

**ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE**

**FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ**

Katedra ekologie



Bc. Sarah Maršíková

**Detekce parazitoidů v hostitelích: případ lumčíka *Dinocampus coccinellae* ve sluněčku *Harmonia axyridis***

Parasitoid detection in insect hosts: the case of *Dinocampus coccinellae* wasp parasiting *Harmonia axyridis* ladybirds

**Diplomová práce**

Vedoucí práce: doc. Ing. Michal Knapp, Ph.D.  
Konzultant práce: Ing. Michal Řeřicha, Ph.D.

© 2024 ČZU v Praze

# ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Sarah Maršíková

Ochrana přírody

Název práce

**Detekce parazitoidů v hostitelích: případ lumčíka *Dinocampus coccinellae* ve sluněčku *Harmonia axyridis***

Název anglicky

**Parasitoid detection in insect hosts: the case of *Dinocampus coccinellae* wasp parasiting *Harmonia axyridis* ladybirds**

### Cíle práce

Cílem práce bude vypracovat literární rešerši na téma detekce parazitoidů v hostitelích (živých, mrtvých, zkamenělých). Specificky bude věnována pozornost různým technikám využitelným pro takovou detekci a vztahu mezi lumčíkem *Dinocampus coccinellae* a jeho hostiteli (sluněčky). V praktické části práce bude ověřována přítomnost larev lumčíků v dospělých sluněčka východního (*Harmonia axyridis*) a to především pomocí metody pitvání usmrčených či přirozeně zemřelých hostitelů.

### Metodika

Literární rešerše bude vypracována na základě vědeckých článků dohledaných v databázi Web of Knowledge, využity ovšem mohou být i ostatní zdroje jako např. vědecké monografie či popularizační články v ČJ.

Praktická část se bude skládat z několika pokusů, přičemž v hlavním pokusu bude diplomantka chovat sluněčka a uměle je infikovat lumčíky *Dinocampus coccinellae* za účelem následného sledování vývoje larev lumčíků (pitvání budou hostitelé 10, 15 a 20 dní po parazitaci). V navazující části bude zkoumána přítomnost larev lumčíků v hostitelích, kteří zemřeli po možné (přírodní populace) či řízené parazitaci (laboratorní jedinci) lumčíkem. Cílem této části bude zjistit, zda zvýšená mortalita může souviset s neúspěšným vývojem parazitoida uvnitř hostitele. Pomocí jednoduchých statistických metod budou analyzovány především následující faktory: umístění larvy lumčíka uvnitř těla hostitele, stáří larvy lumčíka (instar) při úmrtí hostitele, vliv pohlaví hostitele na úspěšnost vývoje lumčíka. Jako doplňující analýza bude zkoumán vztah mezi imunitním systémem hostitele (koncentrace hemocytů) a výskytem lumčíka v jeho těle.

**Doporučený rozsah práce**

cca 40 stran textu + přílohy dle potřeby

**Klíčová slova**

larvální stádium, parazitoid, identifikace, mortalita hostitele, fyziologické markery

---

**Doporučené zdroje informací**

- Franck, P., Maalouly-Mata, M., Olivares, J., 2017: Molecular Tools for the Detection and the Identification of Hymenoptera Parasitoids in Tortricid Fruit Pests. *Int J Mol Sci.* 22: 2031.
- Hall, A.A.G., Steinbauer, M.J., Taylor, G.S., Johnson, S.N., Cook, J.M., Riegler, M., 2017: Unravelling mummies: cryptic diversity, host specificity, trophic and coevolutionary interactions in psyllid – parasitoid food webs. *BMC Evol. Biol.* 17: 127.
- Knapp, M., Řeřicha, M., Maršíková, S., Harabiš, F., Kadlec, T., Nedvěd, O., Teder, T., 2019: Invasive host caught up with a native parasitoid: field data reveal high parasitism of *Harmonia axyridis* by *Dinocampus coccinellae* in Central Europe. *Biological Invasions* 9: 2795–2802.
- Strand M. R., 2014: Teratocytes and their functions in parasitoids. *Current Opinion in Insect Science* 6: 68-73.
- van de Kamp, T., Schwermann, A.H., Dos Santos Rolo, T., Lösel, P.D., Engler, T., Etter, W., Faragó, T., Göttlicher, J., Heuveline, V., Kopmann, A., Mähler, B., Mörs, T., Oda, J., Rust, J., Tan Jerome, N., Vogelgesang, M., Baumbach, T., Krogmann, L., 2018: Parasitoid biology preserved in mineralized fossils. *Nat. Commun.* 28: 3325.

---

**Předběžný termín obhajoby**

2023/24 LS – FŽP

**Vedoucí práce**

doc. Ing. Michal Knapp, Ph.D.

**Garantující pracoviště**

Katedra ekologie

Elektronicky schváleno dne 20. 3. 2024

**prof. Mgr. Bohumil Mandák, Ph.D.**

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 21. 3. 2024

**prof. RNDr. Michael Komárek, Ph.D.**

Děkan

V Praze dne 22. 03. 2024

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma: “Detekce parazitoidů v hostitelích: případ lumčíka *Dinocampus coccinellae* ve slunéčku *Harmonia axyridis*” vypracovala samostatně a citovala jsem všechny informační zdroje, které jsem v práci použila a které jsem rovněž uvedl/a na konci práce v seznamu použitých informačních zdrojů.

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

Jsem si vědoma, že odevzdáním diplomové práce souhlasím s jejím zveřejněním podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a to i bez ohledu na výsledek její obhajoby.

Svým podpisem rovněž prohlašuji, že elektronická verze práce je totožná s verzí tištěnou a že s údaji uvedenými v práci bylo nakládáno v souvislosti s GDPR.

V Jičíně dne 27.3.2024

.....

Sarah Maršíková

## **Poděkování**

V první řadě bych chtěla nesmírně poděkovat svým rodičům, kteří i přes nekonečná léta mého vysokoškolského studia věřili, že to jednoho dne úspěšně dotáhnu do konce, kteří mi projevovali podporu po celou dobu mého studia a kteří se mnou prožívali veškeré radosti a strasti běžného i studijního života. Dále bych ráda poděkovala Týmu ekologie hmyzu, hlavně těm členům, kteří se podíleli na sběru dat. Jmenovitě bych chtěla poděkovat Ing. Michalu Řeřichovi, Ph.D. za poskytnutí některých analýz využitých v mé diplomové práci. Další poděkování patří prof. Mgr. Janu Růžičkovi, Ph.D., bez jehož ochoty a pomoci by nevznikly krásné detailní fotografie larev parazitoidů uvedené v této práci. Obrovské díky rozhodně patří doc. Ing. Michalu Knappovi, Ph.D., mému školiteli, jenž mě dovedl do cíle, byl vždy vstřícný a ochotný se vším pomoci a poradit. Poslední poděkování patří mému nejmilejšímu Ing. Miroslavu Seidlovi, Ph.D., který se mnou intenzivně prožíval každý moment studia i běžného života několik posledních let.

## Abstrakt

Parazitoidi jsou nedílnou součástí ekosystému, ovlivňují tok energií a jsou schopni v relativně krátkém čase efektivně zmenšit populaci svého hostitele. Jejich provázanost s konkrétními druhy hostitelů je činí účinným nástrojem pro biologickou kontrolu škůdců.

První část mé diplomové práce byla zpracována formou literární rešerše, která krátce představuje parazitoidy, jejich životní cykly a životní strategie, vzájemnou koevoluci parazitoidů a hostitelů a způsoby využití parazitoidů člověkem. Větší část rešerše je věnována metodám detekce parazitoidů v živých i mrtvých hostitelích. Jsou zde zahrnuty jak konvenční metody (odchov a pitva), tak moderní metody, kam řadíme metody molekulární či rentgenové. Závěr rešerše představuje dva zkoumané druhy, parazitoida *Dinocampus coccinellae* (Schrank, 1802) (Hymenoptera: Braconidae) a slunéčko východní (*Harmonia axyridis*) (Pallas, 1773) (Coleoptera: Coccinellidae).

Rešeršní část je doplněna o vlastní výzkum, který se snažil pomocí pitvy prokázat, zda se v uhynulých jedincích slunéčka východního nachází larvální stádia parazitoida *Dinocampus coccinellae*. Tento experiment sestával z terénní i laboratorní části, které probíhaly mezi lety 2022-2024. V prvním roce byly sesbírány desítky slunéček, jejichž potomci byli uměle odchováni a následně uměle infikováni, usmrcováni po 10,15 a 20 dnech od infekce a poté pitváni. Jako další část dat byla pitvána slunéčka z volné přírody, která zemřela během 4 týdnů následného laboratorního chovu (za účelem líhnutí parazitoidů). Poslední část jedinců k pitvě byla poskytnuta Týmem ekologie hmyzu z experimentu, kde se pro slunéčka z přírody zkoumaly fyziologické parametry jejich hemolymfy. Kromě potvrzení či vyloučení přítomnosti parazitoida byla sbírána i doprovodná data, jako například uložení parazitoida v těle hostitele, pohlaví hostitelů či které instary parazitoidů se v hostitelích nacházely nejčastěji.

Pitvy potvrdily, že se v některých uhynulých hostitelích nacházela larvální stádia lumčičků *Dinocampus coccinellae*. Parazitoidi byli nalezeni u 4,92 % jedinců. Pitvy cíleně infikovaných a usmrcených jedinců napomohly popsat, jak vypadají jednotlivé instary tohoto parazitoida a pořídit jejich kvalitní fotografie. Analýza uložení parazitoidů v těle hostitele neprokázala, že by se larvy zdržovaly pouze v určité části, neboť byly nalézány ve všech částech hostitelského těla s mírnou preferencí břišní části abdomenu. Nejčastějším instarem v uhynulých hostitelích byl 1. instar, nejméně častý byl pak poslední 3. instar. Analýza

poměru pohlaví hostitelů neprokázala, že by se uhynulí parazitoidi vyskytovali přednostně u některého pohlaví hostitelů. Poslední analýzou jsem se pokusila zjistit, zda je nějaký vztah mezi infikací hostitele a počtem hemocytů v hemolymfě. Hemocyty slouží mimo jiné i jako buňky imunitního systému a jejich zvýšený počet by mohl být prvotní známkou infekce parazitoidem. Tato domněnka však byla vyvrácena.

**Klíčová slova:**

larvální stádium, parazitoid, identifikace, mortalita hostitele, fyziologické markery

## Abstract

Parasitoids are an integral part of the ecosystem and can efficiently reduce the population of their hosts within a relatively short period of time. Their preference of specific host species makes them effective tool in agriculture for the biological pest control.

The first part of my thesis consists of literature review briefly introducing parasitoids, their life cycles, and strategies, the coevolution between parasitoids and hosts, and human utilization methods. The majority of the review primarily focuses on parasitoid detection methods in both live and dead hosts, encompassing conventional techniques such as rearing and dissection, as well as modern approaches including molecular and radiographic methods. The last part of the review introduces two studied species: *Dinocampus coccinellae* (Schrank, 1802) (Hymenoptera: Braconidae) and the asian ladybird (*Harmonia axyridis*) (Pallas, 1773) (Coleoptera: Coccinellidae).

The research section is supplemented by my own study, which attempted to demonstrate through dissection whether larval stages of the parasitoid *Dinocampus coccinellae* were present in deceased individuals of the ladybird beetle. This experiment consisted of both field and laboratory components conducted between 2022 and 2024. In the first year, dozens of ladybird beetles were collected, and their offspring were artificially reared and subsequently artificially infected, euthanized after 10, 15, and 20 days post-infection, and then dissected. Additionally, ladybird beetles from the wild that died within 4 weeks of subsequent laboratory rearing (for the purpose of parasitoid emergence) were dissected. The final group of individuals for dissection was provided by the Insect Ecology Group from an experiment where physiological parameters of their hemolymph were examined. In addition to confirming or excluding the presence of the parasitoid, accompanying data were collected, such as the location of the parasitoid within the host's body, the gender of the hosts, and which instars of the parasitoid were most commonly found in the hosts.

The dissections confirmed that larval stages of *Dinocampus coccinellae* were present in some deceased hosts. Parasitoids were found in 4.92% of individuals. Dissections of intentionally infected and euthanized individuals helped describe the appearance of the individual instars of this parasitoid and obtain high-quality photographs of them. Analysis of the location of parasitoids within the host's body did not indicate that the larvae were confined to a specific area, as they were found in all parts of the host's body with a slight



preference for the abdominal region. The most common instar in deceased hosts was the 1st instar, while the least common was the final 3rd instar. Analysis of the gender ratio of hosts did not indicate a preference for deceased parasitized hosts among any particular gender. Lastly, I attempted to determine if there was any relationship between host infection and the number of hemocytes in the hemolymph. Hemocytes serve, among other things, as cells of the immune system, and an increased number could be an initial sign of parasitoid infection. However, this hypothesis was refuted.

**Key words:**

larval stage, parasitoid, identification, host mortality, physiological markers

## Obsah

1 Úvod .....	12
1.1 Parazitoidi .....	13
1.1.1 Životní cykly a životní strategie parazitoidů .....	13
1.1.2 Vzájemná koevoluce parazitoida a hostitele .....	14
1.1.3 Parazitoidi ve službách člověka .....	16
1.2 Detekce parazitoidů v hostitelích .....	17
1.2.1 Identifikace parazitoida v různých vývojových fázích hostitele .....	18
1.2.2 Odchov .....	20
1.2.3 Pitva .....	20
1.2.4 Behaviorální změny hostitele .....	20
1.2.5 MikroCT .....	21
1.2.6 Teratocyty .....	22
1.2.7 Identifikace parazitoida v mrtvém hostiteli .....	23
1.3 Molekulární metody využívané k identifikaci parazitoidů v hostitelích .....	24
1.3.2 Mikrosatelity .....	24
1.3.3 PCR-RFLP .....	25
1.3.4. PCR-AFLP .....	25
1.3.5 RAPD-PCR .....	26
1.3.6 Multiplexování .....	26
1.4 <i>Harmonia axyridis</i> vs <i>Dinocampus coccinellae</i> .....	27
1.4.1 <i>Harmonia axyridis</i> .....	27
1.4.2 <i>Dinocampus coccinellae</i> .....	29
1.4.3 <i>Harmonia axyridis</i> vs <i>Dinocampus coccinellae</i> v ČR .....	31
2 Metodika .....	33
2.1 První fáze experimentu .....	33
2.1.1 Příprava experimentu .....	33
2.1.2 Infikační proces .....	34
2.1.3 Pitvání cíleně usmrcených slunéček .....	35
2.1.4 Doprovodná data .....	36
2.2 Druhá fáze experimentu .....	37
2.3 Statistická analýza dat .....	38
3 Výsledky .....	38
3.1 Uložení parazitoida v těle slunéčka .....	39
3.2 Poměr mezi infikovanými, neinfikovanými a neúspěšně infikovanými slunéčky .....	41

3.3 Poměr samců a samic neúspěšně infikovaných sluníčků.....	42
3.4 Poměr jednotlivých instarů parazitoidů.....	42
3.5 Závislost mezi infekcí a počtem hemocytů .....	43
4 Diskuze .....	45
5 Závěr.....	49
6 Přehled literatury a použitých zdrojů .....	50
7 Seznam obrázků a příloh.....	60
8 Přílohy .....	62

# 1 Úvod

Studium ekologie hmyzu, tedy vztahu a chování hmyzu vůči svému okolí, nabylo na oblíbenosti až v poslední době ve srovnání například s ekologií velkých savců či ptáků. Důvodem může být například složitost sběru dat a následné analýzy, které se u rychle přizpůsobujícího hmyzu mohou dělat mnohem složitěji a zdlouhavěji.

Se zdokonalující se technologií a metodologií výzkumu se už do popředí ovšem posouvá i ekologie hmyzu. Ekologie každého druhu hmyzu se více či méně liší a je tedy nadmíru jasné, že prozkoumat nároky, potřeby a celý životní cyklus tak komplexní skupiny bude časově velice náročné, neboť mluvíme u hmyzu o milionu druhů popsanych (přibližně 350 000 tvoří brouci) a o zdánlivě dalších milionech nepopsaných. Udává se, že hmyz tvoří až 90 % současných živočišných druhů.

Já se rozhodla své studium věnovat broukům z čeledi slunéčkovitých (*Coccinellidae*), konkrétně slunéčku sedmítečnému (*Coccinella septempunctata*) (Linnaeus, 1758) a slunéčku východnímu (*Harmonia axyridis*) (Pallas, 1773). Ve své bakalářské práci jsem se věnovala shrnutí biologie výše zmíněných slunéček a jejich parazitaci parazitoidem z řádu blanokřídlých, lumčíkem *Dinocampus coccinellae* (Schrank, 1802), která byla doplněna o experimentální část zkoumající míru parazitace obou druhů slunéček. Zkoumány byly biotické i abiotické faktory úspěšné parazitace a možné preference hostitelů. Tato data dala vzniknout článku s názvem **Invasive host caught up with a native parasitoid: field data reveal high parasitism of *Harmonia axyridis* by *Dinocampus coccinellae* in Central Europe** (viz. Příloha 10) publikovanému v žurnálu *Biological Invasions*.

Během tohoto výzkumu byla slunéčka mezi lety 2016–2019 sbírána z přírody ČR a Estonska a následně chována v laboratoři, kde se čekalo na vylíhnutí parazitoidů, abych zhodnotila procento infikace. Infikovaná slunéčka po vylíhnutí parazitoida zpravidla zahynula. Během tohoto výzkumu jsem si všimla, že i přes veškerou péči (krmení, voda, čistota) některá slunéčka zahynula bez zřejmých příznaků infikace lumčíkem, přesto mě napadlo, že ve skutečnosti mohla být infikována, jen nedošlo k úplnému dovyvinutí lumčíka. To mě přivedlo na myšlenku, jak je možné detekovat parazitoidy v hostitelích a rozhodla jsem se tomuto tématu věnovat ve své diplomové práci. Cílem rešeršní části tedy bude shrnutí základních poznatků o parazitoidech a jejich možné detekci v hostitelích (živých i mrtvých). Pozornost bude věnována jak klasickým metodám, kterými jsou například pitva

či odchov hostitelů, tak i moderním metodám, kam řadíme například molekulární metody či MikroCT. Rešeršní část bude doplněna o experiment se sluněčkem východním a lumčíkem *Dinocampus coccinellae*, ve kterém bude zkoumána míra neúspěšné parazitace mezi výše zmíněnými druhy.

## 1.1 Parazitoidi

Téměř 10 % popsaných druhů hmyzu tvoří parazitoidi, kteří se významně podílí na potravním řetězci a ovlivňují jeho stabilitu a tok energií (Lafferty et al. 2008). Nejpočetnějším řádem mezi parazitoidy jsou bezesporu blanokřídlí (Hymenoptera), kteří spolu s dvoukřídlími (Diptera) tvoří přibližně 75 % parazitoidů. Dalšími řády, mezi kterými můžeme nalézt parazitoidy jsou brouci (Coleoptera), síťokřídlí (Neuroptera), motýli (Lepidoptera), chrostíci (Trichoptera) a řáskokřídlí (Strepsiptera) (Eggleton et Belshaw 1992).

### 1.1.1 Životní cykly a životní strategie parazitoidů

Parazitoidi jsou bezesporu zajímavou skupinou s ještě zajímavější životní strategií. Na rozdíl od parazitů se juvenilní stádia vyvíjejí pouze na jednom hostiteli, kterého až na výjimky ukončení jejich vývoje zabíjí, smrtelně mrzačí nebo se hostitel stává sterilním (Poulin et al. 2015, Lenteren et Godfray 2005). K infekci hostitele dochází pomocí trubicovitého orgánu zvaného ovipozitor, pomocí kterého samice klade vajíčka. Parazitoidi prochází proměnou dokonalou a svůj vývoj uskutečňují uvnitř nebo vně svého hostitele, dělíme je tedy na endoparazitoidy a ektoparazitoidy. Jsou i některé druhy parazitoidů, jejichž larvy aktivně svého hostitele vyhledávají. Příkladem může být rod prskavec z čeledi střevlíkovitých (Carabidae: Brachininae), jehož první instar hledá své hostitele mezi kvapníky (Carabidae: Harpalus). Aktivně vyhledává jeho kuklu, kterou začne postupně požírat a po přechodu do druhého instaru se stává méně pohyblivým (Saska et Honek 2004). Endoparazitoidi uskutečňují svůj vývoj uvnitř hostitele, ektoparazitoidi se vyvíjejí na nebo v blízkosti hostitele. V obou případech se larvy živí tělními šťávami a orgány hostitelů (Strand 2014). Zprvu se živí méně důležitými orgány, aby svého hostitele nezabili a stihli se tak plně dovyvinout, poté se mohou dostat k životně důležitým orgánům a hostitele usmrcují (Lenteren et Godfray 2005). Dospělci parazitoidů bývají zpravidla plně okřídleni a živí se nektarem, pylem nebo predují na jiných bezobratlých (Heimpel 2019).

Dalším zajímavým faktem z jejich životní strategie je možnost ovlivnit hostitelovo chování ve svůj prospěch pomocí hormonů nebo toxinů. V tomto případě můžeme parazitoidy dělit na idiobionty a koinobionty. Idiobionti jsou zpravidla ektoparazitoidi, kteří hostitele trvale parazitují a zabraňují mu v dalším vývoji a pohybu. Ektoparazitoidi bývají zpravidla připevnění ke kutikule hostitele a například svlek kutikuly či běžný pohyb hostitele by mohl parazitoida poranit či zabít. Nejčastěji se jedná o parazitaci velkých hostitelů a larvální vývoj je poměrně krátký. Koinobionty naproti tomu nacházíme hlavně mezi endoparazitoidy, kteří své hostitele paralyzují jen krátkodobě, ve vývoji mu nezabraňují, a naopak mohou částečně ovládat jeho pohyb, za účelem nevystavování hostitele nebezpečí pozření predátorem (Kathirithamby 2008). Tento fenomén se vyvinul nezávisle na sobě u všech výše zmíněných řádů parazitoidů (Poulin et al. 2015).

### 1.1.2 Vzájemná koevoluce parazitoida a hostitele

Parazitoid je schopný velice rychle zmenšit populaci hostitele a tím na sebe parazitoid s hostitelem na sebe navzájem vyvíjí silný selektivní tlak, kdy začíná doslova běh o život. O takové situaci ekologové mluví jako o efektu červené královny, kdy se obě strany snaží navzájem předhonorit ve vzájemné koevoluci pomocí nejrůznějších evolučních a behaviorálních procesů (Leavell et al. 2019). Koevoluce může být ovlivněna i změnou biotických a abiotických faktorů, které mohou změnit například reprodukční cykly, sezonalitu či délku vývoje obou participantů, čímž může docházet k mikroevolučním procesům, kterými se snaží s novými podmínkami vypořádat (Dury et al. 2011). Příkladem může být *Asobara tabida* (Nees, 1834) (Hymenoptera: Braconidae), parazitoid octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*) (Fallén, 1823) (Diptera: Drosophilidae), u kterého se vyvinulo několik fenotypů mající odlišnou diapauzu, poměr pohlaví či preferenci hostitele, jakožto předpoklad zvýšení úspěšnosti parazitace (Kraaijeveld et Wel 1994).

Většina parazitoidů je velice úzce specializována na jeden či několik málo druhů hostitelů, které vyhledávají pomocí vizuálních, akustických a předně chemických signálů (Forbes et al. 2018, Gross 1993). Někteří hostitelé se v reakci na parazitoida postupně vyvíjejí například zpevněním kutikuly, na kterou následně parazitoid reaguje například zpevněním či prodloužením ovipozitoru (Forbes et al. 2018).

Ke změnám nemusí docházet nutně pouze na úrovni parazitoid-hostitel, ale dochází k nim i na tritrofické úrovni, příkladem je vztah mezi živnou rostlinou hostitele, hostitelem a parazitoidem. Pokud je živná rostlina napadena fytofágním škůdcem, vypouští do prostoru látky zvané HIPV (herbivore-induced plant volatiles), které slouží primárně jako repelenty pro býložravce, zároveň se je ale parazitoidi naučili vnímat jako signál přítomnosti potencionálního hostitele a slouží tedy i jako atraktanty parazitoidů (Shiojiri et Takabayashi 2003). Jako formu obrany proti parazitoidovi může hostitel přejít na jinou hostitelskou rostlinu, v jejíž blízkosti se parazitoid nevyskytuje. Většinou je v takovém případě snížené hostitelovo fitness, které ale kompenzuje nepřítomnost parazitoida (Diamond et Kingsolver 2010). Jsou případy, kdy se parazitoidovi podařilo hostitele znovu objevit a díky možné změně v hostitelově těle nebo vlivem toxinů z nové rostliny se parazitoidi musí hostitelovi opět přizpůsobit a závod začíná nanovo (Thompson 1996).

U parazitoidů i jiných bezobratlých není výjimečná záležitost, že svého hostitele zcela zamění za jiného. Zpravidla se ovšem jedná o druh, který je buď fylogeneticky nebo ekologicky příbuzný s původním druhem hostitele (Messina 2004). Smith et al. (2007) během svého výzkumu zjistili velice zajímavou změnu hostitele. Hrobařík *Nicrophorus pustulatus* (Herschel, 1808) (Coleoptera: Silphidae) využíval ke svému rozmnožování mršiny menších rozměrů, které zahrabával do země. Následně v blízkosti mršiny kladl vajíčka a larvy se po vylíhnutí začaly žít na předložené mršině. Ve svém výzkumu ale prokázali, že tento hrobařík začal v Severní Americe využívat snůšky vajec užovky tečkované (*Diadophis punctatus*) (Linnaeus, 1766) (Squamata:Colubridae). Zpravidla pak celá snůška vajec byla larvami hrobaříka zničena, čímž se z hrobaříka stal v uvozovkách parazitoid. Takto velká změna může mít za následek rychlou přeměnu ekosystému a drastické snížení počtů užovky tečkované, popřípadě jiných hadích druhů vyskytujících se na dané lokalitě.

Přítomnost nového parazitoida může v širším pohledu způsobit celou kaskádu změn v daném ekosystému, neboť jeho přítomnost může ovlivnit původní druhy parazitoidů i hostitelů, jejich životní cykly a strategie. Předpokládané oteplení planety o 3,9 °C koncem 21. století bude mít pravděpodobně obrovský vliv na veškerou entomofaunu, která změní strukturu populací na různých trofických úrovních, například mezi herbivory a rostlinami, predátory a kořistí a v neposlední řadě mezi parazitoidy a hostiteli (Liu et Raftery 2021, Damien et Tougeron 2019). Příkladem může být oteplování v mírném pásmu Severní Ameriky, které mělo za následek rychlý nárůst populace můry pouzdorvníčka modřínového (*Coleophora laricella*) (Hübner, 1817) (Lepidoptera: Coleophoridae), škůdce modřínů, jehož počty byly udržovány pomocí dvou introdukovaných parazitoidů *Agathis pumila* (Ratzeburg)

(Hymenoptera: Braconidae) a *Chrysocharis laricinellae* (Ratzeburg) (Hymenoptera: Eulophidae), kterým ovšem oteplení nevyhovovalo a míra parazitace se zmenšila, tudíž byl nárůst počtu pouzdrovníčka nevyhnutelný (Ward et al. 2020).

Z důvodů neustálého vývoje ekosystémů, trofických úrovní, globálních změn počasí i teplot je nesmírně důležité umět včas rozpoznat nové situace a predikovat, co se s přírodou bude dále dít. Napomoci tomu může i včasné odhalení parazitoida, ideálně i jeho určení do přesného druhu. Takové zjištění může napomoci odhalit změny biodiverzity daného ekosystému a ideálně včas podniknout důležité kroky, které pomohou jejímu zachování.

### 1.1.3 Parazitoidi ve službách člověka

Až 10 % popsaných druhů hmyzu tvoří parazitoidi (Lafferty et al. 2008). Ti jsou schopni ve velmi krátkém čase zmenšit populaci svého hostitele na dané lokalitě (Leavell et al. 2019). Protože jsou parazitoidi zpravidla vázáni na jeden či několik málo druhů hostitelů, využívá lidstvo jejich služeb v biologické kontrole (použití živých organismů v boji proti škůdcům) (Forbes et al. 2018).

Nejrozšířenějším způsobem jejich využití je eliminace škůdců polních plodin. Parazitoid daného škůdce je jednou nebo opakovaně introdukován na požadovanou zemědělskou půdu, kde má za úkol úplně zneškodnit nebo alespoň co nejvíce snížit počet škůdců. Jedná se o levnou, časově nenáročnou formu eliminace škůdců bez použití drahých syntetických insekticidů, což je hlavně v dnešní době obrovským pozitivem jak v očích samotných zemědělců, tak v očích prostého lidu, neboť je dnes více než kdy jindy ceněno šetrné a ekologické pěstování plodin (Naranjo et al. 2015). Například v neotropické oblasti (Střední a Jižní Amerika) je až na 45 % zemědělských ploch využíváno pouze parazitoidů k eliminaci škůdců a na pouhých 11 % zemědělských ploch jsou používány chemické postřiky (Parra 2014).

Parazitoidi nejsou využíváni pouze v zemědělství. Lidé přišli na několik způsobů, jak jejich služeb využít. Na zajímavý způsob využití přišli například v Přírodopisném muzeu v Londýně, kde mohou návštěvníci zavítat do motýlího pavilonu, kde se ročně vyskytuje až 500 vzácných motýlů ze všech koutů Země. Hlavními škůdci, kteří by mohli motýly ohrozit jsou mšice (Aphidoidea), které se zde mohou rychle rozmnožit a zlikvidovat živné rostliny potřebné pro vývoj housenek i pro dospělé motýly. V tomto muzeu začali k likvidaci mšic využívat dva druhy brakonických vosiček, *Aphidius colemani* a *Aphidius ervi* (Esenbeck 1818)



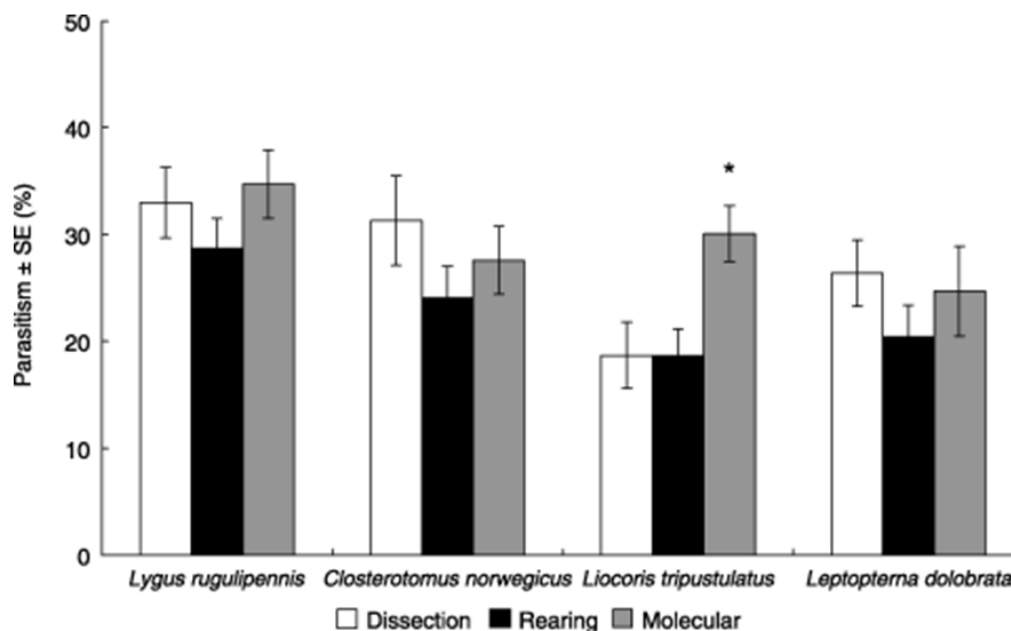
(Hymenoptera: Braconidae). Ti jsou parazitoidy nymf mšic a jsou schopní v krátkém čase zredukovat jejich populaci na minimum (Jennifer P. 2017).

Dalším zajímavým příkladem z muzejního prostředí je využití parazitoidů v boji proti červotočům a molům, kteří mohou postupně znehodnotit či dokonce úplně zničit cenné muzejní sbírky. V muzeích v Německu a v Rakousku už přes 10 let využívají pomoci vosiček *Baryscapus tineivorus* (Ferrière, 1941) a *Trichogramma evanescens* (Westwood, 1833) jako biologické kontroly šatních molů, kteří jsou zde škůdci historických vozidel, které často obsahují vlněné či hedvábné potahy, které jsou často právě díky molům poničené a znehodnocené. Proti červotočům, kteří škodí primárně na výstavních skříních a v krovech budov jako spolehlivou biologickou ochranu používají vosičku *Lariophagus distinguendus* (Förster, 1841) (Hymenoptera: Pteromalidae) (Biebl and Auer 2017).

## 1.2 Detekce parazitoidů v hostitelích

Způsobů využití parazitoidů je mnoho a mnoho jich určitě ještě objeveno nebylo. Pro stanovení úspěšné parazitace a míry parazitace (tedy i zvolení vhodného parazitoida) je potřeba prvně zvládnout detekci parazitoidů v hostitelích. Míra parazitace je vhodným ukazatelem úspěšnosti biologické kontroly (Hawkins et al. 1993).

Způsobů, jak parazitoida detekovat je hned několik. Mezi konvenční metody patří odchov hostitelů odchycených z přírody nebo jejich pitva. Tyto metody mohou být ovšem mnohdy nesměrodatné, protože při nich může dojít k chybnému stanovení míry parazitace či k chybě při identifikaci parazitoida (Day 1994). K novějším a mnohem spolehlivějším metodám patří ty molekulární. Pomocí nich je možné určit jak míru parazitace, tak přesný druh parazitoida (Garipey et al. 2007). Většina studií sice tvrdí, že mezi konvenčními a novými metodami (odchov, pitva, molekulární metody) není statistický rozdíl, ale ty byly zpravidla tvořeny pouze na malém vzorku hostitelů a parazitoidů a nebyly tudíž schopné (obzvláště při nízké míře parazitace) stanovit mezi jednotlivými typy rozdíl. Některé následné studie potvrdily jisté nesrovnalosti mezi jednotlivými metodami (viz. Obrázek 1) (Ratcliffe et al. 2002, Agustí et al. 2005).



Obrázek 1: Porovnání průměrné míry parazitace u 8700 jedinců čtyř druhů hmyzu z čeledi klopuškovitých (Hemiptera: Miridae) ze střední Evropy pomocí odchovu, pitvy a molekulárních metod. U tří ze čtyř druhů nebyl potvrzen signifikantní rozdíl mezi zvolenými metodami (zdroj: Gariepy et al 2008).

### 1.2.1 Identifikace parazitoida v různých vývojových fázích hostitele

Parazitoidi jsou zpravidla úzce specializováni na jednoho či několik málo druhů hostitelů a i v rámci jednoho druhu hostitele napadají pouze určité vývojové fáze (Forbes et al. 2018). Specializace na určité vývojové fáze je jedním ze způsobů, jak můžeme parazitoidy klasifikovat. Jedná se o parazitoidy vajíček, parazitoidy vajíček i larev, parazitoidy larvální (a nymfální), parazitoidy larvální a pupální, pupální a nejméně častým typem jsou parazitoidi adultních jedinců. Jako důvod, proč je nejméně parazitoidů specializováno na adultní jedince se nabízí vysvětlení, že adultní jedinci mají nejvyšší schopnost se parazitoidovi aktivně bránit. Pokud parazitoid napadne nižší vývojové stádium, setrvává často v prvním instaru, dokud hostitel nedospěje do požadovaného vývojového stádia a až pak se začne dále vyvíjet (Godfray 2001).

Relativně nejjednodušší identifikace parazitoida v závislosti jeho specializace na vývojovou fázi hostitele je bezesporu detekce parazitoidů vajíček. Mezi nejčastější parazitoidy vajíček patří chalcidní vosičky čeledi drobněnkovitých (Hymenoptera: Trichogrammatidae) a brvuškovitých (Hymenoptera: Mymaridae). Jedná se o jedny z nejmenších hmyzích zástupců, velikostí zpravidla nepřevyšujících 1 mm. Pomocí tykadel a ovipozitoru zjistí vhodnost daného vajíčka a jestli už bylo parazitováno a následně

do vajíčka nakladou svá vlastní. Mezi jejich nejčastější hostitele patří hmyz z čeledi polokřídých (Hemiptera), tedy například mšice či ploštice, kteří jsou častými škůdci polních plodin, čímž tedy tyto vosičky představují vhodné pomocníky v rámci biologické kontroly (Bin 1994, Godfray 2001). V biologické kontrole je z drobněnkovitých hojně využíván druh *Trichogramma pretiosum* (Riley, 1879) (Hymenoptera: Trichogrammatidae), který je spolehlivým bojovníkem proti můře černopásce bavlníkové (*Helicoverpa armigera*) (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae), která je jedním z nejvíce rozšířených škůdců polních plodin, do jejíž jídelníčku patří například bavlna, kukuřice, sója, tabák či slunečnice a způsobuje v zemědělském průmyslu značné finanční ztráty (Cunningham et Zalucki 2014). Způsobů, jak zjistit přítomnost parazitoida ve vajíčku je hned několik. Nejjednodušší je vajíčko vizuálně prohlédnout. Za předpokladu, že je parazitoid přítomen je vajíčko zpravidla tmavší než zbytek snůšky, která bývá většinou průhledná. Pro jistotu je možné vajíčko prosvítit a za použití kvalitní optiky je možné vidět ve vajíčku siluetu vyvíjejícího se parazitoida. Dalším způsobem je pitva, kdy se vajíčko opatrně rozřízne a prohlédá se jeho obsah. Časově náročnější metodou je odchov vajíčka a vyčkávání na vylíhnutí parazitoida. Poslední možností je využití některé z molekulárních metod, které velice přesně určí přítomnost a případně i druh parazitoida (Day 1994, Amornsak et al. 1998, Garipey et al. 2007).

Pokud se jedná o larvy a nymfy, kukly či dospělé, je identifikace parazitoida mnohem složitější. Mezi jejich nejčastější parazitoidy patří lumčíkovití (Hymenoptera: Braconidae), lumkovití (Hymenoptera: Ichneumonidae) a kuklicovití (Diptera: Tachinidae) V případě, že se jedná o ektoparazitoida je identifikace jeho přítomnosti snadná a zřejmá - bude vidět na povrchu hostitelova těla (Donovan 1991). U některých ektoparazitoidů je dokonce možné pozorovat samičku, jak chrání svoji snůšku na hostiteli. Například parazitoid *Trissolcus basalis* (Wollaston, 1858) (Hymenoptera: Scelionidae) byl několikrát pozorován, jak přímo agresivně bránil svoji čerstvou snůšku od potencionálních predátorů (Field 1998). U endoparazitoidů je identifikace velmi složitá a nabízí se u nich stejné řešení jako u parazitoidů vajíček, tedy pitva, odchov či molekulární metody (Amornsak et al. 1998, Garipey et al. 2007).

### 1.2.2 Odchov

Odchov za účelem identifikace parazitoidů spočívá hlavně v chovu jejich hostitele. Hostitelé se chovají v nádobách potřebné velikosti a s dostatečnou ventilací, přísunem k vodě a k potravě. Takové nádoby je potřeba umístit tam, kde je stejná teplota a fotoperioda, kterých se hostitelům dostává i ve volné přírodě. Potrava se používá buď přímo ta, na které se hostitel běžně v přírodě živí nebo pokud není možné takovou potravu podávat, používá se náhradní krmivo, které je hostitel ochotný přijímat a která mu zajistí dostatek potřebných živin. Pokud je o hostitele pečováno a je infikován, měl by se do určité doby vylíhnout parazitoid, kterého pak lze konkrétně určit například molekulárními metodami (Parra et Coelho 2022).

Metoda odchovu se nepoužívá pouze pro identifikaci hostitele, v poslední době je to především způsobem rychlého namnožení parazitoidů pro následnou biologickou kontrolu na zemědělských půdách. Například v Brazílii jsou používáni uměle odchováni parazitoidi *Trichogramma galloi* (Zucchi, 1988) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) a *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae), kteří jsou používáni jako biologická kontrola téměř 3,5 milionů hektarů zemědělských ploch, kde se pěstuje především sója, bavlna, kukuřice či rajčata. Zde bojují hlavně proti motýlím škůdcům. Na zemědělské plochy se vypouští pomocí dronů a na hektar jich připadne 50-400 000. Přibližně 90-95 % z těchto parazitoidů je uměle odchovaných (Querino et Zucchi 2019).

### 1.2.3 Pitva

Pitva probíhá pod kvalitním mikroskopem nebo binokulárem. Hostiteli se rozřízne spodní část abdomenu a jeho obsah je vizuálně zkoumán. Tato metoda bohužel mnohdy neodhalí vajíčka, která jsou velice malá a často splývají s vnitřnostmi. Pomocí této metody nejdou rozeznat konkrétní druhy parazitoidů, neboť si jsou larvy jednoho řádu i napříč rozličnými řády mnohdy velmi podobné (Colinet et al. 2005, Pennacchio et Strand 2006).

### 1.2.4 Behaviorální změny hostitele

Některé parazitické organismy jsou schopné změnit či ovlivnit hostitelovo chování (Thomas et al. 2005). Nejznámějším příkladem jsou "zombie" mravenci nakaženi houbou *Ophiocordyceps* (Petch, 1931) (Hypocreales: Ophiocordycipitaceae), která mravence přiměje opustit hnízdo a vylézt na vyvýšené místo ve vegetaci, kde má houba nejlepší šance

na rozmnožení (Araújo et al. 2018). U parazitoidů tomu není jinak a někteří také dokážou změnit chování hostitele. Takové podezřelé chování může být ukazatelem možného výskytu parazitoida. Šance parazitoida na přežití velice úzce souvisí se životaschopností jeho hostitele, a tak se někteří parazitoidi přizpůsobili tak, aby jejich larvy či kokony byly chráněné. Některé druhy vosiček například injektují do hostitele znehybňující toxiny a následně odnesou hostitele do svého hnízda, kde jsou larvy chráněné před predátory (Libersat and Gal 2007).

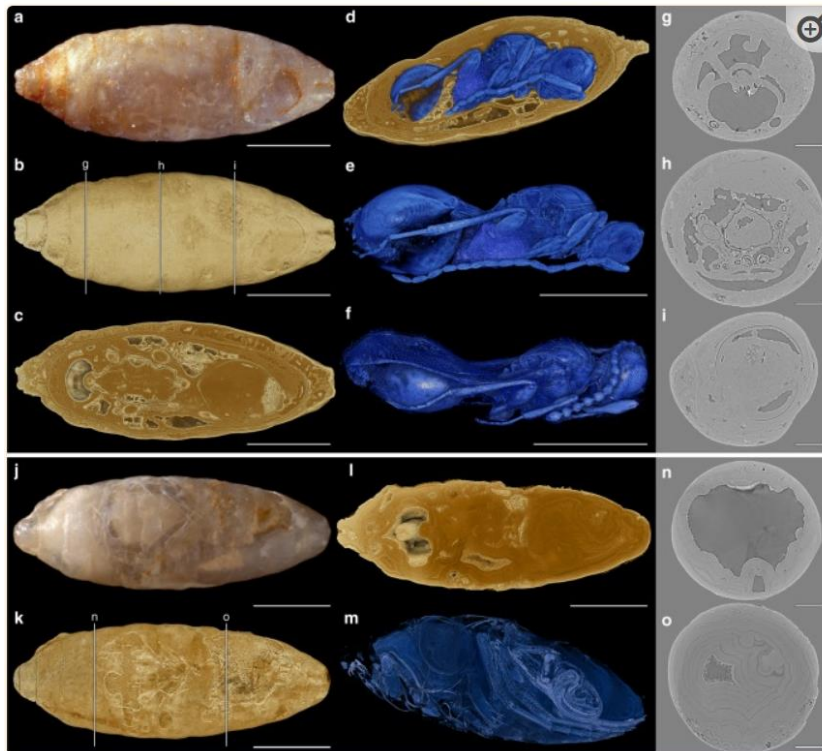
Jiní parazitoidi dokonce dokážou ovlivnit nervovou soustavu hostitele. Takovým příkladem je vosička *Ampulex compressa* (Fabricius, 1781) (Hymenoptera: Ampulicidae), jejímž hostitelem jsou švábi. Šváb dostává od vosičky první žihadlo, díky kterému mu dočasně ochrne přední pár nohou. Poté dostává druhé žihadlo, kterým je do nervové soustavy vpraven jed. Posléze ochrnutí ustane a šváb se začne dlouze čistit a poté vyčkává. V tu chvíli vosička začne švába pomocí jeho tykadla, které je mu vosičkou utrženo navádět do svého hnízda, kde na něj poté naklade vajíčko (Fouad et al. 1994, Moore et al. 2006).

Dalším zajímavým příkladem je lumčík rodu *Glyptapanteles* (Ashmead, 1904) (Hymenoptera: Braconidae). Jeho hostitelem jsou housenky rodu *Thyrintina leucocerae* (Möschler, 1890) (Lepidoptera: Geometridae). Larvy tohoto lumčíka se vyvíjejí uvnitř housenky a po ukončení larválního vývoje housenku opouštějí a kuklí se na blízkém povrchu. V tu chvíli začíná housenka fungovat jako ochránce kukel, nevzdaluje se od nich a případné predátory odhání prudkými pohyby těla (Grosman et al. 2008).

### 1.2.5 MikroCT

Dalším rozhodně zajímavým způsobem, jak identifikovat parazitoida v hostiteli je metoda mikroCT (rentgenová mikrotomografie), která funguje na principu pořizování 2D obrázků řezu napříč celým objektem, kdy výsledkem je 3D model daného objektu (Schambach et al. 2010).

Van de Kamp et al. (2018) využili metody mikroCT k průzkumu 1510 kukel vyhynulých parazitoidních vosiček, které pochází ze sbírek Přírodovědného muzea v Basileji a Švédského přírodovědného muzea. Tyto exempláře byly nasbírány ve fosforitových dolech ve Francii mezi lety 1890-1906. Díky této metodě dokázali popsat 4 nové druhy parazitoidů náležící čeledi Diapriidae.

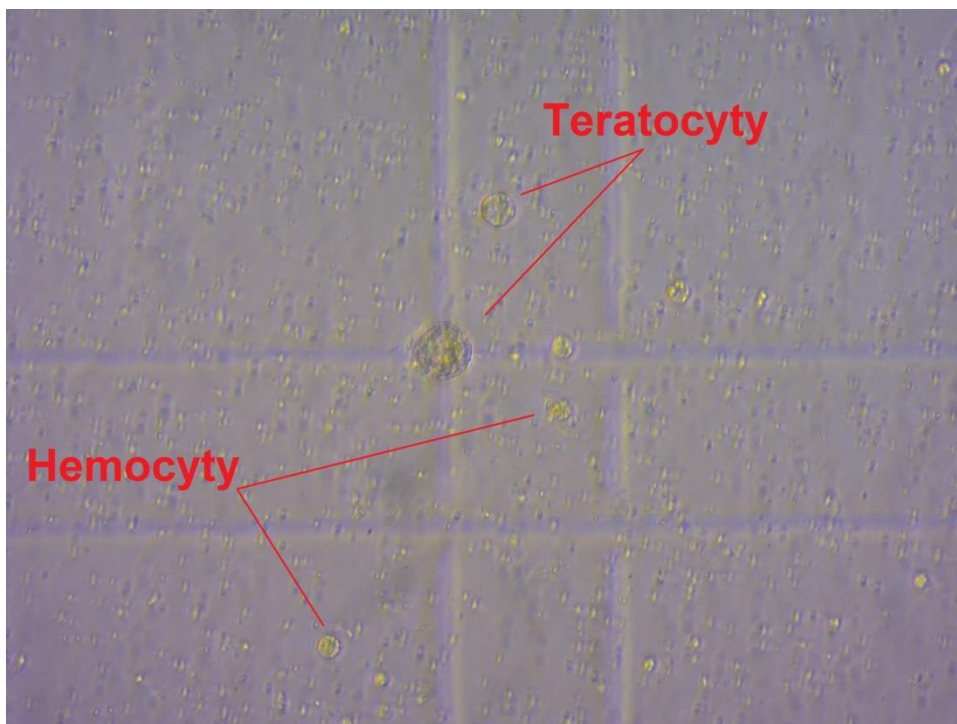


Obrázek 2: MikroCT kukel vosiček *Xenomorphia resurrecta* zobrazující průřez kuklou i 3D model dvou jedinců. Na snímku se nachází samec, na snímku f samička. (zdroj: van de Kamp et al 2018)

### 1.2.6 Teratocyty

Teratocyty jsou buňky vaječné membrány typické pro některé čeledi blanokřídlého hmyzu. Jejich funkce je díky množství obsaženého endoplazmatického retikula velice pravděpodobně sekreční - jejich úkolem tedy nejspíše bude hlavně potlačovat imunitu hostitele (hostitelské tělo se může bránit parazitoidovi enkapsulací ovipozitovaného vajíčka). Buňky vaječné membrány se většinou v hemolymfě (hemocoelu) zpravidla rozpustí, ale teratocyty zůstávají, množí se a enormně rostou a jsou výrazně větší než hemocyty (buňky hemolymfy), čímž se stávají užitečným ukazatelem přítomnosti parazitoida (Godfray 2001).

Teratocyty ale velice pravděpodobně zastávají i vyživovací funkci. Larvy prvního instaru *Dinocampus coccinellae* se velice pravděpodobně nezaměřují na hostitelovu tkáň, ale žíví se jeho tukem. Poté, když se teratocyty dostatečně namnoží začne larva požírat hemolymfu s teratocyty (Ogloblin 1924). Pokud je hostitel v diapauze, je syntéza teratocytů pozastavena a larva se nevyvíjí. Po ukončení diapauzy začne syntéza teratocytů a larva se může začít dále vyvíjet (Kadono-Okuda et al. 1995).



Obrázek 3: Porovnání velikosti teratocytů a hemocytů v hemolymfě sluněčka východního (*Harmonia axyridis*). (Autor: Ing. Michal Řeřicha, Ph.D.)

### 1.2.7 Identifikace parazitoida v mrtvém hostiteli

Jedním z ukazatelů, díky kterým poznáme, že byl přítomen v hostiteli parazitoid je otvor v těle hostitele. Ten je způsoben přesunem parazitoida z hostitele ven, aby se mohl zakuklit. Může se ovšem stát, že najdeme mrtvého hostitele bez otvoru, a přesto mohl být parazitoid přítomen. Občas se stane, že parazitoid v hostiteli zemře. Může dojít například k enkapsulaci parazitoidova vajíčka nebo se mohou larvy navzájem zabít, pokud jich je přítomno více. V takovém případě můžeme parazitoida odhalit pomocí pitvy, případně pomocí některé molekulární metody (Blumberg 1997).

V případě, že je nalezen mrtvý hostitel s otvorem nám pitva bohužel moc neprozradí. V takovém případě už je potřeba využít molekulárních metod, aby bylo možné parazitoida určit. V tu chvíli je klíčové, aby parazitoid zanechal dostatečné množství DNA, která časem podléhá rozpadu. Dobrým zdrojem DNA jsou zbytky vaječných obalů či svlečky (mezi jednotlivými instary) (Paula et Andow 2021).

Paula et Andow (2021) byli schopní díky molekulární metodě MCA (melting curve analysis) odhalit 3 druhy úspěšně vylíhnutých parazitoidů ve sluněčkách téměř 5 týdnů po smrti sluněček. MCA neboli analýza křivky tání je dílčí součástí kvantitativního PCR. Funguje na principu zahřívání dvouvláknové DNA. Při zahřívání se začíná DNA štěpit

(disociovat)

a v bodě, kde je DNA na 50 % rozštěpená se říká křivka tání. Každý organismus má křivku tání v jiném bodě a na tomto principu je tedy od sebe můžeme rozlišit (Pryor et Wittwer 2006).

### **1.3 Molekulární metody využívané k identifikaci parazitoidů v hostitelích**

#### **1.3.1 DNA Metabarcoding**

Metabarcoding je levný způsob identifikace jedinců, který se často využívá v taxonomii nebo pro odhalení kryptických druhů. Jeho principem je odhalení druhů z biologického vzorku. Každý druh má svůj barkód (čárový kód), který je porovnáván se vzorkem a s ostatními barkódy ve vzorku (Valentini et al. 2009). Využívá se krátká sekvence DNA (500-700 bp), pomocí které je sekvenován genetický marker (Rugman-Jones et al. 2009). U živočichů se tento marker nazývá COI (cytochrome oxidase I), ale v závislosti na typu požadované taxonomické úrovně mohou být použity i jiné markery, například rDNA (Derocles et al. 2012).

DNA Metabarcoding poskytuje možnost získání velkého množství informací o parazitoidech, které například klasickým odchovem lze jen těžko získat, jako například potvrzení multiparazitismu u daného jedince (přítomnost více druhů parazitoidů, zpravidla vývoj ukončí pouze jeden z nich) (Hall et al. 2017).

Sow et al. (2019) potvrdili funkčnost DNA Metabarcodingu v odhalování parazitoidů v hostitelích. I velice malá část parazitoidova DNA v hostitelské tkáni potvrdila jeho přítomnost. Díky tomuto potvrdili u polních škůdců výskyt multiparazitismu (více parazitoidů v hostiteli) i hyperparazitismu (parazitoid parazitoida).

#### **1.3.2 Mikrosatelity**

Jako mikrosatelity označujeme krátké repetitivní jednonukleotidové až čtyřnukleotidové sekvence, které se opakují v celém genomu. Principem mikrosatelitů je amplifikace mikrosatelitových lokusů v PCR reakci, které jsou následně fluorescenčně označeny, a nakonec jsou v sekvenátoru podrobeny fragmentační analýze (Tóth et al. 2000).



Výhodou mikrosatelitů je, že se zaměřují na několik lokusů najednou a jsou tedy užitečné pro rozlišování kryptických nebo blízce příbuzných druhů (Dai et al 2004).

Metoda využívání mikrosatelitů se pro identifikaci parazitoidů teprve začíná používat. Na zjištění, zda se v hostiteli vyskytuje parazitoid je až zbytečně složitá, ale dokáže dobře například popsat z jaké populace parazitoid pochází a tím prohlubovat znalosti ekologie daného parazitoida (zda se odněkud někam rozšířil, zda původní populace zůstává, etc.) V jižní Francii v roce 2008 vypustili parazitoidy *Psyttalia lounsburyi* (Silvestri, 1913) (Hymenoptera: Braconidae) jako biologickou kontrolu mušky vrtule olivníkové (*Bactrocera oleae*) (Rossi, 1790) (Diptera: Bactrocera), jejíž larvy se živí plody olivovníku. Parazitoidi byli používáni z dvou geograficky odlišných populací (Keňa a jižní Afrika) a pomocí mikrosatelitů zjišťovali, jestli hybridizace těchto dvou skupin ovlivňuje nebo neovlivňuje ustálení a růst populace tohoto parazitoida (Malausa et al 2010).

### 1.3.3 PCR-RFLP

Jedná se o levnou a velmi jednoduchou metodu analýzy DNA. Pomocí RFLP je možné rozeznat genetické rozdíly mezi jedinci jednoho druhu. Principem je rozdělení DNA vzorků od několika jedinců pomocí restričních endonukleáz (speciální štěpné enzymy), které se následně liší v délce fragmentů, které jsou detekovatelné pomocí elektroforézy (Stouthamer et al 1999).

Franck et al (2017) využili metody RFLP pro identifikaci 5 druhů motýlů z čeledi obalečovitých (Lepidoptera: Tortricidae), jejichž housenky spásají listí a jehličí a jsou velkými škůdci dřevin. Dále identifikovali 8 jejich parazitoidů a jednoho superparazitoida.

### 1.3.4. PCR-AFLP

Principem AFLP je štěpení DNA pomocí dvou restričních enzymů. Umožňuje analýzu polymorfismu v celé genomové DNA, aniž by byly potřeba specifické znalosti genomu (konkrétní primery). Po naštěpení DNA je na vzorku dvakrát po sobě aplikována PCR metoda, kde je selektována část fragmentů, u kterých se sleduje přítomnost či nepřítomnost fragmentů určité délky (Kakouli-Duarte et al 2001).

Tato technika se dá využít pro určení druhu parazitoida, ale pouze v případě, že je tato DNA extrahována přímo z parazitoida a ne z hostitele, kde se parazitoid nachází (Jenkins et al 2012).

### 1.3.5 RAPD-PCR

Metoda RAPD spočívá v použití náhodných primerů pro vygenerování velkého množství PCR fragmentů DNA, které poté vytvoří "otisk" (fingerprint) pro daný druh. Zaměřuje se zároveň na několik lokusů, takže se opět jedná o metodu vhodnou k určování blízké příbuzných nebo kryptických druhů (Baruffi et al 1995, Karam et al 2008).

Yuliarti et al (2002) použili metodu RAPD k molekulární identifikaci parazitoidních vosiček *Telenomus* spp. (Hymenoptera: Scelionidae) na Jávě. Protože je vosiček rodu *Telenomus* okolo 500 druhů, rozhodli se pro tuto metodu, díky níž určili přesně 5 druhů vosiček, jež jsou parazitoidy vajíček u řádů polokřídilých (Hemiptera) a motýlů (Lepidoptera).

### 1.3.6 Multiplexování

Multiplexování je obdobou mikrosatelitové metody. Místo jednoho mikrosatelitu se jich ale množí více, čímž se proces genotypizace zrychluje. Rozdílem je počet použitých primerů, u mikrosatelitové metody se používá jeden, kdežto u multiplexování dva a více. Tento typ metody je mnohem obtížnější na přípravu a mohou vzniknout jisté komplikace. Primery spolu mohou reagovat (hybridizovat) a během elektroforézy může vzniknout problém při rozlišení dvou mikrosatelitů mající stejnou délku (Chamberlain et al 1988).

Metodu multiplexování použili například Gariepy et al (2005) pro rozlišení dvou druhů parazitoidních vosiček rodu *Peristenus* (Foerster, 1862) (Hymenoptera: Braconidae) a jejich následné identifikaci v hostiteli *Lygus rugulipennis* (Poppius, 1911) (Hemiptera: Miridae). Pomocí multiplexování byli schopni rozlišit tyto dvě vosičky, a navíc v hostiteli rozeznat jejich larvu i vajíčko už po třech dnech od infekce. I přes složitou přípravu se metoda multiplexování tedy hodí k identifikaci parazitoidů v hostitelích.

## **1.4 *Harmonia xyridis* vs *Dinocampus coccinellae***

### **1.4.1 *Harmonia axyridis***

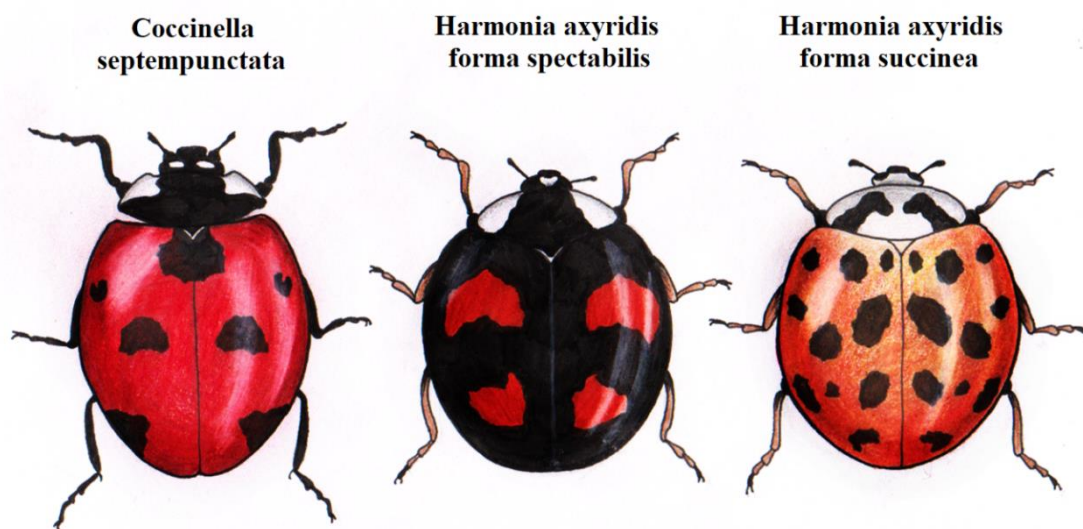
Jedná se o polymorfní druh slunéčka původem ze subtropického pásu východní Asie, dosahující velikosti 5-8 mm a mající více než 100 elytrálních vzorů a různé tvary těla, čímž se stalo vzorem pro mnohé genetické studie (Komai et al. 1950, Tan 1946, Soares et al. 2001). Historie využívání slunéčka východního jako biologické kontroly sahá až na začátek dvacátých let, kdy se v Severní Americe začalo využívat jako biologická ochrana proti škůdcům polních plodin (Gordon 1985). Původně bylo využíváno pouze v Kalifornii a na Havaii, ale v roce 1994 už bylo jako biologická ochrana používáno ve 24 amerických státech, od východního po západní pobřeží (Koch et al. 2006).

Potravně se jedná o velmi nenáročného generalistu, který kromě mšic neváhá predovat i na jiných fytofágních druzích hmyzu či jiných slunéčkovitých broucích, čímž se stává značným konkurentem i predátorem našeho původního druhu slunéčka sedmítečného (*Coccinella septempunctata*) (Roy et al. 2016).

Oproti slunéčku sedmítečnému, které zřídka ročně vyvede více než jednu generaci, je slunéčko východní obdařeno vyšší fekunditou a ročně může vyvést až dvě či tři nové generace (Roy et al. 2016). Slunéčka východní tvoří v podzimních měsících obrovské agregace čítající až tisíce jedinců, kteří poté společně zimují. Tato slunéčka hojně využívají špatně zaizolovaných antropogenních staveb, kde neváhají využít otevřená okna a dveře do budovy, kde se poté usadí například v nábytku nebo kobercích. Jejich masivní počty mohou u citlivějších jedinců spouštět silné alergie v podobě zarudnutí nebo pálení očí, kašle či rýmy (Koch et Galvan 2008).

Díky výše zmíněným vlastnostem se ze slunéčka východního stal ukázkový invazivní druh, který může tvořit jak konkurenční tlak na jiné slunéčkovité brouky, tak může způsobovat škody na úrodě. Například vinařům neváhají při nedostatku mšic požírat samotnou vinnou révu. Tím mohou pomocí alkaloidů v hemolymfě ohrožit sklizeň nebo znehodnotit kvalitu vína (Nedvědová 2013). Invazivním druhem se ale nestalo ihned po introdukci do Severní Ameriky. Přes půl století se nešířilo mimo sady a zemědělské plochy, kam bylo introdukováno. Ke vzniku původní invazivní generace pravděpodobně došlo těsně před rokem 1990 na území Louisiany, USA. V té době tam nejspíše došlo ke vzájemnému

křížení mezi odlišnými poddruhy dovezených populací, které pocházely z různých areálů. Nejpravděpodobnějším scénářem je, že po vzájemném křížení mohlo dojít k mutaci, která umožnila těmto slunéčkům invadovat nová území. Díky malé kontrole přirozenými nepřáteli a schopnosti se rychle adaptovat došlo k obrovskému nárůstu jedinců ve velice krátkém čase a brzy se začalo považovat za globální druh (Ceryngier 2018, Brown et al. 2011). K rozšíření do Evropy došlo přibližně na přelomu tisíciletí pomocí lodní dopravy. První záznamy o jejich výskytu na našem kontinentu pocházely z Nizozemska a Belgie. První záznam o výskytu v České republice je z roku 2006. Během dalších tří let se rozmnožilo natolik, že se pomalu ale jistě stávalo dominantním druhem a začalo tak přímo ohrožovat populace slunéčka sedmitečného (Sprynar 2008, Roy et al. 2016). Díky rychlému rozšíření a namnožení se slunéčko východní stalo terčem hledáček mnoha ekologů v rámci lokálních i globálních výzkumů. Některé z těchto výzkumů prokázaly, že imunita slunéčka východního vůči novým patogenům je mnohem vyšší, než imunita slunéčka sedmitečného (Koch et Galvan 2008, Firlej 2012).



Obrázek 4: Porovnání jedinců našeho slunéčka sedmitečného (*Coccinella septempunctata*), melanistické formy *spectabilis* slunéčka východního (*Harmonia axyridis*) a nejběžnější formy *succinea* slunéčka východního (*Harmonia axyridis*).

### 1.4.2 *Dinocampus coccinellae*

*Dinocampus coccinellae* (Schrank, 1802) (Hymenoptera: Braconidae) je kosmopolitně se vyskytující parazitoid z řádu blanokřídlých (*Hymenoptera*), kterého kromě Antarktidy nalezneme po celém světě. Nejvíce hlášených nálezů této brakonické vosičky pochází z holoarktických oblastí, ale není těžké na ni narazit i v tropech či arktických oblastech (Hodek et al. 2012).

Není zcela jasné, jaký je původní areál výskytu tohoto lumčíka. Balduf (1926) se domníval, že byl pravděpodobně introdukovan do Severní Ameriky s evropskými slunéčky využívanými pro biologickou kontrolu, odkud se následně rozšířil po celém světě.

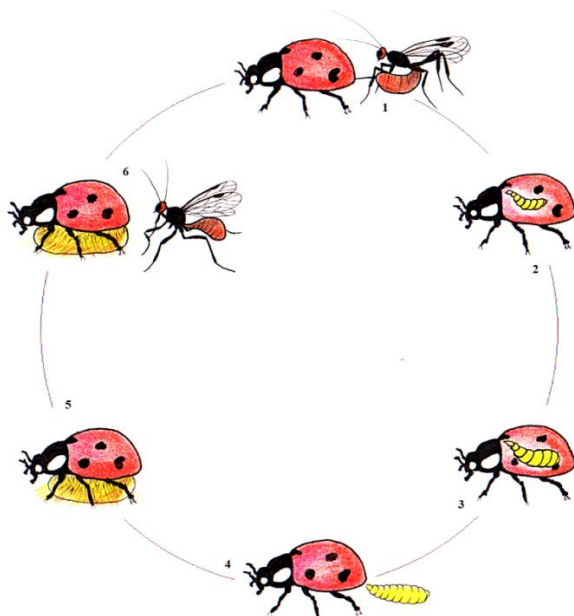
Jeho schopnost se rozšířit na téměř všechny kontinenty můžeme připisovat schopnosti partenogeneze, pomocí níž se primárně rozmnožuje. Samci nejsou příliš častí, přesto je samice často odmítají, jak potvrdil pokus Wrighta (1978), který opakoval sérii pokusů se samcem z Kanady, samci ze Skotska a několika samicemi. Jediný samec z Kanady byl samicí připuštěn, a i po spáření a infikování slunéček se nakonec vylíhly pouze samice.

*Dinocampus coccinellae* je endoparazitoid a svá vajíčka klade pomocí ovipozitoru do hostitele z řádu slunéčkovitých. Zpravidla napadá dospělce, ale v krajní nouzi klade vajíčka i do larev či kukel (Smith 1960). *Dinocampus* svého hostitele vyhledává jak vizuálně podle barvy či velikosti těla, tak i pomocí pachových senzorů, kdy vyhledává substance, jež slunéčko vylučuje (Balduf 1926, Richerson et DeLoach 1972). Pokud *Dinocampus* objeví vhodného hostitele, snaží se ho následně klepáním tykadel vyprovokovat k pohybu, aby byl schopný ovipozitor zavést do měkké tkáně abdomenu na spodní straně těla, což není možné, pokud je slunéčko v klidu a přisedlé k povrchu (Richerson et DeLoach 1972).

Během úspěšné ovipozice je do hostitele vpraveno jediné vajíčko o rozměrech přibližně 250 na 30  $\mu\text{m}$  při naklazení a 1010 na 570  $\mu\text{m}$  při líhnutí (Sluss 1968). *Dinocampus* prochází proměnou dokonalou. Po dobu dvou až tří týdnů prochází třemi instary, kdy má v prvním instaru poměrně velká a silná kusadla, která slouží pravděpodobně k odstranění případných jiných parazitoidů (Balduf 1926). Pokud je hostitel parazitován během larválního vývoje či ve fázi kukly, čeká parazitoid v prvním instaru, dokud se z hostitele nestane dospělec a až poté pokračuje ve vlastním vývoji. Stejně tak tomu je, pokud hostitel prochází diapauzou. V takovém případě s vývojem čeká na ukončení diapauzy (Wright & Laing 1982).

Larva *Dinocampus* se neživí tělními tkáněmi. Podle Slusse (1968) se první instary živí tělním tukem, poté se začnou živit teratocyty. Jedná se o buňky typické pro blanokřídlý hmyz, které se syntetizují po vstřebání vaječného obalu do hemolymfy hostitele. Možnými postihnutými orgány hostitele se mohou ovšem stát pohlavní orgány, kterými se *Dinocampus* ve třetím instaru prokousává k zadečku slunéčka, odkud opouští vnitřní prostor těla. Taková slunéčka se stávají sterilními, samcům se tímto zastavuje spermatogeneze a samicím vývoj vaječníků.

Larva zpravidla opouští tělo mezi šestým a sedmým (případně pátým a šestým) abdomenálním segmentem. Než k tomuto dojde, stává se slunéčko paralyzovaným. K paralyzaci dochází zhruba půl hodiny před přesunem larvy *Dinocampus coccinellae* ven pomocí RNA viru DcPV, který se syntetizuje v larvě parazitoida a následně i v těle hostitele. Díky deformaci pouze pohlavních orgánů slunéčko přesun parazitoida zpravidla přežívá. Na spodní straně abdomenu se parazitoid zakuklí a za pár dní kuklu opouští nový dospělec. Po opuštění dospělce ustává paralýza a slunéčko zpravidla umírá (Maeta 1969, Walker 1961).



Obrázek 5: Životní cyklus *Dinocampus coccinellae*: 1 – ovipozice hostitelského slunéčka; 2,3 - vyvíjející se larva; 4 – larva opouští hostitelovo tělo a chystá se na zakuklení; 5 - paralyzované slunéčko s kuklou parazitoida; 6 - nově vylíhlý parazitoid.

### 1.4.3 *Harmonia axyridis* vs *Dinocampus coccinellae* v ČR

*Dinocampus coccinellae* je v České republice sledován již několik let. V rámci mé bakalářské práce byla sledována možná preference hostitelů mezi slunéčkem východním a slunéčkem sedmitečným. Data byla kontinuálně sbírána mezi lety 2016-2019 na celkem 27 lokalitách v České republice. Za tuto dobu bylo posbíráno celkem 1184 slunéček sedmitečných, z nichž se vylíhlo 81 parazitoidů a 2841 slunéček východních, z nichž se vylíhlo 330 parazitoidů. Z tohoto experimentu jsme se dozvěděli, že parazitoid nevykazuje signifikantní preferenci ani jednoho z druhů, ale klíčovým faktorem byla populační hustota hostitelů. Knapp et al. (2019) ve svém článku uvedli, že *Dinocampus* skutečně nepreferuje ani jeden ze zmíněných druhů, ale přesto může být slunéčko východní lákavějším hostitelem, protože je obecně více aktivní než slunéčko sedmitečné, což pro parazitoida znamená nižší vynaložené úsilí na ovipozici hostitele. Zajímavým zjištěním v tomto článku bylo také nejvyšší naměření proparazitovanost populace a to 46,3 %, zatímco mimo Českou republiku do té doby nebyla uváděna proparazitovanost vyšší než 30 %.

Gramanová (2023) ve své diplomové práci zkoumala preferenci hostitelů v rámci jednoho druhu - slunéčka východního. Vzájemně porovnávala samce a samice, menší a větší samce/samice, infikované a neinfikované slunéčko, mladé a staré slunéčko. Z jejich opakovaných pokusů vyplynulo, že žádný z výše zmíněných faktorů nijak neovlivňuje preference hostitele. Opět ale svými pokusy potvrdila domněnku, že *Dinocampus* preferuje pohybující se slunéčka oproti těm, která jsou přisedlá k povrchu.



Obrázek 6: Nalevo se *Dinocampus coccinellae* pokouší vyprovokovat slunéčko sedmítečné (*Coccinella septempunctata*) k pohybu, aby mohla proběhnout ovipozice ze spodní strany těla. Napravo se *Dinocampus coccinellae* pokouší o ovipozici slunéčka východního (*Harmonia axyridis*).



## 2 Metodika

Jak již bylo avizováno v úvodu práce, experimentální část se zaměřila na slunéčka východní z předchozích experimentů s lumčíkem *Dinocampus coccinellae* v rámci experimentů ostatních členů Týmu ekologie hmyzu, která zahynula bez zjevné příčiny (například stáří, nevhodné životní podmínky, stres, parazitoid, jiné). Cílem experimentu bylo zjistit, jestli slunéčka zahynula při parazitaci lumčíkem a jaká to byla popřípadě poměrná část oproti přeživším nebo úspěšně infikovaným sluněčkům.

Spolehlivým a nejlevnějším způsobem, jak určit, zda byla uhynulá slunéčka skutečně infikovaná je jejich pitva. Larvy blanokřídlého hmyzu se mezidruhově i v rámci jednotlivých instarů (vývojová fáze larev) mohou značně lišit. Z žádného zdroje se bohužel nepodařilo zjistit, jak přesně larvy *Dinocampus coccinellae* v jednotlivých instarech vypadají, jakou mají velikost a kde jsou v těle slunéčka uloženy. Bylo tedy potřeba připravit jakýsi katalog, který by v orientaci pomohl. Experimentální část proto byla rozdělena do dvou hlavních fází. Požadovaným výsledkem první fáze bylo popsání jednotlivých instarů lumčíka a jeho uložení v těle slunéčka. V následné druhé fázi experimentu bylo zjišťováno, zda uhynulá slunéčka byla infikovaná či nikoliv.

### 2.1 První fáze experimentu

Protože nejsou dostupné žádné informace o larvách lumčíka *Dinocampus coccinellae*, které by pro mou experimentální práci byly přínosné, bylo potřeba vymyslet a zrealizovat vlastní metodiku. Cílem bylo zmapovat uložení parazitoida v těle slunéčka a zjistit jeho přesnou podobu v jednotlivých vývojových fázích. Celý experiment proběhl v domácích podmínkách v Konětopech mezi lety 2022-2024.

#### 2.1.1 Příprava experimentu

Pro první část experimentu bylo třeba zajistit slunéčka, která nebyla infikovaná či jinak znehodnocená. Z toho důvodu byl založen chov z volně žijících sluněček, která byla nachytána v červnu roku 2022 v obci Konětopy v okrese Praha-východ. Jednalo se o celkem 50 sluněček východních, která byla společně chována v plastovém boxu o rozměrech 39x28x28 cm a celkovém objemu 22 litrů (viz. Příloha 1). Box byl opatřen dostatečnou

ventilací z kovové mřížky, aby se předešlo přílišné vlhkosti a rychlému plesnivění. Zdroj vody zajišťovalo několik namočených vatových tamponů a krmení bylo předkládáno na několika papírových harmonikách o přibližné velikosti 10x5 cm, které usnadňovaly výměnu krmení za čerstvé. Jako krmení sloužila mražená vajíčka zavíječe moučného (*Ephestia kuehniella*) (Zeller, 1897) (Lepidoptera: Pyralidae). Zdroj vody i krmení byly obměňovány každý druhý den.

Chov těchto slunéček trval 15 dní. Cílem tohoto chovu bylo získání dostatku oplodněných vajíček. Vajíčka byla kladena jak na samotný box, tak na krmící papírové harmoniky. Z plastu nejdou vajíčka bez poškození odebrat, byly proto sbírány pouze papírové harmoniky. Přestože byla slunéčka krmena ad libitum (tedy se nikdy nestalo, že by byla ponechána bez krmení), hrozilo případné sežrání vajíček. Z toho důvodu byl box několikrát denně kontrolován a vajíčka ihned odebírána.

Sebraná vajíčka byla uskladněna v petriho miskách o průměru 9 cm a přiklopena víčkem. Za 3 až 5 dní došlo k vylíhnutí larev. Ty byly rozděleny po 10 jedincích do petriho misek, kde jim byly předkládáno krmivo i voda stejným způsobem jako u dospělců. Jejich larvální vývoj trvá 12 až 14 dní, poté se na přibližně 6 dní zakuklí. Po přibližně 25 dnech od naklazení vajíčka se tedy vylíhli noví dospělci. Ti byli rozděleni podle pohlaví a opět chováni v petriho miskách, tentokrát po 5 jedincích. Dohromady se podařilo odchovat celkem 321 s jistotou neparazitovaných slunéček. Odchovat nová slunéčka celkem tedy trvalo 40 dní.

### **2.1.2 Infikační proces**

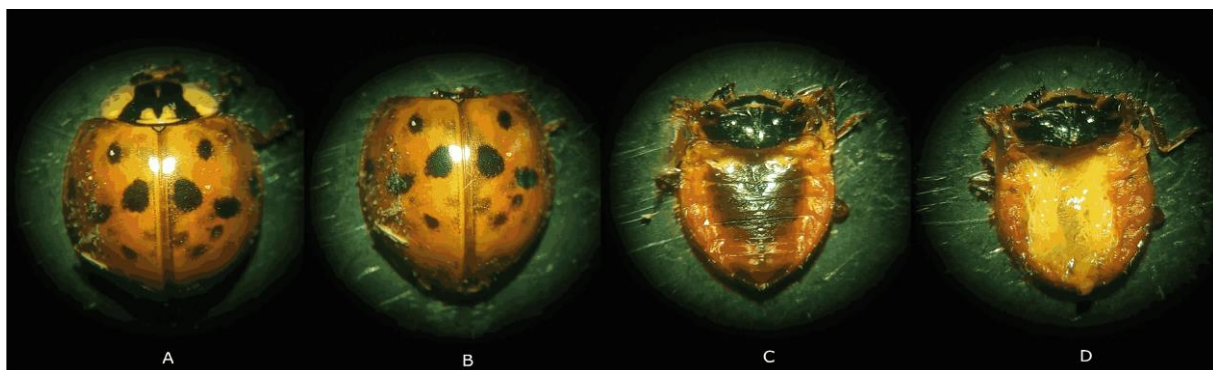
Odchovaná slunéčka byla použita pro umělou infikaci lumčíkem. Na cílenou infikaci bylo použito celkem 60 slunéček (polovina byli samci a polovina samice) a celkem 6 lumčků (jeden pro dvě petriho misky, celkem tedy 12 petriho misek). Do každé petriho misky byl vpuštěn lumčík, který zde byl ponechán, dokud neinfikoval všechna slunéčka, což trvalo maximálně 30 minut. Lumčík infikoval jeden den 5 slunéček, poté byl odebrán a byla mu poskytnuta voda s medem jako zdroj potravy a další den byl vpuštěn k dalším 5 slunéčkům.

Vývoj *Dinocampus coccinellae* trvá od ovipozice (naklazení vajíčka do těla hostitele) po přesun larvy z útrobu slunéčka na jeho spodní abdomenální část přibližně 3 týdny. Uvádí se, že embryonální vývoj může trvat až 10 dní. Petriho misky s infikovanými slunéčky tedy byly popsány datem infekce. Slunéčka následně byla usmrcována mrazem po 10, 15 a 20 dnech a následně uchovávána v mrazáku pro budoucí pitvu. Vznikl tedy dataset, kde z každé periody bylo připraveno na pitvu 20 jedinců.

Zbýlých 261 slunéček bylo chováno v plastovém boxu, který předtím sloužil k umělému odchovu a ke sběru vajíček. Opět o ně bylo obden pečováno. Lumčík, který už infikoval dvě petriho misky byl vložen do boxu ke zbylým slunéčkům, aby zde mohl dále infikovat další jedince. Ti nebyli cíleně usmrcováni, ale byli ponecháváni v boxu po dobu 4 týdnů. Slunéčka, která během této doby zahynula bez zjevné infekce byla též ponechána pro budoucí pitvu. Celkem za tuto dobu zahynulo 64 jedinců.

### 2.1.3 Pitvání cíleně usmrcených slunéček

Slunéčka byla pitvána postupně, podle dne usmrcení. Začínalo se tedy s pitvou slunéček usmrcených po 10 dnech. Slunéčko bylo před pitvou ponecháno 30 minut v pokojové teplotě, aby došlo k jeho rozmrznutí a lepší následné manipulaci. Slunéčku byla pomocí skalpelu odstraněna hrud' a hlava, následně byly pomocí preparační pinzety pootevřeny krovky, které se spolu s křídly taktéž odstranily. Poté se slunéčko vložilo pod binokulární lupu a opatrně byl proveden řez kutikuly na svrchní straně těla po celé délce a poté byla kutikula buď stažena nebo rozevřena na strany. Pro další postup pitvy byla použita vzhledem k velikosti slunéček preparační jehla a skalpel sloužil k přidržení slunéčka na místě.



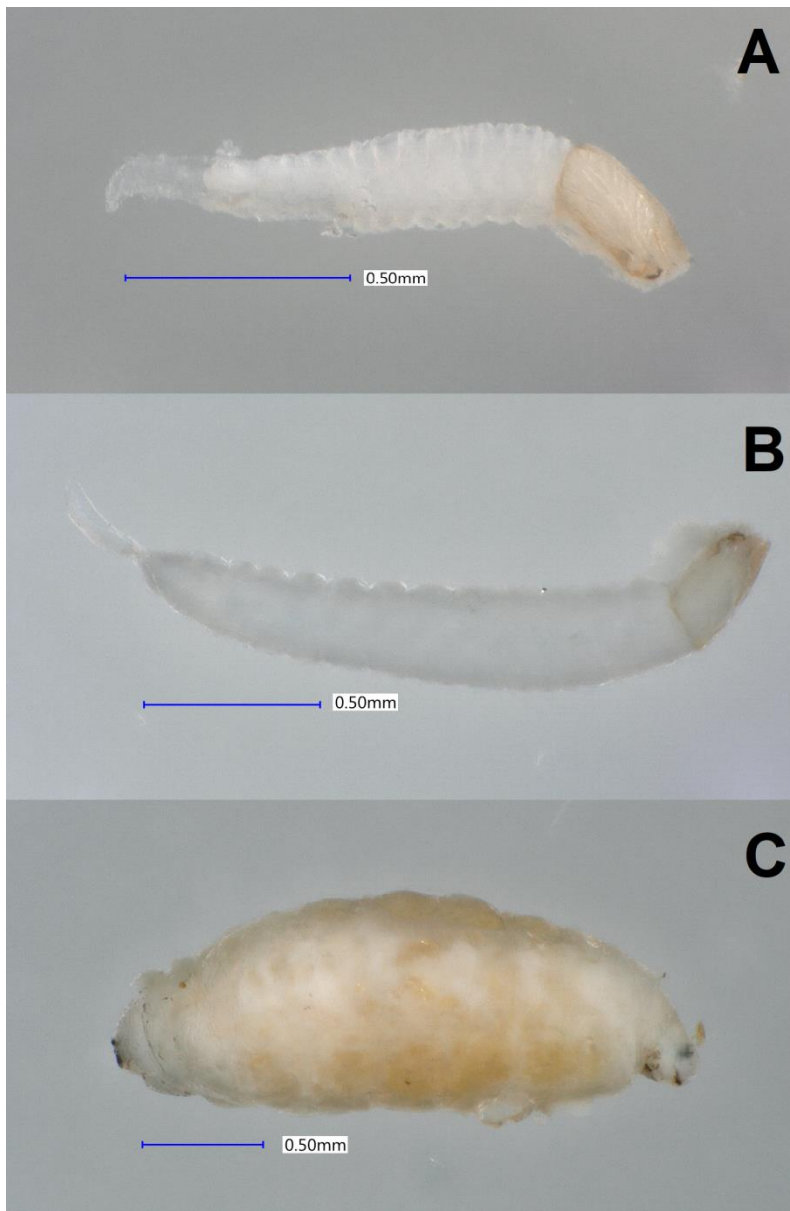
Obrázek 7: A - slunéčko připravené na pitvu; B - slunéčko po odříznutí hrudi; C - slunéčko po odříznutí krovek a křídél; D - slunéčko zbavené kutikuly.

Vnitřnosti slunéčka jsou v nejrůznějších odstínech žluté barvy (viz. Obrázek 7) a parazitoid mohl být průsvitný, popřípadě mohl mít bílou či žlutou barvu a bylo tedy třeba postupovat opatrně. Pomocí preparační jehly byla postupně odebírána tkáň, dokud nebyl parazitoid nalezen. V případě nalezení parazitoida bylo hostitelské slunéčko i parazitoid vloženo do eppendorfky s 96% ethanolem, označené kódem jedince a poté uschováni v mrazáku.

#### **2.1.4 Doprovodná data**

Kromě slunéček odchovaných v roce 2022 jsem data doplnila ještě o slunéčka posbírána v roce 2023, která byla opět chována po dobu 4 týdnů. Jednalo se o celkem 426 slunéček, z nichž během 4 týdnů zemřelo dohromady 115 slunéček, která byla posléze taktéž pitvána.

Pro pořízení kvalitních fotografií parazitoidů (viz. Obrázek 8, Příloha 6-9) byla nachytána slunéčka během teplých dní v lednu 2024, kdy postupně začala opouštět agregace po zimování. Celkem bylo odchyceno 279 slunéček, která byla ihned zmražena a po týdnu pitvána. Fotografie byly pořízeny díky prof. Mgr. Janu Růžičkovi, Ph.D. pomocí digitálního mikroskopu Keyence VHX-6000 (viz. Příloha 4 a 5) s duálním zoomovacím objektivem, kdy na larvy L1 a L2 (první a druhý instar) bylo použito zvětšení 200-2000x a na larvu L3 (třetí instar) bylo použito zvětšení 20-200x.



Obrázek 8: Na obrázku jsou znázorněny 3 larvální instary parazitoida *Dinocampus coccinellae* a jejich postupná změna vzhledu. Pořadí instarů je následovné: A = 1. instar; B = 2. instar; C = 3. instar. Je zde patrné, že první i druhý instar mají narozdíl od třetího instaru sklerotizovanou hlavu s mohutnými kusadly, které slouží k odstranění jiných přítomných larev. (Pozn.: parazitoid druhého instaru (B) má válcovitý tvar po celé délce těla, na obrázku byl ale přibližně 0,1 mm od zadečku poškozen preparační jehlou, jeho velikost je tudíž o trochu větší, než je z obrázku zjevné.)

## 2.2 Druhá fáze experimentu

Druhá fáze experimentu již směřovala k pitvám slunéček z předchozích experimentů dalších členů Týmu ekologie hmyzu. Jednalo se o slunéčka posbíraná v České republice a Německu. V České republice byla slunéčka sbírána v Praze a jejím okolí v roce 2022 a v Německu byla

slunéčka sbírána ve městech Landau, Münster a Magdeburg v roce 2021. Více dat z ostatních experimentů bohužel nevzniklo, neboť byla slunéčka použita pro jiné účely v rámci jiných experimentů. Z českých lokalit se jednalo dohromady o 160 jedinců a z německých lokalit o 110 jedinců.

## 2.3 Statistická analýza dat

Analýza byla provedena ve statistickém programu RStudio 4.2.2 (R Studio team 2022). V prvním modelu bylo porovnáváno umístění parazitoida v těle hostitele. Tělo hostitele bylo rozděleno do pěti částí - břicho, záda, střed, hlava, zadeček (viz. Obrázek 9). Nejdříve byla porovnávána uměle infikovaná slunéčka, v druhém grafu je porovnáno všech 122 jedinců, u nichž byla pitvou prokázána přítomnost parazitoida. Porovnání daných hodnot bylo provedeno pomocí chí kvadrát testu a následně zobrazeno v grafu. Druhý model porovnával infikované, neinfikované a neúspěšně infikované jedince a poměr pohlaví jednotlivých statusů infikovanosti. Porovnání daných hodnot bylo provedeno pomocí chí kvadrát testu a následně zobrazeno v grafu. Třetí model porovnával poměr pohlaví u neúspěšně infikovaných jedinců. Porovnání daných hodnot bylo provedeno pomocí chí kvadrát testu a následně zobrazeno v grafu. Čtvrtý model porovnával jednotlivé instary parazitoidů. Porovnání daných hodnot bylo provedeno pomocí chí kvadrát testu a následně zobrazeno v grafu. Poslední pátý model testoval závislost mezi infikovanými (neúspěšně infikovanými) a neinfikovanými jedinci a koncentrací hemocytů na 1  $\mu$ l hemolymfy. Na tuto analýzu byl zvolen Wilcoxonův test. Výsledky byly následně zobrazeny v grafu. Průkaznost všech daných testovaných proměnných byla stanovena na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

## 3 Výsledky

V roce 2022 se podařilo během 40 dní odchovat celkem 321 slunéček východních (*Harmonia axyridis*), z nichž 60 slunéček bylo cíleně infikováno. Ze zbylých 261 jedinců bylo úspěšně infikováno 103 jedinců a 64 jedinců během chovu 4 týdnů zemřelo. Při pitvě zemřelých jedinců byla přítomnost parazitoida prokázána u 17 jedinců.

Z 426 slunéček, která byla pochytna v roce 2023 bylo úspěšně infikováno 65 slunéček a 115 slunéček zahynulo. Při pitvě 115 zahynulých slunéček byla prokázána přítomnost parazitoida u 21 jedinců.

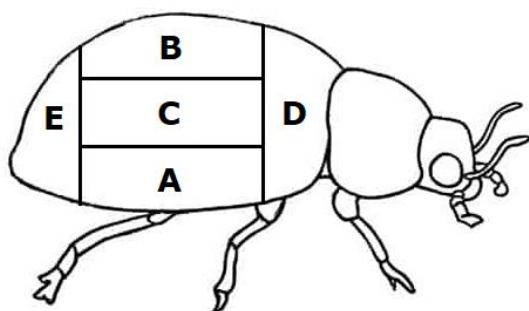
Ze 160 jedinců od členů Týmu ekologie hmyzu z Prahy z roku 2022 byla přítomnost parazitoida potvrzena u 10 jedinců, z nichž u 7 jedinců tato přítomnost byla prve potvrzena díky analýze teratocytů.

Ze 110 jedinců od členů Týmu ekologie hmyzu z Německa z roku 2021 byla přítomnost parazitoida prokázána u 14 jedinců.

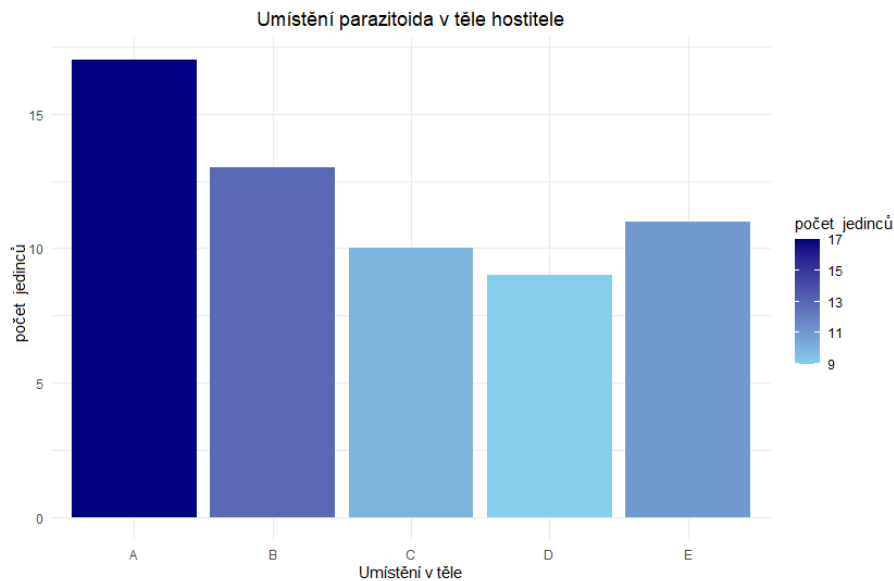
U 62 z 449 zahynulých jedinců byla pitvou potvrzena přítomnost parazitoida. Celkem tedy bylo pitváno 788 slunéček (64+115+160+110+60 (cíleně infikována) + 279 (nachytána v roce 2024 pro získání nejčerstvějších larev parazitoida pro pořízení fotodokumentace)).

### 3.1 Uložení parazitoida v těle slunéčka

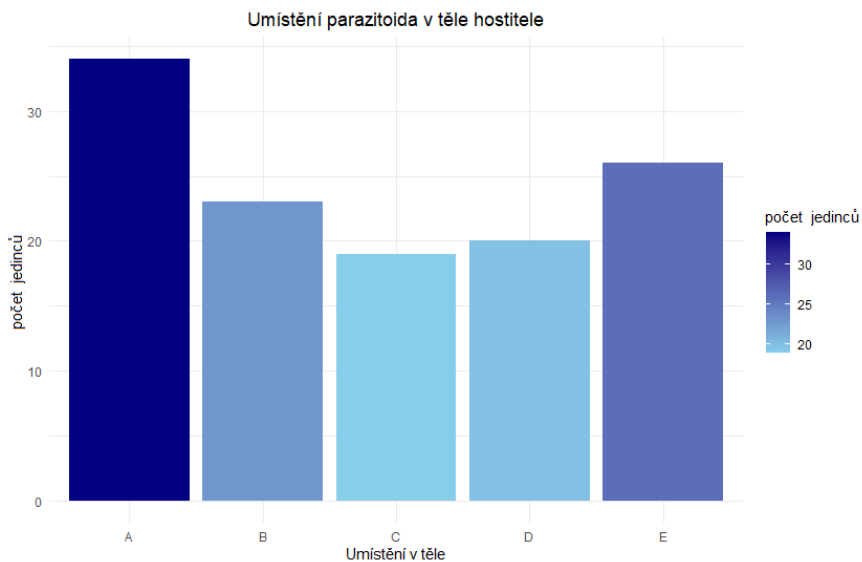
Jednou z neznámých v rámci pitev bylo uložení parazitoida v těle hostitele. Z výsledků statistické analýzy plyne, že umístění parazitoida v těle hostitele bylo čistě náhodné a nebyl prokázán signifikantní rozdíl mezi jednotlivými umístěními parazitoida. V prvním grafu je porovnávána poloha parazitoidů v uměle infikovaných slunéčkách ( $P=0.5037$ ), v druhém grafu jsou porovnávány polohy všech 122 jedinců, kteří byli ve slunéčkách nalezeni ( $P=0.2029$ ).



Obrázek 9: V rámci jedné ze statistických analýz byla porovnávána poloha parazitoidů *Dinocampus coccinellae* v hostitelských slunéčkách *Harmonia axyridis*. Pro lepší analýzu bylo slunéčko pomyslně rozděleno do 5 segmentů: A - břišní část, B - zádová část, C - střední část, D – směrem k hlavě a E - směrem k zadečce.



Obrázek 10: Na grafu je znázorněno v kolika případech se v jakém segmentu hostitelského těla našel parazitoid z 60 uměle infikovaných sluníčků. Na ose x jsou vyznačeny jednotlivé segmenty, na ose y je znázorněn počet jedinců. Z grafu je patrné, že nejčastěji se parazitoid nacházel v segmentu A, tedy v břišní části. Naopak nejméně se vyskytoval v segmentu D, tedy směrem k hlavě. Nebyl ovšem prokázán žádný signifikantní rozdíl v poloze parazitoida v těle hostitele.

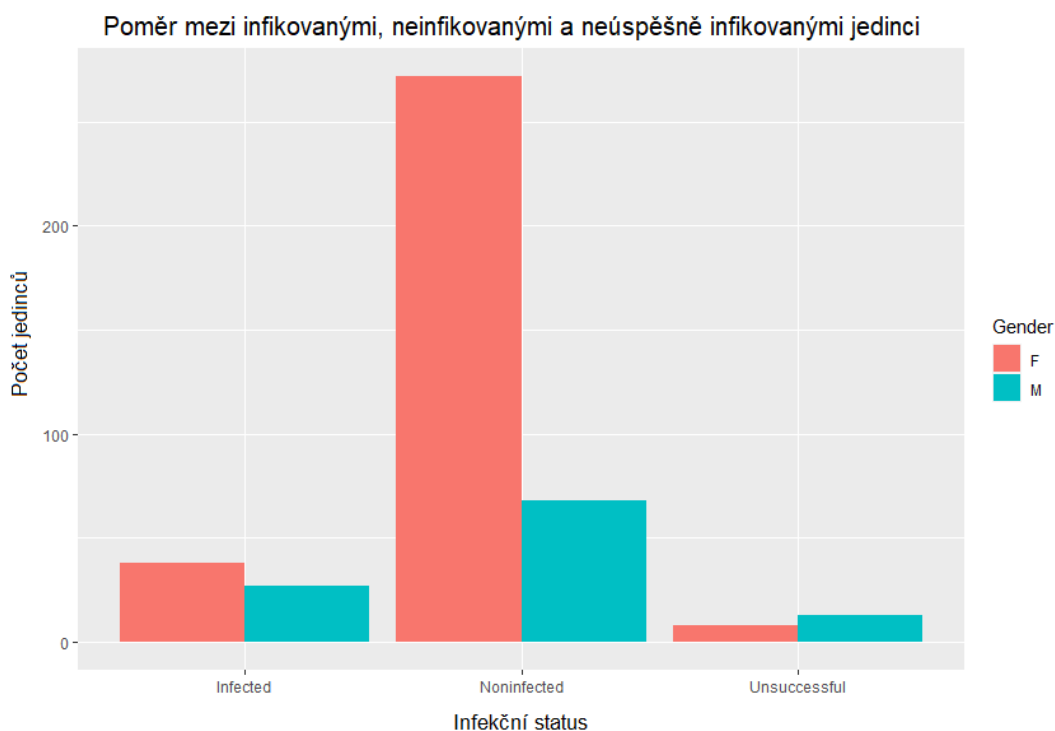


Obrázek 11: Na grafu je znázorněno kolikrát se v jakém segmentu hostitelského těla našel parazitoid ze všech 122 neúspěšně infikovaných sluníčků. Na ose x jsou vyznačeny jednotlivé segmenty, na ose y je znázorněn počet jedinců. Z grafu je patrné, že nejčastěji se parazitoid opět nacházel v segmentu A, tedy v břišní části. Naopak nejméně se vyskytoval v segmentu C, tedy ve středu, v čemž se oproti předchozímu grafu liší. Nebyl ovšem prokázán žádný signifikantní rozdíl v poloze parazitoida v těle hostitele.



### 3.2 Poměr mezi infikovanými, neinfikovanými a neúspěšně infikovanými sluněčky

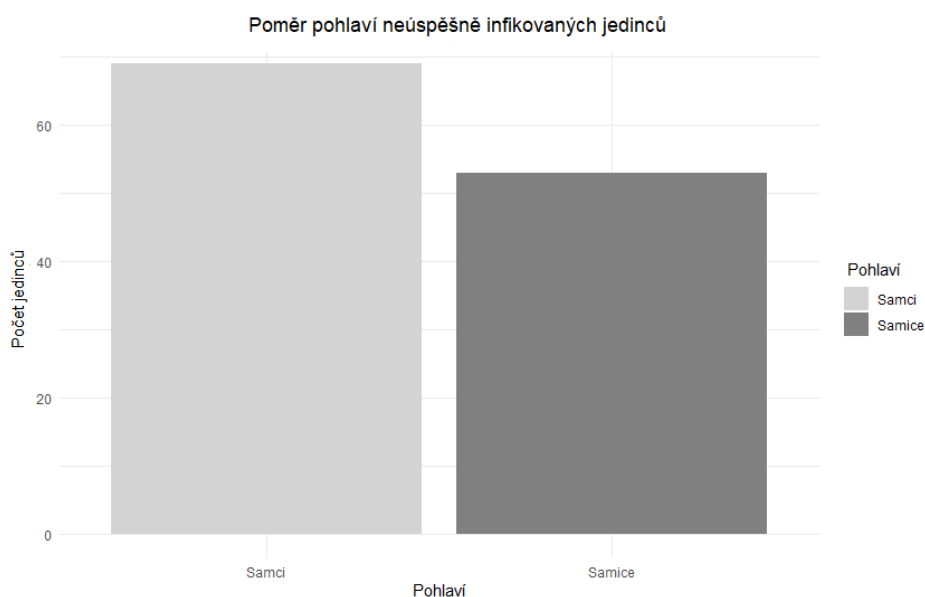
Z dat z roku 2023 (tedy jediná data, kde jsou kompletní informace o statusu infekce, kde nedošlo k žádnému cílenému infikování) byla provedena statistická analýza, která měla za úkol porovnat jednotlivé statusy infekce (infikování, neinfikování a neúspěšně infikování jedinci). Zároveň v této analýze proběhlo porovnání poměru pohlaví v rámci jednotlivých statusů infekce. Z analýzy plyne, že mezi jednotlivými statusy infekce byl značně signifikantní rozdíl ( $P < 0,001$ ). Zároveň je z grafu patrné, že častěji neúspěšně infikovaní byli samci, kdežto u ostatních statusů infekce tomu bylo právě naopak.



Obrázek 12: Na grafu jsou porovnávány 3 typy infekčního statusu (infikovaný, neinfikovaný a neúspěšně infikovaný) na ose x a počet jedinců na ose y. Zde je patrný značný rozdíl mezi jednotlivými statusy, kde neinfikovaní jedinci byli nejpočetnější skupinou. Zároveň jsou zde zobrazeny rozdíly mezi pohlavími (červená=samice, modrá=samci). U infikovaných a neinfikovaných jedinců bylo více samic, kdežto u neúspěšně infikovaných jedinců převažují samci.

### 3.3 Poměr samců a samic neúspěšně infikovaných slunéček

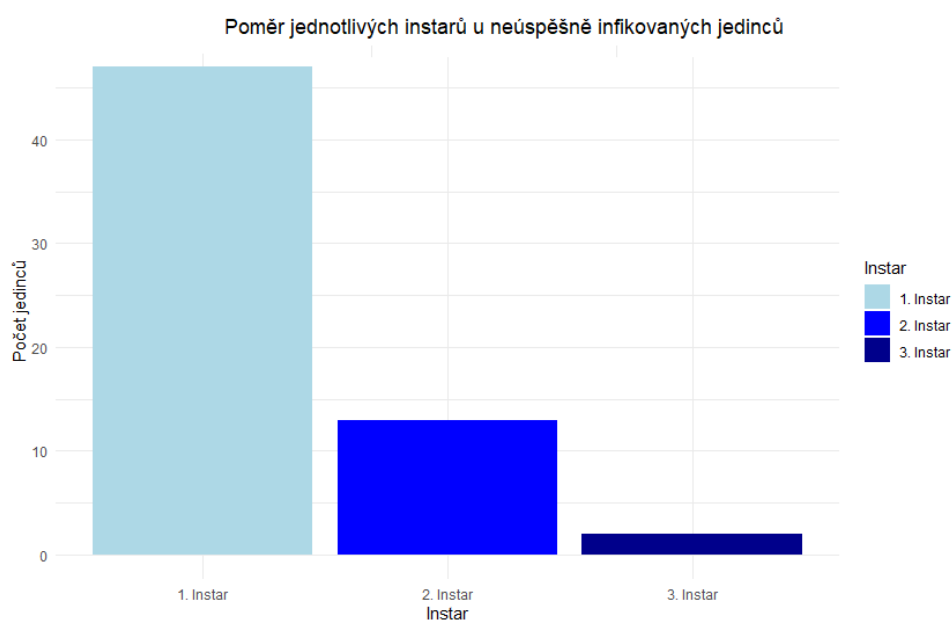
Vzhledem k výsledkům předchozí analýzy, ze které je zjevné, že pouze u neúspěšně infikovaných slunéček převažují samci, byla provedena další analýza, která zkoumala, zda je signifikantní rozdíl mezi samci a samicemi u neúspěšně infikovaných slunéček. Tento rozdíl se v analýze neprojevil jako signifikantní ( $P=0.1475$ ).



Obrázek 13: V tomto grafu je znázorněn poměr pohlaví u neúspěšně infikovaných jedinců. Na ose x jsou zobrazena obě pohlaví, na ose y je zobrazen počet jedinců. Je zde patrný rozdíl mezi pohlavími, nebyl ovšem prokázán jako signifikantní.

### 3.4 Poměr jednotlivých instarů parazitoidů

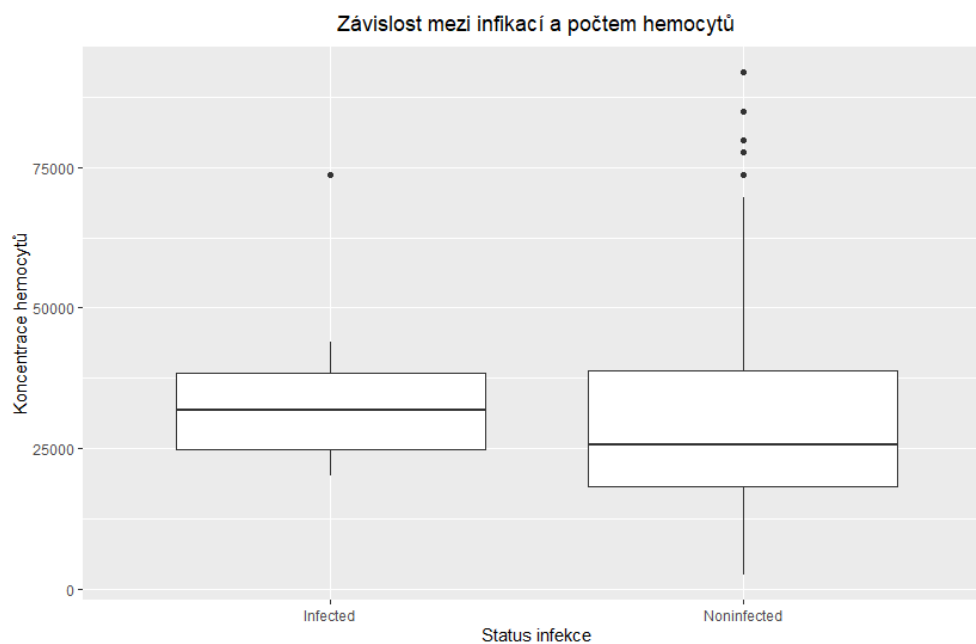
Již z pitev bylo patrné, že se nejčastěji vyskytoval 1. instar. Proto byly jednotlivé instary podrobeny analýze, u které byl potvrzen značně signifikantní rozdíl mezi jednotlivými instary ( $P<0,001$ ). Toto zjištění může napovídat tomu, že již během vývoje vajíček a těsně po vylíhnutí parazitoida z vajíčka nejspíše dochází k jistým imunitním procesům, které mají na následek úhyn hostitele či parazitoida a tím pádem neúspěšnou parazitaci.



Obrázek 14: Na grafu je zobrazen poměr mezi jednotlivými instary parazitoida, kteří byli nalezeni pomocí pitvy. Na ose x jsou zobrazeny jednotlivé instary, na ose y je zobrazen jejich počet. Je zřejmé, že k nejvíce úhynům hostitelů došlo, když byl parazitoid v 1. instaru.

### 3.5 Závislost mezi infikací a počtem hemocytů

Data od kolegů z Týmu ekologie hmyzu z Prahy z roku 2022 poskytovala i doplňkové informace k nalezeným teratocytům a k parametrům hemolymfy, včetně koncentrace hemocytů na 1  $\mu$ l. Hemocyty slouží mimo jiné jako jednoduchý imunitní systém a jejich zvýšený počet by teoreticky mohl představovat jeden z identifikátorů přítomnosti parazitoida. Cílem této analýzy bylo zjistit, zda souvisí koncentrace hemocytů s infikací daného jedince. Tato data tedy byla podrobena Wilcoxonově testu. Z výsledků nevyplývá, že by mezi počtem hemocytů a infikací hostitele byla závislost ( $P=0.2462$ ).



Obrázek 15: Graf znázorňuje (ne)závislost infekce na koncentraci hemocytů. Na ose x jsou zobrazeny infikovaní a neinfikovaní jedinci, na ose y je zobrazena koncentrace hemocytů v hemolymfě. U infikovaných jedinců (zde myšleni neúspěšně infikovaní jedinci) je patrné, že hodnoty koncentrace dosahovaly mezi 25 000 až přibližně 38 000 hemocytů na 1  $\mu$ l a pouze v jednom případě dosahovala hodnota téměř 75 000 hemocytů na 1  $\mu$ l. U neinfikovaných jedinců je rozpětí hodnot značně širší. Nejčastěji se hodnoty hemocytů pohybovaly mezi 20 000 a 40 000 hemocytů na 1  $\mu$ l. V některých případech hodnoty dosahovaly i vyšších hodnot, kdy nejvyšší hodnota představuje téměř 92 000 hemocytů na 1  $\mu$ l.

## 4 Diskuze

První neznámou, která byla v rámci pitev slunéček *Harmonia axyridis* zkoumána byl popis jednotlivých vývojových fází (instarů) larev parazitoida *Dinocampus coccinellae* a jejich uložení (polohy) v těle slunéček. Dostupné informace o larvách tohoto parazitoida jsou velice skoupé a fotografie buď nejsou veřejně uvedené nebo parazitoidi nejsou popsáni jako *D. coccinellae* a nelze tedy spoléhat na jejich správnost. Jediné dostupné fotografie larev tohoto parazitoida jsou zachycené v momentě, kdy opouští hostitelské tělo, aby se pod slunéčkem zakuklil a mohl dokončit svůj vývoj. V této fázi ale není larva příliš podobná prvním instarům. V této diplomové práci jsou tedy dost možná první dostupné fotografie jednotlivých instarů tohoto parazitoida. Jak je možné vidět z fotografií, je mezi jednotlivými instary značný rozdíl, a to ať už ve velikosti či tvaru těla nebo především ve tvaru hlavy. Balduf (1926) tvrdil, že sklerotizovaná hlava s kusadly se nachází pouze u prvního instaru, jak je ale možné spatřit na fotografiích (viz. Obrázek 8), tak se sklerotizovaná hlava nachází jak u prvního, tak u druhého instaru. Změnila se ovšem proporcionalita hlavy k tělu. V prvním instaru tvoří hlava přibližně čtvrtinu délky těla, kdežto u druhého instaru tvoří přibližně osminu těla. Efektivnost těchto kusadel jakožto obrany proti dalším parazitoidům byla potvrzena hned u několika pitvaných slunéček, kde byl nalezen jeden celý parazitoid a pak zbytky parazitoidů právě v podobě sklerotizovaných hlaviček. V jednom případě bylo v jednom těle nalezeno kromě celého parazitoida dalších 8 sklerotizovaných hlaviček. Detail sklerotizované hlavičky je k prohlédnutí v Přílohách 7,8,9.

Co se týče uložení larvy parazitoida v těle hostitele, nebyla potvrzena žádná preference umístění v těle. A to jak pro cíleně infikovaná slunéčka (60 jedinců), tak pro všechna infikovaná slunéčka (122 jedinců). Těla slunéček byla pomyslně rozdělena do 5 částí (břicho, záda, střed, hlava, zadeček). Byť nebyl dokázán žádný signifikantní rozdíl, je patrný slabý trend preference břišního segmentu, kde se parazitoidi v obou zkoumaných modelech vyskytovali nejčastěji. Naopak nejméně se vyskytovali ve střední části těla a v části směrem k hlavě. Nálezy v zádové části a části směrem k zadečku byly téměř vyrovnané. Richerson et DeLoach (1972) uvedli, že *D. coccinellae* potřebuje pro úspěšnou ovipozici aktivně se pohybující slunéčko, aby mohlo mezi zadním párem nohou do břišní strany abdomenu zavést vajíčko. V případě neaktivity je slunéčko parazitoidem provokováno pomocí tykadel k pohybu. Takové tvrzení by potvrdilo nejčastější výskyt právě v břišní části a v části u zadečku, jako tomu bylo u porovnání všech neúspěšně infikovaných slunéček. Ovšem

u modelu porovnávající pouze cíleně infikovaná slunéčka se nejčastěji vyskytovali opět v břišní části, ale narozdíl od modelu všech neúspěšně infikovaných jedinců zde byla druhou nejčastější částí nálezu část zádová, tedy pod krovkami a křídly. Většinu nalezených larev parazitoidů tvořily první instary, tedy larvy velikosti přibližně jednoho milimetru. Zde to vede k zamyšlení, zda se larvy v hostitelském těle aktivně pohybují nebo se zdržují v místě, kam bylo vajíčko zavedeno a k cílenému pohybu dochází až při opouštění hostitelského těla, kdy se parazitoid chystá zakuklit. K aktivnímu pohybu ale pravděpodobně dochází při likvidaci konkurenčních larev. Kdyby vajíčko bylo zaváděno pouze mezi zadní pár nohou, jednalo by se mezi tímto místem a zádovou částí o obrovskou vzdálenost, kterou by larva musela stihnout překonat ještě před tím, než dospěla k druhému instaru. Dalším možným scénářem je, že vajíčko není v hostitelském těle nijak pevně ukotvené a může se tedy volně vznášet hemolymfou v návaznosti na pohyb hostitele, dokud nedojde k vylíhnutí parazitoida.

V druhém modelu byl měřen poměr mezi neinfikovanými, infikovanými a neúspěšně infikovanými slunéčky. Zároveň jsou zde zvlášť vyznačeni samci a zvlášť samice. Ze 426 slunéček bylo úspěšně infikováno 65 jedinců (15,25 %) a neúspěšně infikovaných bylo 21 jedinců (4,92 %) z celkem 115 uhynulých jedinců. Tento model byl postaven na datech z roku 2023, ke kterému jsou veškeré potřebné informace o statusu infikace. Protože se jednalo o divokou populaci neznámého stáří, nelze zcela vyloučit vliv pokročilého věku slunéček na tak vysoký úhyn (26,99 %). Z grafu je zároveň patrné, že u neinfikovaných i infikovaných jedinců převažují samice, naopak u neúspěšně infikovaných jedinců převažují samci (ve třetím modelu potvrzeno jako nesignifikantní). Toto zjištění by mohlo vést k domněnce, že samci mohou být za přítomnosti parazitoida náchylnější k úhynu, ovšem vzhledem k velmi nerovnováznému poměru pohlaví v tomto vzorku divoké populace nelze takovou domněnku brát jako zcela relevantní a pro její potvrzení by bylo třeba dalších pokusů jak s divokými, tak s odchovanými slunéčky.

Čtvrtý model se věnoval porovnání přítomnosti jednotlivých instarů (1-3) při úmrtí hostitele. Zde vyšel zcela jednoznačně průkazný rozdíl. Nejčastěji slunéčka umírala, když byl parazitoid na samém počátku larválního vývoje, tedy ve stádiu prvního instaru. Jednalo se o celkem 47 jedinců z 62. Ve druhém instaru bylo nalezeno 13 jedinců a ve třetím instaru pouz 2 jedinci. Dosud nebylo zcela jistě zjištěno, zda se larvy prvního instaru živí či neživí tělními tkáněmi hostitele. Sluss (1968) uvádí, že se první instary tělními tkáněmi neživí a živí se pouze tělním tukem a posléze teratocyty. Tato domněnka bývá nejčastěji citována a vylučuje hypotézu, že by tak vysoká mortalita hostitelů během prvního instaru parazitoida

byla způsobena poškozením či pozřením tkání hostitele. Různé zdroje ovšem uvádí různé hypotézy, co se výživy prvního instaru týče. Bylo by tedy zajímavé prověřit obsah trávicího traktu larvy prvního instaru, čímž by se jednou provždy potvrdila nebo vyvrátila hypotéza, že ani larvy prvního instaru nepožírají hostitelské tkáně.

V posledním pátém modelu jsem se pokusila zjistit, zda spolu souvisí infikace hostitele a počet hemocytů. Tento model byl založen na datech od Týmu ekologie hmyzu z Prahy z roku 2022. Jednalo se o celkem 160 jedinců. U 10 z nich byla prokázána přítomnost parazitoida, u 7 z těchto 10 jedinců byla jejich přítomnost prokázána díky nálezům teratocytů ještě předtím, než byla samotná slunéčka pitvána. Hypotézou byla myšlenka, že přítomnost parazitoida by mohla být částečně prokázána zvýšeným počtem hemocytů v hemolymfě, což by bylo způsobeno aktivací (indukcí) imunitního systému hostitele (Chapman 2013). Hemocyty mimo jiné plní imunitní funkci, proto by se dalo předpokládat, že přítomnost parazitoida by mohla zvýšit jejich počet, protože tato odpověď je běžná pro hmyz (včetně slunéček) vystavený patogenům a parazitům (Chapman 2013). Tato hypotéza ovšem mými daty potvrzena nebyla, neboť se i mnohonásobně vyšší počty hemocytů vyskytovaly u některých neinfikovaných slunéček. Celkově byly počty hemocytů u zkoumaných slunéček velmi variabilní, za což zřejmě mohou další faktory (např. genetické predispozice jedinců či kvalita a kvantita potravy). Hemocyty se dále mohou nabalovat na melaninovou zátku vlivem koagulační funkce hemolymfy v důsledku poškození hostitelského těla vnějším činitelem (Kodrík 2004), tedy parazitace a poškození tkání v důsledku koagulace může počet volně cirkulujících hemocytů i snižovat. V rámci pitev slunéček bylo několik nálezů neúspěšně infikovaných slunéček s přesně takovou melaninovou zátkou, kterou Kodrík popisuje. Ve většině případů se tato zátka nacházela na spodní straně abdomenu, ale v některých případech byla nalezena pod krovkami. Byť se tato zátka nenacházela u všech slunéček, která měla v těle parazitoida, nabízí se otázka, zda tyto zátky nemohly vzniknout při ovipozici. Pokud ano, byly by zátky pod krovkami důkazem, že k ovipozici nemusí nutně docházet na spodní straně abdomenu mezi zadním párem nohou, ale může k ní docházet pomocí modifikovaného ovipozitoru jinam do těla hostitele (popřípadě k ovipozici může docházet, pokud se slunéčko chystá k letu a zvedá krovky).

Jak již bylo zmíněno, u některých slunéček byla přítomnost parazitoida potvrzena již před pitvou díky přítomnosti teratocytů. Teratocyty jsou buňky typické pro blanokřídlé parazitoidy (Strand 2014). Uvolňují se z vaječného obalu do těla hostitele, kde se dále množí

a rostou a slouží jako potrava larev parazitoidů. Zároveň se předpokládá, že jejich funkce je i sekreční a mohou potlačovat imunitní reakce hostitele, který by se mohl larvě parazitoida bránit například enkapsulací buď samotného vajíčka nebo larvy v nižším vývojovém stádiu. Není známo, zda se teratocyty z vaječného obalu uvolňují až během líhnutí vajíčka nebo v nějakém časovém rozmezí už před líhnutím parazitoida. Jak bylo zmíněno v metodice, embryonální vývoj parazitoida může trvat až 10 dní, je tedy možné, že se teratocyty mohou začít z vaječného obalu uvolňovat i v řádu hodin či dnů před jeho vylíhnutím, aby došlo k včasnému potlačení imunitního systému hostitele. V datasetu od Týmu ekologie hmyzu byla přítomnost teratocytů potvrzena i u dvou slunéček, u kterých parazitoid nebyl nalezen. Je tedy možné, že tato slunéčka v sobě neměla larvu parazitoida, nýbrž jeho vajíčko, které má rozměry přibližně 250 na 30  $\mu\text{m}$  (Sluss 1968) a je tedy pod obyčejným binokulárem jen těžko viditelné. Pokud přistoupíme na myšlenku, že teratocyty jsou vylučovány již před vylíhnutím a potlačují imunitu hostitele, je velice možné, že mnohem víc pitvaných slunéček obsahovalo ve svém těle parazitoida. Takové zjištění by znamenalo, že procento neúspěšné parazitace je ve skutečnosti mnohem vyšší, než necelých 5 %, jak napovídají výsledky mých pitev. K takovému potvrzení by mohla být využita jedna z molekulárních metod pro detekci parazitoidů popisovaná v rešeršní části v kombinaci s průzkumem hemolymfy pro případné potvrzení výskytu teratocytů.

Úmrtnost slunéček během parazitace ovšem nemusí být nutně přímým následkem samotné parazitace a může tomu být v některých případech naopak. Přítomnost parazitoida může potlačovat imunitní systém slunéčka a je tedy možné, že je pak slunéčko náchylné k jiným patogenům, které mohou zapříčinit jeho úhyn. Hoch et al. (2000) potvrdili, že například některé mikrosporidie mohou ve velkém počtu usmrtit hostitele, čímž následně zahyne i samotný parazitoid. Saito a Bjørnson (2013) zkoumali vliv mikrosporidií *Tubulinosema hippodamiae* na vývoj *D. coccinellae* ve slunéčku *Hippodamia convergens*. Byť se vliv na samotný vývoj *D. coccinellae* v jejich výzkumu nepotvrdil, nevyvrací to domněnku, že vlivem těchto (či jiných patogenů) může zahynout nejprve hostitel, následně i parazitoid.



## 5 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo popsat možné metody identifikace parazitoidů v hostitelích. Kromě tradičních metod byly popsány i molekulární metody, které představují budoucnost identifikace nejen parazitoidů, ale i jiných například kryptických druhů.

Cílem praktické části bylo zjistit, zda za úhynem slunéček východních může stát i neúspěšná parazitace parazitoidem *Dinocampus coccinellae*. Praktická část tedy sestávala z pitev těchto uhynulých jedinců. Celkem bylo pitváno 60 cíleně infikovaných slunéček, 449 slunéček, která zemřela bez zjevných příčin a 279 slunéček, jejichž parazitoidi byli použiti pro pořízení fotodokumentace. Během pitev se potvrdila přítomnost larválních stádií parazitoidea u 4,92 % z 449 jedinců. Pitvy pomohly popsat jak vzhled parazitoidů v jednotlivých instarech, tak jejich polohu v těle hostitele. Bylo prokázáno, že sklerotizovaná hlavička se nachází u prvního i druhého instaru, byť jiné studie tvrdily, že sklerotizovaná hlavička se nachází pouze u prvního instaru. Zároveň nebyla prokázána souvislost mezi infikací a počtem hemocytů v hemolymfě slunéček a lze tedy metodu počítání hemocytů označit za nerelevantní v oblasti identifikace přítomnosti parazitoidů.

Data byla doplněna o velmi zajímavé fotografie jednotlivých instarů parazitoidea, které jsou velice pravděpodobně první oficiálně dostupné.

Svoji diplomovou práci bych označila jako přínosnou pro budoucí studie parazitoidů a zároveň by data z této diplomové práce by mohla být použita pro vědecký článek. Do budoucna bych chtěla pokračovat se studiem tohoto velice zajímavého parazitoidea, o jehož životě, a hlavně vývoji ještě není mnoho známo. Do budoucna by byla zcela jistě zajímavá studie dopodrobna popisující jeho larvální vývoj, kde by hlavním předmětem této studie byly pitvy hostitelů po jednotlivých dnech od data infikace, čímž by se přesně mohlo popsat, ve kterých dnech přechází larvy z nižších instarů do těch vyšších a k nim opět poříditi fotografie, ze kterých by se dalo popsat, jak se larva každým dnem mění. Popřípadě rozšířit mou studii o některou z molekulárních metod, kterou by se dalo určit, zda infikovaný hostitel zemřel ještě než se z vajíčka vylíhl parazitoid.

## 6 Přehled literatury a použitých zdrojů

**Agustí, N., Bourguet, D., Spataro, T., Delos, M., Eychenne, N., Folchers, L., Arditi, R., 2005:** Detection, identification and geographical distribution of European corn borer larval parasitoids using molecular markers. *Molecular Ecology*, 14, 3267–3274.

**Amornsak, W., Gordh, G., Graham, G., 1998:** Detecting parasitised eggs with polymerase chain reaction and DNA sequence of *Trichogramma australicum* Girault (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Australian Journal of Entomology*. 37: 174–179.

**Araújo, J.P.M., Evans, H.C., Kepler, R., Hughes, D.P., 2018:** Zombie-ant fungi across continents: 15 new species and new combinations within *Ophiocordyceps*. I. *Myrmecophilous hirsutelloid* species. *Stud Mycol*. 90: 119-160.

**Balduf, W.V., 1926:** The bionomics of *Dinocampus coccinellae* Schrank. *Annals of the entomological society of America*. 19: 465–489.

**Baruffi, L., Damiani, G., Guglielmino, C.R., Bandi, C., Malacrida, A.R., Gasperi, G., 1995:** Polymorphism within and between populations of *Ceratitis capitata*: Comparison between rapid and multilocus enzyme electrophoresis data. 74:425–437.

**Biebl, S., Auer, J., 2017:** The practical use of braconid wasps for control of the furniture beetle (Coleoptera: Anobiidae). 367–75.

**Bin, F., 1994:** Biological control with egg parasitoids other than *Trichogramma*. *Biological Control with Egg Parasitoids other than Trichogramma*. In Wajnberg, E. et Hassan, S.A (Eds.), *Biological Control with Egg Parasitoid*. Academic press. 245–271.

**Blumberg, D., 1997:** Parasitoid encapsulation as a defense mechanism in the Coccoidea (Homoptera) and its importance in biological control. *Biological Control*. 8, 225–236.

**Brown, P.M.J., Thomas, C.E., Lombaert, E., Jeffries, D.L., Estoup, A., Lawson Handley, L.J., 2011:** The global spread of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae): distribution, dispersal and routes of invasion. *Biocontrol*. 56: 623-641.

**Ceryngier, P., Nedvěd, O., Grez, A.A., Riddick, E.W., Roy, H.E., Martin, G.S., Steenberg, T., Veselý, P., Zaviezo, T., Zuniga-Revioso, A., Haelewaters, D., 2018:** Predators and parasitoids of the harlequin ladybird, *Harmonia axyridis*, in its native range and invaded areas. *Biological Invasions*. 20: 1009–1031.

- Chamberlain, J.S., Gibbs, R.A., Ranier, J.E., Nguyen, P.N., Caskey, C.T., 1988:** Deletion screening of the duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 16:11141–11156.
- Chapman, R. F., 2013:** *The Insects Structure and Function*. Cambridge University Press.
- Colinet, H., Salin, C., Boivin, G., Hance, T., 2005:** Host age and fitness-related traits in a koinobiont aphid parasitoid. *Ecological Entomology*, 30(6), 473-479.
- Cunningham, J.P., Zalucki, M.P., 2014:** Understanding Heliiothine (Lepidoptera: Heliiothinae) pests: what is a host plant? *J. Econ. Entomol.* 107, 881–96.
- Damien, M., Tougeron, K., 2019:** Prey–predator phenological mismatch under climate change. *Curr. Opin. Insect Sci.*, 35, 60–68.
- Dai, S.M., Lin, C.C., Chang, C., 2004:** Polymorphic microsatellite DNA markers from the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (hendel) *Mol. Ecol. Notes.* 4:629–631.
- Day, W.H., 1994:** Estimating mortality caused by parasites and diseases of insects: comparison of the dissection and rearing methods. *Environmental Entomology*, 23, 543–550.
- Diamond, S.E., Kingsolver, J.G., 2010:** Fitness consequences of host plant choice: A field experiment. *Oikos* 119, 542–550.
- Derocles S.A.P., Le Ralec A., Plantegenest M., Chaubet B., Cruaud C., Cruaud A., Rasplus J.Y., 2012:** Identification of molecular markers for DNA barcoding in the aphidiinae (hym. Braconidae) *Mol. Ecol. Resour.* 12:197–208.
- Donovan, B.J., 1991:** Life cycle of *Sphecophaga vesparum* (Curtis) (Hymenoptera: Ichneumonidae), a parasitoid of some vespidae wasps. *N. Z. J. Zool.* 18: 181–192.
- Dury P., Baco A., Durr P., A., Franco B., Couderchet B., 2011:** Climate change alters the structure of host-parasitoid interactions in the field. *Journal of Animal Ecology* 2, p: 468-476.
- Eggleton, P., Belshaw, R., 1992:** Insect parasitoids: an evolutionary overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society B.* 337 (1279): 1–20.
- Field, S.A., 1998:** Patch exploitation, patch-leaving and pre-emptive patch defence in the parasitoid wasp *Trissolcus basalis* (Insecta: Scelionidae). *Ethology* 104: 323–338.

**Firlej, ., Girard, P.A., Brehélin, M., Coderre, D., Boivin, G., 2012:** Immune Response of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) Supports the Enemy Release Hypothesis in North America. *Annals of the Entomological Society of America* 105: 328-338.

**Forbes A. A., Bagley R. K., Beer M.A., Hippee A. C., Widmayer H.A.,2018:** Quantifying the unquantifiable: why Hymenoptera, not Coleoptera, is the most speciose animal order. *BMC Ecology* 1 : 1-11.

**Fouad, K., Libersat, F., Rathmayer, W., 1994:** The venom of the cockroach-hunting wasp *Ampulex compressa* changes motor thresholds: a novel tool for studying the neural control of arousal. *Zoology* 98, 23–34.

**Franck, P., Maalouly-Mata,r M., Olivares, J., 2017:** Molecular Tools for the Detection and the Identification of Hymenoptera Parasitoids in Tortricid Fruit Pests. *Int J Mol Sci.* 22;18(10):2031.

**Gariepy, T.D., Kuhlmann, U., Gillott, C., Erlandson, M., 2007:** Parasitoids, predators and PCR: the use of diagnostic molecular markers in biological control of arthropods. *Journal of Applied Entomology*, 131, 225–240.

**Gariepy, T., Kuhlmann, U., Gillott, C., Erlandson, M., 2008:** A large-scale comparison of conventional and molecular methods for the evaluation of host–parasitoid associations in non-target risk-assessment studies. *Journal of Applied Ecology*, 45: 708-715.

**Godfray, H.C.J., 2001:** Parasitoids, *Encyclopedia of Biodiversity* (Second Edition). Academic Press. 674-682.

**Gordon, R.D., 1985:** The Coccinellidae (Coleoptera) of America North of Mexico. *Journal of the New York Entomological Society.* 93: 1–912.

**Gramanová, N., 2023:** Host choice in braconid wasp *Dinocampus coccinellae*: laboratory experiments to identify relevant factors. Diplomová práce. “Nepublikováno”. Dep. Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague.

**Grosman, A.H., Janssen, A., de Brito, E.F., Cordeiro, E.G., Colares, F., Fonseca, J.O., Lima, E.R., Pallini, A., Sabelis, M.V., 2008:** Parasitoid Increases Survival of Its Pupae by Inducing Hosts to Fight Predators. *PLoS ONE* 3(6): e2276.

**Gross P., 1993:** Insect behavioral and morphological defenses against parasitoids. *Annual Review of Entomology* 1: 251-273.

**Hall, A.A.G., Steinbauer, M.J., Taylor, G.S., Johnson, S.N., Cook, J.M., Riegler, M., 2017:** Unravelling mummies: cryptic diversity, host specificity, trophic and coevolutionary interactions in psyllid – parasitoid food webs. *BMC Evol. Biol.* 17, 127.

**Hawkins, B.A., Thomas, M.B., Hochberg, M.E., 1993:** Refuge theory and biological control. *Science*, 262, 1429–1432.

**Heimpel, G. E., 2019:** Linking parasitoid nectar feeding and dispersal in conservation biological control. *Biological Control*. 1: 36-41.

**Hoch, G., Schopf, A., Maddox, J.V., 2000:** Interactions between an Entomopathogenic Microsporidium and the Endoparasitoid *Glyptapanteles liparidis* within Their Host, the Gypsy Moth Larva, *Journal of Invertebrate Pathology*, 75, 59-68.

**Hodek, I., Van Emden, H.F., Honěk, A., 2012:** *Ecology and Behaviour of the Ladybird Beetles (Coccinellidae)*. Willey-Blackwell, Chichester. 561 s.

**Jenkins, C., Chapman, T.A., Micallef, J.L., Reynolds, O.L., 2012:** Molecular Techniques for the Detection and Differentiation of Host and Parasitoid Species and the Implications for Fruit Fly Management. *Insects*. 763-88.

**Jonsson, M., Buckley, H.L., Case, B.S., Wratten, S.D., Hale, R.J., Didham, R.K., 2012:** Agricultural intensification drives landscape-context effects on host–parasitoid interactions in agroecosystems. *J. Appl. Ecol.* 49, 706–714.

**Jennifer, P., 2017:** Butterflies and their sensational parasitoids | Digital Collections Programme (online) [cit.2017.06.22], dostupné z

<https://naturalhistorymuseum.blog/2017/06/22/butterflies-and-their-sensational-parasitoids-digital-collections-programme/>

**Kadono-Okuda, K., Sakurai, H., Takeda, S., Okuda, T., 1995:** Synchronous growth of a parasitoid, *Perilitus coccinellae*, and teratocytes with the development of the host, *Coccinella septempunctata*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 75: 145–149.

**Kakouli-Duarte, T., Casey, D.G., Burnell, A.M., 2001:** Development of a diagnostic DNA probe for the fruit flies *ceratitis capitata* and *ceratitis rosa* (diptera: Tephritidae) using amplified fragment-length polymorphism. *J. Econ. Entomol.* 94:989–997.

**Karam, N., Guglielmino, C.R., Bertin, S., Gomulski, L.M., Bonomi, A., Baldacchino, F., Simeone, V., Malacrida, A.R., 2008:** Rapd analysis in the parasitoid wasp *Psytalia concolor* reveals mediterranean population structure and provides scar markers. *Biol. Control.* 47:22–27.

**Kathirithamby, J., 2008:** Host-Parasitoid Associations in Strepsiptera. Annual review of entomology. 54. 227-49.

**Knapp, M., Řeřicha, M., Maršíková, S., Harabiš, F., Kadlec, T. Nedvěd, O., Teder, T., 2019:** Invasive host caught up with a native parasitoid: field data reveal high parasitism of *Harmonia axyridis* by *Dinocampus coccinellae* in Central Europe. *Biological Invasions* 9: 2795–2802.

**Koch, R.L., Galvan, T.L., 2008:** Bad side of a good beetle: the North American experience with *Harmonia axyridis*. *Biocontrol* 53:23–35

**Koch, R.L., Venette, R.C., Hutchison, W.D., 2006:** Invasions by *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) in the Western Hemisphere: implications for South America. *Neotropical Entomology.* 35: 421–434.

**Kodřík, D., 2004:** Fyziologie hmyzu. Entomologický ústav Akademie věd České republiky, České Budějovice.

**Komai, T., Chino, M., Hosino, Y., 1950:** Contributions to the evolutionary genetics of the lady-beetle, *Harmonia*. I. Geographic and temporal variations in the relative frequencies of the elytral pattern types and in the frequency of elytral ridge. *Genetics.* 35: 589–601.

**Kraaijeveld, A.R., van der Wel, N.N., 1994:** Geographic variation in reproductive success of the parasitoid *Asobara tabida* in larvae of several *Drosophila* species. *Ecol Entomol* 19:221–229.

**Lafferty, K.D., Allesina, S., Arim, M., Briggs, C.J., De Leo, G., Dobson, A.P., Dunne, J.A., Johnson, P.T.J., Kuris, A.M., Marcogliese, D.J., Martinez, N.D., Memmott, J., Marquet, P.A., McLaughlin, J.P., Mordecai, E.A., Pascual, M., Poulin, R., Thieltges, D.W., 2008:** Parasites in food webs: the ultimate missing links. *Ecology Letters.* 11: 533-546.

**Leavell B.C., Bernal X.E., 2019:** The cognitive ecology of stimulus ambiguity: a predator–prey perspective. *Trends in Ecology & Evolution* 11: 1048-1060.

**Lenteren J.C., Godfray H.C.J., 2005:** European science in the Enlightenment and the discovery of the insect parasitoid life cycle in The Netherlands and Great Britain. *Biological Control* 1: 12-24.

**Libersat, F., Gal, R., 2007:** Neuro-manipulation of hosts by parasitoid wasps. In *Recent Advances in the Biochemistry, Toxicity and Mode of Action of Parasitic Wasp Venoms*. 93–114.

**Liu, P.R., Raftery, A.E., 2021:** Country-based rate of emissions reductions should increase by 80% beyond nationally determined contributions to meet the 2 °C target. *Commun. Earth Environ.*, 2, 29.

**Maeta, Y., 1969:** Biological studies on the natural enemies of some coccinellid beetles. I. On *Perilitus coccinellae* (Schrank). *Kontyu*. 37: 147–166.

**Malausa, J., Blanchet, A., Bon, M., Cheyppé-Buchmann, S., Groussier, G., Jones, W., Pickett, C., Ris, N., Roche, M., Thaon, M., Fauvergue, X., 2010:** Introduction of the African parasitoid *Psytalia lounsburyi* in south of France for the classical biological control of *Bactrocera oleae*: will hybridization affect establishment and population growth?. *IOBC/WPRS Bulletin*. 53. 49-55.

**Marino, P.C., Landis, D.A., 1996:** Effect of Landscape Structure on Parasitoid Diversity and Parasitism in Agroecosystems. *Ecol. Appl.* 6, 276–284.

**Messina, F.J., 2004:** How labile are the egg-laying preferences of seed beetles? *Ecol. Entomol.* 29: 318–326.

**Moore, E.L., Haspel, G., Libersat, F., Adams, M.E., 2006:** Parasitoid wasp sting: a cocktail of GABA, taurine, and beta-alanine opens chloride channels for central synaptic block and transient paralysis of a cockroach host. *J. Neurobiol.* 66, 811–820.

**Naranjo S.E., Ellsworth, P.C., Frisvold, G.B., 2015:** Economic value of biological control in integrated pest management of managed plant systems. *Annual Review of Entomology*. 60: 621–645.

**Nedvěďová, T., Awad, M., Ungerová, D., Nedvěď, O., 2013:** Characteristics of ladybird *Harmonia axyridis* during autumn migration. *IOBC-WPRS Bulletin* 94: 117-122.

**Ogloblin, A., 1924:** Le role du blastoderme extraembryonnaire du *Dinocampus terminatus* Nees pendant l'etat larvaire. *Věstník Královské české společnosti nauk.* 2: 1–27.

**Pennacchio, F., Strand, M.R., 2006:** Evolution of developmental strategies in parasitic hymenoptera. *Annual Review of Entomology*, 51, 233-258.

**Parra, J.R.P., 2014:** Biological control in Brazil: An overview. *Scientia Agricola.* 71:345-355.

**Parra J.R.P., Coelho, A. Jr., 2022:** Insect Rearing Techniques for Biological Control Programs, a Component of Sustainable Agriculture in Brazil. *Insects.* 17;13(1):105.

**Paula, D.P., Andow, D.A., 2021:** Melting curve analysis for detection and identification of ghost parasitoids in host carcasses a month after host death. *Methods Ecol Evol.* 12: 1552–1561.

**Poulin, R., Randhawa, L., Haseeb, S., 2015:** Evolution of parasitism along convergent lines: from ecology to genomics. *Parasitology.* 142: 1-15.

**Pryor, R.J., Wittwer, C.T., 2006:** Real-time polymerase chain reaction and melting curve analysis. *Methods in Molecular Biology.* 336, 19–32.

**Querino, R.B., Zucchi, R.A., 2019:** Annotated checklist and illustrated key to the species of *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) from South America. *Zootaxa.* 4656, 201–231.

**Ratcliffe, S.T., Robertson, H.M., Jones, C.J., Bollero, G.A., Weinzierl, R.A., 2002:** Assessment of parasitism of house fly and stable fly (Diptera: Muscidae) pupae by pteromalid (Hymenoptera: Pteromalidae) parasitoids using a polymerase chain reaction assay. *Journal of Medical Entomology*, 39, 52–60.

**Richerson, J.V., DeLoach, C.J., 1972:** Some aspects of host selection by *Perilitus coccinellae*. *Annals of the Entomological Society of America.* 65: 834–839.

**Roy, H.E., Brown, P.M.J., Adriaens, T., Berkvens, N., Borges, I., Clusella Trullas, S., Comont, R., De Clercq, P., Eschen, R., Estoup, A., Evans, E.W., Facon, B., Gardiner, M.M., Gil, A., Grez, A.A., Guillemaud, T., Haelewaters, D., Herz, A., Honěk, A., Howe, A.G., Hui, C., Hutchinson, W.D., Kenis, M., Koch, R.L., Kulfan, J., Lawson Handley, L., Lombaert, E., Loomans, A., Losey, J., Lukashuk, A.O., Maes, D., Magro, A., Murray, K.M., San Martin, G., Martínková, Z., Minnaar, I.A., Nedvěd, O., Orlova-Bienkowskaja, M.J., Osawa, N.,**



- Rabitsch, W., Ravn, H.P., Rondoni, G., Rorke, S.L., Ryndevich, S.K., Saethre, M.G., Sloggett, J.J., Soares, A.O., Stals, R., Tinsley, M.C., Vandereycken, A., van Wielink, P., Viglasova, S., Zach, P., Zakharov, I.A., Zaviezo, T., Zhao, Z. 2016:** The harlequin ladybird, *Harmonia axyridis*: global perspectives on invasion history and ecology. *Biological Invasions*. 18: 997–1044.
- Rugman-Jones P.F., Wharton R.A., van Noort T., Stouthamer R., 2009:** Molecular differentiation of the *Psytalia concolor* (szepligeti) species complex (hymenoptera: Braconidae) associated with olive fly, *Bactrocera oleae* (rossi) (diptera: Tephritidae), in africa. *Biol. Control*. 49:17–26.
- Saito, T., Bjørnson, S., 2013:** The convergent lady beetle, *Hippodamia convergens* Guérin-Méneville and its endoparasitoid *Dinocampus coccinellae* (Schrank): The effect of a microsporidium on parasitoid development and host preference, *Journal of Invertebrate Pathology*, 113, 18-25.
- Saska, P., Honek, A., 2004:** Development of the beetle parasitoids, *Brachinus exulans* and *B. crepitans* (Coleoptera: Carabidae). *Journal of Zoology* 262: 29-36.
- Schambach, S.J., Bag, S., Schilling, L., Groden, C., Brockmann, M.A., 2010:** Application of micro-CT in small animal imaging. *Methods*. 50: 2-13.
- Shiojiri, K., Takabayashi, J., 2003:** Effects of specialist parasitoids on oviposition preference of phytophagous insects: encounter–dilution effects in a tritrophic interaction. *Ecological Entomology* 5: 573-578.
- Sluss, R., 1968:** Behavioral and anatomical responses of the convergent lady beetle to parasitism by *Perilitus coccinellae* (schrank) [Hym: Braconidae]. *Journal of Invertebrate Pathology*. 10: 9-27.
- Smith, B.C., 1960:** Note on parasitism of two coccinellids, *Coccinella trifasciata* perplexa Muls. and *Coleomegilla maculata* lengi Timb. (Coleoptera: Coccinellidae) in Ontario. *The Canadian Entomologist*. 92: 652.
- Smith, G., Trumbo, S.T., Sikes, D.S., Scott, M.P., Smith, R., 2007:** Host shift by the burying beetle, *Nicrophorus pustulatus*, a parasitoid of snake eggs. *Journal of evolutionary biology*. 20. 2389-99.

- Soares, A.O., Coderre, D., Schanderl, H., 2001:** Influence of phenotype on fitness parameters of *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae). *European Journal of Entomology*. 98: 287–293.
- Sow, A., Brévault, T., Benoit, L., Chapuis, M., Galan, M., Coeur d’acier, A., Delvare, G., Sembène, M., Haran, J., 2019:** Deciphering host-parasitoid interactions and parasitism rates of crop pests using DNA metabarcoding. *Sci Rep* 9, 3646.
- Sprynar, P., 2008:** Faunistic records from the Czech Republic—252. Coleoptera: Coccinellidae. *Klapalekiana*. 44: 77–79.
- Stouthamer, R., Hu, J., van Kan, F.J.P.M., Platner, G.R., Pinto, J.D., 1999:** The utility of internally transcribed spacer 2 DNA sequences of the nuclear ribosomal gene for distinguishing sibling species of *Trichogramma*. *BioControl*. 43:421–440.
- Strand M. R., 2014:** Teratocytes and their functions in parasitoids. *Current Opinion in Insect Science*. 6: 68-73.
- Tan, C.C., 1946:** Mosaic dominance in the inheritance of color patterns in the ladybirds beetle, *Harmonia axyridis*. *Genetics*. 31: 195–210.
- Thomas, F., Adamo, S., Moore, J., 2005:** Parasitic manipulation: where are we and where should we go? *Behavioural Processes*. 68: 185-199.
- Thompson, J.N., 1996:** Trade-offs in larval performance on normal and novel hosts. *Entomol. Exp. Appl.* 80, 133–139.
- Tóth, G., Gáspári, Z., Jurka, J., 2000:** Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*. 10 (7): 967–981.
- van de Kamp, T., Schwermann, A.H., Dos Santos Rolo, T., Lösel, P.D., Engler, T., Etter, W., Faragó, T., Göttlicher, J., Heuveline, V., Kopmann, A., Mähler, B., Mörs, T., Oda, r J., Rust, J., Tan Jerome, N., Vogelgesang, M., Baumbach, T., Krogmann, L., 2018:** Parasitoid biology preserved in mineralized fossils. *Nat Commun*. 28;9(1):3325.
- Valentini, A., Pompanon, F., Taberlet, P., 2009:** DNA barcoding for ecologists, *Trends in Ecology & Evolution*. 2,110-117.
- Walker, M.F., 1961:** Some observations on the biology of the ladybird parasite *Perilitus coccinellae* (Schrank) (Hym., Braconidae), with special reference to host selection and recognition. *The Entomologists monthly magazine*. 97: 240–244.

**Ward, S.F., Aukema, B.H., Fei, S., Liebhold, A.M., 2020:** Warm temperatures increase population growth of a nonnative defoliator and inhibit demographic responses by parasitoids. *Ecology*. *101*, e03156.

**Wright, J.E., 1978:** Observations on the copulatory behaviour of *Perilitus coccinellae* (Hymenoptera: Braconidae). *Proceedings of the Entomological Society of Ontario*. *109*: 22.

**Wright, J.E., Laing, J.E., 1978:** The effects on temperature on development, adult longevity and fecundity of *Coleomegilla maculata lengi* and its parasite, *Perilitus coccinellae* . *Proceeding of the Entomological Society of Ontario*. *109*: 33 –47.

**Yuliarti, N., Hidayat, P., Buchori D., 2002:** Molecular identification of egg parasitoid *Telenomus* spp. (Hymenoptera: Scelionidae) from several locations in Java using RAPD-PCR. *Biotropia*. *19*:57-64.

## 7 Seznam obrázků a příloh

Obrázek 1: Porovnání průměrné míry parazitace čtyř druhů hmyzu z čeledi klopuškovitých

Obrázek 2: MikroCT kukel vosiček *Xenomorphia resurrecta*

Obrázek 3: Porovnání velikosti teratocytů a hemocytů

Obrázek 4: Porovnání sluněčka sedmítečného a sluněčka východního

Obrázek 5: Životní cyklus *Dinocampus coccinellae*

Obrázek 6: Infikace sluněčka východního parazitoidem *Dinocampus coccinellae*

Obrázek 7: Příprava sluněčka východního na pitvu

Obrázek 8: Vývoj larev *Dinocampus coccinellae*

Obrázek 9: Rozdělení těla sluněčka do 5 sektorů

Obrázek 10: Graf porovnávající umístění parazitoidů v cíleně infikovaných hostitelích

Obrázek 11: Graf porovnávající umístění parazitoidů všech infikovaných hostitelů

Obrázek 12: Graf porovnávající poměr infikovaných, neinfikovaných a cíleně infikovaných jedinců

Obrázek 13: Graf porovnávající poměr pohlaví u neúspěšně infikovaných jedinců

Obrázek 14: Graf znázorňující poměr jednotlivých instarů *Dinocampus coccinellae*

Obrázek 15: Graf znázorňující (ne)závislost infikace na koncentraci hemocytů

Příloha 1: Chovný box

Příloha 2: Sluněčko východní se zakukleným parazitoidem

Příloha 3: Parazitoid *Dinocampus coccinellae*

Příloha 4: Prof. Mgr. Jan Růžička, Ph.D. pořizující fotografii

Příloha 5: Prof. Mgr. Jan Růžička, Ph.D. pořizující fotografii

Příloha 6: Detailní fotografie pitvaného sluněčka východního s 3. instarem parazitoidea *Dicoínampus coccinellae*

Příloha 7: Detail bočního pohledu na hlavu parazitoidea v 1. instaru

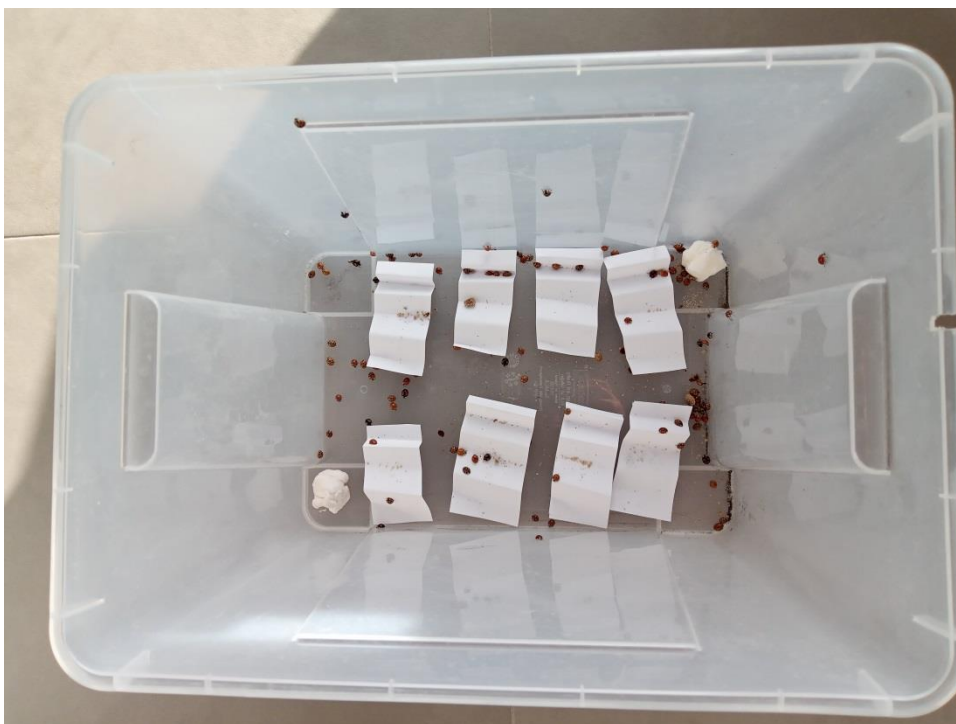
Příloha 8: Detail spodního pohledu na hlavu parazitoida v 1. instaru

Příloha 9: Detail spodního pohledu na hlavu parazitoida v 1. instaru

Příloha 10: Článek “Invasive host caught up with a native parasitoid: field data reveal high parasitism of *Harmonia axyridis* by *Dinocampus coccinellae* in Central Europe”

## 8 Přílohy

Příloha 1: Chovný box se sluněčky východními. Box byl vybaven vlhčenými ubrousky jakožto zdrojem vody a papírovými harmonikami, které sloužily na kladení vajíček a pro podávání potravy, kterou byly vajíčka zavíječe moučného



Příloha 2: Sluněčko východní se zakukleným parazitoidem *Dinocampus coccinellae* ve volné přírodě.



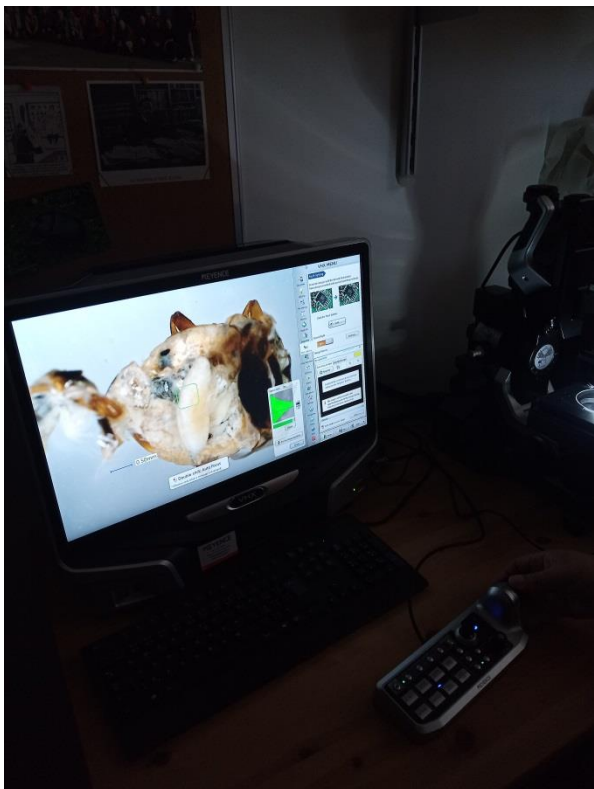
Příloha 3: Uhynulý jedinec parazitoida *Dinocampus coccinellae*, jenž byl využit pro umělou infekci slunéček východních.



Příloha 4: Prof. Mgr. Jan Růžička, Ph.D. pořizující fotografii 3. instaru larvy parazitoida *Dinocampus coccinellae*.



Příloha 5: Prof. Mgr. Jan Růžička, Ph.D. pořizující fotografii 3. instaru larvy parazitoida *Dinocampus coccinellae* v těle slunéčka východního.





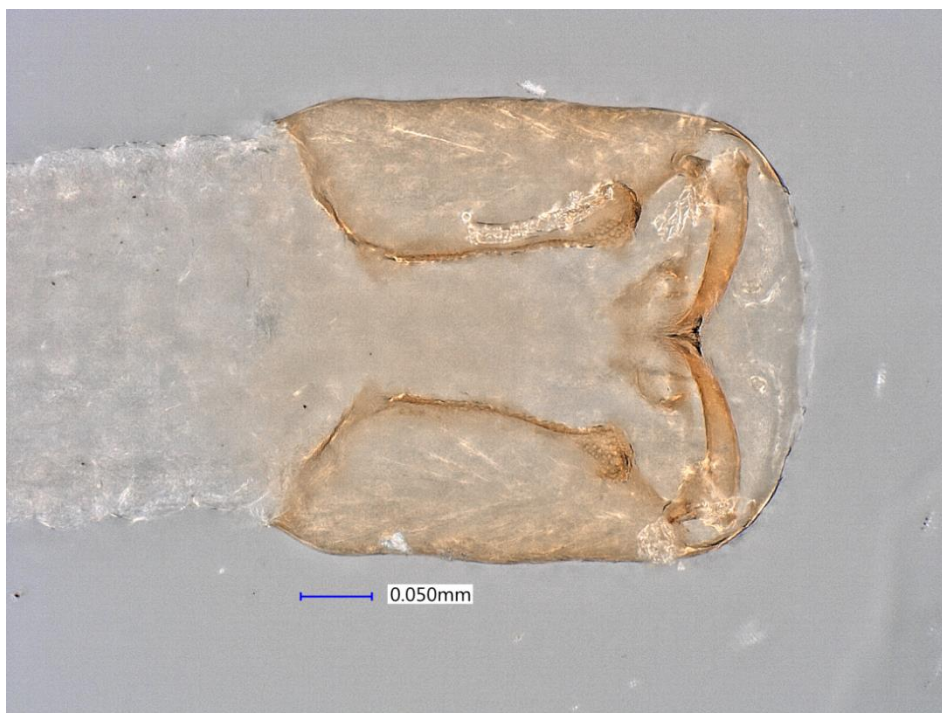
Příloha 6: Detailní fotografie pitvaného slunéčka východního s 3. instarem parazitoida *Dicoínampus coccinellae*.



Příloha 7: Detail bočního pohledu na hlavu parazitoida v 1. instaru. Patrná je sklerotizovaná hlava i svaly pod sklerotizovanou hlavou.



Příloha 8: Detail spodního pohledu na hlavu parazitoida v 1. instaru. Patrná je sklerotizovaná hlava i svaly pod sklerotizovanou hlavou.



Příloha 9: Detail spodního pohledu na hlavu parazitoida v 1. instaru. Dominantním znakem jsou mohutná kusadla sloužící k likvidaci konkurenčních larev v těle hostitele.



Příloha 10: Článek “Invasive host caught up with a native parasitoid: field data reveal high parasitism of *Harmonia axyridis* by *Dinocampus coccinellae* in Central Europe”.