



Pedagogická
fakulta
Faculty
of Education

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Pedagogická fakulta
Katedra biologie

Diplomová práce

Vliv zeměpisné šířky, resp. klimatických
podmínek na chladovou odolnost
ruměnice *Pyrrhocoris apterus*

Vypracoval: Bc. Václav Janda
Vedoucí práce: RNDr. Tomáš Ditrich, Ph.D.

České Budějovice 2017

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

V Českých Budějovicích dne 2. 1. 2017

Bc. Václav Janda

Chtěl bych poděkovat vedoucímu práce Tomášovi Ditrichovi za vedení při psaní mé diplomové práce, za ochotu, se kterou mi věnoval čas, kdykoli jsem potřeboval a za pomoc při experimentu.

Poděkování patří také Davidovi Doleželovi za poskytnutí populací na experiment.

Děkuji také Vladimíru Košťálovi za poskytnutí technického zázemí pro provedení měření v jeho laboratoři.

Dále bych chtěl poděkovat Haně Vaněčkové za pomoc při experimentu.

Také chci poděkovat své ženě Anně za podporu, pomoc a trpělivost.

Abstrakt

Janda, V. 2017: Vliv zeměpisné šířky, resp. klimatických podmínek na chladovou odolnost ruměnice *Pyrrhocoris apterus*. Diplomová práce, Pedagogická fakulta JU, 42 s.

Tato práce se zabývá vztahem místa původu a mírou chladové odolnosti ruměnice pospolné *Pyrrhocoris apterus* (Linnaeus, 1758). V experimentu bylo použito 13 populací z 12 evropských lokalit. Hodnoty SCP (10. percentil, první kvartil, průměr a medián) jednotlivých populací byly porovnávány s minimálními a průměrnými zimními teplotami daných lokalit. Vztah mezi teplotami prostředí a SCP jednotlivých populací je průkazný v případě, že jsou použita data všech populací. Po vyjmutí tří jižních nediapauzujících populací je tento vztah neprůkazný.

Klíčová slova: Chladová odolnost, *Pyrrhocoris apterus*, SCP, zeměpisný gradient, vnitrodruhová variabilita

Abstract

Janda, V. 2017: Influence of latitude or rather climatic conditions on cold hardiness of firebug *Pyrrhocoris apterus*. Diploma thesis, Faculty of Education, University of South Bohemia, 42 pp.

This thesis deals with the relationship between the place of origin and the extend of cold hardiness of fire bug *Pyrrhocoris apterus* (Linnaeus, 1758). Thirteen populations from twelve European localities were used in the experiment. Linear regressions were used to relate the values of SCP (10th percentile, first quartile, mean and median) of the individual populations to minimum and average winter temperatures of given localities. The relationship between air temperatures and SCP values were significant provided that the data of all populations were used. After the removal of three southern non-diapausing populations this relationship lost its significance.

Key words: cold hardiness, *Pyrrhocoris apterus*, SCP, latitudinal cline, interspecific variation

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Literární přehled	2
2.1	Chladová odolnost ruměnice pospolné.....	2
2.1.1	Definice a dělení chladové odolnosti.....	2
2.1.2	Chladová zranění.....	4
2.1.3	Metody měření chladové odolnosti.....	5
2.1.4	Ruměnice pospolná.....	6
2.1.5	Chladová odolnost <i>Pyrrhocoris apterus</i> a metoda jejího měření.....	6
2.1.6	Význam diapauzy a aklimatizace.....	7
2.1.7	Role trávicího traktu.....	8
2.1.8	Dopad kolísání teplot na chladovou odolnost	9
2.1.9	Způsob přezimování <i>Pyrrhocoris apterus</i>	9
2.1.10	Konec diapauzy a kviescence	10
2.2	Vliv zeměpisné šířky na chladovou odolnost různých druhů hmyzu	11
2.2.1	Rozdíly hemisfér	12
2.2.2	Úskalí mezidruhových porovnání.....	12
2.2.3	Vliv nadmořské výšky	13
2.2.4	Druhy ovlivněné geografickým původem	13
3	Materiál a metodika	17
3.1	Studovaný organismus	17
3.1.1	Habitat a potrava	17
3.1.2	Křídelní formy.....	17
3.1.3	Životní cyklus v podmínkách České republiky.....	17
3.2	Design experimentu	18
3.2.1	Sběr a uchování.....	18
3.2.2	Aklimace	21
3.2.3	Měření SCP	21
3.3	Analýza dat	23

3.4	Klimatická data	23
3.5	Seznam používaných zkratek	24
4	Výsledky	25
4.1	Vztah průměrné zimní teploty a SCP	25
4.2	Vztah minimálních teplot a SCP	30
5	Diskuse	34
5.1	Variabilita chladové odolnosti <i>Pyrrhocoris apterus</i>	34
5.2	Nediapauzující populace	34
5.3	Geografický gradient v chladové odolnosti	35
5.4	Chladová odolnost jako dědičný znak	36
6	Závěr	37

1 ÚVOD

Chladová odolnost (cold hardiness, cold tolerance) je v poslední době v centru zájmu mnoha vědců. Ačkoli byly doposud popsány životní strategie mnoha různých ektotermních organismů i složité fyziologické procesy zodpovědné za přežívání v nízkých teplotách, má kryobiologie více otázek než odpovědí. V případě ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus*) bylo již zjištěno, která životní stádia jsou schopná přežít teploty pod 0 °C a jaké fyziologické procesy to umožňují. Současně se také objevují práce mezidruhově i vnitrodruhově porovnávající letální teplotní limity v závislosti na zeměpisné šířce. Podle trendu, který se v pracích objevuje, se nabízí myšlenka, že jedinci *P. apterus* z lokalit s vyšší zeměpisnou šířkou budou vykazovat výraznější chladovou odolnost než jedinci z lokalit položených blíže rovníku. Tato práce se snaží přispět k řešení uvedené problematiky.

Cílem diplomové práce je zodpovědět následující otázky:

- Co bylo doposud zjištěno o chladové toleranci *P. apterus*?
- Je míra chladové odolnosti *P. apterus* závislá na zeměpisné šířce, respektive na klimatických podmínkách?

Na tuto práci bude navazovat analýza metabolitů jednotlivých ploštic.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 CHLADOVÁ ODOLNOST RUMĚNICE POSPOLNÉ

2.1.1 Definice a dělení chladové odolnosti

Pojem chladová odolnost popisuje schopnost organismu přežít nízké teploty, které mají za následek omezení metabolismu či dokonce zmrznutí tělních tekutin (IUPS Thermal Commission, 2001). Pro stanovení míry chladové odolnosti je používáno několik různých metod, jejichž výběr se řídí typem chladové odolnosti vybraného organismu. Nejzákladnější dělení typů chladové odolnosti rozlišuje druhy freeze tolerant¹ (zmrznutí tolerující), které zvládnou přežít zmrznutí svých tělních tekutin, a druhy freeze intolerant (zmrznutí netolerující), jež zmrznutí nepřežijí. Teplota, při které dojde ke zmrznutí tělní tekutiny, však neodpovídá běžnému bodu tání těchto tekutin. Hemolymfa (i ostatní tekutiny) bývají i v teplotách pod bodem tání kapalné v tzv. podchlazeném stavu. Podchlazené kapaliny jsou metastabilní – k jejich krystalizaci dochází náhle až v teplotách významně nižších, než je bod tání. V tom případě se teplota krystalizace označuje jako bod podchlazení (SCP²). Ke snížení SCP dochází i za pomoci kryoprotektantů, které umožní organismům vyhnout se zmrznutí.

Bale (1993) ale poukazuje na to, že pojem freeze intolerant zahrnuje širokou škálu typů chladové odolnosti. Do této kategorie spadají jak jedinci umírající už při nemrazových podmínkách³, tak jedinci, kteří umírají výhradně kvůli zmrznutí. Objevují se i druhy, které jsou schopné v laboratorních podmínkách přežít velmi nízké mrazové teploty, ale v přirozeném prostředí hynou při mnohem mírnějším mrazu, pokud jsou mu vystaveni po delší dobu. Bale (1993) považuje pojem freeze intolerant za zavádějící, protože svádí k představě, že SCP je možné použít jako ukazatel chladové odolnosti všech freeze intolerant druhů. Rozdělil tedy freeze intolerant druhy do čtyř skupin:

¹ Jelikož neexistují ustálené české ekvivalenty a pro přehlednost textu jsou názvy typů chladové odolnosti uváděny v angličtině.

² Supercooling point.

³ K smrti dochází po delší době vlivem zastavení či omezení metabolismu.

- **Freeze avoiding**⁴ jsou druhy, jejichž jedinci umírají výhradně kvůli zmrznutí. U nich je možné použít SCP jako ukazatel chladové odolnosti. Tento typ se objevuje hlavně u druhů přezimujících ve stádiu vajíčka.
- **Chill tolerant**⁵ jsou druhy, u kterých byla zaznamenána úmrtí před zmrznutím, ale zároveň mají tito jedinci schopnost dlouhodobě přežívat nízké teploty, které se v jejich přirozeném prostředí normálně vyskytují. Problém ale je, že i u freeze avoiding druhů dochází v malém počtu k nemrazovým úmrtím. Bale (1993) uvádí jako příklad vysoké chladové odolnosti⁶ *Alaskozetes antarcticus*, u kterého dochází k 27% mortalitě po vystavení teplotě o 10 °C vyšší než je jeho průměrné SCP na 100 dní. Z uvedeného se zdá, že při nižší mortalitě, například 10%, by se dalo uvažovat o zařazení do freeze avoiding.
- **Chill susceptible**⁷ je menší skupina druhů, které přežívají nízké teploty omezující normální vývoj, ale při vystavení mrazovým teplotám brzy hynou. Bale navrhuje u této skupiny měřit chladovou odolnost pomocí LT50 (viz níže).
- **Opportunistic species**⁸ jsou druhy, které nejsou schopné přežít delší dobu v nemrazových teplotách, jež omezují metabolismus. Většinou žijí v tropech a podobných prostředích nebo vyhledávají teplá místa.

Nedvěd (2000) se domnívá, že dosud nemáme dostatek poznatků o strategiích jednotlivých druhů a proto je předčasné vytvářet dělení s pevně popsány skupinami. Z dostupných poznatků vybírá tři na sobě nezávislé kvalitativní proměnné a jejich vzájemnou kombinací vytváří osm skupin pojmenovaných podle Sněhurky a sedmi trpaslíků. Na rozdíl od Baleova (1993) dělení, které klade různé strategie do lineárního kontinua, vytváří Nedvěd (2000) multidimenzionální klasifikaci, jež je otevřená přidání nových proměnných podle toho, jak se bude poznání strategií přezimování rozšiřovat. Dále také otevírá otázku rozdělení freeze tolerant druhů, kterému se doposud nikdo nevěnoval.

Nedvěd (2000) uvádí následující vlastnosti organismů:

⁴ Vyhýbající se mrazu.

⁵ Chlad tolerující.

⁶ Highly chill tolerant.

⁷ Chladu podléhající.

⁸ Oportunní druhy.

- 1) smrt je nebo není způsobena zmraznutím tělních tekutin
- 2) smrt je nebo není způsobena chladovým šokem⁹
- 3) smrt může nebo nemůže být působena kumulativním efektem chladového (nemrazového) zranění

Druhy jsou rozřazovány do tříd podle splnění či nesplnění jednotlivých vlastností (tab. 1). Nedvěd (2000) pro srovnání uvádí v tabulce i Baleovy (1993) kategorie. Nejširší třídou je „Sněhurka“, tedy hmyz, který je freeze intolerant a zároveň může podlehnout dlouhodobému podchlazení. Tato třída odpovídá v Baleově (1993) dělení chill tolerant druhům. Mohou mezi ně však patřit i některé oportunní druhy. Nedvěd (2000) do této skupiny zařazuje i *Pyrrhocoris apterus*.

Tab. 1 Klasifikace chladové odolnosti podle Nedvěda (2000) (+ způsobuje smrt, - nezpůsobuje smrt)

Efekt nízké teploty			Základní strategie	Upravená klasifikace			Třída	
zmrznutí	chladový šok	nemraz. zranění						
+	+	+	citlivé na zmrznutí	oportunně přežívající	chill susceptible		Kejchal	
+	+	-			chill tolerant		Dřímál	
+	-	+			freeze avoiding		Sněhurka	
+	-	-		tato kombinace není možná			Prófa	
-	+	+	zmrznutí tolerující	tato kombinace není možná			Stydlín	
-	+	-		tato kombinace není možná			Šmudla	
-	-	+		částečně tolerující zmrznutí	středně tolerující zmrznutí	sílně tolerující zmrznutí	freeze tolerant s nízkým SCP	Rejpal
-	-	-		tato kombinace není možná			Štístko	

2.1.2 Chladová zranění

Turnock a Fields (2005) popsali příčiny úmrtí způsobeného nízkými teplotami. Rozdělili je do dvou skupin: mrazová a nemrazová zranění.

- a) Mrazová zranění mají dvě složky: fyzickou a metabolickou. Fyzická složka je způsobena tvorbou krystalů, které naruší strukturu buňky. Metabolická složka zranění představuje škody napáchané osmotickým stresem, anoxií¹⁰ (Turnock

⁹ Cold shock – smrt způsobená rychlým poklesem teploty, nikoli však zmrznutím.

¹⁰ Nedostatek kyslíku.

a Fields, 2005), zablokováním enzymů a vyčerpáním energetických zásob (Renault a kol., 2002). Jsou příčinou úmrtí u freeze avoiding druhů a částečně u chill tolerant druhů (Bale, 1993).

- b) Nemrazová zranění jsou metabolického rázu a jsou způsobená teplotou nad SCP ale pod teplotou potřebnou pro funkční metabolismus. Mají kumulativní efekt. Velkou roli při nich hraje míra chladu a délka expozice. Po zvýšení teplot dochází k uzdravení, pokud zranění nepřekročí únosnou mez (Turnock a Bodnaryk, 1993 in Turnock a Fields, 2005).

Turnock a kol. (1998 in Turnock a Fields, 2005) se domnívá, že adaptace na mrazová a nemrazová zranění jsou na sobě nezávislá.

Chen a Walker (1994) zjistili, že nemrazová zranění se dají rozdělit na dva typy fungující na jiných fyziologických základech. První typ nemrazových zranění funguje tak, jak je popsali Turnock a Fields (2005). Druhý typ je chladový šok, tedy úmrtí způsobené náhlým výrazným klesnutím teploty.

2.1.3 Metody měření chladové odolnosti

Metoda měření chladové odolnosti by se měla vybírat v závislosti na typu odolnosti. V současnosti se nejčastěji používají tři níže zmíněné metody. Ostatní méně používané metody popisuje Sinclair a kol. (2015).

Bod podchlazení (Supercooling point, SCP) – udává teplotu reálného zmrznutí tělních tekutin (tj. hemolymfy), která je pro všechny freeze intolerant druhy smrtelná. V přirozených podmínkách však často není teplotou, která způsobuje smrt (Bale, 1993; Renault a kol., 2002). Podle Renaulta a kol. (2002) už není SCP považováno za vhodný prediktor počtu zimu přeživších jedinců. Nicméně alternativní standardní metoda zatím zvolena nebyla (Turnock a Fields, 2005). Jako přesný prediktor míry chladové odolnosti se může použít jen v případě freeze avoiding druhů (Bale, 1993). I přesto je však nejrozšířenější metodou (Turnock a Fields, 2005).

Letální čas (Lethal time, Lt50) udává čas, za který uhynie polovina jedinců při konstantní teplotě¹¹. Objevují se i jiné varianty, například Lt90 (čas, za který zahyne 90 % jedinců).

Letální teplota (Lethal temperature, LT50) udává konstantní teplotu, při které uhynie polovina jedinců při určeném času expozice (Kalushkov a Nedvěd, 2000).

2.1.4 Ruměnice pospolná

Ruměnice pospolná (*Pyrrhocoris apterus*, L. 1758) je terestrická ploštice (Hemiptera: Heteroptera: Pyrrhocoridae). Její rozšíření zahrnuje mírný pás palearktické oblasti, na východě až k Indii a Altajskému pohoří v Mongolsku. Vyskytuje se i ve střední Americe, Spojených státech amerických (Socha, 1993) a severní Africe (Hanzák a kol., 1973).

2.1.5 Chladová odolnost *Pyrrhocoris apterus* a metoda jejího měření

Tak jako většina hmyzu v mírném podnebném pásmu severní polokoule, *P. apterus* nejsou schopné přežít zmrznutí tělních tekutin (Sinclair a Chown, 2005). Jejich zařazení do Baleova dělení (1993) je však problematické. Hodková a Hodek (1997) *P. apterus* zařazují do freeze avoiding druhů, Košťál a Šimek (2000) do chill tolerant, stejně jako Kalushkov a Nedvěd (2000), kteří ale dodávají, že velká část jedinců přežívala několik dní při teplotách blízkých průměrnému SCP. Sám Bale (1993) uznává, že hranice mezi jednotlivými skupinami nemusí být ostré. Zdá se tedy, že *P. apterus* se pohybuje na rozhraní druhů freeze avoiding a chill tolerant. Toto hraniční postavení je potvrzeno i poznatkem, že *P. apterus* je druhem, u kterého se objevuje korelace mezi hodnotami SCP, Lt50 a LT50 (Kalushkov a Nedvěd, 2000; Hodková a Hodek, 1997), jelikož ta u chill tolerant druhů není pozorována. Ani v rámci hmyzu se tato korelace neobjevuje často (Renault a kol., 2002). Kromě *P. apterus* však byla tato korelace pozorována také u příbuzných semiakvatických ploštic (Heteroptera: Gerromorpha) (Ditrich a Košťál, 2011).

SCP sice nemůže být považováno za přesnou teplotu způsobující smrt ve většině případů, jelikož také záleží na délce expozice nízké teplotě, ale na rozdíl od ostatních chill tolerant druhů je dobrým ukazatelem chladové odolnosti *P. apterus* (Hodková a

¹¹ Například Lt50_s udává čas, za který uhynie 50 % vzorku při teplotě -5 °C.

Hodek 1997; Kalushkov a Nedvěd, 2000) a má velký význam zejména při porovnávání v rámci druhu. Další výhodou ve srovnání s ostatními metodami je možnost determinace SCP i u jedinců. Díky tomu je možné určit populační charakteristiku SCP (např. průměr, medián či jiný percentil) s vysokou mírou přesnosti i na relativně malém počtu jedinců.

Před zmrznutím se ruměnice brání nástupem diapauzy a teplotní aklimatizací, což způsobuje nárůst chladové odolnosti. Přezimují pouze dospělci, jelikož ostatní životní stádia nejsou schopna vstoupit do diapauzy, která zvyšuje efekt následné chladové aklimatizace. V našich zeměpisných šířkách teplota vzduchu nabývá nejnižších hodnot v lednu a únoru, což koresponduje s nejvyšší mírou chladové odolnosti *P. apterus* v těchto měsících (Hodková a Hodek, 1997).

2.1.6 Význam diapauzy a aklimatizace

Pro nárůst chladové odolnosti je klíčová reprodukční diapauza, která je spuštěna krátkí se denní fotoperiodou (Hodková a Hodek, 1997). Diapauzní jedinci se v podmínkách České republiky objevují kolem poloviny července, kdy klesá kritická délka dne potřebná k navození reprodukce (Košťál a Šimek, 2000). Společně s diapauzou má velký význam pro chladovou odolnost také chladová aklimatizace. Hodková a Hodek (1997) měřili SCP dospělců žijících v Českých Budějovicích v průběhu roku. To se na začátku prediapauzy pohybovalo okolo -7 °C. Následně SCP kleslo o 4 až 5 °C vlivem nástupu diapauzy, která umožňuje klesnutí SCP o dalších 5 až 6 °C díky teplotní aklimaci¹². Z dalších výsledků Hodkové a Hodka (1997) je patrné, že je nárůst chladové odolnosti spuštěn již na začátku podzimu vlivem krátkí se denní fotoperiody a postupným klesáním teplot, a ne až s nástupem zimy. K většímu snížení SCP totiž došlo u jedinců, kteří byli vystaveni trvalé teplotě 15 °C nebo fluktuující teplotě při fotoperiodě krátkého dne než u jedinců aklimovaných na 5 °C při trvalé tmě.

Ačkoli samotná teplotní aklimatizace nízkými teplotami bez krátkí se denní fotoperiody není schopná vyvolat diapauzu, má dopad na chladovou odolnost. Po čtyřtýdenním

¹² Přizpůsobení se prostředí v laboratorních podmínkách.

klesání teploty z 25 °C na 0 °C se délka přežití při konstantní teplotě -5 °C u nediapauzujících dospělců zvýšila a hodnoty SCP klesly (Šlachta a kol., 2002).

Pokud předcházela aklimaci diapauza, došlo k těmto změnám:

- omezení vzniku krystalizačních jader, což vedlo k nižšímu SCP
- vytvoření a akumulace specifických „zimních“ polyolů (Šlachta a kol., 2002)
- nárůst poměru kyseliny palmitové v membránových fosfolipidech, která umožňuje fluidnost membrány i při nižších teplotách (Hodková a kol., 1999 in Šlachta a kol., 2002)
- regulace koncentrace Na⁺ a K⁺ v hemolymfě

Nezávisle na diapauze se vlivem teplotní aklimace objevily tyto fyziologické změny:

- snížení spotřeby kyslíku
- úbytek vody v tělesných tekutinách o 5–13 %
- zvýšená osmolalita hemolymfy
- v membránových fosfolipidech se zvýšil poměr fosfatidylethanolaminů na úkor fosfatidylcholinů a zvýšený poměr kyseliny linolové na úkor olejové kyseliny ve fosfatidylethanolaminech (Šlachta a kol., 2002)

Tzv. „zimní“ polyoly (zejména ribitol, sorbitol, arabinitol a mannitol) fungují jako obrana proti nemrazovým zraněním, jelikož prodlužují Lt50₋₁₅¹³, ale nesnižují SCP. Jejich syntéza a ukládání je spuštěna při teplotách pod +5 °C. Schopnost akumulovat „zimní“ polyoly se objevuje pouze u dospělců, kteří vstoupili do diapauzy a jsou následně teplotně aklimováni. U nediapauzujících jedinců nebyla zjištěna žádná akumulace (Košťál a kol., 2001; Šlachta a kol., 2002).

2.1.7 Role trávicího traktu

Jednotlivé části těla *P. apterus* se navzájem liší v hodnotách SCP, přičemž nejvyšší hodnoty byly zjištěny v trávicím traktu; ostatní orgány mají SCP nižší, a to nezávisle na délce fotoperiody (Hodková a Hodek, 1997). Z uvedeného vyplývá, že ke zmrznutí tělních tekutin trávicího traktu dochází jako první z celého organismu, proto snížení jeho SCP během diapauzy je pro *P. apterus* klíčovým. Příčinou vysokých hodnot SCP

¹³ Letální čas při teplotě -15 °C.

u trávícího traktu je jeho samotná tkáň, nikoli jeho obsah¹⁴. Naopak, dostatečná strava pozitivně ovlivňuje míru chladové odolnosti (Hodková a Hodek, 1997).

2.1.8 Dopad kolísání teplot na chladovou odolnost

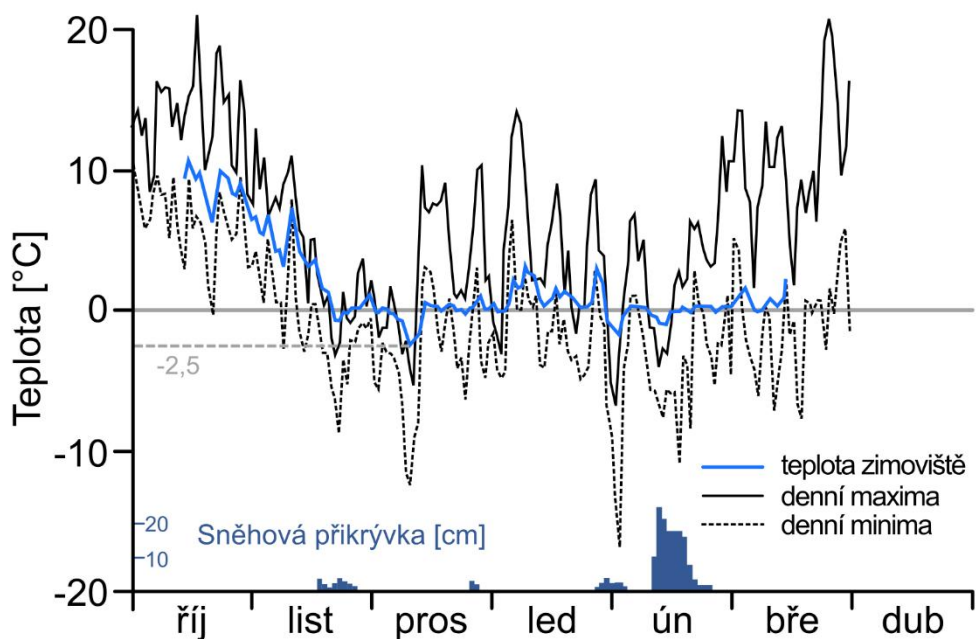
Zastánci měření chladové odolnosti způsobem co nejbližším přirozeným podmínkám upozorňují i na význam kolísání teplot v denním rytmu (Dansk, 1996). Hanč a Nedvěd (1999) zkoumali jeho vliv na Lt50. Zjistili, že kolísání teplot má pozitivní dopad. Při krátké každodenní expozici¹⁵ 10 °C se Lt50 prodlužuje. Podobné výsledky má i Kalushkov a kol. (2001). Je to způsobeno tím, že chlad vyvolá syntézu stresových proteinů, která může začít až po návratu vyšších teplot. Pokud jsou tyto vyšší teploty v rozmezí hodnot, se kterými by se jedinci mohli reálně setkat ve svém přirozeném prostředí, může dojít k uzdravení zranění způsobeného chladem. Pokud jsou ale po ukončení diapauzy teploty vyšší než obvykle, mohou způsobit deaklimaci a tak zvýšit úmrtnost v průběhu zimy (Hanč a Nedvěd, 1999). Oproti tomu týdenní expozice *P. apterus* vyšším teplotám před koncem diapauzy na míru chladové odolnosti neměla vliv (Kalushkov a Nedvěd, 2000).

2.1.9 Způsob přezimování *Pyrrhocoris apterus*

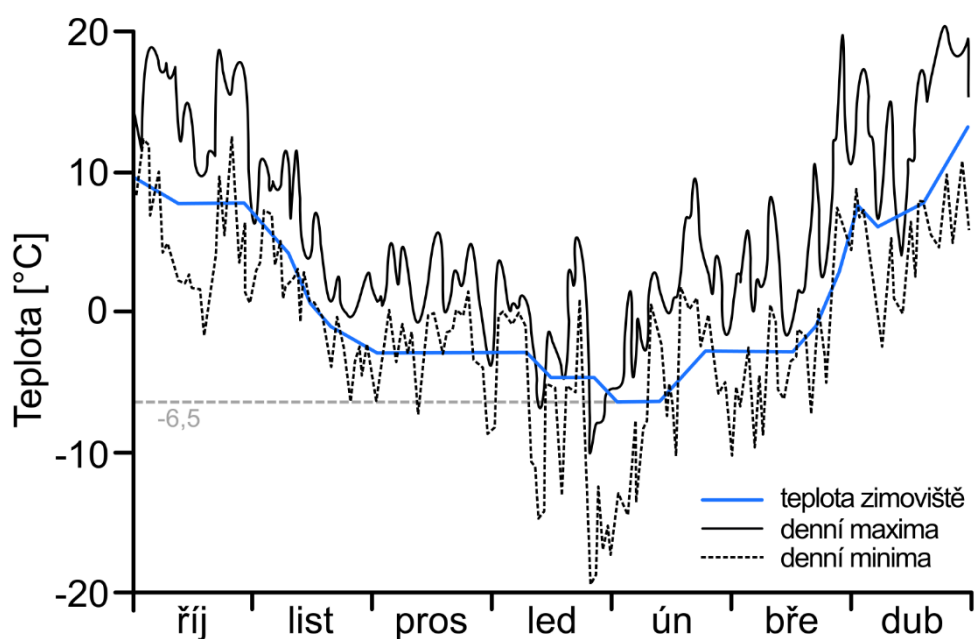
Jedinci *P. apterus* přezimují pod vrstvou spadaného listí, přízemní vegetace a případně i pod sněhovou přikrývkou. To je chrání nejen před mrazem ale i před předčasným snížením chladové odolnosti vlivem mimořádných zvýšení teplot (Košťál a Šimek, 2000). Pohyb teplot mikrohabitatu přezimujících jedinců v porovnání s okolními teplotami zaznamenal pro jižní Čechy Košťál a Šimek (2000) a Košťál (nepublikovaná data). Teplota hibernakula se mění nevýrazně v porovnání s venkovními teplotami. Z výsledků jejich měření je patrné, že i když se nejnižší teploty blížily -20 °C, v hibernakulu nejnižší naměřená teplota neklesla pod -7 °C (obr. 1 a 2).

¹⁴ SCP střeva bylo vyšší než u ostatních orgánů i v případě dlouhodobého vyhladovění.

¹⁵ Hodinová expozice.



Obr. 1 Záznam teplot uvnitř hibernakula, minimálních a maximálních teplot prostředí v Českých Budějovicích (zima 1998/99) (převzato z Košťál a Šimek, 2000)



Obr. 2 Záznam teplot uvnitř hibernakula, minimálních a maximálních teplot prostředí (nepublikovaná data, Vladimír Košťál)

2.1.10 Konec diapauzy a kviescence

Citlivost ruměnic na fotoperiodu se pomalu vytrácí, až se na konci diapauzy, tj. okolo zimního slunovratu, úplně ztratí. Od konce diapauzy se klidové stádium označuje jako kviescence. Pokud jsou jedinci vystaveni vyšším teplotám, začínají být aktivní a jejich

chladová odolnost se zhorší (Hodková a Hodek 1997; Košťál a Šimek, 2000), avšak i bez zvýšení teplot se postupně vytrácí (Kalushkov a Nedvěd, 2000).

2.2 VLIV ZEMĚPISNÉ ŠÍŘKY NA CHLADOVOU ODOLNOST RŮZNÝCH DRUHŮ HMYZU

Otázka vztahu zeměpisné šířky původu jedinců a jejich chladové odolnosti je předmětem oboru makroekologie. Ta se zabývá procesy, které ovlivňují abundanci, distribuci a diverzitu druhů na Zemi od místního až po celosvětové měřítko (Lawton, 1999). Zejména u hmyzu, který patří mezi poikilothermní¹⁶ živočichy, je vhodné mezi tyto procesy zařadit teplotu prostředí a její sezónní variace. Porozumění principům chladové odolnosti, a tím i šířce teplotní tolerance¹⁷, začíná nabývat na významu v souvislosti s klimatickými změnami (Sunday a kol., 2011), jelikož znalost principů chladové odolnosti může napomoci při předpovědi reakce organismů na tyto změny (Deutsch a kol, 2008).

Při zkoumání vlivu zeměpisné šířky na chladovou odolnost se vychází ze dvou předpokladů. Prvním předpokladem je, že chladová odolnost je formována teplotami prostředí. Zadruhé se předpokládá, že s narůstající zeměpisnou šířkou klesá průměrná teplota prostředí. Ve velkém měřítku toto tvrzení jistě platí. V menším měřítku či pro zpřesnění je však třeba mimo souřadnic vzít v úvahu mnoho dalších faktorů¹⁸. Proto je přesnější porovnávat úroveň chladové odolnosti s teplotami prostředí, které chladovou odolnost formují nejvíce.

Kromě snižování průměrné teploty prostředí dochází s narůstající zeměpisnou šířkou i k větším sezónním změnám teplot. Tyto změny mají za následek rostoucí šířku teplotní tolerance, a to více u terestrických než u mořských organismů, jelikož pevninské teploty kolísají výrazněji než mořské. Šířka teplotní tolerance se zvětšuje díky rozdílné rychlosti klesání letálních limitů. U terestrických organismů průměrně klesá spodní limit přežití o 2,4 °C na 10° zeměpisné šířky, zatímco horní limit klesá pouze o 0,3 °C na 10° zeměpisné šířky, jelikož díky vyhledávání slunných míst mohou

¹⁶ Organismy, jejichž tělesná je určována teplotou vnějšího prostředí.

¹⁷ Thermal tolerance breadth (TTB) – rozmezí mezi horní, Upper lethal temperature (ULT), a dolní letální teplotou, Lower lethal temperature (LLT).

¹⁸ Nadmořská výška, jižní či severní polokoule, přímořské či pevninské klima.

dosáhnout teplot vyšších, než je teplota okolního vzduchu. Naproti tomu u mořských ektotermů horní limit klesá podobným tempem jako spodní (Sunday a kol., 2011).

2.2.1 Rozdíly hemisfér

Tyto poznatky však neplatí pro severní a jižní hemisféru stejně. Na severní polokouli byly zaznamenány rozmanitější hodnoty LLT (Addo-Bediako a kol., 2000; Sunday a kol., 2011). Oblasti se stejnou hodnotou zeměpisné šířky si na obou hemisférách teplotně neodpovídají (Addo-Bediako a kol., 2000), jelikož teploty jižní polokoule jsou více stabilizovány vodami oceánů a nedochází na ní k tak výrazným sezonním změnám teplot (Gaston a Chown, 1999b).

Rozdíly gradientu letálních limitů v závislosti na hemisféře jsou zatím popsány pouze u hmyzu, a to Addo-Bediakem (2000) (Sunday a kol., 2011). Sinclair a Chown (2005) si všímají rozdílných trendů v typu chladové odolnosti. V mírných pásech severní polokoule je většina hmyzu freeze intolerant, zatímco na jižní polokouli bylo doposud nalezeno víc druhů freeze tolerant. Tento rozdíl si autoři vysvětlují větší nepředvídatelností změn teplot na jižní polokouli, proti níž je účinnější obranou tolerance zmrznutí. Sami ale dodávají, že je zkoumaný vzorek příliš malý pro utváření závěrů.

2.2.2 Úskalí mezidruhových porovnání

Makroekologové si při takto rozsáhlých porovnáváních musí klást otázku, jestli je adekvátní porovnávat druhy s odlišnými strategiemi přežití chladu. Ať už se jedná o toleranci zmrznutí, typ mikrohabitatu (Danks, 1996) nebo životní stádium, v němž jedinci druhu přezimují. Mezi SCP jednotlivých vývojových stádií je totiž u freeze intolerant druhů průkazný rozdíl (Addo-Bediako a kol., 2000).

Další problém takto rozsáhlých porovnání spočívá v nedostatku celistvých dat získaných u jednotlivých druhů (Sunday a kol., 2011). Často se měří buď horní, nebo dolní letální limit. U hmyzu z mírných pásů se většinou zkoumá LLT (low lethal temperature), zatímco u hmyzu z tropů většinou ULT (upper lethal temperature) (Chown a kol., 2002); nehledě na rozmanitost používaných metodik. Například aklimace rozšiřuje hodnoty naměřené TTB v průměru o 2 °C (Sunday a kol., 2011), což

přibližně představuje hodnotu, o kterou se TTB rozšíří při nárůstu zeměpisné šířky o 10°.

2.2.3 Vliv nadmořské výšky

Stejně jako zeměpisná šířka má vliv na chladovou odolnost i nadmořská výška (Gaston a Chown, 1999a). Výškové metry je však možné podle Price a kol. (1998) přepočítat na stupně zeměpisné šířky v poměru 305 výškových metrů na 4° zeměpisné šířky.

2.2.4 Druhy ovlivněné geografickým původem

Pro predikci reakcí poikilotermních organismů na klimatické změny se proto zdá přínosnější posuzovat každý druh zvlášť na základě charakteristik jeho chladové odolnosti. U několika druhů byla již korelace zeměpisné šířky a míry chladové odolnosti dokázána nebo ji alespoň data naznačují (tab. 2). V následující kapitole jsou dosud získané poznatky o jednotlivých druzích rozděleny podle řádů.

2.2.4.1 Polokřídlí (*Hemiptera*)

Jedním z nepotvrzených druhů je i *Pyrrhocoris apterus*. Kalushkov a Nedvěd (2000) zjistili, že bulharské ruměnice (42° 45' S) jsou méně chladu odolné¹⁹ než české ruměnice (48° 58' S), a to i přes aklimatizaci v českém prostředí. Populace byly bohužel pouze dvě, což není dostatečné množství pro pozorování geografického gradientu. Také byla pozorována korelace mezi velikostí jedinců a zeměpisnou šířkou.

Geografický gradient nebyl pozorován u tří druhů lovčic *Nabis rugosus*, *N. ericetorum* a *N. pseudoferum*, které rovněž patří mezi ploštice (*Heteroptera*). Závislost byla v jejich případě pozorována mezi SCP a pohlavím (Roth a Reinhardt, 2009), které naopak u ruměnic nehrálo žádnou roli (Kalushkov a Nedvěd, 2000).

2.2.4.2 Dvoukřídlí (*Diptera*)

Mezi nejpoužívanější modelové druhy patří octomilky. Odráží se to i na počtu studií věnovaných vlivu geografického gradientu na jejich chladovou odolnost. Při pozorování délky zotavení octomilky *Drosophila melanogaster* po chladovém kómatu²⁰ zaznamenali Ayrinhac a kol. (2004) silnou korelaci se zeměpisnou šířkou místa sběru. Tato práce je výjimečná díky šířce sběrových lokalit na obou hemisférách

¹⁹ Za použití metod SCP, LT50 i Lt50.

²⁰ Chill coma – ztráta pohybových schopností vlivem prochlazení organismu.

od Helsinek (60° 10' S) po Montevideo (34° 51' J). Výraznějších rozdílů v délce zotavení však dosáhli aklimací v rozdílných teplotách v průběhu vývoje, přičemž aklimace v nižších teplotách vedla ke kratšímu zotavení. Tyto výsledky svědčí o vysoké fenotypické plasticitě octomilek. Ta může být ale i ke škodě. U jedinců rostoucích při nižší teplotě se později objevovaly patologické projevy negativně ovlivňující například počet potomků, samčí plodnost či délku života dospělců. Stejná korelace místa původu a doby zotavení po chladovém kómatu byla pozorována i u octomilky *Drosophila serrata* (Hallas a kol., 2002). Na práci Ayrinhaca a kol. (2004) navazuje stejnou metodou další studie octomilek *D. melanogaster* z Austrálie (Hoffmann a kol., 2002). Na populacích z rozmezí od Cooktown (15° 28' J) až po jih Tasmánie (43° 06' J) potvrzuje tento článek korelaci nejen mezi zeměpisnou šířkou a délkou zotavení po chladovém kómatu, ale i délkou zotavení po teplotním šoku. Tento jev objevující se u mořských ektotermů může být vysvětlen tím, že sběr všech vzorků proběhl do 20 kilometrů od pobřeží. Geografický gradient je patrný i u octomilek *D. lutescens*, na rozdíl od *D. takahashii* (Kimura a kol., 1994). U *D. albomicans* je vázanost pozorovatelná pouze u neaklimovaných samečků (Isobe a kol., 2013). Na octomilkách je patrné, že ani tak nízký taxon, jako je rod, nemusí být jednotný v existenci geografického gradientu.

Mezi zástupci řádu dvoukřídlých byl zaznamenán geografický gradient v chladové odolnosti i u vrtalky jihoamerické (*Liriomyza huidobrensis*) (Chen a Kang, 2004).

2.2.4.3 Brouci (Coleoptera)

Objevují se i případy, kdy dojde ke změně tolerance zmrznutí, která má velký dopad na míru chladové odolnosti. Larvy brouků *Dendroides canadensis* (Pyrochroidae) z Indiany (USA), u kterých byla sledovaná tolerance zmrznutí v letech 1978 až 1980, přestaly být freeze tolerant a jejich SCP se snížilo přibližně o 15 °C. Tyto změny vytrvaly minimálně po dobu 6 následujících let, kdy bylo SCP larev monitorováno. U larev byla také pozorována korelace mezi chladovou odolností a zeměpisnou šířkou. Stejnou změnou tolerance zmrznutí prošel i brouk lesák *Cucujus clavipes* (Kukal a Duman, 1989).

Geografický gradient je patrný také na počtu přeživších vajíček *Psacotha hilaris* (tesaříkovití) při teplotách -16 a -20 °C (Shintani a Ishikawa, 1999) a na SCP dospělců *Ophraella communa* (mandelinkovití) (Zhou a kol., 2011).

U lýkožroutů *Ips grandicollis*, *I. pini*, *I. perroni* a lýkohuba *Dendroctonus frontalis* se objevuje geografický gradient v hodnotách SCP mezidruhově. Vnitrodruhově byl zaznamenán pouze v případě *I. grandicollis*. Kromě rozdílných hodnot SCP se u tohoto druhu objevuje i behaviorální rozdíl. Zástupci *I. grandicollis* v průběhu roku žijí pod kůrou stromů. Jedinci ze severní populace se na zimu přesouvají do skulin v zemi, zatímco chování jižních jedinců se nemění v průběhu celého roku a jejich rozmnožování ani vývoj nejsou omezeny (Lombardero a kol., 2000).

2.2.4.4 Blanokřídlí (Hymenoptera)

U mravence *Solenopsis invicta*, vyskytujícího se v Severní Americe na rozmezí sedmi a půl stupně zeměpisné šířky (33° 08' až 25° 57' S), se objevuje zvláštnost v podobě obráceného gradientu. Jižní populace mají nižší hodnoty SCP než populace severní. Tato studie proběhla na populacích ze třech lokalit. Autor se domnívá, že by obrácený gradient mohl být způsobený přítomností kryoprotektantů v hemolymfě, vytvořených ještě před sběrem, který proběhl dva měsíce před pokusem (Quarles a kol., 2005).

2.2.4.5 Motýli (Lepidoptera) a rovníkřídlí (Orthoptera)

Z řádu motýlů koreluje míra chladové odolnosti se zeměpisnou šířkou u zavíječe *Ostrinia furnacalis*, který přezimuje ve stádiu larvy. Jeho SCP signifikantně koreluje se severní šířkou jejich původu (Xia a kol., 2015).

Z řádu rovníkřídlných byl geografický gradient v chladové odolnosti sledován na vajíčkách saranče stěhovavé metodou letálního času a teploty. Na hodnotách SCP však tento gradient patrný nebyl (Jing a Kang, 2003).

Tab. 2 Geografický gradient v chladové odolnosti

Řád/podřád	Čeleď	Rod	Druh	Gradient
Coleoptera	Cerambycidae	<i>Psacotha</i>	<i>hilaris</i>	ano ^a
Coleoptera	Curculionidae	<i>Ips</i>	<i>grandicollis</i>	ano ^b
Coleoptera	Curculionidae	<i>Ips</i>	<i>pini</i>	ne ^b
Coleoptera	Curculionidae	<i>Ips</i>	<i>perroni</i>	ne ^b
Coleoptera	Curculionidae	<i>Dendroctonus</i>	<i>frontalis</i>	ne ^b
Coleoptera	Chrysomelidae	<i>Ophraella</i>	<i>communa</i>	ano ^c
Coleoptera	Pyrochroidae	<i>Dendroides</i>	<i>canadensis</i>	ano ^d
Diptera	Agromyzidae	<i>Liriomyza</i>	<i>huidobrensis</i>	ano ^e
Diptera	Drosophilidae	<i>Drosophilla</i>	<i>melanogaster</i>	ano ^f
Diptera	Drosophilidae	<i>Drosophilla</i>	<i>takahashii</i>	ne ^g
Diptera	Drosophilidae	<i>Drosophilla</i>	<i>lutescens</i>	ano ^g
Diptera	Drosophilidae	<i>Drosophilla</i>	<i>albomicans</i>	ano ^{21 h}
Diptera	Drosophilidae	<i>Drosophilla</i>	<i>serrata</i>	ano ⁱ
Heteroptera	Nabidae	<i>Nabis</i>	<i>rugosus</i>	ne ^j
Heteroptera	Nabidae	<i>Nabis</i>	<i>ericetorum</i>	ne ^j
Heteroptera	Nabidae	<i>Nabis</i>	<i>pseudoferum</i>	ne ^j
Heteroptera	Pyrrhocoridae	<i>Pyrrhocoris</i>	<i>apterus</i>	ano ^k
Hymenoptera	Formicidae	<i>Solenopsis</i>	<i>invicta</i>	obrácený ^l
Lepidoptera	Crambidae	<i>Ostrinia</i>	<i>furnacalis</i>	ano ^m
Orthoptera	Acrididae	<i>Locusta</i>	<i>Migratoria</i>	ano ⁿ

Zdroje: (a) Shintani a Ishikawa, 1999; (b) Lombardero a kol., 2000; (c) Zhou a kol., 2010; (d) Kukul a Duman, 1989; (e) Chen a Kang, 2004, (f) Hoffmann a kol., 2002; Ayrinhac a kol., 2004; (g) Kimura a kol., 1994; (h) Isobe a kol., 2013; (i) Hallas a kol., 2002; (j) Roth a Reinhardt, 2009; (k) Kalushkov a Nedvěď, 2000; (l) Quarles a kol., 2005; (m) Xia a kol., 2015; (n) Jing a Kang, 2003

²¹ Pouze u neaklimovaných samců.

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 STUDOVANÝ ORGANISMUS

Pro zkoumání vlivu zeměpisné šířky na chladovou odolnost byla vybrána ruměnice pospolná (*Pyrrhocoris apterus* Linnaeus, 1758). Tento modelový organismus je pro studium chladové odolnosti široce využíván z důvodu svého kosmopolitního rozšíření a jednoduchosti chovu i odchyty.

3.1.1 Habitat a potrava

Jedinci ruměnice pospolné se shlukují do větších skupin poblíž stromů, které mají dostatek slunečního světla. V České republice se živí převážně oříšky lípy srdčité (*Tilia cordata*), semeny ostatních slézovitých rostlin (*Malvaceae*) a trnovníku akátu (*Robinia pseudoacacia*), příležitostně mrtvým hmyzem (Hudec a kol., 2007). Dále je známo, že ruměnice napadají oslabené a čerstvě svlečené jedince vlastního druhu (Socha, 1993). Jedinci přezimují v přízemní vegetaci a pod spadáním listím.

3.1.2 Křídelní formy

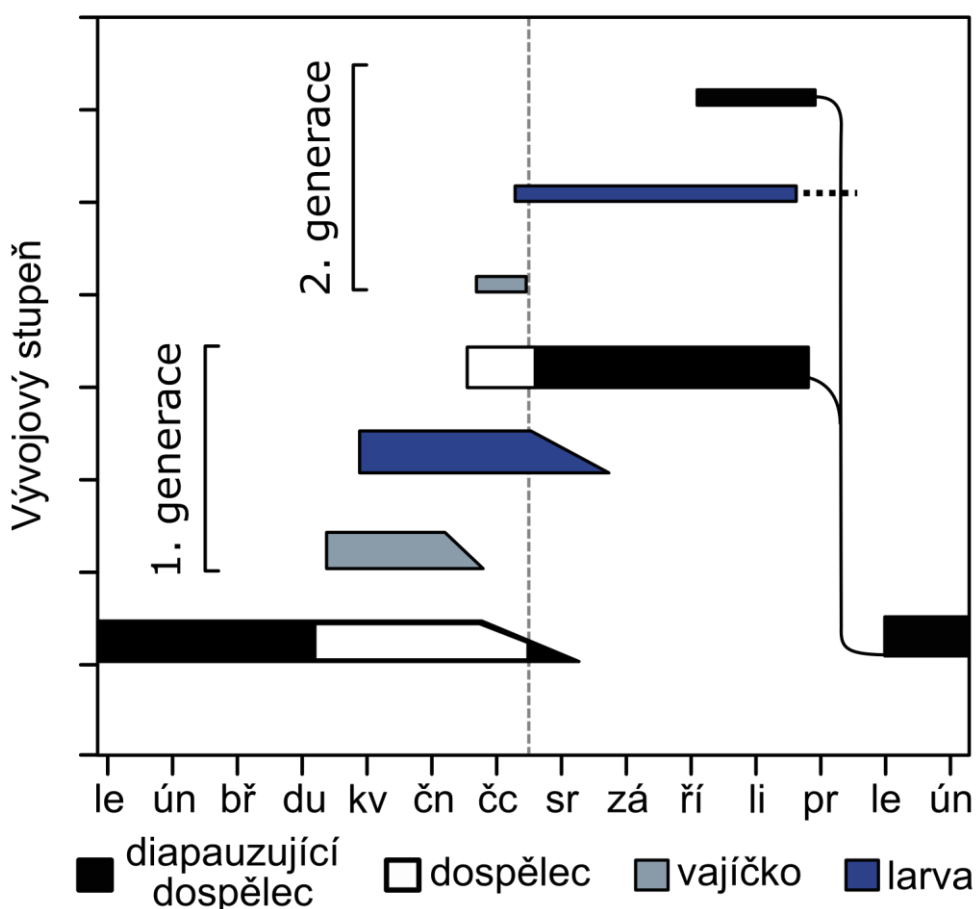
Pyrrhocoris apterus získala své druhové jméno podle formy s redukovanými křídly (brachypterní forma²²). Zřídka se objevuje i makropterní forma s plně vyvinutými křídly. Četnost jejího výskytu je určena geneticky a je zároveň závislá na faktorech prostředí, jako je potrava a hustota populace (Socha, 2004; Macek, 2001). Makropterní jedinci se od brachypterních liší mnoha fyziologickými rysy, nicméně také nejsou schopni letu (Socha, 2004).

3.1.3 Životní cyklus v podmínkách České republiky

Samička naklade v průběhu dubna v přibližně šesti snůškách vajíčka do vyhrabaných komůrek v zemi nebo do listí. Vylíhnutí vajíček je do značné míry ovlivněno teplotou a nejčastěji k němu dochází mezi 10. a 14. dnem. Následuje pět larválních stádií. Dospělci se začínají objevovat v polovině června. Dříve svlečené samičky začínají klást vajíčka, z nichž vzchází druhá generace (tzv. direct breeders). Zimu však přežijí jen ti

²² Apteris znamená bezkřídlý.

jedinci, kteří dosáhnou dospělosti ještě před podzimním klesáním teplot (obr. č. 3) (Košťál a Šimek, 2000; Socha, 1993; Macek, 2001).



Obr. 3 Schéma ročního cyklu podle Košťál a Šimek (2000)

3.2 DESIGN EXPERIMENTU

3.2.1 Sběr a uchování

Pro experiment bylo použito 13 populací. Čas a místo sběru jsou uvedeny v tabulce 3 a na obrázku 4. Ruměnice byly poskytnuty z chovu Davida Doležela (ENTÚ Biologického centra AV ČR). Jednalo se o jedince, kteří nebyli využiti v jeho vlastních výzkumech. Jednotlivé populace byly až do experimentu chovány ve 25 °C při konstantním osvětlení. Voda a potrava²³ byly poskytovány *ad libitum*.

²³ Oříšky lípy srdčité (*Tilia cordata*).

Švédská populace byla bezprostředně po sběru pro účely pokusu rozdělena na dvě dílčí, které byly nazvány pro účely zde prezentovaného výzkumu „Lanna“ a „Stockholm“. Tyto populace byly chovány po celou dobu experimentu odděleně.

Od ostatních populací se odlišuje historie litevské a českobudějovické populace. Litevská populace byla odebrána autorem této práce v říjnu 2015 a odeslána v kartonové krabici (cca 15x15x10cm) poštou do Českých Budějovic. Přeprava trvala tři dny. Jelikož jedinci již vstoupili do diapauzy, nebylo možné použít vajíčka následující generace. Použiti byli jedinci ze zdrojové generace, kteří byli přidáni do aklimačního procesu ve stádiu dospělce. Jako data českobudějovické populace byla použita náhodně vybraná data z jiného experimentu se stejnou metodou aklimace a měření SCP. Jednalo se o jedince F1 generace (první potomky dospělců odchycených v přírodě v prosinci 2014). Rodičovská generace se rozmnožila v průběhu února 2015 po ukončení diapauzy i kviescence teplotou 25 °C a dlouhou fotoperiodou (18:6). Experimentální jedinci byli chováni při krátké fotoperiodě (12:12) a 20-22 °C až do dospělosti, kde prošli stejným aklimačním režimem i měření SCP (viz níže) jako ostatní populace. Dosud nepublikovaná data této českobudějovické populace poskytl školitel DP (Tomáš Ditrich).



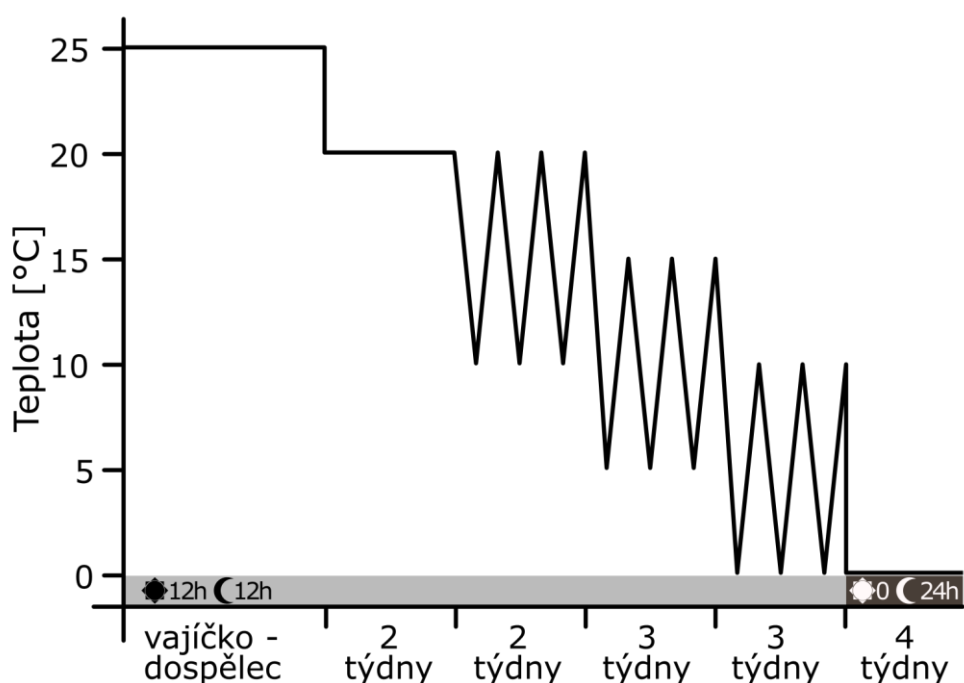
Obr. 4 Mapa míst sběru (červeně jsou vyznačeny populace, které nevstoupily do diapauzy)

Tab. 3 Místa a čas sběru populací, generace použita v pokusu

Populace	Původ	Generace	Datum sběru
Aachen (GER)	50°49'56.8"N 06°03'01.6"E	7.	červen 2014
Alatskivi (EST)	58°35'31.7"N 27°07'29.8"E	31.	červen 2010
Cordoba (ESP)	37°53'21.5"N 04°47'51.7"W	17.	srpen 2012
Č. Budějovice (CZE)	48°59'37.3"N 14°32'30.1"E	1.	2015
Glyfada (GR)	37°52'46.1"N 23°46'06.2"E	33.	srpen 2009
Hoge Veluwe (NL)	52°04'57.7"N 05°50'00.2"E	19.	červen 2012
Lanna (SWE)	59°12'00.0"N 18°09'00.0"E	36.	duben 2010
Marseille (FR)	43°17'35.9"N 05°21'35.6"E	58.	červen 2004
Novi Sad (SRB)	45°15'41.4"N 19°51'19.4"E	30.	červen 2011
Sofia (BG)	42°42'00.0"N 23°19'12.0"E	27.	2011
Stockholm (SWE)	59°12'00.0"N 18°09'00.0"E	36.	duben 2010
Toila (EST)	59°24'57.6"N 27°31'02.3"E	33.	2010
Vilnius (LT)	54°41'41.9"N 25°15'34.8"E	0.	říjen 2015

3.2.2 Aklimace

Jedinci byli od stádia vajíčka až po dosáhnutí stádia dospelce vystaveni konstantní teplotě 25 °C a fotoperiodě krátkého dne, tj. 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Následovaly dva týdny při konstantní teplotě 20 °C, dva týdny při kolísání teplot 20 °C při světle a 10 °C při tmě, tři týdny při 15 a 5 °C, tři týdny při 10 a 0 °C a na závěr čtyři týdny při trvalé tmě a 0 °C (obr. 5). Jedinci byli umístění ve sklenicích o přibližném objemu 250 ml, ve které byly poskládané filtrační papíry do tvaru „harmoniky“. Na dno byla vysypána vrstva lipových oříšků. Do každé sklenice překryté jemnou síťovinou byla umístěna skleněná zkumavka naplněná odstátou vodou, zavřená natěsno smotanou buničinou.



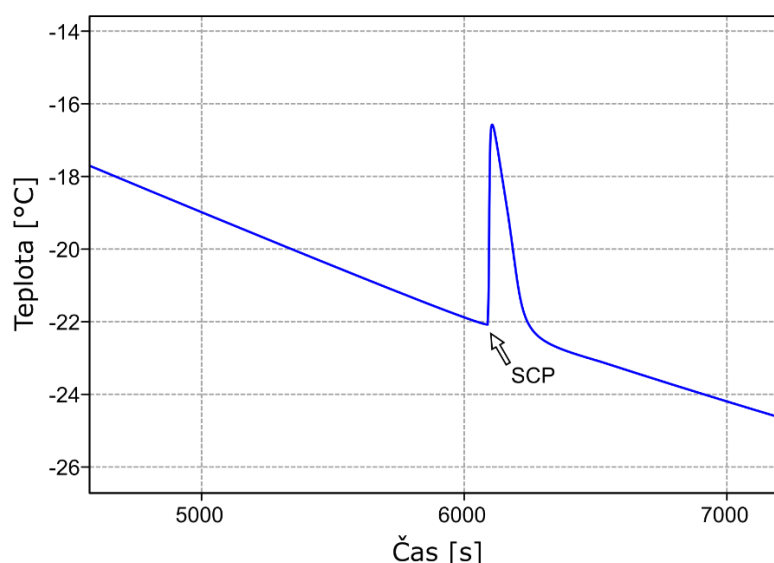
Obr. 5 Časové a teplotní schéma aklimace, schéma fotoperiody

3.2.3 Měření SCP

Pro stanovení míry chladové odolnosti byla použita metoda měření SCP. Hodnota SCP byla měřena u každého jedince zvlášť. Pro měření bylo použito zařízení termologger TC-08 (Pico Technology, UK) a program PicoLogger (tataž společnost), z kterého byla následně odečtena hodnota SCP. Při přenášení jedinců a přípravě do mikrozkuvek byla sklenice s rumenicemi položena na ledu, aby byly vystaveny pokojové teplotě po co nejkratší dobu. Jedinci byli postupně vloženi každý do své mikrozkuvky. Při čemž bylo dbáno na řádné osušení vatou, jelikož led v přímém kontaktu s tělem

ruměnice by mohl zvýšit jejich SCP. Na ruměnici byl přiložen konec termočlánu a přidán kousek vaty tak, aby se jedinec nemohl hýbat a zůstal v přímém kontaktu s koncem termočlánu. Mikrozkuřavka byla uzavřena víčkem, v kterém byl otvor pro termočlánek. Mikrozkuřavky byly umístěny po 32 (byly použity čtyři termologger, každý s osmi termočlány) do hliníkového bloku, který byl ponořen do cca 20 litrů denaturovaného etanolu a podložen tak, aby hliníkový blok vyčníval centimetr nad hladinu a nedošlo tak ke kontaktu etanolu s mikrozkuřavkami. Ethanol se chladil chladícím zařídím rychlostí cca 0,19 °C/min (tj. 11 °C/hod). Rovnoměrné klesání teploty bylo zajištěno míchací hlavou. Počáteční teplota etanolu se pohybovala v rozmezí 0 až -3 °C.

Hodnoty SCP byly odečteny z grafu znázorňujícího teplotu na termočlánu. Jako SCP je brána nejnižší naměřená teplota před zvýšením teploty způsobeného uvolněním latentního tepla vlivem krystalizace (exothermou) (obr. 6).



Obr. 6 Příklad záznamu teploty a odečtení hodnoty SCP (v tomto případě se SCP rovná -22 °C)

Protože jednotlivé termočlány termologgerů udávají mírně odlišné teploty i při naprosto shodných podmínkách, byly termologgery zkalibrovány. Kalibrace termočlánu byla provedena na začátku a na konci experimentu. Termočlány byly svázané co nejbliže k sobě a vloženy na 15 minut do tajícího ledu (tedy do teploty 0 °C). Po skončení experimentu byly naměřené hodnoty každého jednotlivého termočlánu odečteny od získaných hodnot SCP.

3.3 ANALÝZA DAT

Z naměřených hodnot SCP byl vypočítán průměr, medián, desátý percentil²⁴ a první kvartil²⁵ pro jednotlivé populace. Průměr a medián SCP byly použity proto, že jde o nejčastější uváděné statistiky při měření SCP hmyzu. Další percentily (0,1 a 0,25) přitom mohou být ekologicky relevantnější – odpovídají teplotě, při které ještě přežije dostatečně velká část populace. Všechny tyto hodnoty byly následně porovnávány s minimálními a průměrnými zimními teplotami daných lokalit (viz níže) jednoduchou lineární regresí. Ve všech případech je uvedena dosažená hladina významnosti (p) a hodnota korelačního koeficientu (r) podle programu Statistica 13 (Dell, Statsoft, Tulsa, OK). Na pohlaví nebyl brán zřetel, jelikož nemá prokazatelný vliv na hodnoty SCP (Kalushkov a Nedvěd, 2000 i analýza těchto dat).

3.4 KLIMATICKÁ DATA

Použity byly teplotní záznamy za leden a únor z let 2010 až 2015. Hodnoty SCP byly porovnávány s minimální teplotou (Tmin) a průměrnou teplotou (Twin) za dané období. Průměrné teploty byly použity, jelikož se při srovnávání chladové odolnosti na geografickém gradientu obvykle používají. Minimální teploty jsou použity, protože formují chladovou odolnost jednotlivých populací. Většina dat byla získána od národních hydrometeorologických ústavů v elektronické podobě prostřednictvím e-mailu: pro Toilu a Alatskivi (EST) od Keskkonnaagentuur, pro České Budějovice (CZ) od Českého hydrometeorologického ústavu, pro Glyfadu (GR) od Εθνική Μετεωρολογική Υπηρεσία a pro Vilnius (LT) od Lietuvos hidrometeorologijos tarnyba. Část dat byla odečtena z volně přístupných materiálů: pro Aachen (GER) a Hoge Veluwe (NL) na webových stránkách Koninklijk Nederlands Meteorologisch Instituut²⁶ a Републички хидрометеоролошки завод pro Novi Sad (SRB)²⁷. Data pro zbylé lokality (Cordoba (ESP), Sofia (BG), Lanna a Stockholm(SWE)) se nepodařilo získat od státních hydrometeorologických ústavů. Z toho důvodu byla použita data z webových stránek www.weatherunderground.com

²⁴ Teplota, při které přežije 10% populace.

²⁵ Teplota, při které přežije 25% populace.

²⁶ <http://projects.knmi.nl/klimatologie/daggegevens/selectie.cgi>

²⁷ http://www.hidmet.gov.rs/ciril/meteorologija/klimatologija_godisnjaci.php

Pro Cáchy (Aachen) byla použita data z nizozemské meteorologické stanice Valkenburg (vzdáleno 15 km), jelikož cášská meteorologická stanice (5 km) přestala měřit v roce 2011.

3.5 SEZNAM POUŽÍVANÝCH ZKRATEK

SCP	supercooling point – bod podchlazení
LT50	letální teplota – teplota, při které zemře 50 % jedinců
Lt50	letální čas – čas, po kterém zemře polovina jedinců
LLT	lower lethal temperature – dolní letální limit
ULT	upper lethal temperature – horní letální teplota
Tmin	minimální teplota v letech 2010–2015
Twin	průměrná teplota za měsíce leden a únor v letech 2010–2015
BG	Bulharsko
CZ	Česká republika
ESP	Španělsko
EST	Estonsko
FR	Francie
GER	Německo
GR	Řecko
LT	Litva
NL	Nizozemsko
SRB	Srbsko
SWE	Švédsko

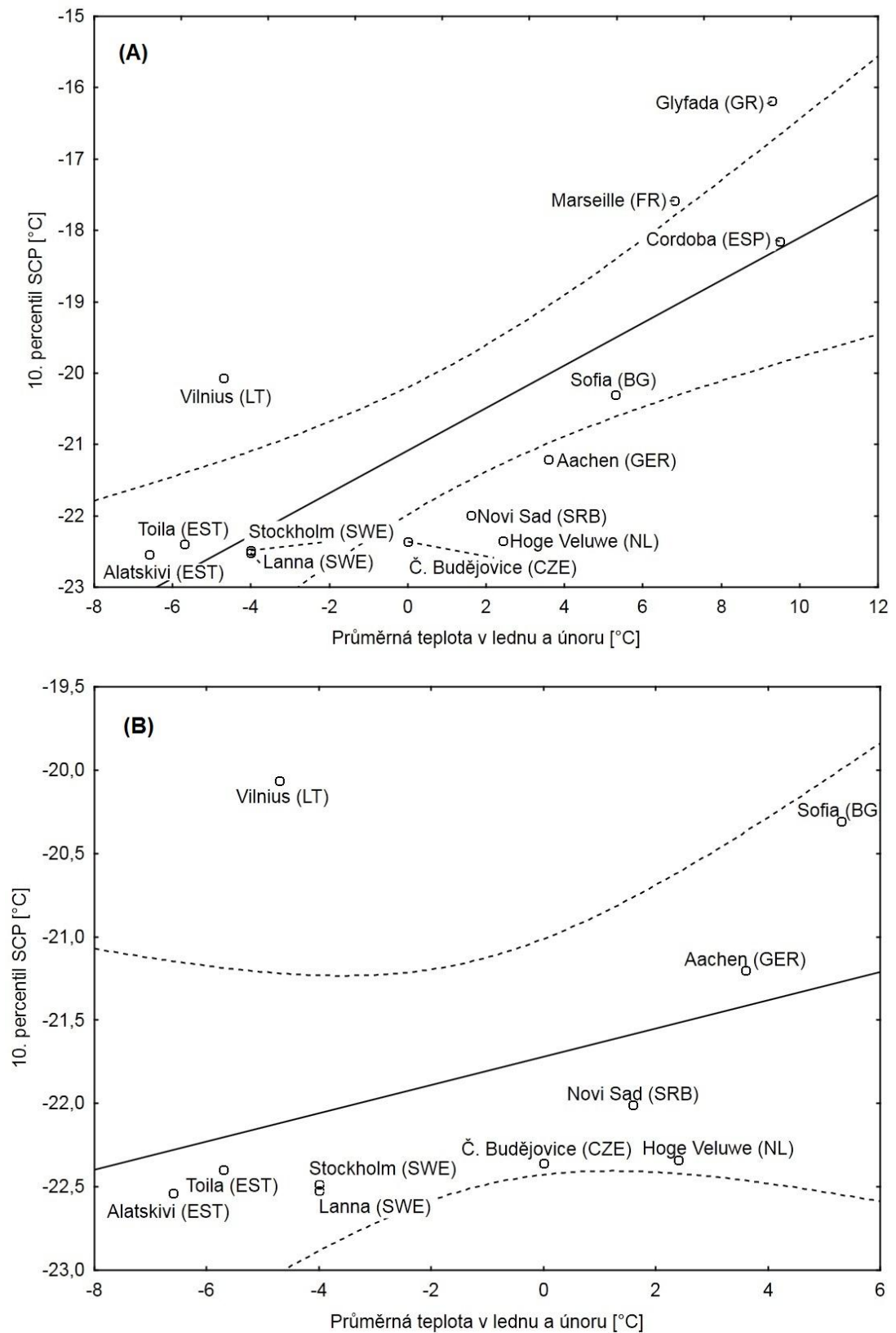
4 VÝSLEDKY

Po provedení experimentu bylo zjištěno, že minimálně někteří jedinci tří jižních populací (Marseille, Glyfada a Cordoba) nevstoupili do diapauzy. Vystává tedy otázka, zda je možné nediapauzující jedince zařadit do souboru analyzovaných dat. V této kapitole jsou proto uvedeny výsledky včetně i vyjma nediapauzujících jedinců. Uvedený problém je řešen v diskusi.

4.1 VZTAH PRŮMĚRNÉ ZIMNÍ TEPLoty A SCP

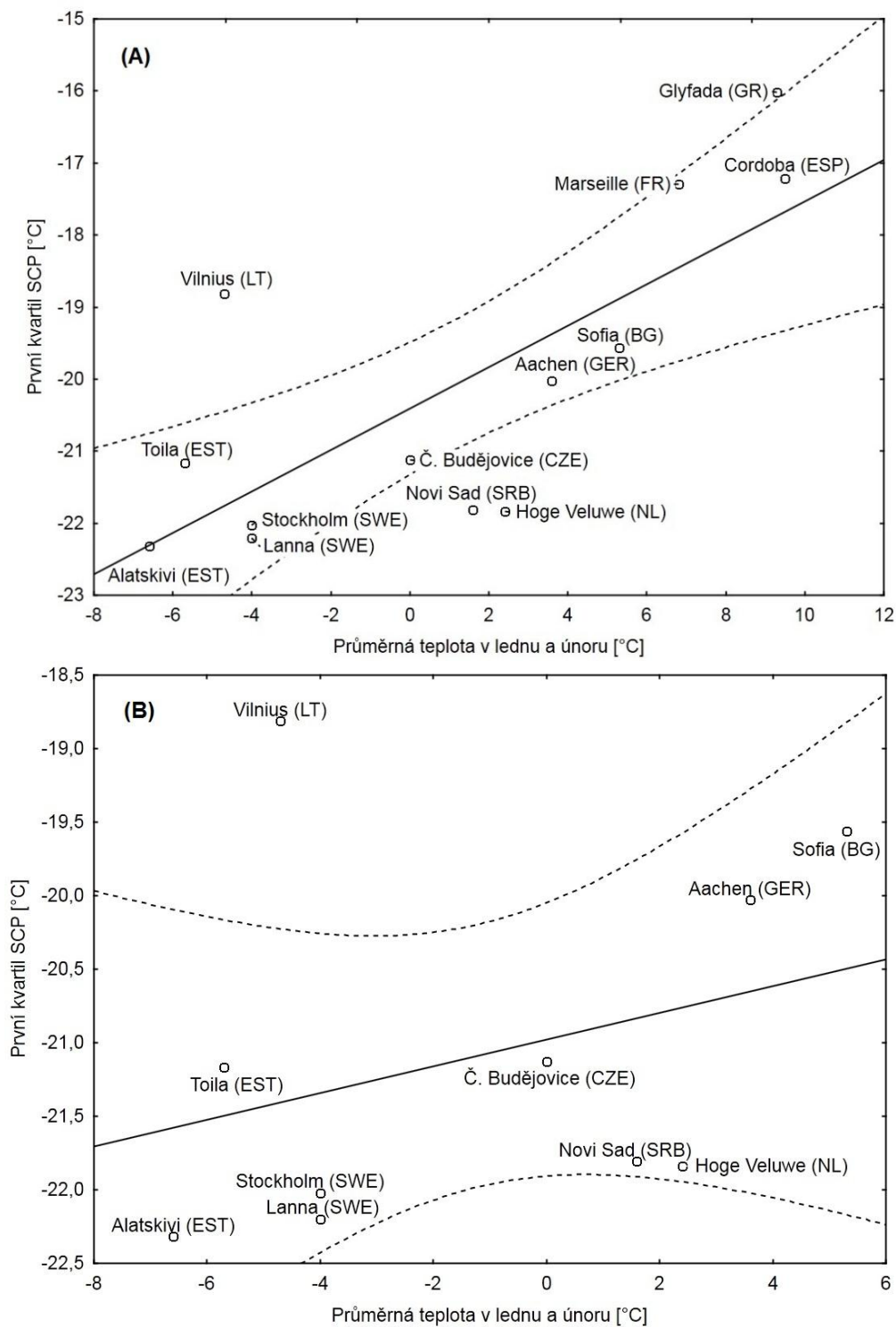
Při zahrnutí všech populací byl vzájemný vztah průměrných zimních teplot a 10. percentilu SCP (obr. 7) vysoce průkazný ($r = 0,77$; $p = 17 \times 10^{-4}$; 10. percentil = $-21,09 + 0,2984 \times T_{win}^{28}$). Po vyjmutí nediapauzujících populací průkazný nebyl ($r = 0,38$; $p = 0,27$; 10. percentil = $-21,72 + 0,0845 \times T_{win}$).

²⁸ T_{win} – průměrná teplota za měsíce leden a únor v letech 2010–2015.



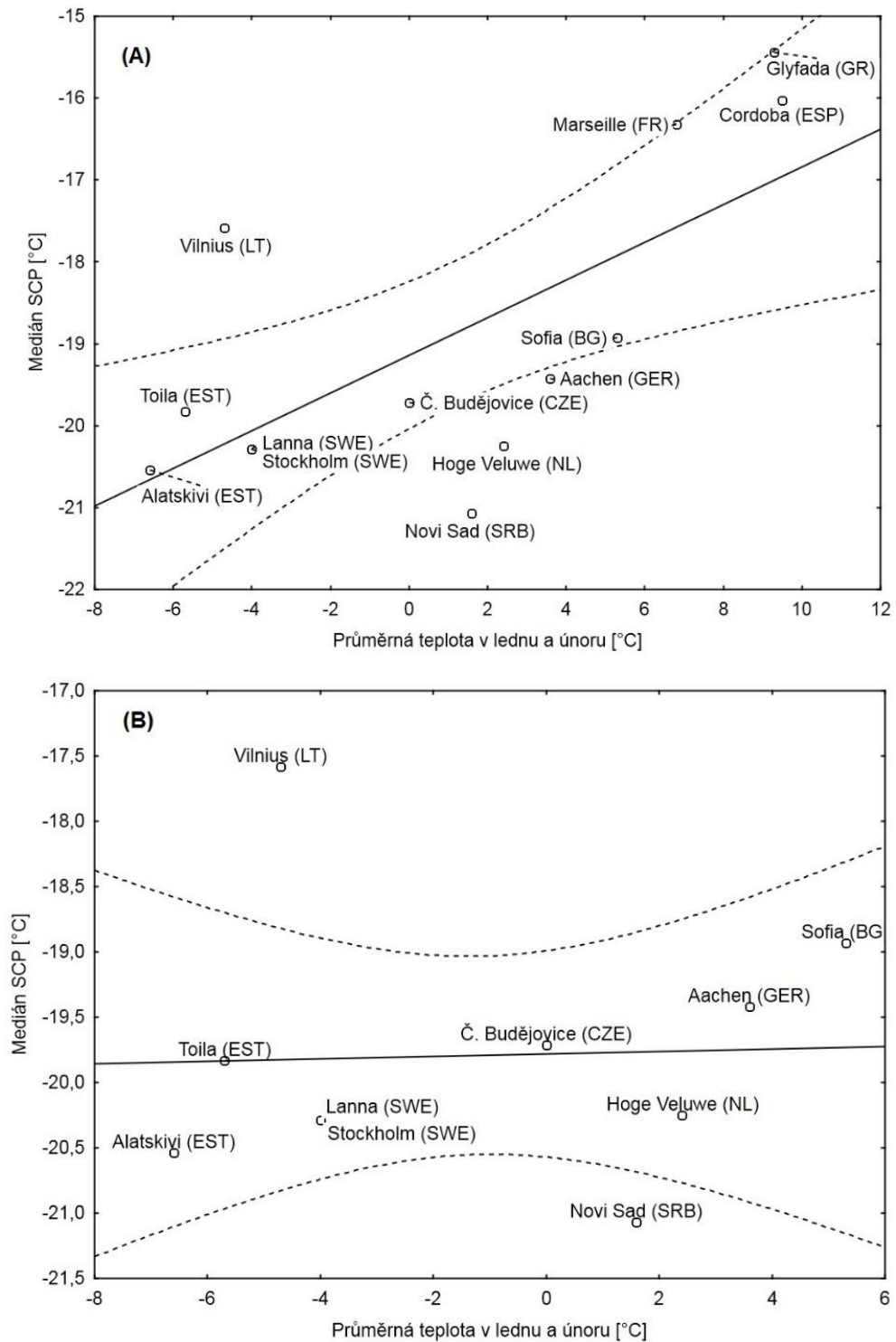
Obr. 7 Lineární regresní model znázorňující vztah průměrné zimní teploty a 10. percentilu SCP jednotlivých populací včetně (A) a vyjma (B) nediapauzujících populací. Regrese byla (A), resp. nebyla (B) průkazná. Čárkovaně je vymezen 95% konfidenční interval regresní přímky.

Vzájemný vztah průměrných zimních teplot a 1. kvartilu SCP všech populací (obr. 8) je vysoce průkazný ($r = 0,75$; $p = 0,002$; 25. percentil = $-20,41 + 0,2871 \times T_{win}$). Po vyjmutí nediapauzujících populací průkazný není ($r = 0,31$; $p = 0,36$; 25. percentil = $-20,98 + 0,0910 \times T_{win}$).



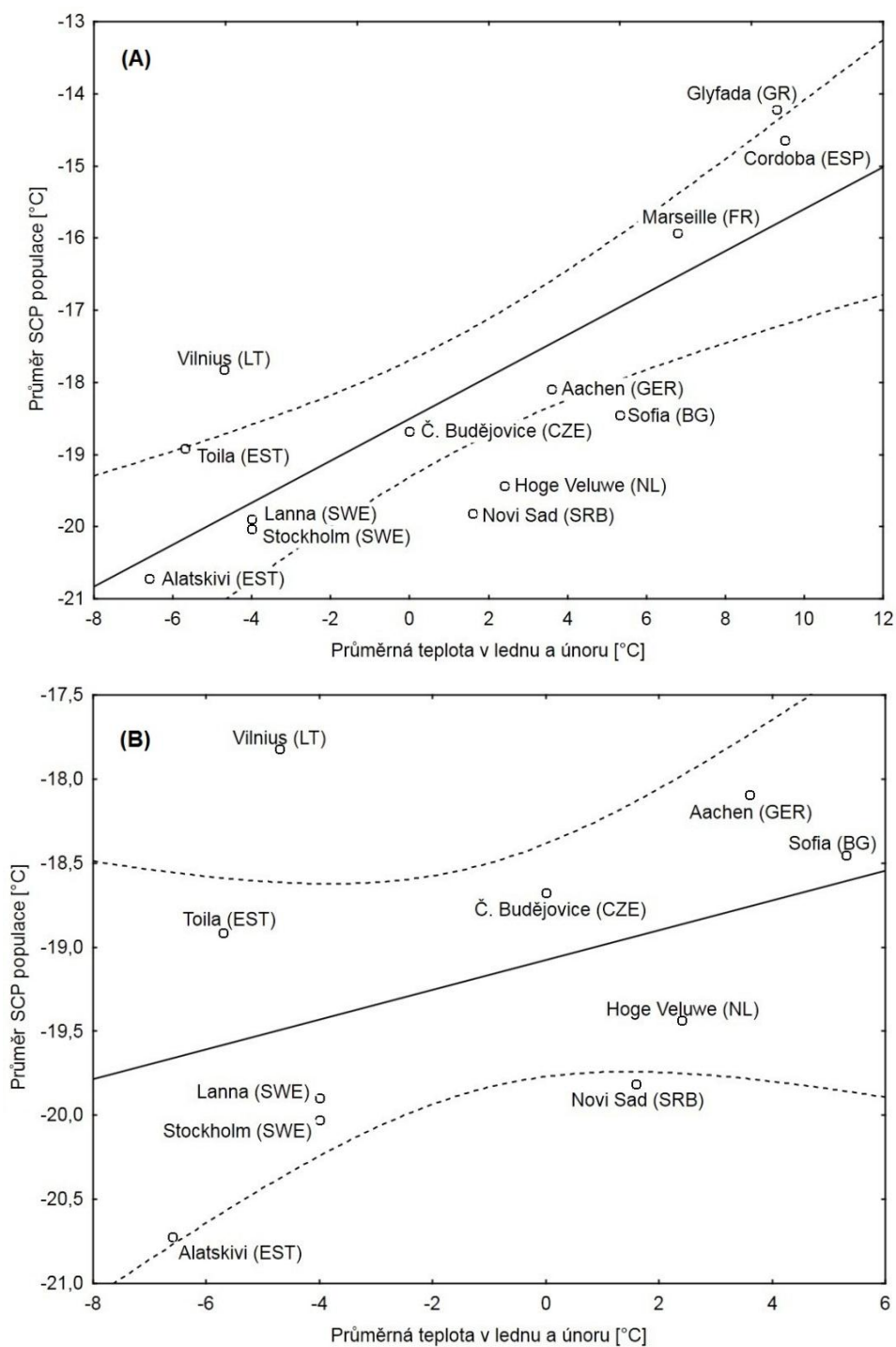
Obr. 8 Lineární regresní model znázorňující vztah průměrné zimní teploty a 1. kvartilu SCP jednotlivých populací včetně (A) a vyjma (B) nediapauzujících populací. Regrese byla (A), resp. nebyla (B) průkazná. Čárkovaně je vymezen 95% konfidenční interval regresní přímky.

Při použití dat všech populací je vztah průměrných teplot a mediánu SCP jednotlivých populací (obr. 9) průkazný ($r = 0,68$; $p = 0,009$; medián SCP = $-19,14 + 0,2298 \times T_{win}$). Po vyloučení nediapauzujících případů je tento vztah neprůkazný ($r = 0,03$; $p = 0,91$; medián SCP = $-19,78 + 0,0091 \times T_{win}$).



Obr. 9 Lineární regresní model znázorňující vztah průměrné zimní teploty a mediánu SCP jednotlivých populací včetně (A) a vyjma (B) nediapauzujících populací. Regrese byla (A), resp. nebyla (B) průkazná. Čárkovaně je vymezen 95% konfidenční interval regresní přímky.

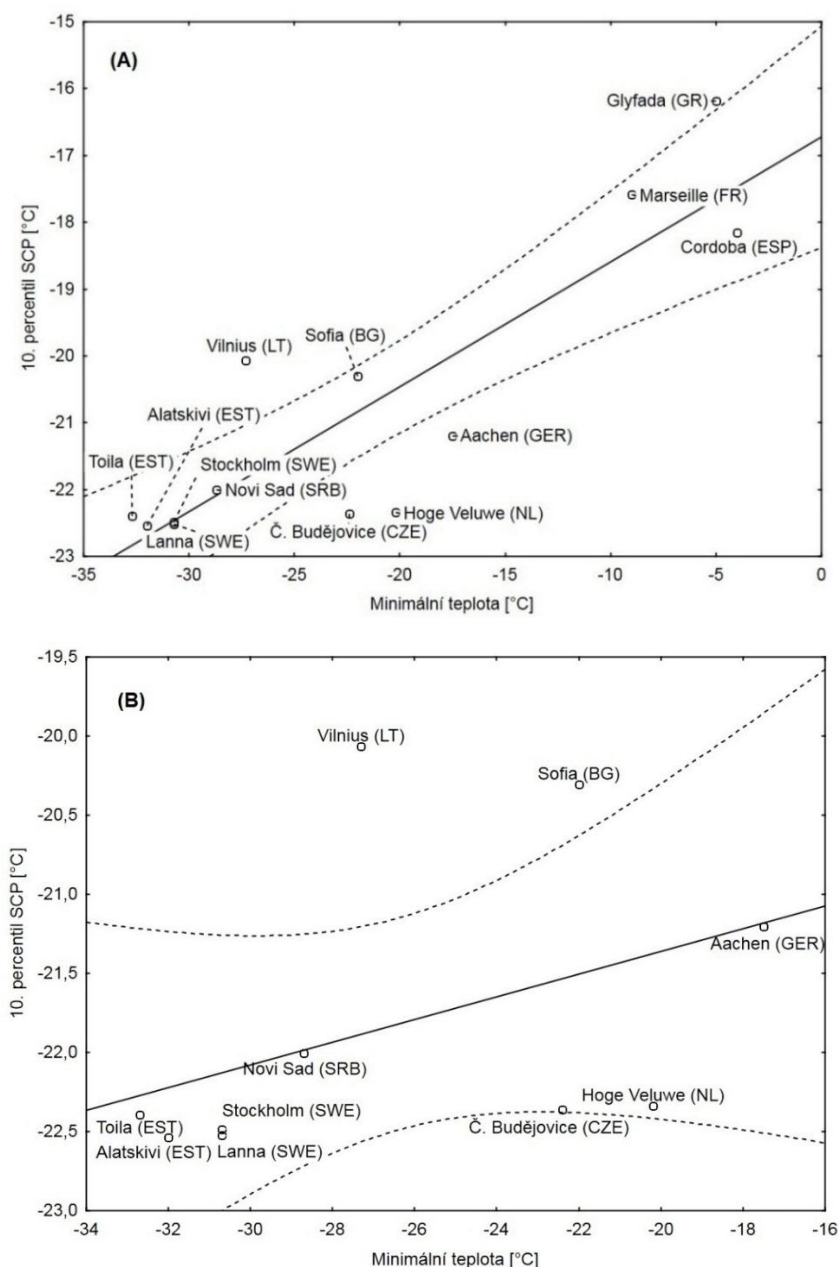
Nejužší korelace z SCP hodnot (průměr, 10., 25., 50., 75. a 90. percentil) se objevuje u aritmetického průměru SCP. Jeho vztah k průměrným teplotám (obr. 10) je při použití dat všech populací průkazný ($r = 0,79$; $p = 0,001$; průměr SCP = $-18,50 + 0,2904 \times T_{win}$). Po vyloučení nediapauzujících populací je korelace neprůkazná ($r = 0,40$; $p = 0,24$; průměr SCP = $-19,08 + 0,0886 \times T_{win}$).



Obr. 10 Lineární regresní model znázorňující vztah průměrné zimní teploty a aritmetického průměru SCP jednotlivých populací včetně (A) a vyjma (B) nediapauzujících populací. Regrese byla (A), resp. nebyla (B) průkazná. Čárkovane je vymezen 95% konfidenční interval regresní přímky.

4.2 VZTAH MINIMÁLNÍCH TEPLOT A SCP

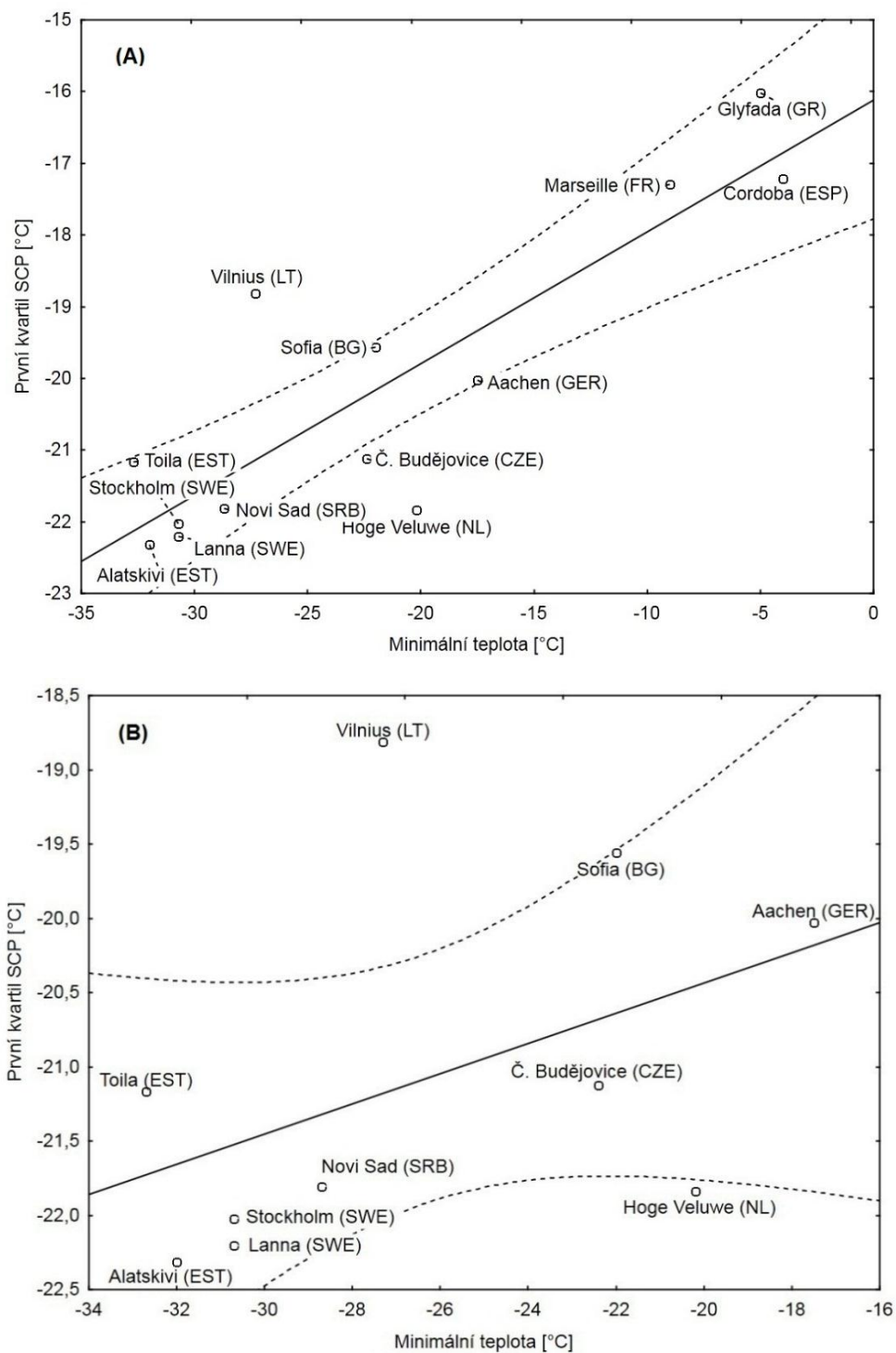
Minimální teploty korelovaly s hodnotami SCP vždy lépe než teploty průměrné. Při zahrnutí všech populací byl vzájemný vztah minimálních teplot a 10. percentilu (obr. 11) SCP vysoce průkazný ($r = 0,87$; $p = 1 \times 10^{-4}$; 10. percentil = $-16,73 + 0,1867 \times T_{min}^{29}$). Bez nediapauzujících populací je tento vztah neprůkazný ($r = 0,41$; $p = 0,23$; 10. percentil = $-19,93 + 0,0717 \times T_{min}$).



Obr. 11 Lineární regresní model znázorňující vztah minimální teploty a 10. percentilu SCP jednotlivých populací včetně (A) a vyjma (B) nediapauzujících populací. Regrese byla (A), resp. nebyla (B) průkazná. Čárkovaně je vymezen 95% konfidenční interval regresní přímky.

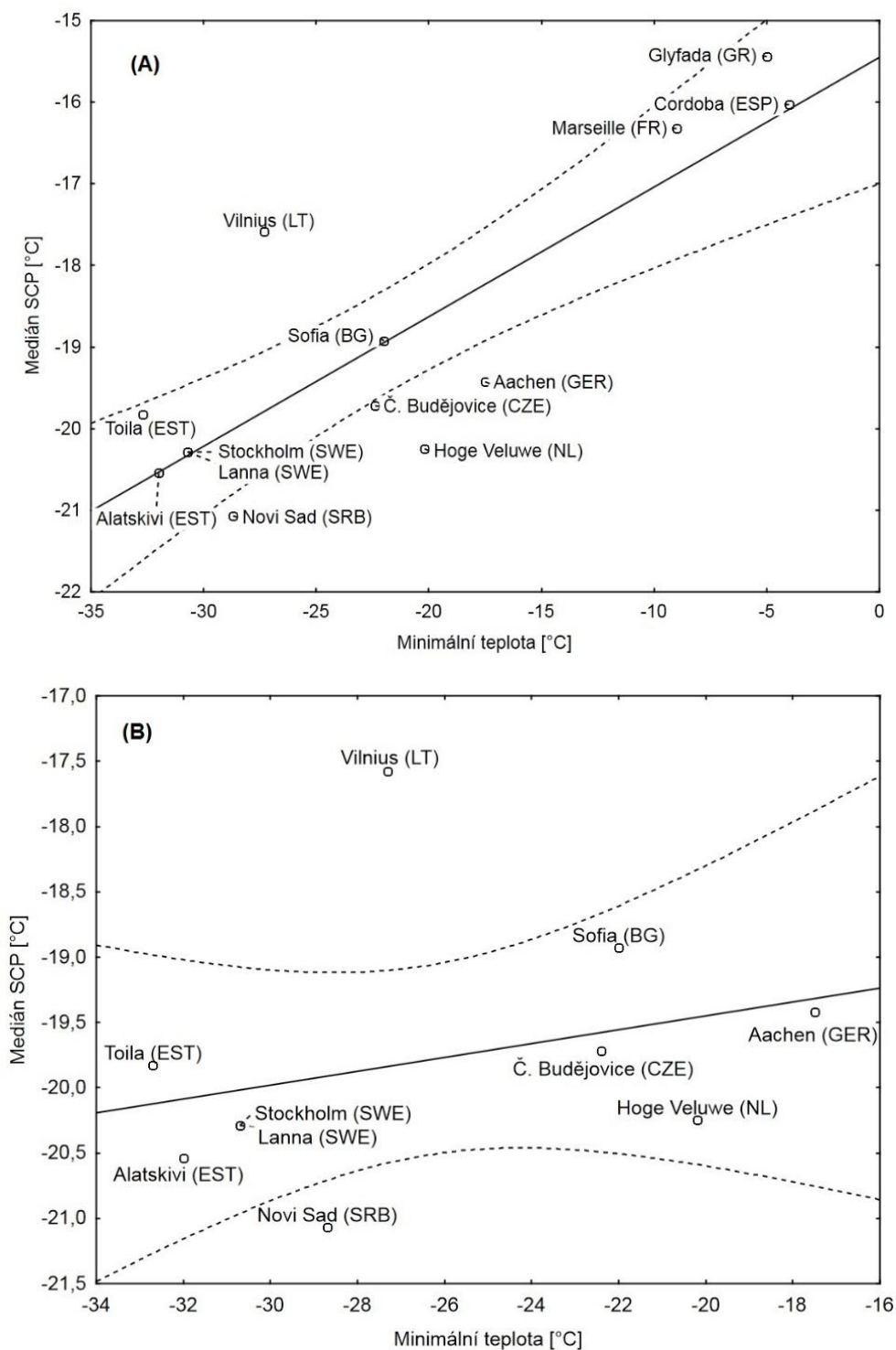
²⁹ T_{min} – minimální teplota v letech 2010–2015.

Při použití dat všech populací je vztah minimálních teplot a 1. kvartilu SCP (obr. 12) průkazný ($r = 0,86$; $p = 1 \times 10^{-4}$; 25. percentil = $-16,11 + 0,1839 \times T_{min}$). Po vyloučení nediapauzujících případů je tento vztah neprůkazný ($r = 0,45$; $p = 0,18$; 25. percentil = $-18,40 + 0,1017 \times T_{min}$).



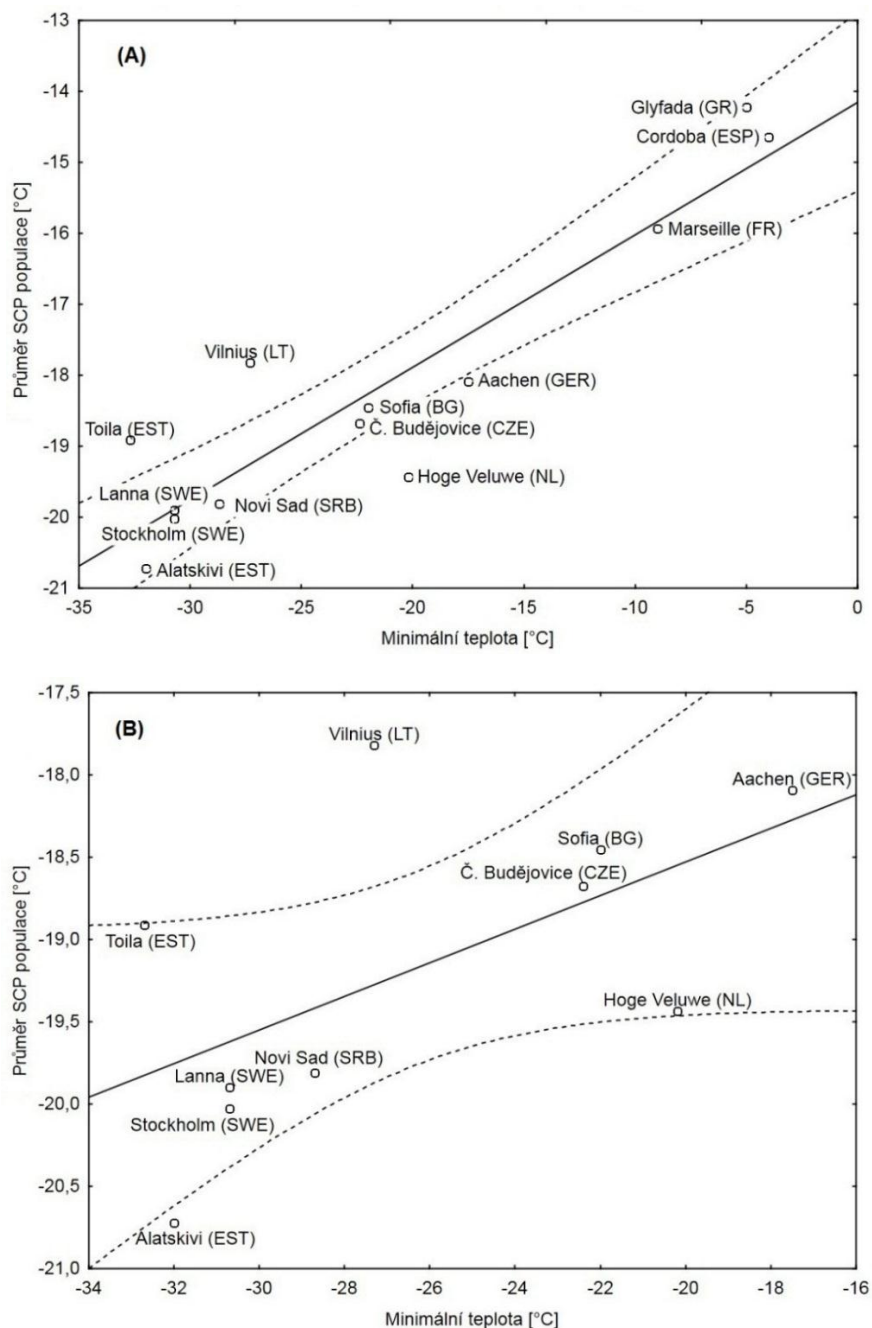
Obr. 12 Lineární regresní model znázorňující vztah minimální teploty a prvního kvartilu SCP jednotlivých populací včetně (A) a vyjma (B) nediapauzujících populací. Regrese byla (A), resp. nebyla (B) průkazná. Čárkovaně je vymezen 95% konfidenční interval regresní přímky.

Vztah minimálních hodnot a mediánu SCP všech populací (obr. 13) je průkazný ($r = 0,84$; $p = 2 \times 10^{-4}$; medián SCP = $-15,45 + 0,1590 \times T_{min}$). Stejný vztah u pouze diapauzujících populací je neprůkazný ($r = 0,29$; $p = 0,40$; medián SCP = $-18,38 + 0,0533 \times T_{min}$).



Obr. 13 Lineární regresní model znázorňující vztah minimální teploty a mediánu SCP jednotlivých populací včetně (A) a vyjma (B) nediapauzujících populací. Regrese byla (A), resp. nebyla (B) průkazná. Čárkovaně je vymezen 95% konfidenční interval regresní přímky.

Nejužší korelace ve vztahu ke klimatickým podmínkám z SCP hodnot³⁰ dosahuje aritmetický průměr. Ve spojení s minimálními teplotami místa sběru (obr. 14) všech populací je tento vztah nejprůkaznější ($r = 0,91$; $p = 9 \times 10^{-6}$; průměr SCP = $-14,15 + 0,1866 \times T_{min}$). Po vyjmutí nediapauzujících populací tento vztah průkaznost ztrácí ($r = 0,59$; $p = 0,07$; průměr SCP = $-16,49 + 0,1019 \times T_{min}$).



Obr. 14 Lineární regresní model znázorňující vztah minimální teploty a aritmetického průměru SCP jednotlivých populací včetně (A) a vyjma (B) nediapauzujících populací. Regrese byla (A), resp. nebyla (B) průkazná. Čárkovaně je vymezen 95% konfidenční interval regresní přímky.

³⁰ Průměr, medián, 10. a 25. percentil.

5 DISKUSE

5.1 VARIABILITA CHLADOVÉ ODOLNOSTI *PYRRHOCORIS APTERUS*

Celkově lze konstatovat, že se chladová odolnost ruměnice *P. apterus* mění v závislosti na geografické poloze, přičemž populace z oblastí s mírnějším klimatem mají spíše nižší chladovou odolnost. Vysoce průkazná závislost SCP na klimatických podmínkách však byla narušena, jestliže byly z analýzy vyňaty výsledky tři nediapauzujících populací (problém těchto nediapauzujících populací je více diskutován dále).

I bez zahrnutí nediapauzujících populací je tato závislost pozorovatelná, ačkoli není průkazná. Na první pohled se odlišují zejména výsledky populace z Vilnius, která má nižší chladovou odolnost (vyšší SCP) než odpovídá ostatním populacím při zjištěné závislosti na klimatických podmínkách. Tato litevská populace však prošla zcela odlišnou historií, než ostatní populace – SCP bylo zjišťováno přímo u jedinců sebraných v terénu, zatímco všechny ostatní populace byly již aspoň jednu generaci v laboratorním chovu. Kdyby se tato populace z výsledků rovněž vyjmula, závislost chladové odolnosti na klimatických podmínkách by určitě byla přesvědčivější.

5.2 NEDIAPAUZUJÍCÍ POPULACE

Otázka, zda je možné použít i data tří nediapauzujících populací, nemá zcela jasnou odpověď. Je sice pravda, že diapauza silně ovlivňuje míru chladové odolnosti a že úzká vázanost SCP na $Lt50$ platí pouze u diapauzujících jedinců (Hodková a Hodek, 1997), nicméně všechny populace byly vystaveny stejným podmínkám vyvolávajícím diapauzu. Pokud jižnější populace nebyly schopny v těchto podmínkách diapauzu spustit, s největší pravděpodobností u nich k nástupu diapauzy nedochází. To znamená, že mají jižní populace jinou strategii ochrany před zmrznutím. Je možné, že SCP jižních nediapauzujících jedinců je snižováno výhradně aklimatizací a to do větší míry než u populací, které jsou schopné do diapauzy vstoupit. Z toho vyplývá, že i u nediapauzujících populací by SCP mělo určitou výpovědní hodnotu. Absence diapauzy je pro jižní populace výhodnější, jelikož diapauza s sebou přináší nevýhody v podobě nemožnosti se rozmnožit a spotřeby energie. Některé organismy proto

snižují riziko nepřežití populace tím, že část populace diapauzu podstoupí a část ne (Hou a kol, 2016). Tato strategie byla pozorována u marseillské populace při předchozím pokusu (T. Ditrich, ústní sdělení).

5.3 GEOGRAFICKÝ GRADIENT V CHLADOVÉ ODOLNOSTI

Z porovnání výsledků vyplývá, že s hodnotami SCP lépe korelují minimální teploty. Populace z lokalit s nižší průměrnou teplotou totiž nemusí mít nižší hodnoty SCP, pokud jsou porovnávány s populacemi, které žijí ve vyšších průměrných teplotách, nicméně jsou, byť jednorázově, vystaveni výrazně nižší teplotě. O přežití jedinců obecně rozhodují extrémní hodnoty podmínek prostředí (v tomto případě teplotní minima) spíše než průměry. Z této korelace lze usuzovat na selekční funkci chladu i četnost úmrtí způsobených zmrznutím.

Výsledky tohoto pokusu jednoznačně vztah zeměpisné šířky a chladové odolnosti u *P. apterus* neprokázaly. Je však pravděpodobné, že by se tak stalo, kdyby byl použit lepší postup. Uvádím dva návrhy, jak by bylo možné experiment vylepšit:

- 1) použitím populací, které byly uchovány v laboratorních podmínkách po stejný počet generací, a to nejlépe co nejdříve po sběru. Dlouhý pobyt ve stejných podmínkách může po několika generacích rozdílnost v chladové odolnosti stírat. Mezi sběrem první a poslední populace v tomto experimentu byl rozdíl větší než 11 let, což představuje 58 generací. Použití zdrojové generace³¹ v případě litevské populace by mohlo vysvětlit její nízkou míru chladové odolnosti. Na druhou stranu z podobnosti výsledků švédských populací lze usuzovat na charakter změn chladové odolnosti v laboratorních podmínkách. Jestliže se totiž obě populace výrazně podobají hodnotami SCP i po 6 letech (tj. 36 generací) ve fotoperiodě dlouhého dne a 25 °C, je možné toto zjištění vysvětlit buď stálostí SCP, nebo podobným tempem klesání míry chladové odolnosti. V prvním případě by nezáleželo, zda jsou populace ve stejných laboratorních podmínkách ze stejné generace. V druhém případě by výsledky

³¹ Generace, které byla odebrána v terénu. Jedinci byli vloženi do aklimačního procesu až jako dospělci.

testu nebyly ovlivněny délkou uchovávání v laboratorních podmínkách, pokud by byli použiti jedinci stejné populace.

- 2) Přidáním jedinců z lokalit s nižší zeměpisnou šířkou. Například v populaci z Marseille se vyskytovali i jedinci schopní vstoupit do diapauzy, bohužel v tomto výzkumu byli pohromadě s nediapauzními jedinci. Jednoduše odlišit diapauzní a nediapauzní jedince z jedné populace bez kontroly stavu gonád (neinvazivními metodami) je přitom komplikované a nejednoznačné.

5.4 CHLADOVÁ ODOLNOST JAKO DĚDIČNÝ ZNAK

Fakt, že při použití všech populací je vztah minimální teploty a průměrné SCP vysoce průkazný i po několika generacích, poukazuje na to, že míra chladové odolnosti je u *P. apterus* dědičně předávaným znakem (Kalushkov a Nedvěd, 2000) a nikoli projevem fenotypické plasticity, jako je tomu například u octomilek (Ayrinhac a kol., 2004).

6 ZÁVĚR

Vztah zeměpisné šířky a míry chladové odolnosti u jedinců ruměnice pospolné nebyl touto prací jednoznačně potvrzen. Její výsledky ovšem naznačují jeho existenci. Práce upozorňuje na možné problémy při studiu vlivu zeměpisné šířky na chladovou odolnost. Jsou to především nediapauzující populace z jižněji položených lokalit a rozdílná doba uchovávání populací v laboratorních podmínkách.

Zajímavým poznatkem je stabilita chladové odolnosti nebo stejný směr jejích změn u rozdělené švédské populace po 36 generací v laboratorních podmínkách.

Problematiku vztahu chladové odolnosti a místa původu jedinců i problematiku chladové odolnosti u nediapauzujících populací je potřeba dále studovat.

SEZNAM LITERATURY

- ADDO-BEDIAKO, A., S. L. CHOWN a K. J. GASTON. 2000. Thermal tolerance, climatic variability and latitude. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. **267**(1445), str. 739-745. DOI: 10.1098/rspb.2000.1065. ISSN 0962-8452. Dostupné také z: <http://rspb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rspb.2000.1065>
- AYRINHAC, A., V. DEBAT, P. GIBERT, A. G. KISTER, H. LEGOUT, B. MORETEAU, R. VERGILINO a J. R. DAVID. 2004. Cold adaptation in geographical populations of *Drosophila melanogaster*: phenotypic plasticity is more important than genetic variability. *Functional Ecology*. **18**(5), str. 700-706. DOI: 10.1111/j.0269-8463.2004.00904.x. ISSN 0269-8463. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.0269-8463.2004.00904.x>
- BALE, J. S. 1993. Classes of Insect Cold Hardiness. *Functional Ecology*. **7**(6), str. 751-753.
- DANKS, H. V. 1996. The wider integration of studies on insect cold-hardiness. *European Journal of Entomology*. **93**(3), str. 383-403. ISSN 12105759. Dostupné také z: <http://www.eje.cz/artkey/eje-199603-0010.php>
- DEUTSCH, C. A., J. J. TEWKSBURY, R. B. HUEY, K. S. SHELDON, C. K. GHALAMBOR, D. C. HAAK a P. R. MARTIN. 2008. Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **105**(18), str. 6668-6672. DOI: 10.1073/pnas.0709472105. ISSN 0027-8424. Dostupné také z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0709472105>
- DITRICH, T. a V. KOŠŤÁL. 2011. Comparative analysis of overwintering physiology in nine species of semi-aquatic bugs (Heteroptera: Gerromorpha). *Physiological Entomology*. **36**(3), 261-270. DOI: 10.1111/j.1365-3032.2011.00794.x. ISSN 03076962. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3032.2011.00794.x>
- GASTON, K. J. a S. L. CHOWN. 1999a. Elevation and Climatic Tolerance: A Test Using Dung Beetles. *Oikos*. **86**(3), str. 584-590. DOI: 10.2307/3546663. ISSN 00301299. Dostupné také z: <http://www.jstor.org/stable/3546663?origin=crossref>
- GASTON, K. J. a S. L. CHOWN. 1999b. Why Rapoport's Rule Does Not Generalise. *Oikos*. **84**(2), str. 309-312. DOI: 10.2307/3546727. ISSN 00301299. Dostupné také z: <http://www.jstor.org/stable/3546727?origin=crossref>
- HALLAS, R., M. SCHIFFER a A. A. HOFFMANN. 2002. Clinal variation in *Drosophila serrata* for stress resistance and body size. *Genetics Research*. **79**(2), str. 141-148. DOI: 10.1017/S0016672301005523. ISSN 0016-6723. Dostupné také z: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0016672301005523
- HANČ, Z. a O. NEDVĚD. 1999. Chill injury at alternating temperatures in *Orchesella cincta* (Collembola: Entomobryidae) and *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Pyrrhocoridae). *European Journal of Entomology*. **96**(2), str. 165-168. ISSN 12105759. Dostupné také z: <http://www.eje.cz/artkey/eje-199902-0010.php>
- HANZÁK, J., J. MOUCHA a J. ZAHRADNÍK. 1973. *Světlem zvířat: V. díl (2. část) Bezobratlí*. 1. Paha: Albatros. 456 s. ISBN 13-214-KMČ-80.

- HODKOVÁ, M., P. ŠIMEK, H. ZAHRADNÍČKOVÁ a O. NOVÁKOVÁ. 1999. Seasonal changes in the phospholipid composition in thoracic muscles of a heteropteran, *Pyrrhocoris apterus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. **29**(4), str. 367-386. DOI: 10.1016/S0965-1748(99)00011-9. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0965174899000119>
- HODKOVÁ, M. a I. HODEK. 1997. Temperature Regulation of Supercooling and Gut Nucleation in Relation to Diapause of *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Heteroptera). *Cryobiology*. **34**, str. 70-79.
- HOFFMANN, A. A., A. ANDERSON a R. HALLAS. 2002. Opposing clines for high and low temperature resistance in *Drosophila melanogaster*. *Ecology Letters*. **5**(5), str. 614-618. DOI: 10.1046/j.1461-0248.2002.00367.x. ISSN 1461-023x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1461-0248.2002.00367.x>
- HOU, Y.-Y., L.-Z. XU, Y. WU, P. WANG, J.-J. SHI a B.-P. ZHAI. 2016. Geographic Variation of Diapause and Sensitive Stages of Photoperiodic Response in *Laodelphax striatellus* Fallén (Hemiptera: Delphacidae). *Journal of Insect Science*. **16**(1), str. 13. DOI: 10.1093/jisesa/iev161. ISSN 1536-2442. Dostupné také z: <http://jinsectscience.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/jisesa/iev161>
- HUDEK, K. 2007. *Příroda České republiky: průvodce faunou*. Praha: Academia. 440 s. ISBN 978-80-200-1569-3.
- CHEN, Ch.-P. a V. K. WALKER. 1994. Cold-shock and chilling tolerance in *Drosophila*. *Journal of Insect Physiology*. **40**(8), str. 661-669. DOI: 10.1016/0022-1910(94)90093-0. ISSN 00221910. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022191094900930>
- CHEN, B. a L. KANG. 2004. Variation in Cold Hardiness of *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae) Along Latitudinal Gradients. *Environmental Entomology*. **33**(2), str. 155-164. DOI: 10.1603/0046-225X-33.2.155. ISSN 0046225x. Dostupné také z: <http://ee.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1603/0046-225X>
- CHOWN, S. L., A. ADDO-BEDIAKO a K. J. GASTON. 2002. Physiological variation in insects: large-scale patterns and their implications. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. **131**(4), str. 587-602. DOI: 10.1016/S1096-4959(02)00017-9. ISSN 10964959. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096495902000179>
- ISOBE, K., A. TAKAHASHI a K. TAMURA. 2013. Cold tolerance and metabolic rate increased by cold acclimation in *Drosophila albomicans* from natural populations. *Genes*. **88**(5), str. 289-300. DOI: 10.1266/ggs.88.289. ISSN 1341-7568. Dostupné také z: https://www.jstage.jst.go.jp/article/ggs/88/5/88_289/_article
- IUPS THERMAL COMMISSION. 2001. Glossary of terms for thermal physiology: Third Edition. *The Japanese Journal of Physiology*. **51**(2), str. 245-280.
- JING, X.-H. a L. KANG. 2003. Geographical variation in egg cold hardiness: a study on the adaptation strategies of the migratory locust *Locusta migratoria* L. *Ecological Entomology*. **28**(2), str. 151-158. DOI: 10.1046/j.1365-2311.2003.00497.x. ISSN 0307-6946. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2311.2003.00497.x>

- KALUSHKOV, P., M. HODKOVÁ, O. NEDVĚD a I. HODEK. 2001. Effect of thermoperiod on diapause intensity in *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera Pyrrhocoridae). *Journal of Insect Physiology*. **47**(1), str. 55-61.
- KALUSHKOV, P. a O. NEDVĚD. 2000. Cold hardiness of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Pyrrhocoridae) from central and southern Europe. *European Journal of Entomology*. **97**(2), str. 149-153. DOI: 10.14411/eje.2000.027. ISSN 12105759. Dostupné také z: <http://www.eje.cz/doi/10.14411/eje.2000.027.html>
- KIMURA, M. T., T. OHTSU, T. YOSHIDA, T. AWASAKI a F. J. LIN. 1994. Climatic adaptations and distributions in the *Drosophila takahashii* species subgroup (Diptera: Drosophilidae). *Journal of Natural History*. **28**(2), str. 401-409. DOI: 10.1080/00222939400770181. ISSN 0022-2933. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00222939400770181>
- KOŠŤÁL, V., M. ŠLACHTA a P. ŠIMEK. 2001. Cryoprotective role of polyols independent of the increase in supercooling capacity in diapausing adults of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Insecta). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. **130**(3), str. 365-374. DOI: 10.1016/S1096-4959(01)00441-9. ISSN 10964959. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096495901004419>
- KOŠŤÁL, V. a P. ŠIMEK. 2000. Overwintering strategy in *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera): the relations between life-cycle, chill tolerance and physiological adjustments. *Journal of Insect Physiology*. **46**(9), str. 1321-1329. DOI: 10.1016/S0022-1910(00)00056-1. ISSN 00221910. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022191000000561>
- KUKAL, O. a J. G. DUMAN. 1989. Switch in the overwintering strategy of two insect species and latitudinal differences in cold hardiness. *Canadian Journal of Zoology*. **67**(4), str. 825-827. DOI: 10.1139/z89-121. ISSN 0008-4301. Dostupné také z: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/z89-121>
- LAWTON, J. H. 1999. Are There General Laws in Ecology? *Oikos*. **84**(2), str. 177-192. DOI: 10.2307/3546712. ISSN 00301299. Dostupné také z: <http://www.jstor.org/stable/3546712?origin=crossref>
- LOMBARDERO, M. J., M. P. AYRES, B. D. AYRES a J. D. REEVE. 2000. Cold Tolerance of Four Species of Bark Beetle (Coleoptera: Scolytidae) in North America. *Environmental Entomology*. **29**(3), str. 421-432. DOI: 10.1603/0046-225X-29.3.421. ISSN 0046-225x. Dostupné také z: <http://ee.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1603/0046-225X-29.3.421>
- MACEK, J. 2001. *Bezobratlí*. Praha: Albatros. 170 s. Svět zvířat (Albatros). ISBN 80-000-0918-8.
- NEDVĚD, O. 2000. Snow white and the seven dwarfs: a multivariate approach to classification of cold tolerance. *Cryo Letters*. **21**(6), 339-348.
- PRICE, P. W., G. W. FERNANDES, A. Gh. F. LARA, J. BRAWN, H. BARRIOS, M. G. WRIGHT, S. P. RIBEIRO a N. ROTHCLIFF. 1998. Global patterns in local number of insect galling species. *Journal of Biogeography*. **25**(3), str. 581-591. DOI: 10.1046/j.1365-

2699.1998.2530581.x. ISSN 0305-0270. Dostupné také z:
<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2699.1998.2530581.x>

- QUARLES, A., R. M. KOSTECKE, S. A. PHILLIPS a S. GOLDSMITH. 2005. Supercooling of the Red Imported Fire Ant (Hymenoptera: Formicidae) on a Latitudinal Temperature Gradient in Texas. *The Southwestern Naturalist*. **50**(3), str. 302-306. DOI: 10.1894/0038-4909(2005)050[0302:SOTRIF]2.0.CO;2. ISSN 0038-4909. Dostupné také z: [http://www.bioone.org/doi/abs/10.1894/0038-4909\(2005\)050\[0302:SOTRIF\]2.0.CO;2](http://www.bioone.org/doi/abs/10.1894/0038-4909(2005)050[0302:SOTRIF]2.0.CO;2)
- RENAULT, D., C. SALIN, G. VANNIER a P. VERNON. 2002. Survival at low temperatures in insects: what is the ecological significance of the supercooling point? *Cryo Letters*. **23**(4), str. 217-228.
- ROTH, S. a K. REINHARDT. 2009. Sexual dimorphism in winter survival rate differs little between damselbug species (Heteroptera: Nabidae). *European Journal of Entomology*. **106**(1), str. 37-41. DOI: 10.14411/eje.2009.005. ISSN 12105759. Dostupné také z: <http://www.eje.cz/doi/10.14411/eje.2009.005.html>
- SHINTANI, Y. a Y. ISHIKAWA. 1999. Geographic variation in cold hardiness of eggs and neonate larvae of the yellow-spotted longicorn beetle *Psacotha hilaris*. *Physiological Entomology*. **24**(2), str. 158-164. DOI: 10.1046/j.1365-3032.1999.00126.x. ISSN 0307-6962. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-3032.1999.00126.x>
- SINCLAIR, B. J. a S. L. CHOWN. 2005. Climatic variability and hemispheric differences in insect cold tolerance: support from southern Africa. *Functional Ecology*. **19**(2), str. 214-221. DOI: 10.1111/j.1365-2435.2005.00962.x. ISSN 0269-8463. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2435.2005.00962.x>
- SINCLAIR, B. J., L. E. COELLO ALVARADO a L. V. FERGUSON. 2015. An invitation to measure insect cold tolerance: Methods, approaches, and workflow. *Journal of Thermal Biology*. **53**, str. 180-197. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2015.11.003. ISSN 03064565. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306456515301339>
- SOCHA, R.: 1993. *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera) - an experimental model species: A review. *European Journal of Entomology*. **90**, str. 241-286.
- SOCHA, R. 2004. Decreased mating propensity of macropterous morph in a flightless wing-polymorphic insect, *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera). *European Journal of Entomology*. **101**(4), str. 539-545. DOI: 10.14411/eje.2004.077. ISSN 12105759. Dostupné také z: <http://www.eje.cz/doi/10.14411/eje.2004.077.html>
- SUNDAY, J. M., A. E. BATES a N. K. DULVY. 2011. Global analysis of thermal tolerance and latitude in ectotherms. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. **278**(1713), str. 1823-1830. DOI: 10.1098/rspb.2010.1295. ISSN 0962-8452. Dostupné také z: <http://rspb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rspb.2010.1295>
- ŠLACHTA, M., P. BERKOVÁ, J. VAMBERA a V. KOŠŤAL. 2002. Physiology of cold-acclimation in non-diapausing adults of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera). *European Journal of Entomology*. **99**(2), str. 181-187. DOI: 10.14411/eje.2002.026. ISSN 12105759. Dostupné také z: <http://www.eje.cz/doi/10.14411/eje.2002.026.html>

- TUNOCK, W. J. a R. P. BODNARYK. 1993. The reversal of cold injury and its effect on the response to subsequent cold exposures. *Cryo Letters*. **14**(4), str. 251-256.
- TURNOCK, W. J., G. BOIVIN a R. A. RING. 1998. Interpopulation differences in the coldhardiness of *Delia radicum* (Diptera: anthomyiidae). *The Canadian Entomologist*. **130**(2), str. 119-129. DOI: 10.4039/Ent130119-2. ISSN 0008-347x. Dostupné také z: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0008347X00010427
- TURNOCK, William J. a P. G. FIELDS. 2005. Winter climates and coldhardiness in terrestrial insects. *European Journal of Entomology*. **102**(4), str. 561-576. DOI: 10.14411/eje.2005.081. ISSN 12105759. Dostupné také z: <http://www.eje.cz/doi/10.14411/eje.2005.081.html>
- XIE, H.-C., D.-S. LI, H.-G. ZHANG, Ch. E. MASON, Z.-Y. WANG, X. LU, W.-Z. CAI a K.-L. HE. 2015. Seasonal and geographical variation in diapause and cold hardiness of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis*. *Insect Science*. **22**(4), str. 578-586. DOI: 10.1111/1744-7917.12137. ISSN 16729609. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1744-7917.12137>
- ZHOU, Z.-S., J.-Y. GUO, J. P. MICHAUD, M. LI a F.-H. WAN. 2011. Variation in cold hardiness among geographic populations of the ragweed beetle, *Ophraella communa* LeSage (Coleoptera: Chrysomelidae), a biological control agent of *Ambrosia artemisiifolia* L. (Asterales. *Biological Invasions*. **13**(3), str. 659-667. DOI: 10.1007/s10530-010-9857-x. ISSN 1387-3547. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10530-010-9857-x>