

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Regulace diapauzy u bázlivce kukuřičného (*Diabrotica
virgifera virgifera* LeConte)**

Diplomová práce

Bc. Kateřina Janská

Školitel: RNDr. Petr Doležal, Ph.D.

České Budějovice 2015

Janská, K. 2015: Regulace diapauzy u bázlivce kukuřičného (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). [Regulation of diapause in the western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). Mgr. Thesis, in Czech.] – 40 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The thesis aims to optimize the methods of laboratory culture and to fill in the gaps in knowledge of *D. virgifera virgifera* ecophysiology. The experiments on embryology and development proved that the diapause of *D. virgifera virgifera* is of obligatory type and can be terminated by exposure to long-day conditions (20:4; photo : scotophase) and constant temperature of 25° C. Approximately 10% of eggs completed the development to adults within 4 months. Besides numerous other environmental conditions that are discussed, temperature seems to be a key factor influencing longevity in this pest. Higher temperature of 25° C prolonged survival by more than 20 days in 2015, compared to 22° C in 2014.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 9. 12. 2015

.....
Kateřina Janská

Poděkování:

Děkuji především svému školiteli Petru Doležalovi za odborné vedení práce a obětování času. Také děkuji Markétě za pomoc při statistickém zpracování výsledků, pomoc při práci v laboratoři a řadu cenných rad. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině za podporu během celého studia.

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
1.1. <i>Diabrotica virgifera virgifera</i>	1
1.2. Životní cyklus.....	2
1.3. Diapauza bázlivce kukuřičného.....	7
1.4. Embryonální vývoj.....	8
1.5. Záměr práce.....	13
2. CÍLE PRÁCE.....	15
3. MATERIÁL A METODY.....	16
3.1. Vývoj vajíček v roce 2014.....	16
3.2. Embryonální vývoj vajíček.....	16
3.3. Barvení vajíček.....	17
3.4. Statistické vyhodnocení přežívání dospělců za rok 2014 a 2015.....	18
4. VÝSLEDKY.....	19
4.1. Vývoj vajíček v roce 2014.....	19
4.2. Přežívání dospělců za rok 2014.....	20
4.3. Přežívání dospělců za rok 2015.....	20
4.4. Barvení vajíček.....	21
5. DISKUZE.....	24
5.1. Diapauza bázlivce kukuřičného.....	24
5.2. Přežívání dospělců bázlivce kukuřičného.....	26
5.3. Embryonální vývoj.....	27
6. ZÁVĚR.....	30
7. POUŽITÁ LITERATURA.....	31
8. PŘÍLOHY.....	38

1. ÚVOD

1.1. *Diabrotica virgifera virgifera*

Bázlivec kukuřičný (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) je považován za monovoltinní druh přezimující ve stádiu vajíčka a patřící mezi jednoho z nejvýznamnějších škůdců kukuřice v USA a Evropě. Tento typicky invazivní škůdce původně pochází ze Severní Ameriky, poměrně rychle se rozšířil po celém území USA a následně i do Evropy, kde byl poprvé zaznamenán v roce 1992 (Meinke et al., 2009). Škody na rostlinách způsobují především larvy, které napadají kořenový systém kukuřice a snižují tak příjem živin. Roční výnosové ztráty jsou jen v USA odhadovány na 1 miliardu dolarů (Weseller et al., 2010), ekonomický dopad na evropské státy je odhadován na 500 miliónů euro za rok (Moeser, 2003).

Šíření v Severní Americe

Taxonomicky tento hmyzí škůdce patří do řádu brouci (Coleoptera), čeledi mandelinkovití (Chrysomelidae). Poprvé byl zaznamenán v Severní Americe v roce 1867 (LeConte, 1868). Po mnoho let byl považován pouze za jednoho z mnoha zástupců čeledi mandelinkovitých, dokud nezačal páchat škody na kukuřici. Před tím, než se ve 40. letech 20. století stal vážným škůdcem, byly jeho populační hustoty nízké a zprávy o jeho výskytu vzácné. Hlášeny byly z několika států Mexika, Arizony, jihozápadní Nebrasky, a zřejmě i z Jižní Dakoty. Od roku 1945 byla zaznamenána rozsáhlá expanze směrem na východ, do roku 1980 byl bázlivec kukuřičný rozšířen do několika států podél atlantského pobřeží. Nyní zasahuje areál od Montany, po Severní Dakotu, severozápadní Quebec, oblast Nové Anglie, severovýchod a sever Georgie, až po jihovýchodní Alabamu (Meinke et al., 2009).

Šíření v Evropě

Do Evropy byl bázlivec kukuřičný poprvé zavlečen v roce 1992, kdy byl zaznamenán v Srbsku (v bývalé Jugoslávii) nedaleko letiště v Bělehradu. K zavlečení tohoto druhu do Evropy došlo pravděpodobně při mezikontinentálním letu ze středozápadu USA. Následně byly vyvinuty široké mezinárodní kooperativní sítě pro sledování jeho disperze z původního ohniska do dalších zemí EU. Šíření bázlivce po celé bývalé Jugoslávii a sousedních zemích má za následek každoročně se rozrůstající zamořené oblasti, které už dosahují rozlohy více než 400 000 km² (Meinke et al., 2009). V roce 1995 byli brouci poprvé zaznamenáni v Chorvatsku a Maďarsku, v roce 1996 v Rumunsku, v roce 1997 v Bosně a Hercegovině,

v roce 1998 byli potvrzeni v Bulharsku a Itálii, v roce 2000 ve Slovensku a Švýcarsku, na Ukrajině v roce 2001, v Rakousku, České republice a Francii v roce 2002; a v Belgii, Nizozemsku a Anglii v roce 2003. V roce 2005 byl tento škůdce zjištěn v Polsku (Boriani et al., 2006). Rychlost rozsahu expanzí se velmi liší rok od roku, v průměru se pohybuje okolo 40 km za rok (Meinke, 2009). V České republice, kam poprvé pronikl v roce 2002, byl poprvé zaznamenán na jižní Moravě, v okresech Břeclav, Hodonín a Uherské Hradiště. Podle posledního monitoringu, který probíhal na území České republiky v roce 2011, byl bázlivec kukuřičný zaznamenán v celkem 43 okresech: Benešov, Brno-venkov, Bruntál, Břeclav, České Budějovice, Český Krumlov, Frýdek-Místek, Havlíčkův Brod, Hodonín, Hradec Králové, Chrudim, Jeseník, Jičín, Jihlava, Jindřichův Hradec, Karviná, Kolín, Kroměříž, Kutná Hora, Mladá Boleslav, Náchod, Nymburk, Olomouc, Opava, Pardubice, Pelhřimov, Písek, Prostějov, Přerov, Rychnov nad Kněžnou, Strakonice, Svitavy, Šumperk, Tachov, Tábor, Trutnov, Třebíč, Uherské Hradiště, Ústí nad Orlicí, Vyškov, Zlín, Znojmo a Žďár nad Sázavou. Nejvyšší počet dospělců byl pozorován na jižní Moravě, naopak nejnižší počet byl zaznamenán v jižních Čechách (Kroutil, 2011).

1.2. Životní cyklus

Pářící chování a kopulace

Bázlivec kukuřičný má jednu generaci za rok (Berger, 2001). K páření brouků dochází většinou během července a srpna (Ball, 1957). První dospělí samečci se objevují asi pět dní před samičkami (larvální vývoj samečků je rychlejší než u samiček). Po tom, co se objeví první samečci, zhruba 80% z nich potřebuje 5 až 7 dní pro dosažení pohlavní dospělosti. Samičky jsou schopné se rozmnožovat již během několika hodin po vylíhnutí (Spencer et al., 2009).

Pářící se sameček vkládá do části samičího vejcovodu zvaného burza copulatrix velký spermatofor. Spermatofory jsou produkovány z bílkovinných sekretů samčích přídatných žláz, a jsou používány pro přenos spermií do samičky. Spermatofor bázlivce kukuřičného se skládá ze dvou částí – z bílé, želatinové části s vrstvenou strukturou uložené v předním laloku burzy během první hodiny páření a ze světle růžové kulovité části, která je později uložena v zadním laloku burzy copulatrix. Spermie jsou uloženy v tmavé sklerotizované spermatéce, která do burzy copulatrix ústí. 35% samiček má ve spermatéce spermie již do dvou hodin po páření, 100% samiček má pak spermie ve spermatéce do 4 hodin. Nějaké spermie je možno nalézt

v pomalu degradujícím spermatoforu až po dobu tří dnů po páření. Spermie jsou pak postupně uvolňovány a oplozují vajíčka (Spencer et al., 2009).

Kladení vajíček

Samičky začínají klást vajíčka zhruba 10 dní po oplození do půdy v blízkosti rostlin kukuřice (Berger, 2001). Vajíčka jsou kladena po dobu zhruba 60 dnů (Spencer et al., 2009). K páření může během jejich života dojít opakovaně, pouze s výjimkou doby aktivního kladení vajíček (Branson et al., 1977)., Vzhledem k tomu, že oplodněné samičky jsou obvykle pro samečky už neatraktivní, k opakovanému páření pravděpodobně dochází pouze v reakci na předešlý neúspěšný pokus (Bartlett and Chiang, 1977). Bartlett a Chiang (1977) zároveň uvádí, že samičky po úspěšném páření přestanou produkovat pohlavní feromony. Ball and Chaudhury (1973) jako první prokázali existenci pohlavního feromonu samiček bázlivce kukuřičného. Samičky vylučují tento feromon z kutikulárních pórů nacházejících se v 7. abdominálním segmentu (Lew and Ball, 1978). Nejvíce reagují na feromony samečci, kteří jsou 7 až 9 dní staří (Guss, 1976) v časech mezi 8:30 až 12:30 a mezi 15:30 až 18:30 (Dobson and Teal, 1986). Reakce na feromony je také ovlivněna teplotou, pokud teplota klesne pod 15 °C, nevykazují samečci žádnou odpověď. Těžší samičky jsou pro samečky více atraktivní než ty lehčí, což naznačuje, že pohlavní výběr není zcela náhodný (Kang and Krupke, 2009).

Stáří samičky značně ovlivňuje její plodnost a počet nakladených vajíček (Elliott et al., 1990). Samičky začínají klást vajíčka, když jsou zhruba 20 dní staré (Short and Hill, 1972). Optimální teplota pro kladení vajíček se pohybuje v rozmezí mezi 15,6-18,3 °C. Průměrný počet životaschopných vajíček, která samička naklade je 440. Pokud mají samičky k dispozici dostatek kvalitní potravy, mohou naklást až 1000 vajíček (Spencer et al., 2009). Polní podmínky pravděpodobně také značně ovlivňují jejich biotický potenciál (Hein and Tollefson, 1987). Asi 80% vajíček je nakladena do svrchních 15 cm půdy (Ball, 1957), výjimečně samičky kladou vajíčka do hloubky až 30-35 cm (Weiss et al., 1983). Častější je kladení vajíček do brázdy (do mezery mezi řádky) než do vlastního řádku a preferována jsou spíše krytá a vlhká místa (Guss, 1976). Dříve docházelo ke kladení vajíček téměř výlučně v kukuřičných polích. Postupně byly oplozené samičky nalezeny i v polích se sójou, ovsem a vojtěškou, stejně tak i snůšky vajíček. Nejvyšší hustota snůšek však byla nalezena v kukuřičných porostech (Spencer et al., 2009).

Několik dní po nakladení vstupují vajíčka do diapauzy. Diapauza snižuje jejich mortalitu a zajišťuje synchronizaci s růstovým cyklem kukuřice (Coats et al., 1986). Pro diapauzní

vajíčka je dle dostupné literatury nezbytné projít před vylíhnutím na sklonku jara chladovým obdobím. Prahová teplota pro ukončení diapauzy se v tomto případě pohybuje okolo 11 °C, přičemž byly zaznamenány odlišnosti v rámci populací z různých regionů.

Larvy

Larvy se líhnou z vajíček obvykle v období od konce května do začátku června. Čerstvě vylíhlé larvy se pohybují na kořenech kukuřice a v půdě v blízkosti kořenů, kde zahájí žír (Hodgson, 2008). Mladé larvy jsou maličké, zhruba 1,2 mm dlouhé a téměř bezbarvé, ale postupně bělají. Starší larvy jsou světlé až krémové barvy se zřetelnou hnědou hlavou a tmavou skvrnou svrchní straně. Úplně vyvinuté larvy měří 10 až 18 mm (Berger, 2001). Období larválního žíru obvykle začíná na začátku června a trvá až do konce července (Bryson et al., 1953). Larvy procházejí třemi instary a jejich vývoj trvá v rozmezí od 27 do 71 dní (Berger, 2001). Délka jejich vývoje závisí především na teplotních podmínkách, ale také na podmínkách v půdě (Musick and Fairchild, 1971). Optimální teplota pro larvální vývoj se pohybuje od 18 do 30 °C (Fisher, 1986), hraniční teplota, při které vývoj probíhá je 9 °C (Jackson and Elliott, 1988). Larvální vývoj samečků probíhá rychleji než samic. Během líhnutí se většina larev nachází v horních 10 cm kořenové zóny (Bergman et al., 1981). Larvy prvního a druhého instaru se pohybují od špičky kořene směrem k bázi rostliny a zanechávají za sebou viditelné chodbičky. Larvy třetího instaru se vyskytují hlavně na velkých kořenech blízko stonku rostliny (Berger, 2001). Pohyb larev a jejich následné uchycení na kořenech kukuřice ovlivňují fyzikální a chemické faktory. Pohybu v půdě je pravděpodobně dosaženo lezením ve vzduchem vyplněných pórech. Ve zhutněných půdách s velikostí pórů 0,15 mm nebo menší je pohyb značně omezený (Gustin and Schumacher, 1989). Vysychání larev a mortalita je vyšší v písčítých než v jílovitých půdách, půdy s vysokou koncentrací písku jsou také obecně drsnější a mohou poškodit kutikulu larev (Turpin and Peters, 1971).

Larvy lokalizují kořeny kukuřice pomocí CO₂ gradientu, který je výsledkem dýchání kořenového systému v půdním profilu (Strnad et al., 1986). Larvy vykazují největší odezvy na oxid uhličitý při koncentracích v rozmezí 2,5 - 4,2 mmol/mol - koncentrace v blízkosti kořenů kukuřice je přibližně 4,3 mmol/mol. Koncentrace vyšší než 300 mmol/mol působí na larvy toxicky (Bernklau and Bjostad, 1998).

Larvy bázlivce kukuřičného se vyznačují dvěma odlišnými typy chování při vyhledávání potravy. Zatímco vystavení hostitelskému pletivu vede ke složitému, lokalizovanému potravnímu chování, styk s nehostitelským pletivem navozuje tzv. toulavé chování (relativně

rovný pohyb v půdě). Larvy urazí v půdě i 100 cm, aby našly svého hostitele (Short and Luedtke, 1970). Schopnost larev najít potravu primárně závisí na času stráveném hledáním potravy. S prodlužující se dobou hledání se zvyšuje jejich mortalita, protože hladovějící larvy mají sníženou schopnost proniknout do kořenové tkáně (Branson, 1989). Hladovění trvajících 24 až 72 hodin vede k 48 -100% mortalitě. Pohyb v půdě je pozitivně korelován se stářím a velikostí larev (Schumann and Vidal, 2012). Během žíru jsou larvy vystaveny vnitrodruhové i mezidruhové kompetici (Woodson, 1994). Také vlastnosti a fenologie hostitele ovlivňují larvy v mnoha ohledech (Moeser and Vidal, 2004). Přežívání, růst a vývoj larev je ovlivňován i stářím rostlin. Mladší rostliny jsou vhodnějšími hostiteli než starší rostliny. Larvy, které se vylíhnou dříve, mají totiž nižší mortalitu, než larvy vylíhlé později (Chege et al., 2005).

Kukly

Ke kuklení dochází od poloviny června do konce července (Berger, 2001). Kukly mají průsvitně bílou barvu a jsou podobné dospělcům. Z kukly se líhne dospělec po 5 až 10 dnech.

Dospělci

Dospělí brouci dosahují délky 5 až 6 mm a jsou žlutí se třemi černými pruhy po stranách křídel. Tloušťka černých pruhů je značně variabilní a někdy se i překrývají, takže se křídla mohou jevit jako celá černá. Obě pohlaví se od sebe liší velikostí, samičky jsou větší než samečci (Hodgson, 2008). Počet brouků objevujících se z kukuřičných polí souvisí s počtem vajíček nakladených předešlé vegetační období (Weiss and Mayo, 1985). Vzhledem k tomu, že samečci mají rychlejší larvální vývoj, objevují se o několik dní dříve než samičky. V polních podmínkách trvá délka života brouků přibližně 44 až 55 dní (Ball, 1957), ale za optimálních podmínek se jejich životnost prodlužuje a může dosáhnout až 100 dnů (Hill, 1975). Délka života je ovlivněna dobou líhnutí - brouci, kteří se vylíhli dříve během vegetačního období, žijí déle než ti, co se vylíhli později (Boetel and Fuller, 1997). Čerstvě vylíhlí dospělci se přednostně pylém a bliznami kukuřice, později se přesouvají na listy a na vyvíjející se zrna v mléčné zralosti. Výživové vlastnosti potravních zdrojů mají vliv na plodnost, pokud brouci konzumují čerstvé vlásky a pyl, jejich plodnost se zvyšuje (Elliott et al., 1990).

Rostliny kukuřice uvolňují velké množství sloučenin, které lákají dospělé bázlivce kukuřičného. Těkavé látky uvolňované z vlásků kukuřice vyvolávají při měření elektroantennogramu tykadél dospělců výraznou odezvu (Hibbard et al., 1997). Do kategorie

silných atraktantů patří především indol (Andersen and Metcalf, 1986), který je ovšem silně uvolňován z potravy, proto má pouze omezený vliv na syté dospělce. Další atraktivní sloučeniny jsou geranylaceton, linalool, methylsalicylát a α -terpineol (Hammack, 1996). Kukuřice produkuje ještě celou řadu látek, které slouží jako potravní atraktanty neboli fagostimulanty. Patří sem především některé aminokyseliny, jako jsou β -alanin, L-alanin a L-serin (Kim and Mullin, 1998) a cucurbitaciny, hořké látky získané z rostlin čeledi tykvovitých (*Cucurbitaceae*) (Metcalf et al., 1980).

Aktivita dospělců bázlivce kukuřičného je ovlivněna teplotou. Vrchol aktivity u samečků nastává při mírně chladnější teplotě (25 – 27 °C), než u samiček (27 – 29 °C) (Spencer et al., 2009). Nízké teploty a tma omezují jejich aktivitu (Isard et al., 2004). Samečci urazí v poli průměrně vzdálenost dlouhou 6 až 17 m/den, vzdálenost uražená samičkami se od samečků příliš neliší (Spencer et al., 2009). Letová schopnost bázlivců je obecně spíše nízká a významnou měrou ji může negativně ovlivnit silný vítr, během nějž dospělci nelétají (VanWoerkom et al., 1983; Isard et al., 2003). Naproti tomu atmosférické fronty mohou rozptýlit dospělce do značných vzdáleností (Grant and SeEVERS, 1989). Witowski et al. (1975) popsal lety brouků jako bimodální, s nejvyšší letovou aktivitou v době 2 až 3 hodiny po východu a před západem slunce, kdy se teploty pohybovaly mezi 22 až 27 °C. Při teplotách nižších než 10 °C nebo naopak vyšší než 30 °C letová aktivita ustává. Kromě počasí ovlivňuje let také stáří a pohlaví. Samečci se z domovského pole nerozšiřují na takovou vzdálenost jako samičky (Hill and Mayo, 1980). Samičky po páření zůstávají v jejich domovských kukuřičných polích, kde se krmí po dobu několika dní až týden. Potom se rozptýlí do jiného pole s kukuřicí během doby jejich letové aktivity (Isard et al., 2004). Let samiček lze rozdělit na triviální a vytrvalý. Triviální lety jsou kratší (trvajících několik minut) a pomalejší (16 m/min) než vytrvalé lety, které mohou trvat hodinu nebo déle až při rychlosti až 49 m/min (Coats et al., 1986).

Poškození hostitelské rostliny

Larvy bázlivců poškozují hlavní i vedlejší kořeny kukuřice. Mladé larvy požírají především jemné kořenové vlásky. Starší larvy mají vyšší požadavky na množství potravy a vyžírají vnitřek kořenů a celé kořeny až po bazální uzel. Napadené kořeny hnědnou a ve větších kořenech jsou patrné chodby po žíru larev. Poškození kořenů kukuřice rovněž zvyšuje pravděpodobnost, že bude stonek a kořen napaden houbovými chorobami. Pokud je kořenový systém z poloviny poškozen, dochází k polehnutí rostlin. Při větším výskytu larev je sežrán

celý kořenový systém a rostlina zavadá, hnědne a hyne. Dospělí brouci se živí na nadzemních částech kukuřice, upřednostňují především pyl a blizny kukuřice, čímž způsobují hluchost klasů. V menší míře škodí žírem na listech. Větší hospodářské škody způsobené dospělci jsou však vzácné (Berger, 2001; Hodgson, 2008).

1.3. Diapauza bázlivce kukuřičného

Bázlivec kukuřičný přezimuje ve stádiu vajíček nakladených v půdě. Zimní dormance se skládá z několika fází: pre-diapauzy, diapauzy a post-diapauzy (Košťál, 2006). Diapauza vajíček a rychlost embryonálního vývoje jsou ovlivněné nízkou teplotou (Krysan, 1972). Ačkoliv jsou vajíčka bázlivce kukuřičného dobře adaptována na nízké teploty, dlouhodobé vystavení teplotám pod 0 °C zvyšuje jejich mortalitu (Chiang 1973; Gustin 1981). Záleží také na tom, v jaké fázi vývoje jsou vajíčka při nástupu nízkých teplot, u vývojově starších vajíček, která jsou vystavena nízkým teplotám, je mortalita vyšší (Palmer et al., 1977). Izolační vlastnosti půdy mají také vliv na úspěšné přezimování vajíček. Nedostatek dešťových nebo sněhových srážek během zimy a brzkého jara zvyšují mortalitu vajíček (Calkins and Kirk 1969).

V oblastech mírného podnebného pásu, jsou vajíčka kladena do půdy v průběhu července až září. Embryogeneze pravděpodobně začíná nakladením nebo krátce po něm, ale vývoj embrya se zastaví zhruba po 11 - 13 dnech při teplotě 20 °C, kdy vajíčka přejdou do diapauzy (Meinke et al., 2009).

Údaje o průměrné délce diapauzy vajíček bázlivce kukuřičného se značně liší v rámci různých dříve publikovaných studií, které byly vesměs prováděny na jedincích z různých populací. Uvádí se délka v rozmezí 78 až 163 dní, ale i mezi jedinci téže populace byly zjištěny výrazné rozdíly. Diapauza je kratší v severních zeměpisných šířkách, protože časové období mezi kladením vajíček a nástupem nízkých teplot je zde kratší než v jižních zeměpisných šířkách (Krysan 1982; Coats et al., 1986). V přirozených podmínkách mírného pásu je diapauza ukončena během zimy, kdy je teplota půdy trvale nižší než 11 °C, které jsou uváděny jako spodní teplotní hranice pro vývoj. Občasná teplá období, kterým jsou přezimující vajíčka vystavena, nemají vliv na předčasné ukončení diapauzy (Gustin 1981). Postdiapauzní vajíčka následně zůstávají neaktivní ve stavu postdiapauzní kviescence, dokud teplota půdy nestoupne nad 11 °C. Navzdory drobným odchylkám byl tento jev pozorován u většiny vajíček bázlivce kukuřičného v mírných oblastech.

Při teplotách půdy vyšších než 11 °C začíná postdiapauzní vývoj až vylíhnutím, které v laboratoři nastává zhruba po 14 až 20 dnech po zchlazení při konstantní teplotě 20- 25 °C, přičemž byly opět pozorovány mezipopulační rozdíly. Optimální teplota pro vývoj postdiapauzních vajíček je okolo 28 °C. Mnoho faktorů jako mikroklima, obdělávání půdy a její vlastnosti ovlivňují teplotu půdy v dané hloubce, a tím i předvídatelnost líhnutí vajíček.

Kromě optimální teploty potřebují postdiapauzní vajíčka k úplnému vývoji také vodu, kterou absorbují ze svého okolí. Pokud nemají k dispozici vodu, postdiapauzní vývoj se zastaví a přejdou do stavu kviescence. Velikost embrya se v této době většinou pohybuje v rozmezí 300-600 μm. Vajíčka zůstávají v dormantním stavu, dokud voda nepřijde do kontaktu s vajíčkem a dokud není absorbována. Diapauzní vajíčka schopnost absorpce vody přes membránu nevykazují, což ukazuje na změnu propustnosti membrány vajíčka po ukončení diapauzy.

Toto zjištění podporuje i fakt, že bázlivec kukuřičný má tropický nebo subtropický původ, s následnou kolonizací do Severní Ameriky. Diapauza vajíček v Mexiku nastává během období sucha, kdy není k dispozici kukuřice, a je následována kviescencí. Počátek období dešťů umožňuje vajíčkům pokračování postdiapauzního vývoje a larvy se z vajíček líhnou synchronně s vývojem hostitelských rostlin. Předpokládá se, že tento typ diapauzy se vyvinul jako strategie k přežití suchých podmínek, a tím došlo zároveň k preadaptaci bázlivce kukuřičného pro přežití chladného období v mírných oblastech (Meinke et al., 2009).

1.4. Embryonální vývoj

Embryonální vývoj hmyzu se skládá z několika fází: rýhování, vzniku blastodermu, vzniku zárodečné pásky, gastrulace a vzniku zárodečných listů, segmentace a vzniku přívěsků a následné organogeneze. Vzhledem k tomu, že není dostupný článek, který by přímo popisoval embryonální vývoj bázlivce kukuřičného, byl pro srovnání využit poměrně dobře prostudovaný embryonální vývoj mandelinky bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*), která rovněž patří do čeledi mandelinkovitých (Chrysomelidae).

Rýhování vajíčka začíná po oplození a naklazení vajíček. Během tohoto procesu dochází k mnohonásobnému dělení jader zygoty a migraci jader směrem k periférii vajíčka. Potom, co jádra doputují pod povrch a buněčná membrána vajíčka se vchlípí mezi jádra, vznikají buňky blastodermu. Buňky blastodermu se poté shlukují na břišní straně vajíčka a brzy se objevuje podél ventrální středové čáry rýha. Začíná být viditelná segmentace. Embryo se prodlužuje,

když hlava roste v oblasti předního pólu a větší část abdomenu se přesouvá ze zadního pólu na hřbetní část. Ve výsledku začíná být nápadná dlouhá zárodečná páska, stejně důležitá struktura jako článkované přívěsky, dále se formuje tracheální systém a centrální nervový systém. Krátká zárodečná páska je zjevná, když se embryo smrští a dokud není zadní konec znovu přesunut těsně k zadnímu pólu vajíčka. Hlavové a hrudní přívěsky a vnitřní orgány se diferencují později. Larvální tělo je kompletní, když se laterální části embrya přesunou směrem ke hřbetní středové čáře a nakonec zde splynou.

Rýhování

Tři a půl hodiny po naklazení vajíček začíná superficiální (povrchové) rýhování. První dělení probíhá ve středu buněk vajíčka, ale během dalšího dělení se rýhovací energidy (jádra a okolní cytoplasma) přesunují na periferii vajíčka (periplazma). Do šestého cyklu je dělení jader synchronizováno a počet rýhovacích energid je pokaždé zdvojnásoben. Každý cyklus trvá zhruba hodinu. Na začátku sedmého cyklu dělení probíhá mitóza ve prostřed vajíčka nebo blízko předního pólu a později se šíří jako vlna přes celé vajíčko. Zatímco se většina rýhovacích energid dále přesunuje na periferii vajíčka, malá část jich zůstává ve žloutku a vznikají z nich primární vitelofágy. Během rýhování se vaječné buňky sevrkávají a následně vzniká perivitelinní prostor mezi buňkou a obalem vajíčka na obou pólech.

Vznik blastodermu

Patnáct hodin po naklazení vajíček a po jedenáctém mitotickém dělení, vstupují rýhovací energidy do periplazmy. Buněčná membrána vajíčka se začíná vchlipovat mezi jádra v periplazmě a vzniká první vrstva buněk – blastoderm. V raných fázích jsou buňky blastodermu víceméně rovnoměrně rozložené a jsou stejně velké, až na ty, které jsou kolem posteriorního pólu, ty jsou větší a jsou nazývány pólové buňky. Pólové buňky jsou prekurzory zárodečných buněk. Jednotlivá jádra se přesunují z blastodermu zpátky do žloutkového váčku, kde zůstávají jako sekundární vitelofágy.

Během fáze blastodermu probíhají tři mitotické cykly, dvanáctý, třináctý a čtrnáctý cyklus. Sekundární vrstva buněk vzniká hned pod blastodermem, ale tyto buňky se brzy začleňují mezi buňky blastodermu. Později se buněčná membrána sevře jako svěrač na spodní straně každé buňky, ale až do gastrulace zůstávají stále spojené se žloutkovou membránou. V poslední fázi se blastoderm rozděluje na embryonální a extra-embryonální část, když se buňky shlukují na břišní straně a řídnou na hřbetní straně. Tento shluk buněk na břišní straně

(embryonální část) mění tvar z kvádrového na cylindrický a vymezuje primitivní zárodečnou ploténku, ze které pochází embryo a amnion. Oproti tomu, buňky na hřbetní straně (extra-embryonální část), které jsou prekurzory serózy, se hodně zplošťují.

Gastrulace a vznik zárodečných listů

Třicet hodin po naklazení vajíček se začíná objevovat rýha v podélné ose zárodečné ploténky. Začíná v místě budoucího ústního ústrojí veprostřed zárodečné ploténky a vede směrem k zadní části, kde končí jako mělká prohlubeň ukrývající pólové buňky. Tyto části zárodečné ploténky, které tvarují rýhu, představují mezoderm a endoderm, zatímco ektoderm tvoří buňky na povrchu obou bočních stran a ve střední části rýhy. Následně se obě půlky ektodermu oddělují od mesendodermu podél rýhy a spojují se. Tento proces začíná blízko předního kraje zárodečné ploténky a přesunuje se jako zip směrem k zadnímu pólu. Zhruba po patnáctihodinové pauze se během gastrulace znovu objevuje mitotické dělení buněk, první je viditelné v potenciální hlavové části a následně se šíří přes celé embryo. Pravděpodobně dochází pouze k jednomu mitotickému cyklu, při kterém je zdvojnásoben počet buněk embrya.

Během gastrulace se laterální části ektodermu přesunují přes rýhu směrem k ventrální straně, což vede k narovnávání embrya. Toto přetvoření embrya je podpořeno dramatickým prodlužováním embrya, zvláště na jeho zadním konci. Přední část embrya se přesunuje směrem k přednímu pólu, zadní část obsahující pólové buňky se přesouvá směrem k zadnímu konci a noří se do dorzální části žloutkového váčku. Brzy po začátku gastrulace začíná být viditelná segmentace embrya, když se objeví mělká prohlubeň v místě budoucího ústního ústrojí ektodermu, svisle k rýze. Molekulární markery ukazují, že tyto rýhy jsou prvními morfologickými znaky částí segmentů. Dále během gastrulace pokračuje rozdělování embrya na segmenty v hrudní a později také v abdominální části.

Současně s prodlužováním embrya na obou pólech se rozšiřuje i extra-embryonální blastoderm v opačném směru. Na obou pólech se objevuje záhyb, protože extra-embryonální blastoderm se neodděluje od zárodečné pásky. Oba záhyby se přesunují přes embryo. Zadní záhyb je více zřetelný, protože prodlužování embrya je tady mnohem silnější než v přední části. Oba záhyby se pomalu přesouvají přes ventrální stranu embrya, dokud se nepotkají a nepokryjí celé embryo. Když je pokryta poslední mezera, oddělují se od sebe vnitřní a vnější části záhybů. Vnitřní list zůstává spojený s embryem. Tento tenký epitel se nazývá amnion, který kryje mladé embryo na břišní straně. Vnější list zůstává spojený s dorzální částí extra-

embryonálního blastodermu. Tato vrstva se nazývá seróza a obaluje amnion a embryo na břišní straně stejně jako přechází v hřbetní část žloutkového váčku. Během rané gastrulace je zřejmý tok ve vnitřku žloutkového váčku. V pozdějších fázích gastrulace se žloutkový váček dále dělí na velké žloutkové buňky. Každá z nich obsahuje několik jader pocházejících z vitelofágů. Nakonec obsahují žloutkové buňky všechn materiál jako dřívější žloutkový váček.

Segmentace a vznik přívěsků

Během gastrulace se zadní konec embrya protahuje do žloutku, ale teď se objevuje na dorzální straně žloutku. Embryo se proměňuje v tenkou podlouhlou strukturu, která je dvakrát tak dlouhá, jako byla zárodečná páska na začátku gastrulace. Hlavové laloky jsou nyní situované kolem předního pólu a abdominální záhyby jsou kolem zadního pólu, poslední segmenty leží na dorzální straně. Hlavové laloky jsou více zřetelné než zbytek těla a také hrudní segmenty jsou více zřetelné než čelistní a abdominální segmenty, které jsou nejtenčí. Segmentace je kompletní po celém těle. Ve většině částech zárodečné pásky jsou hranice segmentů viditelné jako mělké rýhy vedoucí na ventrální a laterální strany embrya. V přední části pásky nejsou zřetelné žádné morfologické hranice čelistních segmentů, ale molekulární markery ukazují alespoň jeden předtykadlový, tykadlový a interkalární segment. Následují tři čelistní, tři hrudní a deset abdominálních segmentů. Vchlípená mesendormální trubice se rozpadá, čímž vzniká smíšená tělní dutina – mixocoel – typická pro hmyz.

Podél středové osy, kde se během gastrulace spojily dvě ektodermální části, mizí velké neuroblasty dovnitř embrya. Zde se dělí a diferencují na nervové buňky, které formují centrální nervový systém skládající se z mozku, suboesophagiálního ganglia a břišní nervové pásky. Během tohoto procesu je většina rudimentů interkalárního segmentu pohlcena, když jejich neuroblasty formují tritocerebrum, které později srůstá s předtykadlovým segmentem protocerebra a tykadlovým segmentem deutocerebra, čímž se zakládá sekundární syncerebrum, které je typické pro hmyzí mozek.

Ústa se ukazují jako mělká prohlubeň, která je buď pozůstatek předního konce gastrulační rýhy nebo nová struktura. Později se prohlubují a formují přední střevo (stomodaeum). Vepředu začíná vystupovat horní pysk (labrum). Na segmentech tykadel, stejně jako na čelistních a hrudních segmentech začínají vybíhat článkované přívěsky. Narůstající počet přívěsků je zřetelný na každém článku, po obou stranách. Později se liší morfologicky, přívěsky na hrudních člancích jsou delší, zatímco tykadlové a čelistní přívěsky zůstávají

menší a kratší. Na základech interkalárního segmentu nejsou zaznamenány žádné morfologické znaky přívěsků. Na obou stranách embrya se objevuje deset malých jamek, jeden pár na každém segmentu od mezothoraxu až po osmý abdominální segment. Postupně se prohlubují do embrya, později se začínají větvit a fúzovat spolu, a tak formovat tracheální systém. Zadní část embrya obsahuje primordium zadního střeva (proctodaeum) a malphigických trubic. Jemné přívěsky segmentů vstupují do amnionové dutiny vyplněné tekutinou situované mezi amnionem a embryem. Buňky tvořící serózu mizí, ale embryo, amnion a žloutek zůstávají obklopené nebuněčnou vrstvou, vyprodukovanou buňkami serózy před tím, než vymizely.

Zárodečná páska

Padesát hodin po naklazení vajíček se embryo zkracuje kvůli vchlipování zadního střeva, později se prodlužuje zpět podél jeho podélné osy. Zejména abdominální a hrudní segmenty se výrazně zkracují, ale zároveň se současně laterálně rozšiřují. Ve výsledku se přesouvá zadní část embrya z dorzální strany okolo zadní části žloutku. Zhruba šedesát hodin po naklazení vajíček se embryo zmenšuje na délku vajíčka, hlava je situována u předního pólu a poslední část abdomenu na zadním pólu. Tyto dva pohyby, prodloužení během a krátce po gastrulaci následované zkrácením o několik hodin později, je typické pro hmyz s dlouhou zárodečnou páskou, u kterých embryo pochází z celé laterální poloviny blastodermu a u kterých hraje mitóza důležitou roli ve formování embrya podél jejich podélné osy. Důvody pro tyto pohyby nejsou zatím jasné. U hmyzu s krátkou zárodečnou páskou sčítá zárodečný terčík pouze malou část blastodermu, větší část představuje prekurzor serózy. U této skupiny hmyzu pochází pouze přední část embrya ze zárodečného terčíku, zatímco zbytek těla se objevuje krok za krokem, kdy se vyvíjí jeden segment za druhým. U většiny hmyzu této skupiny, embryo nejprve leží na břišní straně blízko zadního pólu, během proliferace se přesunuje kolem předního pólu do žloutku, později se vyvalí zpátky ze žloutku, aby dosáhlo konečné ventrální polohy.

Amnion mění svojí polohu současně se zatahováním zárodečné pásky. Ta se postupně rozpadá a buňky migrují améboidním způsobem z ventrální strany na dorzální. Buňky se zde opět semknou a vytvoří tenký epitel pokrývající dorzální stranu žloutku, která zatím není okupována embryem. Amnion zde slouží jako dočasný dorsal closure.

Během zatahování zárodečné pásky, ventrálně fúzíjí hlavové laloky a vzniká hlavová kapsule, která zakrývá rostoucí mozek. Tykadla, části úst a končetiny se prodlužují, ale brzy

jsou embryo a amnion pokrytí kutikulou, která brání dalšímu růstu. V tomto okamžiku embryo nemění jeho vnější strukturu po dobu několika hodin. Zkrácené embryo nyní zeširoka zaujímá celou ventrální polovinu žloutku stejně jako oba póly. Organogeneze probíhá uvnitř embrya.

Dorsal closure

Sto hodin po naklazení vajíček dochází k poslednímu velkému přeorganizování embryonálního těla. Po svlékání kutikuly se epidermální buňky zplošťují a epidermis se rozprostírá kolem hřbetní části žloutku. Části mezodermy se také přesunují na hřbet. Nakonec se pokožka setkává z obou stran podél hřbetní osy a srůstá, čímž tvoří část mezodermy, a formuje trubicovité srdce. Amnion zarůstá pokožkou a vytrácí se uvnitř. Opět rostou tykadla, části úst a končetiny a druhý pár čelistí se přesunuje mediálně, srůstá a formuje spodní pysk (labium). Zadní část embrya se protahuje z terminální do ventrální pozice. Brzy po dorsal closure je embryo opět pokryto kutikulou, která ukazuje larvální struktury. Přes průhlednou membránu vajíčka začíná být viditelná barva těla (Fleig, 1996).

1.5. Záměr práce

Navzdory tomu, že bázlivec kukuřičný je škůdce s obrovským ekonomickým významem, zůstává mnoho aspektů jeho biologie téměř neprobádáno. Laboratořím, které se zabývají výzkumem bázlivce kukuřičného, se například nedaří zavést kontinuální laboratorní chov. V praxi tak vajíčka případně dospělce odebírají z terénu, v laboratoři nakladená vajíčka ponechávají přes zimu ve venkovních podmínkách, což logicky kopíruje životní cyklus bázlivce v přírodě. Materiál na pokusy v podobě dospělců tak mají k dispozici pouze během vegetační sezóny a ještě vlivem různého načasování líhnutí značně nestejnorodý. Proto jsme se pokusili zavést kontinuální chov za standardních podmínek tak, abychom měli brouky k dispozici i jindy než během vegetačního období. Aby se nám to podařilo, bylo nutné vyřešit především otázku ukončení diapauzy vajíček, a eliminovat tak nutnost vajíčka chladit různě dlouhou dobu a s nejistým výsledkem. Zaměřili jsme se proto na to, jestli je diapauza skutečně obligatorní, jak uvádí literatura, nebo fakultativní a lze tedy provozovat chov bez chlazení. Za standardního dlouhého dne 18:6 (foto:skotofáze) se nám to během experimentů prováděných v bakalářské práci nepodařilo (Janská, 2013), proto jsme délku dne odpovídajícím způsobem prodloužili. Vzhledem k tomu, že jsme chtěli jednoznačně prokázat, že se vajíčka v extrémně dlouhém dni vyvíjejí normálně, studovali jsme i vývoj embrya. V literatuře se uvádí, že zhruba po 11 – 13 dnech je embryonální vývoj v přírodě zastaven a

vajíčka vstupují do diapauzy obligatorního typu (Meinke et al., 2009), což jsme ověřovali za výše odvozených chovných podmínek v laboratoři.

2. CÍLE PRÁCE

1. Zavést kontinuální chov bázlivce kukuřičného v laboratorních podmínkách.
2. Zjistit podmínky vedoucí k ukončení diapauzy vajíček, zejména s ohledem na vystavení chladnému období.
3. Vyhodnotit délku přežívání dospělců bázlivce kukuřičného v laboratoři – posoudit vliv teploty.
4. Pozorovat embryonální vývoj vajíček bázlivce kukuřičného v podmínkách extrémně dlouhého dne.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Vývoj vajíček bázlivce kukuřičného v roce 2014

Experiment probíhal v insektáriu Entomologického ústavu v Českých Budějovicích a byl zahájen poslední týden v červenci 2014, ukončen byl první týden v říjnu 2015. Cílem bylo zjistit, za jakých podmínek je ukončena diapauza vajíček a zavést kontinuální chov bázlivce kukuřičného v laboratorních podmínkách.

Dospělci bázlivce kukuřičného byli nasbíráni v kukuřičném poli na jižní Moraně a následně převezeni do Českých Budějovic. Poté byli brouci rozděleni do krabiček vždy po dvaceti kusech. V každé krabičce bylo 10 samic a 10 samečků. Celkem jsme měli 29 krabiček, tedy 580 brouků. Krabičky byly poté umístěny do insektária s nastavenou fotoperiodou 20:4 hodin (foto:skotofáze) a teplotou zhruba 22 °C. Brouci byli krmeni vlásky kukuřice a klasy, potrava jim byla dvakrát týdně měněna. Snůšky byly vybírány po celou dobu kladení, tedy přibližně dva měsíce, jednou týdně každé pondělí a následně přenesena do květináčů s hlínou. Květináče s vajíčky byly po celou dobu pokusu umístěny v insektáriu, kde byla nastavena stejná fotoperioda, jako měli brouci během kladení a teplota 25 °C. Květináče byly pravidelně zalévány, aby měla vajíčka dostatek vlhkosti. Druhý týden v lednu (12. 1. 2015) byla do květináčů s vajíčky zasazena naklíčená kukuřice, aby se případně vylíhnuté larvy měly na čem žít. Od začátku února byly postupně v květináčích s kukuřicí nalézány larvy. Na začátku března byli v kukuřici poprvé zaznamenáni dospělí brouci a byli zde nalézáni během celého měsíce a jejich počet byl vždy zaznamenán. Po tom, co přestali objevovat nové dospělé, byli všichni brouci umístěni spolu s květináči s kukuřicí do klecí a opět byli ponecháni v dlouhém dni a nastavenou teplotou na 25 °C. Následně samicami nakladená vajíčka byla opět přenesena do květináčů s kukuřicí a nechána v insektáriu.

Zároveň byla každý týden zaznamenávána úmrtnost brouků. Vždy jednou týdně byli spočítáni mrtví samečci a mrtvé samičky, počet byl zaznamenáván do tabulky.

3.2. Embryonální vývoj bázlivce kukuřičného

Tento pokus probíhal opět v insektáriu a laboratoři Entomologického ústavu v Českých Budějovicích a trval od 22. 7. 2015 do 12. 10. 2015. Cílem tohoto experimentu bylo zjistit životnost samic a samečků a pozorovat embryologii vajíček bázlivce kukuřičného.

Brouci byli opět nasbíráni v kukuřičném poli na jižní Moravě a následně převezeni do insektária v Českých Budějovicích. V insektáriu byly nastaveny shodné parametry jako

předešlý rok, tedy 20:4 (foto:skotofáze) a teplota 25 °C. Dospělci byli rozděleni do krabiček, v každé vždy bylo 10 samic a 10 samečků. Celkem jsme měli 11 krabiček vždy po 20 broucích, celkem tedy 220 brouků. Krmeni byli dvakrát týdně vlásky a klasy kukuřice. Po dvou týdnech v insektáriu začaly samičky klást vajíčka. Vajíčka byla každý týden vybírána a použita k dalším pokusům. Stejně jako předešlý rok byla opět každý týden zaznamenávána úmrtnost dospělců. Počet mrtvých samic a mrtvých samečků byl vždy jednou týdně zaznamenán do tabulky.

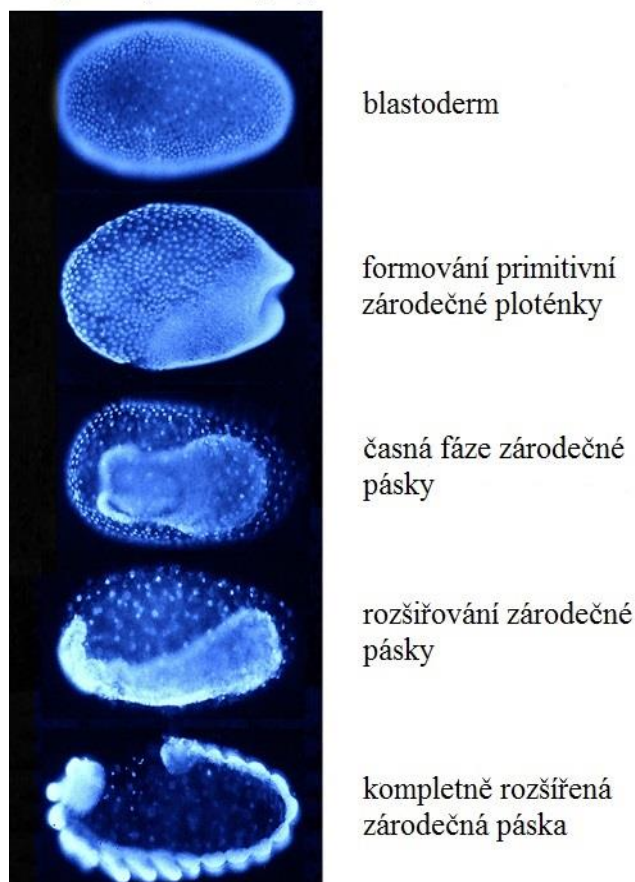
3.3. Barvení vajíček

Vybraná vajíčka byla barvena pomocí fluorescenčního barviva podle postupu, který uvádí Masci and Monteiro (2005) a následně pozorována pod fluorescenčním mikroskopem a fotografována. Barvena byla různě stará vajíčka – 7 dní, 10 dní, 14 a 16 dní, aby mohl být porovnáván vývoj vajíček. Nakladená vajíčka byla skladována v insektáriu na síťce položené na plastové krabičce s vodou, aby vajíčka měla dostatek vlhkosti. Zde byla vajíčka uložena požadovaný počet dní a poté použita na barvení.

Vajíčka byla nejprve ponořena do Petriho misky s bělicím přípravkem, aby byla vajíčka zbavena vnějšího obalu - chorionu. Bělicí přípravek byl smíchán s destilovanou vodou v poměru 1:3 (2,5 ml bělicího přípravku a 7,5 ml destilované vody), do tohoto roztoku byla vajíčka ponořena pouze na několik vteřin, delší ponoření vajíček v roztoku by je poškodilo. Aby se předešlo zničení vajíček, byla dechorionace prováděna pod binolupou Leica S6D (Leica, Wetzlar, Německo), kde bylo pozorováno postupné odplavování chorionu. Po odstranění chorionu byla vajíčka pomocí jemné entomologické pinzety přenesena do Petriho misky s předem připraveným roztokem 7,5 ml destilované vody a 2,5 ml PBS, kde byla ponechána 30 minut. Po 30 minutách byla vajíčka přendána do 5 ml destilované vody a 5 ml PBS a byla zde opět 30 minut. Ve třetím kroku byla vajíčka dána na 30 minut do 2,5 ml destilované vody a 7,5 ml PBS. V posledním kroku byla vajíčka ponořena do 10 ml PBS a nechána alespoň 2 hodiny v lednici. Mezitím byl na analytických vahách navážen 1 mg fluorescenčního barviva Hoechst 33258. Barvivo bylo dáno do mikrozkušavky a pomocí pipety přidán 1 ml destilované vody. Po dvou hodinách byla vajíčka vyjmuta z lednice a přenesena na Petriho misku se skleněným dnem a vložena do kapky PBS. K vajíčkům bylo přidáno barvivo a celý obsah byl ihned zabalen do hliníkové folie, aby se snížila fotodegradace, a na minimálně 20 minut uložen v lednici. Vajíčka byla poté pozorována pod fluorescenčním mikroskopem (Zeiss Jena, Jena, Německo) a fotografována. Tento mikroskop

byl přizpůsoben pro používání fotoaparátu na kinofilm, což vzhledem k tomu, že takový fotoaparát nebyl dostupný, vedlo k improvizovanému řešení. Na fotografování byl použit digitální fotoaparát Canon EOS 500D (Canon, Tokio, Japonsko), který byl nasazen na okuláry mikroskopu. Fotografie byly poté prohlédnuty, tříděny a popsány podle článku Strobla and Stelzera (2014), Masciho and Monteiro (2005) a podle obrázku (**Obr. 1**), který byl upraven z článku Tautze (1999) a kde jsou znázorněny fáze embryonálního vývoje potměníka hnědého (*Tribolium castaneum*).

Raný embryonální vývoj *Tribolia castaneum*



Obr. 1 Obrázek zobrazuje jednotlivé fáze embryonálního vývoje potměníka hnědého (*Tribolium castaneum*). Obrázek byl upraven podle obrázku, který je dostupný na: <http://www.sdbonline.org/sites/fly/vdevlhom/triboli.jpg>.

3.4. Statistické vyhodnocení přežívání dospělců za rok 2014 a 2015

Výsledky přežívání dospělců pořízené v roce 2014 a v roce 2015 byly vyhodnoceny v programu STATISTICA v. 7.2 (StatSoft Inc. Tulsa, OK, USA). Na vyhodnocení byla použita metoda analýza přežívání (Kaplan-Meierova křivka).

4. VÝSLEDKY

4.1. Vývoj vajíček bázlivce kukuřičného v roce 2014

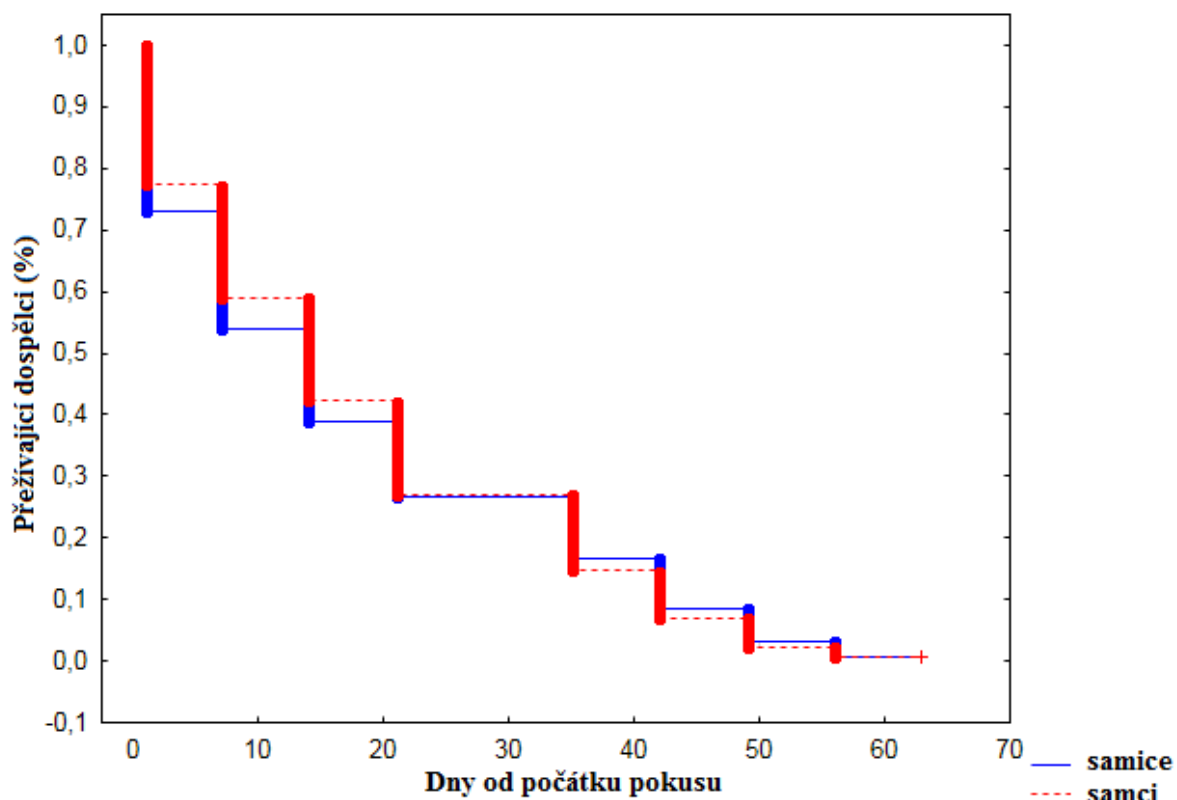
Poté, co byli dospělci uloženi v inšektáriu (22 °C, fotoperioda 20:4) a krmeni vlásky a klasy kukuřice, začaly samičky klást vajíčka. Vajíčka byla poprvé objevena na klasech kukuřice třetí týden po začátku pokusu (11. 8. 2014). Samičky kladly vajíčka celkem 60 dní. Z vajíček, která byla od naklazení uložena v květináčích s půdou a následně k nim zasazena naklíčená kukuřice, se na začátku února vylíhly larvy. Poprvé byly larvy, které se začaly líhnout po zhruba čtyřech měsících, co byla vajíčka uložena v inšektáriu (25 °C, fotoperioda 20:4), na kukuřici zaznamenány 9. 2. 2015. Na rostlinách kukuřice bylo viditelné charakteristické poškození. První vylíhnutí dospělci se objevili 2. 3. 2015 a objevovali se průběžně až do konce března. Úspěšnost líhnutí byla zhruba 10%, z přibližně 1500 vajíček se vylíhlo asi 150 larev, z nichž vývoj úspěšně dokončilo 132 dospělců, z toho 64 samiček a 68 samečků. Vzhledem k tomu, že v květináčích bylo vždy nalézáno více snůšek vajíček, nedá se statisticky prokázat, které pohlaví se objevilo dříve. Jednotlivé počty vylíhnutých samiček a samečků jsou uvedeny v **Tab. 1**. Poté samičky kladly vajíčka do květináčů s kukuřicí. V květináčích s nakladenými vajíčky, které byly ponechány v inšektáriu po dobu zhruba čtyř měsíců, nebyly nalezeny žádné vylíhnuté larvy.

Tab. 1 Tabulka uvádí počet vylíhnutých samiček a samečků bázlivce kukuřičného během měsíce března 2015.

Datum vylíhnutí	dospělci	
	samice	samci
10.3.	22	34
11.3.	3	3
12.3.	3	1
13.3.	2	3
16.3.	5	4
17.3.	4	4
19.3.	4	2
23.3.	13	5
24.3.	5	8
26.3.	3	2
31.3.	1	2

4.2. Přežívání dospělců za rok 2014

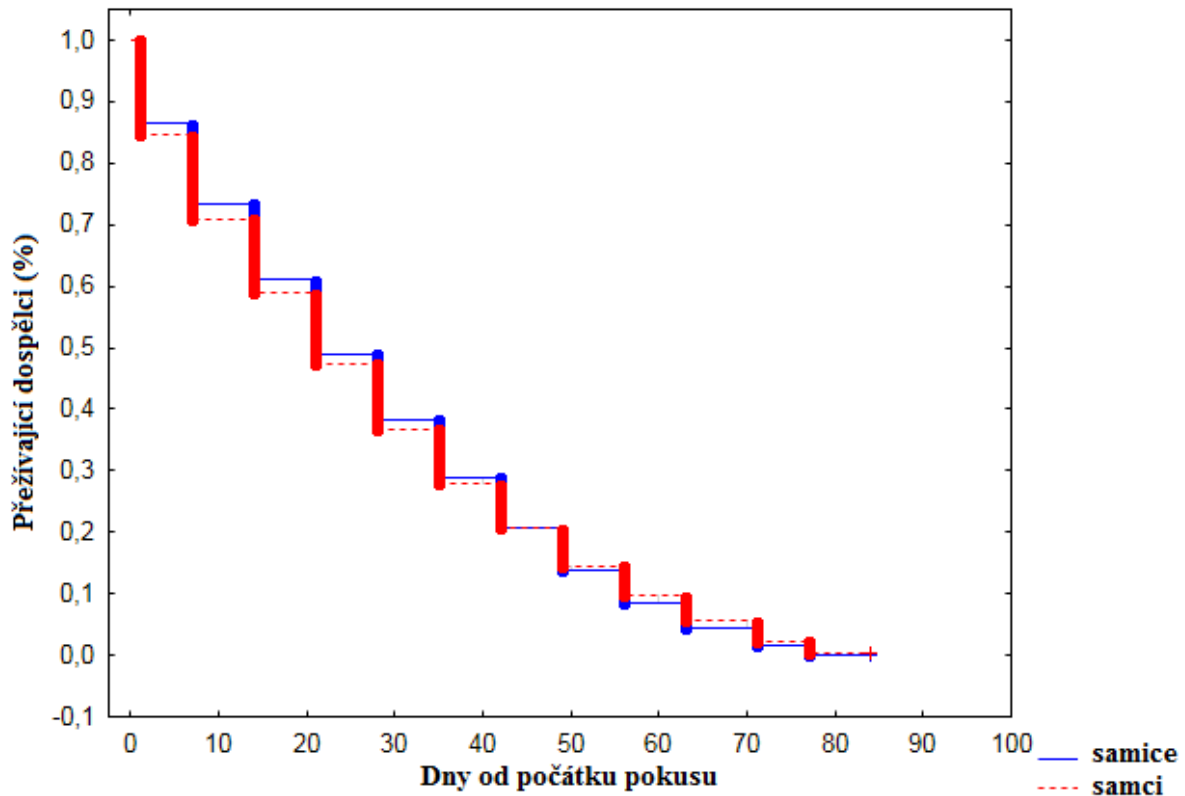
Počet mrtvých samic a samečků krmených na vláscích a klasech kukuřice zaznamenávaný v týdenních intervalech je uvedený v příloze (viz **Tab. 1** a **Tab. 2**). Grafické zpracování dat pomocí Kaplan-Meierovy křivky je uvedeno na **Obr. 2**. Životnost dospělců byla maximálně 63 dní. Přibližně 50% mortalita byla zaznamenána po dvou týdnech.



Obr. 2 Graf zachycuje procento přeživších dospělců bázlivce kukuřičného v roce 2014 zaznamenávané v týdenních intervalech. Modře jsou v grafu zaznamenány samičky a červeně jsou označeni samečci.

4.3. Přežívání dospělců za rok 2015

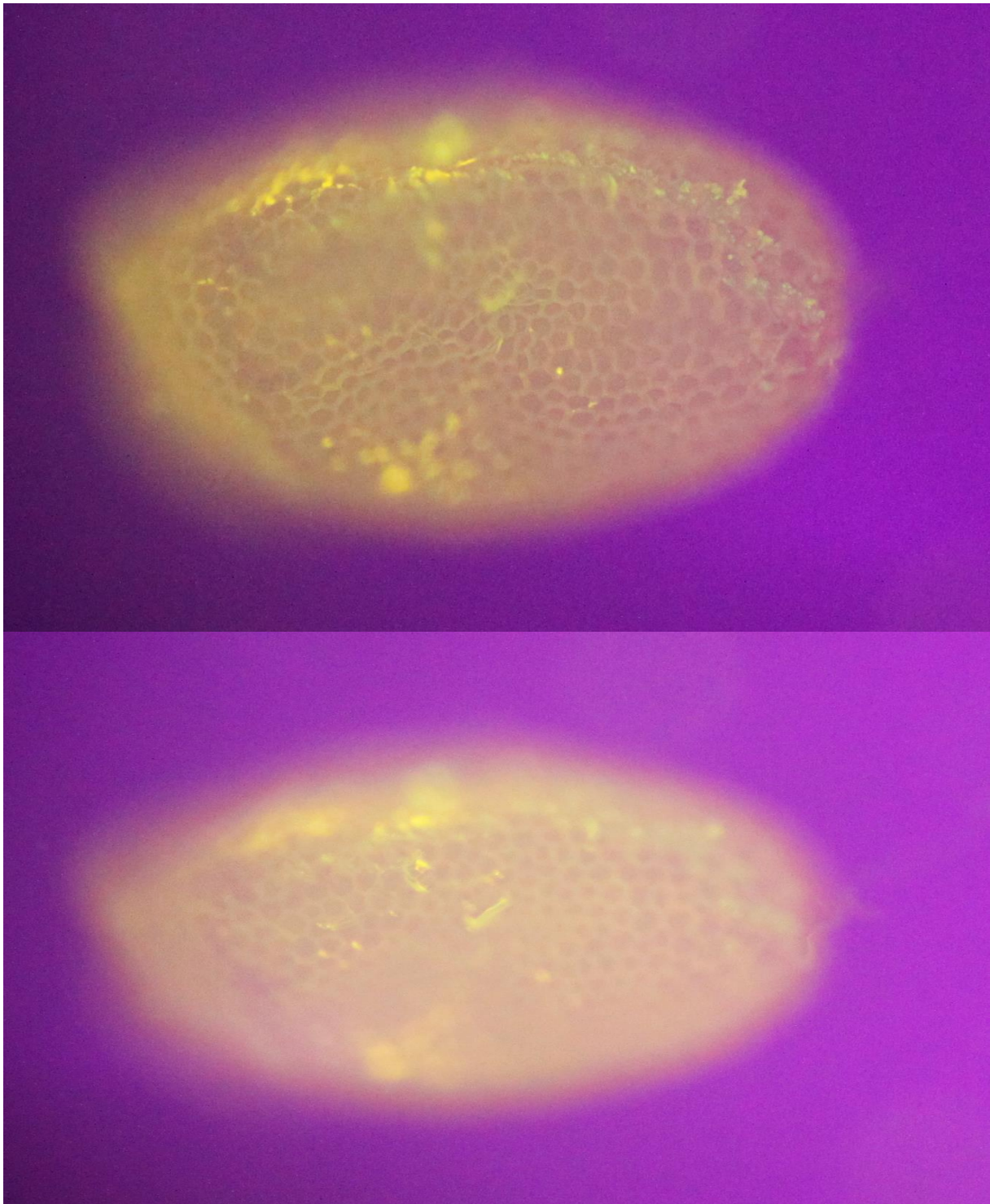
Počet mrtvých samic a samečků krmených na vláscích a klasech kukuřice zaznamenávaný v týdenních intervalech je uvedený v příloze (viz **Tab. 3**). Grafické zpracování dat pomocí Kaplan-Meierovy křivky je uvedeno na **Obr. 3**. Z obrázku vyplývá, že dospělci žili maximálně 84 dní. Přibližně 50% mortalita byla zaznamenána po třech týdnech.



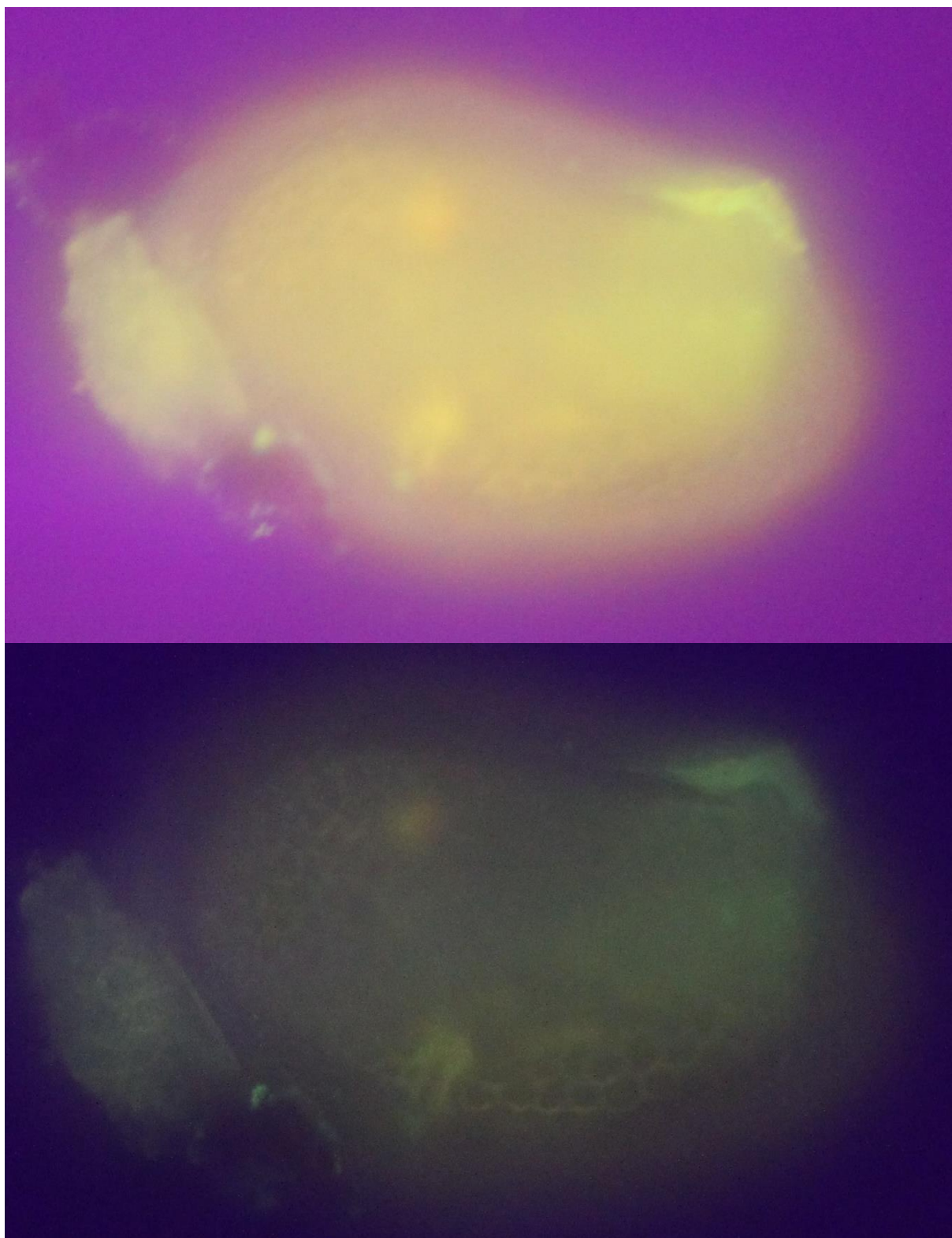
Obr. 3 Graf zachycuje procento přeživších dospělců bázlivce kukuřičného v roce 20145 zaznamenávané v týdenních intervalech. Modře jsou v grafu zaznamenané samičky a červeně jsou označeni samečci.

4.4. Barvení vajíček

Vajíčka nabarvená pomocí fluorescenčního barviva Hoechst 33258 v rozdílné vývojové fázi jsou zachycena na **Obr. 4** a **Obr. 5**. Na **Obr. 4** je zobrazena konečná fáze blastodermu, kdy začíná pohyb jader z přední dorzální části směrem k zadní ventrální části, kde nakonec bude většina jader tvořit primitivní zárodečnou ploténku. Na **Obr. 5** je zobrazena raná fáze zárodečné pásky, která se formuje na ventrální straně a jsou viditelné i hlavové laloky a růstová zóna.



Obr. 4 Vajíčko bázlivce kukuřičného obarvené fluorescenčním barvivem Hoechst 33258. Pozorováno pod fluorescenčním mikroskopem 10 dní po naklazení. Zachyceny jsou buňky blastodermu a zhuštění jader ve spodní části formující primitivní zárodečnou ploténku.



Obr. 5 Vajíčko bázlivce kukuřičného obarvené fluorescenčním barvivem Hoechst 33258 a pozorováno pod fluorescenčním mikroskopem 14 dní po naklazení. Zobrazena je časná fáze zárodečné pásky během gastrulace.

5. DISKUZE

5.1. Diapauza bázlivce kukuřičného

Diapauza představuje důležitou část životního cyklu u mnoha druhů bezobratlých (Košťál, 2006). U hmyzu představuje hlavní formu adaptace na sezónní změny prostředí (Masaki, 2002). Diapauza je definována jako stav, během kterého dojde k pozastavení vývoje (Košťál, 2006). Diapauzní hmyz může být vysoce tolerantní ke chladu, horku, suchu nebo hladovění, ale k těmto podmínkám jsou dobře přizpůsobiví, pouze když diapauza nastane ve vhodný čas. Toto načasování je ve většině případů kontrolováno odezvou na sezónní podněty, jako je délka dne nebo teplota. Načasování ukončení diapauzy je také důležité pro efektivní využití zdrojů, primárně je určeno intenzitou diapauzy a sekundárně regulováno sezónními podněty (Masaki, 2002).

Bázlivec kukuřičný přezimuje ve stádiu vajíčka (Meinke et al., 2009). Mnoho druhů hmyzy vstupuje do diapauzy ve stádiu vajíčka a je běžné, že nízké teploty jsou nutné k tomu, aby došlo k vylíhnutí larev (Andrewartha and Birch 1954). Košťál (2006) uvádí, že chlad patří mezi nejčastější faktor, který ukončuje zimní diapauzu.

George and Ortman (1965) prokázali, že diapauza bázlivce kukuřičného se vyskytuje u vajíček a že rychlost vývoje je ovlivněna nízkými teplotami. Woodson and Gustin (1993) tvrdí, že nízké teploty půdy jsou důležitým faktorem pro přežívání vajíček bázlivce kukuřičného. Berger (2001) uvádí, že vajíčka musí projít chladovým obdobím před vylíhnutím. Délka chladového období, která je nutná pro ukončení diapauzy vajíček bázlivce kukuřičného se v literatuře liší. Krysan et al. (1984) uvádí, že chladové období dlouhé 4 měsíce je nutné pro synchronizaci líhnutí. Jackson and Elliott (1988) zaznamenal první líhnutí vajíček poté, co byla uložena v teplotě 8 °C po dobu 7 až 8 měsíců a následně inkubována ve 25 °C.

Vajíčka bázlivce kukuřičného dobře snáší vystavení nízkým teplotám, ovšem dlouhodobé vystavení teplotám pod bodem mrazu zvyšuje jejich mortalitu (Chiang 1973, Gustin 1981). Woodson and Gustin (1993) studovali míru mortality u vajíček bázlivce kukuřičného, která byla vystavena různě nízkým teplotám po dobu až 14 týdnů. Vajíčka byla v laboratoři dána do teplot 0, -5 a -7,5 °C. Úspěšnost vylíhnutých vajíček se snižovala se snižující se teplotou, doba vývoje se prodlužovala při nižších teplotách. Patel et al. (1967) zjistil, že líhnutí vajíček bylo sníženo při teplotě -2 °C a že po vystavení vajíček teplotám -10 nebo -23 °C na dobu šesti nebo více týdnů nedošlo k žádnému líhnutí. Berger (2001) zaznamenal, že líhnutí bylo

sníženo na 50 %, pokud byla vajíčka vystavena teplotám $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu jednoho týdne, žádná vajíčka se nevylihla, pokud byla vajíčka vystavena těmto teplotám po dobu čtyř týdnů nebo pokud byla v teplotě $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ uložena jeden týden. Gustin (1981) označil teplotu půdy $-7,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ jako dolní hranici přežití, protože při nižších teplotách zaznamenal u přezimujících vajíček výraznou mortalitu.

Jako prahová teplota, která vyvolává ukončení diapauzy, se pohybuje okolo $11\text{ }^{\circ}\text{C}$, přičemž mírné odlišnosti byly zaznamenány v rámci populací z různých regionů (Hodgson et al., 2008). Berger (2001) uvádí hraniční teplotu $12,8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Teplotní požadavky pro líhnutí se pohybují v rozmezí 300 až 400 denostupňů. Levine et al. (1992) zkoumal prahové teploty a teplotní podmínky nutné pro vylíhnutí vajíček v laboratorních podmínkách na populaci bázlivce kukuřičného pocházející ze státu Illinois v USA. Rychlost vývoje se lineárně zvyšovala se zvyšující se teplotou. Prahová teplota pro první líhnutí byla $12,7\text{ }^{\circ}\text{C}$, 50 % líhnutí nastalo při hraniční teplotě $11,2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Délka vývoje u vajíček této populace byla delší než u vajíček pocházejících z Minnesoty a Jižní Dakoty při podobných teplotách, což podporuje teorii, že vajíčka ze severnějších populací mají tendenci líhnout se dříve než vajíčka z jižních zeměpisných šířek a že pravděpodobně existují fyziologické rozdíly mezi populacemi (Levine et al., 1992).

Během našeho pokusu byla vajíčka po celou dobu uložena v insektáriu, kde byla nastavena teplota $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, což se uvádí jako optimální teplota pro následnou inkubaci vajíček po tom, co projdou chladem. Vajíčka použitá v našem experimentu nebyla vystavena žádnému chladovému období, pouze extrémně dlouhému dni (20 hodin). Lze se tedy domnívat, že v literatuře uváděná (Krysan et al., 1977) obligatorní diapauza byla v našem pokusu přerušena vlivem nestandardních světelných podmínek. Předpokladem správnosti tohoto tvrzení je však skutečnost, že světlo proniká do hlíny v květináči o hloubce cca 15 cm, kde byla vajíčka umístěna. Vliv velmi dlouhého dne na ukončení diapauzy by bylo možno jednoznačně potvrdit paralelním pokusem v úplné tmě, který ovšem nebyl prováděn, jelikož cílem bylo především zavedení kontinuálního laboratorního chovu bez nutnosti přenosu vajíček do chladu. Vliv dlouhého dne na ukončení obligatorní diapauzy byl však již v minulosti prokázán (Doležal and Sehnal, 2007; Hodek, 2012). Na základě poměrně dlouhé doby mezi umístěním vajíček do dlouhého dne a teploty $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ se domníváme, že se v případě bázlivce kukuřičného jedná skutečně o obligatorní diapauzu, i když v porovnání s některými dříve publikovanými daty byla doba nutná k obnovení vývoje kratší než u vajíček, která různí autoři vystavovali chladu (Jackson and Elliott, 1988) Poměrně vysoká byla v našem pokusu i úspěšnost

dokončení vývoje do dospělců, která byla téměř 10%. Někteří autoři uvádějí tuto úspěšnost v rozmezí od méně než 1% až 2,8% (Toepfer et al., 2008; Elliott and Hein, 1991).

5.2. Přežívání dospělců bázlivce kukuřičného

Bázlivec kukuřičný je považován za monovoltinní druh (Meinke et al., 2009). Údaje o průměrné délce života uváděné v dříve publikovaných člancích se mezi sebou většinou liší. Bylo zaznamenáno, že brouci bázlivce kukuřičného žijí v poli průměrně 52 dnů (maximálně 86 dnů), zatímco v laboratoři se průměrná délka života trvá déle (Toepfer and Kuhlmann, 2005). Elliott et al. (1990) uvádí průměrnou délku života mezi 50 až 62 dny, Hill (1975) zaznamenal průměrnou životnost u brouků držených v kontrolovaných laboratorních podmínkách 78 dní, zatímco Branson and Johnson (1973) zaznamenal, že v brouci v laboratoři žili až 95 dní. Tyto údaje se lišily v závislosti na laboratorních podmínkách. Elliott et al. (1990) během svého pokusu udržoval teplotu v laboratoři 24 °C. Hill (1975) měl v laboratoři nastavenou fotoperiodu 16:8 (foto:skotofáze), zatímco během fotofáze byla teplota 28 °C a během skotofáze byla teplota 25 °C/18 °C.

V polních podmínkách populace sameček umírala rychleji než populace samiček, což naznačuje, že mortalita sameček je vyšší než u samiček (Ball, 1957). Nicméně, laboratorní studie naznačují srovnatelnou životnost samiček a sameček (Toepfer and Kuhlmann, 2005). V laboratoři po 42 dnech se mortalita bázlivce kukuřičného rapidně zvyšovala nezávisle na typu potravy (Elliott et al., 1990), s přibližně 50% mortalitou po 50 dnech (Branson and Sutter, 1985).

Životnost brouků v polních podmínkách je nepříznivě ovlivňována např. nedostatkem potravy nebo nízkými teplotami (Toepfer and Kuhlmann, 2005). Elliott et al. (1990) prokázal, že v laboratoři úmrtnost brouků závisí také na výživové hodnotě rostlin, kterými jsou krmeni. Mortalita se zvyšovala s rostoucím věkem rostlin. Životnost byla nejdelší u brouků, kteří byli krmeni zelenými vlásky kukuřice, pylem a listy kukuřice. Na druhou stranu, nejkratší dobu žili ti, kteří byli krmeni rostlinami před nebo po kvetení. Ioana (2003) také uvádí, že kvalita potravy ovlivňuje životnost brouků, který prováděl pokusy s brouky drženými v laboratorních podmínkách a kmenými různými částmi kukuřice (zelené listy kukuřice, zelené vlásky a pyl, nezralé kukuřičné klasy a hnědé vlásky kukuřice). Brouci krmeni listy kukuřice žili nejdéle (94 dní), naopak brouci, kteří se živili na hnědých vláskách, žili nejkratší dobu, 60 dní.

Z literatury vyplývá, že přežívání dospělců je kromě potravy ovlivněno především teplotními a světelnými podmínkami. Teplota ovlivňuje mnoho procesů u dospělců zahrnující délku života, vývoj a plodnost. Konstantní teplota okolo 25 °C se uvádí jako vyhovující pro tento druh (Jackson, 1986).

Během našich experimentů prováděných dva roky po sobě byla zaznamenána životnost dospělců maximálně 63 dní v roce 2014 a až 84 dní v roce 2015. Přibližně 50% mortalita byla zaznamenána po dvou týdnech během experimentu v roce 2014 a v roce 2015 byla přibližně 50% mortalita po třech týdnech. Úmrtnost samečků a samic se lišila pouze minimálně. V roce 2014 byla nepatrně vyšší mortalita samic, naopak v roce 2015 byla o trochu vyšší mortalita samečků. Kratší životnost dospělců v roce 2014 může být ovlivněna teplotou v insektáriu, kde byli brouci umístěni. Zatímco v roce 2015 byli brouci drženi v teplotě 25 °C, v roce 2014 byla v insektáriu udržována teplota 22 °C. Fotoperioda 20:4 (foto:skotofáze) a potrava, kterou byli brouci krmeni, byly po oba roky stejné. Vzhledem k tomu, že nemůžeme určit přesné stáří dospělců, protože brouci jsou sbíráni v poli a nevíme, kdy přesně vyletěli, může být rozdílná životnost dospělců v laboratoři vysvětlena i jejich rozdílným stářím.

Branson and Johnson (1973) zaznamenali, že samičky byly schopné klást životaschopná vajíčka až 60 dní po páření. Hill (1975) zaznamenal toto období dlouhé 76 dní. Výsledky našeho pokusu se shodují s výsledky, které publikoval Branson and Johnson (1973). Samičky, které byly použity v našem pokusu, kladly také 60 dní. Klazení trvalo 60 dnů jak během experimentu v roce 2014, tak během experimentu, který byl prováděn o rok později.

V literatuře se také uvádí délka období před tím, než samičky začnou klást vajíčka. Branson and Johnson (1973) zaznamenali v laboratoři u dospělců bázlivce kukuřičného období před klazením vajíček dlouhé 14 dní, Hill (1975) pozoroval u samic toto období dlouhé 12 dní. Berger (2001) uvádí, že samičky začínají klást vajíčka zhruba 10 dní po oplození. Během našeho pokusu prováděného v roce 2014 trvalo toto období 18 dní, v roce 2015 bylo zaznamenáno období před klazením vajíček dlouhé 12 dní. Delší doba před klazením v roce 2014 mohla být opět zapříčiněna nižší teplotou v insektáriu.

5.3. Embryonální vývoj

V hmyzí embryologii existují dva základní typy embryí, embrya s dlouhou zárodečnou páskou a embrya s krátkou zárodečnou páskou.

Charakteristika dlouhých zárodečných embryí zahrnuje meroistickou oogenezi, relativně rychlou embryogenezi, neschopnost regulovat embryogenezi v reakci na změny prostředí a velkou zárodečnou pásku uvnitř vajíčka. Druhy s krátkou zárodečnou páskou mají panoistickou oogenezi, delší trvání embryogeneze a schopnost příznivě reagovat na změny prostředí během embryogeneze. Předpokládá se, že osud každé buňky zárodečné pásky je určen později během vývoje embryí s krátkou zárodečnou páskou. Kromě toho buňky serózy, které zůstaly z raného blastodermu poté, co se diferencioval zárodečný terčík, jsou mnohjaderné, na rozdíl od druhů s dlouhou zárodečnou páskou, které mají obvykle tyto buňky mononukleární (Masci and Monteiro, 2005).

V případě druhů s tzv. dlouhou zárodečnou páskou vznikají všechny segmenty téměř současně. Naproti tomu, u hmyzu s krátkou zárodečnou páskou, jsou zadní segmenty postupně přidávány jeden po druhém k zadní růstové zóně, což naznačuje opakující se mechanismus jako somitogeneze u obratlovců (Nakao, 2010).

Zatímco vývoj embryí s dlouhou zárodečnou páskou je považován za vysoce odvozený, embryogeneze embryí s krátkou zárodečnou páskou je považována za základní a je pozorována u většiny členovců (Schröder et al., 2008).

Octomilka obecná (*Drosophila melanogaster*) patří mezi nejvýznamnější hmyzí druh používaný jako modelový organismus ve vývojové biologii hmyzu. Potemník hnědý (*Tribolium castaneum*) je rovněž považován za vynikající modelový organismus a stal se druhým hmyzím modelem po *Drosophila melanogaster*.

Raná embryologie u *Drosophily* a *Tribolia* a u většiny dalšího hmyzu je poměrně stereotypní. V zygotě probíhá rychlé mitotické dělení, jádra migrují ze žloutku na okraj vajíčka, kde tvoří syncytiální blastoderm. Později po několika dalších cyklech dělení vzniká buněčný blastoderm, který je jednovrstvý a obklopuje žloutek vajíčka. Kromě těchto velmi časných podobností, embryo *Tribolia* vykazuje mnoho znaků, které jsou společné pro většinu hmyzu (a další členovce), ale ne pro *Drosophilu*, která se projevuje mnoha odvozenými znaky. U *Tribolia* se pouze zadní a ventrální část blastodermu zhušťuje, aby vzniklo embryo správně. Zbytek blastodermu se diferencuje na dva extra-embryonální epitely – serózu, která obklopuje celý povrch vajíčka a amnion, který se ohýbá kolem embrya, aby pokryl jeho ventrální povrch.

Na rozdíl od *Tribolia*, zárodek embrya *Drosophily* prodělal expanzi v průběhu evoluce, tak, že zabírá téměř celý povrch blastodermu, zatímco extra-embryonální tkáň byla zredukována a je omezena na většinu dorzální části. V důsledku této expanze, a skutečnosti, že všechny tělní segmenty vznikají současně, je embryo *Drosophily* řazeno mezi embrya s dlouhou zárodečnou páskou, zatímco embrya s krátkou zárodečnou páskou, jako je *Tribolium*, jsou specifická segmenty v přední části embrya ve fázi blastodermu a až později během vývoje postupně vznikajícími segmenty v zadní části.

Celkově tyto rozdíly vedou k mnohem dramatičtějším pohybům buněk a epiteliálním přestavbám během raného embryonálního vývoje *Tribolia* ve srovnání s *Drosophilou* (Benton and Pavlopoulov, 2014).

Z našich omezených informací se zdá, že embryo bázlivce kukuřičného se jeví spíše jako embryo s krátkou zárodečnou páskou. Embryogeneze probíhá spíše pomalu. Po deseti dnech byla pozorována konečná fáze blastodermu. Po čtrnácti dnech byla evidentní raná fáze gastrulace. Tyto fáze vývoje jsou u hmyzu s dlouhou zárodečnou páskou pozorovány do několika hodin po naklazení vajíček. V této vývojové fázi (raná gastrulace) se zřejmě embryonální vývoj zastaví a vajíčka vstupují do diapauzy. Meinke et al. (2009) ve své publikaci uvádí, že embryonální vývoj embrya se zastaví zhruba po 11 - 13 dnech, kdy vajíčka přejdou do diapauzy, což potvrzují i naše pozorování. Vajíčka starší než 14 dní se nám nepodařilo zachytit, jelikož ve starších sériích docházelo k vyschnutí, případně ve vyšších vlhkostech k plesnivění vajíček navzdory všem snahám o udržení sterilního prostředí. Plísňe jsou zřejmě i nejvýznamnějším faktorem, který vedl k poměrně nízké (do 10 %) líhivosti popisované v dříve publikovaných pracích a pozorované i během našich pokusů.

6. ZÁVĚR

Hlavním cílem této práce bylo zavedení kontinuálního chovu bázlivce kukuřičného v konstantních laboratorních podmínkách. Za tímto účelem byly prováděny pokusy s diapauzními vajíčky a dospělci bázlivce kukuřičného. Během experimentu s diapauzními vajíčky se podařilo prokázat, že vajíčka nemusí projít chladovým obdobím před vylíhnutím, jak se uvádí v literatuře, a k ukončení diapauzy vede i extrémně dlouhý den (20 hodin). Inkubace vajíček v teplotě 25 °C po 4 měsíce vedla k líhnutí larev, přičemž vývoj do dospělců dokončilo přibližně 10 % jedinců (z původního počtu vajíček), což je množství na horní hranici v literatuře uváděných výsledků pro chovy, kde byla diapauza ukončována chladem. Výskyt obligatorní diapauzy u bázlivce kukuřičného byl potvrzen i sledováním vývoje embryí, jejichž vývoj v teplotě 25° C a 20 hodin dlouhém dni byl zastaven stejně, jako to bylo popsáno u vajíček odebíraných z přírody. U 10 dní starých vajíček byla zřetelná pozdní fáze blastodermu. U 14 dní starých vajíček byla pozorována raná fáze gastrulace. Délku života dospělců a přítomnost pouze jedné generace bázlivce kukuřičného v přírodních podmínkách naopak potvrdil experiment s přežíváním v laboratorních podmínkách, kdy bylo prokázáno, že bázlivci bez rozdílu pohlaví přežívají dva až tři měsíce. Zdánlivý výskyt druhé generace často popisovaný praktickými zemědělci je tedy spíše způsoben různým načasováním líhnutí imag a jejich relativně dlouhým přežíváním.

7. POUŽITÁ LITERATURA

- Andersen, J. F., Metcalf, R. L.** (1986): Identification of a volatile attractant for *Diabrotica* and *Acalymma* spp. from blossoms of *Cucurbita maxima* duchesne. *Journal of Chemical Ecology*, 12: 687-699.
- Andrewartha, H. G., Birch, L. C.** (1954): The distribution and abundance of animals. Chicago Univ. Press, Chicago.
- Ball, H. J.** (1957): On the biology and egg-laying habits of the western corn rootworm. *Journal of Economic Entomology*, 50: 126–128.
- Ball, H. J., Chaudhury, M. F. B.** (1973): A sex attractant of the western corn rootworm. *Journal of Economic Entomology*, 66: 1051-1054.
- Bartlett, R. J., Chiang, H. C.** (1977): Field studies involving the sex-attractant pheromones of the western and northern corn rootworm beetles. *Environmental Entomology*, 6: 853–861.
- Benton, M. A., Pavlopoulos, A.** (2014): *Tribolium* embryo morphogenesis: May the force be with you. *Bioarchitecture* 4: 16-21.
- Berger, H. K.** (2001): The western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*): a new maize pest threatening Europe. *OEPP/EPPO Bulletin*, 31: 411-414.
- Bergman, M. K., Tollefson J. J., Hinz P. N.** (1981): Sampling scheme for estimating populations of corn rootworm larvae. *Environmental Entomology*, 10: 986-990.
- Bernklau, E. J., Bjostad, L. B.** (1998): Reinvestigation of host location by western corn rootworm larvae (Coleoptera: Chrysomelidae): CO₂ is the only volatile attractant. *Journal of Economic Entomology*, 91: 1331-1340.
- Boetel, M. A., Fuller, B. W.** (1997): Seasonal emergence-time effect on adult longevity, fecundity, and egg viability of northern and western corn rootworms (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environmental Entomology*, 26: 1208-1212.
- Boriani, M., Agosti, M., Kiss, J., Edwards, C. R.** (2006): Sustainable management of the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae), in infested areas: experiences in Italy, Hungary and the USA. *Eppo Bulletin*, 36: 531-537.
- Branson, T. F.** (1989): Survival of starved neonate larvae *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 62: 521-523.
- Branson, T. F., Guss, P. L., Jackson, J. J.** (1977): Mating frequency of the western corn rootworm. *Annals of the Entomological Society of America*, 70: 506-508.
- Branson, T. F., Johnson, R. D.** (1973): Adult western corn rootworms: oviposition, fecundity, and longevity in the laboratory. *Journal of Economic Entomology*, 66: 417-418.

- Branson, T. F., Sutter, G. R.** (1985): Influence of population density of immatures on size, longevity, and fecundity of adult *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environmental entomology*, 14: 687-690.
- Bryson, H. R., Wilbur, D. A., Burkhardt, C. C.** (1953): The western corn rootworm, *Diabrotica virgifera* Lec. in Kansas. *Journal of Economic Entomology*, 46: 995–999.
- Calkins, C. O., Kirk, V. M.** (1969): Effect of winter precipitation and temperature on overwintering eggs of 12 of northern and western corn rootworm. *Journal of Economic Entomology*, 62: 541-543.
- Chege, P. G., Clark, T. L., Hibbard, B. E.** (2005): Alternate host phenology affects survivorship, growth, and development of western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) larvae. *Environmental Entomology*, 34: 1441-1447.
- Chiang, H. C.** (1973): Bionomics of the northern and western corn rootworms. *Annual Review of Entomology*, 18: 47–72.
- Coats, S. A., Tollefson, J. J., Mutchmor, J. A.** (1986): Study of migratory flight in the western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environmental Entomology*, 15: 620-625
- Dobson, I. D., Teal, P. E. A.** (1986): Field studies of the temporal response patterns of male *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte and *D. barberi* Smith and Lawrence to 8R-methyl-2R-decyl propanoate. *Physiological Entomology*, 11: 405-410.
- Doležal, P., Sehnal, F.** (2007): Effects of photoperiod and temperature on the development and diapause of the bark beetle *Ips typographus*. *Journal of Applied Entomology*, 131: 165 – 173.
- Elliott, N. C., Gustin, R. D., Hanson, S. L.** (1990): Influence of adult diet on the reproductive biology and survival of the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 56: 15-21.
- Elliott, N. C., Hein, G. L.** (1991): Population dynamics of the western corn rootworm: formulation, validation, and analysis of a simulation model. *Ecological Modelling*, 59: 93-122.
- Fisher, J. R., Jackson, J. J., Sutter, G. R., Branson, T. F.** (1986): Influence of adult diet to corn by larvae of the western corn rootworm *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology*, 79: 114-115.
- Fleig, R.** (1996): Summary of the embryonic development of *Leptinotarsa decemlineata* (Chrysomelidae: Chrysomelinae). *Chrysomelidae Biology* edited by P. H. A. Jolivet and M. L. Cox, vol. 3:109-117.
- George, B. W., Ortman, E. E.** (1965): Rearing the western corn rootworm in the laboratory. *Journal of Economic Entomology*, 58: 375-377.

- Grant, R. H., Seevers, K. P.** (1989): Local and long-range movement of adult western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) as evidenced by washup along Southern Lake Michigan Shores. *Environmental Entomology*, 18: 226-272.
- Gustin, R. D.** (1981): Soil temperature environment of overwintering western corn rootworm eggs. *Environmental Entomology*, 10: 483-487.
- Gustin, R. D., Schumacher, T. E.** (1989): Relationship of some soil pore parameters to movement of first-instar western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environmental Entomology*, 18: 343-346.
- Guss, P. L.** (1976): The sex pheromone of the western corn rootworm (*Diabrotica virgifera*). *Environmental Entomology*, 5: 219-223.
- Hammack, L.** (1996): Corn volatiles as attractants for northern and western corn rootworms beetles (Coleoptera: Chrysomelidae: *Diabrotica* spp.). *Journal of Chemical Ecology*, 22: 1237-1253.
- Hein, G. L., Tollefson, J. J.** (1987): Model of the biotic potential of western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) adult populations, and its use in studying population dynamics. *Environmental Entomology*, 16: 446-452.
- Hibbard, B. E., Randolph, T. L., Bernklau, E. J., Abou-Fakhr, E. M., Bjostad, L. B.** (1997): Electroantennogram-active components of maize silk for adults of the western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environmental Entomology*, 26: 285-296.
- Hill, R. E.** (1975): Mating, oviposition patterns, fecundity and longevity of the western corn rootworm. *Journal of Economic Entomology*, 68: 311-315.
- Hill, R. E., Mayo, Z. B.** (1980): Distribution and abundance of corn rootworm species as influenced by topography and crop rotation in Eastern Nebraska. *Environmental Entomology*, 9: 122-127.
- Hodek I.** (2012): Adult diapause in Coleoptera. *Psyche: a journal of entomology*, 2012: ID249081, 1-10.
- Hodgson, E. W.** (2008): Western corn rootworm. Published by Utah State University Extension and Utah Plant Pest Diagnostic Laboratory, 1-4.
- Ioana G., Marghitas L. A.** (2003): Influence of temperature, humidity and feeding on the development of *Diabrotica virgifera virgifera* Le Conte adults, in laboratory and field conditions. *Bulletin of the University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine*, 59: 70-74.
- Isard, S. A., Spencer, J. L., Mabry, T. R., Levine E.** (2004): Influence of atmospheric conditions on high-elevation flight of western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environmental Entomology*, 33: 650-656.

Jackson, J. J., Elliott, N. C. (1988): Temperature-dependent development of immature stages of the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environmental Entomology*, 17: 166-171.

Jackson, J. J. (1986): Rearing and handling of *Diabrotica virgifera* and *Diabrotica undecimpunctata howardi*. *Methods for the Study of Pest Diabrotica* edited by J. L. Krysan and T. A. Miller: 25-47.

Janská, K. (2013): Vybrané ekofyziologické charakteristiky nových invazivních škůdců v zemědělství. Přírodovědecká fakulta JU, Bakalářská práce, 1-45.

Kang, J., Krupke, Ch. H. (2009): Influence of weight of male and female western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) on mating behaviors. *Annals of the Entomological Society of America*, 102: 326-332.

Kim, J. H., Mullin, Ch. A. (1998): Structure - phagostimulatory relationships for amino acids in adult western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. *Journal of Chemical Ecology*, 24: 1499-1511.

Košťál, V. (2006): Eco-physiological phases of insect diapause. *Journal of Insect Physiology*, 52: 113-127.

Kroutil, P. (2011): Výsledky průzkumu výskytu bázlivce kukuřičného (*Diabrotica virgifera virgifera*) v ČR v roce 2011. Ministerstvo zemědělství ČR, ve spolupráci se Státní rostlinolékařskou správou, 1-11.

Krysan, J. L., Branson, T. F., Castro, G. D. (1977): Diapause in *Diabrotica virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae): a comparison of eggs from temperate and subtropical climates. *Entomologia experimentalis et applicata*, 22: 81-89.

Krysan, J. L. (1982): Diapause in the nearctic species of the *virgifera* group of *Diabrotica*: Evidence for tropical origin and temperate adaptations. *Annals of the Entomological Society of America*, 75: 136-142.

Krysan, J. L. (1972): Embryonic stage of *Diabrotica virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae) at diapause. *Annals of the Entomological Society of America*, 65: 768-769.

Krysan, J. L., Jackson, J. J., Lew, A. C. (1984): Field termination of egg diapause in *Diabrotica* with new evidence of extended diapause *D. barberi* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environmental Entomology*, 13: 1237-1240.

Levine, E., Oloumi-Sadeghi, H., Ellis, C. R. (1992): Thermal requirements, hatching patterns, and prolonged diapause in western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) eggs. *Journal of Economic Entomology*, 85: 2425-2432.

Lew, A. C., Ball, H. J. (1978): The Structure of the apparent pheromone-secreting cells in female *Diabrotica virgifera*. *Annals of the Entomological Society of America*, 71: 685-688.

- Masci, J., Monteiro, A.** (2005): Visualization of early embryos of the butterfly *Bicyclus anynana*. *Zygote* 13: 139-144.
- Masci, J., Monteiro, A.** (2005): Visualization of early embryos of the butterfly *Bicyclus anynana*. *Zygote* 13: 139-144.
- Meinke, L. J., Sappington, T. W., Onstad, D. W., Guillemaud, T., Miller, N. J., Komáromi, J., Levay, N., Furlan, L., Kiss, J., Toth, F.** (2009): Western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) population dynamics. *Agricultural and Forest Entomology*, 11: 29–46.
- Metcalf, R. L., Metcalf, R. A., Rhodes, A. M.** (1980): Cucurbitacins as kairomones for diabroticite beetles. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77: 3769-3772.
- Moeser, J.** (2003): Nutritional ecology of the invasive maize pest *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte in Europe. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Agrarwissenschaften der Georg-August Universität Göttingen, 9p.
- Moeser, J., Vidal, S.** (2004): Do alternative host plants enhance the invasion of the maize pest *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae, Galerucinae) in Europe? *Environmental Entomology*, 33: 1169-1177.
- Musick, G. J., Fairchild, M. L.** (1971): Field studies on rate of hatch of western corn rootworm eggs in Missouri during 1965-68. *Journal of Economic Entomology*, 64: 9-11.
- Nakao, H.** (2010): Characterization of *Bombyx* Embryo Segmentation Process: Expression Profiles of Engrailed, Even-Skipped, Caudal, and *wnt1/Wingless* Homologues. *Journal of Experimental Zoology*, 314: 224-231.
- Palmer, D. F., French, L. K., Chiang, H. C.** (1977): Effects of chill temperatures on developing western corn rootworm eggs. *Environmental Entomology*, 6: 862-864.
- Patel, K. K., Apple, J. W.** (1967): Ecological studies on the eggs of the northern corn rootworm. *Journal of Economic Entomology*, 60: 496-500.
- Schröder, R., Beermann, A., Wittkopp, N., Lutz, R.** (2008). From development to biodiversity - *Tribolium castaneum*, an insect model organism for short germband development. *Development genes and evolution* 218: 119-126.
- Schroeder, J. B., Gray, M. E., Ratcliffe, S. T., Estes, R. E., Long, S. P.** (2006): Effects of elevated CO₂ on a variant of the western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environmental Entomology*, 35: 637-644.
- Schumann, M., Vidal, S.** (2012): Dispersal and spatial distribution of western corn rootworm larvae in relation to root phenology. *Agricultural and Forest Entomology*, 14: 331-339.

- Short, D. E., Hill, R. E.** (1972): Adult emergence, ovarian development, and oviposition sequence of the western corn rootworm in Nebraska. *Journal of Economic Entomology*, 65: 685-689.
- Short, D. E., Luedtke, R. J.** (1970): Larval migration of the western corn rootworm. *Journal of Economic Entomology*, 63: 325-326.
- Spencer, J. L., Hibbard, B. E., Moeser, J., Onstad, D. W.** (2009): Behaviour and ecology of the western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *Agricultural and Forest Entomology*: 11, 9-27.
- Strnad, S. P., Bergman, M. K., Fulton, W. C.** (1986): First-instar western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) response to carbon dioxide. *Environmental Entomology*, 15: 839-842.
- Strobl, F., Stelzer, E. K. H.** (2014): Non-invasive long-term fluorescence live imaging of *Tribolium castaneum* embryos. *Development* 141: 2331-2338.
- The Interactive Fly:** *Tribolium* early embryonic development [online]. The Interactive Fly ©2015 [cit. 20.11.2015]. Dostupné z: <http://www.sdbonline.org/sites/fly/vdevlhom/triboli.jpg>.
- Toepfer, S., Kuhlmann, U.** (2005): Natural Mortality Factors Acting on western Corn Rootworm Populations: A Comparison between the United States and Central Europe. *Western Corn Rootworm: Ecology and Management* edited by S. Vidal et al.: 95-119.
- Toepfer, S., Zhang, F., Kiss, J., Kuhlmann, U.** (2005): The Invasion of the Western Corn Rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*, in Europe and Potential for Classical Biological Control. In *Second International Symposium on Biological Control of Arthropods*.
- Turpin, F. T., Peters, D. C.** (1971): Survival of southern and western corn rootworm larvae in relation to soil texture. *Journal of Economic Entomology*, 64: 1448–1451.
- VanWoerkom, G. J., Turpin, F. T., Barrett Jr., J. R.** (1980): Influence of constant and changing temperatures on locomotor activity of adult western corn rootworms (*Diabrotica virgifera*) in the laboratory. *Environmental Entomology*, 9: 32-34.
- Weiss, M. J., Mayo, Z. B.** (1985): Influence of corn plant density on corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) population estimates. *Environmental Entomology*, 14: 701-704.
- Weiss, M. J., Mayo, Z. B., Newton, J. P.** (1983): Influence of irrigation practices on the spatial distribution of corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) eggs in the soil. *Environmental Entomology*, 12: 1293-1295.
- Wessler, J., Fall, E. H.** (2010): Potential damage costs of *Diabrotica virgifera virgifera* infestation in Europe – the “no control” Scenario. *Journal of Applied Entomology*, 134: 385-394.

Witkowski, J. F., Owens, J. C., Tollefson, J. J. (1975): Diel activity and vertical flight distribution of adult western corn rootworms in Iowa cornfields. *Journal of Economic Entomology*, 68: 351-352.

Woodson, W. D. (1994): Interspecific and intraspecific larval competition between *Diabrotica virgifera virgifera* and *Diabrotica barberi* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environmental Entomology*, 23: 612-616.

Woodson, W. D., Gustin, R. D. (1993): Low temperature effects on hatch of western corn rootworm eggs (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 66: 104-107.

8. PŘÍLOHY

Tab. 1 Tabulka zobrazuje počet mrtvých samic a samečků zaznamenaný v týdenních intervalech během pokusu v roce 2014. V prvním sloupci je uvedeno číslo kelímku (**Číslo k.**). Každý kelímek obsahoval na počátku experimentu 10 samců a 10 samic bázlivce kukuřičného.

Číslo k.	Datum kontroly 25. 8. 2014		Datum kontroly 1. 9. 2014		Datum kontroly 8. 9. 2014		Datum kontroly 15. 9. 2014	
	samice	samci	samice	samci	samice	samci	samice	samci
1	2	1	2	2	1	2	4	2
2	2	2	0	1	2	1	3	2
3	1	2	1	1	1	0	3	3
4	1	1	0	0	1	2	3	2
5	2	1	1	1	2	2	3	3
6	2	2	1	0	0	1	3	3
7	2	2	0	0	1	1	2	2
8	2	1	1	1	0	0	2	5
9	0	2	2	1	1	1	2	2
10	0	2	1	1	1	0	3	2
11	1	2	1	1	0	1	3	3
12	0	2	1	1	2	2	3	2
13	1	1	0	2	1	1	4	2
14	1	1	1	2	2	1	3	2
15	2	2	0	1	1	1	2	2
16	1	0	2	0	2	2	3	3
17	0	1	2	2	1	1	2	1
18	2	2	1	2	2	2	2	3
19	1	1	2	1	1	2	3	3
20	1	1	2	3	1	1	2	2
21	2	1	1	1	0	2	3	2
22	1	1	2	1	1	1	4	1
23	1	2	2	2	2	2	2	2
24	0	2	2	0	1	1	3	2
25	2	1	1	2	1	1	3	4
26	2	1	1	1	2	1	3	2
27	2	1	1	1	1	2	2	2
28	1	0	2	1	1	2	3	2
29	0	1	1	2	2	1	2	2

Tab. 2 Tabulka zobrazuje počet mrtvých samic a samečků zaznamenaný v týdenních intervalech během pokusu v roce 2014. V prvním sloupci je uvedeno číslo kelímku (**Číslo k.**). Každý kelímek obsahoval na počátku experimentu 10 samic a 10 samic bázlivce kukuřičného.

Číslo k.	Datum kontroly 22. 9. 2014		Datum kontroly 30. 9. 2014		Datum kontroly 6. 10. 2014	
	samice	samci	samice	samci	samice	samci
1	0	1	1	1	0	0
2	2	2	0	1	1	1
3	2	2	1	2	0	0
4	2	2	2	1	1	2
5	1	1	1	2	0	0
6	1	2	2	1	1	1
7	2	1	2	2	1	2
8	1	1	2	1	2	1
9	2	2	3	1	0	0
10	1	1	3	2	1	2
11	1	1	2	2	1	0
12	2	1	1	2	1	0
13	1	1	2	2	0	0
14	1	2	2	2	0	0
15	2	1	1	2	1	1
16	1	1	1	2	0	0
17	2	1	1	2	1	2
18	2	0	2	1	0	0
19	2	1	0	1	1	1
20	3	1	1	2	0	0
21	1	2	2	0	1	1
22	1	0	1	0	0	0
23	1	0	0	0	2	2
24	1	2	2	2	0	0
25	0	1	2	0	1	1
26	0	2	0	1	1	1
27	1	1	1	1	2	1
28	0	1	2	2	1	2
29	2	1	2	1	1	2

Tab. 3 Tabulka zobrazuje počet mrtvých samiček a samečků zaznamenávaný v týdenních intervalech během pokusu v roce 2015. V prvním sloupci je uvedeno číslo kelímku (**Číslo k.**). Každý kelímek obsahoval na počátku experimentu 10 samců a 10 samiček bázlivce kukuřičného.

Číslo k.	Datum kontroly 27. 7. 2015		Datum kontroly 3. 8. 2015		Datum kontroly 10. 8. 2015		Datum kontroly 17. 8. 2015	
	samice	samci	samice	samci	samice	samci	samice	samci
1	1	1	1	0	0	0	2	1
2	1	3	0	0	1	0	0	1
3	1	1	1	1	0	1	1	0
4	0	1	0	1	1	0	2	0
5	0	1	0	0	0	1	2	2
6	1	0	0	1	0	1	2	0
7	0	2	1	0	0	0	1	1
8	0	0	1	2	0	1	0	0
9	1	1	1	1	0	0	1	0
10	0	0	0	2	0	0	1	0
11	0	3	0	3	0	0	1	1
Číslo k.	Datum kontroly 24. 8. 2015		Datum kontroly 31. 8. 2015		Datum kontroly 7. 9. 2015		Datum kontroly 14. 9. 2015	
1	1	0	0	1	1	1	0	1
2	1	1	0	1	1	0	2	0
3	1	2	0	1	0	0	2	2
4	0	0	0	3	2	0	1	1
5	0	1	1	1	1	0	1	1
6	0	0	2	1	1	1	1	0
7	2	2	1	0	1	0	1	0
8	2	1	0	1	1	2	1	0
9	1	0	2	2	1	2	2	1
10	2	2	2	2	1	2	1	1
11	0	1	1	0	1	0	1	1
Číslo k.	Datum kontroly 21. 9. 2015		Datum kontroly 29. 9. 2015		Datum kontroly 5. 10. 2015		Datum kontroly 12. 10. 2015	
1	1	0	0	2	2	2	1	1
2	1	1	1	1	1	1	1	1
3	0	1	2	0	1	1	1	0
4	2	1	1	1	1	2	0	0
5	2	0	0	1	1	1	2	1
6	0	1	0	1	2	2	1	2
7	1	2	2	0	0	1	0	2
8	1	0	1	1	1	1	2	1
9	0	0	0	1	1	0	0	2
10	1	0	0	0	2	0	0	0
11	2	0	1	0	1	0	2	1