

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

KATEDRA EKOLOGIE



Dobře zahřátá kukla: ovlivňuje teplota během preimaginálního vývoje

odolnost dospělců k teplotnímu stresu?

**Well warmed pupa: effects of preimaginal temperature on thermal stress
tolerance of adults**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Bakalant: Radek Svoboda

Vedoucí práce: Ing. Michal Knapp Ph.D.

2015

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Katedra ekologie

Fakulta životního prostředí

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Radek Svoboda

Aplikovaná ekologie

Název práce

Dobře zahřátá kukla: ovlivňuje teplota během preimaginálního vývoje odolnost dospělců k teplotnímu stresu?

Název anglicky

Well warmed pupa: effects of preimaginal temperature on thermal stress tolerance of adults

Cíle práce

Cílem práce bude vypracovat stručnou literární rešerši o faktorech, které ovlivňují termální toleranci u hmyzu. Důraz bude kladen především na vliv aklimatizace a teplotní historie jedince (v jaké teplotě se vyvíjela předchozí vývojová stádia). Součástí práce bude i laboratorní experiment zkoumající vliv teploty během stádia kukly na termální toleranci dospělců invazivního slunéčka *Harmonia axyridis*.

Metodika

Literární rešerše bude zpracována na základě vědeckých článků vyhledaných pomocí databáze Web of Knowledge. Použito bude nejméně 30 relevantních literárních zdrojů. Laboratorní experiment bude realizován v Českých Budějovicích v laboratořích Jihočeské univerzity a Entomologického ústavu AV ČR. Kukly slunéček *Harmonia axyridis* forma *succinea* pocházející od několika rodičovských párů budou vystaveny třem teplotám (těsně nad spodním teplotním prahem vývoje = 17°C; teplotní optimum = 26°C; těsně pod horním teplotním prahem vývoje = 35°C). Po vylíhnutí dospělců bude u poloviny jedinců měřena jejich odolnost vůči mrazu (chill coma recovery) a u druhé poloviny jedinců bude měřena doba jejich přežití v extrémně vysoké teplotě (40°C). Data budou následně zpracována pomocí GLMM, kde identita rodičů bude použita jako náhodný faktor (k zohlednění vlivu různých genotypů).

Doporučený rozsah práce
cca 30 stran + přílohy dle potřeby

Klíčová slova

fyzilogie hmyzu, *Harmonia axyridis*, kukla, odolnost mrazu, teplotní tolerance

Doporučené zdroje informací

- Bowler K, Terblanche JS (2008): Insect thermal tolerance: what is the role of ontogeny, ageing and senescence? *Biological Reviews* 83: 339-355.
- Colinet H, Hoffmann AA (2012): Comparing phenotypic effects and molecular correlates of developmental, gradual and rapid cold acclimation responses in *Drosophila melanogaster*. *Functional Ecology* 26: 84-93.
- Knapp M, Nedvěd O (2013): Gender and Timing during Ontogeny Matter: Effects of a Temporary High Temperature on Survival, Body Size and Colouration in *Harmonia axyridis*. *PLoS ONE* 8(9): e74984.
- Terblanche JS, Chown SL (2006): The relative contributions of developmental plasticity and adult acclimation to physiological variation in the tsetse fly, *Glossina pallidipes* (Diptera, Glossinidae). *Journal of Experimental Biology* 209: 1064-1073.

Předběžný termín obhajoby

2015/06 (červen)

Vedoucí práce

Ing. Michal Knapp, Ph.D.

Elektronicky schváleno dne 17. 2. 2014

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 10. 12. 2014

prof. Ing. Petr Sklenička, CSc.

Děkan

V Praze dne 13. 04. 2015

Prohlášení

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

V Praze 13. 4. 2015

.....

Poděkování:

V první řadě bych chtěl poděkovat mému školiteli Michalovi Knappovi, za vždy přátelský přístup, podporu, přemíru trpělivosti, odborné vedení a pracovní dny plné humoru. Dále bych rád poděkoval mému kolegovi Michalovi Řeřichovi za pomocnou ruku, kterou mi vždy beze slova podal, a za velmi vydařené zážitky spojené s pobytem v Českých Budějovicích. Velký dík patří i panu docentu Nedvědovi za odborný dohled, pomoc při práci v laboratoři a poskytnutí zázemí pro realizaci experimentu. A v neposlední řadě děkuji své rodině za podporu všeho druhu, které si bezmezně vážím.

Abstrakt

Teplota je společně s potravou nejdůležitějším environmentálním faktorem ovlivňujícím preimaginální vývoj hmyzu. Teplota zažitá během preimaginálního vývoje často poznamená jedince na celý život a ovlivní tak vlastnosti, které má jako dospělec.

V této studii jsem zkoumal vliv teploty během stádia kukly a pohlaví jedince na odolnost teplotnímu stresu u invazního slunéčka *Harmonia axyridis*. Brouci byli během fáze kukly vystaveni buď nízké teplotě (17°C), optimální teplotě (26°C) nebo vysoké teplotě nedaleko horního prahu vývoje (35°C). Pro testování odolnosti bylo využito pokusů zaměřených na rychlost probuzení z chill coma a výdrž v extrémně vysoké teplotě 42°C.

Na odolnost extrémním teplotám 24 hodin po vykuklení nemělo žádný vliv pohlaví slunéček. Jejich odolnost teplotním extrémům však průkazně ovlivňovala teplota zažitá během stádia kukly. Slunéčka z nízké teploty se z komatu způsobeného mrazem probrala o 40 vteřin dříve než ta z teploty optimální a dokonce o 70 vteřin dříve než ta z vysoké teploty. Pobyt kukly ve vysoké teplotě měl naopak pozitivní vliv na délku přežívání dospělců při extrémně vysoké teplotě (42°C).

Výsledky experimentu prokázaly, že teplota zažitá během stádia kukly, významně ovlivňuje budoucí teplotní odolnost dospělců.

Klíčová slova: teplotní tolerance, expozice, *Harmonia axyridis*, odolnost vůči mrazu, kukla, fyziologie hmyzu

Abstrakt

(English)

Temperature together with food are the most important environmental factors affecting preimaginal development in insects. Temperature experienced during preimaginal development often affect an individual for rest of its life and shapes adult traits.

In this study, the effect of ambient temperature experienced during the pupal stages and the effect of sex on resistance to thermal stress was investigated in the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. Beetles were exposed either low temperature (17°C), optimal temperature (26°C) or high temperature near the upper developmental threshold (35°C) during the pupal stage.

The resistance of 24 hours old adults to extreme temperatures was not affected by their sex. However, their resistance to extreme temperatures was significantly influenced by the temperature experienced during the pupal stage. Beetles from the low temperature treatment (17°C) were waking up from chill coma about 40 seconds earlier than beetles from the optimal temperature (26°C) and about 70 seconds earlier than beetles from the high temperature treatment (35°C). Development in high temperature (35°C) during pupal stage had the positive effect on longevity of adults in extremely high temperature (42°C).

This study provides evidence that temperature experienced during pupal stage has substantial effect on thermal resistance of adult beetles.

Key words: thermal tolerance, exposure, *Harmonia axyridis*, chill-tolerance, pupa, insect physiology

Obsah

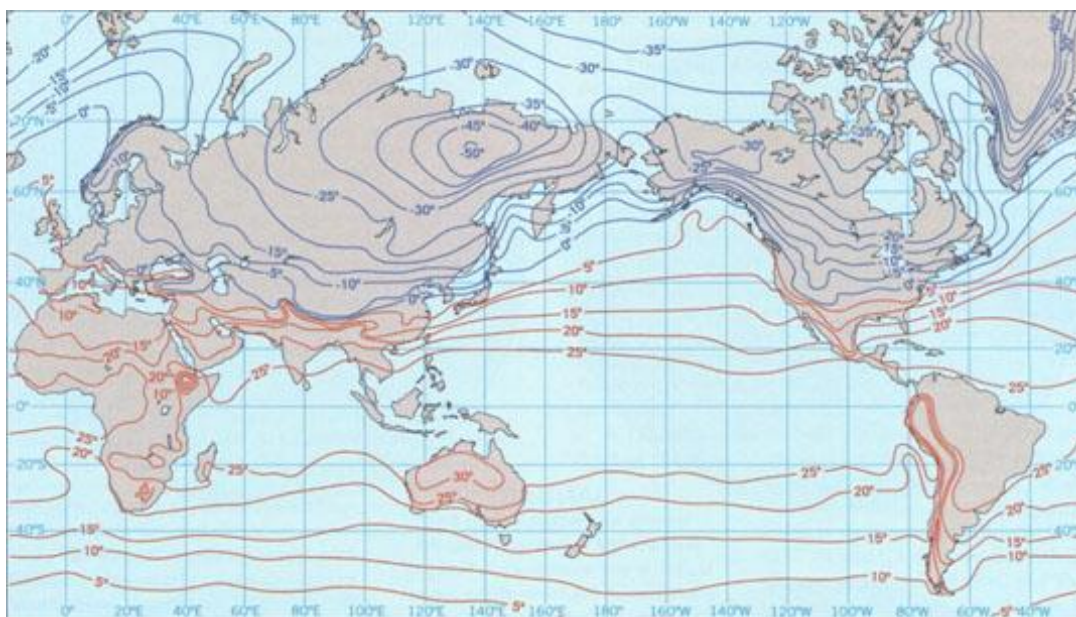
1. Úvod.....	8
1.1. Teplota na Zemi	8
1.2. Abiotický stres.....	11
1.3. Teplotní variabilita prostředí	11
1.4. Teplota a fyziologické děje hmyzu	12
1.4.1. Termoregulace hmyzu	13
1.4.2. Aklimace.....	14
1.4.3. Proteiny teplotního šoku (HSP).....	15
1.5. Hmyz a chladné podmínky	16
1.5.1. Supercooling point (SCP).....	18
1.5.2. Chladné prostředí a biochemické procesy	19
1.5.3. Chill coma recovery.....	20
1.6. Hmyz a vysoké teploty	22
1.7. Slunéčko východní (<i>Harmonia axyridis</i>).....	24
1.7.1. Charakteristika druhu	24
1.7.2. Původ	25
1.7.3. Teplotní valence.....	26
1.7.4. Popis slunéčka východního	27
1.7.5. Určení pohlaví	29
2. Cíle práce a hypotézy	30
3. Metodika	31
3.1. Chov Slunéčka východního	31
3.2. Testování chill coma recovery (CHCR)	32
3.3. Testování high temperature (HT).....	32
3.4. Statistické vyhodnocení	33
4. Výsledky	34
4.1. Vliv teploty během stádia kukly na rychlost probuzení dospělců z chill coma.....	34
4.2. Vliv teploty během stádia kukly na přežívání dospělců ve vysoké teplotě.....	35
5. Diskuse	37
6. Závěr.....	40
7. Literatura.....	41
8. Přílohy	48

1. Úvod

1.1. Teplota na Zemi

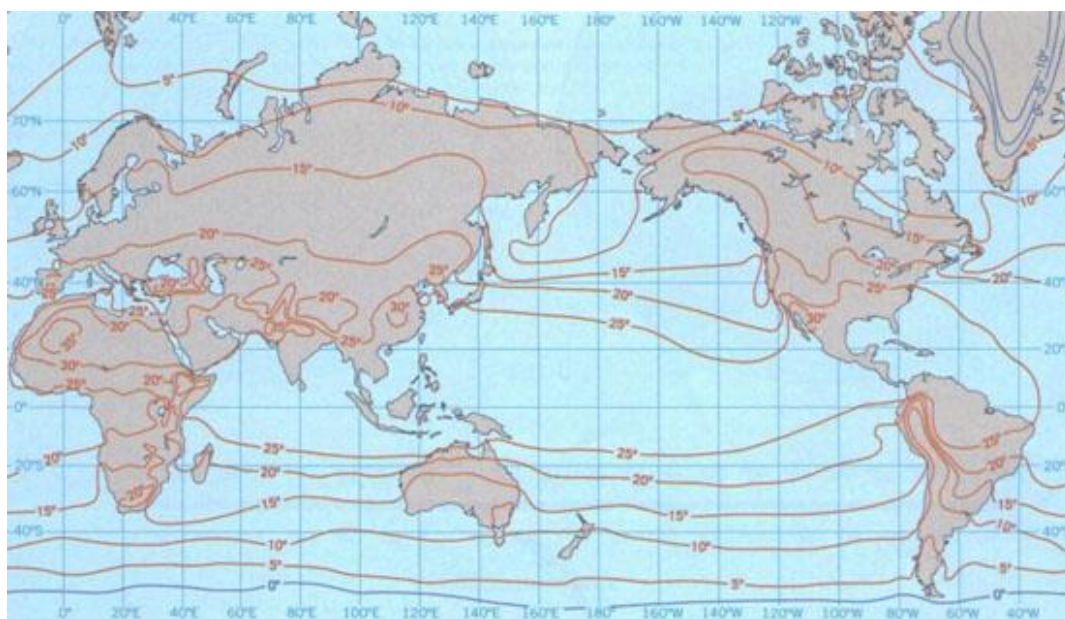
Teplota, jakožto jeden z nejdůležitějších abiotických faktorů v přírodě, ovlivňuje veškeré živé organismy na Zemi. V planetárním měřítku je geografické rozložení teploty vzduchu podle ovlivňováno energetickou bilancí, všeobecnou cirkulací atmosféry a mořskými proudy (viz obr. 1 a 2; Bednář et Kopáček 2005).

Obrázek 1: Rozložení minimálních teplot (leden)



(zdroj: Strahler, 2006)

Obrázek 2: Rozložení maximálních teplot (červenec)



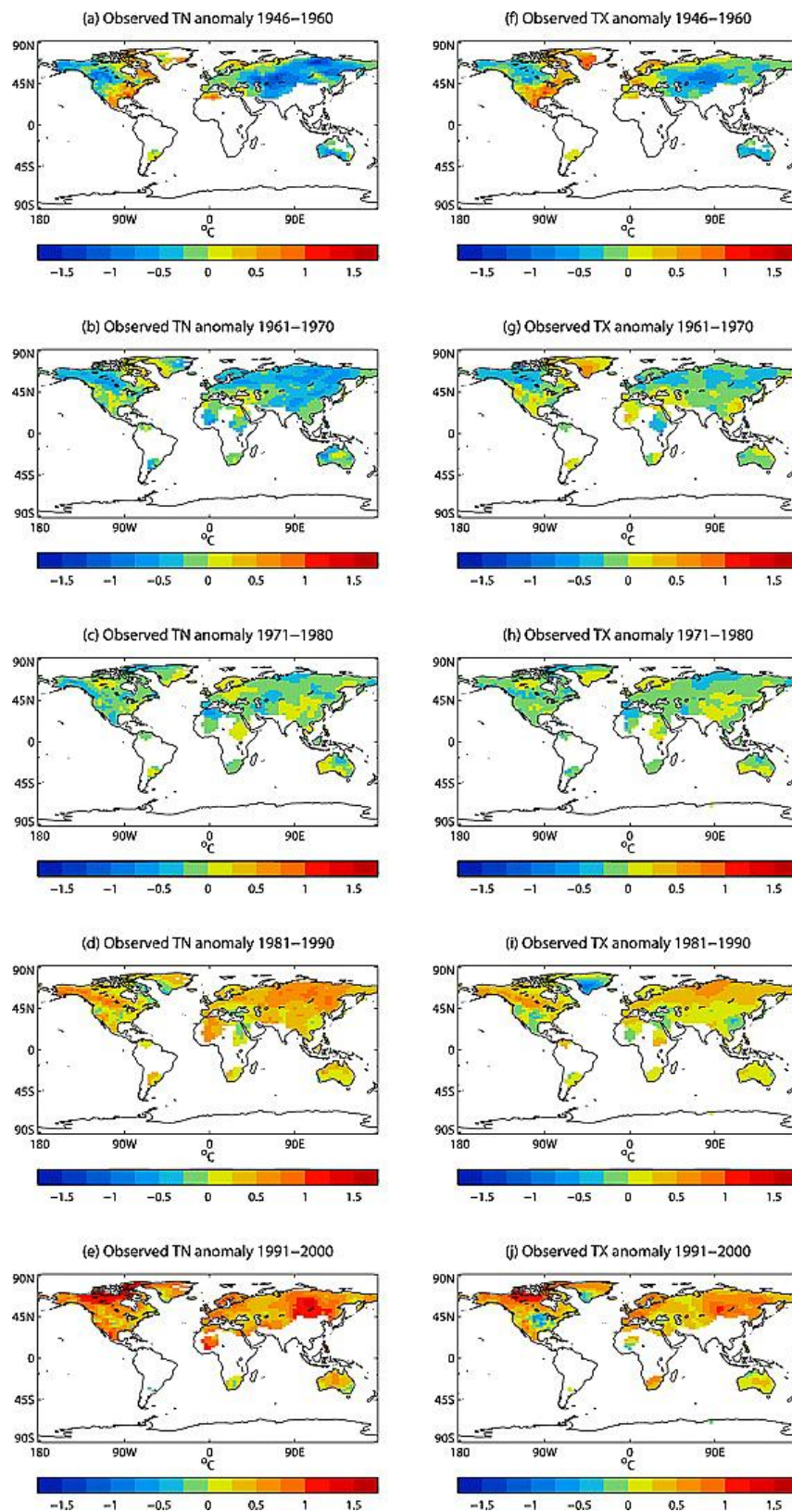
(zdroj: Strahler, 2006)

Většina analýz dlouhodobých změn globálního klimatu je prováděna pomocí pozorování změn v průměrných hodnotách teplotních a srážkových dat. Spojením světových meteorologických organizací vznikla komise pro klimatologii (CCI), která prakticky ihned zavedla světový program výzkumu klimatu (WCRP). V tomto programu týmy expertů z celého světa provádějí detekce podnebných změn, monitorování a následné analýzy teplotních výkyvů (Alexander et al. 2006).

Při společném výzkumu dlouhodobých změn klimatických extrémů několika evropských zemí bylo zjištěno, že změny v T_{max} a T_{min} kopírují dobře zdokumentovaný trend změn průměrné teploty. Studie potvrdila, že důsledkem rychlejšího růstu T_{min} než T_{max} poklesla v průběhu tohoto století denní amplituda teploty v severní a střední Evropě. Také výskyt mrazů zaznamenává klesající trend (Thomas et al. 1999). Obecně platí, že globální denní maximální a minimální hodnoty teploty vzduchu (T_{min} a T_{max}) se zvyšují, přičemž zvyšování T_{min} je třikrát rychlejší (Kejna et al. 2009).

Výsledky interpretované v práci Caesar et al. 2006 (obr. 3) umožňují studovat pozorované struktury světových změn klimatu a dát jim srozumitelnou grafickou podobu. Obrázek 3 znázorňuje po dekadách anomálie v minimální a maximální teplotě v letech 1946 – 2000. V obou případech teplota vzrostla a to především v posledních dvou desetiletích. Změny ovšem nenastaly jen v průměrných hodnotách. Ze studie vyplývá, že i ukazatele jako je tvar rozdělení denních teplot a šířka rozptylu vykazují odlišnosti mezi jednotlivými obdobími.)

Negativní důsledky možných klimatických změn jsou však spojené spíše se změnami výskytu extrémních jevů, než se změnami průměrných teplotních charakteristik. Nárůst extrémních klimatických jevů je předpokládán i do budoucna (Středová 2011).



Obrázek 3: Anomálie v minimální a maximální teplotě v letech 1946 – 2000

1.2. Abiotický stres

Abiotický stres je jedním z primárních omezení limitující rozšíření a úspěšnost hmyzu. Je definován jako negativní vliv jistého neživého faktoru prostředí na život organismu (Gao et al. 2007). Faktory neživé složky prostředí, jejichž aktuální hodnoty spadají mimo běžný rozsah hodnot ekologické valence daného organismu, mají velice nepříznivý vliv na životaschopnost populací, či na individuální kondici jedince (Vinebrooke 2007). Výzkum rovněž ukázal, že abiotické stresory nejvíce škodí, pokud se vyskytují společně v různých kombinacích. Nejčastější stresory jsou zároveň nejjednodušší na identifikaci, avšak existuje celá řada dalších, méně rozpoznatelných (Mittler 2006). Nejzákladnějšími stresory jsou: silný vítr, extrémní teploty, sucho, povodně a jiné, v nepatrně menší míře se vyskytující přírodní projevy, jako jsou tornáda a požáry, které však mohou mít o to katastrofálnější následky na celá společenstva. Mezi méně známé stresory, běžně fungující, avšak méně nápadné, patří: špatné půdní podmínky (škála rozsahu pH), vysoká radiace, zhutnění půdy či dnes velmi významné antropogenní znečištění. Žádný abiotický faktor životního prostředí však není pro hmyz důležitější, než teplota (Gao et al. 2007).

1.3. Teplotní variabilita prostředí

Ektotermní organismy tvoří drtivou většinu suchozemské biodiverzity. Proto je teplota prostředí jedním z nejzásadnějších faktorů ovlivňujících život na Zemi. Hlavní problematikou studia teploty je její nestálost. Ve většině typů prostředí dochází ke kolísání teploty v čase. Na tuto skutečnost se organismy samozřejmě museli adaptovat (Deutsch et al. 2008). Teplotní tolerance, která zásadně působí na vnitřní míru růstu populace, byla v posledních letech díky technologickému pokroku experimentálně kvantifikována pro mnoho druhů z celého světa, přesto hlubší znalosti jsou omezeny na několik modelových druhů (Addo-Bediako et al. 2000). Hodnocení dopadů rychle se měnících teplot na životaschopnost populace a přežívání vyžaduje proto detailnější propojení s fyziologickými citlivostmi organismů (Pörtner et al. 2006). Dopady měnící se teploty mohou být zásadní pro základní fyziologické funkce, jako je pohyb, růst a reprodukce. Schopnost ektotermů vykonávat takovéto funkce je popsána křivkou tepelné výkonnosti, která se postupně zvyšuje od minimální kritické teploty

(CTmin), na optimální teplotu (Topt) a následně rychle klesne až k maximální kritické teplotě (CTmax). Kritické teploty CTmin a CTmax, provozně definované meze výkonu organismu, byly změřeny různým skupinám organismů a obvykle korespondují se zeměpisnou šířkou, odrážející jejich, alespoň částečné, přizpůsobení se lokálním podmínkám podnebí (Frazier et al. 2006).

1.4. Teplota a fyziologické děje hmyzu

Fyziologické procesy v hmyzím organismu ovlivňuje řada vnějších faktorů jako je střídání teplot, dostupnost potravy, fotoperioda, vlhkost prostředí, mutageny, toxiny nebo živé organismy tj. zástupci stejného či jiných druhů (Kordík 2000).

Veškeré scénáře klimatických změn předpovídají nárůst jak globální teploty, tak i teploty sezónní či denní. Nelineární vztah mezi teplotou a biologickými procesy způsobuje, že fluktuující teploty ovlivňují průběh fyziologických procesů, což má vliv na životní strategie hmyzu a rozmanité ekologické důsledky (Vinebrooke et al. 2007).

Bezobratlí jsou - ektotermní, poikilotermní - organismy. To znamená, že nejsou schopné automaticky řídit a kontrolovat svoji teplotu a jsou tedy závislí na teplotě vnějšího prostředí. To přináší řadu nevýhod, ale i některé výhody:

- **nevýhoda**

nejsou schopni zajistit životní funkce při extrémních teplotách a upadají do abiotických stavů.

- **výhoda**

zajištění energetických funkcí je méně energeticky náročné, protože homoiotermové musí převážnou část energie věnovat na uchování stálé teploty těla (Kordík 2000).

Rozmezí teploty, ve které může daný druh hmyzu žít, bývá různé a souvisí se schopností adaptace určitého druhu nebo vývojového stádia na teplotní podněty vnějšího prostředí (Bale et al. 2009). Značnou schopnost adaptace mají eurytermní druhy (obecně euryvalentní druhy). Jejich schopnost se přizpůsobit je dána tím, že žijí v širokém rozmezí teplot, mají tedy širokou vitální zónu. Naopak stenothermní druhy (obecně stenovalentní druhy) mají úzkou vitální zónu, těžko se přizpůsobují (Barrington 1979).

1.4.1. Termoregulace hmyzu

Všechny změny, ke kterým dochází v organismu v důsledku změn teploty vnějšího prostředí, se projevují na - intenzitě metabolismu. Intenzita metabolismu se pak projeví v celé řadě biologických projevů jako je aktivita jedince, intenzita růstu těla, délka vývoje, plodnost atd. (Chapman 1998).

Přestože hmyz patří mezi poikilotermní živočichy, může určitým způsobem, i když jen na omezenou dobu, regulovat svou teplotu. V této regulaci se uplatňují dva mechanismy - behaviorální termoregulace (založená na fyzikálních mechanismech a na využití externího tepla) a fyziologická termoregulace, někdy také označovaná jako tzv. „částečná endotermie“ (Heinrich 1993).

Behaviorální termoregulace zahrnuje získávání tepla ze substrátu nebo přímo ze slunečního záření. V behaviorální regulaci je dobře využitelná skutečnost, že zástupci skupin hmyzu disponující poměrně velkou plochou těla v poměru ke svému objemu, takže vystavením maximální plochy těla ke zdroji tepla, zvýší jeho absorpci (Teets et Denlinger 2014). Ochlazení je naopak zajištěno vyhledáváním stínu, chladnějších míst apod. Existuje komplexní vztah mezi regulací teploty a hmyzím zbarvením případně uspořádáním povrchu těla (Heinrich 1993). Příkladem může být chování pouštních brouků z čeledi *Tenebrionidae*. Tmavěji zbarvení jedinci jsou aktivnější v době nižších teplot (nejvíce zrána), zatímco u světlejších jedinců je největší aktivita zaznamenávána až při zvýšené teplotě (Kordík 2000).

Fyziologická termoregulace je založená na tvorbě a využití metabolického tepla. Druhy s touto schopností dokážou ovlivňovat tělesnou teplotu pomocí mohutné letací svaloviny, která je schopna produkovat metabolické teplo (Heinrich 1993). To se děje především během letu, kdy se jedinec musí vyrovnávat se dvěma protichůdnými tendencemi - uchováním tepla, které je nutné pro činnost svaloviny a jeho ztrátou, která zabraňuje přehřátí (Heinrich 1980). Uchování tepla je zajištěno izolací hrudi pomocí kutikulárních útvarů - šupin, vlásků, chlupů atd. Zabránění přehřátí svaloviny je zajištěno buď tím, že letící jedinec kombinuje aktivní let s plachtěním (*Lepidoptera*, *Orthoptera*) nebo se ochlazuje zrychlením cirkulace hemolymfy

a jejím odvodem do neizolovaných částí těla, kde se teplo uvolňuje do vnějšího prostředí (včely, čmeláci; Kordík 2000).

Další výhodou je skutečnost, že tyto funkce jsou zachovány i při slabém slunečním záření. Bohužel endotermie, jako taková, je velmi nákladný proces z hlediska energie. Proto tuto schopnost její uživatelé využívají jen v nezbytných případech, jako jsou právě extrémnější teploty (Willmer et Stone 1997).

1.4.2. Aklimace

Aklimace je mechanismus, kterým se ektotermní organismy přizpůsobují teplotním změnám prostředí. V praxi aklimace funguje jako morfoloická, behaviorální, fyzická či biochemická odpověď organismu na environmentální změny. Aklimace souvisí s ontogenezí jedince, čili ji není možné srovnávat z adaptací (Huey & Berrigan 1996).

Aklimační reakce je spuštěna smyslovou detekcí změny prostředí. Následně je metabolismus jedince podněcován k aktivaci chemických látek (enzymů, polymeráz, apod.) zajišťujících patřičnou odpověď na vzniklou situaci (Chapman 1998). Nejčastěji jsou zkoumány aklimace na teplotní podmínky prostředí, avšak organismy mohou tuto schopnost využít i k ochraně před jinými environmentálními faktory (např. vysokým výskytem těžkých kovů; Huey & Berrigan 1996).

Ačkoli je známo, že hmyz dokáže reagovat na změny teploty poměrně rychle, informace o typech a rozsahu mechanismů, které tuto schopnost podporují, nejsou kompletní. Právě aklimace je podle řady vědců jednou z odpovědí na různé teplotní tolerance hmyzu (Chapman 1998).

Podle Angilleta et al. (2006) existují dva typy aklimace:

- **nevratná** (= vývojová)
 - projevuje se nevratností fyziologické odpovědi, vyvolané v průběhu ontogeneze jedince (v určitých stádiích).
- **vratná**
 - odpověď organismu obvykle na sezónní či denní výkyvy prostředí, jejíž projev po skončení expozice environmentálního vlivu opět odezní.

Mechanismy vratné aklimace, poprvé popsané na masařce z rodu *Sarcophaga*, jsou pravděpodobně užitečné k fyziologické odpovědi na teploty během jednoho dne, kdy může dojít k nepředvídatelnému výkyvu (Johnson et Bennett 2008).

Na základě výsledků dřívějších studií byla uznávána hypotéza, že aklimace vždy zlepšuje fitness jedince. Avšak některé výsledky pozdějších studií tuto hypotézu buď nepotvrdily, nebo dokonce prohlásili za neplatnou. Následně byla tedy formulována „hypotéza prospěšné aklimace“, která říká, že jedinci, kteří měli možnost aklimatizovat se na specifika prostředí, budou mít lepší fitness, než jedinci, kteří možnost aklimatizace neměli (Johnson et Bennett 2008).

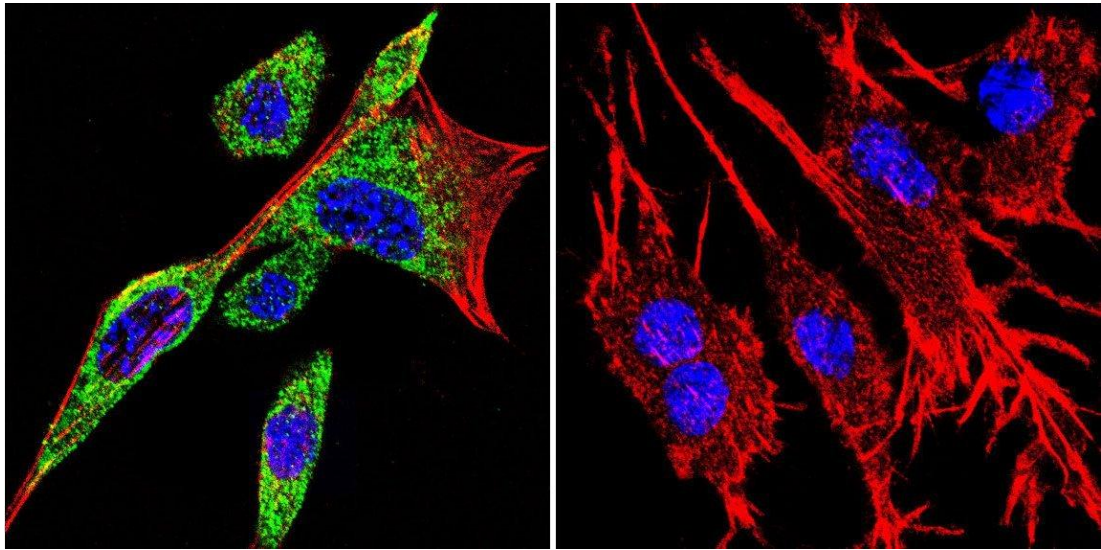
Nápadný mechanismus aklimace lze pozorovat v reakci hmyzu na nízké teploty. Pokud modelový druh (např. *Drosophila melanogaster*) bez jakékoli přípravy vystavíme extrémnímu mrazu (-5 až -10°C), můžeme očekávat většinovou úmrtnost. Jestliže však jedinci projdou, před vystavením smrtící teplotě, režimem (1-2 hodiny) teploty mírnější (0 až 2°C), dokonce 80 - 100% jedinců, jinak letální teploty, přežije (Chapman 1998).

Podobně má i v horkých podmínkách krátká expozice sub-letální teploty za následek menší úmrtnost, což bylo prokázáno u vosy rodu *Trichogramma* a několika druhů much (Chapman 1998).

Biochemické projevy aklimace jsou doprovázeny aktivací proteinů teplotního šoku (viz níže; Kordík 2004)

1.4.3. Proteiny teplotního šoku (HSP)

Proteiny tepelného šoku neboli Heat Shock Proteins (HSP, obr. 4) jsou látky vyznačující se reakcí na vysokou či nízkou teplotu a jiné vlivy okolního prostředí (např. silné UV záření, extrémnímu pH či vysoká koncentrace těžkých kovů). Jejich reakce se projevuje stabilizací nových proteinů nebo v pomoci při obnově jiných proteinů buněk, které byly poškozeny stresem (Hochachka & Somero 2002). Například za vysokých teplot zabraňují denaturaci a agregaci běžných bílkovin. Proteiny teplotního šoku jsou pojmenovány podle jejich molekulové hmotnosti (např. HSP60, HSP80 či HSP90; Wu 1995). Jsou využívány širokým spektrem organismů. Pro HSP je typické, že geny, kódující tyto proteiny, nejsou exprimovány za normálních podmínek, ale jsou rychle „zapnuty“ v reakci na stres a znovu „vypnuty“ při jeho odeznění (Rinehart et al. 2006).



(zdroj: URL 1)

Obrázek 4: Struktura HSP90 zachycená elektronovým mikroskopem

Produkce HSP je obecně celulární reakce, protože se HSP vyskytují ve všech tkáních i v laboratorně izolovaných buňkách. Funkční význam tepelného šoku dnes není plně pochopen, ale je zde silný náznak skutečnosti, že vede k termotoleranci a termoprotekci. Mechanismus syntézy HSP je zakódován v tzv. heat shock genech (Gehring et Wehner 1994).

1.5. Hmyz a chladné podmínky

Ačkoli nízké teploty mohou vážně ovlivňovat život většiny organismů a hrát klíčovou roli ve stanovení distribučních limitů a přežití organismu, hmyz se stal jednou z nejúspěšnějších skupin kolonizátorů zemského povrchu a to včetně polárních oblastí (Addo-Bediako et al. 2000). V mírném pásu jsou zástupci hmyzu denně či sezónně vystaveni teplotám, které jsou výrazně nižší, než teploty pro optimální růst. Sezónní změny teploty jsou důležitou složkou v modelech populační dynamiky, protože často je hmyz není schopen kompenzovat behaviorální termoregulací (Chapman 1998). V důsledku toho byla zaměřena celá řada ekofyziologických studií na schopnost hmyzu přežít při nízkých teplotách díky

mechanismům, které společně chrání organismus před poškozením pomocí fyziologických a biochemických adaptací (Renault et al. 2002).

Chce-li být druh úspěšný ve vysoce sezónních typech prostředí mírného pásu, musí být schopen omezit růst a rozmnožování na několik měsíců v létě a přežít zbytek roku bez krmení v konfrontaci všech nástrah nepříznivých teplot. Jako indikátory prostředí signalizující příchod zimy hmyzu slouží především zkrácení délky dne v pozdním létě a posunutí rozptylu denních teplot k chladnějším hodnotám (Addo-Bediako et al. 2000). U většiny druhů hmyzu v přírodě krátká délka dne evokuje fázi specifického vývojového pozastavení, známého jako diapauza. Uvedení do diapauzy = fyziologického stavu (hormonálně řízeného), představuje alternativní vývojovou cestu genové exprese s jedinečnými vzory, které vedou k ukládání živin, zastavení či zpomalení vývoje, snížené frekvenci dýchání a akvizici zvýšené tolerance vůči vlivu okolního prostředí (Rinehart et al. 2007).

Mnoho druhů hmyzu využívá k dosažení vyšší tolerance vůči chladu diapauzu v kombinaci s behaviorální strategií hledání vhodných mikrohabitátů, kde chladná expozice nedosahuje takových extrémů (Rinehart et al. 2009).

Rozsah teplot, který zůstává v přípustném rozmezí, může i celkově zlepšit výkon hmyzu. Naopak ty teploty, které přípustné rozmezí překračují, mají obvykle negativní vliv z kumulativního poškození v průběhu po sobě jdoucích expozic (Vinebrooke et al. 2007). Vědci na začátku 20. století zjistili, že hmyz za kolísajících teplot roste lépe, než při teplotách konstantních, což podporují výsledky modernějších studií. Fluktuující teploty navíc, z experimentálního hlediska, lépe odráží reálné životní podmínky zažívané hmyzem v přírodě. Avšak teploty rozšiřující schopnost hmyzu odolávat tvrdším podmínkám vývoj z pravidla zpomalují. Toto zpomalení je pravděpodobně důsledkem přímých zranění, způsobených vysokou teplotou nebo neúměrným chladem a náklady na následné fyziologické a biochemické opravy (Deutsch et al. 2008). Jiné studie, obvykle zaměřené na modelový druh octomilky *Drosophila melanogaster*, zase uvádějí, že hmyz může zlepšit svou chladovou toleranci právě v kombinaci s mírným stresem ze suché expozice, avšak zranění, vzniklá narušováním tkání vodními krystaly, musí být regenerována do expozice následující (Colinet et al. 2015).

Odolnost hmyzu vůči chladu je studována za použití nejrozmanitějších technik výzkumu, a tak jsou dnes některé klíčové aspekty přežívání, jako je například zimní přežívání, relativně dobře popsány (Renault et al. 2002).

1.5.1. Supercooling point (SCP)

Přezimování hmyzu je doprovázeno celou řadou zajímavých fyziologických změn (včetně syntézy polyolů a dalších kryoprotektantů) vedoucích ke snížení jejich supercooling pointu, který reprezentuje teplotu, při které voda v těle jedince začne mrznout. Naopak jiné druhy jsou schopny přežít i s těmito krystaly vody. Za klíčovou složku tolerance k zmrznutí je považováno vytváření ledových tělísek v extracelulárních částech těla jedince (Rinehart et al. 2009).

Do mechanismů zimního přežívání je často nahlédnuto laboratorními experimenty, jako například měřením tělesné teploty zmrznutí (supercooling point/SCP) nebo stanovením doby přežití (survival time/ST) (Sømme 1996). Na základě těchto experimentů byl hmyz nejprve rozdělen do dvou hlavních kategorií:

- Druhy tolerující zmrznutí (freezing-tolerance) schopné přežít extracelulární tvorbu ledu z důvodu rychlého zmrznutí mezibuněčných prostor.
- Druhy netolerantní vůči zmrznutí (freezing-avoidance) vyhýbající se zmrznutí pomocí snižování SCP, což odpovídá schopnosti zabránit zmrznutí tělních tekutin. Pro tuto skupinu platí, že teplota, při které supercooling tělních tekutin dosáhne nejzazších hodnot, koresponduje s absolutní letální teplotou (Salt 1961).

Dlouhý čas poté, co byl objeven a popsán SCP u hmyzu, se předpokládalo, že čas strávený v podchlazeném stavu nemá žádné škodlivé účinky, pokud není hodnota maximálního podchlazení překročena. Teprve Sturgess a Goulding (1968) prvně vyjádřili myšlenku, že nižší teploty, především pod 0°C, mohou způsobit tělesná poškození, která vedou k fyziologickým a fyzickým poruchám, tzv. mrazovým zraněním (chill injury; Renault et al. 2002).

Od doby, kdy bylo nashromážděno větší množství výsledků ekologických výzkumů zkoumajících mrazovou odolnost hmyzu, byly zjištěné limitní hodnoty podrobeny nespočtu diskusí o užitečnosti SCP jako ukazatele obecné míry schopnosti přežití hmyzu v teplotách blízkých nule. To vedlo k různým reklasifikacím obou hlavních strategií vypořádání se s chladovými podmínkami. V současnosti se většina autorů domnívá, že SCP není dostatečně vypovídající hodnotou k posouzení schopnosti organismu přežít nízké teploty (Rinehart et al.

2009). Ačkoli známe dnes četné studie zabývající se odolností hmyzu vůči chladu, literatury o vztahu mezi teplotou a časem zotavování je pomálu. Kromě toho, třebaže mnoho autorů uznává, že organismus může být zabit při hodnotách překračujících SCP, přesné fyziologické příčiny smrti za těchto podmínek zůstávají málo známé (Sømme 1996).

1.5.2. Chladné prostředí a biochemické procesy

Chemické reakce jsou v živém organismu také závislé na aktivitě řady enzymů. Rychlost reakce mnoha enzymů stoupá v určitém rozsahu teplot lineárně (v logaritmickém měřítku); rychlost metabolismu se odvíjí od rychlosti reakce nejpomalejšího enzymu (Lee et al. 2006). Teplotní limity souvisí i s inaktivací enzymu nebo jeho substrátu kritickou teplotou. Vliv teploty se může projevovat prostřednictvím změněného množství nenasycených mastných kyselin a snížené proteolytické aktivity (Harwood et Takata 1965).

Mezi přispěvatele prevence zmrznutí můžeme zahrnout i polyoly jako je glycerol a krevní cukr hmyzu- trehalózu. Tyto funkční prvky se vyznačují charakteristickými vlastnostmi, mezi které mimo jiné patří stlačení SCP, či stabilizace proteinů a buněčných membrán (Rinehart et al. 2007).

Změny cytoskeletu, včetně změn zvyšujících pružnost buněčné membrány pro podporu zachování funkce při extrémních teplotách, jsou rovněž široce využívány ve strategiích přezimování (Lee et al. 2006).

Udržování vodní bilance a tolerance ke kolísání teploty jsou základními mechanismy nezbytnými pro toleranci zmrznutí. V sušších prostředích má snížení zbytečných ztrát vody hlavní prioritu při regulaci vodní bilance. Nejčastější trasy ztrát vody jsou kutikulární a respirační (MacMillan et Sinclair 2011). V chladných prostředích však jedinci čelí teplotnímu stresu i nízké dostupnosti vody, což vyžaduje toleranci k oběma faktorům. Jak zima, tak sucho způsobují snížení objemu hemolymfy a zvýšení osmolarity, takže je odůvodněné očekávání vzájemného překrývání těchto stresorů (Teets et Denlinger 2014). Obsah iontů a vodní bilance je u hmyzu regulována rovnováhou mezi vylučováním malpighickými trubicemi a absorpcí koncových částí střeva. Malpighické tubuly fungují jako transportní cesty vylučování iontů. S ohledem na jejich funkci v osmoregulaci je možné, že kanálkový epitel hraje dosud nedefinované role v chladové odolnosti (MacMillan et Sinclair

2011). V kontrolních mechanismech neuroendokrinní signalizace může funkce tubulů působit jako integrovaný fyziologický proces pro toleranci abiotických stresorů, jelikož hmyzí osmoregulace je předmětem vysoce sofistikovaného endokrinního systému a několika skupin neuropeptidů regulujících diurézu (Terhzaz et al. 2014).

Osmotické a mechanické poškození buněk a membrán při zmrznutí hemolymfy je vlastně způsobeno nedostatkem vody (jež je vázána v krystalu). Ale i v případě, kdy nedojde k zmrznutí vody v led, je organismus ohrožen vysycháním. Po dlouhou dobu (týdny až měsíce) je přezimující hmyz vystaven působení suchého vzduchu (MacMillan et Sinclair 2011). Při teplotě pod 0 °C je absolutní vlhkost vzduchu velmi nízká, přitom parciální tlak vodní páry nad podchlazeným roztokem (např. hemolymfa) je poměrně vysoký, takže molekuly vody unikají z roztoku a jsou vázány v ledu. Pro přežití zimního období jsou tedy potřebné i mechanismy odolnosti k vysychání, protože právě suché mrazivé expozice jsou jedním z nejnáročnějších elementů životního prostředí hmyzu (Nedvěd 1996).

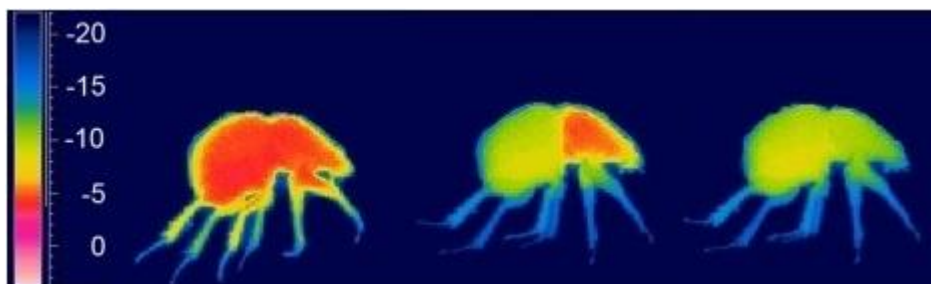
1.5.3. Chill coma recovery

Chill coma (CHC) je definováno jako různě dlouhý stav jedince hmyzu, který v důsledku ztráty neuromuskulární koordinace vyvolané působením nízkých, ne však smrtících (často mezi 0 a 4°C), teplot upadne do stavu podobného komatu. Po návratu do příznivějších teplot se hmyz zotaví za určitou dobu, která je zaznamenána (Rasnberry et al. 2011). Chill coma recovery (CHCR), tedy čas potřebný k zotavení po „ochrnutí“, je jedním z nejčastějších měřítek studené tolerance a bývá používáno k vývoji a testování teorií v oblasti biogeografie, evoluce a biologických následků změn klimatu. Stav chladové strnulosti je dokonce možné využít jako anestetickou alternativu k CO₂ či etheru. Schopnost přežít vystavení náhlého mrazu je nedílnou součástí mnoha strategií přežívání hmyzu (Mukherjee et al. 2014).

Rozdíly v CHCR odráží výkyvy v expozici nízké teploty ve volné přírodě. Například, CHCR je rychlejší u jedinců odebraných z populací nebo druhů ve vyšších nadmořských výškách nebo zeměpisných šířkách, což naznačuje, že jedinci z takovýchto prostředí mohou mít menší obtíže se z CHCR probít (lehčí koma). Pro zájmový organismus mohou být takovéto podmínky modelovány pomocí

klimaboxů (obr. 5) a uměle tak simulovat vhodné prostředí pro experiment (Gibert et al. 2001).

Nástup chill-komatu je způsoben neschopností udržet hemolymfu ve stavu osmotické homeostázi, což vede k elektrofyziologickému selhání nervosvalového systému. Na podzim dojde k chladem indukovanému přerozdělení Na^+ a vody z hemolymfy do niternějších útrob těla jedince (Mukherjee et al. 2014).



(zdroj: upraveno dle Verdu et al. 2010)

Obrázek 5: Snímky termokamery umístěné v klimaboxu (postupné ochlazování)

Dále se při CHC zvyšuje koncentrace K^+ a dochází k depolarizaci svalu. Jakmile se sval depolarizuje nad prahovou hodnotu membránového potenciálu, kontrakce a/nebo relaxace již nejsou možné a hmyz je paralyzován. Ačkoli je probuzení z CHC obvykle interpretováno jako návrat elektrofyziologických podmínek jedince, oživení pohybu neznamena úplné osmotické uzdravení (MacMillan et Sinclair 2011).

V minulosti, s rozvojem genetiky, byly již provedeny pokusy, které se snažily vysvětlit rozdíly v CHCR na úrovni exprese konkrétních genů. Bohužel v žádném genetickém materiálu nebyly nalezeny sekvence (lokusy), které by jev obecně definovaly (Gibert et al. 2001). I když se obecně předpokládá, že obnova pohybu vyžaduje obrácení procesů, které k chill-komatu vedly, změna času probouzení vždy nekoresponduje s počáteční teplotou ztuhnutí. A tak, i přes více než deset let používání metody jako metriky studené tolerance, přesné fyziologické mechanismy, které určují trvání CHCR, zůstávají neznámé (Rasnberry et al. 2011).

1.6. Hmyz a vysoké teploty

Globální oteplování v tomto století, může být největším antropogenním narušením přírodních systémů, jaké historie doposud pamatuje. Bude zřejmě mít vliv na distribuci (= rozmístění) druhů na Zemi, ale přesné dopady nebyly dosud odhadnuty, protože chybí dostatečný počet relevantních výsledků studií na toto téma (Alexander et al. 2006).

Tolerance hmyzu k vysokým teplotám je často hlavním faktorem určujícím jeho distribuci (= rozšíření) a abundanci (= početnost) v rámci různě velkých areálů. Tato odolnost nevykazuje takovou varianci jako její protipól (tolerance k chladným podmínkám), avšak i na toto téma existuje řada odlišných výsledků studií (Bowler et Terblanche 2008).

Z obecnějších výsledků pozorování chování hmyzu vyplývá, že přiblíží-li se teploty k hornímu konci teplotního rozsahu, jaký je jedinec schopný ještě snést, dochází u něj k prudkému navýšení pohybové aktivity. Pokud se teplota i nadále zvyšuje, následuje naopak ztráta schopnosti pohybu (fáze známá jako tepelné omámení). Při setrvávajících vysokých teplotách dochází již k nevratným zraněním, po kterých obvykle jedinec hyne (Chapman 1998).

Smrt může nastat v důsledku různých činitelů. Velmi horké teploty, pohybující se kolem horní hranice teplotní odolnosti jsou schopné destabilizovat fosfolipidové membrány a nepříznivě tak ovlivnit intracelulární proteiny (Mourier et Poulsen 2000). Proteiny tkání mohou začít denaturovat a bilance metabolických procesů tím být narušena. V takovýchto případech dochází k hromadění toxických produktů, ztrátám funkčnosti buněčných membrán, změny pH a degradaci DNA, což způsobuje obvykle nevratná poškození (Gehring et Wehner 1994).

Letální teplota je samozřejmě závislá i na době expozice a interakci s jinými faktory, zejména vlhkostí. Při dlouhodobějším vystavení vysoké teplotě prostředí, kde je navíc malá vlhkost vzduchu, dochází obvykle k poškozením či smrti z důvodu vysychání (Bowler et Terblanche 2008). Například švábi (*Blatta*) dokážou přežít při teplotě 37-39°C po dobu 24 hodin, avšak v prostředí musí být dostatečná vlhkost. V případě podobné expozice v suchém prostředí, většina švábů zahyne. Účinek okolní vlhkosti bude pravděpodobně výraznější pro malé druhy hmyzu, které jsou více náchylné vůči stresu z vysychání (Chapman 1998).

Za toleranci stresu, jenž byl vyvolán vysokou teplotou, je též odpovědná rychlost fyziologické odpovědi metabolismu jedince. Mezi takovéto rychlé fyziologické reakce, jejichž výsledkem je protekce organismu před tepelnými zraněními, můžeme zahrnout tzv. „otuzování“ (heat-hardening). „Otužování“ může být popsáno jako schopnost zpracování tepla tak, aby nedocházelo k poraněním. Jedná se o proces trvající od několika minut až po několik hodin. Nicméně hmyz se obvykle při krátkodobém vystavení vysoké teplotě snaží ochladit pomocí evaporace (Hadley et al. 1991).

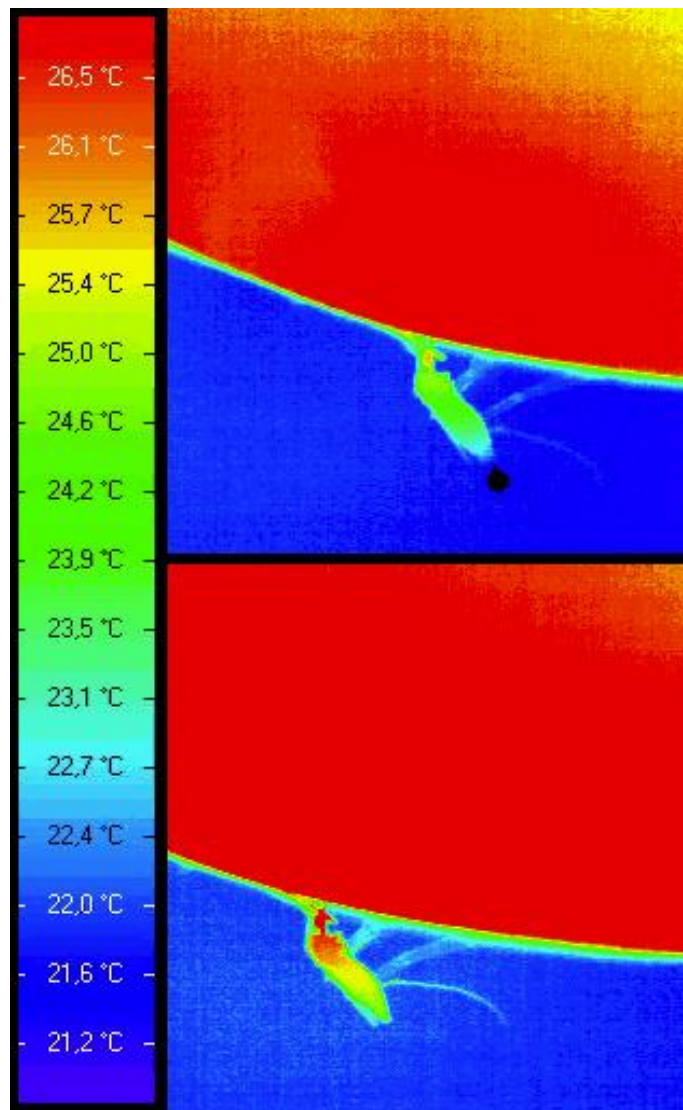
Co se týká těch nejzazších vysokých teplot, můžeme dnes konstatovat, že pro většinu druhů hmyzu je letální i relativně krátké vystavení teplotě 40 – 50°C. Vysokou teplotu dobře snáší rod *Thermobia* (*Thysanura*), pro kterou je letální až teplota 51°C. Snad nejodolnějšími druhy hmyzu vůči vysoké teplotě jsou larvy některých zástupců pakomárů (*Chironomidae*), které žijí v horkých pramenech ve 49 – 51°C (Kordík 2000).

Vystavení hmyzu vysokým teplotám je již popsáno v řadě studií (Abdelghany et al. 2010., Knapp et Nedvěd 2013). Avšak jejich výsledky jsou zřídka kdy podobné, natož pak shodné. Rozdílily se neprojevují jen v reakci různých druhů, ale dokonce zaznamenáváme odlišné reakce jednotlivých životních stádií.

Genetické studie naznačují, že za odolností vůči vysokým teplotám může stát soubor několika genů, avšak pravděpodobně se na celém mechanismu teplotní tolerance podílí biochemické adaptace, které zatím nejsou dobře prozkoumány (Bowler et Terblanche 2008).

Velice zajímavou adaptací hmyzu na prudké navýšení teploty, která též stojí za zmínku je tzv. heterotermie při krmení. Ta se u několika skupin bodavě savého hmyzu nezávisle vyvinula, jako následek potravní specializace (krev endotermních organismů). Obrázek 6 znázorňuje strmý nárůst teploty těla krmícího se komára rodu *Anopheles* (Lahondère et Lazzari 2013).

Obrázek 6: Komár rodu *Anopheles* zachycený termokamerou při krmení



(zdroj: Lahondère et Lazzari 2013)

Zvýšené teploty se často používají jako jeden z postupů odstranění škůdců skladovaných produktů (Mourier et Poulsen 2000).

1.7. Slunéčko východní (*Harmonia axyridis*)

1.7.1. Charakteristika druhu

Slunéčko východní (*Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) (Coleoptera: Coccinellidae) je dravý brouk pocházející z východní Asie. Tento druh byl záměrně převezen na několik dalších kontinentů včetně Evropy. Slunéčko východní se osvědčilo v biologickém boji proti hmyzím škůdcům, ale rychlé šíření a populační exploze jeho

invazních populací z něj zároveň udělaly obtížný hmyz, neboť často zimuje v domácnostech, vypouští páchnoucí obranné látky, barví zařízení bytu obrannou tekutinou, občas dokonce kouše lidi a okusuje ovoce a hrozny. Kromě toho jeho žravost vede k potlačování neškodných či užitečných původních druhů hmyzu včetně v ČR původních slunéček. Druh navíc disponuje celou řadou různých barevných forem (obr. 7), takže může snadno dojít k záměně s původním druhem (Nedvěd et al. 2014).

Obrázek 7: Přehled nejčastějších forem slunéčka východního (*H. axyridis*)



(zdroj: Nedvěd et al. 2014)

1.7.2. Původ

Původní areál rozšíření slunéčka východního je mírné až subtropické pásmo východní Asie, to znamená především Japonsko, Čína, Korea, Dálný východ Ruska, Mongolsko, jižní Sibiř až po východní Kazachstán (Brown et al. 2008). Geneticky jde o dva dosti odlišné geografické klastry, kdy v západoasijské části areálu rozšíření převládají melanické formy bez kýlu na krovkách, ve východní části převládá forma *succinea* a u všech forem jsou jedinci s kýlem na zádi krovek. Na východ USA byly

zřejmě dovezeny populace z obou klastrů, které po zkřížení vytvořily invazní populaci. Přesná místa původu introdukovaných populací nebyla dohledána (Rieseberg 2011).

Podle klimatických podmínek v celém původním areálu byl spočítán model možného rozšíření tohoto invazního druhu po světě (Poutsma et al. 2008). Později byl model upřesněn podle skutečných klimatických limitů Evropské invazní populace (Bidinger et al. 2012). Biologické vlastnosti původních populací ve východní Asii ukazují na hojný, ale populačně stabilní druh s hustotně závislou regulací skrze kanibalismus. Heterogenní prostředí napomáhá koexistenci slunéčka východního s jinými druhy (Osawa 2011).

1.7.3. Teplotní valence

Oproti nejběžnějšímu původnímu evropskému slunéčku sedmitečnému jsou optimální teplotní limity pro vývoj a další životní projevy u slunéčka východního posunuty k nižším hodnotám (Nedvěd et al. 2012). Tento druh slunéčka je známý i díky jeho termálnímu melanismu: jedinci chovaní v nižších teplotách (okolo 20°C) mají velmi zřetelné černé skvrny na krovkách, zatímco jedinci odchovávaní při teplotách vyšších (okolo 28°C) černé skvrny téměř postrádají (Michie et al. 2010).

Anabolické reakce u *H. axyridis* jsou maximalizovány při nízkých teplotách okolo 5°C, zatímco rychlost katabolických je maximální při 25-30°C.

Spodní vývojový práh larev se pohybuje okolo 11°C (měřeno na různých populacích, s různou skladbou potravy). Preimaginální vývoj jedince *H. axyridis* není vždy stejně dlouhý, jak také popisuje např. Lamana et Miller (1998). Teplota jako abiotický faktor se na časové náročnosti vývoje podílí z velké části. Je prokázáno, že jedinci, kteří se vyrůstají v nižších teplotách (pod 20°C), potřebují k dokončení vývinu o několik dní více než například jedinci z teplot nad 25°C (Castro et al. 2011).

Teploty optimální pro vývoj a reprodukci byly zaznamenány v populacích ve Velké Británii a v Brazílii a pohybovali se v rozmezí 14-28°C. Horní meze úspěšného vývoje jsou odhadovány mezi 30-35°C podle Acar et al. (2004).

V Řecku se slunéčko východní opakovaně vysazovalo do citrusových sadů, ale nikdy dlouho nepřežilo, pravděpodobně právě kvůli vysokým letním teplotám (Nedvěd et al. 2012).

1.7.4. Popis slunéčka východního

1.7.4.1. Vajíčka

Vajíčka (obr. 8) jsou žlutooranžová, eliptická, kladená v těsných snůškách po 20–70, přilepená vzpřímeně jedním koncem k podkladu. Spolehlivé určení vajíček slunéček do druhu podle morfologických znaků není možné. Podle velikosti vajíček pouze rozpoznáme, zda jde o snůšku podobně velkého druhu (Nedvěd et al. 2014).

Obrázek 8: Líhnutí vajíček *H. axyridis*



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

1.7.4.2. Larvy

Larvy prvního a druhého instaru slunéčka východního jsou šedočerné, bez barevné kresby, podobně jako u mnoha dalších druhů slunéček. Dobrým poznávacím znakem už v této fázi vývoje jsou dvou až tříhroté trnovité výběžky na hrudi a zadečku. Jde o výběžky zvané scoli, jednotlivé hroty se jmenují chalazy a ty nesou na konci krátkou sétu (Nedvěd et al. 2014).

Larvy druhého instaru mají pár žlutavých teček na prvním zadečkovém článku.

Larvy třetího instaru (obr. 9) mají oranžově zbarvené řady výběžků na 1.–5. zadečkovém článku. Larvy čtvrtého, posledního, instaru mají oranžově zbarvenou

i kutikulu v okolí těchto výběžků a také žlutooranžové prostřední výběžky na 1., 4. a 5. článku. Oranžové výběžky jsou u slunéčka východního dvouhroté (Nedvěd et al. 2014).

Obrázek 9: Larvy třetího instaru při požívání slabého jedince (kanibalismus)



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

1.7.4.3. Kukly

Kukla všech slunéček je typu mumiová kukla (pupa obtecta), tj. s částečně k tělu přitmelenými končetinami a křídelními pochvami, přitmelená koncem zadečku k podkladu. U druhů podčeledi Coccinellinae je volná, se zbytky svlečené larvální kutikuly u konce zadečku. Je pohyblivá mezi několika zadečkovými články, při ohrožení se prudce vztyčuje a pokládá (Nedvěd et al. 2014).

Kuklu slunéčka východního (obr. 10) poznáme od jiných druhů nejlépe podle výrůstků na zbytcích larvální svlečky. Jedná se o senti s vysokou bází a se dvěma nebo třemi vysokými chalazami s krátkou sítou na vrcholu (viz Určování larev). Velikostí i zbarvením je podobná kukle slunéčka sedmítečného: je 5–7 mm

dlouhá, základní zbarvení jasně oranžové, s černými skvrnami proměnlivého rozsahu podle teploty před zakuklením (Nedvěd et al. 2014).

Kukla slunéčka východního má výrazné slévající se skvrny na středo- a zadohrudí a na 2. až 3. zadečkovém článku než na ostatních částech těla (Nedvěd et al. 2014).

Obrázek 10: „Líhnutí“ kukly ze stádia prepupy



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

1.7.4.4. *Imaga*

Jedinci invazní populace sdílejí s východoasijskými jedinci důležitý rozpoznávací znak – příčnou lištu na zadní části krovek. Podobnou lištu mají další dva druhy slunéček vyskytujících se v České republice: hojné slunéčko desetitečné (*Adalia decempunctata*) a vzácné slunéčko *Vibidia dodecimguttata*. Oba tyto druhy jsou daleko menší, do 4,5 mm, zatímco slunéčko východní je nejméně 5 mm velké. Štítek u slunéčka východního je 12–15x užší než tělo, u slunéčka desetitečného 15-18x. Výběžek předoprsí u slunéčka východního je se dvěma žebírky rozbíhajícími se vpředu, u slunéčka desetitečného bez žebírek. Ačkoli barevně je slunéčko východní nesmírně proměnlivé, žádná jeho barevná forma není úplně shodná s jiným u nás žijícím druhem (Nedvěd et al. 2014).

1.7.5. Určení pohlaví

Pohlaví slunéček (obr. 11) lze stanovit podle tvaru posledního viditelného sternitu (břišního článku) nebo podle zbarvení na hlavě a hrudi. Samičky slunéčka východního mají poslední sternit trojúhelníkovitý, s předním okrajem rovným,

s povrchem lehce vyklenutým, samečkové s předním okrajem obloukovitým, s povrchem lehce vydutým. Horní pysk a klypeus (přední okraj hlavy) je u samečků bílý, u samiček s různě velkou černou skvrnou, podle celkové pigmentace těla. Spodní část prvního hrudního článku před a mezi kyčlemi předních nohou je u samiček černá, u samečků bílá (Nedvěd et al. 2014).

Obrázek 11: Pohlaví *H. axyridis*: samec (vlevo), samice (vpravo)



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

2. Cíle práce a hypozézy

Cílem této studie bylo prozkoumání vlivu teplotního režimu ve stádiu kukly na následnou teplotní odolnost mladých dospělců sluněčka východního (*Harmonia axyridis*).

Předpokládané výsledky našich experimentů byly následující: Dospělci, jejichž kukly byly uloženy do teplotního režimu simulujícího chladné přírodní podmínky (17°C), budou v testování na probuzení z chill coma úspěšnější, než jedinci z teplot tropických. Naopak jedinci z teplotního režimu 35°C by zase mohli vykazovat lepší odolnost vůči vystavení teplotám přes 40°C. Tyto hypotézy jsou postaveny na předpokladu, že teploty zažité v období stádia kukly mohou připravovat jedince na expozice, které bude zažívat jako dospělec a tudíž by tedy měly působit jako vnější tlak na budoucí fyziologickou odolnost subjektu vůči oběma teplotním extrémům (horko, chlad).

3. Metodika

Výzkum probíhal v laboratorních podmínkách na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Laboratoř katedry zoologie disponuje několika klimaboxy, mikroskopy, binokulární lupou schopnou zaznamenávat videa či pořizovat snímky v sekvencích, chladicí místností a dalším příslušenstvím nezbytným k úspěšnému dokončení pokusu.

3.1. Chov Slunéčka východního

Testované jedince (*Harmonia axyridis*) jsme, z důvodu úspory místa v klimaboxech (počtu jedinců) odchovávali v Petriho miskách (PM). Do misky jsme vždy připravili pitítko s vodou (malý srolovaný kousek buničiny) a dostatek pruhů filtračního papíru složených do harmoniky. Přeložený papír simuloval spodní stranu listu (úkryt), která je pro samičku velmi atraktivním místem pro naklazení snůšky.

Samička byla vždy uzavřena se samcem do PM (rodičovský pár). Při realizaci experimentu bylo použito 7 rodičovských párů. Během oploďování byli jedinci krmeni kombinací mšic a vajíček zavíječů a denně kontrolováni pro případnou snůšku. Nakladené snůšky byly ihned odebrány (kvůli častému kanibalismu) a vloženy do připravené (přeložený papír, vata) PM. I dobře oplozené snůšky obsahují jen 70–90 % vyvíjejících se vajíček, zbylá poslouží jako tzv. trofická vajíčka pro ranou výživu ostatních mladých larev. Malé a řídké roztroušené snůšky bývají celé neoplozené. Oplozená vajíčka asi 6 hodin před líhnutím (v cca 25 °C) zešednou. V našem experimentu byly vajíčkům, larvám, prepupám a dospělcům klimaboxy nastaveny na konstantní teplotu 26°C.

Po vylíhnutí byly larvy odchovávány ve společné PM tak, aby bylo každému jednotlivci zajištěno přežití, dostatečný prostor a každodenní přísun potravy (rozdělování larev při velkém počtu jedinců na PM). Larvy prvního instaru byly obvykle ponechány společně, z důvodu malé velikosti a špatné manipulace (riziko rozmáčknutí pinzetou). Jen ve výjimečných případech velké snůšky byly larvy opatrně rozděleny cca po 15 kusech. Larvy druhého a třetího instaru (nejdravější, nejaktivnější) byly obvykle rozdělovány po 10, 5 a po 3 jedincích na PM. Larvy čtvrtého či větší larvy třetího instaru byly v PM po jedné, až do prepupálního stádia.

Po přechodu do stádia prepupy byla PM vyčištěna od zbytku potravy, aby nehrozil nechtěný výskyt plísní. V PM byla ponechána pouze vata s vodou z důvodu zachování přirozené vlhkosti prostředí. Prepupa byla poté opět vrácena do klimaboxu (26°C). Každý den byly kontrolovány všechny prepupy.

Již hotové kukly byly rozříděny podle původu (identity rodičovského páru) a uvnitř páru rovnoměrně rozřazeny do třech teplotních režimů, které byly nastaveny podle limitních teplot schopnosti úspěšné metamorfózy druhu. Spodní (chladovou) hodnotou bylo 17°C, prostřední (optimální) a zároveň kontrolní hodnotou bylo 26°C a vrchní strop teplot tvořilo tropických 35°C.

Přibližně 24 hodin po vylíhnutí (vykuklení) byli jednodenní jedinci podrobeni testování.

3.2. Testování chill coma recovery (CHCR)

Každý brouk byl před vlastním testováním zvážen a následně na dvě hodiny uzavřen do klimaboxu nastaveného na teplotu -4°C. Po uplynutí dvouhodinové lhůty byli dospělci vyjmuti, se současně zapnutými stopkami, a obráceni ventrální stranou vzhůru. Následně byl sledován a zaznamenáván čas první prokazatelné pohybové reakce. Do jedinců bylo z boční strany vždy po jednotných intervalech lehce postrčeno pinzetou. Čas prvního otočení se ukázal jako nevhodný, zdlouhavý a velmi individuální, navíc zde hrálo velkou roli „simulování ztuhlosti“ ze strany již pohybu schopných jedinců. Naopak když se do jedince lehce strčilo, byl dobře patrný rozdíl mezi přetrvávající strnulostí a prvním záškubem tykadla či nohy.

Naměřené časy byly zapsány do záznamového archu.

3.3. Testování high temperature (HT)

Pokusy s vysokou teplotou probíhaly za pomoci klimaboxu nastaveném na 42°C. Jedinci byli jednoduše vloženi do klimaboxu a byly zaznamenávány časy jejich úmrtí. Na začátku byly nepatrné potíže v časových intervalech kontroly, nakonec však bylo rozhodnuto, že 15 minutové intervaly budou dostatečně vypovídající. Neblahou rekordmankou v přežití byla větší samička, která odolávala horkým teplotám něco málo přes 8 hodin.

Po uhynutí byli otestovaní jedinci vráceni do klimaboxu a 48 hodin uvnitř ponechání kvůli následnému měření suché hmotnosti.

Posledním měřením bylo zjištění délky krovek pomocí binokulární lupy a počítačového programu analyzujícímu obraz.

Hodnota času smrti, suchá hmotnost a délka krovky byla opět zapsána do záznamového archu.

3.4. Statistické vyhodnocení

Vyhodnocení bylo provedeno za pomoci statistického programu R- 3.0.2. určeného pro uživatelské rozhraní Windows. Software R poskytuje širokou škálu statistických technik, včetně lineárního a nelineárního modelování, klasické statistické testy, analýzy časových řad, klasifikaci, shlukování, a další.

Před zpracováním jsme data napřed museli sjednotit pod stejně jednotky. Zápis dat do záznamových archů byl prováděn ve tvaru mm:ss či hh:mm (např. 3:15), proto bylo nutné všechny časy přepočítat na sekundy v případě chill coma recovery a na minuty v případě pobytu ve vysoké teplotě.

Vlastní zpracování probíhalo podle standardních postupů. Nejprve byla upravená data nahrána do programu R. Následně byla provedena explorační datová analýza (EDA), která měla odhalit případné chyby v datech (odlehle hodnoty způsobené např. špatným přepisem dat z formátu mm:ss či hh:mm). Poté byly sestaveny zobecněné lineární modely s využitím Poissonova rozdělení chyb. Jako náhodný efekt sloužila identita rodičovského páru, aby byly odfiltrovány případné vlivy různé genetické predispozice měřených jedinců. Jako vysvětlující proměnné s pevným efektem byly do modelů vždy použity: 1) teplotní režim během stádia kukly (17, 26 či 35°C), 2) pohlaví jedince. U analýzy chill coma recovery byl navíc zkoumán i vliv tělesné hmotnosti jedince, protože byl předpoklad pomalejšího promrzání větších jedinců (kteří by se následně dříve probouzeli z komatu). U analýzy přežívání ve vysoké teplotě byl navíc zkoumán i vliv suché hmotnosti jedince a jeho strukturní velikosti (délka krovky). Modely vždy obsahovaly i všechny existující interakce mezi hlavními efekty. Průkaznost jednotlivých hlavních efektů byla testována pomocí F-testů. Pro analýzu chill coma recovery a přežívání při vysoké teplotě byly provedeny dva samostatné modely.

4. Výsledky

Celkem bylo odchováno (do dospělosti) necelých 1700 jedinců. Z tohoto celkového počtu bylo na výzkum CHCR a HT použito cca 340 brouků. Zbylí jedinci byli použiti na další výzkumy souběžné a budoucí. Kompletní seznam, rozdělený podle pohlaví, původu a teplotních režimů, lze nalézt v příloze č. 1 této bakalářské práce.

4.1. Vliv teploty během stádia kukly na rychlost probuzení dospělců z chill coma

Experiment prokázal, že na rychlost probuzení z chill coma nemá pohlaví ($P = 0,781$) ani váha ($P = 0,772$) sluníček, měřená před testováním, prokazatelně signifikantní vliv. Jejich odolnost teplotním extrémům však průkazně ovlivňovala teplota ($P < 0,001$) prožité během stádia kukly.

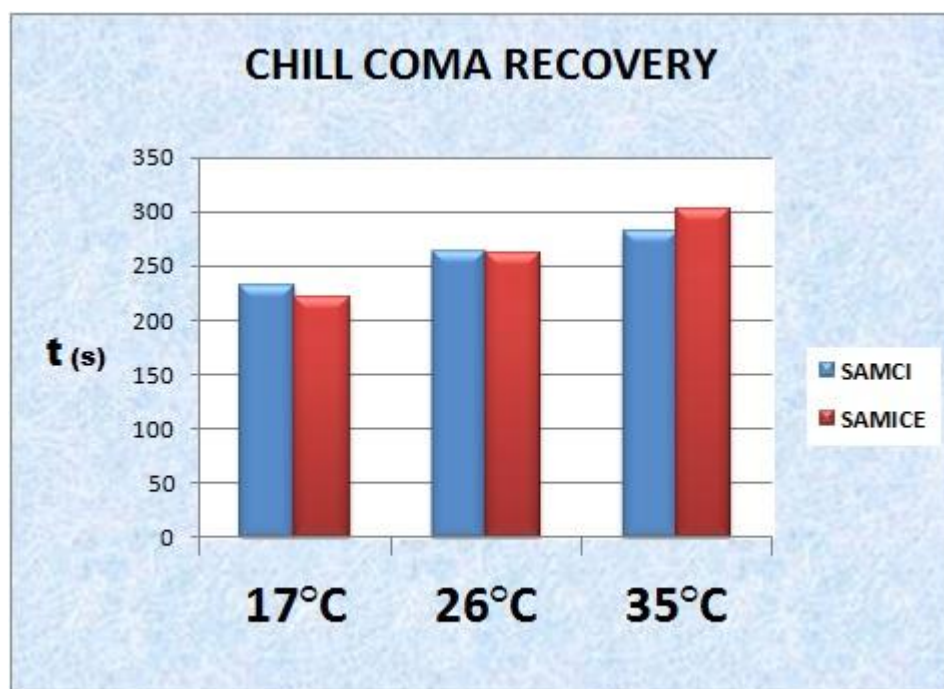
Ostatní interakce, které byly součástí analýzy, nebyly dostatečně významné ($P > 0,05$). P-hodnoty interakcí, hodnoty F-testů a počty stupňů volnosti viz tabulka č. 1 níže.

Tabulka č. 1: Vliv jednotlivých faktorů ovlivňujících rychlost probuzení z chill coma

Název proměnné	Počet stupňů volnosti	F-hodnota	P-hodnota
teplota	2	19,03	< 0,001
pohlaví	1	0,08	0,781
tělesná hmotnost	1	0,08	0,772
teplota : pohlaví	2	1,11	0,333
teplota : tělesná hmotnost	2	1,03	0,359
pohlaví : tělesná hmotnost	1	0,21	0,647
pohlaví : tělesná hmotnost : teplota	2	1,45	0,237

Jak je patrné z grafu č. 1, samci z teplotního režimu 17°C se ze strnulosti proprali v průměru o půl minuty dříve, než samci z teploty optimální (26°C). Samcům z režimu 35°C to obvykle trvalo ještě o patnáct sekund déle.

Graf č. 1: Porovnání vlivu teplotních režimů na rychlost probuzení z chill coma v sekundách



U samic byl rozdíl ještě markantnější. Samice původem z chladných podmínek stádia kukly (17°C) se v průměru probouzely téměř o tři čtvrtě minuty dříve než samičky z režimu 26°C a dokonce o 81 sekund dříve než samice z tropických 35°C.

4.2. Vliv teploty během stádia kukly na přežívání dospělců ve vysoké teplotě

V druhé části experimentu jsme testovali, jestli má teplota zažitá ve stádiu kukly vliv na délku přežívání v extrémně vysoké teplotě. Z výpočtů statistického programu vyplývá, že na délku přežívání má, kromě prokazatelně signifikantní teploty ($P = 0,003$), jistý vliv také tělesná hmotnost jedince, jelikož hodnoty následné suché hmotnosti vykazovaly též signifikantní vliv ($P = 0,010$). Těžší jedinci tedy přežívali déle.

Ostatní hodnoty interakcí, které byly součástí analýzy, nebyly dostatečně významné ($P > 0,05$), stejně jako v případě testů na CHCR. P-hodnoty interakcí, hodnoty F-testů a počty stupňů volnosti viz tabulka č. 2 níže.

Tabulka č. 2: Vliv jednotlivých faktorů ovlivňujících délku přežívání ve vysoké teplotě

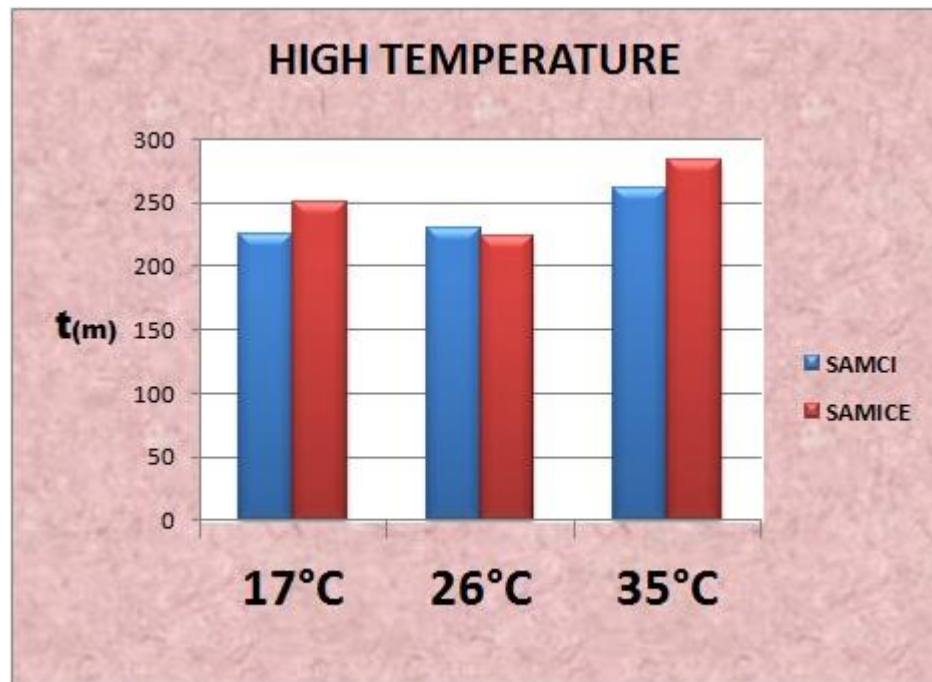
Název proměnné	Počet stupňů volnosti	F-hodnota	P-hodnota
(Intercept)	1	49315,72	< 0,001
teplota	2	6,26	0,0026
pohlaví	1	1,33	0,2512
suchá hmotnost	1	6,82	0,0101
délka krovky	1	0,51	0,4773
teplota : pohlaví	2	0,57	0,5657
teplota : suchá hmotnost	2	1	0,3721
teplota : délka krovky	2	0,12	0,8893
pohlaví : suchá hmotnost	1	0,55	0,459
pohlaví : délka krovky	1	0,02	0,9019
suchá hmotnost : délka krovky	1	0,23	0,6299
teplota : pohlaví : suchá hmotnost	2	0,75	0,4752
teplota : pohlaví : délka krovky	2	1,59	0,2086
teplota : suchá hmotnost : délka krovky	2	1,79	0,1714
pohlaví : suchá hmotnost : délka krovky	1	0,07	0,7849
teplota : pohlaví : suchá hmotnost : délka krovky	2	0,22	0,804

V tomto případě testování zvýhodňovala slunéčka vysoká teplota (35°C) prožitá během pupálního vývoje (graf č. 2). Nejméně odolní se pak ukázali jedinci z teplotního optima (26°C).

Životnost samců z režimů 17°C a 26°C byla téměř totožná (rozdíl cca 5 minut). Naopak samci z režimu 35°C průměrně vydrželi o 36 minut déle, než samci z chladného režimu.

U samic byly rozdíly znatelnější stejně jako v případě chill coma recovery. Nejméně odolné se ukázaly být samice ze středního režimu teplot (26°C), které v průměru snášely vysokou teplotu 223 minut. Samičky z chladného režimu (17°C) obvykle přežily o cca půl hodiny déle a samice z horkých teplot při pupálním vývoji pak dokonce o hodinu.

Graf č. 2: Porovnání vlivu teplotních režimů na délku přežívání ve vysoké teplotě v minutách



Experiment přežívání ve 42°C překvapil ze strany slabší odolnosti jedinců z optimálních teplot stádia kukly a poukázal na nekompletnost informací o teplotní schopnostech přežití slunéček. Tyto závěry podpořil i osmi hodinový rekord samičky čtvrtého páru, která se vyvíjela v tropickém režimu (35°C).

5. Diskuse

Teploty okolního prostředí zažité v průběhu preimaginálního vývoje jsou významnou zkušeností, která ovlivňuje fenotypový projev dospělého hmyzu, jak uvádí řada studií (např. Michie et al. 2010 či Kingsolver et Huey 2008). Nicméně detailních informací o variaci vlivů tohoto abiotického faktoru je stále málo.

V souladu s tvrzením, že teplota zažité během stádia kukly má vážnější vliv na tělesnou hmotnost dospělců, než teplotní zkušenosti z larválních stádií, které bylo uvedeno v práci Briscoe et al. (2012), jsme pro tuto studii využívali výhradně teplotního ovlivňování stádia kukly.

Výsledky této studie potvrdily, že teploty zažité v době stádia kukly mají na následnou teplotní odolnost jedince prokazatelný vliv. Pokusní jedinci byli v této

studii uzavření v teplotních režimech (17, 26 a 35°C) po celou dobu pupálního vývoje, což ovšem příliš nekorresponduje s přírodními podmínkami, kde teplota kolísá. I zde se naskýtá prostor pro experiment, který by testoval odolnost brouků z fluktuujících teplot. Při práci se slunéčky z teplotního režimu 17°C byly také pozorovány projevy termálního melanismu (jedinci vykazovali mnohem větší míru melanizace), popsáno např. v práci Michie et al. (2010).

Teoreticky by na jedince měla mít, z hlediska aklimace, největší vliv teplota, kterou zažili v nepohyblivém stádiu (vajíčko, kukla), protože nemají možnost se před expozicí vysoké teploty skrýt. Larvy a dospělci mohou své mobility využít k nalezení vhodného úkrytu. Avšak toto pravidlo u brouků často neplatí. Například letální časy vajíček a kukel červotoče spízního (*Stegobium paniceum*) byly značně kratší, než časy larev a dospělců jak uvádí Abdelghany et al. (2010).

Naproti tomu ve studii Knapp et Nedvěd (2013) bylo zjištěno, že u *H. axyridis* klesá mortalita při pozdějším načasování horké expozice, tedy při vystavení vysoké teplotě pozdějších stádií. Na vysokou teplotu byla, dle výsledků studie, nejvíce citlivá vajíčka. Naopak kukly projevovaly nejlepší odolnost. Expozice 33°C pravděpodobně u raných stádií zapříčinila příliš velký fyziologický stres.

Velmi překvapivým výsledkem této studie je neprůkazný vliv pohlaví ani u jednoho z testů. Například u testů na CHCR bylo předpokládáno, že samičky, díky obvykle větší hmotnosti (pohlavnímu dimorfismu) popsané např. Tederem (2005), „nestihnou“ během dvouhodinového pobytu v -4°C tolik promrznout, tudíž se budou probouzet z chill coma rychleji. Studie David et al. (1998), zaměřená na časy probuzení z chill coma v prostředích s různou teplotou vzduchu, uvádí, že procitnutí bylo u samců octomilek (*Drosophila melanogaster*) obvykle pomalejší než u samic, což bylo v našem experimentu naznačeno pouze u jedinců z teplotního režimu 17°C. Optimální režim (26°C) skončil pro samce i samice prakticky stejně a u brouků z teplot 35°C dokonce samci v rychlosti probuzení nepatrně vítězili. Je tedy pravděpodobné, že buď konfrontace výsledků napříč jednotlivými druhy hmyzu není možná, nebo (jak uvádí Gibert et al. 2001) nemáme povědomí o jiném morfologickém či fyziologickém znaku, jenž způsobuje tak velkou individuální variabilitu v odolnosti k extrémním teplotám. Pohlavně specifické rozdíly v důsledku odchovu v různých teplotách byly již dříve popsány u několika druhů (např. Hu et Lei 2011 či Ketola et al. 2012).

Co se týká vlivu odchovu hmyzu v různých teplotních režimech na následné přežívání ve vysoké teplotě, Chapman (2013) doplňuje, že dospělci octomilky (*Drosophila melanogaster*) odchovávané při teplotě 15°C vydrželi vystavení teplotě 33,5°C v průměru 140 minut, kdežto v případě much z režimu 25°C byla průměrná výdrž asi 180 minut.

Studie Lamana et Miller (1998) zase ukázala, že jen 25% larev prvního instaru druhu *Harmonia axyridis* dosáhlo dospělosti při teplotě 34°C a značné úmrtnosti (nad 50%) dosáhl teplotní režim 33°C. Úmrtnost při pobytu kukel v teplotních režimech byla v této studii zanedbatelná, byla zřejmě způsobena predispozicí (sníženou životaschopností) konkrétního jedincem, než přímým vlivem teplotního režimu.

Testy přežívání ve vysoké teplotě byly realizovány i ve studii Abdelghany et al. (2010), která zkoumala horní teplotní práh tolerance larev červotoče spízního (*Stegobium paniceum*). Ta uvádí, že se zvyšujícím se teplotním extrémem (42, 45, 50, 55 a 60°C) klesala schopnost přežití, což bylo předpovězeno. Časy úmrtí korespondovaly se zvyšující se teplotou následovně: 13 h, 10 h, 1.4 h, 0.06 h, 0.05 h a 0.01 hodiny.

Slunéčko východní při testování v této studii ukázalo, že z hlediska odolnosti vůči teplotním extrémům je velmi konkurenceschopným druhem jak uvádí i Nedvěd et al. (2014) a tudíž je pravděpodobné, že si bude tvrdě hájit přivlastněné místo v biodiverzitě ČR.

6. Závěr

V této studii realizované na jaře roku 2014, jsou vyhodnoceny nashromážděné výsledky experimentů zaměřených na teplotní odolnost slunéčka východního *Harmonia axyridis*. Výzkum probíhal v laboratorních podmínkách na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Stěžejní složkou celé studie bylo dochování cca 340 pupálních stádií slunéček, která se vyvíjela ve třech teplotních režimech (17, 26 a 35°C). Následně byli dospělí jedinci ovlivnění teplotním režimem cca 24 hodin po vykuklení testováni na odolnost vůči teplotnímu stresu. Testy byly rozděleny na dvě hlavní části: odolnost vůči chladným podmínkám (= rychlost probuzení z chill coma) a odolnost vůči vysokým teplotám (= doba přežívání při 42°C). Nashromážděná data byla poté analyzována pomocí zobecněných lineárních modelů s náhodnými efekty.

Analýzou dat byl prokázán signifikantní vliv teploty během kukly testu na chill coma recovery ($P < 0,001$). Vliv ostatních faktorů (pohlaví $P = 0,781$ a váha $P = 0,772$) se ukázal jako neprůkazný. Signifikantní vliv teploty byl prokázán i na přežívání ve vysoké teplotě ($P = 0,003$), kde hrála roli i hmotnost jedince ($P = 0,010$). Vlivy ostatních faktorů jako např. pohlaví ($P = 0,251$) nebyl prokázán ani u jednoho typu testování, stejně tak vliv vzájemných interakcí jednotlivých faktorů.

Stanovené cíle práce byly splněny. Studie prokázala vliv teplotních režimů na odolnost testovaného druhu *Harmonia axyridis*. Z hlediska dalších výzkumů na tentýž druh by nebylo od věci stejným způsobem prozkoumat teplotní odolnost o něco starších jedinců. Též by jistě bylo zajímavé vytvoření experimentu, ve kterém by byly kukly vystaveny denním režimům kumulující teploty, které by se lišily dobou expozice. Kupříkladu vychovat kontrolní skupinu jedinců v 26°C a dalším dvěma skupinám nastavit různě dlouhý režim střídajících se stupňů (17 a 35°C). A tím se zase o něco málo přiblížit ke kompletnímu náhledu na teplotní tolerance hmyzu.

7. Literatura

1. ABDELGHANY A. Y., AWADALLA S. S., ABDEL-BAKY N. F., EL-SYRAFI H. A. & FIELDS P. G., 2010: Effect of high and low temperatures on the Drugstore Beetle (Coleoptera: Anobiidae).– *Journal of Economic Entomology* 103: 1909 - 1914.
2. ACAR E. B., MILL D. D., SMITH B. N., HANSEN L. D. & BOOTH G. M., 2004: Calorespirometric determination of the effects of temperature on metabolism of *Harmonia axyridis* (Col: Coccinellidae) from second instars to adults.– *Environmental Entomology* 33: 832 - 838.
3. ADDO-BEDIAKO A., CHOWN S. L. & GASTON K. J., 2000: Thermal tolerance, climatic variability and latitude.– *Proceedings of the Royal Society of London* 267: 739 - 745.
4. ALEXANDER L. V. [ed.], 2006: Global observed changes in daily climate extremes of temperature and precipitation.– *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 111: D006290.
5. BALE J. S., ALLEN C. M. & HUGHES G. E., 2009: Thermal ecology of invertebrate biological kontrol agents: establishment and aktivity.– *Third international symposium on biological control of arthropods (ISBCA) Christ Church*, p. 8 - 13.
6. BARRINGTON E. J. W., 1979: *Invertebrate Structure and Function*.–Houghton Mifflin Company, Boston.
7. BEDNÁŘ J. & KOPÁČEK J., 2005: *Jak vzniká počasí*.– Karolinum, Praha.
8. BIDINGER K., LÖTTERS S., RÖDDER D. & VEITH M., 2012: Species distribution models for the alien invasive asian harlequin ladybird (*Harmonia axyridis*).– *Journal of Applied Entomology* 136: 109 -123.
9. BOWLER K. & TERBLANCHE J. S., 2008: Insect thermal tolerance: what is the role of ontogeny, ageing and senescence.– *Biological Reviews* 83: 339 - 355.
10. BRISCOE N. J., PORTER W. P., SUNNUCKS P. & KEARNEY M. R., 2012: Stage-dependent physiological responses in a butterfly cause non-additive effects on phenology.– *Oikos* 121: 1464 - 1472.

11. BROWN P. M. J. [ed.], 2008: *Harmonia axyridis* in Europe: spread and distribution of a non-native coccinellid.– *Biocontrol* 53: 5 - 21.
12. CASTRO C. F., ALMEIDA L. M. & PENTEADO S. R. C., 2011: The impact of temperature on biological aspects and life table of *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae).– *Florida Entomologist* 94: 923 - 932.
13. CAESAR J., ALEXANDER L. & VOSE R., 2006: Large-scale changes in observed daily maximum and minimum temperatures: Creation and analysis of a new gridded data set.– *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 111: D05101.
14. COLINET H., SINCLAIR B. J., VERNON P. & RENAULT D., 2015: Insect in fluctuating thermal environments.– *Annual Review of Entomology* 60: 123 - 140.
15. DAVID R. J., GIBERT P., PLA E., PETAVY G., KARAN D. & MORETEAU B., 1998: Cold Stress Tolerance in *Drosophila*: analysis of chill coma recovery in *D. melanogaster*.– *Journal of Thermal Biology* 23: 291 - 299.
16. DEUTSCH C. A., TEWKSBURY J. J., HUEY R. B., SHELDON L. C., GHALAMBOR C. K., HAAK D. C. & MARTIN P. R., 2008: Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude.– *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 6668 - 6672.
17. FRAZIER M. R., HUEY R. B. & BERRIGAN D., 2006: Thermodynamics constrains the evolution of insect population growth rates: “Warmer is better”.– *The American Naturalist* 168: 512 - 520.
18. GAO J. P., CHAO D. Y. & LIN H. X., 2007: Understanding abiotic stress tolerance mechanisms: recent studies on stress response in rice.– *Journal of Integrative Plant Biology* 49: 742 - 750.
19. GATTEN Jr. R. E., ECHTERNACHT A. C. & WILSON M. A., 1988: Acclimatization versus acclimation of activity metabolism in a lizard.– *Physiological Zoology* 61: 322 - 329.
20. GEHRING W. J. & WEHNER R., 1994: Heat shock protein synthesis and thermotolerance in *Cataglyphis*, an ant from the Sahara desert.– *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92: 2994 - 2998.

21. GIBERT P., MORETEAU B., PÉTAVY G., KARAN D. & DAVID J. R., 2001: Chill-coma tolerance, a major climatic adaptation among *Drosophila* species.– *Evolution* 55: 1063 - 1068.

22. HADLEY N. F., QUINLAN M. C. & KENNEDY M. L., 1991: Evaporative cooling in the desert cicada: thermal efficiency and water/metabolic costs.– *Journal of Experimental Biology* 159: 269 - 283.

23. HARWOOD R. T. & TAKATA N., 1965: Effect of photoperiod and temperature on fatty acid composition of the mosquito *Culex tarsalis*.– *Journal of Insect Physiology* 11: 711 - 716.

24. HEINRICH B., 1980: Mechanisms of body-temperature regulation in honeybee, *Apis mellifera*: I. Regulation of head temperature.– *Journal of Experimental Biology* 85: 61 - 72.

25. HEINRICH B., 1993: The hot-blooded insects: Strategies and mechanisms of thermoregulation.– Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.

26. HOCHACHKA P. W. & SOMERO G. N., 2002: Biochemical adaptation: Mechanism and process in physiological evolution.– Oxford University Press, New York.

27. HU Y., YUAN X. & LEI C., 2011: Sexual size dimorphism decreases with temperature in a blowfly, *Chrysomya megacephala* (Fabricius)(Diptera: Calliphoridae).– *Ecological Entomology* 36: 111 - 115.

28. JOHNSTON I. A. & BENNETT A. F., 2008: Animals and Temperature: Phenotypic and Evolutionary Adaptation.– Cambridge University Press, Cambridge.

29. CHAPMAN N. F., 1998: The Insects. Structure and Function (4th edition).– Cambridge University Press, Cambridge.

30. KEJNA M., ARAŻNY A., MASZEWSKI R., PRZYBYŁAK R., USCKA-KOWALKOWSKA J. & VIZI Z., 2009: Daily minimum and maximum air temperature in Poland in the years 1951-2005.– *Bulletin of Geography- physical geography series* 2: 35 - 56.

31. KETOLA T., KRISTENSEN T. N., KELLERMANN V. M. & LOESCHCKE V., 2012: Can evolution of sexual dimorphism be triggered by developmental temperatures?– *Journal of Evolutionary Biology* 25: 847 - 855.
32. KINGSOLVER J. G. & HUEY R. B., 2008: Size, temperature, and fitness: three rules.– *Evolutionary Ecology Research* 10: 251.
33. KNAPP M. & NEDVĚD O., 2013: Gender and timing during ontogeny matter: effects of a temporary high temperature on survival, body size and colouration in *Harmonia axyridis*.– *Plos One* 8: e74984.
34. KORDÍK D., 2000: Fyziologie hmyzu- učební texty, Biologická fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
35. KRENGEL S., STANGL G. I., BRANDSCH C., FREIER B., KLOSE T., MOLL E. & KIOWSI A., 2012: A comparative study on effects of normal versus elevated temperatures during preimaginal and young adult period on body weight and fat body content of mature *Coccinella septempunctata* and *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae).– *Environmental Entomology* 41: 676 - 687.
36. LAHONDÈRE CH. et LAZZARI C. R., 2013: Thermal stress and thermoregulation during feeding in *Mosquitoes*.– *Vectors* 16: 17.
37. LAMANA M. L. & MILLER J. C., 1998: Temperature-dependent development in an Oregon population of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae).– *Environmental Entomology* 27: 1001 - 1005.
38. LEE R. E., DAMODARAN K., YI S. X. & LORIGAN G. A., 2006: Rapid cold-hardening increases membrane fluidity and cold tolerance of insect cells.– *Cryobiology* 52: 459 - 463.
39. LOWE C. H. & VANCE V. J., 1955: Acclimation of the critical thermal maximum of the reptile *Urosaurus ornatus*.– *Science* 122: 73 - 74.
40. MACMILLAN H. A. & SINCLAIR B. J., 2011: The role of the gut in insect shilling injury: Cold-induced disruption of osmoregulation in the fall field cricket, *Gryllus pennsylvanicus*.– *The Journal of Experimental Biology* 214: 726 - 734.

41. MICHIE L. J., MALLARD F., MAJERUS M. E. N. & JIGGINS F. M., 2010: Melanic through nature or nurture: genetic polymorphism and phenotypic plasticity in *Harmonia axyridis*.– *Journal of Evolutionary Biology* 23: 1699 - 1707.
42. MITTLER R., 2006: Abiotic stress, the field environment and stress combination.– *Trends in Plant Science* 11: 15 - 19.
43. MOURIER H. & POULSEN K. P., 2000: Control of insects and mites in grain using a high temperature/short time (HTST) technique.– *Journal of Stored Products Research* 36: 309 - 318.
44. MUKHERJEE A., KNUTSON A., HAHN D. A. & HEINZ K. M., 2014: Biological control of giant salvinia (*Salvinia molesta*) in a temperate region: cold tolerance and low temperature oviposition of *Cyrtobagous salviniae*.– *BioControl* 59: 781 - 790.
45. NEDVĚD O., 1996: Chladová odolnost hmyzu a tropy.– *Vesmír* 75: 669.
46. NEDVĚD O., 2012: Family affect in body mass and developmental time of *Harmonia axyridis*.– *IOBC Bulletin* 60: 57 - 59.
47. NEDVĚD O., 2014: Slunéčko východní (*Harmonia axyridis*)- pomocník v biologickém boji nebo ohrožení biodiverzity.– certifikovaná metodika pro praxi, Jihočeská univerzita, České Budějovice.
48. OSAWA N., 2011: Ecology of *Harmonia axyridis* in natural habitats within its native range.– *BioControl* 56: 613 - 621.
49. PODRABSKY J. & SOMERO G. N., 2004: Changes in gene expression associated with acclimation to constant temperatures and fluctuating daily temperatures in an annual killifish *Austrofundulus limnaeus*.– *Journal of Experimental Biology* 207: 2237 - 2254.
50. PÖRTNER H. O., [ed.], 2006: Trade-offs in thermal adaptation: The need for a molecular to ecological integration.– *Physiological and Biochemical Zoology* 79: 295 - 313.
51. POUTSMA J., LOOMANS A. J. M., AUKEMA B. & HEIJERMAN T., 2008: Predicting the potential geographical distribution of the harlequin ladybird, *Harmonia axyridis*, using the Climex model.– *BioControl* 53: 103 - 125.

52. RANSBERRY V. E., MACMILLAN H. A. & SINCLAIR B. J., 2011: The relationship between chill-coma onset and recovery at the extremes of the thermal window of *Drosophila melanogaster*.– *Physiological and Biochemical Zoology* 84: 553 - 559.
53. RENAULT D., SALIN C., VANNIER G. & VERNON P., 2002: Survival at low temperatures in insects: What is the ecological significance of the supercooling point.– *CryoLetters* 23: 217 - 228.
54. RIESEBERG L., [ed.], 2011: Inferring the origin of populations introduced from a genetically structured native range by approximate Bayesian computation: case study of the invasive ladybird *Harmonia axyridis*.– *Molecular Ecology* 20: 4654 - 4670.
55. RINEHART J. P., LI A., YOCUM G. D., ROBICH R. M., HAYWARD S. A. & DENLINGER D. L., 2007: Up-regulation of heat shock proteins is essential for cold survival during insect diapause.– *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 11130 - 11137.
56. RINEHART J. P., YOCUM G. D., CHIRUMAMILLA-CHAPARA A. N. I. T. H. A. & BOETEL M. A., 2009: Supercooling point plasticity during cold storage in the freeze-tolerant sugarbeet root maggot *Tetanops myopaeformis*.– *Physiological Entomology* 34: 224 - 230.
57. RINEHART J. P., HAYWARD S. A., ELNITSKY M. A., SANDRO L. H., LEE R. E. & DENLINGER D. L., 2006: Continuous up-regulation of heat shock proteins in larvae, but not adults, of a polar insect.– *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 14223 - 14227.
58. SALT R. W., 1961: Principles of insect cold-hardiness.– *Annual Review of Entomology* 6.1: 55 - 74.
59. SØMME L., 1996: The effect of prolonged exposures at low temperatures in insect.- *CryoLetters* 17: 341 - 346.
60. STŘEDOVÁ H., 2011: Trend teplotních a srážkových podmínek v zemědělsky intenzivních oblastech.– *Úroda (vědecká příloha)* 10: 590 - 596.

61. STURGESS B. T. & GOULDING R. L., 1968: Tolerance of free species of larval *Chironomidae* to physicochemical stress factors occurring in stabilization lagoons.– *Annals of the Entomological Society of America* 61: 903 - 906.
62. TEETS N. M. & DENLINGER D. L., 2014: Surviving in a frozen desert: Environmental stress physiology of terrestrial Antarctic arthropods.– *Journal of experimental biology* 217: 84 - 93.
63. TEDER T., 2005: Male-biased size dimorphism in *Ichneumonine wasps* (Hymenoptera: Ichneumonidae) - the role of sexual selection for large male size.– *Ecological Entomology* 30: 342 - 349.
64. THOMAS R. K., NEVILLE N., ANVER G., [eds.], 1999: Progress in the study of climatic extremes in northern and central Europe.– *Weather and Climate Extremes*, Springer, Netherlands.
65. VERDÚ J. R., CASAS J. L., LOBO J. M. & NUMA C., 2010: Dung Beetles eat acorns to increase their ovarian development and thermal tolerance.– *Plos One* 5: e10114.
66. VINEBROOKE R. D., COTTINGHAM K. L., NORBERG M. S., DODSON S. I., MABERLY S. C. & SOMMER U., 2007: Impacts of multiple stressors on biodiversity and ecosystem functioning: the role of species co-tolerance.– *Oikos* 104: 451 - 457.
67. WILLMER P. & STONE G., 1997: Temperature and water relations in desert bees.– *Journal of Thermal Biology* 22.6: 453 - 465.
68. WU C., 1995: Heat shock transcription factors: structure and regulation.– *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 11: 441 - 469.

Internetové zdroje:

URL 1: NOVUS bio-techne brand (cit. 2015.03.29) dostupné z
 <http://www.novusbio.com/HSP90-Antibody-3B6_NB120-5455.html>

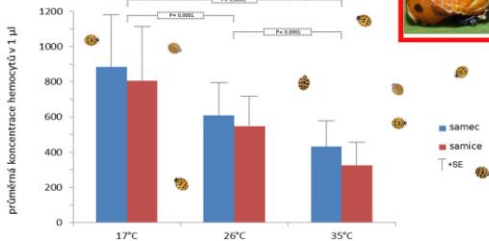
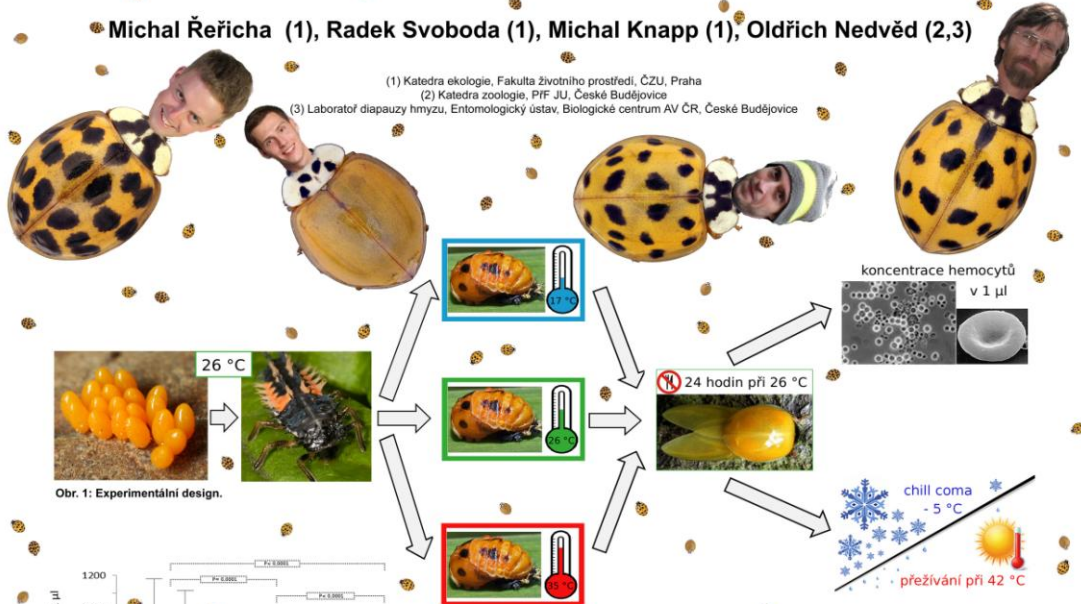
8. Přílohy

Příloha č. 1: Poster na Zoologické dny 2015, Brno

Jak teplota během stádia kukly ovlivňuje imunitní systém a odolnost teplotnímu stresu u sluněčka *Harmonia axyridis*

Michal Řeřicha (1), Radek Svoboda (1), Michal Knapp (1), Oldřich Nedvěd (2,3)

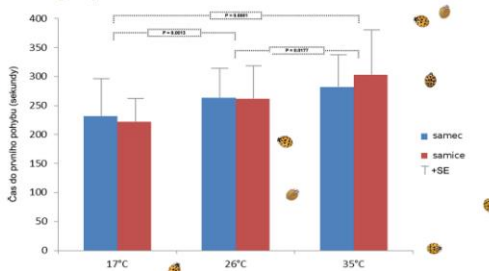
(1) Katedra ekologie, Fakulta životního prostředí, ČZU, Praha
 (2) Katedra zoologie, PFF JU, České Budějovice
 (3) Laborator diapaury hmyzu, Entomologický ústav, Biologické centrum AV ČR, České Budějovice



Obr. 2: Vliv teploty během stádia kukly a pohlaví na koncentraci hemocytů v hemolyfě.

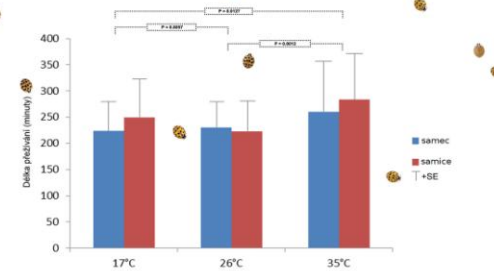
Data byla analyzována pomocí zobecněného lineárního smíšeného modelu (GLMM), kde identita rodičovského páru (bylo použito 7 párů) sloužila jako náhodný efekt a jako pevný efekt byly testovány teplota, pohlaví a jejich interakce. Pro zjištění významných rozdílů mezi jednotlivými teplotními ošetřeními byly použity Tukeyho testy.

Samci měli 24 hodin po vyuknutí obecně vyšší koncentraci hemocytů v hemolyfě než samice (GLMM: $F = 5,30$; $P = 0,023$) a koncentrace hemocytů stmrně klesala s rostoucí teplotou během stádia kukly (GLMM: $F = 55,94$; $P < 0,001$; Obr. 2). Na odolnost extrémním teplotám 24 hodin po vyuknutí nemělo pohlaví sluněček žádný vliv. Jejich odolnost teplotním extrémům však průkazně ovlivňovala teplota během stádia kukly. Sluněčka z nízké teploty se z chladové strnulosti způsobené pobytem v mrazu probrala o 40 vteřin dříve než ta z teploty optimální a dokonce o 70 vteřin dříve než ta z vysoké teploty (GLMM: $F = 19,03$; $P < 0,001$; Obr. 3). Pobyt kukly ve vysoké teplotě měl pozitivní vliv na délku přežívání dospělci při extrémně vysoké teplotě (42°C; GLMM: $F = 7,03$; $P = 0,001$; Obr. 4).



Obr. 4: Vliv teploty během stádia kukly na rychlost probírání se dospělci z "chill coma".

Teplota je společně s potravou nejdůležitějším environmentálním faktorem ovlivňujícím preimaginální vývoj hmyzu. Teplota zažitá během preimaginálního vývoje často poznamená jedince na celý život a ovlivní tak vlastnosti, které má jako dospělce. V této studii jsme zkoumali vliv teploty během stádia kukly a pohlaví jedince na množství hemocytů a odolnost teplotnímu stresu u invazivního sluněčka *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773). Brouci byli během fáze kukly vystaveni buď nízké teplotě (17°C), optimální teplotě (26°C) nebo vysoké teplotě nedaleko horního prahu vývoje (35°C; Obr. 1). Koncentrace hemocytů v hemolyfě jednodenních dospělci byla spočítána v optickém mikroskopu pomocí Bürkerovy komůrky. Odolnost extrémním teplotám byla měřena jako délka přežívání jednodenních dospělci při 42°C a čas potřebný k probírání se z "chill coma" (chladové strnulosti) způsobeného dvou hodinovým pobytem při teplotě -5°C.



Obr. 3: Vliv teploty během stádia kukly na délku přežívání při teplotě 42°C.

Vypadá to, že fungování imunitního systému sluněčka *Harmonia axyridis* se vymyká obecným představám o pozitivním vlivu teploty, jak na tumorální složky (Adamo et Lovett, 2011), tak i buněčné složky (Ouedraogo et al., 2003) imunitního systému hmyzu. Navíc koncentrace hemocytů byla u samců obecně vyšší než u samic, což je v rozporu s všeobecným předpokladem vyšší koncentrace hemocytů u samic než samců (Chapman, 2013). Tyto abnormality si určité zaslouží detailnější zkoumání v dalších experimentech. Naproti tomu výsledky experimentů zkoumajících odolnost sluněček k extrémním teplotám dopadly v souladu s široce přijímanou teorií (beneficial acclimation hypothesis; Chown et Terblanche, 2007).

S. A. Adamo, M. M. E. Lovett, 2011. Some like it hot: the effects of climate change on reproduction, immune function and disease resistance in the cricket *Gryllus borealis*. *The Journal of Experimental Biology* 214: 1997–2004.
 R. F. Chapman, 2013. *The Insects: Structure and Function*. Cambridge University Press, 786 s.
 R. M. Ouedraogo, M. Couston, M. S. Goettel, J. Brodeur, 2003. Inhibition of fungal growth in thermoregulating locusts, *Locusta migratoria*, infected by the fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Journal of Invertebrate Pathology* 82: 103–109.
 S. L. Chown, J. S. Terblanche, 2007. Physiological diversity in insects: Ecological and evolutionary contexts. *Advances in Insect Physiology* 33: 55–152.

další informace o projektu: knapp@fzp.czu.cz

Příloha č. 2: Diplom kolegy Michala Řeřicha, reprezentace práce na Zoologických dnech 2015 v Brně.

DIPLOM ZA NEJLEPŠÍ POSTER

Michal Řeřicha



Příloha č. 3: *Harmonia axyridis*- pohled zdola.



Příloha č. 4: Klimaboxy - teplotní režimy 17, 26 a 35°C + režim teploty 42°C



Příloha č. 5: Petriho misky s pokusnými brouky



Příloha č. 6: Práce v laboratoři- čištění PM prepupám



Příloha č. 7, 8: Líhnutí dospělce



Příloha č. 9: Dobarvování jedince po vylíhnutí



Příloha č. 10: Detail chodidla s drápkem

