

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta životního prostředí

Katedra aplikované ekologie



Česká
zemědělská
univerzita
v Praze

Vliv kvality prostředí na kondici larev vážek

Effect of habitat quality on the body condition of dragonfly larvae

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Kateřina Bártová

Vedoucí práce: Mgr. Filip Harabiš, Ph.D.

2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Kateřina Bártová

Aplikovaná ekologie

Název práce

Vliv kvality prostředí na kondici larev vážek

Název anglicky

Effect of habitat quality on the of body condition of dragonfly larvae

Cíle práce

Ekologické pasti jsou taková prostředí, která se organismům zdají být optimální, přestože pro jejich život nemusí být zcela vhodná.

U vážek o osudu vodních larev rozhoduje terestrická samice. Existují nepřímé důkazy o tom, že v člověkem pozmeněném prostředí mohou samice často chybovat. Chybné rozhodnutí může vést přímo k mortalitě nebo ke snížení fitness.

Tato práce má za úkol zjistit, jaký vliv má kvalita prostředí vliv na jejich celkovou kondici larev. Bude se tedy zkoumat rozdíl v imunitě larev nakladených do skutečně vhodného prostředí a larev kladených do ekologických pastí.

Metodika

Na začátku experimentu bude na 10-ti lokalitách umístěno 30 experimentálních klíček s larvami. Postupně, během sezóny bude opakovaně (třikrát) odebrán vzorek 200 larev vážek (z každé lokality 20). V laboratoři se tedy bude postupně pracovat celkem s 600 larvami. Po označení bude každé larvě třeba opatrně odstranit 1 končetinu v oblasti kyčle a odebrat odtud tělní hemolymfu pomocí kapátka. Ta se smíchá v určitém poměru s fyziologickým roztokem a bude se zkoumat pod mikroskopem. Dle počtu pozorovaných buněk se pak určí imunita larev jednotlivých vážek.

Doporučený rozsah práce

30 stran + přílohy

Klíčová slova

Odonata, habitat quality, lipid contend, stress

Doporučené zdroje informací

- A. Córdoba- Aguilar (2008)- Dragonflies and Damselflies: Model Organisms for Ecological and Evolutionary Research
- B. A. Robertson, J. S. Rehage, A. Sih (2013)- Ecological novelty and the emergence of evolutionary traps
- J. Battin (2004)- When Good Animals Love Bad Habitats: Ecological Traps and the Conservation of Animal Populations
- R. Hale, S. E. Swearer (2017)- When good animals love bad restored habitats: how maladaptive habitat selection can constrain restoration
-

Předběžný termín obhajoby

2022/23 LS – FŽP

Vedoucí práce

Mgr. Filip Harabiš, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra ekologie

Konzultant

Anna-Marie Poskočilová

Elektronicky schváleno dne 28. 3. 2022

prof. Mgr. Bohumil Mandák, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 28. 3. 2022

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Děkan

V Praze dne 22. 03. 2023

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma: Vliv kvality prostředí na kondici larev vážek vypracovala samostatně a citovala jsem všechny informační zdroje, které jsem v práci použila a které jsem rovněž uvedla na konci práce v seznamu použitých informačních zdrojů. Jsem si vědom/a, že na moji bakalářskou 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 vědom/a, že odevzdáním bakalářské 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 30.03.2023

.....

Kateřina Bártová

Poděkování

Mé srdečné poděkování patří hlavně vedoucímu mé bakalářské práce Mgr. Filipu Harabišovi, Ph.D. za odborné rady a doporučení, ale také za velkou ochotu a trpělivost při vedení mé práce i v situacích, kdy jsem byla na vážkách.

Děkuji také své konzultantce Ing. Anně Marii Poskočilové za rady a laskavost při práci v laboratoři.

Abstrakt

Jednotlivé druhy si svá stanoviště vybírají podle určitých kritérií. Pokud tato kritéria splňují, habitat se pro ně stává atraktivním. Tato bakalářská práce se věnuje problematice ekologických pastí, kterými se stanoviště stávají, pokud jsou pro jedince atraktivní, a přesto pro ně představují nekvalitní místo pro život. Tyto pasti většinou vznikají lidskou činností. Cílem práce bylo zjistit, jaký vliv má kvalita prostředí na kondici larev vážky obecné (*Sympetrum vulgatum*), kterým jejich habitat vybírá terestrická matka při ovipozici. Vyhodnocení probíhalo na základě počtu imunitních buněk v jejich hemolymfě.

V teoretické části bylo shrnuto, že hlavními faktory ovlivňující kondici larev je predace, nedostatek potravy, znečištění a stres, který je zároveň důsledkem těchto faktorů a zároveň také příčinou snížení imunitních funkcí. Imunitní systém bezobratlých funguje jak na humorálních (látkových), tak na buněčných mechanismech, které jsou postaveny na buňkách zvaných hemocyty. Právě hemocyty zkoumá experimentální část této práce, a to konkrétně jejich koncentraci v hemolymfě larev pocházejících z různého prostředí. Pro výzkum bylo vybráno 10 lokalit v okolí Sokolovska, z nichž 5 mělo přírodní charakter a 5 představovalo rekultivovaná místa po těžbě hnědého uhlí. V laboratoři se pak počítalo množství hemocytů a granulocytů v hemolymfě larev z obou typů habitatů ve dvou termínech. Výsledky mé práce potvrdily předpoklad, že larvy z přirozených lokalit disponují větším počtem imunitních buněk, a to zejména granulocytů než larvy z rekultivovaných habitatů, u kterých byly navíc vyzorovány menší rozměry. Tyto rozdíly se projeví hlavně při druhém měření. Z této studie docházím k závěru, že kvalita prostředí má signifikantní vliv na kondici larev vážek a tento vliv se zvyšuje s délkou expozice danému prostředí.

Porozumění podobným mechanismům v přírodě je kritické pro ochranu živočichů a jejich prostředí. V návaznosti na tyto poznatky je možné utlumit vliv lidské činnosti vhodnými opatřeními a managementem stanovišť. Poznatky o imunitě bezobratlých je pak možné přispět k rozvoji medicíny a ochraně zemědělských plodin před škůdci.

Klíčová slova

Odonata, bezobratlí, parazitace, fagocytóza, fenoloxidáza

Abstract

Individual species choose their habitats according to certain criteria. If they meet these criteria, the habitat becomes attractive to them. This bachelor's thesis focuses on the topic of ecological traps. Habitats may become such a trap if they are attractive to individuals and yet represent a poor-quality place for them to live. These traps are mostly created by human activities. The aim of this study was to investigate the effect of environmental quality on the fitness of dragonfly (*Sympetrum vulgatum*) larvae, which inherit their habitat from their terrestrial mother during oviposition. The evaluation was based on the number of immune cells in their haemolymph.

The theoretical section of this work summarizes that the main factors affecting the fitness of larvae are predation, lack of food, pollution and stress, which is both a consequence of these factors and a cause of reduced immune function. The invertebrate immune system is based on both humoral and cellular mechanisms, which are based on cells called hemocytes. Hemocytes are investigated in the experimental section of this thesis, specifically their concentration in the haemolymph of larvae coming from different environments. Ten sites in the Sokolov region were selected for the research, 5 of which were natural and 5 were reclaimed sites after lignite mining. The amount of hemocytes and granulocytes in the haemolymph of larvae from both types of habitats collected on two dates was identified in the laboratory. The results of my work confirmed the assumption that larvae from natural sites possess a greater number of immune cells, especially granulocytes, than larvae from reclaimed habitats. In addition, larvae from reclaimed habitats were of smaller size. These differences were particularly evident in the second measurement. From this study, I conclude that environmental quality has a significant effect on the fitness of dragonfly larvae, and this effect increases with the prolonged duration of exposure to a given environment.

Understanding similar mechanisms in nature is critical for the conservation of animals and their environment. Building on this knowledge, it is possible to mitigate the impact of human activities through appropriate measures and habitat management. In addition, data concerning invertebrate immunity can contribute to the development of medicine and pest control.

Keywords

Odonata, invertebrates, parasitization, phagocytosis, phenoloxidase

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíle práce	2
3	Teoretická část	3
3.1	Životní cyklus	3
3.2	Výběr ovipozičního místa matkou	4
3.3	Ekologické pasti	5
3.4	Faktory ovlivňující kondici larev	6
3.4.1	Kompetice	6
3.4.2	Predace	6
3.4.3	Znečištění	8
3.4.4	Stres	9
3.5	Imunita hmyzu	12
3.5.1	Behaviorální obranné mechanismy	12
3.5.2	Vnější tělní bariéry	13
3.5.3	Rozpoznání mikroorganismů	14
3.5.4	Buněčná imunita	15
3.5.5	Humorální imunita	17
3.5.6	Adaptivní imunita u bezobratlých	20
4	Metodika	22
5	Výsledky	25
6	Diskuze	27
7	Závěr	29
8	Seznam použité literatury	30
8.1	Odborné publikace	30
8.2	Ostatní a internetové zdroje	35

1 Úvod

Lidská činnost má obrovský vliv na fungování přírody. Má za následek například fragmentaci a degradaci přírodní krajiny, zvyšování průměrné roční teploty a znečištění ovzduší i vodních ekosystémů. Vzhledem k rozsáhlosti těchto změn a rychlosti, s kterou se dějí, je nezbytné podrobně pochopit fungování ekosystémů v divočině i v urbanizovaných oblastech (Villalobos-Jiménez et al., 2016). Typ habitatu má zásadní vliv na kvalitu prostředí pro vývin vážek i ostatních živočichů. Larvální stádium je pro vážky kritické, jelikož téměř všechny druhy v něm stráví největší část života (McPeck, 2008). O tom, v jakých podmínkách bude larva žít, u vážek rozhoduje terestrická matka výběrem ovipozičního místa (Wildermuth, 1993). Díky efektům lidské činnosti však může narazit na fenomén zvaný ekologická past, kdy prostředí, které se jedinci na první pohled může zdát jako ideální, ve skutečnosti skrývá nástrahy vedoucí ke snížení jeho fitness (Schlaepfer et al., 2002).

Vážky jsou velmi citlivé na znečištění a změny teplot (Villalobos-Jiménez et al., 2016). Kromě toho na ně působí (obzvláště v nevhodném prostředí) také řada dalších faktorů ovlivňujících jejich kondici jako je např. stres, kompetice, predace a parazitace (McPeck, 2008). Strategie bezobratlých na obranu vůči patogenům a parazitům spočívá především v pevné vnější chitinové kostře, krátkém životním cyklu, velkém počtu potomků a také buněčném a humorálním imunitním systému (Hyršl, 2018b). Imunitní systém je jak tvárný, tak citlivý vůči stresu (Mangahas et al., 2019). Zprostředkování imunitní reakce je fyziologicky poměrně nákladné – jsou zapotřebí živiny a energie, které by jinak jedinec investoval do jiných fyziologických funkcí. Vysoká míra parazitismu má tak negativní dopady na fertilitu, fekunditu a délku života jedinců. Tento jev, kdy náklady na imunitní reakce mají negativní dopad na fitness se někdy označuje jako „metabolic fitness impacts“ (Beckage, 2009).

V této práci se věnuji vlivu kvality prostředí na kondici a imunitu larev vážky obecné. Vážka obecná (*Sympetrum vulgatum*) je druh z čeledi Libellulidae a vyskytuje se v téměř po celé Eurasii (Hinojosa et al., 2017). V experimentální části jsem se zaměřila na počet imunocytů v jejich hemolymfě jako ukazatel kvality imunitních funkcí.

2 Cíle práce

Cílem mé práce je představit problematiku ekologických pastí a jejich vliv na kondici potomstva. Mým záměrem je popsat, jaké faktory ovlivňují jejich celkovou kondici a imunitu, které se chci věnovat v závěru literární rešerše. Cílem experimentální části bylo určit, jaký vliv má kvalita prostředí larev vážek obecných na počet imunitních buněk v jejich hemolymfě. Úkolem bylo porovnat poměr hemocytů v hemolymfě larev pocházejících z přirozeného prostředí a larev pocházejících ze stanovišť rekultivovaných po těžbě hnědého uhlí.

3 Teoretická část

3.1 Životní cyklus

Životní cyklus vážek (Odonata) má 3 základní stádia – vajíčko, larvu a dospělce. Vajíčka samička klade do vodního prostředí (McPeck, 2008). Embryo přežívá 5-60 dní, pokud se vyvíjí přímo, nebo 80-200 dní pokud podstupuje diapauzu (Tennessee, 2009). Délka závisí především na konkrétním druhu a také na teplotě (Corbet, 1999).

Z vajíček se vylíhnou akvatické nebo semiakvatické larvy (McPeck, 2008). Počet larválních instarů se pohybuje mezi 9 a 17 podle konkrétního druhu, dostupnosti potravy a teploty. Většina druhů má mezi 11 a 13 instary, které jsou však velmi špatně odlišitelné, a navíc se jejich počet může lišit i mezi sourozenci. Nejdelší je poslední instar, který může trvat pět dní až rok (Tennessee, 2009). Larvy vážek jsou dravé a v některých ekosystémech mohou být i na vrcholu vodního potravního řetězce. Živí se jinými bezobratlými, a to převážně dvoukřídlými (Diptera). Někdy se jejich potravou mohou stát také vajíčka měkkýšů nebo některých obratlovců, jako jsou ryby nebo obojživelníci (Corbet, 1999; Tennessee, 2009). Dýchání pod vodou larvám různokřídlíc (Anisoptera) zajišťují rektální žábry a většině skupin stejnokřídlíc (Zygoptera) lupínkové žábry. Ty se později metamorfózou přemění na vzdušnice (Corbet, 1999). Na vývoj larev i vajíček mají zásadní vliv některé vlastnosti vodního prostředí. Z těch abiotických je to teplota, pH, obsah rozpuštěného kyslíku, rozpuštěné látky a vysychání. Působí zde však také biotické faktory, a to hlavně predace, kompetice, parazité a nemoci. Správné umístění vajíček tedy hraje zásadní roli nejen pro přežití larev, ale také pro jejich fitness (Crumrine et al., 2008; McPeck, 2008).

Dospělci vážek prochází dvěma obdobími – prerreprodukční a produkční. Vzácně také můžeme pozorovat kratičké postreprodukční období. Samičky často do reprodukční doby dospějí později než samci (Tennessee, 2009). Dospělá fáze trvá většinou jen pár dní. Najdou se však také druhy, které žijí až několik měsíců (většinou se jedná o druhy tropické). Různé druhy vážek můžeme nalézt v širokém spektru vodních stanovišť. Mohou osídlit jak velká jezera a řeky, tak např. i dendrotelmy, a to jak permanentní, tak i sezónní (McPeck). Téměř všechny druhy vážek mají za život více partnerů. Najdou se však i některé monogamní druhy. Většina druhů zplodí jednu nebo dvě generace do roka, mnoho vážek je však semivoltinních, a vývoj jedné generace jim trvá více jak rok (Tennessee, 2009).

3.2 Výběr ovipozičního místa matkou

Vážky, stejně jako řada jiných živočichů, mají různé nároky na strukturu prostředí pro vykonávání odlišných aktivit nezbytných pro jejich přežití, jako je shánění potravy, dospívání, odpočinek či reprodukce. Obzvláště důležitá je pak kvalita lokality pro umístění vajíček (proces habitat selection), jelikož ta přímo determinuje jejich šanci na přežití (Wildermuth, 1993). Patrně k tomu používají zrakové a hmatové vjemy (Crumrine et al., 2008). Bylo vyzorováno chování označované jako „water-touching“, kdy se vážky za letu lehce dotýkají substrátu pod nimi pro jeho lepší prozkoumání. Hlavním smyslem pro výběr místa na kladení vajíček je však zrak (Wildermuth & Spinner, 1991).

Ovipoziční místa samička vybírá podle několika faktorů, těmi jsou především polarizované světlo, rozměry vodní plochy a přítomnost i struktura vodní vegetace (Crumrine et al., 2008). Důležitá je také přítomnost jedinců stejného druhu a predátorů (Wildermuth, 1993), tu však vážky obecně nedokážou příliš dobře detekovat. (Harabiš & Dolný, 2012). Některé druhy vážek (například *Anax junius*) kladou vajíčka endofyticky čili dovnitř částí rostlin. Vodní flóra však nemusí mít vždy takto přímý vliv na vývin nebo vývoj jedinců. Poskytuje také více úkrytů pro larvy a snižuje tak pravděpodobnost predace (Crumrine et al., 2008). Různé druhy makrofyt také indikují různou strukturu vodního prostředí (Corbet, 1999). Zřejmě proto je přítomnost a struktura vegetace jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících výběr ovipozičního místa (Harabiš & Dolný, 2012), samice ve většině případů preferují tůňky pokryté mykrofyty před těmi, jenž jsou jimi obklopeny méně nebo vůbec (Wildermuth & Spinner, 1991). Vážky také obecně preferují větší plochy vodní hladiny před menšími (Wildermuth, 1993), existují ale i druhy, které výhradně preferují malé plochy, jako jsou louže a fytotelmy (Corbet, 1999).

Samotné kladení pak probíhá často na vodní hladině v blízkosti stonků rostlin, mechového podloží nebo bahna z rašeliny (Wildermuth & Spinner, 1991). Samička vajíčka z pravidla naklade rychleji, pokud je při ovipozici hlídána samcem. Fitness obou pohlaví se tímto tedy zvyšuje (Tennessee, 2009). U vážek bylo také vyzorováno jisté agregační chování. Přítomnost páru v tandemu často láká další jedince na to samé místo a stimuluje jejich páření a ovipozici (Martens, 1994).

Přes všechny tyto obecné poznatky je třeba brát v potaz, že různé druhy vážek preferují jiná stanoviště a typy vod (mají různé niky) (Wildermuth, 1993). Jednotlivé skupiny osidlují jak potoky a řeky všech velikostí, tak i stojaté vody jako jsou jezera, rybníky, mokřady i drobné fytotelmy, litotelmy a průsaky (Tennessee, 2009). Je tedy

zřejmé, že soubor znaků, podle kterých si vážky vybírají svá ovipoziční místa se mezidruhově nepatrně liší (Wildermuth, 1993).

3.3 Ekologické pasti

Při výběru vhodného prostředí se organismy řídí evolučními algoritmy (Darwinian algorithms), díky kterým jsou schopné rozpoznat určité podněty naznačující kvalitu prostředí, ve kterém eventuálně žijí a plodí potomstvo. Tyto evoluční algoritmy jsou adaptivní a mění se v rámci evoluce a životní historie druhu. Lidská činnost však mění přírodu s takovou rychlostí, že se organismy nedokážou včas adaptovat (Schlaepfer et al., 2002). Zmíněné podněty tak již nemusí být známkou vysoké kvality prostředí, nebo jedinec dokonce za tento podnět považuje něco jiného – zpravidla člověkem vytvořenou strukturu. Tato špatná vyhodnocení často dopadají tragicky, jelikož díky nim se organismy dostávají do ekologických pastí, které pro ně bývají fatální, ba někdy dokonce i příčinou zániku celých populací (Harabiš & Dolný, 2012). Ekologické pasti jsou součástí evolučních pastí, což je širší fenomén na stejném principu, jen se kromě výběru stanoviště vztahuje i na ostatní selekce v rámci životní historie, jako například výběr potravy, načasování migrace či rozmnožování, počet potomků, výběr partnera a podobně (Schlaepfer et al., 2002).

Vážky jsou při výběru vhodného stanoviště odsouzeny převážně na vizuální posouzení (Wildermuth & Spinner, 1991). Za indikátor kvalitního prostředí považují rozsáhlou a dobře strukturovanou makrofytní vegetaci, nedokážou však rozeznat vodní znečištění a dospělé vážky také neumí příliš dobře odhadnout přítomnost predátorů (Harabiš & Dolný, 2012). Vážky a jiní bezobratlí s vodními larvami (výjimkou je *Aedes aegypti*) rozpoznávají přítomnost vody pomocí horizontálně polarizovaného světla, které voda odráží (Kriska et al., 2009) a to i z větších vzdáleností (Harabiš & Dolný, 2012). Tato schopnost se nazývá pozitivní polarotaxe a vyskytuje se u nejméně 250 druhů vodních bezobratlých (Horváth & Kriska, 2008). Polarizované světlo však odráží také řada antropogenních struktur, jako jsou leštěné černé náhrobní kameny, asfalt, dehet, nádrže ropy a odpadního oleje (Horváth & Kriska, 2008), které mohou být pro některé druhy dokonce atraktivnější než samotná voda, jelikož odráží více polarizovaného světla (Wildermuth & Horváth, 2005), dále také tmavé skleněné povrchy, lesklé černé fotovoltaické solární panely (Kriska et al., 2009), panely z plexiskla (Horváth et al., 2007), povrchy aut (zejména černé a červené barvy) (Horváth & Kriska, 2008) a černé plastové plachty používané zejména v zemědělství na ukrytí úrody před deštěm a parazity (Bernáth et al., 2001). Všechny

tyto a mnohé další povrchy jsou součástí takzvaného „polarizačního světelného znečištění“ (Kriska et al., 2009).

V důsledku toho pak vodní bezobratlí na tyto povrchy sedají, zejména pak samičky, které se na ně pokouší naklást vajíčka (Horváth & Kriska, 2008), přestože mohou mít vhodná stanoviště nedaleko. To pro ně má často fatální dopady – obzvláště když se jedná například o ropné nádrže nebo asfaltové silnice (Schlaepfer et al., 2002). Bylo doloženo, že přírodní asfaltové výrony z dávné historie Země fungovaly jako podobné pasti. Tehdejší živočichové – zejména bezobratlí se do nich chytali v masovém měřítku a jejich pozůstatky jsou dnes důležitým paleontologickým materiálem (Horváth & Kriska, 2008). V tomto případě se však jedná o ekologickou past, jejíž vznik není způsobený antropogenní činností. Můžeme zde tedy uvažovat o pojmu „přírodní ekologická past“ či „přirozená ekologická past“ (Schlaepfer et al., 2002).

3.4 Faktory ovlivňující kondici larev

3.4.1 Kompetice

Larvy vážek bývají ve většině případů limitovány nedostatkem potravy díky kompetici s jedinci stejného druhu, nebo s jinými druhy na stanovišti (McPeck, 2008), což však téměř vždy bývají jiné druhy vážek. Velkou roli zde hraje velikost – větší larvy jsou kompetičně silnější, než larvy větší (Moore, 1964). Při interakci dvou larev můžeme často pozorovat agresivní chování a situace často dospěje až ke kanibalismu. Menší vážky se tak kompetici snaží vyhnout snížením své aktivity, což může vést k nižšímu příjmu potravy a problém se tak prohlubuje. Přítomnost větších jedinců stejného druhu, nebo jiných druhů vážek tedy vede ke snížení fitness (Buskirk, 1992). Při změnách způsobených člověkem – například znečištění a degradace ekosystémů, se také často stává, že ubývá specialistů, ale generalisté jsou mnohdy schopni se přizpůsobit. To dělá generalisty kompetičně silnější a tento efekt se tak prohlubuje právě kvůli kompetici (Villalobos-Jiménez et al., 2016).

3.4.2 Predace

Hlavní predátory larev předurčuje především prostředí, ve kterém se jednotlivé druhy vyskytují (McPeck, 2008). Obecně by se však dalo konstatovat, že dominantními predátory larev vážek jsou ryby, těsně za nimi jsou ptáci a na třetím místě pak případně obojživelníci (Corbet, 1999; McPeck, 2008). Dalšími mohou být plazi, vodní brouci, ploštice a jiné vážky (a to často stejného druhu) (Tennessen, 2009). Ryby si častěji vybírají větší larvy a bylo zjištěno, že vážky z podřádu

různokřídlic (Anisoptera) jsou loveny více druhy ryb a častěji než larvy z řádu stejnokřídlic (Zygoptera). Z ptáků bývají největšími predátory larev vážek ty druhy, které loví v mělkých sladkých vodách. Co se týče žab, vztah predátor-kořist je zde oboustranný, jelikož larvy vážek často predují na žabích vajíčkách a žáby pak v dospělosti loví jak larvy, tak i dospělé vážek. Vnitrodruhová predace se objevuje u všech druhů vážek kromě několika málo, ze kterých všechny patří mezi stejnokřídlice (Zygoptera)(Corbet, 1999; McPeck, 2008).

Během proměny jsou vážky také zranitelné vůči pavoukům. Predátory dospělých vážek mohou být (kromě skupin jmenovaných u larev) také např. dvoukřídlí, vosy a letouni. Dostupnost dospělců je však v průběhu roku omezená, a tak je jejich predátoři loví často například jen při krmení mláďat – např. ptáci (Corbet, 1999). Dospělé vážky se navíc mohou dostat do pastí masožravých rostlin, nebo se omylem zachytit o trny, úponky či lepkavé stonky jiné vegetace (Torralba-Burrial & Ocharan, 2007).

Obranné mechanismy, kterými larvy proti predaci bojují jsou využívání skrýší, strnulost, nebo také předstírání smrti. Larvy různokřídlic (Anisoptera) se navíc často brání bodavými pohyby zadečku. Pokud larvy jsou chyceny za tělní přívěsky, dokážou je odvrhnout a později regenerovat nové (Tennessen, 2009). V období, kdy vážky podstupují metamorfózu jsou k predaci obzvláště náchylné (Corbet, 1999). Neletální účinky způsobené predací popisuje kapitola (3.4.4.)

Parazitace

Vážky jsou hned po rovnokřídlych (Orthoptera) nejvíce napadaná skupina hromadinkami (Protozoa)(Corbet, 1999). Hostitel pozře jejich oocysty s potravou a uvolněné sporozoity se usadí ve střevě, kde započnou přijímat potravu pomocí osmózy (Hupało et al., 2014). Hromadinky larvám způsobují snížení obsahu tuku v těle, zhoršení létacích schopností (McPeck, 2008) a ve velkém množství mohou ucpat střední střevo vážky a způsobit tak její podvýživu nebo smrt (Corbet, 1999). Proti hromadinkám se vážky pravděpodobně brání spuštěním fenoloxidázové kaskády (viz. 3.5.5.) ve středním střevě (Forbes & Robb, 2008). Na infekci hromadinkami jsou zřejmě náchylnější stejnokřídlice (Zygoptera)(Corbet, 1999). Další parazité larev vážek jsou hlísti (Aschelminthes) a ploštěnci (Platyhelminthes), a to obzvláště motolice (Trematoda) a tasemnice (Cestoda)(Corbet, 1999; McPeck, 2008). Všechny skupiny jmenovaných parazitů mají složitý životní cyklus a larvy vážek slouží pouze jako jejich mezihostitelé. Definitivními hostiteli bývají často ptáci nebo někteří savci, kteří na larvách vážek predují (Corbet, 1999).

Dospělce mohou navíc také infikovat entomopatogenní houby, které jim často působí fatální mykózy a ektoparazitičtí vodní roztoči (Corbet, 1999). Roztoči se přisávají sací trubicí, která parazita začne zásobovat potravou z hemolymfy. Na to v ideálním případě reaguje imunitní systém hostitele melanickou enkapsulací (viz. 3.5.4.) sací trubice roztoče, což většinou způsobí jeho smrt. Na odolnost vůči parazitům má mimo jiné vliv také teplota při vývinu (Forbes & Robb, 2008).

3.4.3 Znečištění

Městské vodní toky jsou často uzpůsobené k odvádění dešťové vody do přírodních vodních toků a nádrží. Dešťová voda však odplavuje také odpadky, odpadní vody a odtoky ze silnic (Mangahas et al., 2019; Villalobos-Jiménez et al., 2016) a přírodní toky a nádrže jsou pak vystavené toxickým látkám, organickému znečištění (vč. organických hnojiv) a jiným naplaveninám. Navíc se také mění jejich teplota a pH (Shiddamallayya & Pratima, 2008; Villalobos-Jiménez et al., 2016).

Odpadní vody zanáší životní prostředí kovy, organickými i anorganickými hnojivy, pesticidy (Villalobos-Jiménez et al., 2016) a také farmaceutickými látkami včetně hormonů a antibiotik (Oertli, 2008). Tyto látky mohou být přímo toxické pro organismy včetně vážek. Těžké kovy se akumulují v jejich tkáních a vnější kostře. Pesticidy pak mohou způsobit pokles aktivity larev a tím také k snížení příjmu potravy (Villalobos-Jiménez et al., 2016) a také deformace a asymetrii těla (Oertli, 2008).

Znečištění odtoky ze silnic pak popisuje studie Mangahas et al. (2019), která konkrétně zkoumá působení vyplavených rozmrazovacích látek na larvy vážek. Výsledky této studie prokazují sníženou životaschopnost vodních organismů vystavených tomuto „zasolení“. To způsobuje například zvýšenou hladinu stresu, zhoršení kvality osmoregulace a sníženou odolnost vůči parazitům (Mangahas et al., 2019).

Některé efekty na kondici vážek jsou podobné pro znečištění pesticidy, hnojivy a rozmrazovacími soli. Vystavení larev rozmrazovacími látkami i po méně týden může znesnadnit spuštění buněčných imunitních reakcí proti cizím strukturám (Mangahas et al., 2019). Pokles imunitního systému často způsobují i pesticidy (Villalobos-Jiménez et al., 2016). V zasolené vodě je také méně rozpuštěného kyslíku, stejně jako ve vodě znečištěné hnojivy, které způsobují její eutrofizaci. Nedostatek kyslíku způsobuje ztížené dýchání organismů. Tracheální žábry, které larvy vážek využívají pro dýchání, jsou navíc při hypoxii velmi neefektivní. To celé vede k respiračnímu stresu (Mangahas et al., 2019; Villalobos-Jiménez et al., 2016).

Energii, kterou organismus vydá pro udržení homeostázi při znečištění, by jinak využil na jiné funkce (například na reprodukci), jak to bývá také u řady jiných ohrožujících faktorů. Pokud organismus nese následky tohoto znečištění a zároveň je vystaven jinému stresoru (např. v důsledku parazitace či predace), může to pro něj mít fatální následky (Oertli, 2008; Mangahas et al., 2019). Generalisté se tomuto znečištění mohou být schopni přizpůsobit, specializovaných druhů však v důsledku těchto změn ubývá (Villalobos-Jiménez et al., 2016). Kromě toho toto znečištění může snížit populace jiných druhů v ekosystému a narušit tak potravní řetězec, což má zpětně vliv i na larvy vážek, obzvláště pokud se sníží populace jejich kořisti (Shiddamallayya & Pratima, 2008).

3.4.4 Stres

Všechny popsané faktory mohou u jedinců vyvolat také stres. Stres můžeme popsat jako negativní působení fyzikálních, chemických nebo fyziologických vlivů, které aktivuje jednu nebo více složek imunitního systému. Stres může vyvolat narušení homeostázy, rozvrat fyziologických funkcí nebo dokonce i smrt. Dokážeme rozlišit mnoho typů stresu. Například stres teplotní, časový, stres vyvolaný parazitací, predací či změnou typu nebo dostupnosti potravy a také stres mechanický, způsobený poraněním (Hyršl, 2018a). V předchozí kapitole je také popsán stres respirační, ke kterému dochází při sníženém obsahu rozpuštěného kyslíku ve vodě (Mangahas et al., 2019). Typické stresory pro vodní larvy vážek jsou nedostatek potravy a predace (Stoks et al., 2008).

Hormony či neurohormony hmyzu, které jsou vylučovány během stresových situací, pomáhají připravit zásoby energie a podporují smyslové vnímání, podobně jako u obratlovců. Veškerá aktivita stresových hormonů závisí na konkrétním kontextu, stresoru, čase a koncentrací látek (Adamo, 2012). Některé stresory mohou jedince ovlivňovat nejen v životní fázi, v které se v daný moment nachází, ale také ve fázích pozdějších díky přenosným efektům. Stres, který zažívá larva, může mít tedy účinky ještě na dospělce. Některé efekty se dokonce mohou přenést i z matky na vajíčko (Villalobos-Jiménez et al., 2016).

Stres vyvolaný predací

Kromě samotného zabití jedince může mít přítomnost predátora také významný neletální účinek (Corbet, 1999). Larvy vážek jsou schopné vycítit přítomnost predátora pomocí chemických signálů, které vydávají buď samotní predátoři, nebo zranění jedinci stejného druhu či druhu ze stejné potravní guildy (Wisenden et al., 1997). Pokud se v prostředí larev vyskytuje nebezpečí predace, jsou zpravidla méně

aktivní a konzumují méně potravy. Často se však krmí po delší dobu, aby na konci dne přijmuly stejné množství. Přítomnost predace na ně má ovšem fyziologické dopady, které způsobují, že jsou méně schopné konvertovat požitou potravu ve vlastní biomasu. U některých druhů se tak tempo larválního růstu může snížit o více než 50% (McPeck, 2008).

Stres vyvolaný nedostatkem potravy

Dostupnost potravy často není tak velká, aby larvy vážek rostly maximální rychlostí. To je způsobené buď málo produktivním prostředím, nebo vysokou vnitrodruhovou, či mezidruhovou kompeticí (McPeck, 2008), která často vede k velké agresivitě, a dokonce i ke kanibalismu. Tomu se larvy snaží vyhnout, a tak v důsledku tohoto kompetičního stresu snižují svou aktivitu, nepřijímají tak tolik potravy a tempo jejich růstu se tak snižuje, stejně jako u stresu vyvolaného predací (Buskirk, 1992). Nedostatek potravy však nebývá příliš častou příčinou mortality (McPeck, 2008).

Teplotní stres

Vážky jsou poměrně citlivé na změny teplot. Pokud je jejich organismus vystaven stresu v důsledku nevyhovující teploty prostředí, může to na ně mít letální účinky. Teplota má totiž vliv na řadu fyziologických funkcí jako je termoregulace, metabolismus, dýchání, svalová činnost, reprodukce, vývoj (Villalobos-Jiménez et al., 2016) a také imunita, jelikož odolnost vůči vnějším parazitům ovlivňuje mimo jiné také teplota při vývinu (Forbes & Robb, 2008). Za zmínku také stojí to, že zvýšení teploty prostředí může způsobit vyschnutí vodní plochy (Villalobos-Jiménez et al., 2016) a způsobit tak organismu také časový stres (Stoks et al., 2008).

Časový stres

Časový stres (time stress) je způsobený sezonalitou, působí tedy na populace žijící na územích se sezonním klimatem. Jedinci pak musí dosáhnout určitého stádia před změnou podmínek, jako je například vyschnutí vodního habitatu nebo nástup zimního období (Stoks et al., 2008). Hmyz poznává časový posun v rámci období pomocí fotoperiody (Košťál, 2011). Časový stres se typicky projeví menší velikostí po metamorfóze nebo zrychlením vývinu (pokud je to možné), kdy energii, kterou larvy získají z potravy, nasměrují především na růst na úkor jiných funkcí. To má však mnoho důsledků. Tyto larvy jsou později více citlivé na hladovění, méně investují do tvorby imunocytů a také v dospělosti pomaleji reagují na predátory. Jedinci, na které v larválním stádiu působil časový stres také bývají méně úspěšní při hledání partnera (Stoks et al., 2008).

Kombinace stresorů

Obzvláště nebezpečné pro larvy je, když na ně působí více stresorů najednou (Stoks et al., 2008; Mangahas et al., 2019). Pokud se například spojí časový stres, na který larvy reagují zrychleným vývinem, se stresem z nedostatku potravy, tak se larva vyvíjet rychleji nemůže, jelikož na to nemá dostatek zdrojů. V takovém případě pak dochází naopak k vývinu pozdějšímu. Zajímavá je kombinace časového stresu a stresu predančního. Tyto omezení mají opět opačný efekt na životní strategie vážek – časový stres vývin urychluje, zatímco predanční stres ho zpomaluje. Pokud se tedy objevují zároveň, pozorujeme odlišné strategie mezi jednotlivými druhy. Každý druh si tak určuje, na jaké omezení je třeba reagovat prioritně (Stoks et al., 2008).

Stres a imunita

Je známo, že imunita je jak citlivá, tak přizpůsobivá vůči stresu (Mangahas et al., 2019). Stresové hormony ovlivňují imunitní funkce u korýšů, měkkýšů i u hmyzu. Tyto hormony se uplatňují především během „fight or flight“ reakce. (Adamo, 2012). „Fight or flight“ reakce probíhá během nebezpečí a je to okamžitá a automatická reakce organismu, při které buď dojde k tomu, že se jedinec začne bránit (fight), nebo zahájí útěk (flight)(Milosevic, 2015). Existuje velmi pravděpodobná hypotéza, že stresové hormony vyvolávají přetváření sítí, aby si jedinec zachovával optimální imunitu během změn probíhajících v organismu. Toto přetváření podporuje některé imunitní reakce a jiné zase potlačuje. To vše závisí na konkrétním kontextu vznikající stresové situace. Přítomnost receptorů pro stresové hormony a souvisejících vnitrobuněčných signálních drah naznačuje, že tento efekt je adaptivní a musí tak organismu přinášet zvýšení jeho fitness. (Adamo, 2012)

U bezobratlých (podobně jako u obratlovců) začíná akutní stresová reakce rychlým uvolněním biogenních aminů (dopamin, serotonin, histamin apod.). U hmyzu se konkrétně uvolňuje oktopamin (OA). Ten připravuje organismus na energeticky náročné úkony a podporuje svalové kontrakce a dlouhý let. Uvolňuje se lokálně do těch svalů, které jsou v dané situaci potřeba (Adamo, 2012; Baumann et al., 2009). OA má také značný vliv na hemocyty a dokáže navyšovat imunní reakce – např. fagocytózu (viz. 3.5.4.). Na druhou stranu může mít také efekty, které některé imunitní reakce zpomalují nebo znemožňují – například snižovat odolnost vůči některým bakteriím (Adamo, 2012). U některých druhů OA také navozuje behaviorální obranné mechanismy, jako je agresivní chování (Baumann et al., 2009). Po určité prodlevě organismus uvolní další neuroendokrinní faktor, což u bezobratlých bývá často peptid nebo protein – u hmyzu je to konkrétně peptid zvaný adipokinetický hormon (AKH), který zaktivuje zásoby energie (Adamo, 2012).

Co se týče chronického stresu, jeho efekty jsou vždy imunosupresivní čili potlačují imunitní reakce. Konkrétně snižují expresi genů kódujících některé látky zprostředkující imunitu, potlačují imunitní funkce a způsobují ztrátu rezistence na některé nemoci. Krátkodobý stres tedy může být nezbytný pro přežití jedince, ale z dlouhodobého hlediska stres způsobuje fyziologické změny způsobující hromadění toxických látek a vyčerpání zdrojů nezbytných molekul. Vztah stresu a imunity je navíc oboustranný – stres prokazatelně ovlivňuje imunitu a na druhé straně některé imunitní reakce způsobují vylučování stresových hormonů (Adamo, 2012; Horvath et al., 2013).

3.5 Imunita hmyzu

Imunitu definujeme jako soubor reakcí organismu na cizí struktury, nebo struktury vlastní, které byly nějakým způsobem pozměněné (Kučeráková, 2018). Bezobratlí živočichové mají na rozdíl od obratlovců pouze imunitu vrozenou (nespecifickou) a v průběhu života se jim již neformuje imunita adaptabilní (specifická). Před samotným napadením se hmyz může bránit určitými behaviorálními mechanismy (Siva-Jothy et al., 2005). Pokud se patogen, jeho části, nebo látky jim vylučované snaží dostat do těla hostitele, stojí před nimi soubor vnějších tělních bariér. Obranu proti vniklým patogenům jim pak zajišťuje kombinace buněčných mechanismů a látkových (humorálních) mechanismů (Hyršl, 2018a). Buněčná a humorální složka se však velmi často prolíná (D. Li et al., 2002). Stejně jako u obratlovců můžeme i u bezobratlých imunitu rozlišovat také podle lokalizace v těle – slizniční imunita, imunita střeva, imunita dýchacího systému, pohlavních orgánů apod. (Hyršl, 2018a). Bylo vypořádáno, že imunita u larev řady druhů je nejúčinnější v posledním larválním instaru. To je pravděpodobně zapříčiněno poklesem juvenilního hormonu (JH), který má negativní účinky na indukci exprese genu kódujícího antimikrobiální peptidy (viz. 3.5.5.) (Beckage, 2009).

3.5.1 Behaviorální obranné mechanismy

Obrana pomocí určitého chování je první překážkou, kterou musí patogen zdolat pro to, aby byl úspěšný (Schmid-Hempel, 2005). U ostatních skupin živočichů se můžeme setkat například s ptačím popelením nebo s vybíráním parazitů, které je známo například u primátů nebo některých ryb. Tyto adaptace jsou u bezobratlých poměrně málo prostudovány, přesto známe řadu impozantních mechanismů, kterými bezobratlí snižují risk parazitace (Siva-Jothy et al., 2005).

Jedním z nich je například přesun nebo disperze směrem od skupin či populací s převahou napadených jedinců. Tento jev je velmi účinný a zároveň jednoduchý. Dalším je takzvaná „behaviorální horečka“ (behavioral fever), při které jedinec vědomě zvyšuje svou teplotu, čímž znevýhodňuje parazita, který již nemá vhodné podmínky pro invazi. Tato adaptace bývá často specificky mířená na konkrétní druh parazita (Adamo, 1998; Siva-Jothy et al., 2005). Zajímavou behaviorální obranu používají cvrčci. Samci hlasovými projevy lákají samičky, mohou jimi však zároveň přilákat i některé parazitoidy (zejména masařky a kuklice) (Kolluru, 1998). Někteří cvrčci se řídí principem trade-off a buď hlasitost svých projevů nesnižují, ale zvyšují tak riziko parazitace, anebo své projevy tlumí či vůbec neprovozují a snižují tak šanci na předání svých genů. Najdou se však samci, kteří tento princip obejdou tím způsobem, že se zdržují v blízkosti zpívajícího samce a v okamžiku, kdy se přiblíží samička, využijí příležitosti a spáří se s ní (Siva-Jothy et al., 2005).

Další soubor behaviorálních jevů pak označujeme jako sociální imunita. Sociální imunita je typ imunitního systému, který se vyvinul u sociálního hmyzu a jedná se o formu vzájemné spolupráce, která vede k potlačení pravděpodobnosti infekce nebo přenosu patogenů (Schmid-Hempel, 2017). Zahrnuje jednoduché mechanismy, jako je čištění jedinců či hnízda, ale také složitější úkony, jako je vytváření antimikrobiálních látek (případně jejich sběr po okolí) a jejich následné předávání mezi zdravými a nakaženými živočichy. Další impozantní jev, který v rámci sociální imunity můžeme pozorovat je trofolaxe. Trofolaxe je jednostranné nebo oboustranné předání zažívacího traktu, a to buď ústním nebo řitním otvorem. Předání ústy se nazývá stomodeální trofolaxe a předání řitním otvorem je trofolaxe proktodeální. Tento mechanismus využívají například mravenci. (Hyršl, 2018b)

3.5.2 Vnější tělní bariéry

Druhou překážkou pro nepřátelské organismy jsou vnější tělní bariéry. Ty zajišťují ochranu před poškozením tkání, které by způsobilo ztrátu tělních tekutin a vstupu patogenů (Homolová, 2008). Díky velké různorodosti skupin bezobratlých jsou i jejich vnější bariéry velmi variabilní. Hmyz chrání převážně pevná kutikula. U jiných skupin se objevují také například ulity, lastury, sliz apod. (Hyršl, 2018a).

Kutikula je pevná, pružná a vodotěsná struktura na povrchu těla. Vznikla z bazálních epidermálních buněk a může být pokryta mikrobiálním biofilmem (Siva-Jothy et al., 2005). Pokrývá povrch těla hmyzu a také povrch jejich trávicí soustavy. Zároveň slouží jako „kostra“ pro uchycení svalů (Andersen, 2009). Její síla spočívá v procesech zvaných sklerotizace a melanizace. Oba procesy vedou k zesíťování

proteinů a jejich základní enzymy jsou také složky vnitřní imunity, což značí jistou propojenost s hemolymfou. Kutikula se skládá z epikutikuly, exokutikuly a endokutily, přičemž souhrnné označení pro exokutikulu a endokutikulu je prokutikula.

Epikutikula je zpravidla velmi tenká, ale poměrně komplexní. Neposkytuje téměř žádnou fyzikální bariéru (jen výjimečně může být tvořena silnou vrstvou vosku – např. u červců), pravděpodobně však vykazuje značnou antimikrobiální aktivitu (Siva-Jothy et al., 2005). Na epikutikulu navazuje prokutikula. Prokutikula obsahuje kanálky, které zajišťují propojení s okolním prostředím. Je díky své struktuře a obsahu chytinu velice účinná (Andersen, 2009). Jediná skupina entomopatogenů, která je schopna ji přímo proniknout jsou houby. Úspěšnost obrany proti entomopatogenním houbám závisí zejména na tloušťce a míře sklerotizace kutikuly.

Kutikula také zajišťuje biochemickou bariérní obranu, byla v ní zaznamenána antimikrobiální aktivita a aktivita enzymu fenoloxidáza (Siva-Jothy et al., 2005). Fenoloxidáza je součástí procesů vedoucích k melanizaci, která je schopna zneškodnit patogeny (včetně entomopatogenních hub)(Schmid-Hempel, 2005). Není však jednoznačné, zdali tento enzym nemá pouze strukturální funkci v kutikule. V každém případě je jeho úkolem obrana proti patogenům.

Části, kde by patogeny mohly mít větší šanci na proniknutí, jsou například chemoreceptory, střední střevo, malpigické trubice nebo reprodukční orgány při kopulaci. Nejméně chráněné je však střední střevo, jelikož je s potravou neustále vystaveno strukturám, které nejsou tělu vlastní (Siva-Jothy et al., 2005) a je potaženo pouze tenkou kutikulární peritrofickou membránou, která zajišťuje vstřebávání živin do těla. Tento povrch je však imunologicky aktivní produkuje například obranné peptidy. (Terra & Ferreira, 2009)

3.5.3 Rozpoznání mikroorganismů

Samotné imunitní reakci předchází rozpoznání mikroorganismů v těle. To probíhá pomocí receptorů PRRs (Pattern Recognition Receptors)(Schmid-Hempel, 2005). PRRs jsou peptidy nacházející se volně v tělní tekutině nebo na povrchu buněk (Hyršl, 2018a). Jejich hlavním úkolem je rozpoznat charakteristické struktury na povrchu patogenů, nebo patogeny vylučované (Schmid-Hempel, 2005). Souhrnně je označujeme jako PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns), případně MAMPs (Microbe-Associated Molecular Patterns).

PAMPs jsou různorodé molekuly, mohou to být například proteiny, glykoproteiny, oligosacharidy, lipidy a motivy nukleových kyselin. Do těla bezobratlých se však

mohou dostat také mikroorganismy, které nejsou patogeny, ale přesto vylučují PAMPs. Pro organismus jsou neméně nebezpečné, přestože hostitelské buňky přímo nepoškozují (Hyršl, 2018a). Buňky díky nim umírají, jelikož jsou stresované a následně podstupují nekrózu (smrt). Imunitní systém organismy vyhodnotí jako nebezpečné až poté, co zanikající buňky vyloučí vzory, které označujeme jako DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns), mezi které patří například aktin (Srinivasan et al., 2016).

PRRs rozpoznávají vzory PAMPs, MAMPs a DAMPs buď pomocí jejich nespecifických vlastností, jako je povrchový náboj, hydrofobicita a další, nebo specifických antigenních molekul jako jsou lektiny (sacharidové vazebné bílkoviny vyskytující se v hemolymfě a tkáních bezobratlých) nebo složek fenoloxidázové kaskády (viz níže). Jakmile jsou tyto molekuly rozpoznány pomocí příslušných PRRs, spustí se vnitrobuněčné signální dráhy a zvýší se exprese efektorů zprostředkujících buněčnou a humorální imunitní odpověď. (Homolová, 2008; Hyršl, 2018a).

3.5.4 Buněčná imunita

Po rozpoznání cizorodých látek přichází na řadu samotná buněčná imunita. Tu zprostředkovávají pouze buňky, a to konkrétně imunocyty. Imunocyty jsou volné buňky a dělíme je na hemocyty, které cirkulují v hemolymfě, a coelomocyty, které se pohybují v coelomové tekutině (Hyršl, 2018a). Hemocyty se mohou uplatnit i při imunitě humorální. Konkrétní imunitní reakce, na kterých se hemocyty podílejí jsou fagocytóza, enkapsulace, nodulace a hojení ran. Tyto reakce zamezují ztrátě tělní tekutiny a vniknutí cizorodých látek do organismu (Homolová, 2008; Beckage, 2009).

Při aktivaci imunitní reakce mohou být také kromě těchto volně cirkulujících buněk k dispozici fixní buňky, které se nacházejí v blízkosti orgánů a kutikuly, odkud se v případě potřeby uvolní. Na počet a aktivitu volně cirkulujících buněk má vliv kromě celkového fyzického stavu a stáří jedince (případně vývojové stádium) také neuroendokrinní systém a působení humorálních faktorů (Hyršl, 2018a).

Morfologie imunocytů je velmi složitá a rozmanitá, a tak je jejich klasifikace doposud nejednoznačná. Nejčastěji se však odlišují granulocyty, prohemocyty, plasmatocyty, koagulocyty, sférolocyty a oenocyty (Hyršl, 2018a; D. Li et al., 2002). Zastoupení jednotlivých typů buněk se liší u jednotlivých skupin bezobratlých (Beckage, 2009). Přehlednější klasifikace je tak podle jejich funkce na buňky fagocytující, hemostatické, pigmentové, nutritivní a progenitorové. Čtyři základní imunitní aktivity jsou pak fagocytóza, enkapsulace, nodulace a koagulace. Koagulace probíhá navíc s pomocí humorálních faktorů (Homolová, 2008; Hyršl, 2018a). Pro tuto

práci jsou důležité především granulocyty, které se řadí mezi fagocyty a jsou tedy u některých druhů schopny fagocytózy. Granulocyty obsahují vezikuly a granula, což jsou vnitrobuněčné váčky (Siva-Jothy et al., 2005).

Fagocytóza

Fagocytóza je základní a nejdůležitější funkce imunitního systému eukaryotních organismů a provádí jí všechny skupiny bezobratlých. Slouží k pohlcení malého množství cizorodého materiálu a u živočichů s otevřenou cévní soustavou jí provádí hemocyty. U hmyzu to bývají konkrétně granulocyty a plasmacyty (Hyršl, 2018a; Schmid-Hempel, 2005). Při likvidaci patogenů se pak uplatňuje proces zvaný „oxidační vzplanutí“, vyvolaný nedostatkem kyslíku při zvýšené buněčné aktivitě. Při oxidačním vzplanutí se vytváří toxické látky – reaktivní kyslíkové metabolity (RKM), které patogen uvnitř fagolysozomu zneškodní. Pokud však dojde k nahromadění RKM, může dojít k tzv. oxidačnímu stresu, což vede k poškození proteinů, lipidů a nukleových kyselin, které následně poškozuje hostitele. Tento jev vyvolávají např. látky znečišťující životní prostředí nebo chemické pesticidy. U bezobratlých jsou však účinky RKM zatím velmi neprobádané. (Homolová, 2008; Hyršl, 2018a; Kučeráková, 2018)

Nodulace

Nodulace naopak slouží k obraně při vniknutí většího množství patogenů menší velikosti. Kolem cizorodého materiálu (např. bakterie) se začnou agregovat hemocyty/coelomocyty do mnoha vrstev (20-30) a vytvoří tak takzvanou noduli (Hyršl, 2018a; Kučeráková, 2018). Nodule tak zabrání dalšímu šíření patogenu a hemocyty zároveň produkují látky toxické pro patogeny. Uplatňují se také složky humorální imunity, jako je fenoloxidázová kaskáda (viz. 3.5.5.), která vede ke tvorbě melaninu. Mikroorganismy v nodulích hynou, nebo v nich mohou přežívat po celý život hostitele. Míra, v jaké jsou bezobratlí schopni provádět nodulaci se liší podle jednotlivých skupin. Například octomilka, která je hojně používaná v laboratořích, se vyznačuje přirozeně nízkou nodulační aktivitou (Homolová, 2008; Hyršl, 2018a; Beckage, 2009).

Enkapsulace

Velmi podobným imunitním procesem je enkapsulace. Stejně jako u nodulace se jedná o izolaci patogenu od vlastních tkání hostitele. Enkapsulace však slouží k obraně proti větším organismům, které jsou příliš velké na pohlcení hemocyty/coelomocyty. Těmi mohou být například prvoci, hlísti, vajíčka či larvy parazitů, nebo dokonce umělý materiál (např. sklo apod.). Enkapsulací se tvoří buněčné valy, které parazita oddělí od přístupu živin a případně ho vystaví působení

melanizace nebo reaktivních metabolitů kyslíku a dusíku (Hyršl, 2018a; Beckage, 2009). Ve výjimečných případech může být enkapsulovaný parazit vyloučen do vrstev kutikuly a následně svlečen při ekdyzi („cuticular encystment“)(Beckage, 2009). Reaktivní kyslíkové a dusíkové metabolity mohou melanizaci podporovat, nebo se na likvidaci patogenů podílet přímo (Kučeráková, 2018). Také rozlišujeme enkapsulaci buněčnou a humorální, přičemž humorální enkapsulace probíhá u druhů s malým počtem cirkulujících buněk (Hyršl, 2018a). Nodulace i enkapsulace mohou probíhat současně, a to i jako reakce na ten samý patogen. Je tak často obtížné od sebe tyto procesy odlišit (Homolová, 2008).

Regulace buněčné imunity

Buněčnou imunitu reguluje řada faktorů. Nejvýznamnějšími jsou růstové regulátory, hormony (např. ekdyson) a metabolity. Z metabolitů jsou to např. eikosanoidy (okysličené deriváty nenasycených mastných kyselin – např. kyselina arachnidová), které se uplatňují při antioxidantních mechanismech regulujících tvorbu RKM při oxidačním stresu. Kromě regulace buněčné imunity se uplatňují také při vychytávání bakterií z hemolymfy při infekci, fagocytóze, nodulaci a také při aktivaci některých humorálních mechanismů. Eikosanoidy mají také své inhibitory biosyntézy (u savců např. aspirin nebo ibuprofen). (Hyršl, 2018a)

3.5.5 Humorální imunita

Podíl patogenů, které pronikly do těla bezobratlého živočicha přes mechanické bariéry a nebyly odstraněny buněčnými složkami imunity je velice nepatrný. Některé zdroje uvádějí, že je v řádu sekund fagocyty odstraněno až 99,5% těchto mikroorganismů. Teprve zbývající část má za úkol zlikvidovat humorální imunita (Hyršl, 2018b).

Humorální neboli látková imunita je u bezobratlých zprostředkovávána různými, pro patogeny toxickými, molekulami a také procesy zvanými fenoloxidázová kaskáda a koagulační kaskáda, kdy se humorální imunita prolíná s buněčnou (D. Li et al., 2002; Beckage, 2009). Molekuly humorální imunity jsou například lysozym, lektiny, aglutininy a antibakteriální a regulační peptidy a jiné. Nachází se v cirkulující coelomové tekutině a hemolymfě, nebo jsou produkovány lokálně v tkáních – mohou být například složkou sekretů (typicky slizu) nebo bariérních antimikrobiálních mechanismů na povrchu kutikuly. Tyto molekuly a složky koagulační a fenoloxidázové kaskády jsou buď vytvářeny pouze při infekci (typicky baktericidní peptidy), nebo jsou v organismu neustále (konstitutivně) přítomny a jejich koncentrace se výrazně zvyšuje v případě stresových situací. To jsou například lektiny, lysozym, hemolin,

aglutininy nebo také profenoloxidáza (neaktivní prekurzor enzymu fenoloxidáza). Zastoupení těchto molekul se mění v průběhu vývoje jedince a ve stresových situacích, jako je poranění, setkání s patogenem a podobně (Dunn, 1990; Hyršl, 2018b).

Lysozym

Zcela základní humorální složkou imunity je enzym lysozym řadící se mezi lyziny. Lysozym se nachází především v sliznicích, slinách, mateřském mléce a krevní plazmě obratlovců a tělních tekutinách a sekretech bezobratlých. Lysozym velice účinně ničí buněčné stěny bakterií, je to tedy tkz. baktericidní faktor (Hyršl, 2018b; Kanost, 2009). Takto však působí pouze na grampozitivní bakterie, gramnegativní bakterie mají odlišnou stavbu buněčné stěny a lysozym tak dokáže pouze bránit jejich růstu a množení – působí na ně bakteriostaticky (Hyršl, 2018b).

Antimikrobiální peptidy (AMP)

Další důležitou složkou jsou antimikrobiální peptidy (AMP). Existuje jich široká škála s odlišným působením a jejich zastoupení v organismu se odvíjí od konkrétních taxonů, vývojových stádií i zdrojů nákazy. U bezobratlých byly popsány pouze u malého množství druhů (Hyršl, 2018b; Y. Li et al., 2012). Tyto poznatky by však mohly vést ke značnému posunu v lékařské medicíně, jelikož řada AMP může mít protinádorové či antibiotické účinky. Antimikrobiální peptidy se většinou rozdělují podle struktury a chemické stavby. Také se často pojmenovávají podle taxonu, z kterého byly izolovány, např. diptericyny od Diptera (dvoukřídílí) (Hyršl, 2018b; Beckage, 2009). Syntéza AMP je tkáňově specifická a její aktivace je u hmyzu prozatím nejlépe popsaným poznatkem týkajícím se této humorální složky. Aktivační systém syntézy AMP má 2 signální dráhy (Toll a IMD – imune deficiency), které řídí syntézu menších kladně nabitých antimikrobiálních peptidů. Ty pak působí proti bakteriím, virům a houbám (Hyršl, 2018b). První signální dráha nese název „Spaetzle-Toll“ a je aktivována primárně při infekci houbami a grampozitivními bakteriemi. Druhá dráha se označuje jako „Imd“ a aktivuje jí infekce gramnegativních bakterií (Schmid-Hempel, 2005). AMP s baktericidními účinky vždy působí pouze na grampozitivní nebo pouze na gramnegativní bakterie a na opačný typ mají pouze bakteriostatický účinek (Hyršl, 2018b).

Lektiny a aglutininy

Po ATP je další humorální složkou skupina proteinů zvaných lektiny. Lektiny se uplatňují již při rozeznávání vniklých mikroorganismů do těla a to tak, že hydrofobně vážou specifické glycidy (Arcier, 1986). Dokážou rozeznat patogeny a parazity

a zároveň se podílejí na jejich likvidaci. Jejich syntéza u hmyzu probíhá v tukovém tělese, a to po zranění, bakteriální infekci nebo během metamorfózy. Dobrým příkladem lektinu je limulin, který byl izolován z ostrorepa a využívá se při testování lékařského materiálu na bakteriální kontaminace (Hyršl, 2018b).

Některé látky patří zároveň mezi lektiny a zároveň mezi aglutininy. Aglutininy jsou téměř neprobádaná skupina proteinů, které lze nalézt v tělní tekutině, hlenu a na povrchu těla převážně vodních, ale také suchozemských bezobratlých. Jsou schopny vyvolat aglutinaci (shlukování) antigenu zvaný aglutinogen, který se nachází na povrchu bakterií, virů, spermií a dalších buněk. Působí také opsonizačně (Hyršl, 2018b; Arcier, 1986), čili navazují na antigen částice, díky kterým se usnadňuje navázání na fagocyty a dochází tak ke zvýšení efektivity fagocytózy (Griffin JR, 1977). Oba procesy provádí proti jednotlivým patogenům s různou intenzitou. Aglutininy také mohou aktivovat profenoloxidázu a tím nastartovat fenoloxidázovou kaskádu (viz níže). Navíc se účastní procesů nodulace a enkapsulace (Hyršl, 2018b).

Koagulační kaskáda

Velký význam mají také proteolytické kaskády – koagulační a fenoloxidázová. Koagulační kaskáda je proces, k jehož aktivaci dochází po poranění téměř u všech živočichů. Jedná se o srážení tělní tekutiny, které následně zabrání úniku hemolymfy či coelomové tekutiny a případné infekce. U bezobratlých probíhá tak, že nejdříve dojde poraněním ke stimulaci hemocytů a coelomocytů, které se následně rozpadají a uvolňují faktory koagulační kaskády – např. srážecí proteiny koagulocyty (koagulogeny hemocytů a coelomocytů). Tímto spojením buněčné a humorální imunity se proces aktivuje (Hyršl, 2018b; Beckage, 2009). Další faktory koagulační kaskády se nachází v plazmě a jsou to proteiny sekretované vnitřními orgány (např. tukovým tělesem u hmyzu). Dále jsou zapotřebí transportní proteiny (lipoforiny), hexameriny, jejich receptory a další srážecí faktory (hemolektin). Jedním z úkolů těchto látek je také vytvořit substrát pro enzym transglutamináza, který provazuje koagulační proteiny (tvoří vazby mezi glutaminem a lyziny – např. lysozym) a vzniká tak potřebná sraženina (Hyršl, 2018b). Transglutamináza je závislá na iontech vápníku a také katalyzuje proces polymerizace (spojování molekul). Koagulační kaskáda je u řady bezobratlých propojena také s fenoloxidázovou kaskádou. Enzym fenoloxidáza totiž přispívá k zesíťování proteinů, likvidaci patogenů a melanizaci v „zátce“, která v místě poranění následně vzniká (Dobeš, 2009). Zastoupení koagulačních proteinů a konkrétních procesů se liší mezi jednotlivými skupinami členovců, obecně se však vždy jedná o enzymaticky řízený kaskádový proces od srážecích proteinů po nerozpustný gel koagulin (Hyršl, 2018b).

Fenoloxidázová kaskáda

Druhá důležitá proteolytická kaskáda je fenoloxidázová kaskáda. Ta je doložena u měkkýšů, korýšů a hmyzu vyjma klíšťat. U ostatních skupin bezobratlých chybí, nebo prozatím není známa (Hyršl, 2018b). U hmyzu je však tento proces velice důležitou částí imunity – jako jedna z prvních reaguje v organismu na patogeny a bez ní navíc může dojít k poruše ve vývoji jedince, protože enzym fenoloxidáza je mimo jiné také zodpovědný za správnou tvorbu kutikuly (Dobeš, 2009; Andersen, 2009). Fenoloxidázová kaskáda má však mnohem více funkcí. Má na starosti také shlukování vniklých bakterií, enkapsulaci, tvorbu nodulí, agregaci antigenu a opsonizaci. Celý proces je aktivován třemi způsoby – poraněním, složkami bakteriálních stěn nebo spuštěním jiné imunitní reakce (Hyršl, 2018b), což způsobí přeměnu profenoloxidázy na fenoloxidázu pomocí proteolytických enzymů. Výsledkem celé kaskády je melanizace (přeměna zbytků aminokyseliny tyrozinu na polymer melanin za vzniku tmavého pigmentu)(Beckage, 2009).

Na regulaci výše zmíněných proteolytických kaskád se podílejí serinové proteázy, což jsou enzymy, které štěpí peptidové vazby na místech, kde se nachází aminokyselina serin, tvořící jednu ze základních stavebních složek proteinů. Serinové proteázy jsou pak regulovány inhibitory, kterých bylo u hmyzu popsáno hned několik. U těchto inhibitorů bylo zároveň prokázáno, že také regulují proteázy některých houbových patogenů. Ze skupiny proteáz mají na imunitu hmyzu vliv také metaloproteázy – proteolytické enzymy, jež potřebují ke své aktivitě kov. Patogeny tyto enzymy produkují pro usnadnění jejich invaze. Inhibitory metaloproteáz však nebyly prozatím dostatečně prozkoumány (Hyršl, 2018b; Beckage, 2009).

3.5.6 Adaptivní imunita u bezobratlých

Přestože bezobratlí nedisponují adaptivní imunitou, řada druhů si vyvinula mechanismy, které ji mohou připomínat a podobat se působení protilátek a komplementového systému obratlovců (Hyršl, 2018b). Jsou tedy schopni imunizace čili snižování citlivosti k nákaze při opakovaném setkání se stejným parazitem (Schmid-Hempel, 2005). Imunizace zde funguje na základě specifity (která je však založena na konkrétním vztahu parazita a hostitele, nikoliv na produkci protilátek, jak je to u obratlovců) a imunitní paměti. Přinejmenším krátkodobá imunitní paměť byla prokázána u hmyzu (Insecta), houbovců (Porifera), žahavců (Cnidaria), kroužkovců (Annelida) a ostnokožců (Echinodermata). Měkkýši (Mollusca) a Hlístice (Nematoda) ji však nedisponují. (Hyršl, 2018b, 2018a)

Příkladem imunizace hmyzu je takzvaný „imunitní priming“. Jedná se o situaci, kdy se jedinec nejprve setká s malým množstvím patogenu, díky čemuž je lépe připraven na případné setkání s intenzivnější infekcí. Tuto imunitu je však energetické výhodné udržet jen v rámci dnů až týdnů, což bývá vzhledem ke krátkému životnímu cyklu hmyzu dostačující (Nahodilová, 2018; Schmid-Hempel, 2005). Příkladem dosažení imunitního primingu může být řada jevů pozorovatelných u sociálního hmyzu, jako je například výměna antimikrobiálních látek nebo trofolaxe. Takto získanou imunitu mohou jedinci předat i svým potomkům.

U bezobratlých zatím imunitní priming není důkladně prostudován. Známe sice řadu příkladů, ale jeho samotné mechanismy jsou zatím předmětem výzkumu. Je velmi pravděpodobné, že tyto projevy značí přechod k adaptivní imunitě, proto jsou tyto poznatky velmi důležité pro studium evoluce imunitního systému. (Hyršl, 2018b).

4 Metodika

Na výzkum bylo potřeba vybrat vhodnou oblast, kde jsou jak kvalitní přírodní stanoviště, tak potencionální ekologické pasti, a to v takové blízkosti, aby se podmínky v jednotlivých lokalitách signifikantně nelišily. To vše splňuje Sokolovsko, které bylo v roce 2021 pro podobné výzkumy vybráno. Nejdříve se zde prováděl výzkum atraktivity, který lépe pomohl určit ekologické pasti. Lokality pro náš výzkum se pak vyskytují západně od Sokolova mezi městy Oloví, Habartov, Kynšperk nad Ohří a Březová.

Dohromady bylo vybráno 10 různých míst, z nichž 5 jich představuje „přírodní stanoviště“ a 5 „umělá stanoviště“. Jako přírodní lokality byly vybrány různé tůně, jedno slepé rameno, ale také staré zrašelinělé rybníky bez rybí obsádky, které mohou pro vážky představovat kvalitní biotop, přestože se mezi přírodní stanoviště neřadí. Do skupiny „umělých stanovišť“ pak patří řada umělých vodních nádrží v okolí jezera Medard, jež vzniklo zatopením jámy po těžbě hnědého uhlí (Gillarová et al., 2010), podobně jako Libocké mokřady (ČSOP Kynšpersko, ©2023), představující další z našich lokalit.

Obrázek č.1: Mapa Sokolovska s vyznačenými výzkumnými lokalitami (zdroj: mapy.cz)



Nejdříve bylo potřeba nasbírat larvy vážky obecné (*Sympetrum vulgatum*), respektive *Sympetrum* spp. To probíhalo na přírodní lokalitě s číslem 8, u vesnice Lítov (Habartov), kde se jich pomocí sítě nasbíralo celkem 360. Nachytné larvy se po 12 jedincích rozmístily do 30 plastových košů, které byly rozvezeny mezi našich 10 lokalit. Na každé lokalitě tedy byly 3 experimentální koše obsahující kromě 12 larev také substrát a vegetaci z daného stanoviště a teplotní datalogger. Koše byly nakonec ze stran i z vrchu obmotány nylonovou sítí. To zajistilo, že larvy se nedostaly ven a jejich predátoři zase dovnitř, zatímco potrava mohla volně procházet.

Laboratorní práce měly probíhat ve třech termínech s přibližným odstupem dvou týdnů s tím, že v každém termínu se ze všech lokalit odebere 1 koš. Díky předčasné proměně některých larev se však v druhém termínu přivezlo do laboratoře všech zbylých 20 košů. Ještě před samotným laboratorním zpracováním bylo třeba nalézt všechny larvy. Nejdříve se tedy na roztažený igelit rozprostřel substrát a vegetace, z nichž se larvy vyjímaly do nádoby s vodou. Pokud byly larvy mrtvé, nebyl na nich laboratorní výzkum prováděn – jejich buňky již mohly být degradované. Z nádoby jsem vždy pinzetou odebrala po jedné larvě, kterou jsem opatrně vysušila papírovou utěrkou a umístila do Petriho misky. Poté jsem larvě chirurgickými nůžkami odejmula všechny končetiny a z rány a pomocí jednorázové kapiláry odebrala pokud možno co nejvíce hemolymfy, aby byl vzorek co největší pro případné přezkoumání. Z kapiláry jsem pak opatrně hemolymfu vyfoukla do mikroskopavky a zředila ji fosfátovým pufrům (PBS) v poměru 1:10 pomocí automatické pipety s nastavitelným objemem. Díky PBS byly dobře viditelné imunocyty, které se počítaly pod mikroskopem v následujícím kroku. Na to bylo za potřebí automatickou pipetou naměřit 7,5 µl naředěné hemolymfy a aplikovat ji mezi Bürkerovu počítací komůrku a připevněné krycí sklíčko. Pod mikroskopem nastaveným na celkové zvětšení 400x se nakonec spočítal celkový počet hemocytů s tím, že zvlášť se odlišovaly granulocyty.

Díky ztrátám v důsledku mortality a malému objemu hemolymfy u některých larev bylo spočítaných vzorků celkem 132 (místo zamýšlených 360), z čehož 45 z prvního termínu a 87 z druhého. Jakmile byla zpracována data o počtu hemocytů a granulocytů, mohla se podrobit statistické analýze, kde se počítala koncentrace těchto tělních buněk v 1 µl čisté hemolymfy (K) vydělením jejich množství (N) objemem čtverce Bürkerovy komůrky v µl a vynásobením zvoleným zředěním (Ř). Vzorec byl tedy: $K = (N / 0,2) * \check{R}$

K porovnání rozdílů v počtech hemocytů a granulocytů mezi jednotlivými typy lokalit byl zvolen zobecněný smíšený model (GLMM) s poissonovým rozdělením

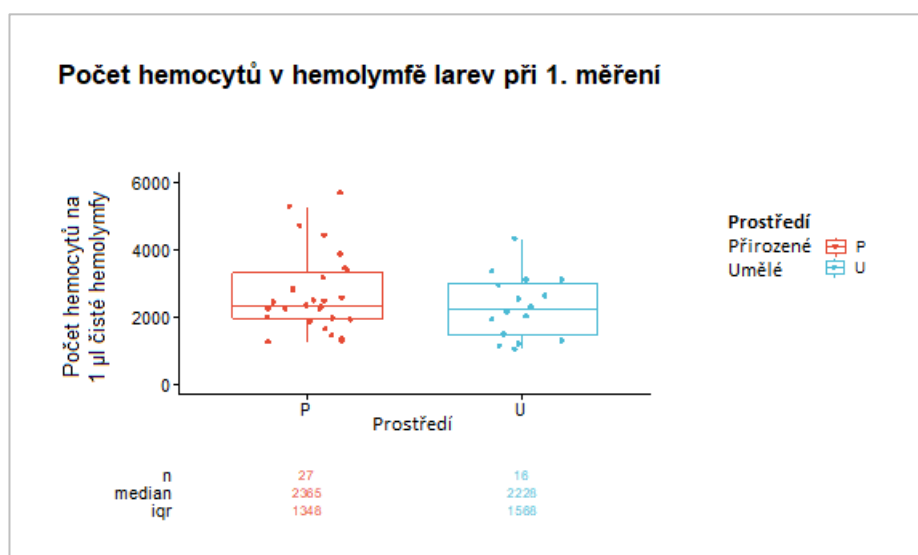
chyb. Pro každé opakování byl vytvořen samostatný model, kde vysvětlovanou proměnnou byl počet buněk a vysvětlujícími proměnnými typ lokality (rekultivované / přirozené). Abychom zohlednili rozdíly mezi lokalitami, jejich efekt byl zohledněn jako náhodný faktor. Hodnoty signifikance byly testovány na hladině významnosti 0.05. Všechny analýzy byly provedeny v programu R verze 4.2.2., package lme4 verze 1.7. (Bates et al., 2015).

5 Výsledky

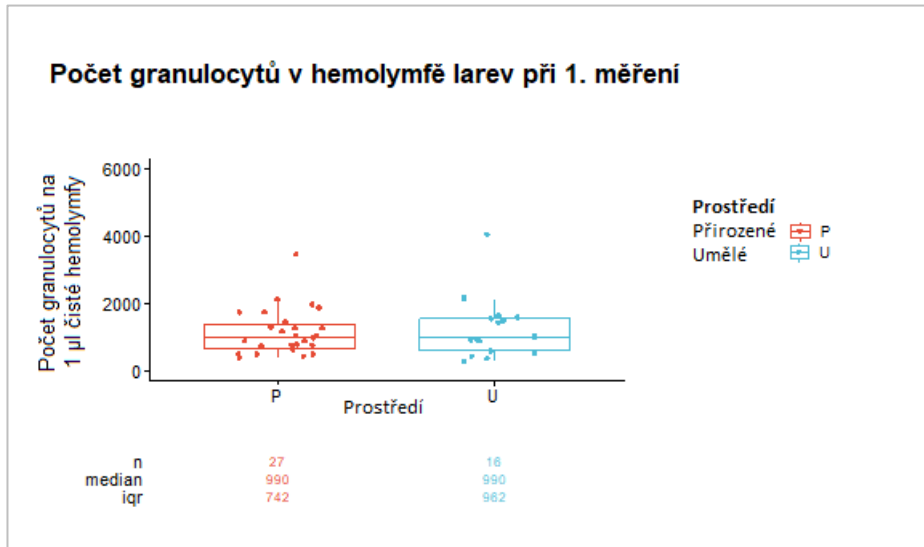
V prvním měření se počet hemocytů mezi larvami z přirozeného a umělého prostředí mírně lišil, tento rozdíl však nebyl signifikantní ($\chi^2 = 1.527$; p-hodnota = 0.216) (viz. Graf č.1). Mezi počtem granulocytů byl rozdíl téměř nulový ($\chi^2 = 0.247$; p-hodnota = 0.619). Granulocytů se v prvním měření celkově naměřilo velmi málo (viz. Graf č.2). Výsledky druhého měření již byly odlišné. Počet hemocytů larev z přirozených stanovišť byl marginálně (téměř signifikantně) vyšší než počet hemocytů larev ze stanovišť umělých ($\chi^2 = 3.347$; p-hodnota = 0.0673) (viz. Graf č.3). Signifikantní rozdíl byl pak v počtu granulocytů ($\chi^2 = 4.711$; p-hodnota = 0.029), jak znázorňuje Graf č.4.

Při srovnání počtu granulocytů a hemocytů v prvním a druhém měření bylo zřejmé, že celkový počet granulocytů stoupl, zatímco počet hemocytů klesnul. Tak tomu bylo jak v přirozených, tak v umělých habitatech. Celkový nárůst granulocytů byl pak marginálně signifikantní ($\chi^2 = 5.778$; p-hodnota = 0.056). Nejvýraznější byl pokles hemocytů larev v umělém prostředí mezi prvním a druhým měřením znázorněný grafem č.3 ($\chi^2 = 9.014$; p-hodnota = 0.011).

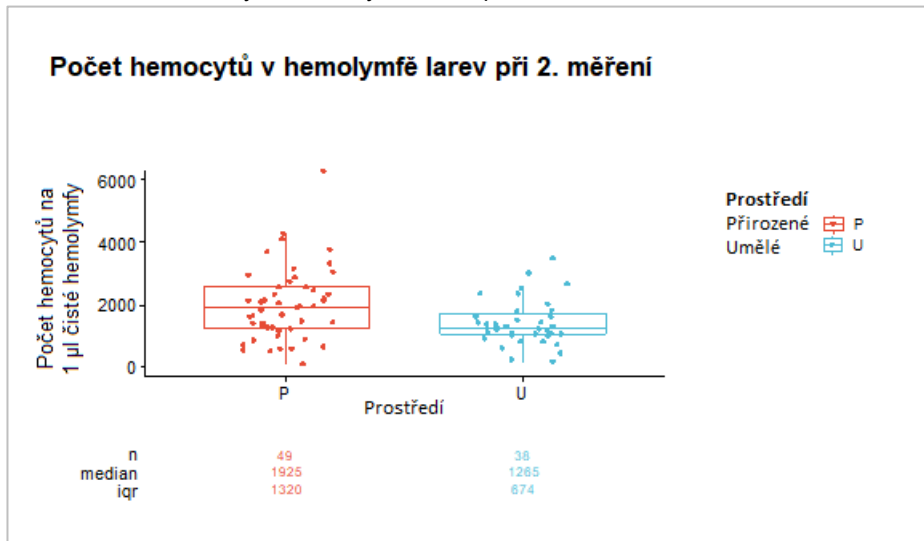
Graf č. 1: Počet hemocytů v hemolymfě larev při 1. měření



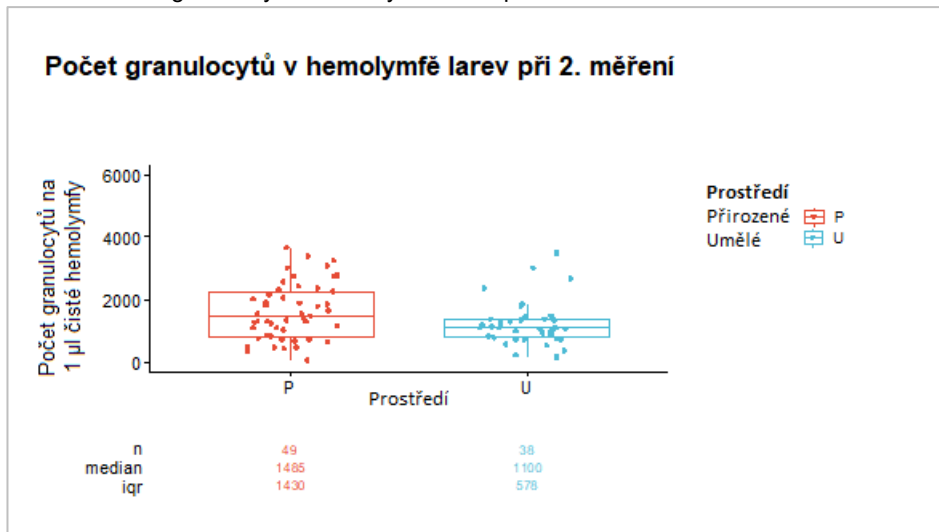
Graf č. 2: Počet granulocytů v hemolymfě larev při 1. měření



Graf č.3: Počet hemocytů v hemolymfě larev při 2. měření



Graf č.4: Počet granulocytů v hemolymfě larev při 2. měření



6 Diskuze

Výsledky našeho výzkumu ukazují, že při prvním termínu měření měly larvy vážek v hemolymfě o dost méně granulocytů a více ostatních hemocytů než při měření druhém. To je pravděpodobně způsobeno tím, že hemocyty se diferenciují na specifické imunitní buňky (včetně granulocytů) postupně. V této myšlence mě utvrzuje Söderhäll et al., (2003) svou studií o zrání a produkci hemocytů u bezobratlých živočichů, kde dospívá k závěru, že hemocyty se diferenciují částečně již v krvevorné tkáni, ale hlavní rozlišení se odehrává až když jsou tyto buňky součástí hemolymfy. Podle Nancy E. Beckage (2008) je v pozdějších instarech účinnější také humorální imunita, a to díky poklesu juvenilního hormonu (JH), který potlačuje indukci genů kódujících antimikrobiální peptidy.

Statistická analýza našich výsledků ukázala, že v průběhu času značně poklesl počet hemocytů larev v umělém prostředí (viz. Graf č.2) a že v přirozeném prostředí se diferenciovalo více granulocytů (viz. Příloha č.5 a Příloha č.6). To skutečně napovídá o lepší imunitě larev v přírodních stanovištích než v rekultivovaných habitatech. Důvodů může být několik. V zatopených dolech po těžbě nejen hnědého uhlí, jak je tomu na Sokolovsku, jsou z pravidla nižší hodnoty pH a vyšší koncentrace těžkých kovů (především železa a manganu) (Fafílková, 2014), které jsou toxické pro vodní bezobratlé, akumulují se v jejich tkáních a působí negativně na některé fyziologické i morfologické funkce (Golovanova, 2008). Krom toho v těchto oblastech také dochází degradaci a erozi půdy (Harabiš & Dolný, 2012; Sýkorová, 2004) což narušuje vodní režim a zvyšuje se tak riziko vsakování vody (Sýkorová, 2004), které larvy vážek vystavuje časovému stresu. Všechny tyto jevy jsou pro vážky imunosupresivní.

V průběhu laboratorního zpracování jsem si také povšimla zdánlivě menší velikosti larev pocházejících z umělých lokalit, což může mít podobnou příčinu – podle Golovanové (2008) některé těžké kovy zpomalují larvální růst. Stoks et al. (2008) popisuje, že velikost larev také závisí na působení stresu. Na většinu stresorů vážky reagují snížením své aktivity, díky čemuž přijímají méně potravy a zpomaluje se tak jejich vývin. Ekologická past larvy může vystavit například stresu chemickému, teplotnímu a respiračnímu (Stoks et al., 2008). Změna chemismu vody, způsobená znečištěním nejen těžkými kovy v místech bývalé těžby, má totiž vliv také na její pH, teplotu a množství rozpuštěného kyslíku (Villalobos-Jiménez et al., 2016).

To vše také ovlivňuje druhové složení stanoviště, což může pro larvy znamenat nedostatek potravy. Ten bývá příčinou vnitrodruhové kompetice, která u vážek často

končí kanibalismem (Buskirk, 1992), což by mohlo podávat vysvětlení, proč bylo z celkového počtu vysazených larev v koších nalezeno pouze necelých 40% jedinců. Nalezených larev bylo vždy více v koších z přirozeného prostředí než z umělých habitatů, z čehož usuzuji, že v umělých lokalitách měly vážky skutečně nedostatek potravy a uchýlovaly se ke kanibalismu (jiní predátoři se přes síť dostat nemohli). V koších z přirozených stanovišť bylo naopak nalezeno více jedinců, navíc v nich bylo ale také více mrtvých larev než v koších z umělých habitatů. Domnívám se, že v přirozených lokalitách tedy byla úmrtnost zapříčiněná patogeny a parazity, což by také souhlasilo s našimi výsledky o větším počtu imunocytů larev, které přežily, jelikož napadené larvy, které parazitaci přežijí, z pravidla disponují větším počtem imunitních buněk, jak potvrzuje Alves e Silva (2013).

Z toho vyvozuji, že v rekultivovaných habitatech může mít na mortalitu vliv hlavně nedostatek potravy, vnitrodruhová kompetice a následný kanibalismus s tím, že pokles imunitních funkcí souvisí především s neletálními účinky stresu, zatímco na přirozených stanovištích je mortalita způsobená hlavně patogeny a parazitismem, jelikož neletální účinky parazitismu bývají spíše imunizační (Alves e Silva, 2013). Tato hypotéza by případně mohla být předmětem dalších výzkumů. Také by se dále mohlo zkoumat v jaké míře se zhoršená imunita či jiné projevy stresu přenáší po proměně na dospělé.

7 Závěr

Všechny cíle mé bakalářské práce byly splněny. V teoretické části jsem popsala, jak terestrická matka ovlivňuje kondici svých potomků výběrem ovipozičního místa a navazující fenomén ekologických pastí. Dále jsem uvedla faktory ovlivňující kondici larev vážek a na závěr se zaměřila na imunitu bezobratlých živočichů. Také jsem popsala, jak na sebe jednotlivé části navazují a jaké mezi sebou mají souvislosti.

V experimentální části práce jsme zkoumali, jak se kvalita prostředí larev vážek projevuje na imunitě jedinců. Jako ukazatel jsme zvolili koncentraci imunitních buněk v hemolymfě. Konkrétně se zjišťoval celkový počet hemocytů a zkoumalo se, jakou část z nich tvoří granulocyty. Zjistili jsme, že celkový počet hemocytů mezi typy prostředí se nijak zásadně neliší. Hlavní rozdíl byl však v poměru granulocytů a nediferenciovaných hemocytů. V umělém prostředí se z hemocytů diferenciovalo méně granulocytů než v prostředí přirozeném, díky čemuž jsme dospěli k názoru, že čím déle je jedinec vystaven nekvalitnímu prostředí, tím více se to projeví na jeho kondici.

Studium imunity bezobratlých má využití například v medicíně nebo agrobiologii, a to zejména v obraně proti škůdcům plodin a kulturních lesů, nebo také v rozvoji chovu včel a jiných člověku prospěšných bezobratlých (Hyršl, 2018a). Z mého pohledu by se však tyto poznatky měly zohledňovat hlavně v ochraně přírody, na jejímž fungování mají bezobratlí zcela zásadní roli.

8 Seznam použité literatury

8.1 Odborné publikace

Adamo S. A., 1998: The specificity of behavioral fever in the cricket *Acheta Domesticus*. *J. Parasitol.* 84. 529-533.

Adamo S. A., 2012: The effects of the stress response on immune function in invertebrates: An evolutionary perspective on an ancient connection. *Hormones and Behavior* 62. 324-330.

Alves e Silva T. L., Vasconcellos, L. R. C., Lopes A. H., Souto-Padro'n, T., 2013: The immune response of hemocytes of the insect *Oncopeltus fasciatus* against the flagellate *Phytomonas serpens*. *PLOS One.* 1-9.

Andersen S. O., 2009: Cuticle. In: Resh V. H., Cardé R. T.: *Encyclopedia of insects.* Academic Press. 245-246.

Arcier, J. M., 1986: Immunity in invertebrates: cells, molecules, and defense reactions. Springer-Verlag. 234.

Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S 2015: Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1), 1–48.

Baumann A., Blenau W., Erber J., 2009: Biogenic Amines. In: Resh V. H., Cardé R. T.: *Encyclopedia of insects.* Academic Press. 80-82.

Beckage N. E., 2009: Immunology. In: Resh V. H., Cardé R. T.: *Encyclopedia of insects.* Academic Press. 492-496.

Bernáth B., Szedenics G., Molnár G., Kriska G., Horváth G., 2001: Visual ecological impact of shiny black anthropogenic products on aquatic insect: oil reservoirs and plastic sheets as polarized traps for insects associated with water. *Archives of Nature Conservation and Landscape Research* 40. 89-109.

Buskirk J., 1992: Competition, Cannibalism, and Size Class Dominance in a Dragonfly. *Oikos* 3. 455-464.

Corbet P. S., 1999: *Dragonflies: behavior and ecology of Odonata.* Cornell University Press, Ithaca.: 864.

Crumrine P. W., Switzer P. V., Crowley P. H., 2008: Structure and dynamics of odonate communities: accessing habitat, responding to risk, and enabling reproduction. In: Córdoba-Aguilar A.: Dragonflies and Damselflies: Model Organisms for Ecological and Evolutionary Research. Oxford University Press, New York. 21-38.

Dunn P. E., 1990: Humoral immunity in insects. *BioScience* 10. 738-744.

Forbes M. R., Robb T., 2008: Testing hypotheses about parasite-mediated selection using odonate hosts. In: Córdoba-Aguilar A.: Dragonflies and Damselflies: Model Organisms for Ecological and Evolutionary Research. Oxford University Press, New York. 175-188.

Gillarová Hranajová H., Pecharová E., Kažmierski T., 2010: Studie Medard z hlediska posuzování vlivů na životní prostředí. *Život. Prostr.* 1. 45-48.

Golovanova I. L., 2008: Effects of Heavy Metals on the Physiological and Biochemical Status of Fishes and Aquatic Invertebrates. *Inland Water biology* 1. 93-101.

Griffin JR., F. M., 1977: Oponization. In: Good R. A.: Biological amplification systems in immunology.: Springer US, Boston. 85-113.

Harabiš F., Dolný A., 2012: Human altered ecosystems: suitable habitats as well as ecological traps for dragonflies (Odonata): the matter of scale. *J. Insect. Conserv.* 16. 121–130.

Hinojosa J. C., Martín R., Maynou X., Vila R., 2017: Molecular taxonomy of the *Sympetrum vulgatum* (Odonata: Libellulidae) complex in the West Palaearctic. *Eur. J. Entomol.* 114. 373–378

Horváth G., Kriska G., 2008: Polarization vision in aquatic insects and ecological traps for polarotactic insects. In: Lancaster J., Briers R.A. (eds.): *Aquatic Insects: Challenges to Populations.* CAB International, Oxfordshire. 204-229.

Horváth G., Malik P., Kriska G., Wildermuth H., 2007: Ecological traps for dragonflies in a cemetery: the attraction of *Sympetrum* species (Odonata: Libellulidae) by horizontally polarizing black gravestones. *Freshwater Biology* 52. 1700–1709.

Horvath K., Angeletti D., Nascetti G., Carere C., 2013: Invertebrate welfare: an overlooked issue. *Ann Ist Super Sanità* 1. 9-17.

- Hupało K., Rachalewski M., Rachalewska D., Tończyk G., 2014:** Gregarine parasitism in two damselfly hosts: Comparison between species, sexes, and sites (Odonata: Calopterygidae). *Odonatologica* 43. 199-211.
- Hyršl P., 2018a:** Imunita hmyzu a dalších bezobratlých živočichů 1. *Živa* 1. 32-34.
- Hyršl P., 2018b:** Imunita hmyzu a dalších bezobratlých živočichů 2. *Živa* 2. 91-93.
- Kanost M., 2009:** Hemolymph. In: Resh V. H., Cardé R. T.: *Encyclopedia of insects*. Academic Press. 446-448.
- Kolluru G. R., 1998:** Sex can be dangerous: Acoustically-orienting parasitoids on field crickets (Orthoptera: Gryllidae). *Metaleptea* 18. 5-7.
- Koštál V., 2011:** Insect photoperiodic calendar and circadian clock: Independence, cooperation, or unity?. *Journal of Insect Physiology* 57. 538-556.
- Kriska G., Bernath B., Farkas R., Horváth G., 2009:** Degrees of polarization of reflected light eliciting polarotaxis in dragonflies (Odonata), mayflies (Ephemeroptera) and tabanid flies (Tabanidae). *Journal of Insect Physiology* 55. 1167–1173.
- Li D., Scherfer C., Korayem A. M., Zhao Z., Schmidt O., Theopold U., 2002:** Insect hemolymph clotting: evidence for interaction between the coagulation system and the prophenoloxidase activating cascade. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32. 919–928.
- Li Y., Xiang Q., Zhang Q., Huang Y., Su Z., 2012:** Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides* 37. 207-215.
- Mangahas R. S., Murray R. L., McCauley S. J., 2019:** Chronic Exposure to High Concentrations of Road Salt Decreases the Immune Respose of Dragonfly Larvae. *Front. Ecol. Evol.* 7. 1-6.
- Martens A., 1994:** Field experiments on aggregation behaviour and oviposition in *Coenagrion puella* (L.) (Zygoptera: Coenagrionidae). *Adv. Odonatol.* 6, 49-58.
- McPeck M. A., 2008:** Ecological factors limiting the distributions and abundances of Odonata. In: Córdoba-Aguilar A.: *Dragonflies and Damselflies: Model Organisms for Ecological and Evolutionary Research*. Oxford University Press, New York. 51-62.
- Milosevic, I., McCabe R. E., 2015:** Fight-or-flight response. In: Milosevic I., McCabe R. E.: *Phobias: The Psychology of Irrational Fear*. ABC CLIO, Greenwood. 464.

Moore N. W., 1964: Intra- and Interspecific Competition Among Dragonflies (Odonata). *Journal of Animal Ecology* 1. 49-71.

Oertli B., 2008: The use of dragonflies in the assessment and monitoring of aquatic habitats. In: Córdoba-Aguilar A.: *Dragonflies and Damselflies: Model Organisms for Ecological and Evolutionary Research*. Oxford University Press, New York. 79-95.

Shiddamallayya N., Pratima M., 2006: Impact of domestic sewage on fresh water body. *Journal of Environmental Biology* 29. 303-308.

Schlaepfer M. A., Runge M. C., Sherman P. W., 2002: Ecological and evolutionary traps. *Trends in Ecology & Evolution* 17, 474–480.

Schmid-Hempel P., 2005: Evolutionary Ecology of Insect Immune Defenses. *Annu. Rev. Entomol* 50. 529–551.

Schmid-Hempel P., 2017: Parasites and Their Social Hosts. *Trends in Parasitology* 6. 453-462.

Siva-Jothy M. T., Moret Y., Rolff J., 2005: Insect immunity: an evolutionary ecology perspective. *Advances in insect physiology* 32: 1-48.

Söderhäll, I., et al., 2003: Hemocyte production and maturation in an invertebrate animal; proliferation and gene expression in hematopoietic stem cells of *Pacifastacus leniusculus*. *Developmental and Comparative Immunology* 27. 661-672.

Srinivasan N., Gordon O., Ahrens S., Franz A., Deddouche S., Chakravarty P, Phillips D., Yunus A. A., Rosen M. K., Valente R. S., Teixeira L., Thompson B., Dionne M. C., Wood W., Reis e Sousa C., 2016: Actin is an evolutionarily-conserved damage-associated molecular pattern that signals tissue injury in *Drosophila melanogaster*. *eLife* 5. 1-26.

Stoks R., Johansson F., De Block M., 2008: Life-history plasticity under time stress in damselfly larvae. In: Córdoba-Aguilar A.: *Dragonflies and Damselflies: Model Organisms for Ecological and Evolutionary Research*. Oxford University Press, New York. 39-50

Tennessen K. J., 2009: Odonata. In: Resh V. H., Cardé R. T.: *Encyclopedia of insects*. Academic Press. 721-729.

Terra W. R., Ferreira C., 2009: Digestive system. In: Resh V. H., Cardé R. T.: *Encyclopedia of insects*. Academic Press. 273-281.

Torralba-Burrial A., Ocharan F. J., 2007: Dragonflies Caught by Plants (Odonata: Libellulidae). *Entomol. Gener.* 30. 301–305.

Villalobos-Jimenez G., Dunn A., Hassall C., 2016: Dragonflies and damselflies (Odonata) in urban ecosystems: A review. *European Journal of Entomology* 113. 217-232.

Wildermuth H., 1993: Habitat selection and oviposition site recognition by the dragonfly *Aeshna juncea* (L.): an experimental approach in natural habitats (Anisoptera: Aeshnidae). *Odonatologica* 22, 27-44.

Wildermuth H., Horváth G., 2005: Visual deception of a male *Libellula depressa* by the shiny surface of a parked car (Odonata: Libellulidae). *International Journal of Odonatology* 8. 97-105.

Wildermuth H., Spinner W., 1991: Visual cues in oviposition site selection of *Somatochlora arctica* (Zetterstedt) (Anisoptera: Corduliidae). *Odonatologica* 20, 357-367.

Wisenden B. D., Chivers D. P., Smith R., F., 1997: Learned Recognition of Predation risk by *Enallagma* Damselfly Larvae (Odonata, Zygoptera) on The Basis of Chemical Cues. *Journal of Chemical Ecology* 1. 137-151.

8.2 Ostatní a internetové zdroje

Dobeš P., 2009: Fenoloxidázová kaskáda u hmyzu. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno. 66. Diplomová práce. „nepublikováno“

Fafílková V., 2014. Vodní a mokřadní lokality v povodí jezera Medard. Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, České Budějovice. 55. Diplomová práce. „nepublikováno“

Homolová S., 2008: Buněčná imunita bezobratlých. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno. 53. Diplomová práce. „nepublikováno“

Kučeráková N., 2018: Reaktivní a dusíkové metabolity v imunitě bezobratlých. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno. 46. Bakalářská práce. „nepublikováno“

Nahodilová I., 2018: Reakce hmyzího imunitního systému na bakteriální stimulaci. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno. 41. Bakalářská práce. „nepublikováno“

Český svaz ochránců přírody Kynšpersko, ©2023: Libocké mokřady [online]. [cit. 25.03.2023], Dostupné z: <https://www.adaptterraawards.cz/Databaze/2020/Libocke-mokrady>

R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.