

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta**

**Fyziológia a biochémia prezimovania  
cifruše bezkrídlej (*Pyrrhocoris apterus*)  
vystavenej rôznym scenárom  
oteplujúcej sa klímy**

Bakalárska práca

**Natália Filová**

Školiteľ: RNDr. Jan Rozsypal , Ph.D.

České Budějovice 2021

Filová, N., 2021: **Fyziológia a biochémia prezimovania cifruše bezkrídlej (*Pyrrhocoris apterus*) vystavenej rôznym scenárom otepľujúcej sa klímy** [Physiology and biochemistry of overwintering in linden bug (*Pyrrhocoris apterus*) exposed to different climate change scenarios. Bc. Thesis, in Slovak.] – 37 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:**

Winter temperatures are rising more than summer temperatures in temperate regions. Current research mostly focuses on the effects of warming winters on invasive insects from south, their population dynamics and spread to higher latitudes. On the other hand, the effects of warming winters on native species, adapted to cold winters, are hardly studied. This thesis describes how different “warm winter” scenarios, simulated in laboratory, and real winters affect overwinter survival, physiology, and biochemistry of linden bug (*Pyrrhocoris apterus*).

**Prehlásenie:**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou 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 13.4.2021

.....  
Podpis

## Pod'akovanie:

Chcela by som poďakovať hlavne môjmu školiteľovi, za jeho ochotu, cenné rady a trpezlivosť, pretože z dôvodu výskytu koronavírusu a epidemiologických opatrení, práca na mojej bakalárke nebola jednoduchá.

## Obsah:

<b>1. Úvod</b> .....	1
1.1. Prezimovanie hmyzu a klimatická zmena .....	1
1.2. Adaptácie hmyzu pre prezimovanie .....	2
1.3. Fyziologické mechanizmy chladovej odolnosti .....	5
1.4. Cifruša bezkrídla ( <i>Pyrrhocoris apterus</i> ) .....	9
<b>2. Ciele</b> .....	12
<b>3. Materiál a metodika</b> .....	13
3.1. Zber cifruší a dizajn pokusu .....	13
3.2. Analýza prežitia a fyziologické parametre chladovej odolnosti .....	16
3.3. Extrakcia a stanovenie celkových lipidov .....	17
3.4. Extrakcia a stanovenie glykogénu .....	19
3.5. Spracovanie výsledkov .....	20
<b>4. Výsledky</b> .....	21
4.1. Klimatické podmienky v zime 2019/2020 .....	21
4.2. Prežitie po vystavení rôznym zimám .....	22
4.3. Parametre chladovej odolnosti .....	23
4.3.1. Tolerancia zmrznutia .....	23
4.3.2. Bod podchladenia .....	23
4.3.3. Hmotnosť a obsah vody .....	24
4.4. Energetické rezervy .....	25
4.4.1. Glykogén .....	25
4.4.2. Lipidy .....	26
<b>5. Diskusia</b> .....	28
<b>6. Záver</b> .....	31
<b>7. Zoznam použitej literatúry</b> .....	32

## 1. Úvod

V mojej bakalárskej práci sa zameriavam na málo študovanú problematiku ako klimatické zmeny v zimnom období vplývajú na naše druhy hmyzu, konkrétne na modelový druh cifrušu bezkrídlu (*Pyrrhocoris apterus*), jej zimné prežitie, fyziológiu a biochémiu.

### 1.1. Prezimovanie hmyzu a klimatická zmena

Hmyz predstavuje extrémne prispôsobivú skupinu organizmov, ktorá obýva všetky pásma na Zemi (od tropických po polárne). Hmyz si vyvinul rôzne mechanizmy ako sa prispôbiť vysychaniu za vysokých teplôt v trópoch, či naopak chladu v polárnych oblastiach. Oproti iným živočíchom má hmyz naozaj pozoruhodnú schopnosť tolerovať nízke telesné teploty. Niektoré druhy hmyzu dokážu zabrániť zmrznutiu svojich telesných tekutín pri nízkych teplotách ako  $-54^{\circ}\text{C}$  (Ring, 1982), zatiaľ čo iné druhy bežne prežívajú v zmrznutom (Sinclair, 1999) či silno dehydratovanom (Holmstrup a Sømme, 1998) stave. Dokonca existujú aj druhy hmyzu schopné prežiť kryoprezerváciu v kvapalnom dusíku ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) (Košťál a kol., 2011b).

Striedanie ročných období, ktoré je výraznejšie so zvyšujúcou sa zemepisnou šírkou, vytvára rozdiel medzi letom a zimou v teplote ovzdušia či počtom zrážok. Pre hmyz obývajúci mierne a polárne pásmo bolo nutné sa prispôbiť týmto sezónnym zmenám, pretože teplota prostredia je pre hmyz veľmi významná. Teplota ovplyvňuje jeho výskyt, aktivitu, príjem potravy i reprodukciu. Zima, kedy je nedostatok potravy a teploty klesajú pod bod mrazu, nastáva zvýšené riziko strát vody či riziko tvorby ľadu vo vnútri tela, je pre hmyz najkritickejšou fázou životného cyklu. Na toto obdobie sa musí hmyz pripraviť, preto vstupuje do diapauzy a aktivuje rôzne mechanizmy zvyšujúce tzv. chladovú odolnosť.

Klimatické dáta ukazujú, že najmä v priebehu 20. a 21. storočia postupne dochádza ku globálnemu zvyšovaniu teplôt (IPCC, 2014). Zmena klímy je dnes veľmi aktuálna téma, ktorú zrejme ovplyvňujú ľudia zvýšenou tvorbou skleníkových plynov (najmä  $\text{CO}_2$  a  $\text{CH}_4$ ). S klimatickou zmenou prichádza otepľovanie ovzdušia, zdvíhanie hladín morí či znížené množstvo zrážok. Klimatická zmena má veľa rôznych dopadov na znehodnotenie pôd, zníženie biodiverzity, stratu zdrojov vody a veľa ďalších. Tieto vplyvy majú dopad na každý živý organizmus vrátane hmyzu, ktorý musí týmto zmenám čeliť.

Rast teplôt je obzvlášť viditeľný v miernom podnebnom pásme. Otepľovanie ovzdušia ovplyvňuje dĺžku a teplotu ročných období, čo je najviac viditeľné v zime. Zimné teploty sú pre mnoho druhov hmyzu zrejme hlavnou bariérou pre ich šírenie do vyšších zemepisných šírok (Bale a Hayward, 2010). Krátke a čoraz teplejšie zimy umožňujú organizmom migrovať na miesta, kde doteraz neboli pre nich vhodné podmienky (z juhu na sever). To môže v pozitívnej miere ovplyvniť nežiaduce druhy hmyzu, rozšírenie ich populácií, a tým spôsobiť väčšie problémy prenosom ochorení či ničením úrody. Migrácie hmyzu ovplyvňujú všetky ekosystémy a je to veľmi študovaná téma. Naopak málo študovanou témou je ako teplé zimy ovplyvnia naše druhy hmyzu, ktoré sú zvyknuté na studené zimy.

Otepľovanie v zimnom období môže mať negatívny dopad na úspešnosť prezimovania domácich druhov hmyzu, pretože podmienky v zime sa budú vplyvom rastúcich teplôt postupne vzdďaľovať od optimálnych, nízkych. Vyššie zimné teploty môžu viesť napr. k rýchlejšej spotrebe energetických rezerv (Sinclair, 2015; Williams et al., 2015), ktoré potom nemusia vydržať až do jari. Teplé zimy tiež môžu viesť k deaklimácii a zníženiu chladovej odolnosti. Deaklimovaný hmyz potom môže byť ohrozený náhlým poklesom teploty.

Lepšie porozumenie vplyvu otepľujúcich sa zím na hmyz môže prispieť napr. k vylepšeniu predpovedných modelov pre šírenie druhov, programov na ochranu ohrozených druhov či ochranu proti škodcom.

## **1.2. Adaptácia hmyzu na prezimovanie**

Väčšina hmyzu je ektotermná či poikilotermná, teda ich telesná teplota je podobná teplote prostredia, preto je zima pre nich najnáročnejšie obdobie, kedy im hrozí vysychanie či zmrznutie. Hmyz má v zásade tri možnosti, ako sa vyrovnáť s nízkymi teplotami v zime: migrovať, regulovať telesnú teplotu alebo tolerovať nízku telesnú teplotu. Niektoré druhy s rozpoznaním príchodu zimy migrujú na dlhé vzdialenosti na juh (napr. motýľ *Danaus plexippus*) (Brower, 1995), iné migrujú na krátku vzdialenosť, či vertikálne hľadaním vhodného úkrytu. Hľadanie úkrytu je u hmyzu veľmi častá migračná stratégia. Vhodným úkrytom sú miesta, kde teplota neklesá tak ako teplota vzduchu (napr. kôra stromov, pôda, opadané listy, odumreté rastlinné tkanivá, a pod.) (Lee, 1989). Druhy pochádzajúce z teplejších oblastí môžu vyhľadávať zimné úkryty tiež v ľudských obydlích (Bale, 1996).

Ďalšou možnosťou ako sa hmyz vyrovnáva s chladom je regulácia telesnej teploty, ktorú môžeme vidieť u tzv. superorganizmov, napr. vo včelstvách zahrievaním letových svalov, čím si udržujú stálu teplotu v úľoch (Southwick a Heldmaier, 1987).

Zďaleka najčastejšia stratégia je u hmyzu tolerancia nízkych telesných teplôt. Mnoho druhov hmyzu si za týmto účelom vyvinulo adaptácie, ktoré zvyšujú ich tzv. chladovú odolnosť.

Hlavnými mechanizmami, ktoré hmyz využíva na prežitie v nepriaznivých podmienkach v zime sú: 1) vstup do dormancie, nazývanej diapauza a 2) sezónna aklimácia (chladová aklimácia). Tieto mechanizmy sú komplexom adaptácií, zahrňujúcich zmeny na všetkých úrovniach organizácie – od molekulárnej po behaviorálnu (Danks, 1994; Clark a Worland, 2008) a vedú k hlbkej zmene fenotypu.

Diapauza môže byť buď obligatórna alebo fakultatívna. Druhy s obligatórnou diapauzou do nej vstupujú nehl'adiac na signály z prostredia. Diapauza je teda neoddeliteľnou súčasťou ich vývojového programu. Väčšina hmyzu má diapauzu fakultatívnu a vstupuje do nej v priebehu alebo na konci leta na základe signálov, ktoré prijíma z prostredia. Hlavným signálom pre vstup do diapauzy je fotoperiód, kedy postupné skracovanie dĺžky dňa (respektíve predlžovanie noci) signalizuje budúci príchod zimy. Menšiu rolu pri vstupe do diapauzy hrajú aj ďalšie signály ako teplota a termoperiód, ale tiež napr. kvalita potravy či hustota populácie (Tauber a kol., 1986; Košťál, 2006). Diapauza má dôležitú rolu pre prežitie nepriaznivých podmienok, a taktiež súvisí s chladovou odolnosťou hmyzu.

U niektorých druhov diapauza súvisí s dokončením vývoja, kedy k diapauze dochádza v skorom štádiu embrya, larvy či pupálnom štádiu. Iné druhy vstupujú do diapauzy ako dospelé jedince. Diapauza nie je akýmsi statickým stavom ("zimným spánkom"), kedy diapauzný jedinec nevykazuje žiadnu aktivitu. Priebeh diapauzy naopak býva často veľmi dynamický proces, zahrňajúci postupný sled rôznych zmien. V tomto ohľade sa v literatúre používa termín "diapauzný vývoj" (Hodek, 1996). Diapauzný program napr. spúšťa akumuláciu energetických rezerv, zastavuje vývoj v určitom druhovo špecifickom štádiu, prípadne zastavuje rozmnožovanie, mení správanie (napr. hľadanie vhodného úkrytu na prezimovanie) a dochádza k zmenám v metabolizme, ktoré umožnia syntézu rôznych látok chrániacich organizmus pred nepriaznivými vplyvy nízkych teplôt.

Krátko po vstupe do diapauzy je diapauzný stav udržiavaný aj za situácie, kedy sa vyskytnú podmienky vhodné pre vývoj a reprodukciu (Tauber a kol., 1986). Diapauzu možno teda považovať i za dôležitý mechanizmus, ktorý zabraňuje predčasnému obnoveniu vývoja napr. počas krátkodobých oteplení na jeseň. Jedinci jedného druhu môžu vstupovať do diapauzy približne od konca leta do začiatku zimy, napr. podľa toho, kedy dokončia vývoj na dospelé jedince. Diapauza potom umožňuje synchronizáciu jedincov s populáciou, kedy na jar všetci jedinci danej populácie obnovia aktivitu približne v rovnakom čase.

Pre lepšie pochopenie sa dá diapauza rozdeliť do 3 častí: pre-diapauza (indukčná a preparačná fáza), diapauza (iniciačná, udržiavacia a terminačná fáza), post-diapauzná kviescencia (Košťál, 2006; Košťál a kol., 2017).

Indukčná fáza sa objavuje v geneticky určenom štádiu vývoja, kedy je organizmus citlivý na stimuly z prostredia, vďaka ktorým organizmus prepne ontogenézu z priameho vývoja na diapauzu. Takýto stimul z prostredia môže byť napr. fotoperiódou alebo teplotou prostredia. U niektorých druhov hmyzu sa môžeme stretnúť aj so začiatkom diapauzy bez podnetu z prostredia, kedy je diapauza súčasťou ontogenézy.

Preparačná fáza sa nevyskytuje u všetkých druhov hmyzu, ale iba u druhov, ktoré majú oddelenú indukčnú a iniciačnú fázu obdobiím priameho vývoja. Pre túto fázu sú charakteristické zmeny v správaní a fyziologických procesoch, ako napríklad migrácia, či akumulácia energetických rezerv.

V iniciačnej fáze nastáva zastavenie priameho vývoja jedinca a s ním spojené zníženie metabolickej aktivity. Druhy, ktoré prežívajú diapauzu ako mobilné, naďalej prijímajú potravu, ktorú premieňajú na energetické rezervy, tiež môžu hľadať vhodné miesto na prezimovanie.

Počas udržiavacej fázy pokračuje zastavenie vývoja a zníženie metabolickej aktivity aj pri priaznivých podmienkach. Udržiavacej fáze môžu dopomáhať špecifické stimuly, aby nedošlo k terminačnej fáze.

V terminačnej fáze sa zníži intenzita diapauzy na minimum podľa špecifických zmien v prostredí, a dosiahne sa fyziologický stav dovoľujúci pokračovanie priameho vývoja. Pre mnoho druhov hmyzu bývajú stimulom pre ukončenie diapauzy dlhšie expozície nízkym teplotám.

Hmyz zostáva po terminácii diapauzy v post-diapauznej kviescencii, kde čaká na priaznivé podmienky pre pokračovanie priameho vývoja. Jediné čo v tejto fáze udržuje dormantný stav je nízka teplota.

Chladová odolnosť popisuje schopnosť organizmu prežiť za nízkych teplôt nevhodných na rast a vývoj. Chladová odolnosť sa zvyšuje po vstupe do diapauzy, ale väčšina druhov hmyzu na dosiahnutie plnej chladovej odolnosti vyžaduje ešte chladovú aklimáciu. Chladová aklimácia nastáva pri postupnom vystavovaní jedinca nízkym teplotám, pričom sa mení napr. zloženie membrán a syntetizujú sa tzv. kryoprotektanty, čo sú látky, ktoré chránia bunkové štruktúry pred poškodením chladom či mrazom (Sømme, 1999).

Chladová odolnosť sa delí na dve základné stratégie (Bale, 1993): tolerancia zmrznutia a podchladenie (tiež vyhýbanie sa zmrznutiu alebo netolerancia zmrznutia). Druhy tolerujúce zmrznutie iniciujú tvorbu ľadu vo vnútri tela pri relatívne vysokých podnulových teplotách (blízko 0° C). Naproti tomu druhy využívajúce stratégiu podchladenia zabraňujú tvorbe ľadu vo vnútri tela znižovaním tzv. bodu podchladenia a udržiujú tak svoje telesné tekutiny v podchladenom stave aj za teplôt hlboko pod nulou. U niektorých druhov hmyzu s permeabilnou kutikulou bola popísaná stratégia tzv. kryoprotektívnej dehydratácie (Holmstrup a Sømme, 1998). Druhy využívajúce túto stratégiu sa vyhýbajú nebezpečenstvu zmrznutia telných tekutín odstránením značnej časti telesnej vody.

Spomínané stratégie využívajú množstvo fyziologických mechanizmov. Niektoré mechanizmy sú typické pre konkrétnu stratégiu, zatiaľ čo iné sú zdieľané, alebo majú u rôznych stratégií rôzne funkcie. Fyziologickým mechanizmom chladovej odolnosti sa podrobnejšie venuje nasledujúca kapitola.

### **1.3. Fyziologické mechanizmy chladovej odolnosti**

Čistá voda zvyčajne mrzne pri teplote 0°C, ktorá zodpovedá aj jej bodu topenia. Bod topenia roztoku predstavuje najvyššiu teplotu, pri ktorej môže k mrznutiu dochádzať. Počiatočnú fázu mrznutia, teda nukleáciu, možno rozdeliť na homogénnu a heterogénnu (Wilson a kol., 2003). K homogénnej nukleácii dochádza, keď sa dostatočné množstvo molekúl vody sformuje do kryštalickej mriežky ľadu a vytvorí tak zárodočný kryštál. Pravdepodobnosť homogénnej nukleácie sa zvyšuje s klesajúcou teplotou (čím nižšia teplota, tým menej molekúl vody je



potrebné k vytvoreniu zárodočného kryštálu) a s rastúcim objemom (viac molekúl vody zvyšuje šancu na vytvorenie zárodočného kryštálu). Mikroskopické množstvá veľmi čistej vody mrznú až pri teplotách okolo  $-40^{\circ}\text{C}$ . Nukleácia vo vodných roztokoch (teda aj v telesných tekutinách živočíchov) je obvykle heterogénna, kedy nejaká častica, iná než voda, slúži ako tzv. nukleátor. Predpokladá sa teda, že v prírode sa stretávame hlavne s heterogénnou nukleáciou (Sømme, 1999; Lundheim, 2002). Niekedy môžeme pozorovať vodu a vodné roztoky v kvapalnom stave aj pri teplotách pod bodom topenia. Kvapalinu, ktorá zostáva v kvapalnom stave za teplôt pod jej bodom topenia nazývame podchladenou. Podchladený stav je metastabilný, čo znamená, že kedykoľvek môže dôjsť k nukleácii. Teplotu, pri ktorej kvapalina skutočne zmrzne (reálny bod mrznutia), potom nazývame bodom podchladenia (Wilson a kol., 2003).

Hlavnou zložkou hemolymfy hmyzu je voda, ktorá spolu s rozpustenými látkami tvorí roztok. Rozpustené látky zvyšujú osmolalitu roztoku a ovplyvňujú tak jeho vlastnosti. Napríklad rozpustením 1 mólu látky (zvýšenie koncentrácie o 1 osmol/kg) dôjde k zníženiu bodu topenia o  $1,86^{\circ}\text{C}$  a bod podchladenia sa zníži o dvojnásobok až trojnásobok tejto hodnoty (Zachariassen, 1985). V takomto prípade hovoríme o koligatívnom pôsobení, kedy nezáleží na povahe rozpustenej látky, ale len na jej príspevku k osmolalite roztoku. V biologických systémoch zapríčiňujú heterogénnu nukleáciu tzv. ice nucleating agents (INAs). Najčastejšie sa jedná o špeciálne proteíny, ktoré nukleujú ľad (ice nucleating proteins) na ich povrchu pri relatívne miernych teplotách pod nulou. Tieto proteíny boli prvýkrát objavené u baktérií žijúcich na povrchu rastlín, a neskôr aj u baktérií, ktoré sú normálnou súčasťou črevnej mikroflóry hmyzu (Lee a kol., 1996; Worland a Block, 1999). Hmyz ich teda môže prijímať v potrave alebo ich vytvára jeho črevná mikroflóra. Niektoré druhy hmyzu si dokonca syntetizujú vlastné proteíny nukleujúce ľad (Storey a Storey, 1988). Ako nukleátory môžu u hmyzu slúžiť napr. aj častice fosforečnanu vápenatého alebo iné anorganické látky (Lee a kol., 1996). Snáď najlepším nukleátorom, vyskytujúcim sa v prírode, je samotný ľad. Ľad sa môže za nízkych teplôt tvoriť vo vlhkom prostredí, ako napr. v opadaných listoch, ktoré sú obľúbeným mikrohabitatom pre prezimovanie mnohých druhov hmyzu. Pri kontakte s okolitým ľadom môže dôjsť k inokulácii telových tekutín a ich následnému zmraznutiu (Rozsypal a Košťál, 2018). Druhy vyhýbajúce sa zmraznutiu sa snažia inokulácii svojich telesných tekutín zabrániť, zatiaľ čo niektoré druhy tolerujúce zmraznutie inokuláciu naopak využívajú aby iniciovali mrznutie za miernych teplôt pod nulou (napr. Layne a kol., 1999).

Pred samotným mrznutím môže (podobne ako u iných roztokov) dochádzať k podchladeniu telesných tekutín, kedy nezmrznú pri dosiahnutí bodu topenia, ale zostávajú ďalej v kvapalnom skupenstve. Toho využívajú podchladzujúce druhy hmyzu, ktoré sa tak vyhýbajú zmrznutiu svojich telesných tekutín. Pre hmyz využívajúci stratégiu podchladenia je dôležité podchladený metastabilný stav stabilizovať a minimalizovať tým riziko zmrznutia. Podchladzujúce druhy hmyzu sa pred príchodom zimy zbavujú nukleátorov alebo ich biochemicky maskujú. Pretože mnoho nukleátorov je obsiahnutých v potrave, podchladzujúce druhy hmyzu často pred zimou prestávajú prijímať potravu a vyprázdňujú črevo (Sømme, 1999). Niektoré podchladzujúce druhy, okrem odstránenia nukleátorov, syntetizujú tzv. antifreeze proteíny (AFP). Antifreeze proteíny regulujú rast ľadových kryštálov tak, že na nich nasadajú a zabraňujú ich ďalšiemu rastu, čím prispievajú k stabilizácii podchladeného stavu (Jorov a kol., 2004). Zmrznutiu telesných tekutín podchladzujúcich druhov je bez výnimky letálne. Mrznutie silne podchladenej kvapaliny totiž prebieha "explozívne" a nenecháva žiadny priestor na vyrovnanie koncentrácií rozpustených látok medzi hemolymfou a roztokom vo vnútri buniek. V silne podchladenom stave navyše hrozí intracelulárne mrznutie, ktoré je taktiež prakticky vždy letálne (Seki a kol., 2009).

Druhy hmyzu tolerujúce zmrznutie telových tekutín naopak nukleátory ľadu akumulujú v hemolymfe, aby zabezpečili skoré zmrznutie pri relatívne miernych podnulových teplotách. Skoré mrznutie za miernych teplôt zaisťuje dostatok času pre vyrovnanie zmien koncentrácií rozpustených látok a presunov vody v dôsledku tvorby ľadu. U druhov hmyzu tolerujúcich zmrznutie dochádza k tvorbe ľadu v hemolymfe (extracelulárne mrznutie). Počas extracelulárneho mrznutia dochádza k zakoncentrovaniu rozpustených látok, ktoré sú vytláčané z kryštalickej mriežky ľadu. Súčasne dochádza k osmotickému odsávaniu vody z buniek (po koncentračnom spáde), zvyšuje sa koncentrácia roztoku vo vnútri buniek a dochádza k bunkovej dehydratácii a zmenšeniu objemu buniek. Ľad sa tak nachádza mimo bunky a roztok vnútri buniek je vysokou koncentráciou rozpustených látok stabilizovaný v podchladenom stave (Sømme, 1999; Bale, 2002).

V prípade intracelulárneho mrznutia prebiehajú deje opačne. Voda je osmoticky nasávaná do buniek a hrozí tak mechanické poškodenie či prasknutie bunkovej membrány, čo je pre bunku letálne (Lundheim, 2002). Už pomerne dávno boli nájdené aj výnimky, pre ktoré intracelulárne mrznutie nie je letálne, a to napr. tukové bunky larvy muchy *Eurosta solidaginis*, ktorá využíva stratégiu tolerancie zmrznutia (Salt, 1959). Je známy dokonca aj prípad prežitia

intracelulárneho mrznutia celého organizmu, a to u hlísty *Panagrolaimus davidi* (Wharton a Ferns, 1995).

Mnoho druhov hmyzu na zimu akumuluje tzv. kryoprotektanty, čo sú látky chrániace organizmus pred nízkymi teplotami či mrznutím, prípadne pred negatívnymi dôsledkami tvorby ľadu vnútri tela (Storey a Storey, 1988). Kryoprotektanty môžeme rozdeliť na nízkomolekulárne a vysokomolekulárne. Medzi nízkomolekulárne kryoprotektanty sa radia cukry (napr. trehalóza, fruktóza), polyoly (napr. glycerol, sorbitol), a voľné aminokyseliny (napr. prolín, alanín). Vysokomolekulárne kryoprotektanty sú potom zastúpené proteíny (antifreeze a heat shock proteíny).

Kryoprotektanty ďalej môžeme rozdeliť podľa mechanizmu ich pôsobenia na koligatívne a nekoligatívne (Storey a Storey, 1991; Ramlø, 2000). Ako už bolo spomenuté vyššie, funkciou koligatívnych kryoprotektantov je zníženie bodu podchladenia a stabilizácia podchladeného stavu. Veľa hmyzu využívajúceho stratégiu podchladenia má multizložkový systém kryoprotektantov. Takýto systém bojuje s možným toxickým efektom spojeným s koncentráciou jednotlivých komponentov. Koligatívne kryoprotektanty tiež zvyšujú podiel tzv. viazanej vody. Viazaná voda je zachytená v hydratačných obaloch rozpustených látok, je tak neprístupná mrznutiu a do istej miery aj vysychaniu. Koligatívne kryoprotektanty okrem prehĺbenia a stabilizácie podchladeného stavu, tiež pomáhajú zadržať vodu a pri dostatočných koncentráciách môžu regulovať množstvo ľadu, ktoré sa vytvorí v tele druhov tolerujúcich zmrznutie. Účinok koligatívnych kryoprotektantov je teda závislý na ich koncentrácii. Naproti tomu nekoligatívne kryoprotektanty pôsobia aj za relatívne nízkych koncentrácií (za predpokladu, že je dosiahnutá istá kritická koncentrácia) tak, že chránia bunkové štruktúry (proteíny a membrány) pred účinkami nízkych teplôt a mrazu. Nekoligatívne pôsobenie sa prisudzuje látkam, ktoré stabilizujú hydratačné obaly makromolekúl, ako napr. prolín či trehalóza (Timasheff, 2002).

Stabilizačnú funkciu makromolekúl plnia tiež vysokomolekulárne kryoprotektanty, ako napr. tzv. heat shock proteíny (HSP). Expresia HSP sa spúšťa pri strese z vonkajšieho prostredia napr. pri šoku z tepla, chladu, pri vysychaní, pri nedostatku kyslíka v tkanivách či pri vystavení rôznym chemikáliám. HSP majú funkciu ako tzv. molekulárne chaperony, ktoré sa pri strese viažu na proteíny, zlepšujú nepriaznivý účinok nesprávneho usporiadania proteínov a pomáhajú proteínom sa vrátiť do ich prirodzených konformácií pri obnovení vhodných

podmienok. HSP teda majú podstatnú rolu pri prežití rôznych nepriaznivých vplyvov prostredia vrátane chladu (Rinehart a kol., 2007).

Takzvané "antifreeze proteíny" (AFP) predstavujú ďalšiu kategóriu kryoprotektantov. Sú to vysokomolekulárne kryoprotektanty s nekologatívnym pôsobením. Ako bolo spomenuté vyššie, mechanizmom ich účinku je regulácia rastu ľadových kryštálov. Pre druhy vyhýbajúcich sa zmrznutiu pomáhajú AFP stabilizovať podchladený stav a takisto bránia prieniku okolitého ľadu, ktorý sa môže vyskytovať v prostredí, skrz kutikulu (inokulácia) (Bale, 2002). Pri druhoch tolerujúcich zmrznutie AFP zabraňujú rekryštalizácii, teda rastu veľkých kryštálov, ktoré by mohli spôsobiť mechanické poškodenie, na úkor menších (Lundheim, 2002; Storey a Storey, 2013). K rekryštalizácii dochádza napr. vplyvom fluktuácií teploty, čo môže spôsobiť cykly čiastočného topenia a opätovného mrznutia a podporovať rast veľkých kryštálov napr. spájaním menších.

Ďalším mechanizmom na zvýšenie chladovej odolnosti je redukcia množstva vody v tele. Zníženie hydratácie vedie k relatívnemu zvýšeniu koncentrácie rozpustených látok. Druhom vyhýbajúcim sa zmrznutiu strata časti telesnej vody pomáha stabilizovať podchladený stav. Špeciálnym príkladom sú druhy spoliehajúce sa na stratégiu kryoprotektívnej dehydratácie, ktoré sa zbavujú značnej časti vody a v tele im tak zostáva prevažne viazaná voda, ktorá za normálnych okolností prakticky nemôže zmrznúť (Holmstrup a Somme, 1998; Wolfe a kol., 2002). Pri druhoch tolerujúcich zmrznutie zníženie obsahu telesnej vody redukuje množstvo ľadu, ktoré sa môže v tele vytvoriť.

Teplota a hydratácia sú hlavnými faktormi ovplyvňujúcimi funkciu biologických membrán. Biologické membrány sú tvorené rôznymi zložkami, ktorých pomery majú výrazný vplyv na fázové správanie a aj funkciu membrán za rôznych podmienok. Dôležitým mechanizmom, ktorý zvyšuje chladovú odolnosť a pomáha prežiť za nízkych teplôt, sú aj adaptívne zmeny v zložení biologických membrán. Hmyz aj iné organizmy na zimu napr. zvyšujú podiel nenasýtených mastných kyselín, tiež zvyšujú podiel fosfatidylethanolaminov na úkor fosfatidylcholinov (Hazel, 1995). Účelom týchto zmien je udržať membrány funkčné za nízkych telesných teplôt, prípadne za nízkej hydratácie v zmrznutom stave.

#### 1.4. Cifruša bezkrídla (*Pyrrhocoris apterus*)

Cifruša bezkrídla patrí do radu Heteroptera (Bzdochy), infraradu Pentamomorpha a čeľade Pyrrhocoridae (Cifrušovité). Jedná sa o prispôsobivý a veľmi rozšírený druh, obývajúci aj Palearktickú oblasť, narozdiel od iných druhov z čeľade Pyrrhocoidae, ktoré obývajú Paleotropickú a subtropickú Palearktickú oblasť. Osídľuje Európu, blízky východ, Sibír (južnú časť), Mongolsko, Čínu a tiež bola nájdená v USA, Centrálnej Amerike a Indii (Socha, 1993).

Záujem o cifrušu bezkrídlu narástol v 60-tych rokoch po objavení tzv. paper factor-u, a teda objavení aktivity juvenilného hormónu. Tento objav nastal náhodou pri prenesení chovu cifruši bezkrídlej do USA, kde sa jedince, pod vplyvom analógu juvenilného hormónu, obsiahnutom v temnejšom papieri, vyvinuli abnormálne oproti chovu v Európe (Sláma a Williams, 1965). Jej výhody pre modelový druh sú ľahká dostupnosť či jednoduchý chov v laboratórnych podmienkach. Je vhodné ju využiť napríklad na morfológické, vývojové, ekologické, biochemické či fyziologické štúdie. Môžeme ju nájsť tam, kde sa nachádzajú lipové stromy z čeľade Tiliaceae (Lipovité) a rastliny z čeľade Malvaceae (Slezovité) napríklad v parkoch či zmiešaných lesoch. Lipové semená sú hlavným zdrojom jej potravy. Avšak jej potravou môžu byť aj semená alebo časti rastlín z čeľadí Betulaceae (Brezovité), Cupressaceae (Cyprusovité), Fagaceae (Bukovité) a iných. Príležitostne sa živí aj saním na mŕtvom hmyze či hmyzích vajíčkach. Jednoduchý zber zabezpečuje výskyt jedincov v zhlukoch napr. na kmeňoch stromov. Tieto zhľuky tvoria vďaka vzhľadovej príťažlivosti a chemickým stimulom, ale prispieť k tendencii zhľukovania môžu aj rôzne abiotické faktory ako teplota alebo vzdušná vlhkosť (Socha, 1993; Kristenová a kol., 2011). Menšie zhľuky na kmeňoch líp môže vytvárať aj v zime za slnečných dní (Rozsypal a Košťál, 2018).

Životný cyklus cifruše bezkrídlej môžeme rozdeliť do 4-tich fází: reprodukčná aktivita (jar, skoré leto), indukcia reprodukčnej diapauzy (vrchol leta), udržiavanie reprodukčnej diapauzy (neskoré leto, skorá zima) a kviescencia (zima, skorá jar). Dôležitou súčasťou životného cyklu je teda reprodukčná diapauza, ktorá zvyšuje chladovú odolnosť a kapacitu podchladenia. Nastáva pri nej sezónne zastavenie reprodukcie a spúšťačom sú skrátenie fotoperiód, nízka teplota prostredia a vysoká hustota populácie, ktoré ovplyvňujú neurohumorálny systém (Košťál a Šimek, 2000). Donedávna sa myslelo, že cifruša bezkrídla využíva iba stratégiu podchladenia (vyhýba sa zmrznutiu). Pri zohľadnení prostredia v ktorom jedince prežívajú zimu (opadané lístie), kde je pomerne vysoká vlhkosť, mierne podnulové teploty a prítomnosť

ľadu a nastáva riziko inokulácie týmto okolitým ľadom. Inokulácia nastáva pri teplotách nad  $-3^{\circ}\text{C}$ , čo je vysoko v porovnaní s bodom podchladenia ( $-16^{\circ}\text{C}$  až  $-20^{\circ}\text{C}$  v zime). Hmyz po inokulácii vonkajším ľadom bol schopný prežiť, ak objem ľadu neprekročil kritickú hranicu (38,7- 42,8% telesnej vody). Cifruša sa snaží redukovať objem ľadu pod túto hranicu, to hlavne presunom osmoticky aktívnej vody do hemolymfy a zvýšením podielu osmoticky neaktívnej vody v tkanivách (Rozsypal a Košťál, 2018).

Na prezimovanie cifruša bezkrídla sezónne akumuluje kryoprotektanty. Sezónne zvyšuje množstvo voľných aminokyselín (prolín a alanín), ktoré sú vedľajšími produktami degradácie proteínov. Pri nízkych teplotách tiež dochádza k premene glykogénu na polyoly (ribitol a sorbitol), čím sa zvyšuje chladová odolnosť. Dochádza aj k expresii HSP, ktoré majú rolu v opravách poškodení spôsobených chladom a mrazom. Taktiež počas chladovej aklimácie dochádza k remodelácii fosfolipidových membrán (Košťál a Tollarová-Borovanská, 2009; Košťál a kol., 2011a).

## **2. Ciele**

- 1) Preskúmať vplyv rôznych scenárov „teplých zím“ simulovaných v laboratóriu a skutočných zím na prežitie a chladovú odolnosť cifruše bezkrídlej.
- 2) Posúdiť vplyv rôznych simulovaných a skutočných zím na spotrebu energetických rezerv.

### 3. Materiál a metodika

#### 3.1. Zber cifruší a dizajn pokusu

Cifruše boli nazbierané začiatkom októbra v Českých Budějoviciach v parku Stromovka (Obr. 1). Bola využitá situácia, kedy sa počas slnečných jesenných dní veľké množstvo jedincov v zhlukoch vyhrieva na kmeňoch líp.



**Obr. 1. Zber jedincov pre pokus.** Vľavo cifruše sliace sa na kmeni lipy. Vpravo nazbierané cifruše pred rozdelením do skupín

Cifruše boli z kôry stromov zbierané pomocou jemnej metličky a lopatky a následne presypané do plastovej nádoby s perforovaným viečkom, naplnené lipovými listami. Po krátkom transporte do laboratória boli cifruše rozdelené do skupín po 100 jedincoch tak, aby každá skupina obsahovala 50 samíc a 50 samcov. Každý zimný scenár (vid' nižšie) zahrňoval 7 opakovaní (skupín), teda 700 jedincov, s výnimkou vonkajšej expozície, kde bolo iba 5 opakovaní (500 jedincov). Dve skupiny navyše v laboratórnych simuláciách boli postupne využité pre priebežné sledovanie prežitia a fyziologických parametrov chladovej odolnosti (koniec simulovanej jesene a koniec simulovanej zimy). Vonkajšia expozícia prebiehala v drevených kontajneroch (Obr. 2) so sieťovaným vekom a dnom naplneným do  $\frac{3}{4}$  suchými lipovými listami, a tiež lipovými semenkami (potrava). Pomocou datalogerov boli zaznamenávané klimatické podmienky (teplota, relatívna vlhkosť a snehová pokrývka) v mieste vonkajšej expozície.





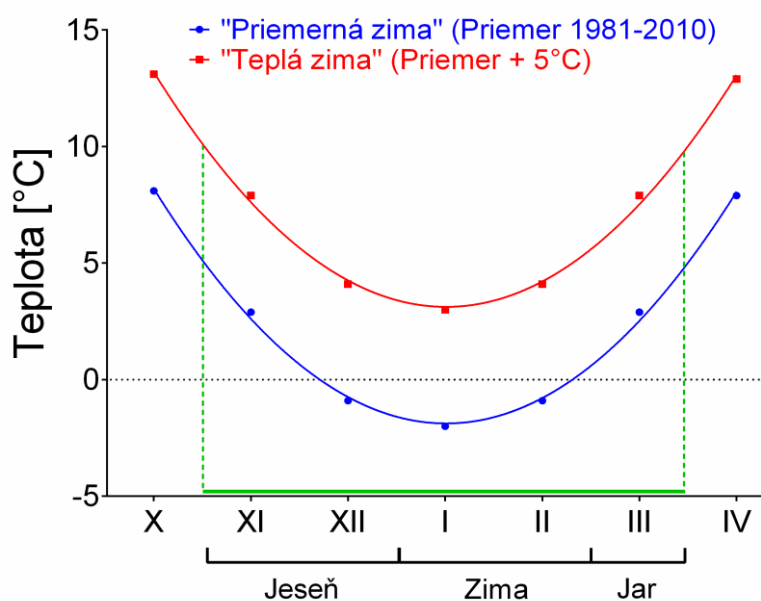
**Obr. 2. Vonkajšia expozícia.** Vľavo stav na začiatku pokusu. Vpravo snehová pokrývka počas pokusu.

Cifruše vystavené simulovaným zimám v inkubátoroch boli umiestené v sklenených nádobách o objeme 500 ml so sieťovaným viečkom (Obr. 3). Nádoby obsahovali lignocel (stelivo z kokosových vlákien), lipové semienka, zložený filtračný papier a napájadlo (plastová tubička s vatovou zátkou naplnená vodou). Napájadlá boli menené týždenne s výnimkou najchladnejších častí simulácie, kedy teplota klesla pod 0°C a voda v napájadlách zmrzla. Relatívna vlhkosť v inkubátoroch bola udržiavaná pomocou nádob s destilovanou vodou a zloženým filtračným papierom (zväčšenie povrchu a tým evaporácie). Simulácie prebiehali od októbra do marca (5 mesiacov) v programovateľných inkubátoroch Sanyo MIR-154 (Sanyo Electric, Osaka, Japonsko).



**Obr. 3. Expozície simulovaných zim v inkubátoroch.**

Simulácie (Obr. 4) boli rozdelené na tri obdobia - jeseň, zima a jar. Na konci každého obdobia bol urobený odber vzoriek za účelom priebežného sledovania prežitia a zmien vo fyziológii a biochémii. Pred vlastným pokusom bol urobený predbežný screening (urobil môj školiteľ pred mojím zapojením do pokusu), na základe jeho výsledkov boli vybrané pre detailnejšie testovanie nasledujúce scenáre: 1) priemerná zima, kde bol teplotný priebeh odvodený od priemerných mesačných teplôt za obdobie 1981 – 2010, získaných od Českého hydrometeorologického ústavu (ČHMÚ), 2) teplá zima, ktorá bola o 5°C teplejšia než priemerná zima; 3) priemerná zima s fluktuáciami, 4) teplá zima s fluktuáciami. Simulované oteplenie o 5°C bolo zvolené na základe horných odhadov modelov stredoeurópskej klímy pre koniec 21. storočia podľa Piatej hodnotiacej správy Medzivládneho panelu pre zmeny klímy (Intergovernmental Panel on Climate Change, IPCC) (IPCC, 2014). Teplota v simuláciách bola menená s týždennou frekvenciou. Účelom fluktuácií bolo simulovať slnenie na kmeňoch stromov a na opadaných listoch (ak nie je sneh), ktoré je možné bežne pozorovať u voľne žijúcej populácie cifruše bezkrídlej za slnečných zimných dní (Rozsypal and Košťál, 2018). Fluktuácie prebiehali s týždennou frekvenciou, kedy behom troch po sebe idúcich dní postupne došlo ku krátkemu zvýšeniu teploty o 5, 10 a 15°C. Každé zvýšenie teploty trvalo 2h a bolo naprogramované medzi 12:00 a 14:00. Zvýšenie teploty behom fluktuácií bolo odhadnuté na základe našich záznamov teploty na kôre stromov (0,5 m nad zemou, orientácia na juh).



**Obr. 4. Simulované zimy.** Obrázok zobrazuje dva základné scenáre: „Priemerná zima“ a „Teplá zima“. Obrázok nezobrazuje scenáre s fluktuáciami. Zelená úsečka vyznačuje simulovanú časť roku. Čierne

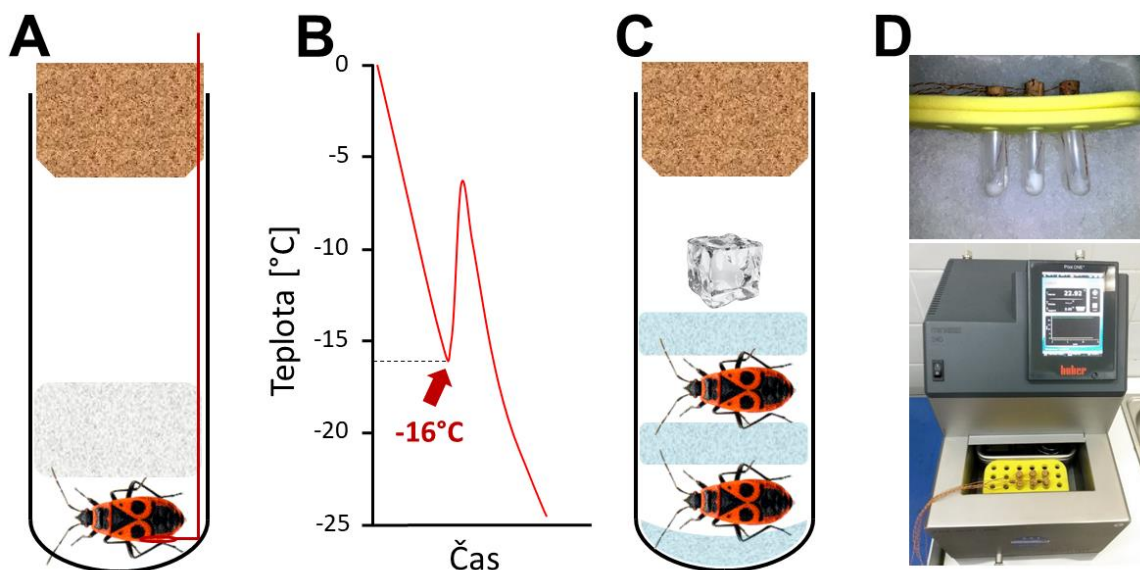
úsečky vyznačujú rozdelenie simulácie na jednotlivé obdobia. Odbery vzoriek a meranie fyziologických parametrov prebiehalo na začiatku simulácie a následne vždy na konci jednotlivých období.

### **3.2. Analýza prežitia a fyziologické parametre chladovej odolnosti**

Prežitie bolo posúdené koncom simulovanej jesene a zimy, vždy u jednej skupiny cifruší ( $n = 100$ ). Celkové prežitie bolo vyhodnotené na konci pokusu (v priebehu simulovanej jari) u zostávajúcich piatich skupín cifruší ( $n = 5 \times 100$ ). Jedince boli premiestnené do  $25^{\circ}\text{C}$  a prežitie bolo posudzované na základe schopnosti koordinovaného pohybu.

Ako jeden z ukazovateľov chladovej odolnosti bol meraný bod podchladenia. Meranie bolo urobené vždy u 20 jedincov (10 samíc, 10 samcov), okrem skupiny TZ+F na konci pokusu (jar), kde bol počet opakovaní 14 (7 samíc, 7 samcov) z dôvodu nízkeho prežitia. Jednotlivé cifruše boli najskôr umiestené do skúmaviek, na ich dne boli konce termočlánkov (Obr. 5A). Cifruše boli potom znehybnené jemným stlačením kúskom suchej buničiny na dno skúmavky, tak aby boli v priamom kontakte s termočlánkom. Skúmavky s cifrušami boli umiestené do programovateľného termostatu Ministat 240-cc (Huber). Rýchlosť poklesu teploty bola štandardná  $1^{\circ}\text{C} / \text{min}$ . Teplota bola zaznamenávaná pomocou datalogeru, ku ktorému boli pripojené termočlánky. Bod podchladenia (Obr. 5B) bol určený ako najnižšia dosiahnutá teplota pred uvoľnením skupenského tepla mrznutia, čo sa prejaví ako dočasné zvýšenie teploty.

Ako ďalší ukazovateľ chladovej odolnosti bola posudzovaná schopnosť prežitia v zmrznutom stave po inokulácii okolitým ľadom (Obr. 5C, D). Inokulatívne mrznutie bolo urobené podľa protokolu popísaného v článku Rozsypal a Košťál (2018). Test bol urobený vždy u 20 jedincov (10 samíc, 10 samcov) z každej skupiny a časti simulácie. Cifruše boli umiestené do plastových skúmaviek, preložené navlhčenými kúskami buničiny (päť jedincov na skúmavku). Mrznutie bolo stimulované pridaním malého kúsku ľadu. Skúmavky s cifrušami boli následne premiestnené do programovateľného termostatu, predchladeného na  $0^{\circ}\text{C}$ . Všetky manipulácie pred premiestnením do termostatu boli robené na ľade ( $0^{\circ}\text{C}$ ). Chladiaci program pozostával zo štyroch krokov: 1) udržiavať  $0^{\circ}\text{C}$  1 min., 2) chladiť na  $-2,5^{\circ}\text{C}$  rýchlosťou  $0,05^{\circ}\text{C} / \text{min}$ ., udržiavať  $-2,5^{\circ}\text{C}$  24 h, a 4) ohriať na  $5^{\circ}\text{C}$  rýchlosťou  $0,5^{\circ}\text{C} / \text{min}$ . Po ukončení programu boli cifruše rozdelené na páry (samec a samica) a umiestené do plastových Petriho misiek a bola im poskytnutá potrava (lipové semená) a napájadlo vo forme malej skúmavky s vatovou zátkou naplnené vodou. Cifruše boli považované za preživšie, keď boli schopné produkovať životaschopné vajíčka.



**Obr. 5. Bod podchladenia a tolerancia zmrznutia.** A) Schéma merania bodu podchladenia. Meranie prebieha „na sucho“, kedy je cifruša znehybnená jemným pritlačením na dno skúmavky kúskom suchej buničiny. Teplota je meraná pomocou termočlánku (červená čiara s očkom). B) Bod podchladenia je zaznamenaný ako najnižšia dosiahnutá teplota pred uvoľnením skupenského tepla mrznutia, ktoré sa prejaví ako dočasné zvýšenie teploty (šípka). C) Schéma testu prežitia v zmrznutom stave. Cifruša je položená na navlhčený kúsok buničiny a prikrytá ďalším kúskom navlhčenej buničiny. Mrznutie je stimulované pridaním malého kúsku ľadu. D) Fotografia usporiadania pri meraní bodu podchladenia (usporiadanie pri teste prežitia v zmrznutom stave bolo takmer identické) a umiestenie skúmaviek v programovateľnom termostate.

Čerstvá hmotnosť, obsah vody a sušiny bola stanovená u rovnakých jedincov, u ktorých bol predtým zmeraný bod podchladenia ( $n = 14$  až  $20$ ). Ihneď po meraní SCP boli cifruše premiestnené do predvážených plastových skúmaviek s viečkom o objeme  $1,5$  ml (Eppendorf) a zvážené (čerstvá hmotnosť = hmotnosť cifruše a skúmavky – hmotnosť prázdnej skúmavky). Cifruše v otvorených skúmavkách boli následne sušené pri  $60^{\circ}\text{C}$  na dobu  $72$  h (alebo do dosiahnutia konštantnej hmotnosti) a znova zvážené (suchá hmotnosť = hmotnosť suchej cifruše a skúmavky – hmotnosť prázdnej skúmavky). Obsah vody (hydratácia) bola potom spočítaná ako rozdiel medzi živou a suchou hmotnosťou. K váženiu boli použité analytické váhy Sartorius BA110S s presnosťou na 4 desatinné miesta ( $0,1$  mg).

### 3.3. Extrakcia a stanovenie celkových lipidov

Pre extrakciu a stanovenie celkových lipidov vo vzorkách cifruší boli použité upravené metódy podľa Folch a kol. (1957) a Gessner a Neumann (2005). Obsah glykogénu bol

stanovený vždy u 10 jedincov (5 samíc, 5 samcov), s výnimkou TZ+F jar (n = 6; 3 samice, 3 samci).

#### Použité reagensy:

- extrakčné médium (roztok chloroformu a metanolu v pomere 2 : 1)
- 0,9% NaCl
- chloroform
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (koncentrovaná)
- vanilínový reagent (668 ml 80% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> + 1,98 g vanilínu + doplniť do 1000 ml dest. vodou)
- kyselina olejová

#### Postup:

Zvážené cifruše boli jednotlivo dané do skúmaviek o objeme 1,5 ml (Eppendorf). Ku vzorke bolo pridané 350 µl extrakčného média a vzorka bola rozstrihaná na malé kúsky a homogenizovaná pomocou piestového homogenizátoru. Po centrifugácii bol odpipetovaný supernatant a vzorka bola ešte dvakrát znovu homogenizovaná v 350 µl extrakčného média. Ku kombinovanému supernatantu 1+2+3 bolo pridané 210 µl 0,9% NaCl. Po pretrepaní a centrifugácii bola do sklenenej vialky o objeme 2 ml kvantitatívne odobraná spodná organická fáza. Následne bolo pod prúdom dusíka odparené rozpúšťadlo a vzorka bola znovu rozpustená v 1 ml chloroformu. Alikvot o objeme 10 µl bol prepipetovaný do 5 ml sklenenej skúmavky a chloroform bol odparený zahriatím na 60°C. Po odparení chloroformu bolo pridané 200 µl koncentrovanej H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a skúmavky boli inkubované pri 95°C po dobu 10 minút. Po ochladnutí bolo pridané 2,5 ml vanilínového reagentu. Po 60 minútovej inkubácii bola zmeraná absorbancia pri 528 nm a nameraná hodnota bola porovnaná s kalibračnou krivkou kyseliny olejovej. Obsah lipidov bol potom vyjadrený v µg na mg živej hmotnosti.

#### Princíp metódy:

Samotný princíp metódy a prebiehajúcej reakcie sú pomerne zložité. Pozitívny výsledok vyžaduje prítomnosť dvojitých väzieb alebo voľných hydroxylových skupín v molekulách analyzovaných lipidov. Reakcia zrejme zahŕňa vznik relatívne stabilných karboniových iónov, ktoré následne reagujú s vanilínom, čo sa prejaví sfarbením s vrcholom absorbancie pri 528 nm (Gessner a Neumann, 2005).



### 3.4. Extrakcia a stanovenie glykogénu

Pre extrakciu a stanovenie obsahu glykogénu vo vzorkách cifruší boli použité upravené metódy podľa Bueding a Orrell (1964) a Dubois a kol. (1956). Obsah glykogénu bol stanovený vždy u 10 jedincov (5 samíc, 5 samcov), s výnimkou TZ+F jar (n = 6; 3 samice, 3 samci).

#### Použité reagensy:

- etanol (70%, 80%, 99,8% - absolútny)
- 30% roztok KOH
- 10% roztok Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (koncentrovaná)
- 5% roztok fenolu (vo vode)
- glykogén (Glycogen from oyster, Fluka)

#### Postup:

Zvážené cifruše boli jednotlivo dané do skúmaviek o objeme 1,5 ml (Eppendorf). Ku vzorke bolo pridané 400 µl 80% etanolu a vzorka bola rozstrihaná na malé kúsky a následne homogenizovaná pomocou piestového homogenizátoru. Po centrifugácii bol odpipetovaný supernatant a vzorka bola znovu homogenizovaná v 400 µl 80% etanolu. Najskôr teda boli zo vzorky do etanolu extrahované nízkomolekulárne látky, ako mono- a disacharidy, polyoly a voľné aminokyseliny a vo vzorke teoreticky zostal iba glykogén. Sušením po dobu ca. 15 minút pri 60°C bol zo vzorky odstránený zostávajúci etanol. Potom bolo ku vzorke pridané 200 µl destilovanej vody a 1,1 ml 30% KOH. Vzorka bola potom inkubovaná pri 95°C po dobu 30 minút (rozloženie tkanív a uvoľnenie glykogénu). Po centrifugácii bolo zo vzorky odobrané do novej 1,5 ml skúmavky (Eppendorf) 250 µl infranatanu. Následne bolo k odobranému infranatanu pridané 125 µl 10% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 750 µl absolútneho ethanolu a potom nasledovala inkubácia na ľade po dobu 60 minút (vyzrážanie glykogénu). Po centrifugácii bola zo vzorky odstránená všetka kvapalina, zvyšná peleta (extrahovaný glykogén) bola dvakrát opláchnutá 500 µl 70% ethanolom a následne usušená pri 60°C. Potom bola peleta rozpustená v 500 µl destilovanej vody. 100 µl vzorka bola prepipetovaná do sklenenej skúmavky o objeme 5 ml. Ku vzorke bolo pridané 200 µl 5% fenolu a 1 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a vzorka bola následne inkubovaná pri 95°C po dobu 20 min. Po 30 minútach chladnutia bola zmeraná absorbancia pri 490 nm a nameraná hodnota bola porovnaná s kalibračnou krivkou glykogénového štandardu. Obsah glykogénu bol potom vyjadrený v µg na mg živej hmotnosti.

### Princíp metódy:

Princípom samotnej metódy je rozštiepenie (hydrolýza) glykogénu v prítomnosti kyseliny na jednotlivé molekuly glukózy. Molekuly glukózy sú v kyslom prostredí dehydratované za vzniku hydroxymethylfurfuralu. Ten reaguje s fenolom, čo sa prejaví sfarbením s vrcholom absorbančie pri 490 nm (Dubois a kol., 1956).

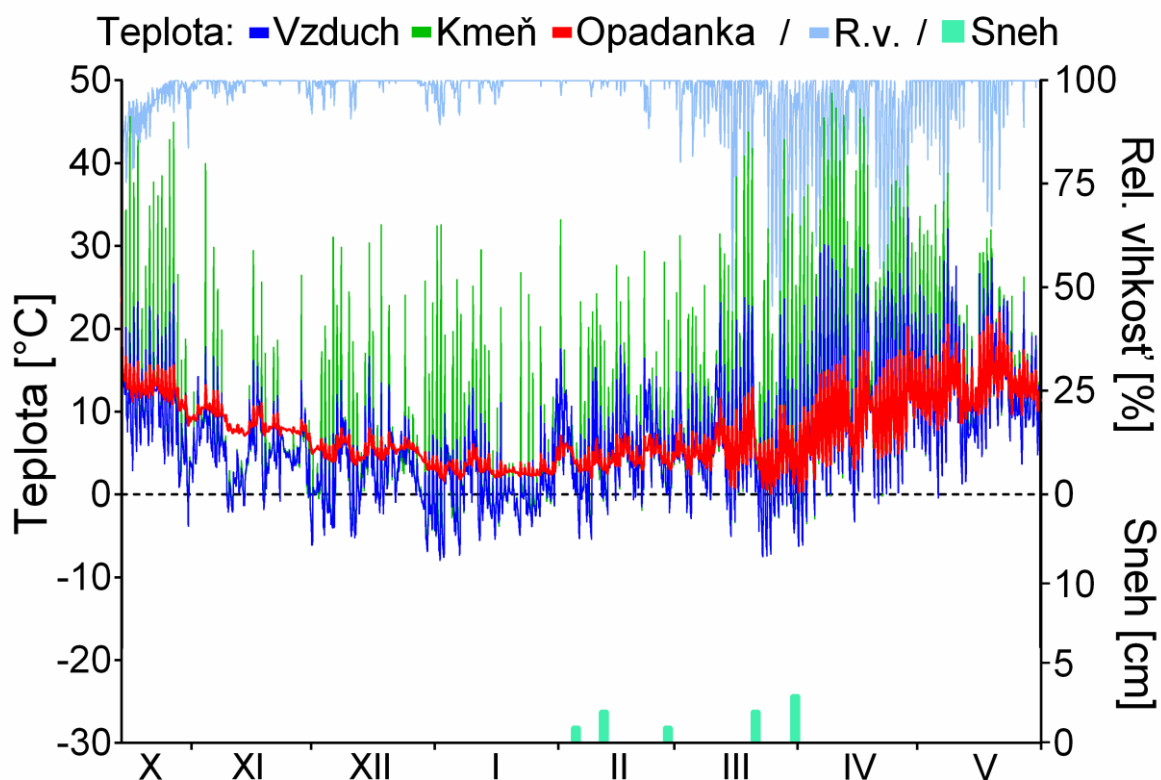
### **3.5. Spracovanie výsledkov**

Získané dáta boli analyzované v programe Prism v6.0 (Graphpad Software, San Diego, USA). Pre porovnanie vplyvu rôznych zím na sledované parametre bola použitá jednocestná ANOVA s Tukeyho post-hoc testom na 5 % hladine významnosti. Pretože neboli zistené štatisticky významné rozdiely medzi pohlaviami v žiadnom zo sledovaných parametrov, boli samci a samice analyzované spoločne.

## 4. Výsledky

### 4.1. Klimatické podmienky v zime 2019/2020

Obrázok 6 ukazuje klimatické dáta zo stanovišťa, kde prebiehala vonkajšia expozícia. Namerané dáta pochádzajú z plochy ca. 3 m<sup>2</sup>. Z obrázku je zjavný výrazný rozdiel medzi teplotou vzduchu, teplotou na južnej strane kmeňa a teplotou v opadaných listoch (opadanke). Teplota v opadanke, ktorá je prirodzeným mikrohabitatom pre prezimovanie nielen cifruší, neklesá zďaleka tak nízko ako teplota vzduchu a tiež výkyvy teplôt sú nižšie (jedná sa o teplotne pufované prostredie). Relatívna vlhkosť v opadanke bola po celú dobu sledovania veľmi vysoká a klesala iba behom teplejších období. Snehová pokrývka bola nízka a vyskytovala sa skôr sporadicky. Celkovo bola zima 2019/2020 jedna z teplejších a teploty v opadanke sa pohybovali v rozmedzí medzi simulovanou „priemernou“ a „teplou“ zimou.

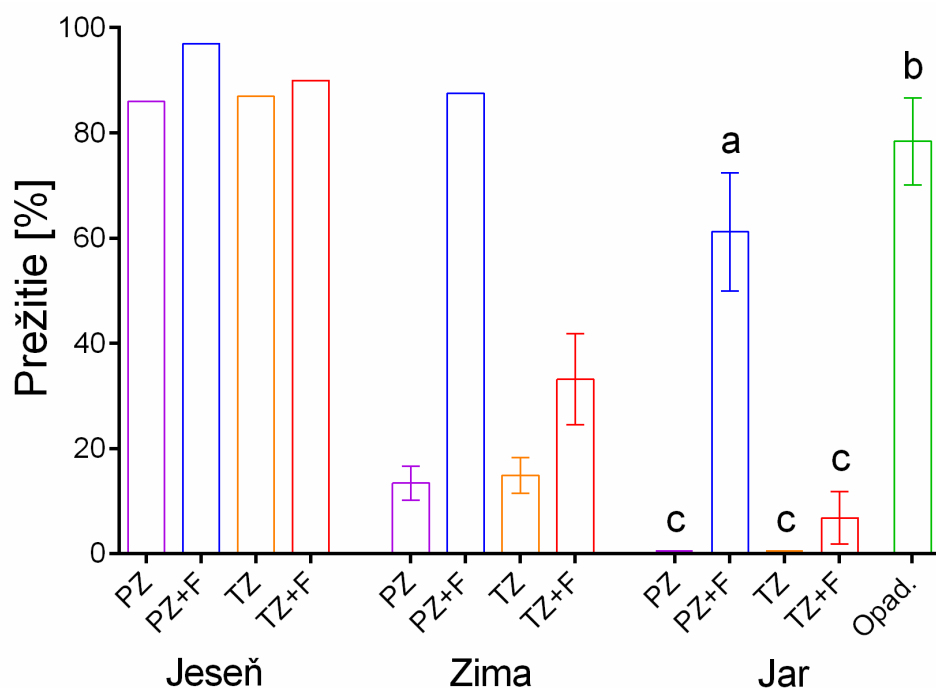


**Obr. 6. Klimatické podmienky v zime 2019/2020.** Klimatické podmienky v mieste vonkajšej expozície. Tmavo modrá: teplota vzduchu 2 m nad zemou v tieni; zelená: teplota na južnej strane kmeňa, 0,5 m nad zemou (miesto kde sa cifruše za slnečných zimných dní vyhrievajú); červená: teplota v opadanke (typický mikrohabitat cifruší pre prezimovanie, a tiež miesto vonkajšej expozície); svetlo modrá: relatívna vlhkosť (R.v.) v opadanke; tyrkysová: výška snehovej pokrývky.



## 4.2. Prežitie po vystavení rôznym zimám

Obrázok 7 zobrazuje výsledky analýzy prežitia. Dáta prežitia namerané koncom simulovanej jesene a zimy nebolo možné štatisticky hodnotiť, kvôli nízkemu počtu opakovaní. Tieto dáta teda slúžia k ilustrácii, ako sa behom simulovanej zimy menilo prežitie v jednotlivých skupinách. Finálna analýza celkového prežitia, ktorá bola urobená behom simulovanej (a tiež skutočnej) jari na konci pokusu, potom ukazuje výrazné rozdiely medzi jednotlivými scenármi. Žiadna z cifruší vystavených scenárom simulujúcim priemernú (PZ) a teplú (TZ) zimu neprežila až do konca pokusu. Naproti tomu cifruše vystavené priemernej zime s fluktuáciami simulujúcimi slnenie (PZ+F) prežili výrazne lepšie (61,2 %) a priblížili sa tak prežitiu cifruší vystavených poloprirodzeným podmienkam vonku v opadanke (Opad.; 78,4 %). Fluktuácie mali pozitívny vplyv na prežitie i v prípade simulovanej teplej zimy (TZ+F), ale prežitie v tejto skupine (6,8 %) bolo, v porovnaní s priemernou zimou s fluktuáciami či s vonkajšou expozíciou, veľmi nízke. Výsledky analýzy prežitia ukazujú na pozitívny vplyv fluktuácií (slnenia) na zimné prežitie cifruší. Naproti tomu je vidieť, že oteplenie o 5°C oproti priemeru („normálu“) má výrazný negatívny dopad na úspešnosť prezimovania.

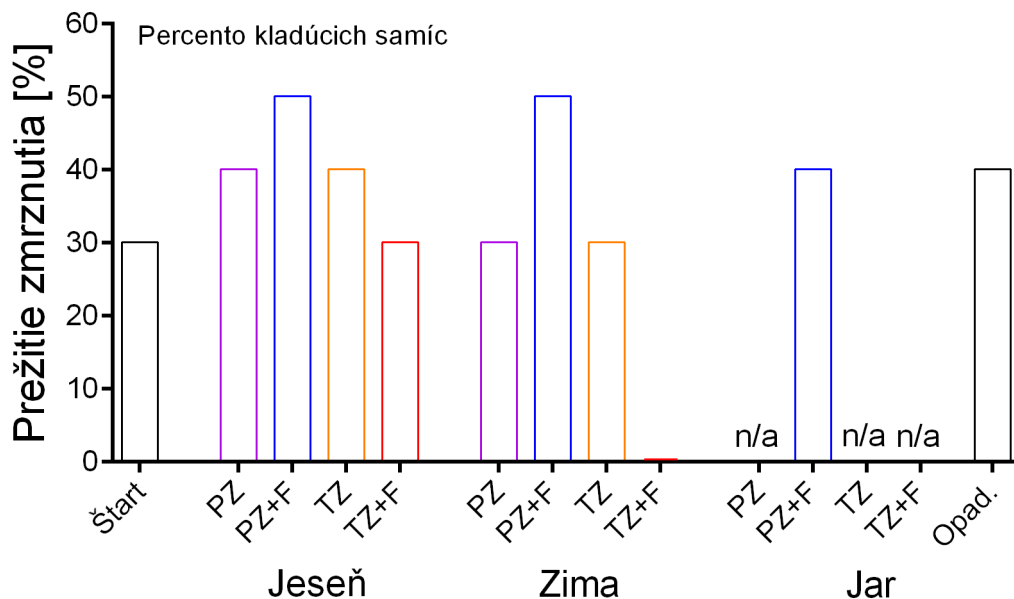


**Obr. 7. Vplyv rôznych scenárov simulovaných zím a vonkajšej expozície na prežitie.** Obrázok zobrazuje priemery a smerodatné odchýlky. Štatisticky významné rozdiely na 5% hladine významnosti sú vyznačené rôznymi písmenami (ANOVA a Tukeyho post-hoc test). Dáta získané koncom simulovanej jesene a zimy neboli štatisticky vyhodnotené, z dôvodu nízkého počtu opakovaní.

### 4.3. Parametre chladovej odolnosti

#### 4.3.1. Tolerancia zmrznutia

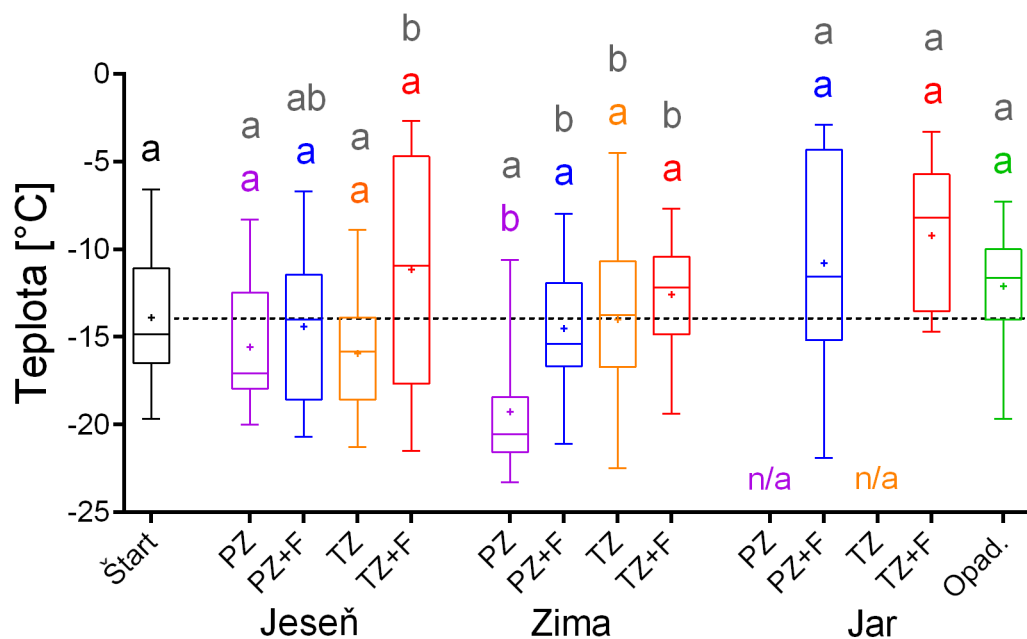
Tolerancia zmrznutia bola posudzovaná ako schopnosť produkcie životaschopných vajíčok po inokulatívnom zmrznutí pri teplote  $-2,5^{\circ}\text{C}$ . Obrázok 8 ukazuje prežitie v zmrznutom stave v rôznych fázach prezimovania. Kvôli značnej náročnosti pokusu bolo urobené iba jedno opakovanie, takže získané dáta nebolo možné štatisticky hodnotiť. Dáta ukazujú možný deaklimačný efekt teplej zimy v spojení s fluktuáciami, kedy koncom simulovanej zimy zmrznutie neprežil žiadny jedinec (TZ+F, zima).



**Obr. 8. Prežitie v zmrznutom stave.** Každý stĺpec ukazuje jednu hodnotu. Z dôvodu absencie opakovaní nebola urobená štatistická analýza. n/a = dáta nie sú dostupné z dôvodu nízkeho prežitia a nedostatku jedincov pre analýzu.

#### 4.3.2. Bod podchladenia

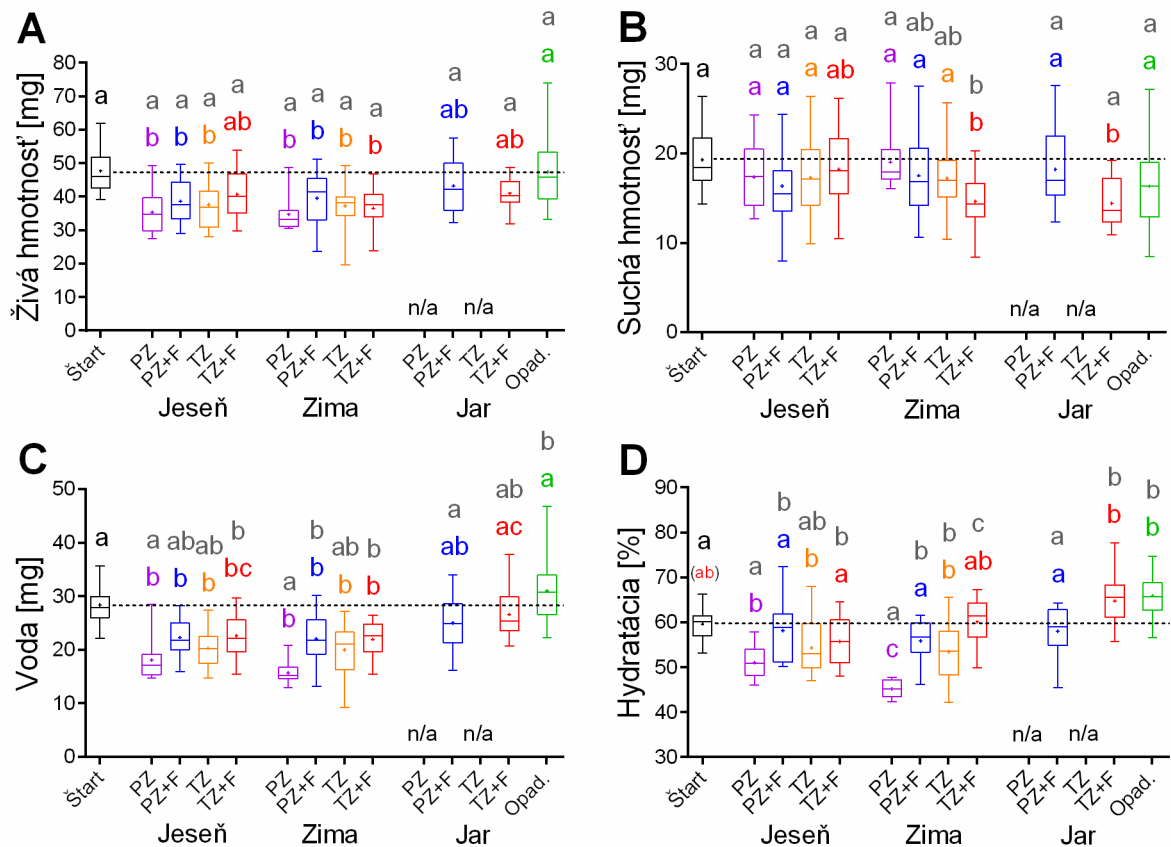
Bod podchladenia (Obr. 9) vykazoval pomerne veľký rozptyl hodnôt a v priebehu simulácie sa v rámci skupín i medzi skupinami štatisticky príliš nemenil. V skupine vystavenej teplej zime s fluktuáciami (TZ+F) boli hodnoty bodu podchladenia vyššie než v ostatných skupinách. Zmienovaný rozdiel ale väčšinou nebol štatisticky významný. Najvýraznejšiu zmenu vykazovali jedince vystavené priemernej zime v zimnej časti simulácie (PZ, zima), kedy ich bod podchladenia významne klesol a priemerom sa tesne priblížil  $-20^{\circ}\text{C}$ . S príchodom jari vykazoval bod podchladenia u všetkých preživších skupín stúpajúci trend.



**Obr. 9. Bod podchladenia.** Obrázok ukazuje mediány (vodorovné čiary), priemery (krížiky), minimá a maximá. Vodorovná čiarkovaná čiara vyznačuje počiatočnú priemernú hodnotu („štart“). Štatisticky významné rozdiely na 5% hladine významnosti sú vyznačené rôznymi písmenami (ANOVA a Tukeyho post-hoc test). Farebné písmená značia sezónne zmeny v rámci jednotlivých skupín (vrátane začiatočného stavu, „štart“) naprieč celou simuláciou zimy. Šedé písmená značia rozdiely medzi skupinami v rámci jednotlivých období simulácie. n/a = dáta nie sú dostupné z dôvodu nízkeho či nulového prežitia a teda nedostatku jedincov pre analýzu.

#### 4.3.3. Hmotnosť a obsah vody

Priemerná živá hmotnosť cifruší bola na začiatku pokusu tesne pod 50 mg (Obr. 10A). V priebehu jesene cifruše časť svojej hmotnosti stratili, a na podobných hodnotách zostali i behom zimnej časti simulácie. V priebehu jari bol zaznamenaný mierny trend návratu k pôvodnej hmotnosti ako na začiatku pokusu. Suchá hmotnosť (obsah sušiny) sa v priebehu simulácie príliš nemenila, s výnimkou skupiny vystavenej teplej zime s fluktuáciami (TZ+F), u nej došlo k štatisticky významnému poklesu počas zimy a na jar (Obr. 10B). Priemerný obsah vody v priebehu jesene poklesol takmer u všetkých skupín a na podobných hodnotách zostal i počas zimy. K významnejšiemu zvýšeniu obsahu vody došlo s príchodom jari (Obr. 10C, D). K najvýraznejšej strate vody došlo u skupiny vystavenej najchladnejším podmienkam, teda priemernej zime (PZ), ale nižšiu hydratáciu vykazovali i cifruše vystavené teplej zime (TZ).

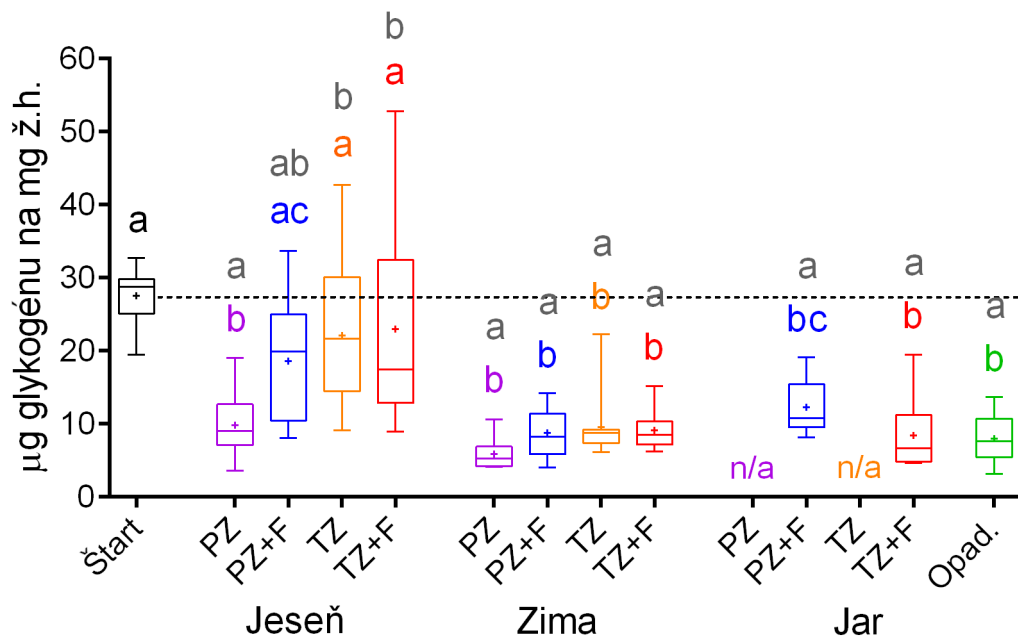


**Obr. 10. Hmotnosti a obsah vody.** Živá hmotnosť (A), suchá hmotnosť (B), obsah vody (C) a hydratácia (D). Obrázok ukazuje mediány (vodorovné čiary), priemery (križičky), minimá a maximá. Vodorovné čiarkované čiary vyznačujú počiatočné priemerné hodnoty („štart“). Štatisticky významné rozdiely na 5% hladine významnosti sú vyznačené rôznymi písmenami (ANOVA a Tukeyho post-hoc test). Farebné písmená značia sezónne zmeny v rámci jednotlivých skupín (vrátane začiatkového stavu, „štart“) počas celej simulácie zimy. Šedé písmená značia rozdiely medzi skupinami v rámci jednotlivých období simulácie. n/a = dáta nie sú dostupné z dôvodu nízkeho či nulového prežitia a teda nedostatku jedincov pro analýzu.

## 4.4. Energetické rezervy

### 4.4.1. Glykogén

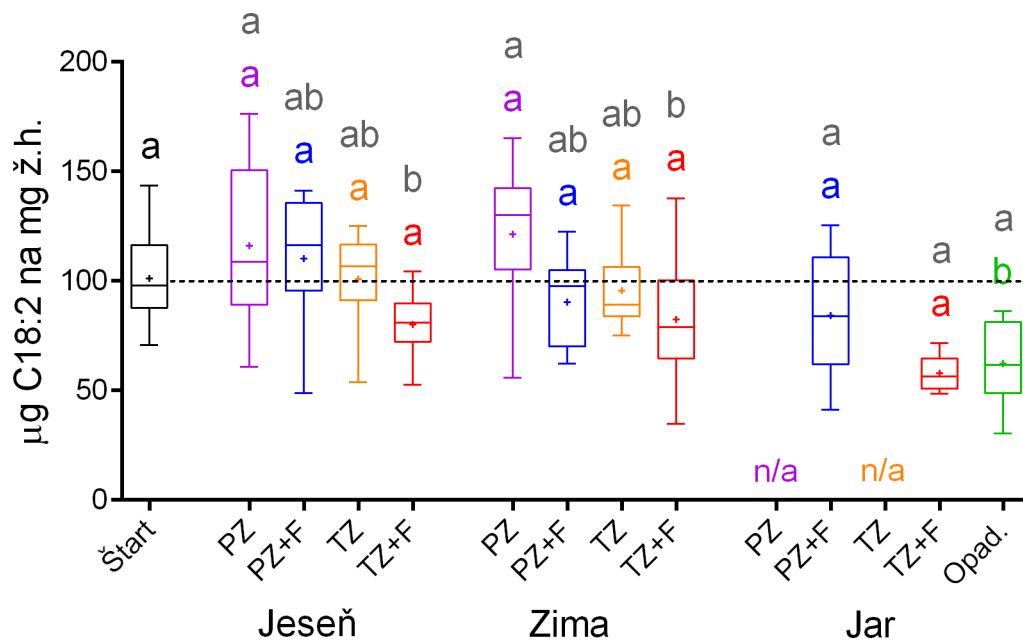
Obsah glykogénu (Obr. 11) bol, v porovnaní so začiatkovým stavom (štart; 28  $\mu\text{g} / \text{mg}$  živej hmotnosti), nižší vo všetkých častiach simulovanej zimy. Najväčšie rozdiely medzi skupinami boli zaznamenané na jeseň. K najprudšiemu úbytku zásob glykogénu oproti začiatku došlo na jeseň u skupiny vystavenej scenáru priemernej zimy (PZ, jeseň). Tento pokles môže súvisieť s vystavením nižším teplotám, oproti ostatným scenárom. V ďalších častiach simulovanej zimy (zima a jar) sa obsah glykogénu vyrovnal a medzi skupinami už neboli výrazné rozdiely.



**Obr. 11. Glykogén.** Obsah glykogénu v  $\mu\text{g}$  na  $\text{mg}$  živej hmotnosti (ž.h.). Obrázok ukazuje mediány (vodorovné čiary), priemery (krížiky), minimá a maximá. Vodorovná čiarkovaná čiara vyznačuje začiatočnú priemernú hodnotu („štart“). Štatisticky významné rozdiely na 5% hladine významnosti sú vyznačené rôznymi písmenami (ANOVA a Tukeyho post-hoc test). Farebné písmená značia sezónne zmeny v rámci jednotlivých skupín (vrátane začiatočného stavu, „štart“) naprieč celou simuláciou zimy. Šedé písmená značia rozdiely medzi skupinami v rámci jednotlivých období simulácie. n/a = dáta nie sú dostupné z dôvodu nízkeho či nulového prežitia a teda nedostatku jedincov pre analýzu.

#### 4.4.2. Lipidy

Obsah lipidov (Obr. 12) bol na začiatku pokusu (štart) okolo  $100 \mu\text{g} / \text{mg}$  živej hmotnosti. S postupujúcou zimou dochádzalo k miernemu poklesu zásob lipidov, i keď tento pokles nebol štatisticky významný. V jesennej a zimnej časti simulácie boli zaznamenané najväčšie rozdiely medzi skupinami. Čím bol scenár teplejší, tým bol väčší pokles zásob lipidov. Na jar neboli rozdiely v obsahu lipidov medzi skupinami štatisticky významné a v tomto období boli tiež zaznamenané najnižšie zásoby lipidov.



**Obr. 12. Lipidy.** Obsah celkových lipidov v  $\mu\text{g}$  na  $\text{mg}$  živej hmotnosti (ž.h.). Obrázok ukazuje mediány (vodorovné čiary), priemery (krížiky), minimá a maximá. Vodorovná čiarkovaná čiara vyznačuje začiatočnú priemernú hodnotu („štart“). Štatisticky významné rozdiely na 5% hladine významnosti sú vyznačené rôznymi písmenami (ANOVA a Tukeyho post-hoc test). Farebné písmená značia sezónne zmeny v rámci jednotlivých skupín (vrátane začiatočného stavu, „štart“) naprieč celou simuláciou zimy. Šedé písmená značia rozdiely medzi skupinami v rámci jednotlivých období simulácie. n/a = dáta nie sú dostupné z dôvodu nízkeho či nulového prežitia a teda nedostatku jedincov pre analýzu.

## 5. Diskusia

Výsledky tejto štúdie priniesli niekoľko zaujímavých zistení: 1) Cifruše vystavené scenárom bez fluktuácií neprežili do jari. 2) Vysoká mortalita bola zaznamenaná i u skupín vystavených scenárom „teplých zím“. 3) Rôzne scenáre mali iba malý či zanedbateľný vplyv na chladovú odolnosť a spotrebu energetických rezerv. 4) Výraznejší bol vplyv na hydratáciu u niektorých scenárov.

Hlavnou príčinou vysokej mortality na jar u skupín vystavenej priemernej zime (PZ) a teplej zime (TZ) bola zrejme absencia fluktuácií. Cifruše v prirodzenom prostredí počas zimných slnečných dní vyliezajú a slnia sa, ako bolo spomenuté v úvode. Slnenie pre hmyz zďaleka nie je neznáme (Hocking and Sharplin, 1965; Porter, 1982; Danks, 2004). Väčšinou ide o slnenie vo vegetačnej sezónne, ktoré primárne hmyzu zvyšuje motorickú aktivitu. U niektorých iných druhov hmyzu môžeme zaznamenať striedanie období dormancie a období zvýšenej metabolickej aktivity počas prezimovania. Tieto aktívnejšie periódy môžu slúžiť ku koordinácii energetického metabolizmu a k zníženiu oxidatívneho stresu (Chen a kol., 2021), ale nedochádza pri nich k takému zvýšeniu teploty ako pri slnení. Ak to vezmeme s miernym zveličením môžeme prirovnať krátkodobé zvýšenie teploty u cifruší k striedaniu období hypotermie a eutermie u hibernujúcich cicavcov (Pengelley and Fisher, 1961; Geiser a kol., 1990). Avšak ani u cicavcov nie je celkom objasnený význam periódy eutermie, ale existuje niekoľko hypotéz. Okrem zdanlivo paradoxnej potreby spánku (Daan a kol., 1991) môže byť dôvodom taktiež hospodárenie s energetickými rezervami (Galster a Morrison, 1975), aktivácia imunitnej reakcie (Prendergast a kol., 2002), či aktivácia mechanizmov na opravu poškodení vzniknutých za relatívne nízkych teplôt počas období hypotermie (Schwartz a kol., 2013). V poslednom desaťročí je vo hmyzej fyziológii veľmi študovaný vplyv tzv. "fluktuujúcich teplotných režimov" (fluctuating thermal regimes, FTR). Tieto fluktuácie bývajú úplne umelo vytvorené a sú študované takmer výlučne v laboratórnom prostredí. Bolo však preukázané, že FTR významne zvyšujú prežitie za nízkych priemerných teplôt, oproti vystaveniu rovnakej priemernej konštantnej teplote. Hlavným predpokladaným mechanizmom pôsobenia FTR je aktivácia reparačných mechanizmov počas teplých období (Colinet a kol., 2015). U slniacich sa cifruší nepochybne dochádza k značnému zvýšeniu telesnej teploty a aj rýchlosti metabolizmu. Podobne ako u hibernujúcich cicavcov (či u FTR) sa môžu aktivovať opravné mechanizmy či mechanizmy na udržovanie homeostázy. U simulovaných zím mali fluktuácie podobný efekt ako slnenie v prirodzenom prostredí, preto

bolo zaznamenané i lepšie prežitie u týchto scenárov. Nech je účel slnenia akýkoľvek, bezpochyby má zásadný vplyv na úspešnosť prezimovania.

Ďalšou možnou príčinou vysokej mortality u skupín bez fluktuácií mohla byť strata vody. Podľa získaných dát bola hydratácia u týchto skupín (TZ a PZ) na konci simulovanej zimy najnižšia. Aj keď nebol u skupiny TZ rozdiel štatisticky významný, mohol byť významný fyziologicky a mohol prispieť k vysokej mortalite na jar. Nemožno teda vylúčiť, že cifruše slnenie využívajú aj na doplnenie vody, ak je k dispozícii. Pitie u cifruší nebolo síce priamo sledované, ale mohlo prispieť k vyššiemu prežitiu u skupín vystaveným scenárom s fluktuáciami.

Pomerne výrazný negatívny dopad na prežitie malo i zvýšenie teploty o 5°C oproti „normálnej zime“ (priemer 1981-2010), a to u scenára TZ+F v porovnaní s PZ+F. Ako najvýznamnejší negatívny vplyv „teplých zím“ na prezimujúci hmyz je uvádzaná zvýšená spotreba energetických rezerv (Sinclair, 2015; Williams a kol., 2015). Zvýšená spotreba energetických rezerv by mohla viesť k ich predčasnému vyčerpaniu a teda by mohla negatívne ovplyvniť zimné prežitie, prípadne znížiť fitness v nasledujúcej vegetačnej sezóne. Dáta ukazujú mierne zvýšenú spotrebu lipidických rezerv u scenárov teplých zím (TZ a TZ+F). U cifruší zo scenára TZ+F na jar sú dáta porovnateľné s dátami scenára PZ+F, či s expozíciou v poloprirodzených podmienkach vonku. Väčšie rozdiely v zásobách glykogénu boli pozorované iba na jeseň, kedy boli najnižšie u scenáre PZ (najchladnejší scenár), kde bol prítomný glykogén vplyvom najvyššej chladovej aklimácie zrejme konvertovaný na kryoprotektanty (polyoly). Tento nepomer sa s postupujúcou zimou zrovnal a počas zimnej časti simulácie už neboli medzi scenármi významné rozdiely. Hypotézu, že „teplé zimy“ zásadne ovplyvňujú spotrebu energetických rezerv, získané dáta nepotvrdzujú, aspoň nie u modelového druhu cifruše bezkrídlej. Aká bola príčina vysokej mortality u „teplých zím“ zostáva neobjasnená. Možným vysvetlením by mohlo byť napr. zvýšené riziko napadnutia infekciou plesní za zvýšených teplôt a teda aj vyššej vlhkosti. To ale nebolo v rámci tejto štúdie skúmané. Výsledky tejto práce však naznačujú, že zvyšujúce sa zimné teploty v strednej Európe môžu mať v budúcnosti negatívny vplyv na prezimovanie cifruše bezkrídlej.

Obsah sušiny sa u žiadneho scenára štatisticky nelíšil od počiatočného stavu, s výnimkou TZ + F, kde došlo k menšiemu, ale štatisticky významnému poklesu. U tohto scenára boli súčasne zaznamenané aj najnižšie hladiny lipidov, aj keď rozdiely neboli štatisticky významné. Úbytok lipidických rezerv ani úbytok glykogénu však nemôže zďaleka vysvetliť



pozorovaný pokles sušiny. Časť úbytku suchej hmotnosti by snáď mohla vysvetliť zvýšená spotreba zásobných proteínov, ktoré si diapauzné cifruše na zimu vytvárajú (Šula a kol., 1995), tie však neboli v rámci tejto práce merané.

U jednotlivých scenárov nebol zistený výrazný vplyv na chladovú odolnosť (bod podchladenia, prežitie v zmrznutom stave), až na výnimku nižšieho bodu podchladenia u skupiny vystavenej priemernej zime (PZ) v zimnej časti simulácie. To sa dá vysvetliť vyššou chladovou aklimovanosťou, keďže táto skupina bola vystavená najchladnejšiemu scenáru. Dáta tiež ukazujú na možný deaklimačný efekt teplej zimy v spojení s fluktuáciami (najteplejší scenár) v zimnom období simulácie (TZ + F, zima), kedy test tolerancie zmrznutia neprežila žiadna z cifruší.

Výsledky tejto práce jasne ukazujú, že teplé fluktuácie (slnenie) majú významný pozitívny vplyv na zimné prežitie cifruše bezkridlej. Naproti tomu zvýšenie zimných teplôt o 5 ° C oproti normálu má významný negatívny vplyv na úspešnosť prezimovanie cifruší. V prípade, že sa zimné teploty v budúcnosti priblížia horným odhadom súčasných modelov klímy teda môžeme očakávať negatívne dopady na úspešnosť prezimovanie nielen cifruší, ale pravdepodobne aj iných domácich druhov hmyzu, adaptovaných na chladné zimy.

## 6. Záver

Zameraním tejto bakalárskej práce bolo posúdiť vplyv otepľujúcej sa klímy („teplých zím“) na prezimovanie, fyziológiu a biochémiu cifruše bezkrídlej. Ciele boli sústredené na jej prežitie, chladovú odolnosť, energetické rezervy. Všetky stanovené ciele boli splnené.

V rámci tejto práce boli cifruše vystavené rôznym scenárom teplých a priemerných zím, simulovaných v laboratóriu, ale aj poloprirodným podmienkam vonku.

Z výsledkov tejto štúdie je zjavné, že fluktuácie (simulácie slnenia) v scenároch zapríčinili lepšie prežitie cifruší, i keď ich význam nie je zďaleka objasnený. Fluktuácie teda majú nezanedbateľný pozitívny vplyv na prezimovanie cifruší.

Na prežitie cifruší mali negatívny dopad aj simulované teplé zimy v porovnaní s normálnymi (priemernými) zimami. Na základe výsledkov teda môžeme predpokladať pomerne výrazný negatívny vplyv otepľujúcej sa zimnej klímy na úspešnosť prezimovania cifruší. Avšak hypotézu, že v teplých zimách sa hmyzu zvýšene spotrebúvajú energetické rezervy získané dáta v prípade cifruší nepodporili.

Podľa výsledkov „teplé zimy“ rovnako nemajú významný vplyv na pozorované parametre chladovej odolnosti cifruší.

Výskum tejto problematiky by mohol pokračovať smerom skúmania mechanizmu fluktuácií, či sa pri nich spúšťajú opravné mechanizmy, teda napr. zistiť syntézu HSP. Keďže nižšia hydratácia u skupín bez fluktuácií v simulovanej zime môže naznačovať súvis obsahu vody s fluktuáciami, možno v ďalšej štúdií potvrdiť, či vyvrátiť túto hypotézu. Tiež možno objasniť príčinu zvýšenej mortality u teplých zím napr. zistiť prítomnosť plesní.

## 7. Zoznam použitej literatúry

Bale JS (1993) Classes of insect cold hardiness. *Funct Ecol* 7, 751-753.

Bale JS (1996) Insect cold hardiness: A matter of life and death. *Eur J Entomol* 93, 369-382.

Bale JS (2002) Insects and low temperatures: from molecular biology to distributions and abundance. *Phil Trans R Soc Lond B* 357, 849–862.

Bale JS and Hayward SAL (2010) Insect overwintering in a changing climate. *J Exp Biol* 213, 980-994.

Brower LP (1995) Understanding and misunderstanding the migration of the monarch butterfly (Nymphalidae) in North America: 1857-1995. *J Lepid Soc* 49, 304–365.

Bueding E and Orrell SA (1964) A mild procedure for the isolation of polydisperse glycogen from animal tissues. *J Biol Chem* 239: 4018–4020.

Chen C, Mahar R, Merrit ME, Denlinger DL and Hahn DA (2021) ROS and hypoxia signaling regulate periodic metabolic arousal during insect dormancy to coordinate glucose, amino acid, and lipid metabolism. *PNAS USA* 118, e2017603118.

Clark MS and Worland MR (2008) How insects survive the cold: molecular mechanisms—a review. *J Comp Physiol B* 178, 917-933.

Colinet H, Sinclair BJ, Vernon P and Renault D (2015) Insects in Fluctuating Thermal Environments. *Annu Rev Entomol* 60, 123-140.

Daan S, Barnes, BM and Strijkstra AM (1991) Warming up for sleep? Ground squirrels sleep during arousals from hibernation. *Neurosci Lett* 128, 265-268.

Danks HV (1994) (Ed.) *Insect Life-Cycle Polymorphism: Theory, Evolution and Ecological Consequences for Seasonality and Diapause Control*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 376 pp.

- Danks HV (2004) Seasonal adaptations in arctic insects. *Integr Comp Biol* 44, 85–94.
- Dubois M, Gilles A, Hamilthon JJ, Rebers PA and Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28: 350–356.
- Folch AJ, Lees M and Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497–509.
- Galster W and Morrison PR (1975) Gluconeogenesis in arctic ground squirrels between periods of hibernation. *Am J Physiol* 228, 325–330.
- Geiser F, Hiebert S and Kenagy GJ (1990) Torpor bout duration during the hibernation season of 2 sciurid rodents—interrelations with temperature and metabolism. *Physiol Zool* 63, 489–503.
- Gessner MO and Neumann PTM (2005) Total lipids. In: Graca MAS, Barlocher F, Gessner MO, eds. *Methods to study litter decomposition: A practical guide*. Berlin: Springer, pp 103–107.
- Hazel JR (1995) Thermal Adaptation in Biological Membranes: Is Homeoviscous Adaptation the Explanation? *Ann Rev Physiol* 57, 19–42.
- Hocking B and Sharplin CD (1965) Flower basking by arctic insects. *Nature* 206, 215
- Hodek I (1996). Diapause development, diapause termination and the end of diapause. *Eur J Entomol* 93, 475–487.
- Holmstrup M and Sømme L (1998) Dehydration and cold hardiness in the Antarctic collembolan *Onychiurus arcticus* Tullberg 1876. *J Comp Physiol B* 168, 197–203.
- IPCC (2014) *Climate Change 2014: The Synthesis Report*. Contribution of working groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Core Writing Team, Pachauri RK and Meyer LA (eds.). IPCC, Geneva, Switzerland, 151pp.

Jorov A, Zhorov BS and Yang DSC (2004) Theoretical study of interaction of winter flounder antifreeze protein with ice. *Protein Sci* 13, 1524-1537.

Košťál V and Šimek P (2000) Overwintering strategy in *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera): the relations between life-cycle, chill tolerance and physiological adjustments. *J Insect Physiol* 46, 1321-1329.

Košťál V (2006) Eco-physiological phases of insect diapause. *J Insect Physiol* 52, 113-127.

Košťál V and Tollarová-Borovanská M (2009) The 70 kDa Heat Shock Protein Assists during the Repair of Chilling Injury in the Insect, *Pyrrhocoris apterus*. *PLoS ONE* 4, e4546.

Košťál V, Renault D and Rozsypal J (2011a) Seasonal changes of free amino acids and thermal hysteresis in overwintering heteropteran insect, *Pyrrhocoris apterus*. *Comp Biochem Physiol A* 160, 245-251.

Košťál V, Zahradníčková H and Šimek P (2011b) Hyperprolinemic larvae of the drosophilid fly, *Chymomyza costata*, survive cryopreservation in liquid nitrogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 13041–13046.

Košťál V, Štětina T, Poupardin R, Korbelová J and Bruce AW (2017) Conceptual framework of the ecophysiological phases of insect diapause development justified by transcriptomic profiling. *Proc Natl Acad Sci USA* 114, 8532–8537.

Kristenová M, Exnerová A and Štys P (2011) Seed preferences of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Pyrrhocoridae): Are there specialized trophic populations? *Eur J Entomol* 108, 581–586.

Layne JR, Edgar CL and Medwith RE (1999) Cold hardiness of the Woolly Bear caterpillar (*Pyrrharctica isabella* Lepidoptera: Arctiidae). *Am Midl Nat* 141, 293–304.

Lee RE Jr. (1989) Insect Cold-Hardiness: To Freeze or Not to Freeze. *BioScience* 39, 308-313.

Lee RE, Costanzo JP and Mugnano JA (1996) Regulation of supercooling and ice nucleation in insects. *Eur J Entomol* 93, 405-418.

Lundheim R (2002) Physiological and ecological significance of biological ice nucleators. *Phil Trans R Soc Lond B* 357, 937–943.

Pengelley ET and Fisher KC (1961) Rhythmical arousal from hibernation in the golden-mantled ground squirrel, *Citellus lateralis tescorum*. *Can J Zool* 39, 105-120.

Porter K (1982) Basking behaviour in larvae of the butterfly *Euphydryas aurinia*. *Oikos* 38, 308- 312.

Prendergast BJ, Freeman DA, Zucker I and Nelson RJ (2002) Periodic arousal from hibernation is necessary for initiation of immuneresponses in ground squirrels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282, R1054–R1062.

Ramløv H (2000) Aspects of natural cold tolerance in ectothermic animals. *Hum Reprod* 15, 26-46.

Rinehart JP, Li A, Yocum GD, Robich RM, Hayward SA and Denlinger DL (2007) Up-regulation of heat shock proteins is essential for cold survival during insect diapause. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 11130-11137.

Ring RA (1982) Freezing-tolerant insects with low supercooling points. *Comp Biochem Physiol A* 73: 605-612.

Rozsypal J and Košťál V (2018) Supercooling and freezing as eco-physiological alternatives rather than mutually exclusive strategies: A case study in *Pyrrhocoris apterus*. *J Insect Physiol* 111, 53-62.

Salt RW (1959) Survival of Frozen Fat Body Cells in an Insect. *Nature* 184, 1426.

Schwartz C, Hampton M and Andrews MT (2013) Seasonal and regional differences in gene expression in the brain of a hibernating mammal. *PloS One* 8: e58427.

Seki S, Kleinhans FW and Mazur P (2009) Intracellular ice formation in yeast cells vs. cooling rate: Predictions from modeling vs. experimental observations by differential scanning calorimetry. *Cryobiology* 58, 157–165.

Sinclair BJ (1999): Insect cold tolerance: How many kinds of frozen? *Eur J Entomol* 96: 157-164.

Sinclair BJ (2015) Linking energetics and overwintering in temperate insects. *J Thermal Biol* 54, 5-11.

Sláma K and Williams CM (1965) Juvenile hormone activity for the bug *Pyrrhocoris apterus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 54, 411–414.

Socha R (1993) *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera)- an experimental model species: A review. *Eur J Entomol* 90, 241-286.

Southwick EE and Heldmaier G (1987) Temperature control in honey bee colonies. *BioScience* 37, 395-399.

Sømme L (1999) The physiology of cold hardiness in terrestrial arthropods. *Eur J Entomol* 96, 1-10.

Storey KB and Storey JM (1988) Freeze tolerance in animals. *Physiol Rev* 68, 27-84.

Storey KB and Storey JM (1991) Biochemistry of cryoprotectants. In: Lee RE and Denlinger DL (eds.): *Insect at Low Temperature*. Chapman and Hall, New York and London, pp. 64-93.

Storey KB and Storey JM (2013) Molecular Biology of Freezing Tolerance. *Compr Physiol* 3, 1283– 1308.

Šula J, Kodrík D and Socha R (1995) Hexameric haemolymph protein related to adult diapause in the red firebug, *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Heteroptera). *J Insect Physiol* 41, 793-800.

Tauber MJ, Tauber CA and Masaki S (1986) The Course of Diapause. In: Tauber MJ, Tauber CA and Masaki S (eds.): Seasonal adaptations of insects. Oxford University Press, New York, pp. 38-66.

Timasheff SN (2002) Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 9721–9726.

Wharton D and Ferns D (1995) Survival of intracellular freezing by the Antarctic nematode *Panagrolaimus davidi*. *J Exp Biol* 198, 1381-1387.

Williams CM, Henry HAL and Sinclair BJ (2015) Cold truths: how winter drives responses of terrestrial organisms to climate change. *Biol Rev* 90, 214–235.

Wilson PW, Heneghan AF and Haymet ADJ (2003) Ice nucleation in nature: Supercooling point (SCP) measurements and the role of heterogenous nucleation. *Cryobiology* 46, 88-98.

Wolfe J, Bryant G and Koster KL (2002) What is “unfreezable water”, how unfreezable it is and how much is there? *Cryoletters* 23, 157–166.

Worland MR and Block W (1999) Ice-Nucleating Bacteria from the Guts of Two Sub-Antarctic Beetles, *Hydromedion sparsutum* and *Perimylops antarcticus* (Perimylopidae). *Cryobiology* 38, 60-67.

Zachariassen KE (1985) Physiology of cold tolerance in insects. *Physiol Rev* 65, 799-832.