

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

KATEDRA EKOLOGIE



**Odolnost invazního slunéčka *Harmonia axyridis*
vůči teplotnímu stresu**

**Tolerance to thermal stress in invasive
ladybird *Harmonia axyridis***

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Diplomant: Bc. Radek Svoboda

Vedoucí práce: Ing. Michal Knapp Ph.D.

2015

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Radek Svoboda

Ochrana přírody

Název práce

Odolnost invazního slunéčka *Harmonia axyridis* vůči teplotnímu stresu

Název anglicky

Tolerance to thermal stress in invasive ladybird *Harmonia axyridis*

Cíle práce

Cílem práce bude sepsat literární rešerši na téma odolnosti hmyzu vůči teplotnímu stresu, včetně částí úzce zaměřených na vývoj odolnosti během života jedince a odolnost vůči teplotnímu stresu u druhu *Harmonia axyridis*. Součástí diplomové práce bude i experimentální výzkum odolnosti slunéček *Harmonia axyridis* vůči zmražení (chill-coma recovery), vývoje této odolnosti vůči zmražení během ontogeneze a zkoumání determinant (např. tělesná velikost, chill-coma recovery time) úspěšnosti přezimování konkrétních jedinců.

Metodika

Literární rešerše v českém jazyce o rozsahu cca 10 stran bude vypracována s pomocí vědecké literatury nalezené v databázi Web of Knowledge. Během laboratorního experimentu budou za standardizovaných podmínek chována slunéčka *Harmonia axyridis* od vajíček až po stárnoucí dospělé. Jednotlivá vývojová stádia (1. larvální instar, 2. instar, 3. instar, 4. instar, čerstvý dospělec, 4 dny starý dospělec, 16 dní starý dospělec) budou zmrazena a následně bude změřen čas potřebný k obnovení jejich schopnosti pohybu (= chill-coma recovery time). Dále bude testována přesnost (repeatability) tohoto způsobu měření odolnosti vůči teplotnímu stresu. V poslední části bude zkoumán vztah mezi naměřenými hodnotami chill-coma recovery time a úspěšností přezimování jedinců. Popis experimentu a jeho výsledky budou v rámci DP zpracovány formou anglicky psaného manuskriptu vědeckého článku). Stručně bude popis experimentu včetně výsledků shrnut i v českém jazyce.

Doporučený rozsah práce

50 stran + přílohy dle potřeby

Klíčová slova

Chill-coma, Harmonia axyridis, ontogeneze, přezimování

Doporučené zdroje informací

Bowler K, Terblanche JS, 2008: Insect thermal tolerance: what is the role of ontogeny, ageing and senescence? *BIOLOGICAL REVIEWS* 83: 339-355.

MacMillan HA, Sinclair BJ, 2011: Mechanisms underlying insect chill-coma. *JOURNAL OF INSECT PHYSIOLOGY* 57: 12-20.

Raak-van den Berg CL et al., 2012: Winter survival of *Harmonia axyridis* in The Netherlands. *BIOLOGICAL CONTROL* 60: 68-76.

Watanabe M, 2002: Cold tolerance and myo-inositol accumulation in overwintering adults of a lady beetle, *Harmonia axyridis* (Coleoptera : Coccinellidae). *EUROPEAN JOURNAL OF ENTOMOLOGY* 99: 5-9.

Předběžný termín obhajoby

2016/17 LS – FŽP

Vedoucí práce

Ing. Michal Knapp, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra ekologie

Elektronicky schváleno dne 16. 3. 2016

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 16. 3. 2016

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Děkan

V Praze dne 16. 04. 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod odborným vedením Ing. Michala Knappa, Ph.D., a že jsem uvedl všechny literární prameny, ze kterých jsem čerpal.

V Praze 18.4. 2017

.....

Poděkování:

Úvodem bych rád poděkoval mému školiteli a především příteli, Michalovi Knappovi, za jeho vždy pozitivní přístup, humor, empatii, nevídanou trpělivost a odborné vedení mých závěrečných prací, které se díky němu proměnily v příjemné a zábavné školní povinnosti. Dále bych rád poděkoval mému kolegovi, Michalovi Řeřichovi, za několikaletou spolupráci, pomoc a podporu, které se mi vždy bez požádání dostalo, i za vydařená léta naplněná úctou a přátelstvím. Velký dík patří i mým spolužákům, bez kterých by má studia končila předčasně a kteří tvoří velkolepou knihovnu zážitků nekonečného smíchu pečlivě uložených v mých vzpomínkách. V neposlední řadě směřují mé díky k rodině, která mi vždy byla zářícím majákem v temných vodách, místem lásky a pochopení.

Abstrakt

Jedním ze základních faktorů ovlivňujících život hmyzu je teplota. Pravidelný i nepravidelný pokles teplot v prostředí vyvíjel v průběhu evoluce tlak na vývoj nejrůznějších fyziologických, morfologických i behaviorálních adaptací.

V první fázi této studie jsem zkoumal vliv ontogenetického stádia na teplotní odolnost sluněčka východního (*Harmonia axyridis*). Jako ukazatel této odolnosti byla u sluněček různého vývojového stupně použita metoda měření tzv. chill coma recovery time, tedy zaznamenávání času procitnutí po vystavení chladnému prostředí (- 6 °C). Ve fázi druhé jsem testoval vliv opakované expozice stejné teplotě na časové prodlevy probuzení dospělců.

Na rychlost procitnutí z chill coma mělo vliv stáří (stádium) jedince. Byl též objeven náznak pohlavního dimorfismu, neboť samci se probouzeli o trochu dříve než samice. Z této části výzkumu je dále patrné, že se dospělci sluněčka východního probouzí v průměru o 45 sekund dříve než larvální stádia.

Analýza dat opakované expozice ukázala, že se zvyšujícím se počtem expozic narůstá i doba zotavení z chill coma, přičemž efekt nebyl jen lineární.

Výsledky experimentu potvrdily vliv ontogeneze i opakované expozice na odolnost jedince vůči chladným podmínkám.

Klíčová slova: teplotní tolerance, expozice, ontogeneze, *Harmonia axyridis*, odolnost vůči mrazu, chill coma, fyziologie hmyzu

Abstrakt

(English)

One of the primary factors affecting the life of insects is temperature. Regular and irregular drop in temperature in the environment was in the course of evolution exerting pressure on the development of a variety of physiological, morphological and behavioral adaptations.

In the first phase of this study, the influence of ontogenetic stages on temperature resistance of eastern ladybugs *Harmonia axyridis* was examined. As an indicator of the resistance a measuring method called Chill Coma Recovery Time, which means recording the time of awakening after exposure to a cold environment (- 6 °C), was used at different stages of development of ladybugs. In the second phase, the effect of repeated exposure to the same temperature on time delay of awakening of adults was tested.

The speed of awakening from chill coma was affected by the age (stage of) individuals. An indication of sexual dimorphism was discovered, as males were awakening a little earlier than females. This part of the research also shows that adults of eastern ladybugs awaken 45 seconds prior to the larval stage on average.

Data analysis of the repeated exposure shows that recovery time from chill coma increases along with the higher number of exposures where the effect is not just linear.

The results confirm the impact of ontogeny and repeated exposure on individual resistance against cold conditions.

Key words: temperature tolerance, exposure, ontogeny, *Harmonia axyridis*, resistance to frost, chill coma, insect physiology

Obsah

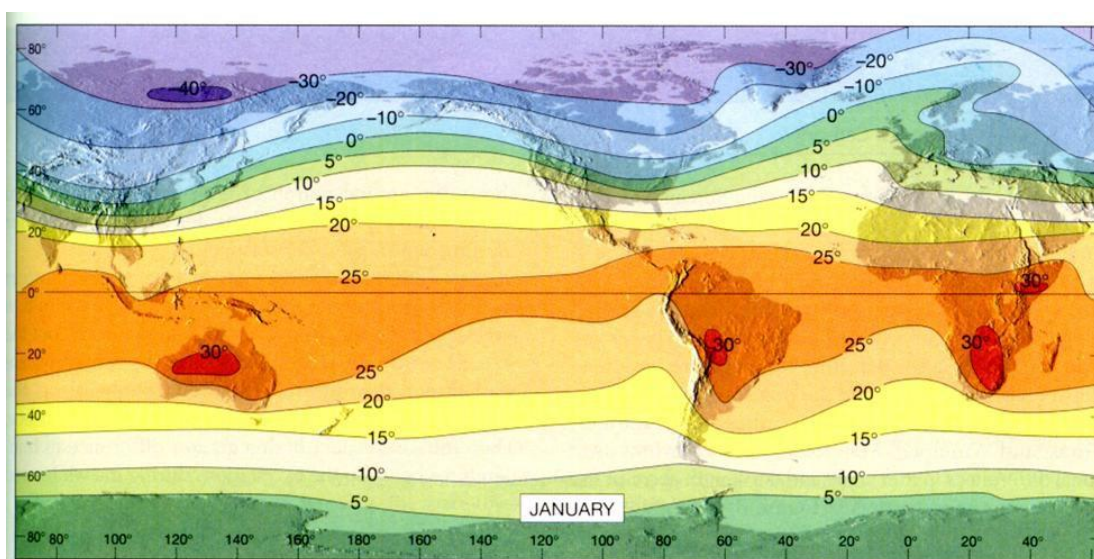
1. Úvod	9
1.1. Teplota v planetárním měřítku	9
1.2. Biologické hodiny	10
1.3. Fotoperiodismus	11
1.4. Teplota prostředí	12
1.5. Teplotní valence	13
1.6. Hmyz a teplota	14
1.6.1. Termoregulace hmyzu	14
1.6.2. Aklimatizace vs aklimace	16
1.6.3. Heat shock proteiny	17
1.6.4. Hmyz a nízké teploty	18
1.6.5. Dormance	23
1.6.6. Zimování slunéčka východního	24
1.6.7. Chill coma	26
1.7. Slunéčko východní (<i>Harmonia axyridis</i>)	30
1.7.1. Charakteristika druhu	30
1.7.2. Původ a rozšíření	31
1.7.3. Teplotní valence	32
1.7.4. Popis ontogeneze slunéčka východního	33
1.7.5. Určení pohlaví	35
2. Cíle práce a hypotézy	36
3. Metodika	37
3.1. Chov slunéčka východního	37
3.2. Testování opakovaného chill coma recovery	38
3.3. Testování vlivu ontogeneze na čas zotavení z chill coma	38
3.4. Analýza dat	39
4. Výsledky	40
4.1. Vliv ontogeneze na rychlost procitnutí (CHCR)	40
4.2. Vliv opakované expozice mrazu na dobu procitnutí (CHCR)	42
5. Diskuse	44
6. Závěr	47
Reference	48
Přílohy	56

1. Úvod

1.1. Teplota v planetárním měřítku

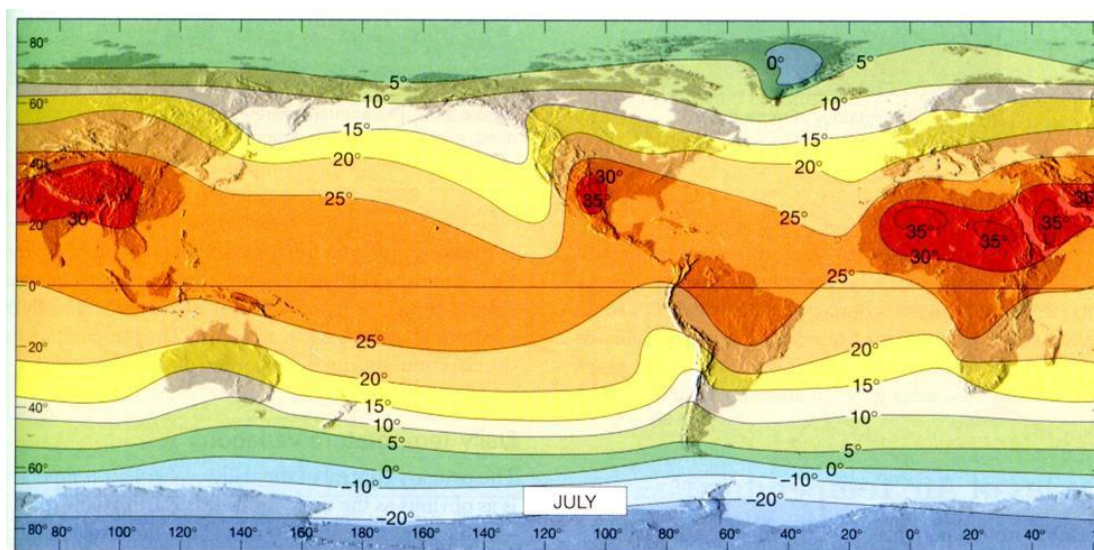
Oproti vesmírnému vakuu je teplota na povrchu Země značně heterogenní. Vnější prostředí naší planety, ve kterém se nachází veškeré biotické i abiotické složky přírody, má naprosto zásadní a určující vliv na vznik, vývoj a adaptace života. Teplotní bilance v planetárním měřítku je nejvíce ovlivňována sluneční energií dopadající na zemský povrch, rozložením tlakových výší a níží, mořskými proudy a všeobecnou cirkulací atmosféry (viz obr. 1 a 2; Bednář et Kopáček 2005).

Obrázek 1: Rozložení teplot (leden)



(zdroj: Strahler et al. 2006)

Obrázek 2: Rozložení teplot (červenec)



(zdroj: Strahler et al. 2006)

Všeobecně platí, že intenzita slunečního záření koreluje s nadmořskou výškou a zeměpisnou šířkou. Distribuce energie přijaté ze Slunce je závislá na planetárních pohybech. V jarních a letních měsících dopadá nejvíce slunečních paprsků na severní polokouli, naopak v zimě na jižní. Nejvíce sluneční energie vždy dopadá na oblasti kolem rovníku, a to v jarní a podzimní rovnodennosti (Strahler et al. 2006). Planetární pohyby, jejichž aspekty se promítají na povrch Země, jsou přírodním zákonem ovlivňujícím periodu slunečního svitu, přesuny vzdušných systémů a změny teploty. Jejich pravidelnost se odráží v životech všech živých organismů, který je díky tomu časově cyklický jako hodiny.

1.2. Biologické hodiny

Evoluční změny se, zejména kvůli kratšímu životnímu cyklu, v rámci hmyzí říše projevují zpravidla rychleji než u vyšších organismů (Nijhout & Emlen 1998). Existují však fyzikální aspekty, jejichž vliv byl zásadní daleko předtím, než se po Zemi pohybovaly jakékoliv organismy. Planetární pohyby Země (kolem své osy a kolem Slunce) zajišťují společně s Měsícem periodicky se opakující změny. Ať už se jedná o střídání dne a noci, slapové jevy či změny ročního období, působí tyto jevy na životní adaptace organismů od samého počátku. Ani na ty největší organismy naší planety však nemůžeme nahlížet orbitální optikou, a tak je nutné sledovat projevy periodických zákonitostí velkého měřítko přímo na souboru adaptací, historicky zachovaných v genetickém kódu, jimiž se jedinci daného druhu navenek projevují. Studie Saunders et al. (2002) používá termín „biologické hodiny“, na kterém demonstruje periodické aktivity organismů v rámci jednoho dne (příjem potravy, pohyb) či delších období, například v rámci roku (kvetení, kuklení, dormance).

Pro lepší porozumění problematice můžeme rytmy biologických hodin rozdělit podle délky periody, s jakou se opakují. Vztaženo na základní jednotky času tedy rozeznáváme cykly o přibližné délce jednoho dne (cirkadiální), měsíce (cirkalunární) a roku (cirkanuární). Specifickým typem je potom cirkatidální neboli přílivový rytmus (Dunlap et al. 2004).

Základní princip fungování biologických hodin je uschován v genomu druhu. Tento evoluční prostředek řídící řadu fyziologických a biochemických procesů, byl již studován na řadě skupin organismů, a tak jsou dnes molekulární mechanismy zodpovědné za adekvátní odpověď organismu dnes známé jak u jednodušších forem

života, jako jsou sinice a houby, tak u složitějších tělesných struktur, jako mají například drobní savci. Systém, který tyto procesy řídí, funguje na principu zpětné vazby. Nahromaděné genové produkty inhibují svou individuální transkripci, jež se plně obnoví až ve chvíli, kdy koncentrace produktu klesne pod jistou hodnotu. Zpětnovazebné smyčky vytvářejí tzv. „clock“ geny (Ueda et al. 2001).

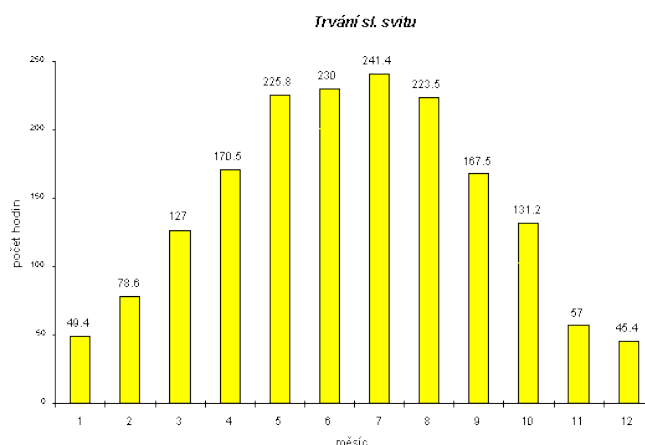
Jeden z největších významů lze přisoudit rytmicky se měnící fotoperiodě (Menaker 1970). Vnímání světla se tak stává řídicím mechanismem, který ovlivňuje živočichy a rostliny i na úrovni ontogeneze.

Cirkanuální cykly mající delší periodu přímo souvisí s množstvím sluneční energie, která dopadá na zemský povrch. Jak už bylo naznačeno výše, dotace touto energií se kontinuálně mění během dne a noci či jara a zimy. Díky biologickým hodinám tak mohou organismy vcelku přesně načasovat období rozmnožování (Hodkova 1976). Těchto poznatků se v současné době využívá i v ochraně přírody. Informace o době rozmnožování různých skupin organismů nám kupříkladu pomáhá při plánování managementových zásahů v krajině. Správným načasováním plánovaných prací můžeme dnes ochránit celé populace volně žijících druhů.

1.3. Fotoperiodismus

Pojem fotoperiodismus lze definovat jako řízení vývoje nebo chování organismů podle fotoperiody, tj. počet hodin světla ve 24 hodinových cyklech, která je v přírodě nejspolehlivějším ukazatelem roční doby. Poprvé jej popsal Garner & Allard roku (1920) po pokusech zkoumajících závislost světelné dotace na produkci květů a plodů u rostlin (tabák, soja aj.).

Graf č. 1: Průměrná délka slunečního svitu během roku.



Zdroj: Litschmann T. (URL 1)

Fotoperiodismus vzniká jako adaptace na pravidelně se měnící délku dne během roku (graf č. 1) a zahrnuje schopnost organismu rozlišit světlo a tmu, měřit dobu jejich trvání a na jejich poměr specificky reagovat. Fotoperiodismus ovlivňuje řadu pozoruhodných přírodních fenoménů. Reguluje např. kvetení rostlin, dormanci, tahy ptáků, reprodukční cykly živočichů aj. Zkracování fotoperiody je navíc pro organismy velmi užitečným ukazatelem toho, že nastává zima a je tedy třeba se na ni připravit. O nástupu změn podmínek určitého období ale spolurozhoduje mj. i teplota, vlhkost atd. (Saunders et al. 2002).

1.4. Teplota prostředí

Teplota v přírodě je závislá na mnoha faktorech fluktuujících v různých časových periodách: denní cykly související s otáčením planety kolem své osy, prudké změny povětrnostních podmínek, oblačnosti či sezónní změny teplot ovlivněné sklonem zemské osy a pohybem Země kolem Slunce.

Každý organismus na Zemi je nepřetržitě vystaven působení teploty prostředí, ve kterém žije. Různé skupiny organismů proto musely vyvinout pestré mozaiku nejrůznějších biologických adaptací, aby se s těmito změnami byly schopné vypořádat (Angilletta 2009). Ektotermní organismy zaujímají v měřítku celé planety převážnou většinu suchozemské biodiverzity, což teplotu, jako ekologický atribut prostředí, řadí na první příčky faktorů ovlivňujících život na Zemi. Zásadní problematikou studia teploty, která zároveň velmi komplikuje výzkum jejích dopadů na fyziologii ektotermů, je její proměnlivost. Téměř ve všech typech biotopů dochází k fluktuaci teploty v čase, na což musí být jejich obyvatelé předem připraveni, aby si zajistili přežití (Deutsch et al. 2008).

Z metabolického hlediska je pro ektotermní organismy ideální, mají-li tělesnou teplotu vyrovnanou s teplotou prostředí. Avšak tohoto stavu je velmi těžké dosáhnout, neboť rychlost změny okolních podmínek znemožňuje naprosto přesnou rovnováhu mezi tělem organismu a prostředím. Mění se teploty mohou mít též zásadní vliv na fyziologické funkce (pohyb, tělesné proporce či rozmnožování).

Faktory nejvíce ovlivňující tělesnou teplotu terestrických ektotermů podle Spotila et al. (1992) jsou:

a) **kondukce** – vedení přímým kontaktem s pevným materiálem (podkladem)

b) **konvekce** – proudění pohyblivých molekul prostředí (voda, vzduch)

c) **radiace/insolace** – sálání nebo vyzařování elektromagnetické energie

d) **evaporace** – vypařování, teplo se spotřebovává změnou skupenství

(pot, sliny)

Neživé složky prostředí, mezi které patří i teplota, mohou mít velmi negativní dopad jak na celé populace, tak na individuální fitness jedince v případě, že se jejich hodnoty pohybují mimo běžný interval hodnot ekologické valence daného druhu (Vinebrooke et al. 2007). Pokud dojde k takovému vychýlení hodnot, působí na organismus narůstající stres z nekomfortního prostředí, který se při nepřetržité expozici může stát fatálním. Tento abiotický stres tak vlastně působí jako primární omezení druhu pro kolonizaci nových území (Gao et al. 2007). Mezi další stresory působící podobně jako teplota patří například silný vítr, úhrn srážek, sucho, vysoká radiace či silné antropogenní znečištění. Mittler ve své studii z roku 2006 také uvádí, že škodlivost abiotických stresorů narůstá, pokud působí v kombinacích.

1.5. Teplotní valence

Poikilotermie je jednodušší a vývojově starší než homoiotermie. Jedná se o strategii sázející na akceptování vnějších podmínek za celkově menších energetických nákladů (Kordík 2000).

Poikilotermní jsou všechny vývojově nižší skupiny živočichů: bezobratlí a z obratlovců ryby, obojživelníci a plazi. Tělesná teplota poikilotermů kolísá s teplotou jejich okolí. Tato životní strategie přináší na jedné straně výhodu v menší energetické náročnosti udržování tělesné teploty pomocí „metabolického kotle“, na straně druhé však nevýhodu při nárazových extrémních podmínkách, kdy metabolismus jedince nestihne či nedokáže adekvátně odpovědět náhlé změně, která se tak může stát jedinci či populaci osudnou (Kordík 2000).

Termální valence druhu souvisí se schopností adaptace napříč všemi vývojovými stádii (Bale et al. 2009).

Kordík (2000) v rámci rozmezí termální valence rozlišuje:

a) **eurythermní** (euryvalentní) druhy – žijí v širokém intervalu teplot.

b) **stenotermní** (stenovalentní) druhy – rozmezí teplot, ve kterém je druh schopen přežít, je úzké, tudíž se jedná o druhy extinkčně náchylnější

Studie zabývající se změnami podnebí (např. Menéndez 2007, Volney & Fleming 2000) již několik let varují před narůstající globální teplotou. Tyto trvalé změny mohou mít v delším časovém horizontu nevratné dopady jak na řadu fyziologických procesů ektotermních organismů (pohyb, růst, reprodukce), tak na geografické rozšiřování areálů invazních druhů, jimž teplotní nárůst otevírá nové příležitosti k obsazení nepůvodních habitatů po celém světě (Vinebrooke et al. 2007).

1.6. Hmyz a teplota

Teplota omezuje geografickou distribuci hmyzu, proto její vlivy mají přímé i nepřímé dopady na šíření nejen invazních druhů. Z pohledu fyziologie je přesně dána druhově podmíněná nejvyšší teplota, při které jedinec umírá, protože jeho organismus již nezvládá základní metabolické pochody- tzv. horní kritická teplota (CT_{max}). Často může být vystaven letálním teplotám hmyz z oblastí pouští či tropických oblastí. Při těchto kritických teplotách dochází k nevratným změnám. V těle jedince denaturují a koagulují proteiny, což způsobuje potlačení aktivity enzymů. K letální vysoké teplotě samozřejmě existuje paralela nacházející se na opačném konci teplotní stupnice tedy CT_{min} (Sinclair 2015), jež nás z hlediska vlastního výzkumu zajímá poněkud více.

1.6.1. Termoregulace hmyzu

Veškeré změny teplot, ke kterým v prostředí dochází, zajišťují unikátní odpověď metabolismu, která se projeví zvýšením jeho intenzity. Teplota má tudíž skrze tuto odpověď metabolismu přímý vliv na většinu biologických projevů (velikost těla, plodnost, aktivita jedince atp.; Chapman 1998).

Kolísání teplot je hmyz schopen do určité míry ovlivňovat, tedy termoregulovat. Mezi významné prostředky termoregulace poikilotermů patří chování (vyhledávání míst s optimální teplotou) a metabolické tvoření či uchovávání tepla (Heinrich 1993).

Behaviorální termoregulace

Zjednodušeně lze říci, že ačkoli je hmyz ektotermní, není nucen strpět veškeré rozměry okolní teploty, pokud je schopen aktivního pohybu. Účinným vzorcem chování může být aktivní vyhledávání mikrohabitátů s optimální teplotou (Teets & Denlinger 2014). Fotoperiodismus, jemuž se věnoval odstavec výše, tak může mít přímou spojitost s behaviorální termoregulací. Sluneční záření je v tomto případě využíváno jako zdroj tepelné energie. Vyhřívání se na slunečném místě v ranních hodinách je zdokumentováno u řady zástupců hmyzu. Ve studii Heinrich (1993) byla dokonce prokázána kauzální souvislost mezi regulací teploty a zbarvením hmyzu. Vynesením grafu denní aktivity bylo zjištěno, že tmavší druhy brouků z čeledi *Tenebrionidae* preferují nižší teploty (zrána), kdežto světlejší druhy byly aktivní, až když teplota stoupla.

Fyziologická termoregulace

Mnoho druhů hmyzu má schopnost částečně udržovat vyšší teplotu těla vůči prostředí. Okřídlené druhy hmyzu například zvyšují svou tělesnou teplotu k zajištění funkčnosti svalů potřebných k letu (Heinrich 1993). Nejčastěji využívají cílených vibračních křídel, jež dokáží (u některých velkých druhů motýlů) zvýšit tělesnou teplotu o 3 – 5 °C. Pokud by této teploty motýl nedosáhl, nebyl by schopen letu z důvodu nízké frekvence kmitání křídel v poměru k velikosti. Jiným typem fyziologické termoregulace je, kupříkladu u *Hymenoptera*, využívání tepelného výměníku, jaký se mimo jiné vyskytuje i u několika druhů tuňákovitých ryb. Výměník blanokřídlých funguje na principu předávání tepla protiproudých cév, jež jsou ve stopce zadečku v těsné blízkosti. Tímto systémem dochází k udržování tepla v hrudní části a zabraňování zbytečným ztrátám. Kombinací aktivního letu s plachtěním či zrychlenou cirkulací hemolymfy lze pak předejít přehřátí svaloviny (Willmer & Stone 1997).

K morfologickým protektorům tepelných ztrát patří šupiny a chlupy, jimiž disponují například chrousti, čmeláci apod. (Kordík 2000).

Termoregulace jako taková je zanesena v genomu druhu. Zanesení takové informace do genetického materiálu je velmi dlouhodobá záležitost. Na kratší časové škále odpovědi organismu na vzniklé podmínky se pohybuje například aklimatizace.

1.6.2. Aklimatizace vs aklimace

Vědecká obec v dnešní době odděluje termín aklimatizace od aklimace. Jako aklimatizace je vnímán proces realizovaný v přírodě, naopak aklimace je potom proces v umělých podmínkách (v laboratoři). Oba termíny jsou však definovány jako fyziologická změna pozitivního charakteru, podmiňující zlepšené přežívání organismu (Chapman 1998). Je navozena změnou jediného faktoru prostředí (například teploty či vysokou koncentrací těžkých kovů). Obecně je tedy proces aklimatizace spuštěn jistou environmentální změnou, na kterou je organismus jedince nucen adekvátně odpovědět. Aklimatizace hmyzu na různé teploty je dnes asi nejvíce zkoumána. Tento biologický systém obrany před náhlými změnami vnějších teplot je v hledáčku vědců i proto, že prozatím není důkaz o vazbě této schopnosti v genomu druhu. Aklimatizace je tedy vnímána pouze z hlediska ontogeneze jedince. Ve hmyzí říši nejčastěji pozorujeme aklimatizace morfologické, biochemické či behaviorální. Jiným typem dělení, jež se objevuje v práci Angilleta et al. (2006), může být aklimatizace vratná a nevratná. Toto dělení jistě lépe definuje konečný dopad zažité změny, jež se průběžně vtiskne do života jedince. **Vratná** aklimatizace má zpravidla kratší trvání (denní, sezónní). Její projevy by podle autora měly pominout prakticky ihned po skončení expozice vlivům prostředí. Aklimatizace **nevratná** by oproti tomu měla jedince doprovázet po zbytek jeho vývoje. V praxi by tento typ aklimatizace znamenal, že pokud by například jedno vývojové stádium hmyzu (larva) zažilo jistý výkyv teploty, mohlo by to zlepšit fitness dospělého. V současné době se, na základě výsledků studií, vědci shodují, že pokud aklimatizace proběhne správně, fitness jedince se vždylepší.

Aklimaci lze názorně demonstrovat na provedených studiích:

Studie Chapman (1998) popisuje aklimaci na modelovém druhu *Drosophila melanogaster*. Jestliže octomilky náhle vystavíme teplotě -5 až -10 stupňů Celsia, můžeme očekávat úmrtnost 90 – 100 % jedinců. Pokud však zkoumaní jedinci projdou 1 – 2 hodinovým režimem teplot mírnějších (0 – 2 °C), většina z nich (80 – 100%) přežije.

Smith et al. (2015) zase uvádí příklad s lesákem moučným (*Cryptolestes ferrugineus*), jehož šestitýdenní aklimace v klimaboxu (4 °C) zvýšila délku přežití při teplotě -10 °C z necelých dvou na 24 dní. V tomto případě se jednalo o aklimaci

reverzibilní, neboť tolerance chladných podmínek se u jedinců ztratila do týdne od navrácení do běžných teplot chovu.

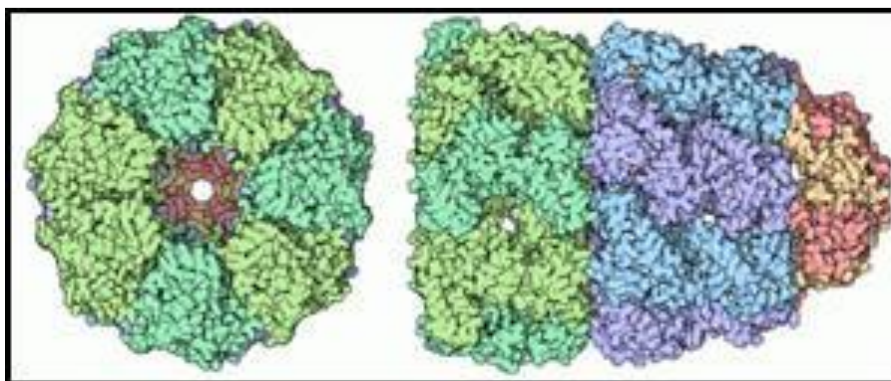
Experimenty prováděné na aklimaci druhů v posledních letech jsou z hlediska důkazů její reálné funkčnosti velmi zajímavé, nicméně náplní mnoha diskusí je otázka, zda laboratorní podmínky odráží realitu ve volné přírodě. Bohužel je velmi těžké jakékoli srovnání, neboť uskutečnit aklimatizační experiment v přírodním prostředí zkoumaného druhu je takřka neproveditelné (Colinet et al. 2015). Také proto se výzkum často zaměřuje přímo na biochemické procesy probíhající v těle hmyzu, neboť principy jejich fungování by mohly (intuitivně) být podobné jako v přírodě.

1.6.3. Heat shock proteiny

Proteiny teplotního šoku (HSP proteiny, obr. 3) napomáhají mimo jiné udržet prostorové uspořádání bílkovin, které by, působením environmentálního faktoru (např. chladu), nenávratně ztratily své prostorové uspořádání. Proteiny teplotního šoku vytvářejí jakousi kapsu, která chrání jiné proteiny před následky pohybu okolních molekul. Nacházíme je kromě živočichů i u bakterií, kvasinek a rostlin (Hochachka & Somero 2002).

Aktivace genů rodiny HSP (heat shock proteins) je univerzální odpovědí na stres buněk vyvolaný teplotou, ale také ozářením, oxidačním poškozením, těžkými kovy, a zahrnuje změny transkripce i translace. Odpověď tepelným šokem je důležitý homeostatický mechanismus, který umožňuje bakteriálním, rostlinným a živočišným buňkám přežít poškození vyvolané faktory zevního i vnitřního prostředí (Rinehart et al. 2006).

Obrázek č. 3: Zjednodušené schéma heat shock proteinu



Zdroj: URL 2

HSP jsou pojmenovány podle molekulové hmotnosti. Obecně jsou přítomny HSP90, HSP70 a HSP60, které spolu s ostatními patří mezi tzv. „šaperony“ (molekuly, které regulují intra- a intermolekulové interakce a chrání proteiny před mechanickým poškozením krystaly vody vzniklými působením mrazu, viz kap. níže). Ve fagocytóze se HSP účastní rozpoznávání cizího od vlastního. HSP chrání v buňkách především lipidy membrán, bílkoviny, složky cytoskeletu a nukleové kyseliny. Ochranné působení se uplatňuje i při chorobném zánětu, kancerogenezi, ischemických poruchách a předčasném stárnutí. Omezují také tvorbu toxických radikálů a patří k jejich důležitým lapačům (Rinehart et al. 2006).

1.6.4. Hmyz a nízké teploty

Měření nízké teploty je v dnešní době velmi rozšířené. Způsoby, jak začlenit všudypřítomné účinky teploty do ekologických či molekulárních studií, vyžadují komplexnější pohled na dynamiku propojení těchto systémů (Frazier et al. 2006).

Hmyz je, stejně jako mnoho dalších studenokrevných živočichů mírného až arktického klimatického pásu, nucen přežít v každý rok se opakující několikaměsíční expozici nepříznivým podmínkám zimy. Proto si většina z těchto druhů již dlouho před samotným příchodem chladného období hledá vhodná útočiště pro přezimování ve stavu diapauzy. Ačkoli některé druhy preferují přezimování ve vrstvě opadanky při povrchu, ohrožuje hmyz pod pokrývkou sněhu hned několik přirozených nebezpečí. Nebezpečí hrozí ze strany predátora, jarního tání (nedostatku kyslíku) či napadení nejrůznějšími patogeny (Abdelghany et al. 2010). Proto některé druhy preferují zimovací stanoviště exponovanějších míst, jakými mohou být skalní štěrbin, živé i odumřelé tkáně rostlin a v současné době čím dál častější úkryty v lidských stavbách. V takovýchto útočištích, třebaže jsou v hlubších místech, tudíž kontakt s okolním prostředím je omezen na minimum, by jedinci nebyli schopni přežít při déle trvajících holomrazech, pokud by nebyli adaptováni i fyziologicky (Rinehart et al. 2009).

Bod podchlazení (supercooling point, SCP) je teplota, při níž začíná ve vzorku (v roztoku) samovolný růst ledových krystalů. Bez přítomnosti iniciačního jádra (nukleátoru), na nějž se nabalují molekuly do krystalické mřížky, se může malý objem roztoku podchladiť na -30 až -40 °C, aniž by voda zmrzla v led. Jako nukleátor působí některé makromolekuly, některé bakterie, prachová zrnka apod. Různé typy nukleátorů iniciují růst krystalu při různých teplotách, záleží také

na jejich celkovém množství ve vzorku. Jakmile se v podchlazeném roztoku objeví přiměřeně velký krystalek, velká část vzorku během zlomku sekundy promrzne (Nedvěd 1996).

Snížení bodu tání roztoku oproti bodu tání čistého rozpouštědla je závislé na molalitě roztoku. Při množství rozpuštěných látek 1 mol/kg vody se sníží bod tání na $-1,86\text{ }^{\circ}\text{C}$. Začne-li v podchlazeném roztoku růst krystal ledu, odčerpávají se na jeho stavbu molekuly vody z roztoku a ten se zahušťuje (Rinehart et al. 2006). Ve chvíli, kdy jeho molalita dosáhne hodnoty odpovídající aktuální teplotě, nastává rovnováha mezi krystalem a roztokem. To znamená, že krystal může dále růst teprve po dalším snížení teploty. Bod tání hemolymfy hmyzu se může pohybovat v rozmezí $-0,5$ až $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Rozpuštěné látky (zvané kryoprotektanty, jsou to zejména polyoly [glycerol apod.] mono- a disacharidy) mimo to působí na nukleátory, snižují jejich aktivitu, takže výrazně snižují bod podchlazení (až na $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$), stabilizují proteiny a membrány, regulují objem buněk (Nedvěd 1996).

Prakticky v každém těle každého organismu na světě se vyskytuje voda. Tato voda se však může stát za mrazivých podmínek (pod $0\text{ }^{\circ}\text{C}$) velmi nebezpečnou, už jen díky svým fyzikálním vlastnostem. Voda obsažená v tkáních vlivem mrazu mění své skupenství kapalně na pevné. To způsobuje tvorbu krystalů ve viscerálním prostoru těla živočicha. Tvorba krystalů ve vnitřním prostředí buňky je považována za letální. Růst krystalů vody však obvykle začíná v mezibuněčném prostoru. Tyto krystaly jsou nebezpečné, protože krom vlastního zvětšování objemu při přechodu skupenství, jež způsobuje zvyšování extracelulárního tlaku, způsobují mechanické poškození (trhliny) v buněčných tkáních (Rinehart et al. 2009). Přítomnost krystalů např. v hemolymfě či uvnitř střeva způsobuje, že se z buněk odčerpává voda, což může zapříčinit celkový osmotický šok buňky. Krom těchto stresorů může buňka čelit i hromadění toxických meziproduktů látkové výměny, vychýlením pH či překročení limitu minimálního objemu. V některých případech může být buňka naopak ohrožena nadměrným příjmem vody z extracelulárního prostoru (v době rozmrzání). Zjednodušeně řečeno buňka vsakuje vodu, dokud nepraskne (Gehring & Wehner 1994).

Nedvěd (1996) dělí druhy na základě citlivosti k výše uvedeným typům poškození a na základě obranné strategie druhu (populace, stádia) do šesti charakteristických skupin.

- **Oportunní přežívání:** druhy vyhledávající útočiště s vyšší teplotou, než je teplota prostředí, pro které je pobyt v podprahových teplotách letální (nepůvodní druhy z tropických oblastí, někteří parazité homoiotermních obratlovců).
- **Citlivost k chladu:** druhy schopné přežít dlouhodobě nízké teploty, pod prahem úspěšného vývoje, avšak se zvýšenou citlivostí k teplotám pod bodem mrazu. Tyto druhy se na období diapauzy uchylují do míst, kde teplota neklesá hluboko pod 0 °C. Mezi zástupce této strategie patří některé druhy mšic.
- **Tolerance chladu:** tato zřejmě nejpočetnější skupina hmyzu je schopna oddalovat zmrznutí snížením bodu podchlazení (Supercooling point- SCP). Zástupci této strategie bez větších obtíží přežívají teploty lehce pod bodem mrazu, avšak při delším vystavení mrazivým teplotám hynou i bez vzniklých krystalů ve viscelárním prostoru. Strategie je rozšířena mezi mnoha taxony napříč různými ontogenetickými stádii.
- **Vyhýbání se zmrznutí:** důmyslnou strategií je i vyhnoutí se zmrznutí těla, kterou mají druhy aktivně snižující SCP k teplotám pohybujícím se okolo -20 až -50 °C. Toho docílí za pomoci vylučování potenciálních nukleátorů z těla (vyprázdnění střev) nebo jejich inaktivací uložením v lipidických fázích membrán. Při tomto procesu dochází k syntéze a akumulaci velkého množství polyolů a kryoprotektantů v hemolymfě. Kryoprotektanty zabraňují ukládání vody do krystalické mřížky.
- **Tolerance zmrznutí:** Tato skupina hmyzu pracuje s viskózními kryoprotektanty, podobně jako předchozí. Avšak hmyz je s touto strategií schopen přežít zmrznutí celého těla, resp. téměř všech tělesných tekutin. V tomto případě totiž dochází k vylučování vlastních nukleátorů přímo do hemolymfy. Na nukleátorech dochází k tvorbě krystalů již při teplotách -3 až -10 °C. Tím je zajištěno, že se krystaly budou tvořit pomalu a jenom v místech, kde nemohou způsobovat velká poškození. Pomalý růst navíc zajistí dostatek času pro buňky, které se musí vyrovnat s růstem objemu (zvýšováním tlaku). Led tak v buňce při vysokých koncentracích těchto látek

nevzniká. Tuto strategii využívají zejména druhy s proměnou dokonalou, jejichž přezimující larvy se dokáží vypořádat i s dlouhodobějším zmrznutím (až $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$).

- **Kombinovaná strategie vyhýbání se a tolerance zmrznutí:** podobně jako u všech kategorizací, i ve strategiích chladové odolnosti hmyzu existují kontinuální výjimky. Jako příklad může sloužit brouk *Pytho deplanatus*, který je schopen kombinovat poslední dvě strategie v případě potřeby.

Ani mezi zcela rozdílnými strategiemi - čtvrtou a pátou - neleží nepřekročitelné hranice. Fyziologické mechanismy zapojené v těchto dvou strategiích jsou podobné (obsah kryoprotektantů a hysterezních proteinů), rozdíl je v přítomnosti vysoce efektivních nukleátorů (Nedvěd 1996). Existují druhy (např. brouk *Dendroides canadensis*), které mohou podle podmínek před zimováním buď snižovat SCP (a zmrznutí nepřežijí), nebo produkovat do hemolymfy nukleátory a tím zvyšovat SCP (přičemž zmrznutí přežívají; Duman 1980). Daleko častěji, než nasvědčují doposud prováděné laboratorní experimenty, hmyz zřejmě využívá cizí nukleátory (bakterie ve střevě, ledové krystaly dotýkající se těla) ke zvýšení SCP a následným přežíváním zmrznutí. Například již zmíněný obaleč *Epiblema scudderiana* udržuje vnitřek své hálky v čistotě a tím se vyhýbá nebezpečí inokulace, zatímco vrtule *Eurosta solidaginis*, vytvářející podobné hálky na téže rostlině (celíku kanadském), ponechává nečistoty uvnitř hálky a využívá inokulace od ledových krystalů vznikajících na této drti (Rickards et al. 1987).

Některé druhy hmyzu v čistém prostředí laboratorně vykazují strategii vyhýbání se zmrznutí nebo tolerance chladu, ale v přírodě na zimovišti využívají (alespoň do jisté míry) toleranci k zmrznutí. Například octomilka *Chymomyza costata* může být v suchém prostředí podchlazena na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, ale pak je citlivá k zmrznutí po inokulaci ledem (při $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$) a po pomalém zchlazení přežívá teploty až $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Jednoduchý mechanismus využívání cizích nukleátorů je pravděpodobně evolučně původní, zatímco tělem produkované "vlastní" nukleátory jsou k tomuto účelu dostatečně přizpůsobené krevní proteiny a lipoproteiny (Košťál et al. 2003).

Druhy, které spoléhají na podchlazení (a těch je většina), jsou schopny udržovat tělní vodu v kapalném stavu a bránit se letálnímu zmrznutí při teplotách v rozmezí $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Fyzikální hranice podchlazování malého množství čisté vody je zhruba na $-38\text{ }^{\circ}\text{C}$. Některé druhy hmyzu však dokáží podchlazovat na mnohem

nižší teploty (a přežít). Absolutní rekord, dosahující $-58\text{ }^{\circ}\text{C}$, byl zaznamenán u larev arktických brouků lesáků *Cucujus clavipes* (Carrasco a kol. 2011). Podchlazení na hodnoty pod $-38\text{ }^{\circ}\text{C}$ je umožněno částečnou dehydratací, zvýšením viskozity a nekovalentní vazbou zbylých molekul vody na biologické membrány a do hydratačních obalů jiných molekul (proteinů, glykogenu, metabolitů) a iontů. Vázané vody mají omezený pohyb, a tudíž se ani nemohou připojovat ke krystalické mřížce ledu. Mnohé druhy hmyzu se vůbec nesnaží tělní vodu udržet v kapalném stavu. Na podzim syntetizují speciální proteiny, jež podporují časně zmrznutí v mimobuněčném prostoru již za teplot těsně pod nulou (strategie zmrznutí; Nedvěd 1996). Krystaly ledu, vytvořené v hemolymfě, vážou část molekul vody do krystalické mřížky, tím se zahustí zbylý roztok a dojde k osmotickému „odsátí“ vody zevnitř buněk. Tato mrazová dehydratace buněk brzy dosáhne svého maxima (již za teplot mezi $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$), takže veškerá „volná“ voda (viz výše) promrzne. V závislosti na druhu a fyziologickém stavu je podíl zmrzlé vody někde mezi 40 % a 75 % celkové tělní vody. Takže adaptace pro přežití zmrznutí se v lecčems podobá adaptaci na dehydrataci, jelikož obě vyžadují schopnost přežít ztrátu kapalné vody (Holmstrup et al. 2002). Pravděpodobnou adaptivní výhodou zmrznutí oproti podchlazení je, že ve zmrzlém stavu se omezí ztráty tělní vody (podchlazená voda má tendenci se odpařovat a připojovat se k okolním krystalům ledu v půdě, sněhu nebo námraze, zatímco zmrzlá voda zůstává vázána), a také se snižuje rychlost metabolismu, a tím se šetří energetické zásoby (led brání difuzi kyslíku, zmrzlá hemolymfa neumožňuje transport látek, takže buňky se dostávají do anoxického a ischemického stavu; navíc vazba molekul vody v buňkách zpomaluje či zastavuje biochemické reakce; Deutsch et al. 2008).

Mechanismy, které hmyz využívá v suchém prostředí proti vysychání (desikaci) jsou podle Nedvěd (1996) následující:

- nižší celkový obsah vody, zvláště volné (nevázané na makromolekuly), již před vystavením vysychání,
- zvýšení chemického potenciálu tělních tekutin, tzn. vysoká molalita roztoku a nižší parciální tlak vodní páry nad tímto roztokem,
- nepropustnost kutikuly a uzavírání průduchů,

- přežívání v dormantním stavu v chráněném mikrohabitat, popřípadě tvorba kokonů apod.

Srovnáme-li adaptace k suchu s adaptacemi k nízké teplotě, naskytá se domněnka, že mnoho mechanismů, považovaných za přizpůsobení k přežití nízké teploty, bylo původně přizpůsobením proti vysychání. Jako adaptace na suché prostředí tyto mechanismy vznikly nejspíše v evoluční minulosti, kdy tropické klima převládalo na většině souše, a dodnes jako adaptace proti vysychání fungují, jejich role v ochraně proti nízké teplotě je druhotná (Holmstrup et al. 2002). Dokumentují to některá měření u tropických druhů hmyzu. Neotropický brouk *Stenotarsus rotundus*, který se nikdy neseťkává s teplotou pod +15 °C, ale musí přežít několikaměsíční období sucha, akumuluje během diapauzy glycerol a sacharidy (tedy vlastně kryoprotektanty), které snad brání ztrátě vody, ale mohou také snižovat bod podchlazení, a zároveň vylučuje z těla látky působící jako nukleátory, takže snižuje bod podchlazení na -15 °C (Yoder et al. 1992).

Existují i speciální adaptace na chlad a mráz (tj.vzniklé de novo), které pro výše popisovanou vodní bilanci nemají žádný význam (například tvorba vlastních nukleátorů v těle, hysterezní proteiny), ale ty jsou omezeny jen na malý počet vyšších taxonů, a tedy jsou zřejmě evolučně mladší. Zároveň se ukazuje, že některé uvedené mechanismy, ať už sloužící jako ochrana proti suchu, nebo proti nízké teplotě, jsou inherentní vlastnosti hmyzího organismu v diapauzním stavu (Knight & Duman 1986).

1.6.5. Dormance

Termín dormance pochází z latinského slova *dormans* (spící) a je souhrnným označením pro přechodné zastavení či omezení fyziologických procesů v živých organismech. Její hlavní význam tkví v úspoře energie, která pomáhá organismu přežít nepříznivé období (Danks 1987).

Diapauza je specifický typ dormance, který je rozšířený zejména u hmyzu. Je podmíněn fyziologickou reakcí, jež je odpovědí na měnící se environmentální podmínky. Stav diapauzy trvá, dokud jsou přítomny všechny či většina druhově specifických symptomů. Jeho ukončení se projevuje postupným zvyšováním citlivosti na vnější podněty. Většina druhů hmyzu je schopna vstoupit i do tzv. kviescence. Tento stav je vyvolán stávajícími nepříznivými podmínkami, avšak hloubka tohoto klidového stavu není srovnatelná s pravou diapauzou, a tak

jsou zástupci této strategie schopni poměrně rychle reagovat na zlepšení situace opětovným navozením normálního stavu (Evans & Brust 1972).

I v případech, kdy diapauza není spojena s chladným obdobím, můžeme u zkoumaného hmyzu zjistit některé již známé jevy: z těla jsou vylučovány cizí nukleátory (neboť střevo se vyprazdňuje a diapauzní hmyz většinou nepřijímá další potravu), zvyšuje se koncentrace glycerolu (neboť metabolismus se v diapauzním stavu zpomaluje a glycerol vznikající z glykogenu není dál zpracováván; Hodkova & Hodek 1997).

Můžeme tedy načrtnout následující scénář vývoje adaptací na nízkou teplotu (v plné míře vyhovující pro akumulaci kryoprotektantů): vznik diapauzy u dávných předků hmyzu a její průvodní symptomy (zvýšení koncentrace glycerolu a jiných meziproduktů) - využití existujících mechanismů k ochraně proti vysychání (selektce na vyšší obsah glycerolu) - využití již vyselektovaných mechanismů (preadaptací pro ochranu proti nízkým teplotám (selektce na spouštění vyšší produkce glycerolu jako odpověď na snížení teploty; Nedvěd 1996).

Schopnost přežít nepříznivé okolnosti ve stavu diapauzy mají u některých druhů různá vývojová stádia. U zkoumaného druhu *Harmonia axyridis* tuto schopnost mají pouze dospělci (Raak-van den Berg 2011).

1.6.6. Zimování slunéčka východního

Jak již bylo zmíněno výše, diapauza je u hmyzu vyvolána změnami okolního prostředí. Různé skupiny hmyzu mají i odlišné strategie přezimování. Některé přezimují ve formě dormantních vajíček, jiné jako larva, kukla či dospělec. Druh *Harmonia axyridis* zvolil za svou strategii diapauzu ve stádiu dospělce (imaga). Tento typ přezimování byl pojmenován jako diapauza reprodukční, v souvislosti s nejnápadnějším aspektem- ukončením rozmnožování dospělých jedinců (Hodek, 2012).

Jedním z důvodů invazivnosti a vysoké konkurenceschopnosti původním druhům je i efektivnější přezimování tohoto brouka. Populace slunéček východních jsou totiž schopny úspěšně přezimovat ve větším počtu (nižší mortalita během zimy), a tak jsou jarní populace početnější než populace nativních druhů. Početnější populace je zároveň schopna rychleji nahradit ztráty zimní mortality. Systém přezimování *H. axyridis* byl zkoumán na několika lokalitách v Japonsku i v Evropě. Tyto studie zaznamenaly několik fyziologických výhod, kterými tento druh disponuje: vaječníky

hibernujících samic nejsou vyvinuté, endokrinní žláza *Corpus allatum*, zodpovědná za produkci juvenilního hormonu, je u přezimujících jedinců ztenčená, a v neposlední řadě autoři objevili rozvinutější struktury lipidů, plnící funkci izolace (Raak-Van Den Berg et al. 2013). Kromě těchto nesporných výhod brouci vykazují migrační chování na místa přezimování již delší dobu předtím, než nastanou právě zimní podmínky. V laboratorních experimentech Lombaert et al. (2011) byli testováni jedinci schopní indukovat stav diapauzy, vyznačující se sníženým příjmem potravy, nízkou aktivitou a agregačním chováním v řádu několika hodin.

V závislosti na aktuálních podnebných podmínkách trvá diapauza *H. axyridis* na severní polokouli obvykle od října do dubna (3 – 6 měsíců). Před samotným upadnutím do stavu strnulosti však dochází k mnoha důležitým pochodům. Jedním z nich jsou masové migrační lety. Migrační let je řízen pomocí tzv. hypsotaxe- brouci se nechávají unášet teplým vzduchem vzhůru a orientují se podle nejvyššího objektu na obzoru. To může být budova, věž, sloup, nebo cokoli jiného, co tvoří významnou, kontrastní siluetu proti okolnímu horizontu. Brouky též přitahují světlé barvy (bílá, žlutá) či barvy výrazně kontrastní (Raak-Van Den Berg et al. 2011).

Po přistání na vhodný objekt rozlišujeme tři fáze chování:

- 1) Brouci otestují, zda je povrch z vhodného substrátu.
- 2) Následně aktivně vyhledávají tmavé, ze všech stran chráněné místo, ideálně s malým otvorem.
- 3) Nakonec se na nalezeném místě usadí a začnou tvořit agregaci.

V poslední části procesu hmyz vylučuje druhově specifické agregační feromony. Druhý jedinec, který tyto feromony zachytí a úspěšně najde jejich emitora, se zachová stejně. Tímto způsobem tak vznikají agregace čítající desítky, stovky, ba i tisíce jedinců. Slunéčka jsou na tato místa setkání lákána krom feromonů i pachy exkrementů, zbytků potravy a rozkládajícími se těly brouků z předchozího roku (Raak-Van Den Berg et al. 2011).

Studie Nalepa et al. (2005), která zkoumala preference *H. axyridis* v kontextu výběru vhodného místa na přezimování z hlediska kontrastu cílové lokality, zanesla do svých výsledků i tabulku (tab. 1) výsledků týdenního pozorování popisující závislost počtu migrujících jedinců na aktuálních podnebných podmínkách.

Tabulka č. 1: Počet migrujících jedinců v porovnání s podnebnými podmínkami.

Date	Maximum temperature (°C)	Average wind speed (km/h)	Sky cover	Number of beetles
28 Oct. 2000	27.0	3.9	0.32	651
29 Oct. 2000	19.4	5.6	0.05	3
30 Oct. 2000	21.1	4.4	0.14	2
31 Oct. 2000	21.1	2.8	0.00	3
1 Nov. 2000	21.1	1.3	0.10	10
2 Nov. 2000	23.0	1.1	0.20	308
3 Nov. 2000	25.0	1.5	0.40	1,591

Zdroj: Nalepa et al. (2005)

1.6.7. Chill coma

Pokud je hmyz vystaven náhlé změně teploty, nikoli očekávané, může uplatnit mechanismus obrany zvaný chill coma (CHC). Českým ekvivalentem pro tento termín by nejspíše byl výraz jako chladová strnulost. Z fyziologického hlediska se jedná o dočasnou ztrátu neuromotorických schopností v důsledku náhlého poklesu teploty k nízkým hodnotám. V praxi jde o stav podobný komatu. Tento stav mohou vyvolat i teploty, které však ve svém důsledku nemusí být smrtící (0 až 4 °C). Při pominutí těchto nepříznivých podmínek prostředí organismus rychle obnovuje svou běžnou aktivitu. Časovou prodlevu mezi pominutím těchto podmínek a běžnou aktivitou nazýváme chill coma recovery time (CHCR; Rasnberry et al. 2011). V současné době je metoda měření časové prodlevy využívána v řadě výzkumů zaměřených na teplotní tolerance hmyzu. Tyto metody (měření SCP, CT_{min} a CHCR) mají výhodu v jejich opakovatelnosti, neboť zpravidla nebývají letální, což se slučuje i s etickým zatížením pokusu. Řada výsledků těchto experimentů byla použita u mnoha druhů jako metriky pro testování teorií o požadavcích druhu na životní prostředí, geografických rozptylech, závislosti na změnách klimatu či reakcích na stresové oblasti (Mukherjee et al. 2014).

Stav chill coma je poměrně snadné rozpoznat. Práce Mellanby (1939) jej definovala jako nedostatek spontánního pohybu po vystavení CCT (chill coma temperature) na dobu 15 minut. Autoři Anderson & Mutchmor (1968) měli snahu přesněji podchytit teplotu, při které dochází k plné ztrátě aktivity, a tak využívali sondu k popichování exponovaného subjektu. Jiné studie popisují CCT jako nejnižší

teplotu, při níž zůstalo 50 % jedinců aktivních. Nedávné studie využily technologického pokroku, a tak nástup chill coma kvantifikovaly poměrně přesně s využitím přesně řízeného snižování teploty (např. Gibert and Huey, 2001).

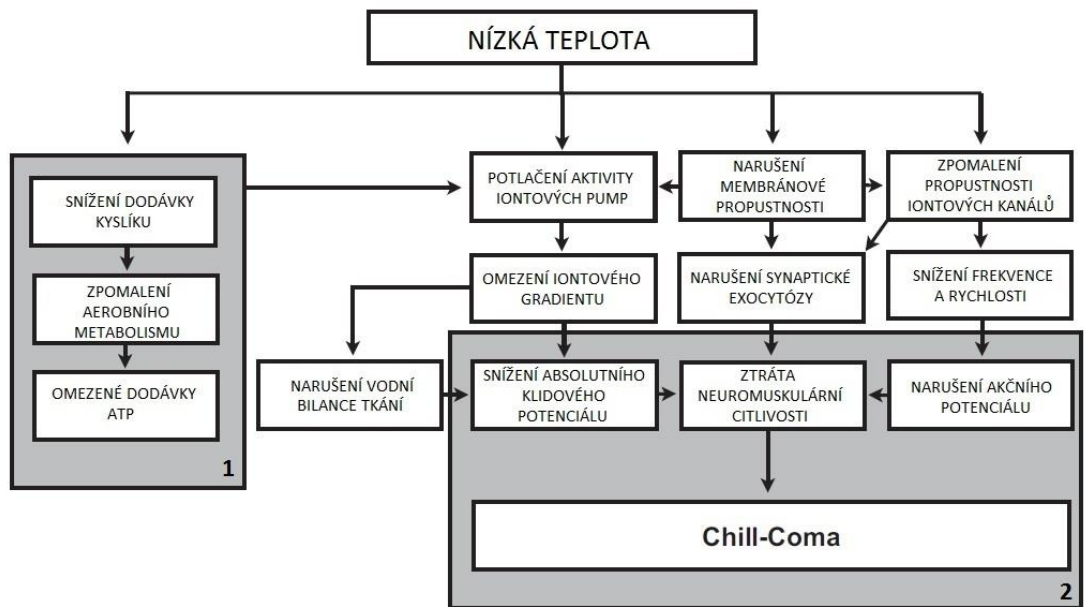
Výsledky studie Morgan & Mackay z roku (2006), prováděné na *Drosophila melanogaster*, dokonce identifikovaly sadu genů (lokusů), jež jsou nejslibnějšími kandidáty pro objasnění tohoto fyziologického mechanismu. Nicméně hlubší pochopení nástupu a následného zotavení z chill comatu v současnosti zatím chybí.

Pörtner et al. (2010) vytvořili teorii, podle které by za stavem chill comatu stála neschopnost dodávat tkáním dostatečné koncentrace kyslíku v důsledku překročení limitních teplot, tedy přechodem aerobního metabolismu na anaerobní. Teorie byla otestována v roce 2010. Aby byla možnost srovnání dvou forem dodávání kyslíku tkáním, byli jako modelové organismy využiti zástupci podzemních stejnonožců (s oběhovým systémem) a brouci z čeledi potěmnikovitých (*Tenebrionidae*, s tracheálním systémem). Z výsledků této studie se nezdá pravděpodobné, že by nízká teplota měla vliv na přístup kyslíku do tkání. Ani u jednoho ze zkoumaných druhů nebyl prokázán signifikantní rozdíl v koncentraci kyslíku v závislosti na snižování teploty. Ačkoli je samozřejmě zapotřebí více podobných výzkumů, zdá se, že se účinky nízkých teplot projevují především na neuromuskulární úrovni.

Neschopnost pohybu, kterou je chill coma definováno, je tedy nejspíše způsobena selháním nervů, které nedokáží dosáhnout akčního potenciálu k podnícení kontrakce. Rychlost přenosu signálu je obecně silně inhibována přímým vlivem nízkých teplot na gangliové zpoždění (z $Q_{10} = C. 3,0$ na $Q_{10} = C. 1,7 - 2,0$) což znamená, že porucha nervového systému je s největší pravděpodobností zapříčiněna sníženou mírou synaptického přenosu (MacMillan & Sinclair 2011).

Rodgers et al. (2004) popsali postupné zvyšování koncentrací extracelulárních K^+ iontů u saranče stěhovavé (*Locusta migratoria*), jaké se objevuje v hrudních gangliích během ochlazování ještě před samotným nástupem komatu. Tento důkaz rychlé depolarizace nervové tkáně jen ukazuje, že za ztrátou tělesné koordinace téměř jistě nestojí jen selhání nervového systému. Jedná se tedy o komplexní mechanismus, do něhož zasahuje, krom neuromuskulární aktivity, i celkový chemismus těla.

Následující schéma (adaptováno z MacMillan & Sinclair 2011) znázorňuje možný fyziologický mechanismus ztráty neuromuskulárního přenosu při vystavení nízké teplotě (CCT).



1. Predikované mechanismy omezené teplotní tolerance související s přenosem kyslíku do tkání (v rámci říše živočichů), podle výsledků současných studií však nepravděpodobné u hmyzu; 2. Navrhované mechanismy navození chill comatu, v současné době podporované empirickými daty (MacMillan & Sinclair 2011).

Vysvětlující pojmy ke schématu:

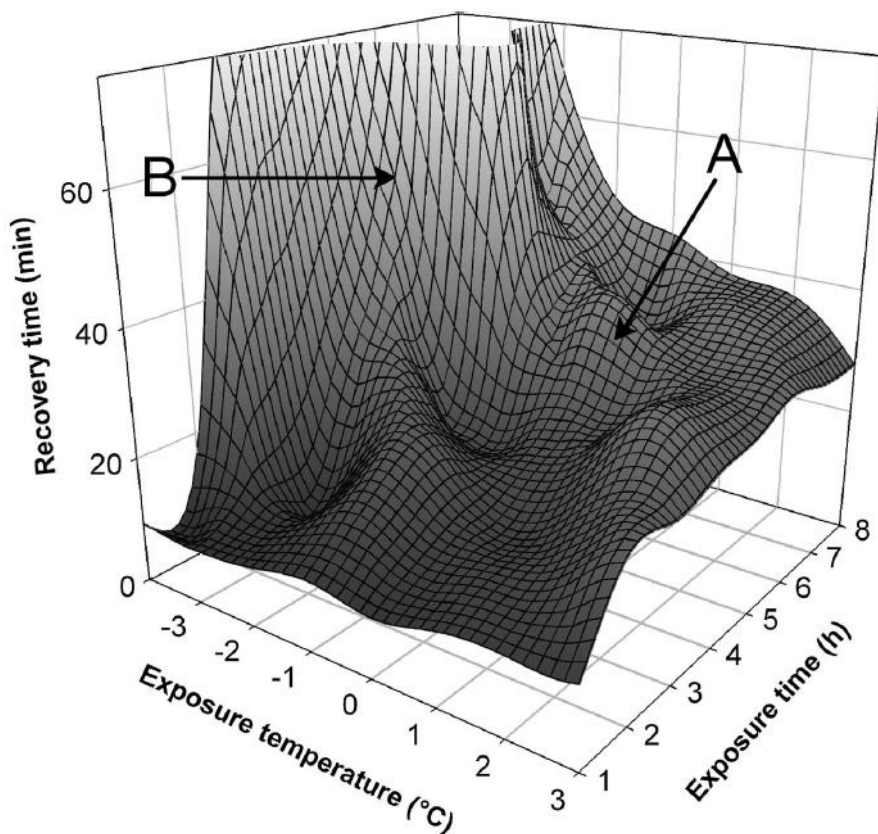
Iontová pumpa: v buněčné biologii označení pro protein na buněčné membráně, který umožňuje aktivní transport některých částic, zejména různých iontů. Pro pohon pump se velmi často spotřebovává molekula adenosintrifosfát (ATP) a takové pumpy jsou pak zvány ATPázy. Díky buněčným pumpám se vytváří určitý gradient (např. draslíkový gradient).

Klidový potenciál: je potenciál na membráně všech buněk lidského těla v klidovém stavu. Je daný dynamickou rovnováhou toku iontů dovnitř a vně buňky. Jeho hodnota je závislá především na koncentracích K^+ iontů.

Akční potenciál: je napětí na membráně odlišné od klidového membránového potenciálu. Jeho vznik si vysvětlujeme tak, že následkem podráždění se otevřou iontové kanály, čímž se změní propustnost membrány pro některé ionty.

Exocytóza: kontinuální proces, při němž buňka vylučuje skrze buněčnou membránu (plasmalemu) větší částice (např. makromolekuly) přímo do extracelulární matrix.

Intuitivní myšlenky dnešních vědců zabývajících se chill coma recovery předpokládají, že ke znovuprocitnutí organismu je třeba obrácených mechanismů, než vedly k jeho strnulosti. Ve skutečnosti existuje velmi těsný vztah mezi dobou zotavení a trváním expozice. Při relativně nízkých teplotách se nástup CHC jeví v grafické podobě exponenciálně či sigmoidálně v závislosti na trvání expozice. Naopak pokud je hmyz vystaven velmi nízkým teplotám, upadá do CHC velmi rychle a doba potřebná k zotavení prudce narůstá (viz graf č. 2; adaptováno z MacMillan & Sinclair 2011).



Graf č. 2: Interaktivní zobrazení závislosti délky zotavení z chill comatu na délce expozice a teplotě, jíž byli jedinci vystavováni. Doba zotavení z CHC je v úzkém vztahu k oběma vstupujícím proměnným, což je v rámci středních hodnot z grafu patrné (A). Sekundární zvýšení doby zotavení (B) může reprezentovat úroveň zatížení, při které již dochází k biologickým poraněním. Data pochází ze studie Macdonald et al. (2004).

Měření CHCR je v současnosti vnímáno jako jeden z možných ukazatelů míry odolnosti druhu vůči poraněním, která jsou způsobena mrazivými teplotami, neboť schopnost jedince se plně zotavit vyžaduje řadu koordinovaných pohybů pro obnovení běžné aktivity. Nicméně je stále zapotřebí mnoho vědecké práce ke stanovení fyziologických příčin a ekologických důsledků, jež mohou osvětlit komplexní vztah chill comatu k expozicím chladného prostředí (MacMillan & Sinclair 2011).

1.7. Slunéčko východní (*Harmonia axyridis*)

1.7.1. Charakteristika druhu

Slunéčko východní (*Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) (Coleoptera: Coccinellidae) je dravý brouk velký přibližně 5 – 9 mm a široký 4 – 7 mm, pocházející z východní Asie. Tento druh byl v rámci biologického boje proti hmyzím škůdcům záměrně šířen mimo svůj původní areál. Přibližně roku 1916 byl druh introdukovan do Severní Ameriky jako agens ochrany rostlin (Koch 2003). Do Evropských států (Ukrajina, Bělorusko, Francie) byla *H. axyridis* introdukována od roku 1964. Zavádění slunéčka však nepočítalo s možnou populační explozí, která z něj jen o několik let později udělala invazní druh. Mezi negativní důsledky invaze slunéčka východního patří okus ovoce (hroznů), zimování v domácnostech či potlačování původních, často užitečných, druhů slunéček (Nedvěd et al. 2014). Tento druh navíc disponuje řadou různě barevných forem (obrázek č. 4). Zástupci var. *succinea*, která je i předmětem studia této práce, mají červeno-oranžové zbarvení s několika (až 19) tečkami, jež mohou u některých dobře melanizovaných jedinců splývat ve větší skvrny (Brown et al. 2007).

Obrázek 4: Přehled nejčastějších forem slunéčka východního (*H. axyridis*)



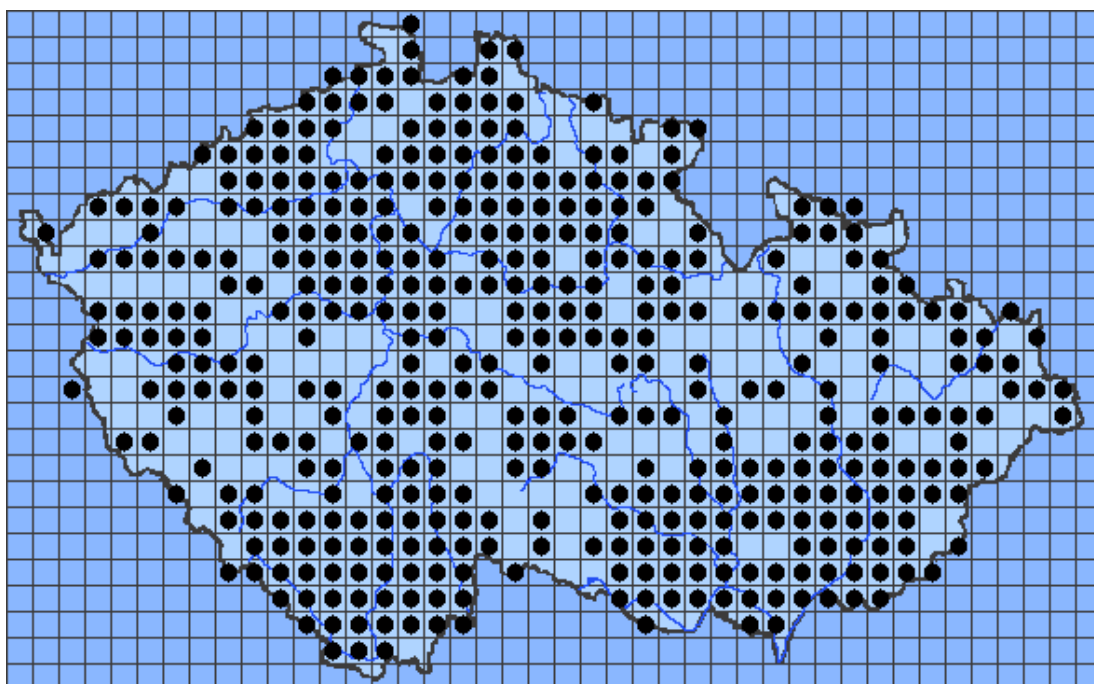
zdroj: Nedvěd et al. (2014)

1.7.2. Původ a rozšíření

Z geografického hlediska je původním areálem rozšíření slunéčka východního subtropická oblast východní Asie. Hojně rozšířený je druh především v Japonsku, Číně, Korey, Mongolsku, na Dálném východě Ruska, jižní Sibiři či ve východním Kazachtánu (Brown et al. 2008). Z genetického hlediska se jedná o dva rozdílné geografické klastry. Západoasijská část areálu rozšíření náleží především melanickým formám bez kýlu na krovkách, naopak východní část formám *succinea* s nápadným kýlem na zadní části krovek. Do východní části Spojených států byly nejspíše introdukovány populace z obou klastrů. Zkřížení jedinců z těchto geneticky odlišných populací mohlo stát u zrodu nové invazní populace. Bohužel relevantní informace k podložení těchto tezí nejsou dohledatelné, neboť původní areály introdukovaných populací jsou neznámé (Lombaert et al. 2011).

V České republice došlo k introdukci v roce 2003. V severozápadních Čechách bylo za účelem biologické ochrany chmelnic vypuštěno malé množství *H. axyridis*, což mělo pomoci s regulací stejnokřídlého hmyzu. V roce 2006 byl brouk zaznamenán v Praze a přilehlém venkovu. Brown et al. (2008) uvádějí, že existuje velká pravděpodobnost, že se spíše jednalo o invazní jedince z populací v Německu, než o slunéčka z českých chmelnic. Záznamy z roku 2008 již ukazují výskyt slunéčka východního na 85% území České republiky (viz mapa č. 1).

Mapa č. 1: Mapování výskytu *H. axyridis* z roku 2008



Zdroj: mapovací schéma Biolibu

1.7.3. Teplotní valence

Slunéčko východní má oproti našemu původnímu slunéčku sedmitečnému (*Coccinella septempunctata*) posunuty teplotní limity optimálního vývoje k nižším hodnotám (Nedvěd et al. 2012). Anaboličké reakce metabolismu slunéčka východního jsou maximální při relativně nízkých teplotách, pohybujících se okolo 5 °C, naproti tomu kataboličké reakce jsou maximální při 25 – 30 °C. Spodním vývojovým prahem larev je teplota okolo 11 °C. Lamana & Miller (1998) doplňují, že preimaginální vývoj jedince vykazuje v souvislosti s teplotou různé délky.

Studie Castro et al. (2011) prokázala, že jedinci chovaní v teplotách nad 25 °C potřebují k úspěšnému dokončení vývinu v dospělce o několik dní méně než jedinci chovaní v teplotách nižších (20 °C). Horní mezí úspěšného vývoje jsou podle Acar et al. (2004) teploty mezi 30 – 35 °C.

1.7.4. Popis ontogeneze slunéčka východního

1.7.4.1. Vajíčka

Vajíčka slunéčka východního (obr. 5) jsou eliptická, žlutooranžového zbarvení a jsou kladena v těsných snůškách po 20 – 70 kusech (ve výjimečných případech i 90 – 100 kusů). Každé vajíčko je ve vzpřímené poloze vždy jedním koncem přilepené k podkladu. Určení, že se jedná o vajíčka *H. axyridis* je podle morfologických znaků prakticky nemožné (Nedvěd et al. 2014).

Obrázek 5: Líhnutí vajíček *H. axyridis*



(zdroj: snímky pořízeny v laboratoři v Českých Budějovicích, autor: Oldřich Nedvěd)

1.7.4.2. Larvy

Larvy prvního instaru slunéčka východního jsou šedočerné, cca 1 - 2 mm velké, bez barevné kresby, podobně jako larvy druhého instaru, které jsou však o něco větší (3 - 4 mm). V této fázi vývoje začínají být patrné poznávací znaky: výběžky na dorzální straně těla zvané scoli či první žlutavé tečky na prvním článku zadečku (Nedvěd et al. 2014).

Larvy třetího instaru mají již oranžově zbarvené dorzo-laterální řady výběžků (1. – 5.) zadečkových článků.

Larvy posledního 4. instaru (obr. 6) slunéčka východního mají dvouhroté žlutooranžové prostřední výběžky na 1., 4. a 5. článku (Nedvěd et al. 2014).

Obrázek 6: Kukla (vlevo) a larva čtvrtého instaru (vpravo)



(zdroj: URL 3)

1.7.4.3. Kukly

Všechna slunéčka mají mumiový typ kukly (*pupa obtecta*) tj. s končetinami částečně přitmelenými k tělu, křídelnými pochvami. Kukla je vždy přitmelená koncovou částí zadečku k podkladu (toto přitmelení zajišťuje již předchozí stádium prepupy). Kukla je v zásadě nepohyblivé stádium, pouze při ohrožení dokáže iniciovat prudké pohyby posledních zadečkových článků, čímž dochází ke střídavému vztyčování a pokládání, ovšem jen v rámci místa přichycení (Nedvěd et al. 2012).

Kukla slunéčka východního (obr. 6 a 7) je poměrně snadno rozpoznatelná od jiných druhů. Nejjednodušším poznávacím znakem jsou výrůstky na zbytcích larvální svlečky. Velikost i zbarvení kukly je podobné jako u slunéčka sedmitečného: je cca 5 – 7 mm dlouhá, zbarvení je proměnlivé od jasně oranžové po červenou, s černými skvrnami různého počtu i tvaru (Nedvěd et al. 2014).

Obrázek 7: „Líhnutí“ kukly ze stádia prepupy



(zdroj: snímky pořízeny v laboratoři v Českých Budějovicích, autor: Oldřich Nedvěd)

1.7.4.4. Imaga

Jedinci invazních populací mají s východoasijskými zástupci tohoto druhu jeden společný rozpoznávací znak – příčnou lištu nacházející se v zadní části krovek. Podobnou lištu mají další dva druhy sluněček vyskytujících se v České republice: poměrně hojné sluněčko desetitečné (*Adalia decempunctata*) a vzácně se vyskytující sluněčko *Vibidia dodecimguttata*. Oba druhy jsou však menších rozměrů do 4,5 mm, zatímco *H. axyridis* je nejméně 5 mm velká. Ačkoli sluněčko východní vykazuje výraznou barevnou proměnlivost, žádná z jeho barevných forem není zcela shodná s jiným žijícím druhem v České republice (Nedvěd et al. 2014).

1.7.5. Určení pohlaví

Pohlaví sluněček (obr. 8) lze určit buď podle tvaru posledního sternitu (břišního článku), či podle zbarvení na hrudi a hlavě. Samice *H. axyridis* mají poslední břišní článek trojúhelníkovitý, přední okraj je rovný. Samci mají přední okraj obloukovitý, s povrchem lehce vydutým. Klypeus neboli horní pysk (přední okraj hlavy) je u samců obvykle bílý, u samic s velkou černou skvrnou, nebo celý černý. Zpravidla podle celkové pigmentace těla – některé málo pigmentované samice mohou být kvůli špatně vybarvenému klypeu chybně určeny. Celkově bývají samice obvykle větší než samci (Nedvěd et al. 2012).

Obrázek 8: Pohlaví *H. axyridis*: samec (vlevo), samice (vpravo)



(zdroj: samec- foto pořízeno v laboratoři v Českých Budějovicích, samice- foto Jaroslav Kaas)

2. Cíle práce a hypotézy

Studie si kladla za cíl prozkoumat vliv ontogeneze na teplotní odolnost larválních stádií i různě starých dospělců slunéčka východního (*Harmonia axyridis*) při vystavení mrazivému prostředí. Druhým cílem práce bylo objasnění toho, jaký dopad bude mít na slunéčka, pokud se expozice chladným podmínkám bude několikrát opakovat.

Předpokládané výsledky experimentů byly následující:

Larvální stádia by měla vykazovat delší časy procitnutí z chill coma než dospělci, neboť z hlediska ekologie druhu nejsou fyziologicky či jinak adaptována na přezimování. Dospělci by oproti tomu měli mít tendenci zkracovat časovou prodlevu probuzení s rostoucím stářím. Toto zkracování by mohlo souviset s příjmem potravy.

U opakování mrazivých expozic byly předpokládány dva scénáře. První z nich předpovídal klesající tendenci hodnot časů se zvyšujícím se stářím z důvodu postupné aklimace testovaných jedinců. Druhý naopak predikoval rostoucí trend časových prodlev procitnutí z důvodu kumulace zranění způsobených mrazem.

3. Metodika

Výzkum probíhal v nově zařízených laboratořích České zemědělské univerzity v Praze. Počítačem řízené klimaboxy umožnily provést veškeré práce se zkoumaným druhem slunéčka východního (*Harmonia axyridis*) v zázemí univerzity, a tak nebylo nutné využívat laboratoří katedry zoologie v Českých Budějovicích, jak tomu bylo při předchozích pokusech realizovaných v roce 2014 pro mou bakalářskou práci. Využity byly především tři klimaboxy (D009) a binokulární lupa (D414).

3.1. Chov slunéčka východního

Jedince (*Harmonia axyridis*) jsme, stejně jako při předchozích pokusech, odchovávali v Petriho miskách (PM) umístěných v klimatických komorách (klimaboxech). Tato metoda je vhodná jak z hlediska ušetření prostoru uvnitř klimaboxu, tak kvůli manipulaci s testovanými subjekty. V PM bylo zapotřebí zajistit základní potřeby organismu, proto každá PM obsahovala pítka s vodou (kousek buničité vaty) a kus papíru poskládaný do harmoniky, jež měl simulovat spodní stranu listu, na který bylo doplňováno i krmivo. Slunéčka jsme po celou dobu experimentu krmili vajíčky zavíječů (*Ephestia kuehniella*) a občas pro doplnění potřebných cukrů jsme pítka napouštěli vodou s cukrem.

Základem experimentu byli jedinci namnožení z několika rodičovských párů, přičemž pro vlastní experiment byly použity tři rodičovské páry. Jejich potomci byli chováni v klimaboxu nastaveném na 26 °C po celou dobu vývoje. Na začátku musely být rodičovské PM kontrolovány každý den, kvůli případné snůšce. Při každém nálezů vajíček byla snůška oddělena, kvůli možnému kanibalismu, a umístěna do vlastní PM, která byla označena specifickým kódem. Oplozená vajíčka mění své zbarvení cca 6 hodin před líhnutím – ze sytě žluté až oranžové na šedou až načernalou. Neoplozená zůstávají žlutá a po vylíhnutí larev slouží jako první zdroj potravy. Až do vylíhnutí larev se snůškami nebylo manipulováno.

Larvy byly po vylíhnutí chovány nejdříve pospolu zhruba do druhého instaru. Pokud byla snůška příliš početná, byly 1. instary opatrně rozděleny již zpočátku po cca patnácti kusech. Druhé a třetí instary byly obvykle rozděleny cca po 4-5 kusech. Larvy posledního (4.) instaru byly již v PM samostatně, aby bylo zamezeno potravní konkurenci a bylo dosaženo standardní velikosti jedinců. Po přechodu do stádia prepupy, kdy se larva přestane pohybovat, dorzálně se prohne a terčíkem

na zadečku se přilepí k podkladu, byly PM šetrně vyčištěny od všech zbytků potravy. Pítko bylo v PM ponecháno kvůli zachování vlhkosti.

Po přechodu do stádia kukly s jedinci opět nebylo manipulováno. Jakmile jsme zaznamenali vylíhnutí dospělého, byla PM opět opatřena krměním. Následně byl dospělce odchováván, až do doby, než byl zapojen do testování vlivu ontogeneze či opakované expozice nízkým teplotám na rychlost zotavení z komatu způsobeného mrazem (chill coma recovery time).

3.2. Testování opakovaného chill coma recovery

Pro tento experiment bylo použito 24 jedinců slunéčka východního (12 samců a 12 samic). Dospělčům, minimálně 14 dní starým, jsme 24 hodin před samotným testováním vyčistili PM od veškerých zbytků potravy. Tím jsme eliminovali zkreslení výsledků, které by mohlo být způsobeno různě nasycenými jedinci. Těsně před vystavením chladu jsme vyjmuli i pítko, aby k němu jedinec nepřimrzl a voda neovlivňovala teplotu uvnitř PM.

Brouky jsme ve vyčištěné PM vkládali na 2 hodiny do klimaboxu nastaveného na $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ v patnáctiminutových intervalech (1 jedinec na PM/ 6x PM na vzorek). Po dvouhodinové expozici byli jedinci vyjmuti. Současně bylo zapnuto měření času. Petriho miska byla otevřena a jedinec vždy otočen ventrální stranou vzhůru. Pečlivým pozorováním a občasnou mechanickou stimulací (pinzetou) byl hlídán první viditelný pohyb, nejčastěji končetiny či tykadel, jehož čas byl zaznamenán.

Po zaznamenání časového údaje byly znovu uzavřené PM ponechány v místnosti po dobu jedné hodiny. Teplota v místnosti se běžně pohybovala okolo $26\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následně byla opakována dvouhodinová expozice v chladu. Celý proces byl opakován 4x tzn. že každý jedinec absolvoval chill coma celkem 4x.

3.3. Testování vlivu ontogeneze na čas zotavení z chill coma

V tomto experimentu byli testováni brouci různého stáří od 1. larválního instaru do 32 dní starých dospělců. Potomci pocházející od tří rodičovských párů byli podrobeni testování na CHCR. Průběh expozice byl stejný jako u výše popisovaného pokusu. Brouci byli vloženi do klimaboxu ($-6\text{ }^{\circ}\text{C}$) na dobu 2 hodin. Po vyjmutí byla opět sledována první znatelná reakce, jejíž čas byl zaznamenán. Testování byli jedinci v následujících vývojových stádiích: L1 = larvy 1. instaru, L2 = larvy 2.

instaru, L3 = larvy 3. instaru, L4 = larvy 4. instaru, D1 = dospělci staří 24 hodin, D4 = 4 dny staří dospělci, D16 = 16 dní staří dospělci a D32 = 32 dní staří dospělci.

3.4. Analýza dat

Data z obou experimentů, ontogeneze odolnosti vůči mrazu i opakovaná expozice mrazu, byla analyzována pomocí lineárních modelů s náhodnými efekty (LME). Jako závislá proměnná vždy figurovala časová prodleva potřebná k probrání z chill coma. Vizuální kontrola naměřených dat potvrdila, že měření času potřebného k probrání se z chill coma poskytuje data s normálním rozdělením chyb.

K analýze dat z experimentu zkoumajícího ontogenezi odolnosti vůči mrazu byly použity dva modely. První model obsahoval jako nezávislou proměnnou pouze stádium vývoje (L1 až 32 dnů starý dospělec). Pohlaví jedinců nebylo pro účely této analýzy rozlišováno. Rodičovský pár, jehož potomkem daný jedinec byl, byl v analýze použit jako náhodný efekt. Pro snazší prezentaci výsledků byly rozdíly mezi jednotlivými vývojovými stádii otestovány pomocí post-hoc testu (Tukey test). Druhý model zkoumal pouze dataset pro dospělé brouky (1 až 32 dní staří jedinci) a kromě stáří jedince figurovalo v modelu jako nezávislá proměnná i jeho pohlaví a interakce mezi stářím a pohlavím. Identita rodičů byla opět použita jako náhodný efekt.

K analýze dat z experimentu zkoumajícího vliv opakované expozice jedince mrazu na rychlost jeho probrání se z chill coma byl použit komplikovanější lineární model s náhodnými efekty. Pořadí měření bylo vyjádřeno jako intervalová proměnná, nikoli jako faktoriální. Apriori nebylo jasné, zda se bude čas potřebný k probrání se z chill coma měnit v průběhu opakovaných měření lineárně či nelineárně. Proto byl do modelu zařazen i kvadratický člen. Maximální model tak obsahoval následující nezávislé proměnné: pořadí měření (a), pořadí měření² (b), pohlaví jedince (c) a všechny možné vzájemné interakce těchto proměnných (viz graf č. 5). Následně byl model zjednodušován odebráním neprůkazných proměnných procesem backward selection. Průkaznost jednotlivých závislých proměnných byla testována pomocí F-testu (příkaz „anova.lme“). Identita jedince byla použita jako náhodný efekt, v tomto případě to byl tedy faktor mající 24 úrovní. Všechny analýzy byly provedeny v programu R 3.0.3 (Knapp 2017).

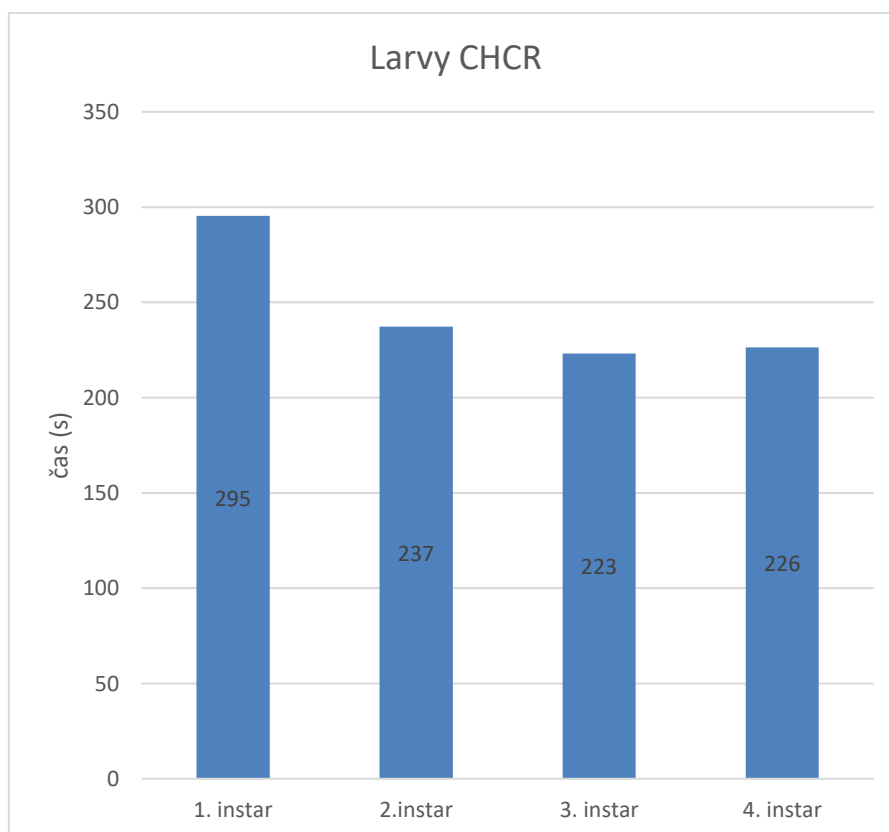
4. Výsledky

Data pro experiment zjišťující vliv ontogenetického stádia na dobu CHCR byla získána od 189 jedinců *Harmonia axyridis*. Druhá fáze výzkumu, vliv opakované expozice na dobu CHCR, byla provedena s 24 jedinci (každý měřen 4x). Celkem bylo tedy testováno 213 jedinců. Kompletní získaná data je možné nalézt v příloze (CD) této diplomové práce.

4.1. Vliv ontogeneze na rychlost procitnutí (CHCR)

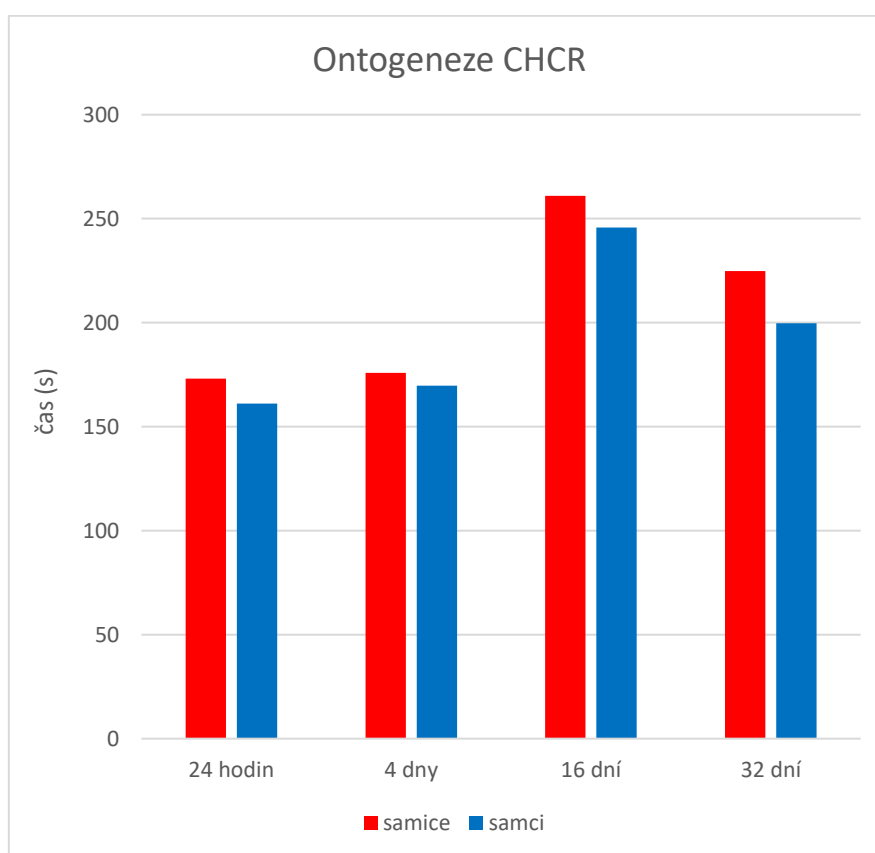
Experiment prokázal, že rychlost procitnutí z chill coma se signifikantně mění v průběhu ontogeneze (model 1: $F = 19,92$; $P < 0,001$;). Pro dospělé brouky byl současně nalezen náznak pohlavního dimorfismu v CHCR, kdy samci se probouzeli z komatu o trochu dříve než samice (model2: $F = 5,07$; $P = 0,026$; graf 4). Interakce mezi stářím dospělého a jeho pohlavím již průkazně nevyšla (model 2: $F = 0,28$; $P = 0,840$).

Graf č. 3: Průměr změřených časů CHCR u larev *Harmonia axyridis*



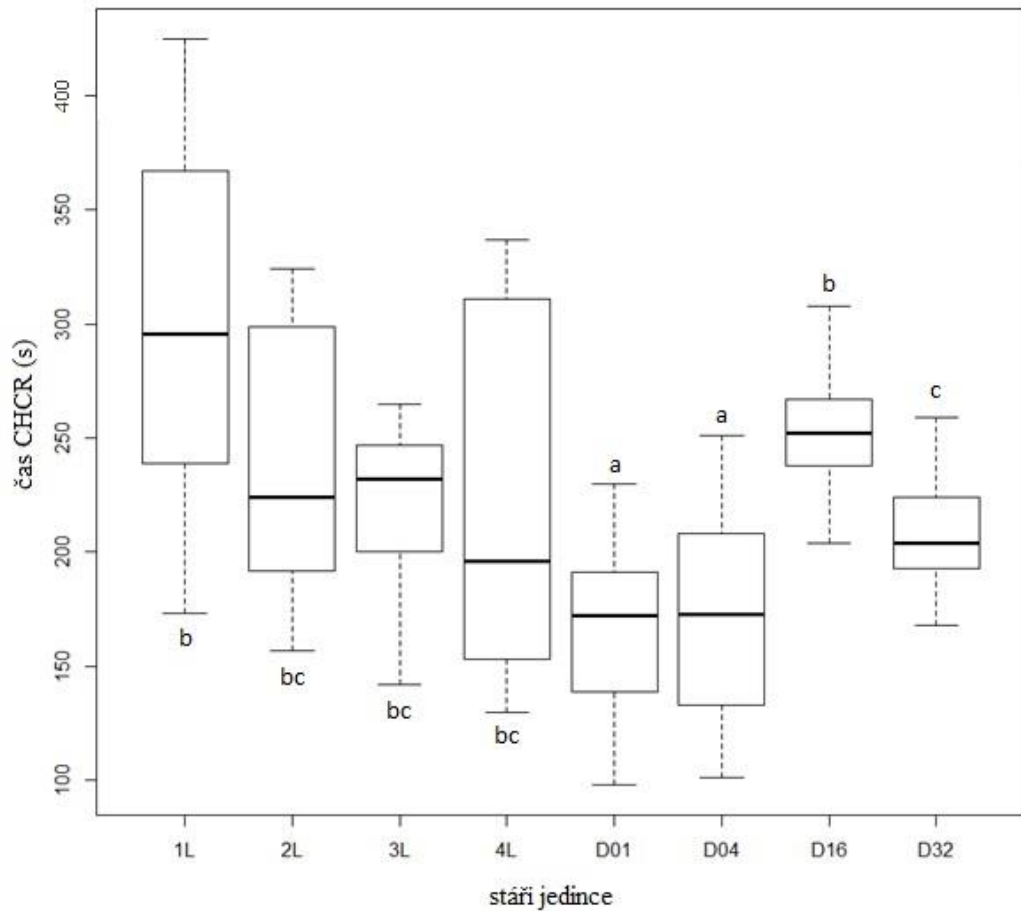
Jak je patrné z grafu č. 3, nejpomaleji se z CHC probíraly larvy prvního instaru. Tuto skutečnost jsme intuitivně předpovídali už před samotným začátkem experimentu. Larvy prvního instaru jsou méně schopné odolávat mrazivým teplotám, pravděpodobně kvůli své nízké hmotnosti, tudíž snazšímu promrzání. Hodnoty mají klesající tendenci až do čtvrtého instaru, který však nevykazuje nijak výrazné změny oproti předchozímu. Průměrná doba od vyjmutí larvy z klimaboxu po její procitnutí byla 246 sekund. V další části byli testováni různě staří dospělci. Následující graf znázorňuje průměrnou dobu procitnutí modelových skupin (staří 1, 4, 16 a 32 dní).

Graf č. 4: Průměr změřených časů CHCR u dospělých jedinců *Harmonia axyridis*



Nejrychleji se z chill coma probírali jedinci staří jeden den, v průměru za 167 sekund. Jen o nepatrnou chvíli déle to trvalo broukům starým 4 dny. O poznání delší probouzení bylo změřeno u jedinců starých 16 dní. Ti se průměrně probouzeli téměř o minutu a půl později než nejrychlejší jedinci staří 24 hodin. Nejstarší jedinci procitli v průměrně za 3,5 minuty. Průměrně se slunéčka v larválních stádiích probírala z chill coma za 201 sekund. Nejkratší čas CHCR byl zaznamenán u 24 hodin starého samce, jenž procitnul za 98 sekund. Po sedmi minutách pak procitla larva 1. instaru, což bylo naměřené maximum.

Graf č.5: Sumarizace výsledků



Sumarizaci nashromážděných výsledků vlivu mrazu na ontogenezi *Harmonia axyridis* znázorňuje graf č. 5, jenž obsahuje i informaci o variabilitě získaných dat.

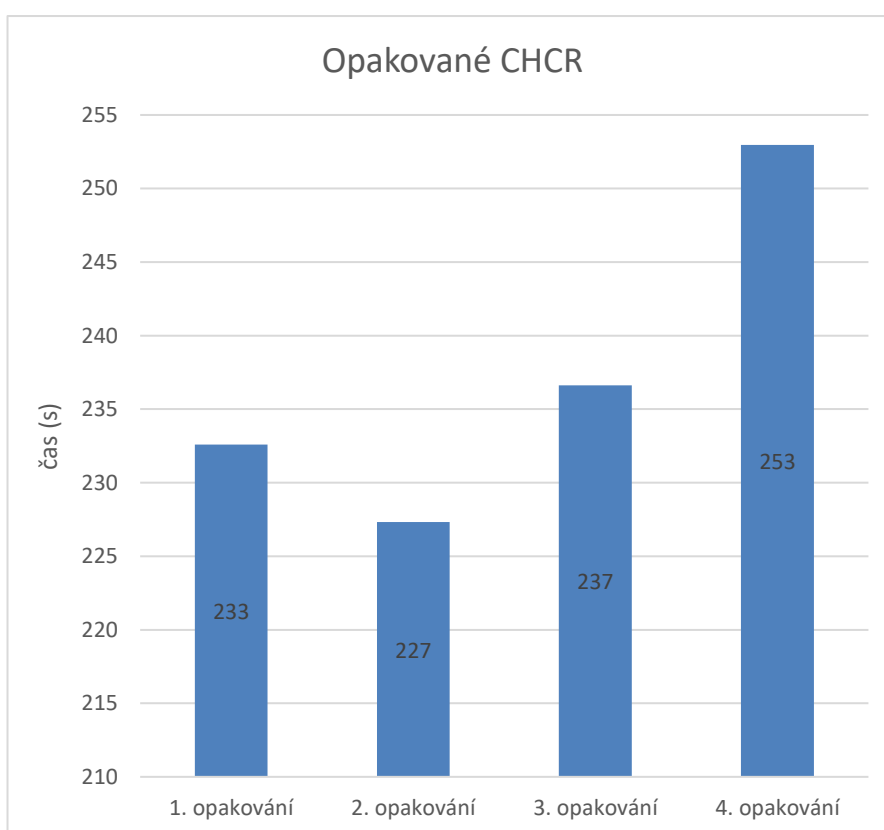
4.2. Vliv opakované expozice mrazu na dobu procitnutí (CHCR)

V druhé části experimentu jsme testovali, jestli má na dobu procitnutí z chill coma vliv opakovaná expozice teplotě -6°C . V tomto případě statistická analýza dat prokázala signifikantní vliv opakované expozice, přičemž efekt nebyl jen lineární (tab. 2). Opakovaná expozice měla za následek navyšování doby procitnutí. Průměrné hodnoty času potřebného k obnovení reakcí jedince jsou uvedeny v grafu č. 6.

Tabulka č. 2: Vliv pohlaví a opakované expozice brouků na délku trvání zotavení z chill coma (CHCR).

proměnná	F-hodnota	P-hodnota
pořadí měření	23.918	<0.001
pořadí měření ²	11.235	0.001
pohlaví	0.023	0.880
pohlaví : pořadí měření	0.278	0.600

Graf č. 6: Průměrné hodnoty času potřebného k procitnutí po opakované expozici



Po prvním opakování expozice (-6°C) se jedinci probouzeli průměrně po 3,8 minutách. Ve druhém opakování jsme zaznamenali pokles doby zotavení o několik málo vteřin. Naopak třetí opakování vykazovalo nárůst doby procitnutí mírně nad hodnotu prvního. Po čtvrtém opakování (chill coma) potřebovali jedinci v průměru o cca půl minuty déle k obnovení reakce na mechanickou stimulaci (procitnutí), než po druhém opakování. Rozdíl mezi minimální naměřenou hodnotou (182 s) a maximální (279 s) je něco málo přes minutu a půl.

5. Diskuse

Mění se teplota prostředí, jak uvádí řada studií po celém světě (např. Angilletta 2009, Menéndez 2007 či Deutsch et al. 2008), přímo ovlivňuje rozšíření a životaschopnost hmyzu. Je základním limitujícím parametrem růstu, aktivity a reprodukce (MacMillan & Sinclair 2011).

Měření chill coma recovery time je v současnosti vnímáno jako jede z možných ukazatelů míry odolnosti druhu vůči poraněním, která jsou způsobena mrazivými teplotami, neboť obnovení běžné aktivity po prožité strnulosti vyžaduje řadu koordinovaných pohybů. Metody získávání časových údajů CHCR však nejsou vždy stejné. Různorodost metodik je dána rozdílnými pohledy autorů na to, co je považováno za procitnutí z chill coma. Halleetal. (2015) například pokládá za důkaz procitnutí koordinované pohyby nohou (chůzi). Macdonald et al. (2004) pro změnu zaznamenával dobu otočení jedince z dorzální strany na ventrální. Jinou používanou metodou může být zaznamenávání první kontrakce abdominální části těla hmyzu, kterou popisuje Macmillan et al. (2012). V předchozím výzkumu jsme se snažili metodiku získávání časových prodlev procitnutí sluníček standardizovat. Metoda, kterou uvádí Macdonald et al. (2004), se pro zkoumaný druh *Harmonia axyridis* ukázala jako neefektivní. Řada jedinců se neotočila do správné polohy ani po dlouhé době (desítky minut, hodina), a tak bylo třeba metodu upravit pro efektivní získání dat. Nakonec byl zvolen postup, při kterém byli jedinci podněcováni k reakci mírným poklepáním pinzetou do podkladu. Tento mírný stimul umožnil zaznamenání i té nejjemnější reakce (např. napřímení tykadel). Jako osvědčená metoda byl postup opakován i v tomto experimentu.

Sinclair (2015) uvádí, že optimální počet najednou testovaných jedinců ve vzorku by se měl pohybovat od deseti do dvaceti. V našem experimentu jsme raději pracovali jen se šesti jedinci na vzorek, aby bylo docíleno co nejvyšší přesnosti záznamu první reakce.

Metodika výzkumu, kde jsme dospělé jedince *Harmonia axyridis* vystavovali opakovaně mrazivým teplotám (-6°C), by pro další experimenty potřebovala ještě lépe propracovat. K možnému zkreslení, resp. navýšení variability získaných dat, totiž mohlo dojít v rámci 15 minutového intervalu, kdy byly skupiny obvykle šesti jedinců v tomto rozmezí vkládány do klimaboxu. Při každém otevření totiž docházelo k navýšování vnitřní teploty klimaboxu teplotou v místnosti. To mohlo

ve výsledku způsobit cca o dva stupně vyšší průměrnou teplotu, která se tedy pohybovala okolo $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$, neboť námi používané klimaboxy (D009) nebyly schopné během 15 minut snížit vnitřní teplotu na požadovaných $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na druhou stranu byli této mírně vyšší teplotě vystaveni všichni testovaní jedinci, takže by zkreslení mohlo být zanedbatelné. Jednoduchým řešením, jak se vyhnout tomuto nežádoucímu jevu, je testování jedné skupiny (6) brouků podruhé. Tato metoda by však vyžadovala poněkud delší časovou dotaci. Podobný problém popisuje Hazell et al. (2008). V experimentu zaměřeném na CHC, CHCR, CT_{\min} a CT_{\max} , kde jako modelový organismus figurovala mšice broskvoňová (*Myzus persicae*), narazili autoři na problém se špatnou tepelnou vodivostí arén, ve kterých byly mšice testovány. Docházelo k nerovnoměrnému teplotnímu gradientu uvnitř arén, což mohlo též mírně zkreslit získaná data. Hazell et al. (2008) mimo jiné upozorňuje na možné interference při testování více jedinců v jedné aréně (v našem případě PM). Tomuto problému jsme však v našem experimentu předešli, neboť jedinci byli testováni v samostatných petriho miskách.

V této části experimentu byly před samotným testováním předpokládány dva scénáře výsledků. První scénář se opíral o myšlenku, že opakování expozice ($-6\text{ }^{\circ}\text{C}$) způsobí aklimační reakci, následkem které budou mít výsledné hodnoty klesající charakter, resp. že se zvyšujícím se počtem opakování bude klesat doba procitnutí z chill coma. Druhý scénář předpokládal rostoucí tendenci naměřených časů z důvodu akumulace fyziologických poškození následkem mrazu. Výsledky analyzovaných dat ukázaly, že na tuto problematiku nelze pohlížet jednoduchou optikou. Jak vyplývá z grafu č. 6, brouci se při druhém opakování expozice probouzeli z chill coma o něco rychleji než po expozici první. Naopak od druhého opakování doba procitnutí narůstala. Otázkou, která se v tomto směru nabízí, je, do jaké míry hraje v našich výsledcích roli aklimace a jakým dílem přispívá akumulace zranění získaných během expozice. Ve srovnání se studií Chapman (1998), jenž uvádí příklad vratné aklimace na *Drosophila melanogaster* (viz kapitola 1.6.2.), i v rámci vlastní intuice předpokládáme, že v prvních dvou opakování se jedinci stihli aklimatizovat na chladné podmínky, avšak opakované teplotní skoky (z $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ a zpět) navýšily u třetího a čtvrtého opakování čas probuzení z důvodu akumulace zranění z předešlých expozic. Bohužel se nepodařilo dohledat ve vědeckých článcích stejný, či alespoň obdobný experiment, tudíž je jakékoli srovnání s relevantními výsledky soudobé studie špatně

proveditelné. Mírnou analogii lze nalézt v práci Renault et al. (1999), ve které však bylo testováno chill coma v kontextu dlouhodobého přežívání pro modelový druh *Alphitobius diaperinus*, resp. počet dní přežívání po upadnutí do chill coma.

Z výsledků ontogenetické části výzkumu je patrné, že se dospělci sluněčka východního probouzí v průměru o 45 sekund dříve než larvální stádia. Tento jev si vysvětlujeme tím, že v přírodních podmínkách, pokud má samice správně synchronizované biologické hodiny s vnějším prostředím, dochází k zastavení reprodukčních pochodů v očekávání zimní diapauzy, tudíž larva není primárně (fyziologicky, morfologicky) stavěna na přezimování. Její odolnost vůči náhlým poklesům teploty by tedy měla být slabší než u dospělého.

Marais a Chown (2009) ve své studii též potvrzují, že vývojové stádium hmyzu má prokazatelný vliv na rychlost probuzení z chill coma. Autoři zkoumali teplotní odolnost *Paractora dreux* pomocí testování aklimace a následného probuzení z chill coma. Experimenty ukázaly signifikantní vliv ontogeneze ($P = <0,001$) a vliv interakce mezi aklimací a vývojovým stádiem. U larválních stádií vliv aklimace nebyl prokázán. Naopak u dospělců má aklimace podíl ($P = 0,044$) ve schopnosti rychlejšího probouzení z chill coma.

V konfrontaci s uvedenou studií Marais a Chown (2009) mohla v našem výzkumu hrát svou roli skutečnost, že v rámci ontogeneze došlo u vývojově starších jedinců (16 a 32 dní) během chovu v poměrně vysoké teplotě (26°C) k nevratné aklimaci na vyšší teplotu. Proto mohli ve výsledku starší jedinci vykazovat delší dobu procitnutí ze strnulosti. Výsledky aklimačních (aklimatizačních) studií Gibert & Huey (2001), Hoffmann et al. (2005) či Evans and Brust (1972) se vesměs jednomyslně shodují, že aklimace hraje velmi významnou roli ve schopnosti hmyzu tolerovat nízké teploty. Terblanche and Chown (2006) doplňují, že teplota zažitá v larválním stádiu se může významně promítnout v teplotní odolnosti dospělého.

V budoucích experimentech s *H. axyridis* by tedy nebylo od věci mírně snížit teplotu, při které jsou brouci chováni před samotným testováním chladové odolnosti (nejen pomocí metody měření CHCR), neboť aklimační reakce jedinců na teplotu během chovu se jeví jako nezanedbatelná.

6. Závěr

V této studii, realizované na podzim 2016, byly shromážděny výsledky experimentů zkoumajících teplotní odolnost invazního sluněčka východního (*Harmonia axyridis*). Praktická část výzkumu se odehrávala v laboratorních podmínkách v zázemí České zemědělské univerzity v Praze.

Stěžejní složkou studie bylo 213 jedinců sluněček, kteří se standardně vyvíjeli v teplotním režimu 26°C. Pro testování chladové odolnosti bylo využito metody měření tzv. chill coma recovery time, tedy zaznamenávání času procitnutí po vystavení chladnému prostředí (v tomto experimentu - 6 °C). Testování bylo rozděleno na dvě fáze. Ve fázi první byl zkoumán vliv ontogenetického stádia na rychlost procitnutí z chill coma. Fáze druhá byla zaměřena na rychlost probuzení po opakované expozici (stejně teplotě) dospělců. Data z obou fází experimentu, byla analyzována pomocí lineárních modelů s náhodnými efekty.

Analýzou dat byl prokázán signifikantní vliv ontogeneze na odolnost jedinců *H. axyridis* vůči mrazu ($P < 0,001$) i vliv opakované expozice ($P < 0,001$). V rámci ontogenetické části byl také nalezen náznak pohlavního dimorfismu- samci se probouzeli z komatu o trochu dříve než samice ($P = 0,026$). Vliv ostatních faktorů, např. interakce mezi stářím dospělého a jeho pohlavím, nebyl prokázán.

Stanovené cíle práce byly splněny. Studie prokázala vliv ontogenetického stádia na odolnost testovaného druhu *Harmonia axyridis*, stejně tak vliv opakované expozice chladu. Některé predikované scénáře výsledků experimentu byly potvrzeny, jiné vyvráceny.

Z hlediska dalších výzkumů by bylo vhodné vyladit metodické obtíže, které byly zaznamenány v průběhu sběru dat a jež mohly nepatrně zkreslit výsledná hodnocení.

Výsledky studie hodnotím kladně a mohou pomoci při dalších realizovaných experimentech na teplotní tolerance *Harmonia axyridis* či jiného zkoumaného druhu.

Reference

1. ABDELGHANY A. Y., AWADALLA S. S., ABDEL-BAKY N. F., EL-SYRAFI H. A. & FIELDS P. G., 2010: Effect of high and low temperatures on the Drugstore Beetle (Coleoptera: Anobiidae).- Journal of Economic Entomology 103: 1909 - 1914.
2. ACAR E. B., MILL D. D., SMITH B. N., HANSEN L. D. & BOOTH G. M., 2004: Calorespirometric determination of the effects of temperature on metabolism of *Harmonia axyridis* (Col: Coccinellidae) from second instars to adults.- Environmental Entomology 33: 832 - 838.
3. ADDO-BEDIAKO A., CHOWN S. L. & GASTON K. J., 2000: Thermal tolerance, climatic variability and latitude.- Proceedings of the Royal Society of London 267: 739 - 745.
4. ANDERSON R. L. & MUTCHMOR J. A., 1968: Temperature acclimation and its influence on the electrical activity of the nervous system in three species of cockroaches.- Journal of Insect Physiology 14: 243 - 251.
5. ANGILLETTA M. J., 2009: Thermal Adaptation: A theoretical and empirical synthesis.- Oxford University Press, Oxford.
6. BALE J. S., ALLEN C. M. & HUGHES G. E., 2009: Thermal ecology of invertebrate biological control agents: establishment and activity.- Third international symposium on biological control of arthropods (ISBCA) Christ Church, p. 8 - 13.
7. BEDNÁŘ J. & KOPÁČEK J., 2005: Jak vzniká počasí.- Karolinum, Praha.
8. BROWN P. M. J. [ed.], 2008: *Harmonia axyridis* in Europe: spread and distribution of a non-native coccinellid.- Biocontrol 53: 5 - 21.
9. CARRASCO M. A., BUECHLER S. A., ARNOLD R. J., SFORMO T., BARNES B. M. & DUMAN J. G. (2011). Elucidating the biochemical overwintering adaptations of larval *Cucujus clavipes puniceus*, a nonmodel organism, via high throughput proteomics.- Journal of proteome research 10: 4634 - 4646.
10. CASTRO C. F., ALMEIDA L. M. & PENTEADO S. R. C., 2011: The impact of temperature on biological aspects and life table of *Harmonia axyridis* (Pallas 1773) (Coleoptera: Coccinellidae).- Florida Entomologist 94: 923 - 932.
11. COLINET H., SINCLAIR B. J., VERNON P. & RENAULT D., 2015: Insects in fluctuating thermal environments.- Annual Review of Entomology 60: 123 - 140.

12. DANKS H. V., 1987: Insect dormancy: an ecological perspective.- Biological Survey of Canada (Terrestrial Artropods) 1: 439 - 439.
13. DEUTSCH C. A., TEWKSBURY J. J., HUEY R. B., SHELDON L. C., GHALAMBOR C. K., HAAK D. C. & MARTIN P. R., 2008: Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude.- Proceedings of the National Academy of Sciences 105: 6668 - 6672.
14. DUMAN J. G., 1980: Factors involved in overwintering survival of the freeze tolerant beetle, *Dendroides canadensis*.- Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology 136: 52 - 59.
15. DUNLAP J. C., LOROS J. & DECOURSEY P. J., 2004: Chronobiology: biological timekeeping.- Journal of Heredity, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts 91-92.
16. EVANS K. W. & BRUST R. A., 1972: Induction and termination of diapause in *Wyeomyia smithii* (*Diptera: Culicidae*), and larval survival studies at low and subzero temperatures.- The Canadian Entomologist 104: 1937 - 1950.
17. FRAZIER M. R., HUEY R. B. & BERRIGAN D., 2006: Thermodynamics constrains the evolution of insect population growth rates: "Warmer is better".- The American Naturalist 168: 512 - 520.
18. GAO J. P., CHAO D. Y. & LIN H. X., 2007: Understanding abiotic stress tolerance mechanisms: recent studies on stress response in rice.- Journal of Integrative Plant Biology 49: 742 - 750.
19. GARNER W. W. & ALLARD H. A., 1920: Effect of the relative length of the day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants.- Journal of Agricultural Research 18: 553 - 606.
20. GEHRING W. J. & WEHNER R., 1994: Heat shock protein synthesis and thermotolerance in *Cataglyphis*, an ant from the Sahara desert.- Proceedings of the National Academy of Sciences 92: 2994 - 2998.
21. GIBERT P. & HUEY R. B., 2001: Chill-coma temperature in *Drosophila*: effects of developmental temperature, latitude, and phylogeny.- Physiological and Biochemical Zoology 74: 429 - 434.
22. HAZELL S. P., PEDERSEN B. P., WORLAND M. R., BLACKBURN T. M. & BALE J. S., 2008: A method for the rapid measurement of thermal tolerance traits in studies of small insects.- Physiological Entomology 33: 389 - 394.

23. HEINRICH B., 1993: The hot-blooded insects: Strategies and mechanisms of thermoregulation.- Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
24. HODEK I., 2011: Adult diapause in *Coleoptera*.- *Psyche: A Journal of Entomology*
25. HODKOVA M. 1976: Nervous inhibition of corpora allata by photoperoid in *Pyrrhocoris apterus*, *Nature* 263: 521 - 523.
26. HODKOVA M. & HODEK I., 1997: Temperature regulation of supercooling and gut nucleation in relation to diapause of *Pyrrhocoris apterus* (L.)(*Heteroptera*).- *Cryobiology* 34: 70 - 79.
27. HOFFMANN A. A., SHIRRIFFS J. & SCOTT M. 2005. Relative importance of plastic vs genetic factors in adaptive differentiation: geographical variation for stress resistance in *Drosophila melanogaster* from eastern Australia. *Funct. Ecol.* 19: 222 - 227.
28. HOCHACHKA P. W. & SOMERO G. N., 2002: Biochemical adaptation: Mechanism and process in physiological evolution.- Oxford University Press, New York.
29. HOLMSTRUP M., BAYLEY M. & RAMLØV H., 2002: Supercool or dehydrate? An experimental analysis of overwintering strategies in small permeable arctic invertebrates.- *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 5716 - 5720.
30. CHAPMAN N. F., 1998: The Insects. Structure and Function (4th edition).- Cambridge University Press, Cambridge.
31. KNAPP M. 2017: ústní sdělení (vedoucí práce, pedagog České zemědělské univerzity v Praze, Kamýcká 129, 165 00 Praha 6) dne 10. dubna 2017.
32. KNIGHT C. A. & DUMAN J. G., 1986: Inhibition of recrystallization of ice by insect thermal hysteresis proteins: a possible cryoprotective role.- *Cryobiology*, 23: 256 - 262.
33. 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: 1 - 16.
34. KORDÍK D., 2000: Fyziologie hmyzu- učební texty, Biologická fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
35. KOŠTÁL V., BERKOVÁ P. & ŠIMEK, P., 2003: Remodelling of membrane phospholipids during transition to diapause and cold-acclimation in the larvae of *Chymomyza costata* (*Drosophilidae*).- *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 135: 407 - 419.

36. LAMANA M. L. & MILLER J. C., 1998: Temperature-dependent development in an Oregon population of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae).- Environmental Entomology 27: 1001 - 1005.
37. LOMBAERT E., GUILLEMAUD T., THOMAS C. E., HANDLEY L. J. L., LI J., WANG S., PANG H., GORYACHEVA I., ZAKHAROV I. A., JOUSSELIN E., POLAND R. L., MIGEON A., VAN LENTEREN J., DE CLERCQ P., BERKVENNS N., JONES W., ESTOUP A., 2011: Inferring the origin of populations introduced from a genetically structured native range by approximate Bayesian computation: case study of the invasive ladybird *Harmonia axyridis*.- Molecular ecology 20: 4654 - 4670.
38. MACMILLAN H. A. & SINCLAIR B. J., 2011: Mechanisms underlying insect chill-coma.- Journal of Insect Physiology, 57: 12 - 20.
39. MARAIS E. & CHOWN S. L., 2008: Beneficial acclimation and the Bogert effect.- Ecology Letters 11: 1027 - 1036
40. MARAIS E., TERBLANCHE J. S. & CHOWN S. L., 2009: Life stage related differences in hardening and acclimation of thermal tolerance traits in the kelp fly, *Paractora dreuxi* (Diptera, Helcomyzidae).- Journal of insect physiology 55: 336-343.
41. MELLANBY K., 1939: Low temperature and insect activity.- Proceedings of The Royal Society of London 127: 473 - 487.
42. MENAKER M., 1970: Rhythms, Reproduction, and Photoreception.- Biology of reproduction 4: 295 - 308.
43. MENÉNDEZ R., 2007: How are insects responding to global warming.- Tijdschrift voor Entomologie 150: 352 - 355.
44. MITTLER R., 2006: Abiotic stress, the field environment and stress combination.- Trends in Plant Science 11: 15 - 19.
45. MORGAN T. J. & MACKAY T. F. C., 2006: Quantitative trait loci for thermotolerance phenotypes in *Drosophila melanogaster*.- Heredity 96: 232 - 242.
46. MUKHERJEE A., KNUTSON A., HAHN D. A. & HEINZ K. M., 2014: Biological control of giant salvinia (*Salvinia molesta*) in a temperate region: cold tolerance and low temperature oviposition of *Cyrtobagous salviniae*.- BioControl 59: 781 - 790.

47. NALEPA C. A., KENNEDY G. G. & BROWNIE C., 2005: Role of visual contrast in the alighting behavior of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) at overwintering sites.- Environmental entomology 34: 425 - 431.
48. NEDVĚD O., 2012: Family affect in body mass and developmental time of *Harmonia axyridis*.- IOBC Bulletin 60: 57 - 59.
49. NEDVĚD O., 2014: Slunéčko východní (*Harmonia axyridis*)- pomocník v biologickém boji nebo ohrožení biodiverzity.- Certifikovaná metodika pro praxi, Jihočeská univerzita, České Budějovice.
50. NIJHOUT H. F. & EMLEN D. J., 1998: Competition among body parts in the development and evolution of insect morphology.- Proceedings of the National Academy of Sciences 95: 3685 - 3689.
51. PÖRTNER H. O., 2010: Oxygen - and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems.- Journal of Experimental Biology 213: 881 - 893.
52. RAAK-VAN DEN BERG C. L., HEMERIK L., de JONG P. W. & van LENTEREN J. C., 2012: Mode of overwintering of invasive *Harmonia axyridis* in the Netherlands.- BioControl, 57: 71 - 84.
53. RAAK-VAN DEN BERG C. L., HEMERIK L., de JONG P. W. & van LENTEREN J. C., 2012: Mode of overwintering of invasive *Harmonia axyridis* in the Netherlands.- BioControl, 57: 71 - 84.
54. RAAK-VAN DEN BERG C. L., de JONG P. W., HEMERIK L. & van LENTEREN J. C., 2013: Diapause and post-diapause quiescence demonstrated in overwintering *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) in northwestern Europe.- European Journal of Entomology 110: 584 - 585.
55. RANSBERRY V. E., MACMILLAN H. A. & SINCLAIR B. J., 2011: The relationship between chill-coma onset and recovery at the extremes of the thermal window of *Drosophila melanogaster*.- Physiological and Biochemical Zoology 84: 553 - 559.
56. RENAULT D., SALIN C., VANNIER G. & VERNON P., 1999: Survival and chill-coma in the adult lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae), exposed to low temperatures.- Journal of Thermal Biology 24: 229 - 236.

57. RICKARDS J., KELLEHER M. J. & STOREY K. B., 1987: Strategies of freeze avoidance in larvae of the goldenrod gall moth, *Epiblema scudderiana*: winter profiles of a natural population.- *Journal of Insect Physiology*, 33: 443 - 450.
58. RINEHART J. P., HAYWARD S. A., ELNITSKY M. A., SANDRO L. H., LEE R. E. & DENLINGER D. L., 2006: Continuous up-regulation of heat shock proteins in larvae, but not adults, of a polar insect.- *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 14223 - 14227.
59. RINEHART J. P., YOCUM G. D., CHIRUMAMILLA-CHAPARA N. I. T. H. A. & BOETEL M. A., 2009: Supercooling point plasticity during cold storage in the freeze-tolerant sugarbeet root maggot *Tetanops myopaeformis*.- *Physiological Entomology* 34: 224 - 230.
60. ROGERS S. M., MATHESON T., SASAKI K., KENDRICK K., SIMPSON S. J. & BURROWS M., 2004: Substantial changes in central nervous system neurotransmitters and neuromodulators accompany phase change in the locust.- *Journal of Experimental Biology* 207: 3603 -3617.
61. SAUNDERS D. S., STEEL C. G. H., VAFOUPOULOU X., LEWIS R. D., 2002: *Insect clocks*, Third edition.- Elsevier science B.V., Amsterdam, The Netherlands, 560 str.
62. SINCLAIR B. J., ALVARADO L. E. C. & FERGUSON L. V., 2015: An invitation to measure insect cold tolerance: methods, approaches, and workflow.- *Journal of thermal biology* 53: 180 - 197.
63. SMITH, L. B., 1970: Effects of cold-acclimation on supercooling and survival of the rusty grain beetle, *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens)(*Coleoptera: Cucujidae*), at subzero temperatures.- *Canadian Journal of Zoology* 48: 853 - 858.
64. SPOTILA J. R., LOMMEN P. W., BAKKEN G. S. & GATES D. M., 1973: A mathematical model for body temperatures of large reptiles: implications for dinosaur ecology.- *American Naturalist* 107: 391 - 404.

65. STRAHLER A. H., BOSCHETTI L., FOODY G. M., FRIEDL M. A., HANSEN M. C., HEROLD M. & WOODCOCK C. E., 2006: Global land cover validation: Recommendations for evaluation and accuracy assessment of global land cover maps.- European Communities, Luxembourg
66. TERBLANCHE J. S. & CHOWN S. L., 2006: The relative contributions of developmental plasticity and adult acclimation to physiological variation in the tsetse fly, *Glossina pallidipes* (Diptera, Glossinidae).- Journal of Experimental Biology 209: 1064 - 1073.
67. TEETS N. M. & DENLINGER D. L., 2014: Surviving in a frozen desert: Environmental stress physiology of terrestrial Antarctic arthropods.- Journal of experimental biology 217: 84 - 93.
68. UEDA H. R., HAGIWARA M. & KITANO H., 2001: Robust oscillations within the interlocked feedback model of *Drosophila* circadian rhythm.- Journal of Theoretical Biology 210: 401 - 406.
69. VINEBROOKE R. D., COTTINGHAM K. L., NORBERG M. S., DODSON S. I., MABERLY S. C. & SOMMER U., 2007: Impacts of multiple stressors on biodiversity and ecosystem functioning: the role of species co-tolerance.- Oikos 104: 451 - 457.
70. VOLNEY W. J. A. & FLEMING R. A., 2000: Climate change and impacts of boreal forest insects.- Agriculture, Ecosystems & Environment 82: 283 - 294.
71. WILLMER P. & STONE G., 1997: Temperature and water relations in desert bees.- Journal of Thermal Biology 22.6: 453 - 465.
72. YAGINUMA, T. & YAMASHITA O., 1978: Polyol metabolism related to diapause in Bombyx eggs: Different behaviour of sorbitol from glycerol during diapause and post-diapause.- Journal of Insect Physiology 24: 347 - 354.
73. YODER J. A., DENLINGER D. L. & WOLDA H., 1992: Aggregation promotes water conservation during diapause in the tropical fungus beetle, *Stenotarsus rotundus*.- Entomologia Experimentalis et Applicata 63: 203 - 205.

Internetové zdroje:

URL 1: <http://www.amet.cz/klima/svit.htm>

URL 2: <https://kof.zcu.cz/vusc/pg/termo09/thermodynamics/prilohy/t6.htm>

URL 3: <https://www.fotoaparar.cz/fotogalerie/fotografie/327334/nahled/>

Přílohy

Příloha č. 1: práce v laboratoři

