, 3(1), 7–13. <https://doi.org/10.1007/s12052-009-0200-x>
- Thrall, P. H., Antonovics, J., & Dobson, A. P. (2000). Sexually transmitted diseases in polygynous mating systems: Prevalence and impact on reproductive success. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 267(1452), 1555–1563. <https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1178>
- Trandem, N., Bhattarai, U. R., Westrum, K., Knudsen, G. K., & Klingen, I. (2015). Fatal attraction: Male spider mites prefer females killed by the mite-pathogenic fungus *Neozygites floridana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 128, 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.04.002>
- Van Lenteren, J. C., & Godfray, H. C. J. (2005). European science in the Enlightenment and the discovery of the insect parasitoid life cycle in the Netherlands and Great Britain. *Biological Control*, 32(1), 12–24. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2004.08.009>

- Vávra, J. (2017). Mikrosporidie : houby, co nevypadají jako houby, aneb Sestry říše Fungi ? Živa 5/2017, Nakladatelství Academia, SSČ AV ČR.
- Vilcinskas, A., Schmidtberg, H., Estoup, A., Tayeh, A., Facon, B., & Vogel, H. (2015). Evolutionary ecology of microsporidia associated with the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *Insect Science*, 22(3), 313–324. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12159>
- Volf, P., Horák, P., Čepička, I., Flegr, J., Lukeš, J., Mikeš, L., Svobodová, M., Vávra, J. (2007). Paraziti a jejich biologie. Nakladatelství Triton, Vykáňská 5, Praha 10.
- Votýpka, J., Modrý, D. (2018). Biologické invaze v nás i kolem nás: invazní patogeny. Živa 5/2018: 285-288. Nakladatelství Academia, SSČ AV ČR.
- Webberley, K. M., & Hurst, G. D. D. (2002). The effect of aggregative overwintering on an insect sexually transmitted parasite system. *Journal of Parasitology*, 88(4), 707–712. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[0707:TEOAOO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[0707:TEOAOO]2.0.CO;2)
- Webberley, K. M., Hurst, G. D. D., Husband, R. W., Schulenburg, J. H. G. V. D., Sloggett, J. J., Isham, V., Buszko, J., & Majerus, M. E. N. (2004). Host reproduction and a sexually transmitted disease: Causes and consequences of *Coccipolipus hippodamiae* distribution on coccinellid beetles. *Journal of Animal Ecology*, 73(1), 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2004.00769.x>
- Weslien, J., & Lindelow, A. (1990). Recapture of marked spruce bark beetles (*Ips typographus*) in pheromone traps using area-wide mass trapping. *Canadian Journal of Forest Research*, 20(11), 1786–1790. <https://doi.org/10.1139/x90-238>
- Wesołowska, W., & Wesołowski, T. (2014). Do *Leucochloridium* sporocysts manipulate the behaviour of their snail hosts? *Journal of Zoology*, 292(3), 151–155. <https://doi.org/10.1111/jzo.12094>
- Yanoviak, S. P., Kaspari, M., Dudley, R., & Poinar, G. (2008). Parasite-induced fruit mimicry in a tropical canopy ant. *American Naturalist*, 171(4), 536–544. <https://doi.org/10.1086/528968>