

**ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE**

**FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ**

**KATEDRA EKOLOGIE**



**Úspěšnost přezimování sluněček: vliv podmínek prostředí na přežívání  
jedinců a jejich energetické zásoby**

Overwintering performance in ladybirds: effects of environmental  
conditions on survival rate and energy reserve use

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Vedoucí práce: Ing. Michal Knapp, Ph.D.

Diplomant: Bc. Aneta Hurková

**2022**

# ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Aneta Hurková

Aplikovaná ekologie

Název práce

**Úspěšnost přezimování sluněček: vliv podmínek prostředí na přežívání jedinců a jejich energetické zásoby**

Název anglicky

**Overwintering performance in ladybirds: effects of environmental conditions on survival rate and energy reserve use**

### Cíle práce

Cílem první části diplomové práce bude vytvořit literární rešerši popisující problematiku přezimování hmyzu, specificky pak vliv teploty a vlhkosti na přežívání hmyzu a hospodaření jedinců s energetickými zásobami během zimy.

Cílem druhé části diplomové práce bude zrealizovat dlouhodobý přezimovací experiment v různých podmínkách prostředí (lokality s různou teplotou a vlhkostí), kdy bude měřeno přežívání jedinců, dopady velikosti těla na jejich přežívání a tělesná kondice (obsah tuku) přeživších sluněček. Diskutován bude i vliv patogenů na přežívání sluněček a výsledky doplňujícího manipulativního experimentu zkoumajícího dopady relativní vlhkosti vzduchu na úspěšnost přezimování sluněček.

### Metodika

Pro tvorbu literární rešerše budou použity různé informační zdroje, především vědecké články dohledané pomocí databáze Web of Science a odborné knihy. Rešeršní část se vedle obecného zaměření na přezimování hmyzu bude specificky věnovat vlivu teploty a vlhkosti na přezimování hmyzu, vlivu velikosti těla na přežívání a hospodaření hmyzu s energetickými zásobami. Závěrečná část literární rešerše se zaměří na popis biologie čeledi sluněčkovitých (Coleoptera: Coccinellidae), zvláště pak druhu *Harmonia axyridis*, slouží jako modelový druh pro praktickou část práce.

Sluněčka budou opakovaně sebrána během podzimu 2018-2020 v lokalitě Ohaře, kde se každoročně vyskytují velké zimovacích agregace sluněček východních. Část jedinců bude během podzimu usmrcena mrazem a okamžitě změřena (délka těla, obsah tuku) a zbývající jedinci budou rozděleni do skupinek po 30ti jedincích a umístěni v plastových krabičkách k přezimování na různé lokality v ČR. V brzkém jaře (březen 2019, 2020 a 2021) budou krabičky dopraveny do laboratoře ČZU, přežívání každého jedince bude zkontrolováno a přeživší jedinci budou opět proměřeni (délka těla, obsah tuku). Průběh teplot a relativní vlhkosti vzduchu během přezimování bude zaznamenán pomocí dataloggerů umístěných těsně vedle krabiček se sluněčky. Jako doplňující pilotní experimenty bude provedeno 1) měření vlivu parazitické houby *Hesperomyces virescens* na přežívání sluněček a 2) měření dopadů manipulativního zvýšení vzdušné vlhkosti na přežívání sluněček východních.

**Doporučený rozsah práce**

cca 40 stran textu + přílohy

**Klíčová slova**

ekofyziologie, přezimování hmyzu, přežívání, teplota, velikost těla, vlhkost

---

**Doporučené zdroje informací**

- Knapp and Řeřicha (2020) Effects of the winter temperature regime on survival, body mass loss and post-winter starvation resistance in laboratory-reared and field-collected ladybirds. *Scientific Reports* 10: 4970.
- Leather et al. (1993) *The Ecology of Insect Overwintering*. Cambridge University Press. 255 pp.
- Sinclair (2015) Linking energetics and overwintering in temperate insects. *Journal of Thermal Biology* 54: 5-11.
- Spacht et al. (2021) Fine-scale variation in microhabitat conditions influences physiology and metabolism in an Antarctic insect. *Oecologia* 197: 373-385.
- Williams et al. (2015) Cold truths: how winter drives responses of terrestrial organisms to climate change. *Biological Reviews* 90: 214-235.
- 

**Předběžný termín obhajoby**

2021/22 LS – FZP

**Vedoucí práce**

Ing. Michal Knapp, Ph.D.

**Garantující pracoviště**

Katedra ekologie

**Konzultant**

Ing. Michal Řeřicha

Elektronicky schváleno dne 24. 2. 2022

**prof. Mgr. Bohumil Mandák, Ph.D.**

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 25. 2. 2022

**prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.**

Děkan

V Praze dne 10. 03. 2022

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma: úspěšnost přezimování slunéček: vliv podmínek prostředí na přežívání jedinců a jejich energetické zásoby vypracovala samostatně a citovala jsem všechny informační zdroje, které jsem v práci použila, a které jsem rovněž uvedla na konci práce v seznamu použitých informačních zdrojů.

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

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

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

V Praze dne 10.3.2022

.....

(podpis autora práce)

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala rodině za jejich podporu, trpělivost a povzbuzování během mého celého studia. Dále děkuji Ing. Michalu Řeřichovi za pomoc během provádění experimentální a statistické analýzy dat. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat vedoucímu práce Ing. Michalu Knappovi, Ph.D. za jeho velkou ochotu a vstřícnost během poskytování odborných rad a jeho pozitivní přístup k práci.

## Abstrakt

Jedním z nejdůležitějších environmentálních faktorů určujícím přežití hmyzu během přezimování jsou zimní teploty. I pro diapauzující hmyz má teplota výrazný vliv na hospodaření s energetickými zásobami a přežívání během zimy. Ve své diplomové práci jsem pokračovala ve dlouhodobém experimentu, který navazuje na mou bakalářskou práci, o vlivu teploty během přezimování na energetické zásoby. V této práci je měřeno přežívání jedinců, dopady velikosti těla na jejich přežívání a tělesná kondice (relativní obsah tuku) přeživších jedinců. Dále jsou zahrnuty doplňující pilotní experimenty, kdy bylo provedeno měření vlivu parazitické houby *Hesperomyces virescens* (Laboulbeniales: Laboulbeniaceae) na přežívání přezimujících slunéček a měření dopadů manipulativního zvýšení vzdušné vlhkosti na přežívání přezimujících slunéček. Jako modelový druh jsem použila ve své práci invazní slunéčko východní, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae).

Po dobu 3 let byli jedinci slunéčka východního během přezimování vystavováni přirozeným zimním teplotám na různých lokalitách v České republice a bylo měřeno jejich přežívání. Měření obsahu tuku se sestávalo ze tří fází. Měření suché hmotnosti, dále pomocí louhování roztoku diethyletheru s chloroformem probíhalo odstranění tuku z těl brouků, a nakonec byla měřena suchá libová hmotnost jedinců, což umožnilo vypočítat obsah tuků v těle brouků.

Okolní teplota se ukázala být velice silným prediktorem zimního přežívání slunéček. Ve své práci jsem dále potvrdila vliv přezimování na tělesnou kondici slunéček. Pro všechny přezimující jedince druhu *Harmonia axyridis* byla zaznamenána statisticky průkazně nižší tělesná kondice po zimě ve srovnání se stavem před přezimováním. Residuály obsahů tuků se průkazně lišily i mezi pohlavími. Vliv teploty během přezimování na tělesnou kondici nebyl statisticky průkazný. Samotné přežívání je průkazně negativně ovlivněno přítomností parazitů, v mém případě napadením houbou *Hesperomyces virescens*. Pilotní experiment zkoumající vliv vlhkosti vzduchu potvrdil, že zvýšení vlhkosti má pozitivní dopady na přežívání slunéček, především, když okolní teploty jsou nadprůměrné.

## Klíčová slova

Ekofyziologie, přezimování hmyzu, přežívání, teplota, velikost těla, vlhkost

## **Abstract**

One of the most important environmental factors which significantly affect insect survival during overwintering are winter temperatures. Even for diapausing insects temperature significantly affects energetic stores and survival during winter. This work is based on long-term research which was launched during my bachelor thesis titled 'How are energetic stores in insects affected by temperature regime during overwintering?'. In the present Diploma thesis I investigated how ladybird survival depends on ambient temperature and if environmental temperature affects ladybird body conditions (relative fat content). In addition, I investigated effect of parasitic fungus *Hesperomyces virescens* (Laboulbeniales: Laboulbeniaceae) and consequences of changes in air humidity on ladybird winter survival. Invasive ladybird *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) was used as the model species for all experiments.

Over a period of three years, adult ladybirds were exposed to natural winter temperatures at various locations across the Czech Republic. Ladybird winter survival was recorded, and measurement of body condition (relative fat content) was performed for a subset of ladybirds. The measurement consisted of three phases: 1) dry mass measurement, 2) leaching ladybirds in a solution of diethylether and chloroform to remove fat from their bodies, and finally 3) the measurements of dry lean mass.

Ambient temperature was very strong predictor of winter survival of ladybirds. In addition, the negative effect of overwintering on body condition of ladybirds was confirmed, however it was not significantly related to winter temperature. Interestingly, post-overwintering body condition differed between sexes, males being in a better condition. Ladybird survival was negatively affected by occurrence of parasitic fungi, in this case by fungus *Hesperomyces virescens*. The last pilot experiment confirmed the significant effects of humidity on ladybirds. Increased humidity had positive effect on ladybirds survival especially when ambient temperature are above average.

## **Keywords**

Ecophysiology, overwintering of insect, survival, temperature, body size, humidity

# Obsah

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | Úvod.....  | 9  |
| 2     | Cíle práce .....   | 11 |
| 3     | Literární rešerše .....  | 12 |
| 3.1   | Přezimování hmyzu .....  | 12 |
| 3.2   | Vliv teploty na přežívání během přezimování.....                               | 15 |
| 3.3   | Vliv vlhkosti na přežívání během přezimování.....                              | 20 |
| 3.4   | Vliv patogenů na přežívání.....  | 22 |
| 3.5   | Vliv velikosti těla a pohlaví na přežívání během přezimování .....             | 24 |
| 3.6   | Hospodaření s energetickými zásobami během zimy .....                          | 25 |
| 3.7   | Biologie čeledi slunéčkovití (Coccinellidae) .....                             | 28 |
| 3.7.1 | Přezimování druhu <i>Harmonia axyridis</i> .....                               | 31 |
| 4     | Praktická část .....   | 32 |
| 4.1   | Popis experimentů .....  | 32 |
| 4.1.1 | Odchyt jedinců, rozmístění na lokality a jarní sběr.....                       | 32 |
| 4.1.2 | Zjišťování obsahu tuku pro dlouhodobý experiment.....                          | 35 |
| 4.2   | Analýza dat.....   | 36 |
| 5     | Výsledky .....   | 37 |
| 5.1   | Tělesná kondice přezimovaných slunéček .....                                   | 37 |
| 5.2   | Vliv teploty na přežívání zimujících slunéček .....                            | 39 |
| 5.3   | Měření vlivu parazitické houby <i>Hesperomyces virescens</i> na přežívání..... | 41 |
| 5.4   | Měření dopadů manipulativního zvýšení vzdušné vlhkosti .....                   | 42 |
| 6     | Diskuze .....  | 45 |
| 7     | Závěr .....  | 48 |
| 8     | Použitá literatura .....   | 49 |
| 9     | Přílohy.....   | 58 |



# 1 Úvod

V současnosti se objevilo několik studií, které upozorňují na výrazný pokles biodiverzity hmyzu. Tento pokles do budoucna může znamenat nenávratné ohrožení celých ekosystémů. Hlavními negativními vlivy na snižování diverzity hmyzu jsou faktory plynoucí z lidské činnosti, jsou intenzifikace zemědělství, změny hospodaření v krajině a urbanizace. Ovšem klesající trendy biodiverzity mohou mít také na svědomí klimatické změny nebo invazní druhy, které vytlačují konkurenčně slabší druhy.

Vlivem intenzifikace zemědělství je zřejmý pokles biodiverzity hmyzu. Hrozba snižování biodiverzity z hlediska zemědělství spočívá hlavně v ničení přirozených biotopů nebo jejich zúrodnění na ornou půdu a následné snížení heterogenity krajiny, a také v extrémně intenzivním využívání půdy. Je dokázáno, že se zvyšující intenzitou zemědělského managementu se snižuje celková druhová diverzita (Hendrickx et al. 2007). Biodiverzita jednotlivých skupin hmyzu je také ovlivněna disperzními vlastnostmi druhů. Například díky fragmentaci krajiny se snižuje diverzita u druhů s nízkými disperzními vlastnostmi (Hendrickx et al. 2009).

Další příčinou poklesu rozmanitosti hmyzu mohou být biologické invaze neboli zavlečení nepůvodních druhů v důsledku antropogenní činnosti. Za nepůvodní (zavlečené) druhy jsou dle definice považovány ty, které se na dané území dostaly v důsledku činnosti člověka z území, ve kterém jsou původní, anebo přirozenou cestou z území, ve kterém jsou nepůvodní, tj. byly do něj tedy zavlečeny již předtím (Richardson et al. 2000; Pyšek et al. 2004). Zavlečení nepůvodních druhů je spolu se změnami kvality stanovišť, změnou klimatu, vzrůstajícím využíváním přírodních zdrojů a znečištěním životního prostředí jsou aspekty, které výrazně negativně ovlivňují biodiverzitu jak v ČR, tak i celosvětově (Vilà et al. 2010).

Introdukce a šíření nepůvodních invazních druhů tvoří jeden z nejdůležitějších hybatelů globálních změn. Spouští dopady, které přesahují jen ztrátu biologické rozmanitosti, ale způsobují i narušení ekosystémových služeb a ovlivňují lidskou pohodu různými způsoby. Z invazních druhů je hmyz nejvýraznější ve vytváření lidských nemocí, nebo způsobuje přímé zemědělské ztráty prostřednictvím snížených výnosů a přenosu rostlinných patogenů (Bradshaw et al. 2016).

Následující klimatické změny, které probíhají na planetě Zemi, ovlivňují všechny organismy, hmyz nevyjímaje. Klima je přirozeně dynamický systém. Vyplývá z toho, že globální teplota Země se od nedávna periodicky zvyšovala a snižovala. Klimatický systém je kromě složitých interakcí mezi jeho jednotlivými složkami ovlivňován také některými vnějšími vlivy. Těmi mohou být například změny v chemickém složení atmosféry vyvolané sopečnou činností, kolísání slunečního záření dopadajícího na Zemi a antropogenní aktivity (Vilà et al. 2010). Právě schopnost lidské činnosti ovlivňovat klimatický systém planety je stále větší. Není tomu tak z důvodu, že by se náš vztah k životnímu prostředí nějak výrazně změnil. Lidé ho totiž ovlivňovali, často negativně, už odnepaměti. Je například prokázáno, že již v prehistorických dobách, při hledání potravy vypálili obrovská území. Nicméně až naše civilizace, zejména kvůli industrializaci a urbanizaci, získala schopnost ovlivnit životní prostředí skutečně celé Země (Papež František 2015).

Změna klimatu ovlivňuje teplotu během přezimování, která má poté významný efekt na veškerou fyziologii hmyzu (Sánchez-Bayo & Wyckhuys 2019). Většina studií zkoumá účinky zvýšené teploty během vegetačního období (léta) a proto účinky vyšších zimních teplot (např. v temperátní zóně) zůstávají méně známé. Přitom efektivní přezimování je pro mnoho druhů klíčové pro jejich přežití (Buxton et al. 2018). S globálním oteplováním jsou nedávné zimy mírnější než v předchozích desetiletí a předpokládá se s pokračováním tohoto trendu. Díky tomuto trendu by se mohlo zvýšit přežití během chladného období, to zejména u druhů citlivějších na zimní nepříznivé podmínky. V mírném podnebí se odolnost vůči nízkým teplotám v zimě u jednotlivých druhů liší. Zatímco některé druhy jsou vysoce odolné vůči mrazu a mohou přežít při teplotách pod  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , jiné druhy jsou již ovlivněny mírnějšími teplotami (Bale 1993).

Účinky změny klimatu na letní podmínky a tím související stres z horka a vysychání přitahují velký výzkumný zájem, zatímco důsledkům měnících se zimních podmínek na hibernaci se dosud věnovala poměrně malá pozornost. V následujících kapitolách mé diplomové práce se budou aspekty ovlivňující přezimování hmyzu rozebírat podrobněji.

## **2 Cíle práce**

Cílem první části mé diplomové práce je vytvoření literární rešerše popisující problematiku přezimování hmyzu, specificky pak vlivu teploty a vlhkosti na přežívání hmyzu a hospodaření jedinců s energetickými zásobami během zimy.

Cílem druhé části mé diplomové práce bude realizace dlouhodobého přezimovacího experimentu v různých podmínkách prostředí: lokality s různou teplotou a vlhkostí, kdy bude měřeno přežívání jedinců a tělesná kondice (obsah tuku) přeživších slunéček. Diskutován bude i vliv patogenů na přežívání slunéček a výsledky doplňujícího manipulativního experimentu zkoumajícího dopady relativní vlhkosti vzduchu na úspěšnost přezimování slunéček.

## 3 Literární rešerše

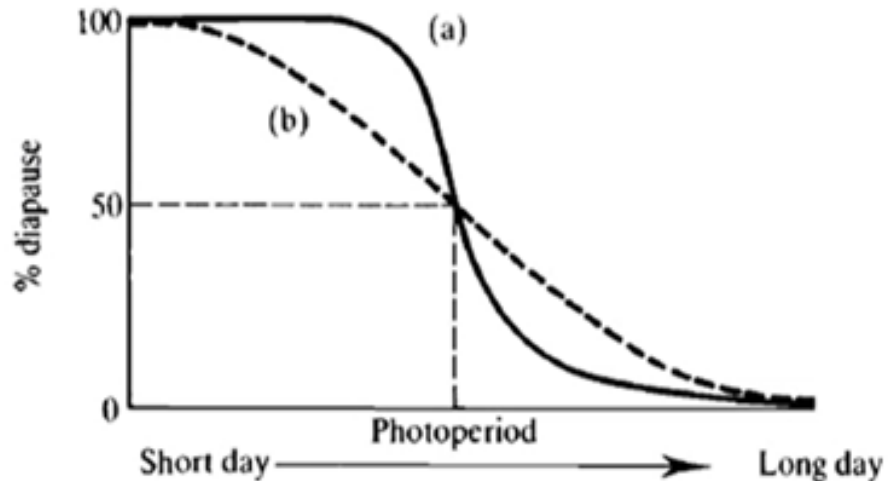
### 3.1 Přezimování hmyzu

Přezimování je proces, který zahrnuje fyziologické, behaviorální a biochemické změny u hmyzu. Nepřesně lze říct, že jde o přizpůsobení organismu, jak se vypořádat s nepříznivými zimními podmínkami. Mezi nepříznivé podmínky řadíme nízkou teplotu, zvýšení proudění vzduchu či nízkou vlhkost.

Hmyz na blížící se zimu, a s tím spojené přezimování druhu, reaguje řadou specifických reakcí. Mezi tyto reakce patří například migrace, diapauza či další druhy dormancí. Nejlepším znakem k rozpoznání nadcházejících zimních podmínek jsou abiotické a biotické podmínky, jako je klesající teplota, krátcí se fotoperioda či snižující se množství a kvalita potravy (Tauber et al. 1986). Druhy hmyzu se odlišují dle náchylnosti k extrémním teplotním změnám (výkyvy teplot, sněhová pokrývka, mráz), což nám způsobuje rozmanitost biologických reakcí na změnu klimatu (Spacht et al. 2021).

Nejrozvinutější typ reakce na nepříznivé dlouhodobé zimní cyklicky se opakující klimatické podmínky je pravá diapauza. Diapauza představuje hlubší přerušování vývoje jedince spojené s hormonálně řízenými fyziologickými změnami. Délka diapauzy se u různých druhů odlišuje, ale řádově můžeme říci, že trvá několik dní až měsíců (Kodrík 2004).

Diapauzu můžeme rozdělit do třech fází: pre-diapauza, diapauza a post-diapauzu. V pre-diapauze dochází ke dvěma dalším fázím. Prvním spouštěcím typem je indukční fáze, která je zahájena vnějším podnětem vyvolaným nad kritickou hladinou únosnosti. Mezi takové podněty řadíme zejména fotoperiodu, teplotu, zdroj potravy nebo hustotu populace. Kritická fotoperioda dokáže indukovat diapauzu u 50 % jedinců v populaci (Leather et al. 1993; Obrázek 1). Toto rozpoznání zahajovací fáze je rozpoznáno pomocí smyslových orgánů (oči) či nervovou soustavou.



Obrázek 1: Průběh křivky ukazuje, jak silná je vazba na fotoperiodu při indukci diapauzy (Leather et al., 1993)

Další fází je přípravná fáze, u které vývoj stále pokračuje, ale dochází k fyziologické a behaviorální pochody přípravy na pravou diapauzu. Mezi fyziologické procesy přípravné fáze můžeme považovat například zvýšený příjem potravy a jako behaviorální reakcí je časná migrace či hledání úkrytu, zimoviště (Košťál 2006).

Druhou fází je již zmíněná pravá diapauza, kterou můžeme rozdělit na tři podfáze, a to na počáteční, udržovací a konečnou fázi. V počáteční fázi dochází k poklesu metabolismu. Následná udržovací fáze spočívá v udržování metabolismu na nízké životní úrovni. Intenzita diapauzy postupně klesá a může i sama vymizet. Konečná fáze se tak u nějakých druhů hmyzu tak nemusí ani vyskytovat. Diapauzu ukončují vnější stimuly jako je fotoperioda či teplota, ovšem nikoli okamžitě, ale až v důsledku hormonálně řízených procesů trvajících řádově dny až týdny (Košťál 2006).

Třetí a poslední fází diapauzy je post-diapauza, která se u druhu vyskytuje, pokud jsou podmínky ještě nepříhodné pro okamžitý restart aktivity nebo vývoje jedince. Tento stav můžeme nazývat jako postdiapauzní kviescence (Košťál 2006). V této fázi již zvýšení aktivitu hmyzu v reakci na teplotu může proběhnout okamžitě, není hormonálně podmíněno.

Jak již bylo zmíněno nejvíce nápomocné k rozeznání nepříznivých zimních podmínek jsou abiotické a biotické podněty. Mezi abiotické podněty, které ovlivňují hmyz, jak rozpoznat blížící se zimu řadíme například fotoperiodu. Fotoperioda je jeden

z nejspolehlivějších faktorů k rozpoznání změny ročního období. Změny trvání dne mají pravidelný cyklický vzorec, kdy se střídá světelná (fotofáze) fáze s temnou (skofáze) fází. Příkladem hmyzu, který reaguje na pravidelný fotoperiodický cyklus jsou mšice *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae; Leather et al. 1993). Dalším abiotickým podnětem, který má významný vliv je teplota. Teplotu ovlivňují denní cykly, u kterých je střídání teplot: vyšší teploty ve dne (fotofázi) a nižší teploty v noci (skofázi). V neposlední řadě je dalším abiotickým faktorem vlhkost, kdy každý hmyz má své optimum vlivu vlhkosti na přežití jinde. Příkladem je populace mexických vrtulí *Rhagoletis pomonella* (Diptera: Tephritidae), kde se ukázala nižší úmrtnost ve vzorcích, kdy jejich dormantní režim končil vlhkým létem (Rull et al. 2019). Ve studii Rull et al. (2019) zkoumající sezónní vlhkostní režimy potvrdili, že nejnižší úmrtnost kukel byla zaznamenána, kdy vlhkostní režimy začínaly a končily vlhkým obdobím.

Druhými podněty, které ovlivňují přezimování hmyzu jsou biotické podněty. Mezi které můžeme řadit například shlukování či potravu. Shlukování jako podnět pro přezimování využívá čeled' sluněčkovitých, konkrétněji sluněčko *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae). Tento druh tvoří velké agregace v lesnatých podhorských lokalitách daleko od jejich letních biotopů. Při hledání pro přezimovací místo využívají feromony, které zanechávají jedinci jako agregační signál pro ostatní jedince druhu (Wheeler & Cardé 2014).

Zimní podmínky zásadně ovlivňují kondici a reprodukci jedince během vegetačního období. Williams et al. (2015) vytvořili rámec pro predikci citlivosti druhů hmyzu vůči negativním dopadům změn klimatu, kde dávají do souvislosti reakce organismů na již zmíněné změny a následné dopady různých zimních teplot na populace hmyzu.

Vyrovnaní se se změnou podmínek vnějšího prostředí hmyz využívá řadu adaptací. Adaptace jsou formovány dlouhodobým nebo opakovaným podnětem, zejména stresem. K zachování homeostatické rovnováhy za působení odlišných ekologických faktorů jsou nutné biologicky výhodné změny organismu. Zahrnujeme do nich regulaci fungování celého organismu, a i změny na úrovni buněk (Kodrík 2004). U ektotermních organismů nalezneme metabolická přizpůsobení dvojího typu, a to změny okamžité a změny pomalé. Adaptace můžeme rozdělit na morfologické,

fyziologické a behaviorální. Morfologické adaptace představují přizpůsobení druhu či populace prostřednictvím dědičného morfologického znaku, mezi které patří zbarvení, velikost nebo tvar jedince. Jde o důsledek dlouhodobého vlivu predace nebo klimatických podmínek. Naopak behaviorální adaptací rozumíme vrozené chování druhu. Třetí adaptace souvisí s fyziologickými životními pochody a funkcemi, příkladem této adaptace je dormance a termoregulační mechanismy, které jsou spouštěny a řízeny množstvím potravy či intenzitou slunečního záření (Šálek & Harabiš 2015).

Dalším druhem adaptace, kterou můžeme nazývat jako rezistentní adaptací, je aklimatizace. Aklimatizaci vidíme jako proces, který je realizovaný v přírodě a řadíme se děje typicky na individuální úrovni. K těmto dějům dochází pod vlivem faktorů vnějšího prostředí v průběhu života jedince. Uskutečňují se v mezích genotypu konkrétního organismu jako projev dědičných možností, které jsou pod vlivem stresu realizovány. Angilleta (2009) uvádí, že fitness jedince se zlepší tehdy, proběhne-li aklimatizace správně. Oproti tomu stojí aklimace, kterou vnímáme jako proces, který je realizován v umělém prostředí. Jako umělé prostředí můžeme považovat třeba laboratorní podmínky. Obě tyto adaptace definujeme jako pozitivní fyziologickou odpověď na změnu, podmiňující zlepšení další reakce na zhoršené podmínky prostředí, která tedy vede ke zvýšenému přežívání jedinců (Chapman 1998). Příkladovým druhem mohou být octomilky druhu *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae), které při náhlém vystavení nižším teplotám očekáváme okamžitou smrt. Studie Chapman (1998) poukazuje na jev, že většina jedinců tohoto druhu přežije, když je vystavíme pozvolným snižováním teploty v delším časovém horizontu.

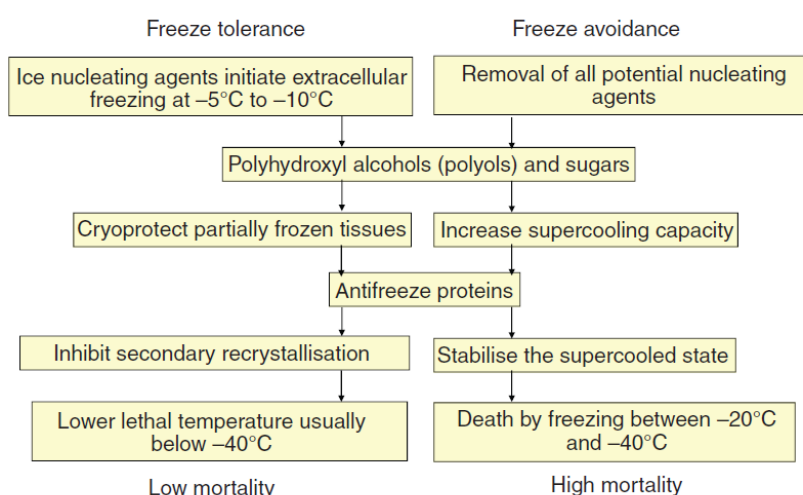
### **3.2 Vliv teploty na přežívání během přezimování**

Hmyz je ektotermní organismus, není tedy schopen automaticky řídit a kontrolovat tělesnou teplotu. Jejich tělesná teplota je silně závislá na teplotě vnějšího prostředí (Spacht et al. 2021). Teplota prostředí je především ovlivněna slunečním zářením, nadmořskou výškou a prouděním vzduchu. Princip použitelný pro popis řady biologických a ekologických jevů souvisejících s působením teploty na hmyz nám ukazuje Arrheniova rovnice. Rovnice vysvětluje exponenciální vliv teploty na rychlost chemických reakcí. Proto je teplota vnějšího prostředí činitelem, který velmi

významně ovlivňuje život hmyzu. V extrémních podmínkách nedokáže organismus jedinců plnit základní životní funkce. Naopak výhodou ektotermních organismů je, že nemusí převážnou část své energie poskytovat k udržení a uchování stálé teploty těla (Kodrík 2004).

Hmyz má velký teplotní rozsah (vitální zónu), ke kterému je schopen se přizpůsobit. Schopnost adaptace určitého druhu hmyzu na teplotní podmínky vnějšího prostředí je individuální a každý druh či jedinec má odlišný optimální interval pro přežití. Z fyziologického hlediska jsou dány kritické hodnoty druhu, kdy při jejich překročení dochází k nevratným změnám v důsledku nezvládnutí základních metabolických pochodů organismu (Sinclair 2015).

Kritické hodnoty můžeme rozdělit na horní (CT<sub>max</sub>) a dolní (CT<sub>min</sub>), která je pro nás významnější z pohledu přezimování hmyzu (Sinclair 2015). Při vyrovnávání se s extrémně nízkou teplotou rozlišujeme dvě základní strategie hmyzu: tolerance vůči zmrznutí a snaha maximálně snížit bod mrznutí. U druhů tolerujících zmrznutí (freezing – tolerance) dochází k rychlému zmrznutí mezibuněčných tekutin a nedochází tak k samotnému poškození buněčných struktur. U druhů využívajících druhou strategii snižování bodu mrznutí (freezing – avoidance) dochází k nahromadění kryptoprotektantů, látek zabraňujících zmrznutí, v hemolymfě a tím se zvyšuje odolnost vůči mrazu. Dále snižují teplotní bod za pomoci vyprázdnění střev a snížení obsahu vody v těle (Bale & Hayward 2010).

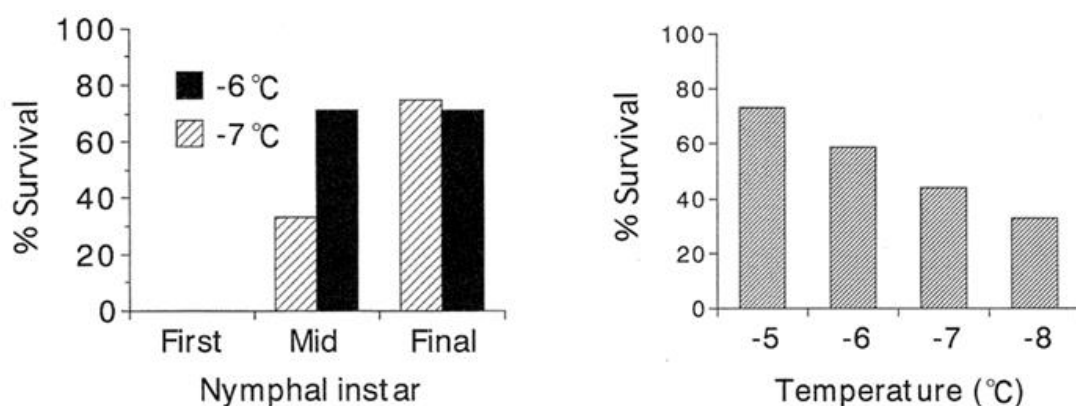


Obrázek 2: Schématické znázornění hlavních biochemických komponentů pro přezimující strategie hmyzu (hmyz tolerující zamrznutí a hmyz vyhýbající se zamrznutí). Schéma poukazuje, že u strategie hmyzu tolerující zamrznutí dochází k menší úmrtnosti než u strategie druhé (Bale & Hayward 2010).



Tanaka & Tanaka (1997) zkoumá toleranci chladu u přezimujících nymf švábů *Periplaneta japonica* (Blattidae: Dyctyoptera) z hlediska nižší letální teploty a bodu podchlazení. Bod podchlazení (SCP) u tohoto druhu spadl do rozmezí -6 až -9 °C. Výsledkem studie bylo vypořádání odlišné kapacity tolerance k chladu mezi jednotlivými instary larev druhu *Periplaneta japonica*. V prvním instaru larvy nedocházelo po zmrazení v rozmezí -6 až -7 °C k obnově tkání, zatímco u středních instarů (od 3. až 5. instaru) a posledního 8. instaru bylo prokázáno větší přežití a obnova tkání v těle (Obrázek 3 vlevo).

Přezimující nymfy druhu *Periplaneta japonica* mají určitý stupeň mrazuvzdornosti, významná část jedinců dané studie přežila zmrazení trvající alespoň 12 hodin. Pro podrobnější objasnění schopnosti tolerance mrazu byly nymfy v posledním instaru vystaveny různým teplotám pod nulou po dobu 12 hodin a poté bylo hodnoceno jejich přežití při 25 °C. Během zmrazovacího testu byli všichni testovaní jedinci zmrazeni alespoň během prvních 3 hodin. Výsledky jsou shrnuty na Obrázku 3 vpravo. Po relativně dlouhodobém zmrazení tkání se významná část jedinců zotavila a plně obnovila svou činnost a vývoj při 25 °C. Přežití zmrzlých jedinců bylo závislé na prožívané teplotě. Přežívání přesáhlo 73 % při -5 °C, ale kleslo jen na 33 % při -8 °C. Tento výsledek je ekologicky relevantní, protože teploty pod nulou se vyskytují pouze v určitých hodinách dne i uprostřed noci (Tanaka & Tanaka 1997).

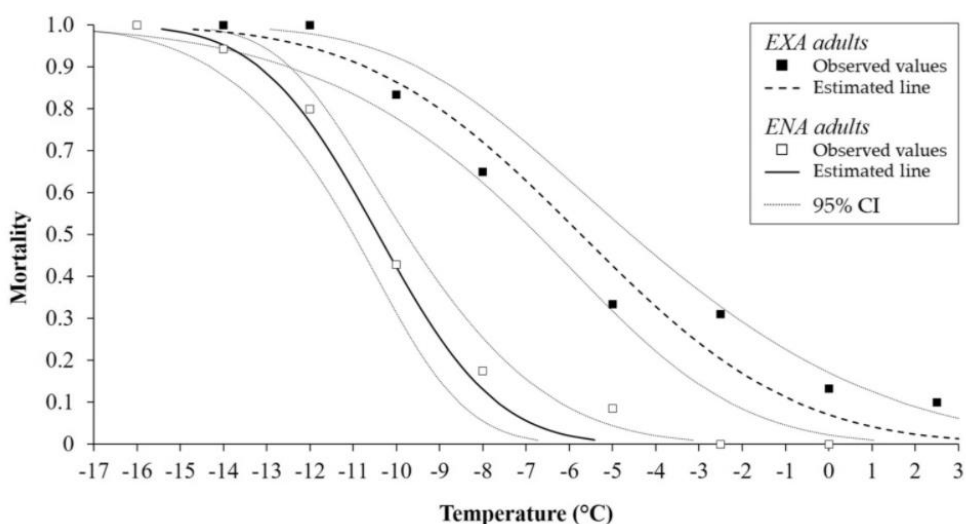


Obrázek 3: Vlevo: Vliv 12hodinového zmrazení tkáně na přežití nymf *Periplaneta japonica* v prvním, středním (od 3. do 5.) a v posledním (8.) instaru při -6 nebo -7 °C.

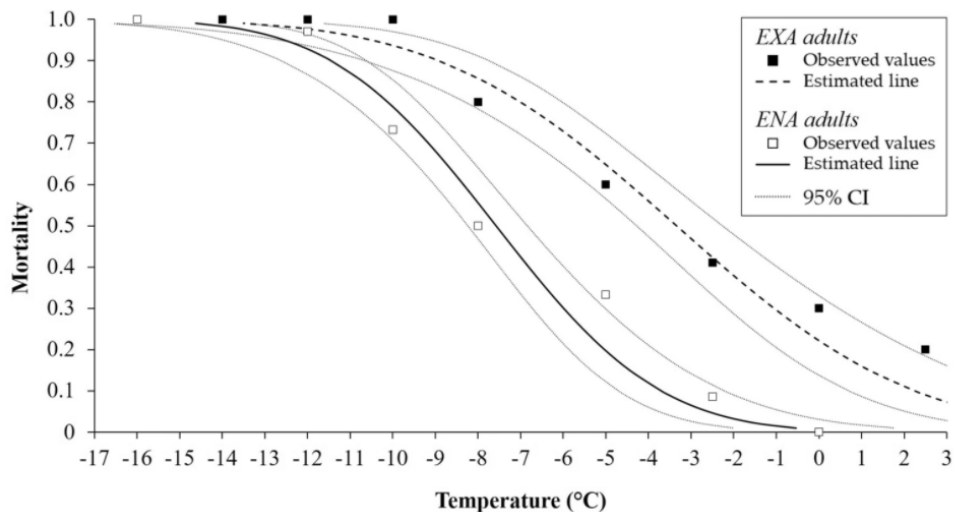
Vpravo: Vliv 12hodinového zmrazení tkáně při různých teplotách pod nulou na přežití nymf *Periplaneta japonica* v posledním instaru. Po zmrazení byly nymfy přeneseny do 25 °C a kontrolovány na přežití. (Tanaka & Tanaka 1997)

Dalším příkladem teplotních limitů v zimním nepříznivém období můžeme ukázat na *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae), který je invazním druhem a přezimuje jako dospělec v přirozených i člověkem vytvořených biotopech. Druh vykazuje při snížené fotoperiodě zvýšené vyhledávání vhodného zimoviště jako jsou například budovy nebo jiné stavby, které poskytnou vhodnější mikrohabitat. Studie Sccanini et al. (2020) charakterizuje rozdíly v mortalitě za nízkých teplot mezi dospělci *Halyomorpha halys*, kteří vstupují do dormance (ENA) a vystupují z dormance (EXA), kdy jedinci byli vystaveni průměrné teplotě 2,6 °C.

Výsledky ukazují, že zvýšená úmrtnost dospělých jedinců ENA byla pozorována za teploty -5 °C po dobu 2 až 4 hodin a teplotě -2,5 °C po dobu 6 hodin. Naopak u dospělých jedinců EXA byla pozorována vyšší mortalita na poměrně nízkých úrovních teploty při 2,5 °C po dobu 2 hodin (10% úmrtnost – LT10) a dále se mortalita zvýšila na 20 % (LT20) při delší době expozice. Získané výsledky ukazují, že existují rozdíly v toleranci chladu mezi hmyzem vstupujícím do dormance a opouštějícím dormanci (ENA vs. EXA). Při expozici 2 hodin byla úmrtnost 50 % (LT50) pro ENA -10,4 °C a u EXA jedinců byla tato hranice -5,7 °C. Dále při expozici 6 hodin teplotě -7,6 °C, zatímco u EXA jedinců byla -3,3 °C (Scscanini et al. 2020). To není překvapivé, protože je známo, že hmyz vstupující do diapauzy snižuje ztrátu vody přeměnou sacharidů na tuky a tato změna má v konečném důsledku za následek zvýšenou odolnost proti vysychání (Danks 2000).



Obrázek 4: Míra úmrtnosti EXA a ENA *Halyomorpha halys* dospělých po vystavení kontrolovaným nízkým teplotám po dobu expozice 2 hodiny (Scscanini et al. 2020).



Obrázek 5: Míra úmrtnosti EXA a ENA *Halyomorpha halys* dospělých po vystavení kontrolovaným nízkým teplotám po dobu expozice 6 hodin (Sccanini et al. 2020).

Další studie řeší vliv změn klimatu na biodiverzitu hmyzu, hlavně z pohledu dopadů různých teplot. Rychlé oteplování zemské atmosféry pravděpodobně do roku 2080 změní současné druhové složení celých ekosystémů (IPCC, 2007). To, jak druhy reagují na oteplování je zvláště důležité pro ektotermní živočichy, jako je hmyz. Kvůli jejich termoregulaci a jejich potencionální nedostateční schopnost odolávat chladným nepříznivým podmínkám (Kearney et al. 2009). Dopady změny klimatu pravděpodobně restrukturalizují složení společenstev všech hmyzích říší, ale zejména je největší pravděpodobnost změny společenstva hmyzu ve vysokých nadmořských výškách (Halsch et al. 2020; Shah et al. 2020).

McCabe et al. (2021) ve své studii provádějí transplantační experiment podél výškového gradientu, aby otestovali účinky změny klimatu na vybrané druhy samotářských včel. Pro studii bylo využito 26 druhů včel z čeledi Megachilidae, které hnízdí v dutinách. Po dobu tří let umísťovali hnízdní dutiny ve třech nadmořských výškách podél výškového gradientu San Francisco, Peaks a Arizona, za účelem kolonizace včel. Následně byly dutiny za první přesunuty do nižších (teplejších) nadmořských výšek, za druhé přesunuty do vyšších (chladnějších) nadmořských výšek a za třetí byly ponechány ve svém přirozeném prostředí (beze změny teploty). Výsledky studie ukazují, že v rámci vlivu teploty některé druhy Megachilidae dokáží přežít při nižších teplotách v nejvyšší nadmořské výšce. Druhy Megachilidae přezimují většinou ve stadiu prepupy a brzy na jaře dokončují svou metamorfózu.

Rozdíly v rychlostech vývoje mohou zkomplikovat to, jak jednotlivé druhy budou ale reagovat na změnu klimatu a jejich pozdějšího přežití ve stádiu dospělého.

Transplantační experimenty, představují vysoce cenné studie, protože jsou schopny zohlednit proměnné prostředí, které by nebylo možné zohlednit v laboratorních podmínkách. Dále také ukazují přesné účinky změny klimatu na jejich cílené rostlinná společenství. Experimenty s elevačním gradientem mohou být jedním z nejlepších způsobů, jak předpovědět, jak se druhy mění v reálných klimatických scénářích (Nooten & Hughes 2017; Yang et al. 2018).

### **3.3 Vliv vlhkosti na přežívání během přezimování**

Dalším kritickým aspektem vyjma teploty pro úspěšné přežití zimního období u hmyzu je efektivní hospodaření s jeho vodními zdroji. Udržování adekvátní vodní hladiny v těle jedince je v zimě náročné kvůli převládající relativní nízké vlhkosti v tomto ročním období (Benoit et al. 2010).

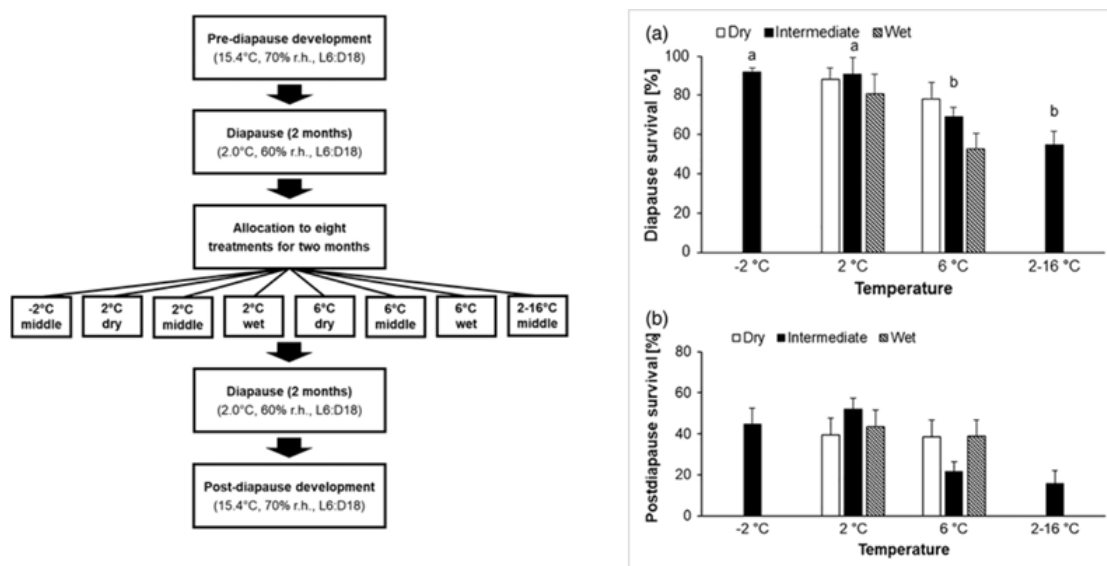
Hmyz se musí vyrovnávat se ztrátou vody a jejím omezeným příjmem v některých kritických obdobích (Hadley 1994). Odolnost k poškození způsobenému dehydratací závisí na dvou hlavních faktorech, a to na snížení ztráty vody a zmírnění stresu, pokud dehydratace dosáhne nadměrné úrovně (Benoit & Denlinger 2007; Benoit 2010). Ke zpomalení ztráty vody v těle jedince napomáhají nejvíce dva mechanismy, snížené dýchání a potlačení kutikulární permeability (Hadley 1994; Benoit 2010). Snížení dehydratačního stresu je dosaženo řadou biochemických produktů, které zahrnují zvýšení produkce proteinů, které souvisejí se stresem (heat shock proteiny), dále neredukujících cukrů, polyolů a v neposlední řadě volných aminokyselin (Benoit & Denlinger 2007).

Existují dvě období v životě hmyzu, kdy je hmyz obzvláště náchylný k dehydrataci, a to zejména v období dormance a ve stadiu kukly. V diapauze je hmyz vystaven okolní vlhkosti, která je v zimních měsících obvykle nízká, dále jsou jedinci vystaveni také nedostatku příjmu nové volné vody (Denlinger 2002). Naopak během stádia kukly není hmyz vůbec schopen doplňovat zásoby vody a jen zřídka jsou kukly schopny pohlcovat vodní páru, aby zvýšily svůj obsah vody v těle. V důsledku toho hmyz přezimující ve stadiu kukly musí spoléhat na své zásoby vody, které si vytvořil před samotným zakuklením, aby přežil celou zimu (Benoit 2010).

Benoit et al. (2015) zkoumají vodní bilance druhu *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae), endemického škůdce v Severní Americe, který se živí sladkou kukuřicí, rajčaty a bavlnou. Tento druh přezimuje ve stadiu kukly zahrabaný v půdě a v důsledku toho je vystaven dlouhodobým xerickým podmínkám. Studie porovnává schopnost diapauzujících a nediapauzujících kulek *Helicoverpa zea* odolávat dehydrataci. Výsledky naznačují, že hmyz procházející diapauzou je výrazně odolnější vůči dehydrataci než druhy, které neprochází diapauzou, což se odráží v míře ztráty vody, která je u nepřezimujících kulek až 20krát vyšší. Potlačení rychlosti ztráty vody je u přezimujících kulek pravděpodobně výsledkem tří faktorů. První z faktorů je, že přezimující kukly jsou větší, což má za následek nižší poměr povrchové plochy k objemu. Druhý faktor je míra spotřeby kyslíku, která je u kulek procházejících diapauzou až poloviční, což naznačuje snížení metabolismu. Posledním faktorem jsou kutikulární uhlovodíky, které jsou u diapauzujících kulek 2krát až 3krát početnější. Tato vlastnost zlepšuje vodotěsnost povrchu kulek.

Teplejší a vlhčí zimní podmínky podstatně snižují míru přežití, a to i u rozšířených druhů v mírném pásmu, které nejsou zvláště citlivé na změnu klimatu. Takovým příkladným druhem je *Lycaena tityrus* (Lepidoptera: Lycaenidae), který přezimuje obvykle ve 3. instaru larvy. Tento druh motýla se pohybuje od západní Evropy po střední Asii a obývá různá stanoviště jako jsou pastviny, písečná vřesoviště, slatiny a otevřené lesy.

Toto tvrzení potvrzuje experimentální studie Klockmann & Fischer (2019), kdy byly modelové motýly druhu *Lycaena tityrus* chovány v klimaboxech za kolísavé teploty a vlhkosti navozující podmínky pro diapauzu (průměrná teplota 15,4 °C, 75 % relativní vlhkosti). Poté, co motýly vstoupili do diapauzy byly larvy drženy po dobu 2 měsíců při teplotě 2 °C a 60 % relativní vlhkosti. Následně diapauzující larvy byly vystaveny změně teploty a vlhkosti, jak vyobrazuje schéma na obrázku 6 vlevo. Výsledkem studie bylo, že vlhkost měla významný vliv na přežití diapauzujících jedinců, kdy za zvýšené vlhkosti byla pozorována vyšší úmrtnost (Obrázek 6 vpravo).



Obrázek 6: Vlevo: Schématické znázornění popisu experimentu

Vpravo: Účinky teplotního režimu a vlhkosti na míru přežití během diapauzy (a) a postdiapauzového vývoje (b) u *Lycaena tityrus* (Klockmann & Fischer 2019).

### 3.4 Vliv patogenů na přežívání

Patogeny nabývají mnoho nejrůznějších forem přes viry, bakterie a až po houby. Pro úspěšný vývoj těchto patogenních organismů musí být vhodné abiotické podmínky, mezi které řadíme teplotu, vlhkost či fotoperiodu (Kodrík 2004).

Entomopatogenní houby, jako například *Hesperomyces virescens* (Ascomycota: Laboulbeniales) která napadá slunéčka druhu *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae), jsou značně problémovým patogenem pro hmyz. Do organismu se dostávají například pozřením houbové propagule, nebo způsobem, který je přímo přes kontakt s kutikulou. Některé druhy hmyzu si vyvinuly obranné mechanismy vůči napadení. Jedním z mechanismů je zvýšení své tělesné teploty nebo si hledání optimálního místa s vhodnou vlhkostí a teplotou. Naopak jiné druhy hmyzu se chrání tím, že si vybírají k přezimování extrémní místa. Například druh čeledi slunéčkovití *Semiadalia undecimnotata* (Coleoptera: Coccinellidae) přežívá zimu tak, že se vystavuje mrazivému vzduchu, kde jiné druhy nepřežijí (Kubátová 2017).

Dalším důležitým ochranným prostředkem před patogeny pro hmyz představuje jejich imunitní systém. Proniknutí patogenu do organismu spouští vrozený imunitní

system, který dokáže rozlišit vlastní buňky od patogenů a zahájí tak fagocytózu (pohlcení látky specializovanou buňkou). Dalšími procesy na odpověď proti patogenům imunitního systému jsou nodulace a enkapsulace. Při nodulaci hemocyty obalí cizorodý patogen a zabraňují mu v dalším šíření. Nodulace se využívá zejména při velkém nárůstu patogenů v těle. U procesu enkapsulace dochází k tvorbě buněčných valů, které oddělí patogenní buňky a tím zabrání dalšímu šíření patogenu. Tento proces se využívá při pohlcení patogenů větších rozměrů, které nemůžou hemocyty pohltnout (Hyršl 2018).

Zima představuje náročné období pro hmyz obývající mírné oblasti. Velké množství studií zkoumalo, jak abiotické podmínky prostředí (např. teplota) ovlivňují úspěšnost přezimování hmyzu. Avšak pouze několik málo studií se zaměřilo na biotické faktory a mechanismy ovlivňující přezimování hmyzu. Studie Knapp et al. (2022) zkoumala účinky již zmíněné parazitické houby *Hesperomyces virescens* (Ascomycota: Laboulbeniales) na přezimování a fungování imunitního systému slunéčka *Harmonia axyridis*. Výsledky studie ukázaly, že mortalita během zimy byla výrazně vyšší u infikovaných jedinců slunéček ve srovnání s neinfikovanými jedinci.

Houba *Hesperomyces virescens* je mikrospopický obligátní ektoparazit slunéček. Nedávné studie ukázaly, že *Hesperomyces virescens* jsou komplexně více druhů, které jsou segregovány podle svého hostitelského druhu slunéčka (Haelewaters et al. 2018; Haelewaters et al. 2021). Stélky houby se mohou vytvořit na kterékoli části těla hmyzu a následně houby proniknou do kutikuly hostitele vytvořením haustoria. Nicméně u slunéček probíhá přenos *Hesperomyces virescens* nejčastěji při páření, kdy samice slunéček jsou obvykle infikovány na krovkách a samci naopak na ventrální straně břicha (Fiedler & Nedvěd 2019). Během zimního období se u jedinců vyskytuje infikování i na jiných částech těla v důsledku vytváření přezimovacích agregací. *Hesperomyces virescens* může zvýšit úmrtnost infikovaných jedinců v laboratorních podmínkách napodobujících vegetační období (Haelewaters et al. 2020).

Četné studie také ukazují, že patogeny mohou mít negativní účinky na sociální hmyz na úrovni celých kolonií (Berthoud et al. 2010). Nedávné studie se zaměřily na chovaný eusociální hmyz (včely medonosné a čmeláci) a jeho roli při přenosu patogenů do volně žijících populací. Studie přímo spojující množství patogenů

s přežíváním populací během zimy však není dosud dobře zdokumentována (Loope & Rankin 2021).

### 3.5 Vliv velikosti těla a pohlaví na přežívání během přezimování

Velikost těla je jednou z nejdůležitějších charakteristik jedince hmyzu. Velikost těla závisí na abiotických a biotických faktorech, které mohou ovlivnit vlastnosti jedinců během larválního vývoje (Chown & Gaston 2010). Velikost těla hmyzu je ovlivněna i pohlavním, kdy je známo, že v hmyzí říši samice bývají větší než samci. U druhu *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) nebyl zjištěn významný mezi samci a samicemi v přežití během zimního období (Knapp & Řeřicha 2020).

Velikost těla hraje zásadní roli v přežívání během přezimování, toto je ale spojené zejména s tělesnou hmotností a množstvím energetických zásob v těle. Například míra ukládání a spotřeby obsahu lipidů (hmotnosti) se může lišit mezi pohlavími nebo se může měnit s velikostí těla (Blanckenhorn et al. 2007). Ne všechny části těla rostou stejně jako celková velikost těla (tzv. růstová izometrie), ale alometrické škálování je docela běžné (Stern & Emlen 1999). Relativní zvýšení nebo snížení energetických rezerv s rostoucí velikostí těla by mohlo být dobrým indikátorem odolnosti druhu proti hladovění v zimním období, která se zvyšuje nebo snižuje v závislosti na celkové tělesné velikosti konkrétního druhu.

Rozdíly mezi pohlavími a účinky úbytku tělesné hmotnosti byly zkoumány ve studii Knapp & Řeřicha (2020), kdy samice druhu *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) jsou rozměrově větší než samci. Data o ztrátě tělesné hmotnosti odhalily, že absolutní i relativní ztráta tělesné hmotnosti byla vyšší u samců. To znamená, že menší relativní ztráta tělesné hmotnosti u samic nemůže být spojena pouze s existencí pohlavního dimorfismu. Ale u *Harmonia axyridis* se pravděpodobně vyskytuje pohlavně specifické řízení energetických rezerv. Větší tělesná hmotnost žen může být zodpovědná za zvýšenou odolnost samic proti hladovění po zimním období, protože větší strukturní velikost může být spojena s výhodami relativně větších zásob energie a nižších hmotnostně specifických splnění abiotických poměrů (Aggarwal 2014). Na základě údajů ze studie není možné zamítnout možnost, že samice *Harmonia axyridis* mají také fyziologickou adaptaci specifickou pro pohlaví, která jim umožňuje přežít déle na jaře v podmínkách hladovění, jako se ukázalo u druhu střevlíka *Anchomenus dorsalis* (Coleoptera: Carabidae; Knapp 2016). Existují



důkazné studie, ve kterých jak strukturní velikost, tak tělesná hmota mohou u hmyzu ovlivnit odolnost vůči hladovění a přežití v zimě (Kovacs & Goodisman 2012).

Ve studii Kovacs & Goodisman (2012) zkoumali, zda úspěch přezimování královen *Vespula maculifrons* (Hymenoptera: Vespidae) souvisí s velikostí nebo tvarem těla. Velikost a tvar těla jsou důležitými aspekty fenotypu jedince a mohou mít zásadní vliv na úspěšnost páření, plodnost, dlouhověkost a zejména na studované přežití během zimního období (Blankenhorn 2000). Výsledky studie ukazovaly, že velikost a tvar těla královny, které patří mezi nejdůležitější aspekty individuálního fenotypu, vykazovaly důležité souvislosti s přežitím během přezimování.

### **3.6 Hospodaření s energetickými zásobami během zimy**

Řízení intenzity metabolismu organismu hmyzu silně ovlivňuje teplota, přičemž intenzita metabolismu se zvyšuje se stoupající teplotou. Ta ovlivňuje zejména rychlost chemických reakcí na úrovni buněk a tkání. Pokud se teplota dál zvyšuje a organismus dosáhne svého metabolického maxima dochází ke zhroucení buněčných procesů a struktur. Tento stav se projeví následným mírným poklesem spotřeby kyslíku a následnou smrtí organismu (Kodrík 2004). Pro hmyz v zimních podmínkách jsou velmi důležité uložené energetické zásoby. Během zimy, kdy je hmyz zpravidla neaktivní, jsou energetické zásoby spotřebovávány rychleji při vyšších teplotách (Williams et al. 2012). Následkem toho mohou být zimy v posledních letech z důvodu vyššího kolísání teplot pro hmyz nebezpečnějším obdobím, než tomu bylo v minulých letech. Současná klimatická změna na Zemi může ovlivňovat přezimování hmyzu, právě tepelná variabilita je důležitá při určování spotřeby energie v zimním období. Tepelné výkyvy směrem k vyšším teplotám představují vyšší rychlost čerpání energetických zásob během přezimování (Williams et al. 2012).

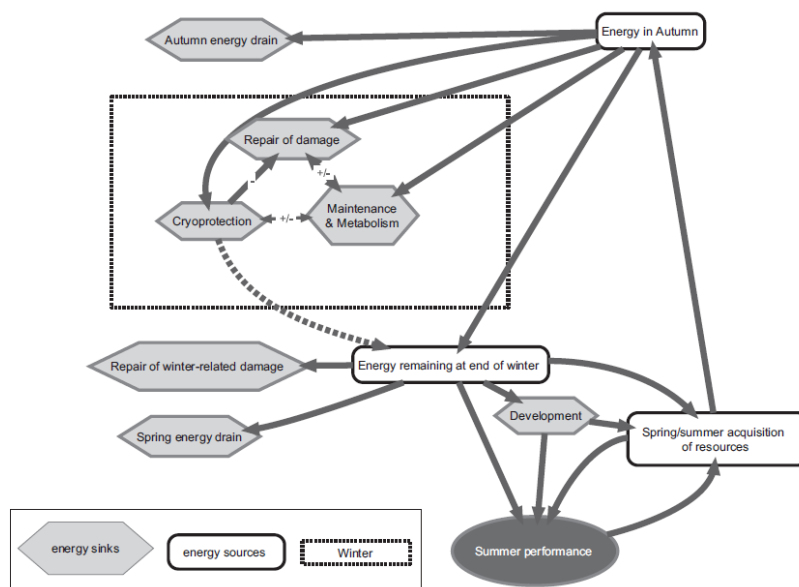
Jelikož je hmyz neaktivní a nepřijímá potravu během přezimování musí tak pokrýt energetickou zásobu z látek, co nahromadil před zimou. Při dormanci musí nashromáždění zásoby energie zajistit základní bazální metabolismus a chod fyziologických mechanismů, které mají za úkol chránit jedince před chladem a vysušením. Energetické zásoby zbývající po ukončení dormantního stavu poslouží k zajištění reprodukce či hledání potravy na začátku dalšího vegetačního období. Hmyz využívá specifické způsoby ukládání energetických zásob, mezi nejvíce energetické látky řadíme lipidy a dalším významným úložištěm energie jsou

uhlovodíky ve formě glykogenu (Hahn & Denlinger 2007). Lipidy nabízí předpoklad, že většina neaktivního hmyzu spotřebovává uložené lipidy (Sinclair et al. 2004). Již zmíněným dalším úložištěm energií jsou uhlovodíky, ty využívá především zmrzlý hmyz v hypoxickém prostředí. Jako modelový druh, který umí využívat uhlovodíky můžeme uvést *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae; Han & Bauce 1993).

Zimní teploty může hmyz ovlivnit volbou mikrobiotopu. Mezi takové mikrobiotopy můžeme řadit například pobyt pod sněhovou pokrývkou či výběr přezimovacího místa uvnitř jeskyně (Spacht et al. 2021). Trvalá sněhová pokrývka zvyšuje průměrnou teplotu tím zároveň snižuje kolísání teplot a napomáhá tak před poškozením či úmrtím hmyzu v důsledku zmrznutí (Pauli et al. 2013). Současná klimatická změna tak může ovlivňovat přezimování hmyzu i skrze změny jako je snižování počtu dní se sněhovou pokrývkou. Tepelná variabilita je velmi důležitá i pro udržení přiměřené spotřeby energie na konci zimního období. V tomto období dochází zejména ke zrychlení rychlosti metabolismu ve vztahu k teplotě, což v důsledku vede ke zvýšení průměrné rychlosti metabolismu, protože vysokoteplotní části teplotních cyklů zvyšují metabolismus více než ho utlumují nízkoteplotní části cyklu (Williams et al. 2012).

Tedy tepelné výkyvy směrem k vyšším teplotám, zejména vysoké teploty během podzimu nebo jara, tak mohou představovat většinu kumulativního využití energie během přezimování. Teplotní citlivost na rychlost metabolismu více přibližuje Jensenovu nerovnost, kdy nám teplota určuje okamžitou rychlost metabolismu a denní spotřebu energie u ektotermních organismů (Sinclair 2015). Velkou výhodou pro přezimující hmyz je zvýšená citlivost, která umožňuje zvýšit úspory energie pro přezimování v nízkých teplotách (Sinclair et al. 2003). Oproti tomu snížená tepelná citlivost snižuje dopad tzv. „Jensenovy nerovnosti“ zapříčiněním snížení vlivu vysokých teplot na rychlost metabolismu. Příkladovým druhem jsou larvy druhu *Erynnis propertius* (Lepidoptera: Hesperiiidae), které byly ve studii Williams et al. (2012) laboratorně chované za proměnlivých podmínek, a tím byla snížena jejich tepelná citlivost. U populací stejného druhu v méně proměnlivém prostředí byla jinak zjištěna vysoká tepelná citlivost (Williams et al. 2012).

Morris & Fulton (1970) ve své studii popisují optimální délku zimy pro zachování energetických rezerv a zjistili, že larvy druhu *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae) v dlouhé zimě často umírají proto, že jejich zásoby energie byly úplně spotřebované. Je možné, že i letní část životního cyklu hmyzu, je skrze energetické zásoby v zimním období nepřímo ovlivňována. Lze očekávat, že efektivní využití energetických zásob je prioritní pro následující období reprodukce, které je určující pro fitness jedince (Sinclair 2015). U pár druhů hmyzu lze stanovit snadno vztah mezi spotřebou energie a reprodukčním výkonem. Například u dospělců *Eurosta solidaginis* (Diptera: Tephritidae), kteří jsou během zimy neaktivní, lze na jaře snadno spočítat jejich oocyty. To nám dále umožňuje prokázat jasné propojení mezi spotřebou energie a reprodukčním výkonem (Irwin & Lee 2000). Obdobně se tento jev vyskytuje i u včely *Osmia lignaria* (Hymenoptera: Megachilidae), kdy v důsledku vyčerpání energetických zásob a následnou sníženou životaschopností u nich dochází k opoždění zrání vajíček (Bosch et al. 2010).



Obrázek 7: Schématické znázornění zdrojů energie a propadů energie hmyzu před, během a po přezimování, a jak by energie mohla souviset s letní výkonností jedince (zahrnuje reprodukční výkon a fitness jedince; Sinclair 2015).

Výběr přezimovacího místa je často kritický pro hmyz a jeho přežití. Rozdíly ve vhodnosti výběru biotopu pro přezimování jsou ovlivněny např. regionálním klimatem, nadmořskou výškou, sklonem svahu či přítomností vegetace (Leather et al. 1993). Ale základním parametrem, který určuje vhodnost místa pro úspěšné přezimování hmyzu je teplota daného místa. Přesný mechanismus, jak si hmyz vybírá

místo pro přezimování není pro většinu druhů detailně znám. Například druh *Eurosta solidaginis* (Diptera: Tephritidae) úmyslně přezimuje nad sněhovou pokrývkou a tím spotřebovává méně energie než některé druhy hmyzu, které přezimují pod sněhem. Výběr míst s cílem omezit spotřebu energie tak spočívá v hledání chladnějších nebo méně proměnlivých přezimovacích míst (Irwin & Lee 2003).

Druhy pro výběr optimálního zimoviště často využívají svou citlivost na světlo a můžeme jejich chování rozdělit na negativní a pozitivní fototaxi. Druhy využívající negativní fototaxi vyhledávají spíše místa pro zahrabávání se jako jsou dutiny, jeskyně nebo hromady spadaného listí. Příkladem je moucha *Pyrellia serena* (Diptera: Muscidae), která přezimuje ve stadiu dospělce v jeskyních (Leather et al. 1993). Negativní fototaxe vyvolává u řady druhů tzv. „zavrtávací reflex“ (digging reflex). Druhým a zároveň opačným typem chování je pozitivní fototaxe. Do této kategorie můžeme zařadit například druhy hmyzu jako jsou *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae) nebo *Aedes impiges* a *Aedeo nigripes* (Diptera: Culicidae), které vyhledávají nezastíněná místa, kde jsou naopak vystavena přímému slunečnímu záření (Hagen 1962; Leather et al. 1993).

### **3.7 Biologie čeledi slunéčkovití (Coccinellidae)**

Brouci čeledi Coccinellidae jsou velcí od 1 do 10 mm. Jedinci jsou zbarveni převážně žluté, oranžové či jasně červené barvy s malými černými skvrnami na krovkách. Slunéčka jsou rozšířena téměř po celém světě a popsáno máme přes 5000 druhů. V Evropě bylo zjištěno kolem 75 rodů, ve kterých je popsáno více než 250 druhů a poddruhů. Všeobecně jsou tyto brouci považováni za prospěšný hmyz, protože se živí mšicemi a jiným hmyzem škodícím na polích, v sadech, zahradách a jiných podobných místech. Výjimkou jsou některé druhy působící i jako škůdci, nebo například invazní druh *Harmonia axyridis*. U dospělců slunéček se vyskytuje tzv. reflexní krvácení, kdy ze svých kloubů na nohou vypouštějí žlutou hemolymfu (Knapp et al. 2018). Tento obranný mechanismus slouží při nebezpečí ze strany predátorů (Nedvěd 2015).

Slunéčka se vyskytují převážně v blízkosti mšic a červců, kde kladou i svá vajíčka, aby se po vylíhnutí larvy mohly touto stravou živit (Koch & Galvan 2008). Původní potravní strategií čeledi je kokcidofágie neboli požívání červců. Nezávisle na sobě se opakovaně z této strategie u některých druhů vyvinula afidofágie, tedy požívání mšic (Escalona et al. 2017). Tato strategie dnes převládá především v mírném pásu.

Afidofágní slunéčka mají rychlejší vývoj než ostatní slunéčka. Jejich vývoj je v souladu s rychlým vývojem své kořisti. Ovšem mezi slunéčky nalezneme i některé fytofágní podčeledi, jako podčeď Epilachninae. Dále zde nalezneme i jiné potravní strategie, jako je například mykofágie (požírání konidií a hyf hub porůstajících listy rostlin např. padlím), tuto strategii nacházíme u tribů Halyziini a Tytthaspidini (Nedvěd 2015).

Rozmnožování slunéček je charakteristické často opakovaným a dlouhotrvajícím pářením, přičemž spojení může trvat i několik hodin. Samec při něm vpraví do samice několik spermatoforů. V čeledi nalezneme různé formy kladení vajíček. Vajíčka podčeledí Coccinellidae a Epilachninae jsou kladena ve snůškách obvykle po 20 až 80 kusech a jsou přilepena jedním vrcholem k vegetaci. U dalších podčeledí jsou kladena jednotlivě nebo po malých skupinách, často do těsné blízkosti kořisti (Nedvěd 2014).

Jedinci s blížící se diapauzou mění své chování. Někteří druhy provádí dlouhé migrační lety a tvoří masivní agregace, ve kterých mohou zůstat až několik měsíců. Toto chování se nejvíce vyskytuje u *Hippodamia convergens*, *Ceratomegilla undecimnotata* a *Harmonia axyridis*. Obecně lze říct, že tyto adaptace na blížící se diapauzu se vyvinuly nejčastěji u afidofágních druhů čeledi slunéčkovití (Hodek et al. 2012).

Rozlišujeme několik fází dormančního chování slunéček. V první fázi pre-diapauze dochází u většiny dospělých jedinců k akumulaci energetických zásob už před migrací na zimoviště, příkladovým druhem je *Coccinella septempunctata*. Ovšem jiné druhy si zajišťují zásoby až po migračním letu (např. *Hippodamia convergens*). Požitá potrava slouží v této fázi k tvorbě velké energetické zásoby v tukovém těle. Dá se tedy předpokládat, že právě dostatečné množství energetických rezerv představují podnět pro začátek vstupu do hlavní fáze diapauzy (Hodek et al., 2012). U slunéčka sedmitečného *Coccinella septempunctata* je regulace diapauzy komplikovaná, tedy alespoň v evropských populacích. Dobrzhanskii (1922) popsal bivoltinní vývojový cyklus pro tento druh a předpokládal geneticky fixované střídání generace s nepřerušným vývojem a generace, která vstupuje do diapauzy. Od této studie ukázal výzkum velmi širokou plasticitu u druhu, která umožňuje heterogenní

aktivitu v různých frakcích populací. Krátké studie Dobrzhanskii (1922) ukazují, že diapauza a průchod jí má veliký adaptivní význam pro následující přežití jedinců.

Významnou fází je migrační let. Existuje určitá kontroverze ohledně použití termínu migrace. Hagen (1962) tvrdí, že pouze let směrem k agregačním místům lze považovat za migraci, protože je směřovaná a částečně ovládaná broukem. Opouštění agregací je pak jednoduchý rozptylový let, protože není směřový. Podle Johnsonovy (1969) koncepce jsou oba zmíněné lety migrací, vysvětluje to jako, že směr obou přesunů je silně ovlivněn větrem, a to až na závěr, kdy fázi migračního letu do přezimovací místa ovládají brouci určením jejich směru ve vztahu k vizuálnímu nebo jiného podnětu. Ve vztahu k adaptivním aspektům při dormanci si brouci vybírají jako zimoviště spíše teplá místa. Zároveň se předpokládá, že vhodný poměr teploty, vlhkosti a provzdušňování dokáže zabránit šíření nemocí během zimy (Honěk 1989). Tendence k přezimování na mírně vyvýšeném terénu může mít výhodu v přežití, zejména v nížinných oblastech, ve kterých existuje hrozba záplav (Hodek et al. 2012).

Agregace je u mnoha slunéček specifickou adaptací spojenou s dormancí. Po příletu brouků na zimoviště se brouci agregují v některých mikrobiotopech podle fyzikálních faktorů (hydrotaxe, termotaxe), dále podle fototaxe, geotaxe nebo tigmotaxe. Brouci vytvářejí často agregace na význačných krajinných prvcích. Pro druhy jako *Ceratomegilla undecimnotata* a *Harmonia axyridis* mohou být tyto místa vrcholy kopců, velké skály nebo vysoké budovy. U jiných druhů to mohou být například okraje lesa, keře či stromy, které se nachází v rovinaté krajině, příkladovým druhem je *Coccinella septempunctata* (Hodek et al. 2012).

Po nastoupení hlavní fáze diapauzy dochází k poklesu metabolismu u brouků. Přečkání zimních nepříznivých podmínek spočívá v následném udržování metabolismu na nízké životní úrovni. Trvání pravé diapauzy může být několik dní až měsíců. Na konci dormance brouci postupně zvyšují svou aktivitu. Nečinnost v úkrytech před zimou a predátory přechází v postupnou mírnou pohyblivost. Během této závěrečné fáze dormance je u některých druhů pozorováno páření (zejména u druhů *Ceratomegilla undecimnotata* a *Coccinella septempunctata*; Hodek et al. 2012).

### 3.7.1 Přezimování druhu *Harmonia axyridis*

Slunéčko východní (*Harmonia axyridis*) využívá k přežití v chladných zimách skrytá a chráněná místa, kde se jedinci agregují a vytvářejí si ochranné mikroklima. Brouci si tak vytváří méně extrémní podmínky, než jaké panují ve vnějším prostředí. Dospělá slunéčka převážně přezimují v trhlinách hornin, betonových staveb, jeskyních či kupě listí (Berkvens et al. 2010). Během migrace na podzim dospělci vyhledávají místa k zimování pomocí tzv. hipotaktické orientace, což je let směrem k významným objektům. Významné objekty mohou být například lesklé a světle zbarvené body nebo členitá vyvýšená místa (Berkvens 2010). Často se agregují na místech, kam dopadá přímé sluneční záření a následně migrují do vhodných mikrostanovišť (štěrbiny ve skále, okenní rámy domů). Dospělci posléze brzy na jaře opouštějí svá přezimovací místa.

Dospělí jedinci *Harmonia axyridis* zažívají během přezimování několik fyziologických změn. Zimu začínají ve stavu pravé diapauzy a mají zvětšené tukové tělo a sníženou rychlost dýchání. Samice během zimy mají sníženou schopnost produkce, tzn. zastavený vývoj vaječnic (Hodek et al. 2012). Jak diapauza dále pokračuje, tak nahromaděný tuk je využíván jako energetická zásoba a tím následně tělesná hmotnost klesá. Postupně diapauza ustává a následuje proces relativně dlouhodobé kviescence, kdy dochází k zastavení nebo zpomalení vývoje (Berkvens et al. 2010). Slunéčka východní, která se vyskytují v nižších teplotách ztrácí během zimy méně tělesné hmotnosti a po přezimování jsou schopná déle přežít bez příjmu potravy (Raak-Van der Berg et al. 2013).

## 4 Praktická část

### 4.1 Popis experimentů

Náplní praktické části mé diplomové práce byla pomoc s realizací dlouhodobého přezimovacího experimentu zaměřeného na vliv teploty na přežívání a tělesnou kondici přezimujících slunéček východních. Navíc byly provedeny další doplňkové pilotní experimenty: 1) měření vlivu parazitické houby *Hesperomyces virescens* (Laboulbeniales: Laboulbeniaceae) na přežívání slunéček v terénních podmínkách a 2) měření dopadů manipulativního zvýšení vzdušné vlhkosti na přežívání slunéček východních v terénních podmínkách.

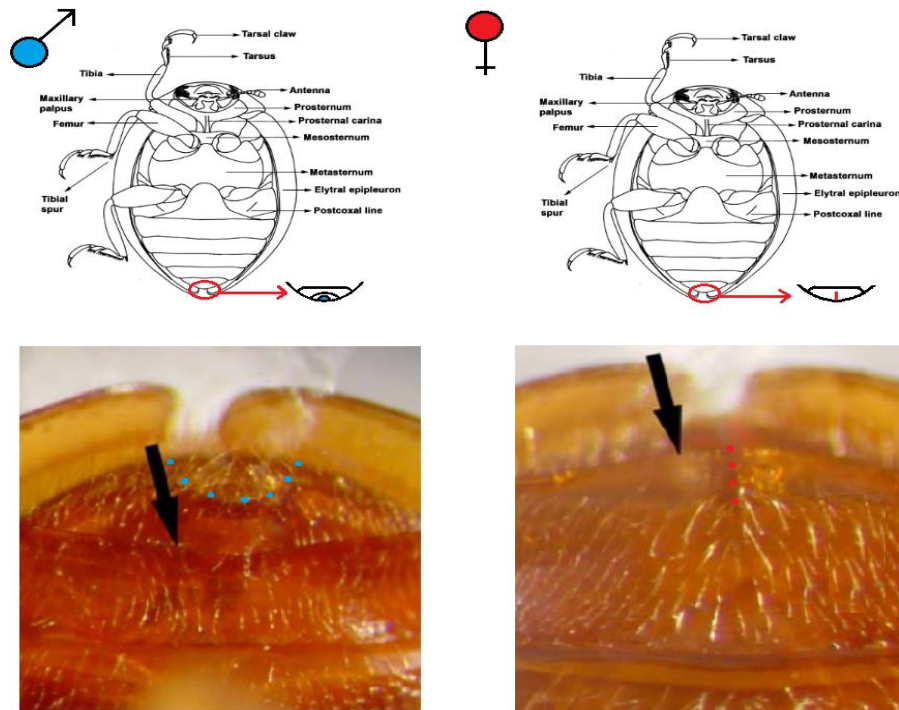
#### 4.1.1 Odchyt jedinců, rozmístění na lokality a jarní sběr

Pro dlouhodobý experiment i pro pilotní experimenty byla použita slunéčka východní agregující se před přezimováním v lokalitě Ohaře, která se nachází ve Středočeském kraji. Sběr probíhal vždy v druhé polovině října v letech 2017-2020 tak, abychom mohli zkoumat přežívání a kondice slunéček během zim 2017/18, 2018/19, 2019/20 a 2020/21. Slunéčka byla sbírána za pomoci metody individuálního sběru pomocí exhaustoru. Živá slunéčka byla stejný den ve velkých nádobách převezena do laboratoře FŽP ČZU v Praze, kde byla uskladněna v lednici nastavené na teplotu 8-10 °C, aby nedošlo k přerušování jejich přípravy na přezimování (indukce diapauzy). V následujících dnech byla provedena determinace pohlaví slunéček a rozdělení jedinců na infikované houbou *Hesperomyces virescens* a ty zdravé. Dále byla slunéčka rozdělena dle zbarvení na světlou (nejběžnější) formu Succinea a tmavě zbarvené (melanické) formy. V literatuře existují indicie, že zbarvení těla může ovlivňovat úspěšnost přezimování slunéček (Seo et al. 2008). Pro experimenty prezentované v této diplomové práci jsem využila pouze jedince nejpočetnější formy succinea, kteří tvoří asi 88 % jedinců v českých populacích (Nedvěd 2014), a proto jsou tyto výsledky pro území České republiky nejrelevantnější.

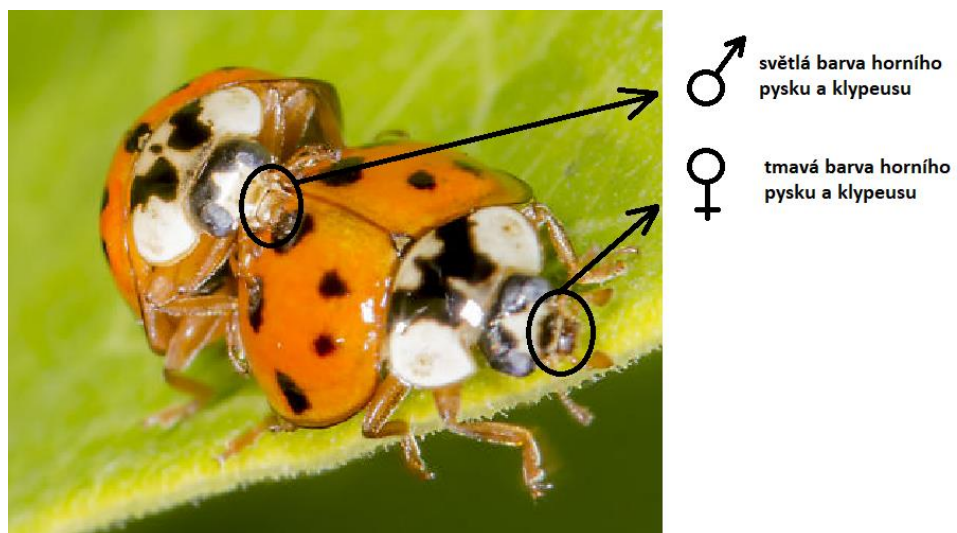
Pohlaví slunéček východních lze na první pohled rozpoznat dle zbarvení horního pysku kousacího ústrojí a klypeusu. U méně vybarvených (melanizovaných) jedinců však tento znak nemusí být vždy průkazný, a tak je potřeba dále využít k determinaci pohlaví i tvar posledního zadečkového článku. Samice má horní pysk a tečku klypeu černé barvy, samci naopak mají tento soubor znaků v bílé barvě (Obrázek 9).



Pro jedince s méně melanizovaným tělem musíme zkontrolovat i tvar posledního zadečkového článku, kde je vyústění kopulačních orgánů. Tento znak rozeznáváme pomocí binokulární lupy. U samic pozorujeme zřetelný znak vystouplé „čárky“ a u samců znak „obloučku“ (viz. Obrázek 8).



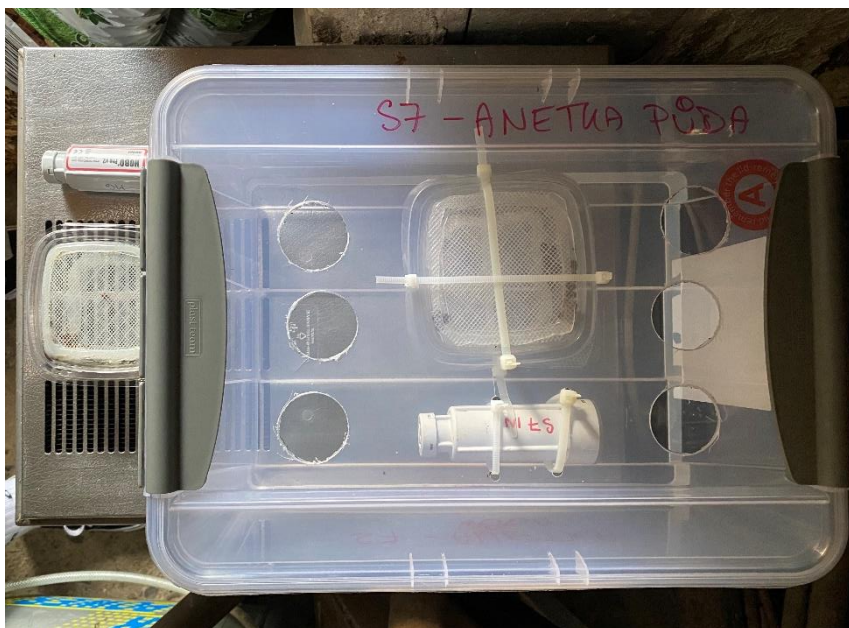
Obrázek 8: Určení pohlaví pomocí tvaru posledního zadečkového článku. Upraveno dle: [http://www.angelfire.com/bug2/j\\_poorani/morphology.htm](http://www.angelfire.com/bug2/j_poorani/morphology.htm)



Obrázek 9: Určení pohlaví pomocí barvy horního pysku a klypeusu. Upraveno dle: <https://bugguide.net/node/view/1121454>

Výskyt ektoparazitické houby *Hesperomyces virescens* (Laboulbeniales: Laboulbeniaceae) byl rovněž zkoumán pomocí binokulární lupy. Jedinci byli rozděleni do tří kategorií: 1) zdraví (bez známek infekce; do této kategorie spadala velká většina jedinců); 2) méně infikovaní (na těle méně než 15 vyvinutých plodnic) a 3) výrazně infikovaní (na těle více než 15 vyvinutých plodnic; tato slunéčka byla následně použita pro experiment zkoumající vliv infekce na přežívání slunéček). Následně byla slunéčka rozdělena do plastových krabiček o rozměru 10x10x5 cm, kde na spodní a vrchní straně byla vystřižena díra a do ní nalepena plastová mřížka (Obrázek 10). Mřížka na krabičce byla vytvořena proto, aby mikroklima uvnitř krabičky bylo stejné jako v jejím okolí. Do každé krabičky bylo umístěno 30 jedinců (15 samců a 15 samic) odpovídajícího typu (zdraví vs infikovaní). Pro základní experiment zkoumající vliv teploty na přezimování slunéček byli použiti jen zdraví jedinci. Navíc bylo několik jedinců každý rok sběru na podzim usmrceno pomocí hlubokého mrazu a uschováno v mrazáku v laboratoři ČZU FŽP v Praze pro následné měření tělesné kondice (před přezimováním). Před rozmístěním krabiček s brouky na různé lokality v rámci České republiky byly krabičky dále uschovány v lednici při teplotě 8–10 °C.

K samotnému rozmístění krabiček na lokality došlo vždy na začátku listopadu. Společně s krabičkou s brouky byl vždy na cílovou lokalitu (do těsné blízkosti krabičky) umístěn i data logger kontinuálně zaznamenávající průběh teploty. V případě pilotního experimentu zkoumajícího vliv vlhkosti byl použit data logger, který současně s teplotou měřil i relativní vzdušnou vlhkost. Pro tento pilotní experiment byl vyvinut speciální typ velkých krabic, které byly z části naplněny vodou a jedna krabička se slunéčky a odpovídající data logger byly umístěny dovnitř velké krabice (na její víko; Obrázek 10). Další krabička se slunéčky a jí odpovídající data logger pak byly umístěny do těsné blízkosti velké krabice (Obrázek 10), aby bylo možné zkoumat efekt zvýšení vzdušné vlhkosti uvnitř velké krabice na přežívání slunéček. Pro druhý pilotní experiment zkoumající vliv infekce na přežívání slunéček byly vždy v terénu položeny dvě krabičky se slunéčky těsně vedle sebe, přičemž jedna obsahovala zdravá slunéčka a druhá slunéčka infikovaná houbou *Hesperomyces virescens*. Pro obě krabičky sloužil k zaznamenávání teploty prostředí sdílený datalogger.



Obrázek 10: Velká krabice naplněna částečně s vodou, uvnitř krabička se slunéčky a data loggerem + vlevo další krabička se slunéčky a odpovídajícím data loggerem

Po konci přezimování na jaře (v druhé polovině března) 2018, 2019, 2020 a 2021, kdy krabičky s brouky byly svezeny zpět do laboratoře FŽP ČZU v Praze. V laboratoři probíhalo k roztržení slunéček na živá a mrtvá, zároveň ve stejném kroku docházelo i k determinaci pohlaví jedinců.

Do druhé části dlouhodobého přezimovacího experimentu, který obnášel zjišťování obsahu tuku, vstupovala pouze ta slunéčka, která přežila přezimování. Tedy do fyziologických analýz byly vybrány pouze ty přezimovací lokality, které měly dostatečné množství přeživších jedinců, které bylo stanoveno na sedm a více přeživších jedinců. Celkově do kondičního experimentu bylo vybráno 28 lokalit (z roku 2018/19 10 lokalit, 2019/20 4 lokality, 2020/21 14 lokalit; viz Příloha 1).

#### **4.1.2 Zjišťování obsahu tuku pro dlouhodobý experiment**

Prvním krokem bylo umístění jednotlivých slunéček do epruvet s unikátním ID kódem. Samotný postup stanovování obsahu tuku lze rozdělit na cyklus o třech fázích, kdy každá fáze trvala 48 hodin. Schéma fází postupu vypadalo následovně: sušení – odtučnění – sušení. V prvním sušení byla nejprve všechna slunéčka vysušena v sušičce v laboratoři Z019 – MCEV I (FŽP ČZU v Praze) při teplotě 50 °C po dobu 48 hodin. Suchá hmotnost, která byla získána prvotním sušením, byla měřena pomocí analytické váhy s přesností  $10^{-4}$  g v ekofyziologické laboratoři D414 (FŽP ČZU

v Praze). Ve druhé fázi odtučnění, která napomáhá ke zjištění suché libové hmotnosti, byl do epruvet k jedincům nalit roztok diethyletheru s chloroformem (50:50), který sloužil k rozpuštění všech tuků. Nakonec, v poslední třetí fázi sušení, byla sluněčka opět umístěna do sušičky v laboratoři Z019 při teplotě 50 °C. Závěrem po vysušení docházelo k finálnímu měření hmotnosti na analytické váze, čím byla získána suchá libová hmotnost. Následně byla změřena strukturní velikost těla pomocí binokulární lupy Zeiss s digitální kamerou a za využití nástrojů analýzy obrazu v programu Zeiss Zen Lite. Výsledný obsah tuku v těle jedince byl vypočten jako rozdíl hodnot suché hmotnosti a suché libové hmotnosti (Knapp 2016; Hurková 2020).

## 4.2 Analýza dat

Pro analýzu dat byl použit program R verze 4.1.2 (R Core Development Team, 2022). Pro vliv teplotního gradientu, vlhkosti a infekce houby *Hesperomyces virescens* na přežívání byly použity zobecněné lineární modely se smíšenými efekty (GLMM; funkce ‚glmer‘) a binomickým rozdělením dat. Vysvětlovanou proměnou bylo přežívání, vysvětlujícími proměnnými byly naměřené teploty (Tmean, Tmin, TSD), naměřené hodnoty vlhkosti (Hmean, HSD), infekce houbou *Hesperomyces virescens*, pohlaví a box (umístění do velké krabice s vodou). Mezi těmito vysvětlujícími proměnnými byly následně zahrnuty vzájemné interakce. Jako náhodný efekt jsme do modelu zahrnuli rok. Nejvhodnější model byl vybrán pomocí AICc kritéria. Zde upozorňuji, že ne všechny nezávislé proměnné byly použity pro všechny datasety (vlhkosti byly měřeny jen pro experiment s boxy a vliv houbové infekce jen pro experiment s *Hesperomyces virescens*).

Pro vizualizaci tělesných kondicí v rámci lokalit byla použita jednosměrná ANOVA. Residuály ze vztahu obsahu tuků-velikosti těla byly zahrnuty v modelu jako vysvětlovaná proměnná a jako vysvětlující proměnná byla použita lokalita. Pro následné ukázání rozdílů mezi lokalitami byly použity Post-hoc testy. Pro vyhodnocení vlivu teploty na tělesnou kondici sluněček po přezimování byla pro každou lokalitu vypočtena průměrná kondice daného pohlaví. Tyto průměrné kondice byly analyzovány napříč roky pomocí lineárního model se smíšenými efekty (LME; funkce ‚lmer‘). Vysvětlovanou proměnou byly průměrné residuály a vysvětlujícími proměnnými byly naměřené teploty (Tmean, Tmin, TSD), pohlaví a jejich vzájemné interakce. Dále byl v modelu zahrnut náhodný efekt roku.

## 5 Výsledky

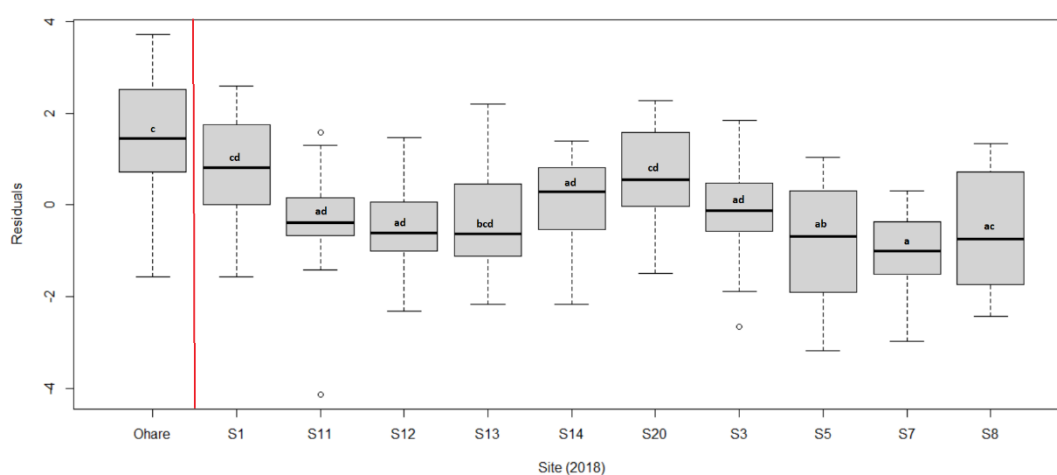
### 5.1 Tělesná kondice přezimovaných sluněček

Výsledkem analýzy relativního obsahu tuku je zjištění, že tělesná kondice sluněček se výrazně snižuje během zimy (vliv lokality: viz Obrázek 11-13). Statisticky průkazné rozdíly najdeme i mezi sluněčky přezimovanými v rámci daného roku v různých podmínkách (Tabulka 1; Obrázek 11-13 a post-hoc testy v nich zobrazené).

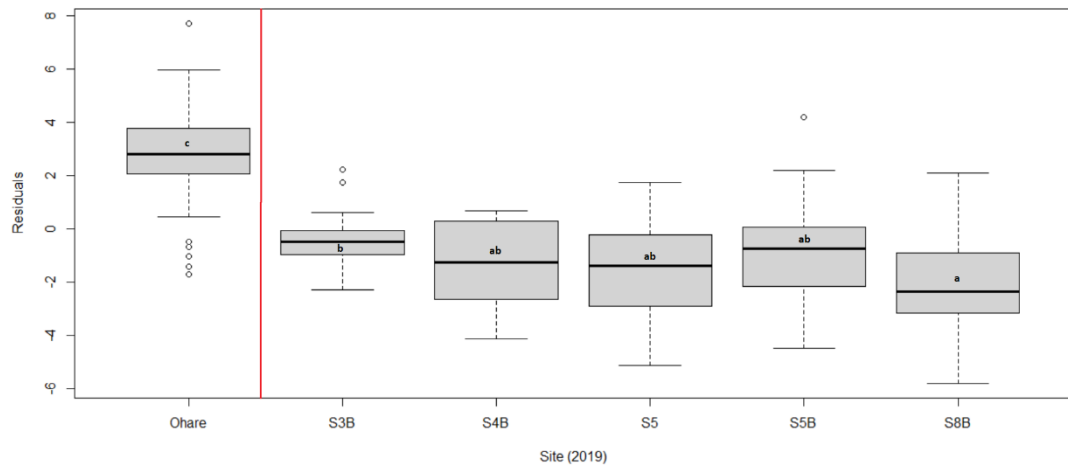
Překvapením je, že teplota během přezimování (Obrázek 14) silně neovlivňuje kondici brouků ( $X^2 = 2,97$ ;  $P = 0,08$ ). Mírně průkazně se ukazuje v mých výsledcích experimentu vztah mezi tělesnou kondicí a mírou fluktuace zimních teplot (TSD;  $X^2 = 5,48$ ;  $P = 0,019$ ). Naopak můžeme vidět celkem konzistentní průkazné rozdíly v residuálech (tělesné kondici) mezi samci a samicemi, kdy je zřejmé, že samci měli vyšší hodnoty téměř napříč všemi lokalitami ( $X^2 = 169,84$ ,  $P < 0,001$ ).

Tabulka 1: Vliv pohlaví a lokality na residuály obsahů tuků během přezimování sluněčka *Harmonia axyridis*.

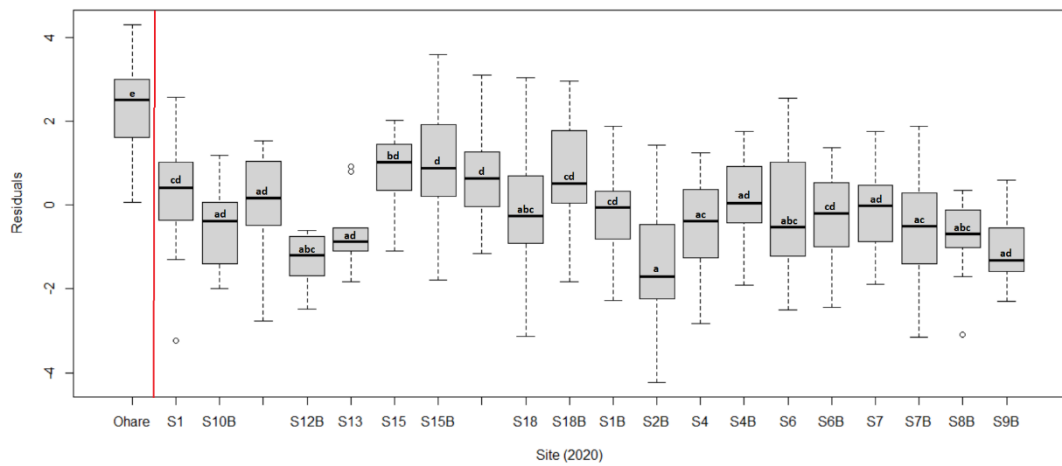
| Rok     | Pohlaví     |             | Lokalita    |             |
|---------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|         | F - hodnota | P - hodnota | F - hodnota | P - hodnota |
| 2018/19 | 32,02       | < 0,001     | 13,40       | < 0,001     |
| 2019/20 | 35,18       | < 0,001     | 27,59       | < 0,001     |
| 2020/21 | 124,04      | < 0,001     | 11,54       | < 0,001     |



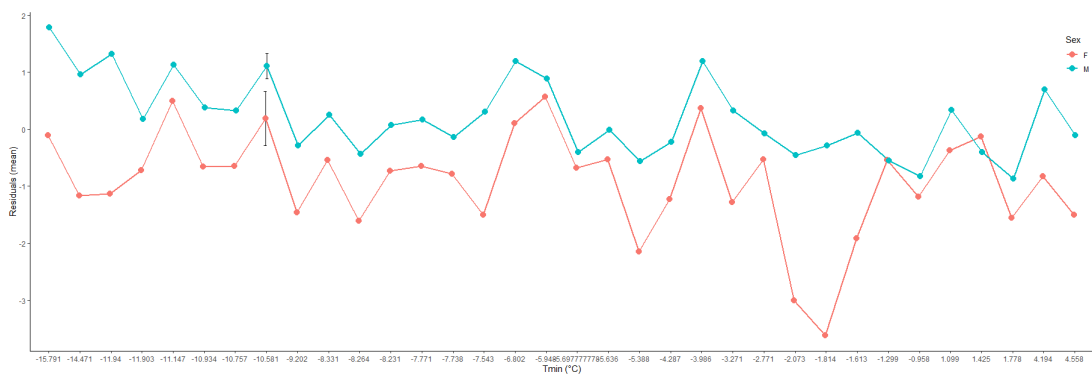
Obrázek 11: Schématický graf znázorňující rozdíl residuálů obsahu tuku mezi jedinci měřenými na podzim (Ohaře) a po přezimování (lokality s ID) v roce 2018.



Obrázek 12: Schématický graf znázorňující rozdíl residuálů obsahu tuku mezi jedinci měřenými na podzim (Ohaře) a po přezimování (lokality s ID) v roce 2019.



Obrázek 13: Schématický graf znázorňující rozdíl residuálů obsahu tuku mezi jedinci měřenými na podzim (Ohaře) a po přezimování (lokality s ID) v roce 2020.



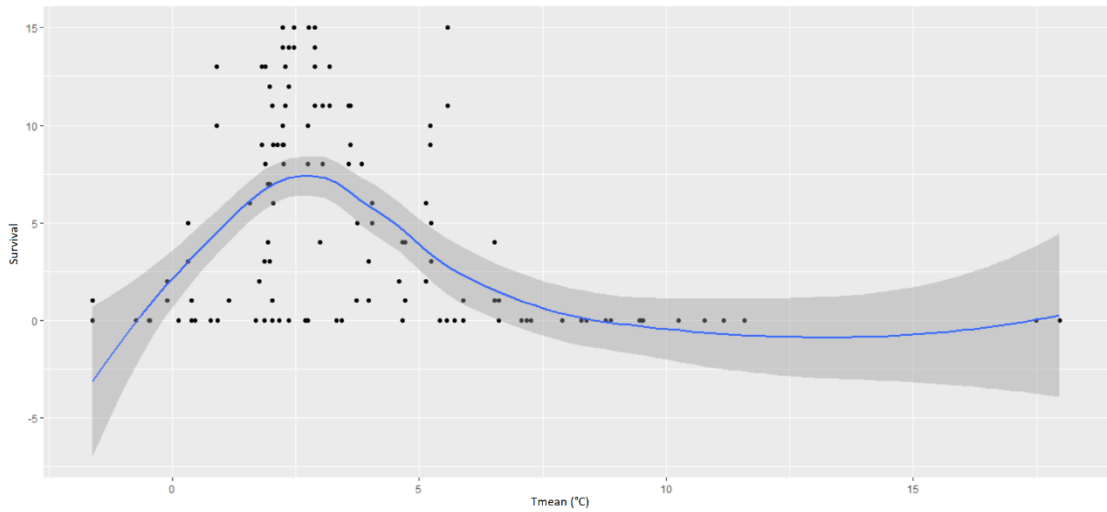
Obrázek 14: Graf znázorňující interakce mezi průměrnou naměřenou teplotou ( $T_{mean}$ ) a pohlavím ke vztahu residuálům obsahu tuku

## 5.2 Vliv teploty na přežívání zimujících slunéček

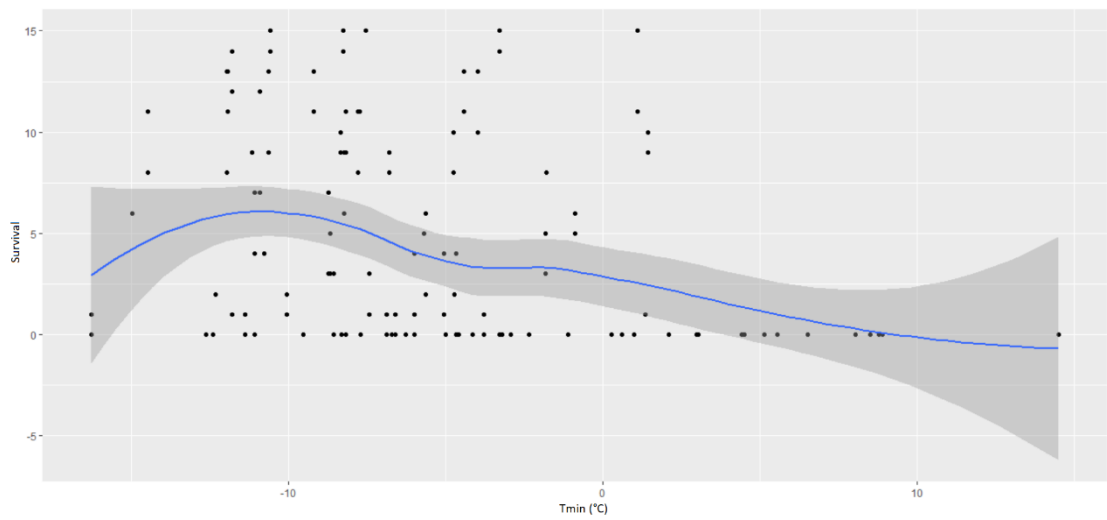
Teplota během přezimování má výrazný vliv na přežívání jedinců druhu *Harmonia axyridis* (viz Tabulka 2). Z grafu na obrázku 15 je patrné, že nejvyšší přežívání se vyskytuje v rozmezí průměrných zimních teplot 2–5 °C. S postupným snižováním i zvyšováním průměrné teploty od tohoto intervalu se zvyšuje mortalita jedinců. Na obrázku 16 zase můžeme vidět, že vysoká míra přežívání se může vyskytovat i v lokalitách, kde byla naměřena relativně nízká minimální teplota okolo -10 °C. Nízká teplota brouky udržuje v neaktivním stavu a tím neztrácí takové množství energetických zásob nutný k přežívání jako v teplotách vyšších. Dalším výsledkem je pozorování, že přirozeně fluktuující teploty (vyšší TSD) jsou pro přežívání brouků prospěšné (Obrázek 17) a konstantní teploty spíše zvyšují riziko úmrtí. Trochu překvapujícím výsledkem bylo, že pohlaví slunéček vůbec neovlivňovalo jejich přežívání během zimy, i když analýza tělesných kondicí ukazovala konstantní rozdíly v kondici (relativním obsahu tuku) mezi samicemi a samci.

Tabulka 2: Vliv teplotního gradientu na přežívání během přezimování slunéčka *Harmonia axyridis*.

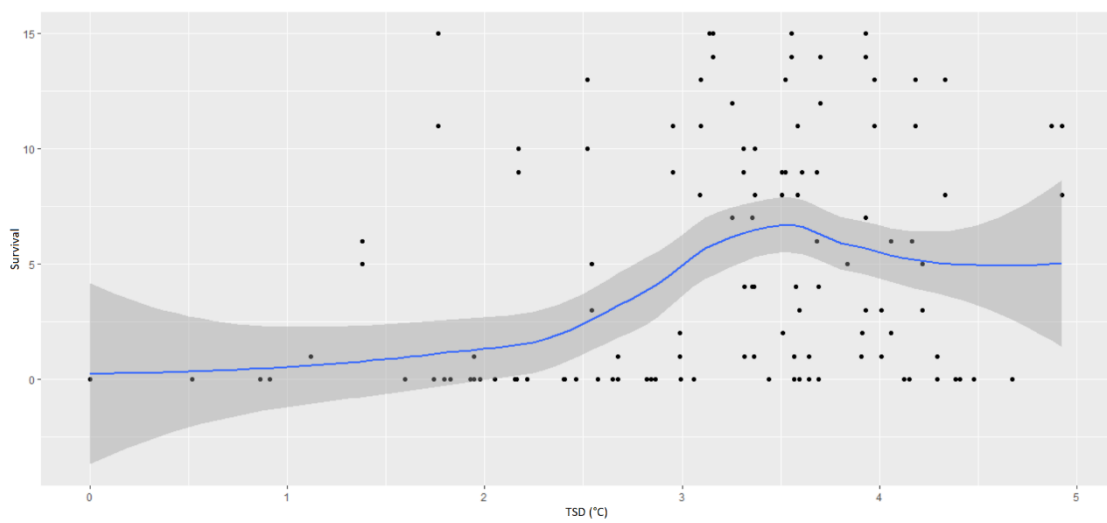
|                           | X <sup>2</sup> - hodnota | P - hodnota    |
|---------------------------|--------------------------|----------------|
| Tmean                     | 118,78                   | < <b>0,001</b> |
| Tmean <sup>2</sup>        | 170.31                   | < <b>0,001</b> |
| Tmin                      | 19.26                    | < <b>0,001</b> |
| TSD                       | 17.19                    | < <b>0,001</b> |
| Tmean : TSD               | 1.71                     | 0,191          |
| Tmean <sup>2</sup> : Tmin | 3.36                     | 0.067          |



Obrázek 15: Křivka přežívání jedinců *Harmonia axyridis* v závislosti na naměřené průměrné teplotě (Tmean)



Obrázek 16: Křivka přežívání jedinců *Harmonia axyridis* v závislosti na naměřené minimální teplotě (Tmin)



Obrázek 17: Křivka přežívání jedinců *Harmonia axyridis* v závislosti na naměřené směrodatné odchylce teplot (TSD)



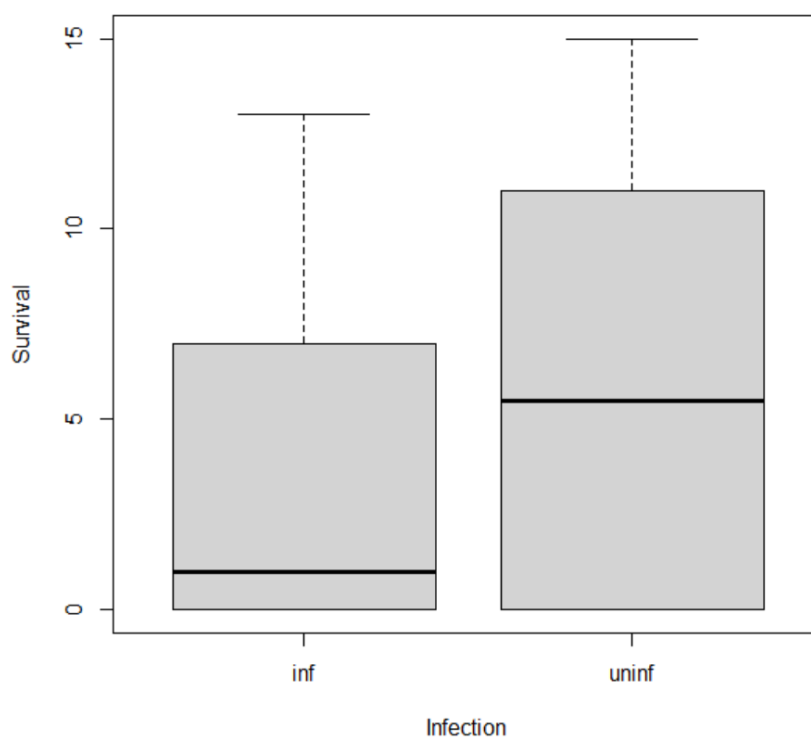
### 5.3 Měření vlivu parazitické houby *Hesperomyces virescens* na přežívání

Výskyt parazitické houby *Hesperomyces virescens* na jedincích druhu *Harmonia axyridis* má výrazný vliv na přežívání během zimy (Obrázek 18; Tabulka 3). Přičemž infikovaná sluněčka mají průkazně nižší přežívání než ta zdravá.

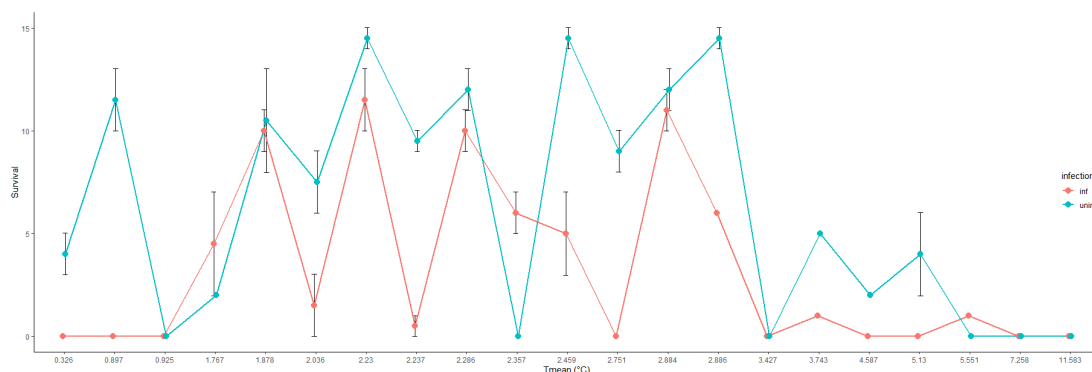
Na obrázku 19 můžeme vidět, že ačkoli byla průkazná i interakce mezi teplotou a infekcí, interpretace výsledku není úplně snadná. Zdá se, že střední (optimální) přezimovací teploty vedou k největšímu rozdílu v úspěšnosti přezimování mezi zdravými a infikovanými sluněčky (Obrázek 19; Tabulka 3).

Tabulka 3: Vliv infekce a teplotního gradientu na přežívání během přezimování sluněčka *Harmonia axyridis*.

|                   | X <sup>2</sup> - hodnota | P - hodnota |
|-------------------|--------------------------|-------------|
| Infection         | 58,35                    | < 0,001     |
| Tmean             | 57,52                    | < 0,001     |
| Tmin              | 28,71                    | < 0,001     |
| TSD               | 6,60                     | 0,010       |
| Infection : Tmean | 6,65                     | 0,010       |
| Infection : Tmin  | 6,09                     | 0,014       |



Obrázek 18: Krabicový graf znázorňující rozdíl v přežívání mezi infikovanými a neinfikovanými jedinci *Harmonia axyridis* houbou *Hesperomyces virescens*.



Obrázek 19: Graf znázorňující interakci infekce houbou *Hesperomyces virescens* a naměřené průměrné teploty (Tmean) ke vztahu k přežívání druhu *Harmonia axyridis*.

#### 5.4 Měření dopadů manipulativního zvýšení vzdušné vlhkosti

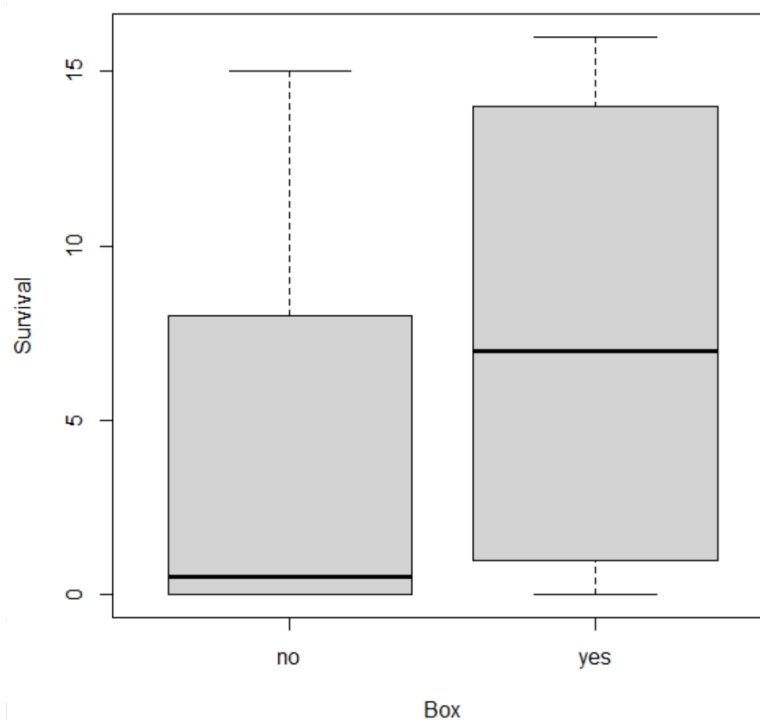
Z výsledků měření dopadů manipulativního zvýšení vzdušné vlhkosti vychází, že vyšší přežívání se vyskytuje právě u jedinců, kteří vyskytující ve velkých boxech naplněných vodou, který simulují zvýšení vzdušné vlhkosti (vliv boxu: Tabulka 4; Obrázek 20).

Z obrázku 21 vyplývá větší přežívání při vyšších teplotách u jedinců, kteří byli uvnitř boxů (velkých krabic naplněných vodou). Při vyšší teplotě může docházet u jedinců mimo box ke zvýšenému vysoušení vedoucí k smrti jedince. Simulace zvýšení vzdušné vlhkosti napomáhalo přezimujícím broukům udržovat hladinu vody v organismu a tím bylo zabráněno vysoušení organismu během zimy.

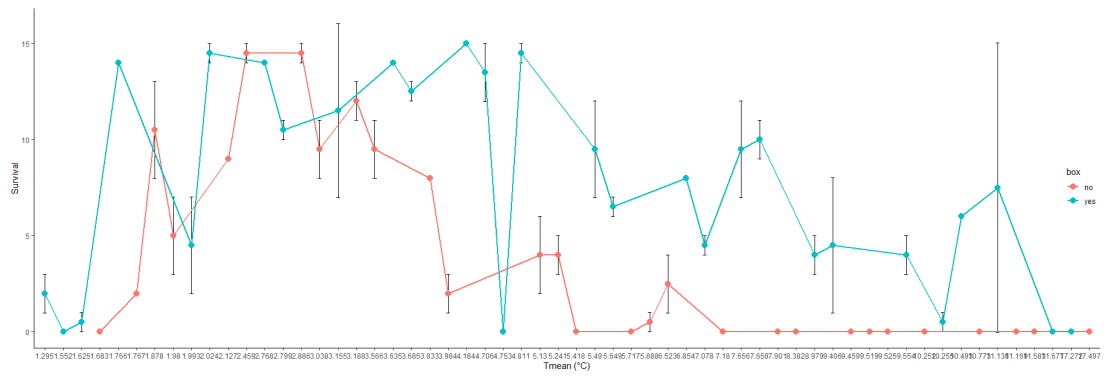
Zajímavým výsledkem je průkazná interakce teploty a vlhkosti ( $X^2 = 78,09$ ;  $P < 0,001$ ). Z mých výsledků vyplývá, že při nízké vlhkosti ( $< 65\%$  vlhkost) a vyšší průměrné naměřené teploty (Tmean) se výrazně zvyšuje mortalita (Obrázek 22). U hmyzu dochází vlivem vyšších teplot a nedostatku vody ve vzduchu k vysoušení. Naopak u vysoké vlhkosti (větší než  $90\%$ ) a nízkých průměrných teplotách dochází u hmyzu k mrazovým zraněním (*chill injuries*), nejspíše v důsledku zvýšené tvorby ledových krystalků v těle (úplně levá část Obrázku 22).

Tabulka 4: Vliv teplotního gradientu a vlhkosti na přežívání během přezimování slunéčka *Harmonia axyridis*.

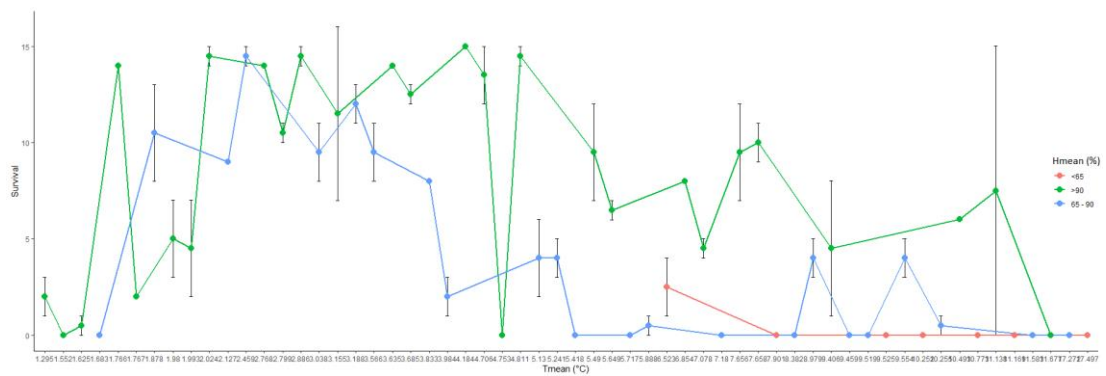
|               | X <sup>2</sup> - hodnota | P - hodnota    |
|---------------|--------------------------|----------------|
| Box           | 21,41                    | < <b>0,001</b> |
| Tmean         | 2,21                     | 0,137          |
| Tmin          | 53,51                    | < <b>0,001</b> |
| Hmean         | 0,0003                   | 0,985          |
| HSD           | 0,068                    | 0,794          |
| Box : Tmean   | 44,25                    | < <b>0,001</b> |
| Box : Tmin    | 16,81                    | < <b>0,001</b> |
| Box : Hmean   | 6,53                     | <b>0,038</b>   |
| Tmean : Hmean | 78,09                    | < <b>0,001</b> |



Obrázek 20: Krabicový graf znázorňující přežívání v závislosti na manipulativním zvyšování vzdušné vlhkosti za pomoci velkých krabic naplněných vodou.



Obrázek 21: Graf znázorňující interakci manipulativního zvyšování vlhkosti za pomoci velkých krabic naplněných vodou (vně nebo vevnitř) a naměřené průměrné teploty (Tmean) ke vztahu k přežívání druhu *Harmonia axyridis*.



Obrázek 22: Graf znázorňující interakci vlhkosti (Hmean) a teploty (Tmean) ke vztahu k přežívání druhu *Harmonia axyridis*.

## 6 Diskuze

Teplota prostředí je významným faktorem, který velmi podstatně ovlivňuje aktivitu hmyzu. Jelikož hmyz patří mezi ektotermní organismy, je teplota jeho těla z podstatné části závislá na teplotě prostředí a tím teplota prostředí určuje spotřebu hmyzích energetických zásob v době přezimování (Spacht et al. 2021). Teplotní gradienty v mé experimentální části nepředstavovaly nijak zvlášť extrémní zimní podmínky pro druh *Harmonia axyridis* (průměrná teplota se ve většině lokalit pohybovala v rozmezí 2-7 °C). Mnou vybraný modelový druh *Harmonia axyridis* má spodní hranici letální hodnoty pro evropské invazní populace okolo -16 °C (Berkvens et al. 2010). Berkvens et al. (2010) ve své studii poukázal, že *Harmonia axyridis* dokáže bez problému přežít při průměrných zimních venkovních teplotách, které se vyskytující v mírném pásmu Evropy. Svou bilanci přežití zvyšuje tento hmyz i tvorbou ochranného mikroklimatu v agregacích při přezimování, v něm zvládají přežít i při teplotách docela hluboko pod nulou (Koch et al. 2004).

Místo snížené přežívání, které jsem pozorovala během mého výzkumu, může souviset s omezenou velikostí agregace. V dlouhodobém experimentu bylo v krabičkách „pouhých“ 30 jedinců, ale pro přirozené agregace je obvyklý počet až několik tisíc jedinců (Hodek et al. 2012). Ke zvýšené mortalitě dochází při nižších teplotách, než jsou optimální teploty přezimování. Dochází tím k poškození jedinců chladem či mrazem. Pokud zmrazíme *Harmonia axyridis* (druh netolerující zmrznutí), dochází ke zmrznutí tělesných kapalin a následně v důsledku tvorby krystalů narušující tkáň dochází k následnému úmrtí jedince (Raak-Van der Berg et al. 2012).

Studie Labrie et al. (2008) ukazuje větší mortalitu i při vyšších zimních teplotách (při teplotě v rozmezí 0–5 °C). Vyšší zimní teploty u hmyzu navozuje větší aktivitu během zimy a tím zvyšuje spotřebu energetických rezerv, které si jedinci nastřádali před zimou. Tento výsledek pozorují ve studii na hodnocení lipidového podílu. Dokládají vyšší vyčerpání lipidů během zimy při teplotě 10 °C, než při teplotě 5 °C. V porovnání s mými výsledky experimentu je ovšem vidět nesoulad, já jsem nepozorovala signifikantní vztah mezi teplotou a spotřebou energetických rezerv. Mírně průkazně se ukazuje v mé práci vztah mezi tělesnou kondicí a mírou fluktuace zimních teplot (TSD;  $P = 0,019$ ).

Pro porovnání tělesné kondice (relativního obsahu tuku) mezi lety si můžeme všimnout, že pokles energetických zásob se mezi roky lišil před a po přezimování (v roce 2018 byl pozorován relativně menší pokles). Toto zjištění by mohlo být dáno specifickou zimou v roce 2018. Naměřené průměrné teploty v roce 2018 se pohybují v rozmezí 2-5 °C (s nejnižší naměřenou teplotou -9 °C), s určitostí nelze říct důvod relativně menšího poklesu energetických zásob před a po přezimování. Zajímavý je rozdíl v kondici samců a samic. Ovšem může se jednat i o jakýsi metodologický artefakt. Pro zkoumání relativního obsahu tuku používám se své práci residuály, kde je odstraněn vliv strukturní velikosti. Tento proces může výsledky nějak ovlivňovat z důvodu existence pohlavního. Obecně v hmyzí říši platí, že samice jsou větší než samci (Chown & Gaston, 2010), což je pravda i pro slunéčko východní. Výsledky mé práce ukazují, že vyšší residuály se vyskytovaly u samců (Obrázek 14). Tento výsledek však může být dán jejich systematicky menší strukturní velikostí.

Pro lepší přežívání hmyzu během zimy, kdy je hmyz převážnou dobu neaktivní, jsou nejvíce prospěšné mírně přirozeně fluktuující teplotní podmínky. Hmyz je na tyto podmínky lépe adaptován. Ve své práci na modelovém druhu slunéčka východního tento předpoklad odpovídá výsledkům. Mé výsledky ukazují nejlepší přežívání při průměrných teplotách od 2 do 6 °C s mírnými kolísáním teplot. Při vyšší míře kolísání teplot se již u slunéček vyskytuje zvýšená mortalita (Obrázek 17).

Dalším výrazným faktorem omezujícím přežívání slunéček během přezimování jsou patogeny, paraziti a další přirození nepřátelé. V mém experimentu byl zjištěn vliv parazitické houby *Hesperomyces virescens*, která významně snižuje přežívání druhu *Harmonia axyridis* v zimním období (Obrázek 18). Existuje pouze málo studií o patogenech a jejich vlivu na přežívání nebo vlivu změny organismu během přezimování. Studie Knapp et al. (2022) poskytla důkazy o tom, že infekce *Hesperomyces virescens* má negativní účinek na přežívání slunéček v laboratorních podmínkách. Zde ukazují, že tento jev je možné pozorovat i při přezimování v přirozených teplotních podmínkách a že navíc přežívání infikovaných jedinců závisí na teplotě (Obrázek 19).

V návaznosti na studii Knapp et al. (2022), která poukazuje na negativní účinek parazitické houby na jarní přežívání infikovaných jedinců, by bylo vhodné v budoucnu navázat na studii zkoumající tělesnou kondici infikovaných jedinců na konci zimy.

Patogeny ovlivňují organismus, kdy samotná parazitická houba může brát samotné zásoby brouků a tím je oslabuje a zvyšuje jejich mortalitu v době, kdy jsou brouci neaktivní. Výsledkem by mohlo být srovnání úbytku obsahu tuku v těle a ukázání, jak moc infekce houbou *Hesperomyces virescens* ovlivňuje úbytek energetických zásoby.

Vyrovnání se hmyzu se ztrátou vody během zimy, aby byla udržena vodní rovnováha v těle, je pro hmyz obtížné (Hadley, 1994). V rámci pilotního experimentu manipulativního zvyšování vzdušné vlhkosti, bylo zřetelné, že jedinci druhu *Harmonia axyridis*, u kteří přezimovali právě ve zvýšené vlhkosti, přežívali během přezimování lépe (Obrázek 20). V rámci interakce vlhkosti s teplotou bylo se ukázalo, že při rostoucí průměrné teplotě a nízké vlhkosti ( $H_{\text{mean}} < 65 \%$ ; Obrázek 22) se výrazně zvyšovala mortalita brouků. Tento výsledek je v rozporu porovnání studie Klockmann & Fischer (2019), kdy v laboratorních podmínkách navozovali podmínky pro diapauzu u motýlů druhu *Lycaena tityrus*. Výsledkem jejich studie bylo, že pozorovali sníženou míru přežití o 17 % u jedinců při vyšší vlhkosti a vyšších průměrných teplotách během zimy.

Ovšem obecně o vztahu vlhkosti a přežívání během přezimování existuje málo vědeckých publikací. Pro budoucí výzkumy by bylo prospěšné pokračovat ve výzkumu vztahu teplota – vlhkost – přežívání u hmyzu. Zjišťovat interakce mezi jednotlivými faktory a jejich kritické hodnoty pro přežívání. Protože vzdušná vlhkost je závislá na teplotě prostředí, bylo by dále prospěšné v dalších experimentálních studiích sledovat přímo obsah vody ve vzduchu korigovaný na teplotu.

## 7 Závěr

Má diplomová práce navazovala na mou bakalářskou práci, čímž se pokračovalo ve dlouhodobém přezimovacím experimentu. Dlouhodobý přezimovací experiment spočíval ve zjišťování přežívání slunéček druhu *Harmonia axyridis* a dopadu teploty na jejich tělesnou kondici. Dále byl dlouhodobý experiment obohacen o pilotní experimenty zjišťující vliv parazitické houby *Hesperomyces virescens* na přežívání slunéček během přezimování a dopadů manipulativního zvyšování vzdušné vlhkosti na přežívání brouků během zimy.

Celkově bylo 695 jedinců z 28 přezimovacích lokalit podrobena přeměřování tělesné kondice po přezimování. Rozdíl mezi měřeními před zimou a po zimě byl znatelný, statistický rozdíl se projevil i mezi jednotlivými přezimovacími lokalitami. Analýzou dat ale nebyl prokázán vliv teploty na hospodaření s energetickými zásobami během zimy.

V dlouhodobém přezimovacím experimentu, který byl zaměřen na přežívání jedinců byly využity různé lokality v rámci celé České republiky. Lokality byly vybrány, aby odpovídaly přirozeným zimním teplotním podmínkám napříč Českou republikou. V rámci statistické analýzy byl prokázán vliv teploty na přežívání během přezimování a následně v rámci pilotních experimentů byly prokázány vlivy parazitické houby *Hesperomyces virescens* a vliv vlhkosti na přežívání zimy u druhu *Harmonia axyridis*.

Výsledky mého experimentu hodnotím kladně, stanovené cíle práce byly splněny. Z hlediska dalšího výzkumu z pohledu přezimování a fyziologie hmyzu by bylo dobré se do budoucna zaměřit více na vliv vlhkosti vzduchu během zimy.



## 8 Použitá literatura

1. AGGARWAL D. D., 2014: Physiological basis of starvation resistance in *Drosophila leontia*: analysis of sexual dimorphism. *Journal of Experimental Biology* 217, 1849-1859.
2. ANGILLETTA M. J., 2009: *Thermal Adaptation: A theoretical and empirical synthesis*. Oxford University Press, Oxford.
3. BALE J.S., 1993: Classes of insect cold-hardiness. *Functional ecology* 7 (6), 751-753.
4. BALE J. S., HAYWARD S. A. L., 2010: Insect overwintering in a changing climate. *Journal of Experimental Biology* 213, 980-994.
5. BENOIT, J.B., ZHANG Q., JENNINGS E.C., ROSENDALE A.J., DENLINGER D.L., 2015: Suppression of net transpiration by multiple mechanisms conserves water resources during pupal diapause in the corn earworm *Helicoverpa zea*. *Physiological Entomology* 40, 336-342.
6. BENOIT, J.B., LOPEZ-MARTINEZ, G., PHILLIPS, Z.P. ET AL., 2010: Heat shock proteins contribute to mosquito dehydration tolerance. *Journal of Insect Physiology* 56, 151–156.
7. BENOIT, J.B., 2010: Water management by dormant insects: comparisons between dehydration resistance during summer aestivation and winter diapause. *Aestivation: Molecular and Physiological Aspects* (ed. By J.E. de Carvalho and C.A. Navas), pp. 209–229.
8. BENOIT, J.B., DENLINGER, D.L., 2007: Suppression of water loss during adult diapause in the northern house mosquito, *Culex pipiens*. *Journal of Experimental Biology* 210, 217–226.
9. BERKVEN N., BALE J. S., BERKVEN D., TIRRY L., DE CLERCQ P., 2010: Cold tolerance of the harlequin ladybird *Harmonia axyridis* in Europe. *Journal of Insect Physiology* 56 (6), 438-444.

10. BERTHOUD, H., IMDORF, A., HAUETER, M., RADLOFF, S. & NEUMANN, P., 2010: Virus infections and winter losses of honey bee colonies (*Apis mellifera*). *Journal Apicultural Research* 49, 60–65.
11. BLANCKENHORN W.U., FANTI J., REIM C., 2000: The evolution of body size: what keeps organisms small? *Q Rev. Biol.* 75 (4), 385-407.
12. BLANCKENHORN W.U., FANTI J., REIM C., 2007: Size-dependent energy reserves, energy utilization and longevity in the yellow dung fly. *Physiological Entomology* 32, 372–381.
13. BOSH J. SGOLASTRA F., KEMP W.P., 2010: Timing of eclosion affects diapause development, fat body consumption and longevity in *Osmia lignaria*, a univoltine, adult – wintering solitary bee. *Journal Insect Physiology* 56, 1949-1957.
14. BRADSHAW C.J.A., LEROY B., BELLARD C., ROIZ D., ALBERT C., FOURNIER A., BARBET-MASSIN M., SALLES J.-M., SIMARD F., COURCHAMP F., 2016: Massive yet grossly underestimated global costs of invasive insect. *Nature Communications* 7, 12986.
15. BUXTON R.T., MCKENNA M.F., CLAPP M., MEYER E., STABENAU E., ANGELONI L.M., CROOKS K., WITTEMYER G., 2018: Efficacy of Extracting Indices from Large-Scale Acoustic Recordings to Monitor Biodiversity. *Conservation Biology* 32 (5), 1174–84.
16. CHAPMAN N. F., 1998: *The Insects. Structure and Function* (4th edition). Cambridge University Press, Cambridge.
17. CHOWN S. L., GASTON K.J., 2010: Body Size Variation in Insects: A Macroecological Perspective. *Biological Reviews* 85 (1), 139–69.
18. DANKS H. V., 2000: Dehydration in dormant insects. *Journal Insect Physiology* 46 (6): 837–852.
19. DENLINGER D.L., 2002: Regulation of diapause. *Annual Review of Entomology* 47, 93–122.

20. DOBRZHANSKII F.G., 1922: Imaginal diapause in Coccinellidae. Mass aggregations and migrations in Coccinellidae. *Izv. Otd. Prikl. Entomology* 2, 103-124.
21. ESCALONA H. E., ZWICK A., LI H. S., LI J. H., WANG X. M., PANG H., HARTLEY D., JERMIIN L. S., NEDVĚD O., MISOF B. NIEHUIS O., SLIPINSKI A., TOMASZEWSKA W., 2017: Molecular phylogeny reveals food plasticity in the evolution of true ladybird beetles (Coleoptera: Coccinellidae: Coccinellini). *BMC Evolutionary Biology* 17 (1), 151.
22. FIEDLER L., NEDVĚD O., 2019: Fifty Shades of the Harlequin Ladybird and a Sexually Transmitted Fungus. *Journal of Insect Science* 19(6), 10.
23. HADLEY, N.F., 1994: *Water Relations of Terrestrial Arthropods*. Academic Press, New York, New York.
24. HAELEWATERS D., DE KESEL A., PFISTER D.H., 2018: Integrative Taxonomy Reveals Hidden Species within a Common Fungal Parasite of Ladybirds. *Scientific Reports* 8 (1), 1–16.
25. HAELEWATERS D., HILLER T., KEMP E.A., VAN WIELINK P.S., SHAPIRO-ILAN D.I., AIME M.C., NEDVED O., PFISTER D.H., COTTRELL T.E., 2020: Mortality of native and invasive ladybirds co-infected by ectoparasitic and entomopathogenic fungi. *Peerj* 8, e10110.
26. HAELEWATERS D., BLACKWELL M., PFISTER D.H., 2021: Laboulbeniomyces: Intimate Fungal Associates of Arthropods. *Annual Review of Entomology* 66, 257-276.
27. HAGEN, K. S., 1962: Biology and ecology of predacious Coccinellidae. *Annual Review of Entomology* 7, 289-326.
28. HAHN D. A., DENLINGER D. L., 2007: Meeting the energetic demands of insect diapause: nutrient storage and utilization. *Journal Insect Physiology* 53 (8), 760–773.
29. HALSCH C.A., SHAPIRO C.M., FORDYCE J.A., NICE C.C., THORNE J.H., WAETJEN D.P., FORISTER M.L., 2020: Insects and recent climate change. *bioRxiv*.

30. HAN E.N., BAUCE É., 1993: Physiological changes and cold hardiness of spruce budworm larvae, *Choristoneura fumiferana* (Clem.), during pre-diapause and diapause development under laboratory conditions. *Canadian Entomologist* 125, 1043–1053.
31. HENDRICKX F., MAELFAIT J-P., DESENDER K., AVIRON S., BAILEY D., DIEKOTTER T., LENS L., LIIRA J., SCHWEIGER O., SPEELMANS M., VANDOMME V., BUGTER R., 2009: Pervasive effects of dispersal limitation on within and among-community species richness in agricultural landscapes. *Global Ecology and Biogeography* 18, 607-616.
32. HENDRICKX F., MAELFAIT J-P., VAN WINGERDEN W., SCHWEIGER O., SPEELMANS M., AVIRON S., AUGENSTAIN I., BILLETER R., BAILEY D., BUKAČEK R., BUREL F., DIEKÖTTER T., DIRKSEN J., HERZOG F., LIIRA J., ROUBALOVÁ M., VANDOMME V., BUGTER R., 2007: How landscape structure, land use intensity and habitat diversity affect components of total arthropod diversity in agricultural landscapes. *Journal of Applied Ecology* 44, 340-351.
33. HODEK I., VAN EMDEN H. F., HONĚK A., 2012: Ecology and behaviour of the ladybird beetles (Coccinellidae). Blackwell Publishing Ltd. 599 pp.
34. HONĚK A., 1989: Overwintering and annual changes of abundance of *Coccinella septempunctata* in Czechoslovakia (Coleoptera, Coccinellidae). *Acta Entomol. Bohemoslov.* 86, 179-192.
35. HURKOVÁ A., 2020: Vliv teploty během přezimování na energetické zásoby hmyzu. Česká zemědělská univerzita. Fakulta životního prostředí, Praha. 45 pp. (bakalářská práce). „nepublikováno“ Dep. SIC ČZU v Praze.
36. HYRŠL P., 2018: Imunita hmyzu a dalších bezobratlých živočichů 1. *Živa* 1, 32–34.
37. IPCC, 2007: Climate change 2007: the physical science basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, New York, USA.

38. IRWIN J. T., LEE R. E., 2000: Mild winter temperatures reduce survival and potential fecundity of the goldenrod gall fly, *Eurosta solidaginis* (Diptera:Tephritidae). *Journal Insect Physiology* 46, 655–661.
39. IRWIN J. T., LEE R. E., 2003: Cold winter microenvironments conserve energy and improve overwintering survival and potential fecundity of the goldenrod gall fly, *Eurosta solidaginis*. *Oikos* 100 (1), 71–78.
40. JOHNSON C.G., 1969: *Migration and Dispersal of Insect by Flight*. Methuen, London, 763 pp.
41. KEARNEY, M., SHINE R., PORTER W.P., 2009: The potential for behavioral thermoregulation to buffer “cold-blooded” animals against climate warming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 3835-3840.
42. KLOCKMANN M., FISCHER K., 2019: Strong reduction in diapause survival under warm and humid overwintering conditions in a temperate-zone butterfly. *Population Ecology* 61 (2), 150-159.
43. KNAPP M., KNAPPOVA J., 2013: Measurement of body condition in a common carabid beetle, *Poecilus cupreus*: a comparison of fresh weight, dry weight, and fat content. *Journal of Insect Science* 13 (6).
44. KNAPP M., 2016: Relative importance of sex, pre-starvation body mass and structural body size in the determination of exceptional starvation resistance of *Anchomenus dorsalis* (Coleoptera: Carabidae). *PLoS ONE* 11, e151459.
45. KNAPP M., DOBEŠ P., ŘEŘICHA M., HYRŠL P., 2018: Puncture vs. reflex bleeding: Haemolymph composition reveals significant differences among ladybird species (Coleoptera: Coccinellidae), but not between sampling methods. *European Journal of Entomology* 115, 1-6.
46. KNAPP M., ŘEŘICHA M., 2020: Effects of the winter temperature regime on survival, body mass loss and post-winter starvation resistance in laboratory-reared and field-collected ladybirds. *Scientific Reports* 10, 4970.

47. KNAPP M., ŘEŘIČHA M., HAELEWATERS D., GONZÁLEZ E., 2022: Fungal ectoparasites increase winter mortality of ladybird hosts despite limited effects on their immune system. *Proceedings of the Royal Society B* 289: 20212538.
48. KOCH R. L., GALVAN T. L., 2008: Bad side of a good beetle: the North American experience with *Harmonia axyridis*. *Biocontrol* 53: 23-35.
49. KODRÍK D., 2004: Fyziologie hmyzu - učební texty, Entomologický ústav Akademie věd české republiky a Biologická fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. 220 pp.
50. KOŠTÁL V., 2006: Eco-physiological phases of insect diapause. *Journal of insect physiology* 52 (2), 113-127.
51. KOVACS, J. L., GOODISMAN, M. A. D., 2012: Effects of Size, Shape, Genotype, and Mating Status on Queen Overwintering Survival in the Social Wasp *Vespula maculifrons*. *Environmental Entomology* 41, 1612–1620.
52. KUBÁTOVÁ A., 2017: Entomopatogenní Houby – Nerovný Souboj. *Živa* 5, 250-254.
53. LABRIE G., CODERRE D., LUCAS É., 2008: Overwintering Strategy of Multicolored Asian Lady Beetle (Coleoptera: Coccinellidae): Cold-Free Space As a Factor of Invasive Success. *Annals of the Entomological Society of America* 101 (5): 860-866.
54. LEATHER S. R., WALTERS K. F. A., BALE J. S., 1993: *The Ecology of Insect Overwintering*. Cambridge University Press. 255 pp.
55. LOOPE K.J., RANKIN E.E.W., 2021: Viral load, not food availability or temperature, predicts colony longevity in an invasive eusocial wasp with plastic history. *Scientific Reports* 11, 10087.
56. McCABE L.M., ASLAN C.E., COBB N.S., 2021: Decreased bee emergence along an elevation gradient: Implications for climate change revealed by a transplant experiment. *Ecology* 103 (2), e03598.
57. MORRIS R.F., FULTON W.C., 1970: Models for the development and survival of *Hyphantria cunea* in relation to temperature and humidity: introduction. *Memoirs of the Entomological Society of Canada* 70, 1-60.

58. NEDVĚD O., 2014: Slunéčko východní (*Harmonia axyridis*) - pomocník v biologickém boji nebo ohrožení biodiverzity. Certifikovaná metodika pro praxi, Jihočeská univerzita, České Budějovice. 65 pp.
59. NEDVĚD O., 2015: Brouci čeledi slunéčkovití (Coccinellidae). *Academia* 1: 304 pp.
60. NOOTEN S.S., HUGHES L., 2017: The power of the transplant: direct assessment of climate change impacts. *Climatic Change* 144, 237-255.
61. PAPEŽ FRANTIŠEK., 2015: *Laudato si'* - encyklika o péči o společný domov. 159 pp. ISBN 978-80-7450-187-6.
62. PAULI J. N., ZUCKERBERG B., WHITEMAN J. P., PORTER W., 2013: The subnivium: a deteriorating seasonal refugium. *Front. Ecol. Environ.* 11 (5), 260-267.
63. PYŠEK P., RICHARDSON D.M., REJMÁNEK M., WEBSTER G.L., WILLIAMSON M., KIRSCHNER J., 2004: Alien plants in checklists and floras: Towards better communication between taxonomists and ecologists. *Taxon* 53, 131-143.
64. R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2022. R: A language and environment for statistical computing., R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.r-project.org/>
65. RAAK-VAN DEN BERG C. L., DE JONG P. W., HEMERIK L., VAN LENTEREN J. C., 2013: Diapause and post-diapause quiescence demonstrated in overwintering *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) in northwestern Europe. *European Journal of Entomology* 110 (4), 584-585.
66. RICHARDSON D.M., PYŠEK P., REJMÁNEK M., BARBOUR M.G., PANETTA F.D., WEST C.J., 2000: Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Diversity Distrib* 6, 93–107.
67. RULL J., LASA R., ALUJA M., 2019: The Effect of Seasonal Humidity on Survival and Duration of Dormancy on Diverging Mexican *Rhagoletis pomonella* (Diptera:Tephritidae) Populations Inhabiting Different Environments. *Environmental Entomology* 48 (5), 1121-1128.

68. SÁNCHEZ – BAYO F., WYCKHUYS K.A.G., 2019: Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. *Biological Conservation* 232, 8-27.
69. SCCANINI, D., VANISHVILI, L., TIRELLO, P., 2020: Lethal and sub-lethal effects of low-temperature exposures on *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) adults before and after overwintering. *Scientific Reports* 10, 15231.
70. SEO M.J., KIM G.H., YOUN Y.N., 2008: Differences in biological and behavioural characteristics of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) according to colour patterns of elytra. *Journal of Applied Entomology* 132 (3), 239-247.
71. SHAH, A. A., M. E. DILLON, S. HOTALING, AND H. A. WOODS., 2020: High elevation insect communities face shifting ecological and evolutionary landscapes. *Current Opinion in Insect Science* 41, 1-6.
72. SINCLAIR B. J., ADDO-BEDIAKO A., CHOWN S. L., 2003: Climatic variability and the evolution of insect freeze tolerance. *Biological Review* 78 (2), 181-195.
73. SINCLAIR B. J., KLOK C. J., CHOWN S. L., 2004: Metabolism of the sub-Antarctic caterpillar *Pringleophaga marioni* during cooling, freezing and thawing. *Journal of Experimental Biology* 207 (8), 1287-1294.
74. SINCLAIR B. J., 2015: Linking energetics and overwintering in temperate insects. *Journal of Thermal Biology* 54, 5-11.
75. SPACHT D.E., GANTZ J.D., DEVLIN J.J., MCCABE E.A., LEE JR. R.E., DENLINGER D.L., TEETS N.M., 2021: Fine-scale variation in microhabitat conditions influences physiology and metabolism in an Antarctic insect. *Oecologia* 197: 373-385.
76. STERN D.L., EMLEN D.J., 1999: The developmental basis for allometry in insects. *Development* 126, 1091–1101.
77. ŠÁLEK M., HARABIŠ F., 2015: *Obecná ekologie*. Česká zemědělská univerzita v Praze. 140 pp.



78. TANAKA K., TANAKA S., 1997: Winter Survival and Freeze Tolerance in a Northern Cockroach, *Periplaneta japonica* (Blattidae: Cicyoptera). *Zoological Science* 14 (5), 849-853.
79. TAUBER M. J., TAUBER C. A., MASAKI S., 1986: Seasonal adaptations of insects. Oxford University Press, New York. 416 pp.
80. VILA M., BASNOU C., PYŠEK P., JOSEFSSON M., GENOVESI P., GOLLASCH S., NENTWIG W., OLENIN S., ROQUES A., ROY D., HULME P.E., DAISIE., 2010: How well do we understand the impacts of alien species on ecosystem services? A pan-European, cross-taxa assessment. *Frontiers in Ecology and the Environment* 8, 135-144.
81. WHEELER CH.A., CARDÉ R.T., 2014: Following in Their Footprints: Cuticular Hydrocarbons as Overwintering Aggregation Site Markers in *Hippodamia convergens*. *Journal of Chemical Ecology* 40, 418-428.
82. WILLIAMS C. M., MARSHALL K. E., MACMILAN H. A., DZURISIN J. D. K., HELLMANN J. J., SINCLAIR B. J., 2012: Thermal Variability Increases the Impact of Autumnal Warming and Drives Metabolic Depression in an Overwintering Butterfly. *PLoS ONE* 7 (3), e34470.
83. WILLIAMS C. M., HENRY H. A. L., SINCLAIR B. J., 2015: Cold truths: how winter drives responses of terrestrial organisms to climate change. *Biological reviews* 90, 214-235.
84. YANG Y, HALBRITTER A.H., KLANDERUD K., TELFORD R.J., WANG G., VANDVIK V., 2018: Transplants, open top chambers (OTCs) and gradient studies ask different questions in climate change effects studies. *Frontiers in Plant Science* 9, 1574.

## 9 Přílohy

### Seznam příloh:

**Příloha 1:** Seznam přezimovacích lokalit pro fyziologické analýzy s naměřenými teplotami (písmeno B v ID lokality znázorňuje velký box s vodou pro pilotní experiment zkoumající vliv vlhkosti).

**Příloha 2:** Seznam přezimovacích lokalit pro fyziologické analýzy s naměřenými hodnotami vlhkosti ve velkých boxech s vodou.

**Příloha 3:** Sušení slunéček v sušičce v laboratoři Z019 – MCEV I (ČZU FŽP v Praze).

**Příloha 4:** Louhování slunéček v roztoku diethyletheru s chloroformem (odstranění tuku z těl brouků).

**Příloha 5:** Vážení slunéček v laboratoři D414 – MCEV II (ČZU FŽP v Praze) – získání suché a suché libové hmotnosti brouků.

**Příloha 6:** Determinace pohlaví slunéček a dále rozdělení brouků na infikované/neinfikované parazitickou houbou *Hesperomyces virescens* a dále dle zbarvení na světlou formu *Succinea* a tmavě zbarvenou (melanickou) formu.

| Rok     | ID   | Lokalita   | GPS                      | Tmean (°C) | Tmin (°C) | TSD (°C) |
|---------|------|--|--------------------------|------------|-----------|----------|
| 2018/19 | S1   | Stožecké sedlo                                       | 50.8395992N, 14.5957844E | 0,897      | -3,986    | 2,522    |
| 2018/19 | S3   | Farkáň - zahrada u domu                              | 50.0605658N, 14.3809919E | 2,237      | -8,331    | 3,309    |
| 2018/19 | S5   | Střecha MCEV II                                      | 50.1300303N, 14.3738181E | 2,286      | -9,202    | 3,975    |
| 2018/19 | S7   | Experimentální nádrže FŽP: venku                     | 50.1300303N, 14.3738181E | 2,230      | -8,264    | 3,554    |
| 2018/19 | S8   | Experimentální nádrže FŽP: uvnitř přístřešku         | 50.1300303N, 14.3738181E | 3,743      | -5,698    | 3,837    |
| 2018/19 | S11  | Mořina- zahrada u rodinného domku                    | 49.9548464N, 14.2056775E | 1,983      | -8,231    | 3,642    |
| 2018/19 | S12  | Počítačem řízený klimabox                            | 50.1300303N, 14.3738181E | 2,029      | -7,738    | 4,871    |
| 2018/19 | S13  | Štoly Amerika - větrané místo                        | 49.9535522N, 14.1882533E | 5,217      | 1,425     | 2,172    |
| 2018/19 | S14  | Štoly Amerika - cca 100 m od větraného místa         | 49.9535522N, 14.1882533E | 5,577      | 1,099     | 1,763    |
| 2018/19 | S20  | Konětopy - zahrada u domu                            | 50.2764039N, 14.6538239E | 2,254      | -6,802    | 3,505    |
| 2019/20 | S3B  | Farkáň - nezaizolovaná profukující půda              | 50.0604028N, 14.3823439E | 5,649      | -2,771    | 2,828    |
| 2019/20 | S4B  | Farkáň - dřevěný uzavřený balkon                     | 50.0604028N, 14.3823439E | 9,406      | 4,558     | 1,749    |
| 2019/20 | S5   | Jarov (Dolní Břežany) - nevytápěná půda na chatě     | 49.9528414N, 14.3952978E | 5,241      | -1,814    | 4,215    |
| 2019/20 | S5B  | Jarov (Dolní Břežany) - nevytápěná půda na chatě     | 49.9528414N, 14.3952978E | 4,706      | -1,613    | 2,383    |
| 2019/20 | S8B  | Benešov - nezateplená půda                           | 49.7816667N, 14.6873611E | 5,490      | -2,073    | 3,142    |
| 2020/21 | S1   | Chlum - nevytápěná půda                              | 50.5807306N, 14.5637931E | 2,459      | -10,757   | 3,931    |
| 2020/21 | S1B  | Chlum - nevytápěná půda                              | 50.5807306N, 14.5637931E | 2,768      | -10,581   | 3,928    |
| 2020/21 | S2   | Chlum - pokoj v nevytápěné půdě                      | 50.5807306N, 14.5637931E | 5,130      | -5,636    | 4,056    |
| 2020/21 | S2B  | Chlum - pokoj v nevytápěné půdě                      | 50.5807306N, 14.5637931E | 4,811      | -5,388    | 3,961    |
| 2020/21 | S4   | Farkáň - zahrada                                     | 50.0604028N, 14.3823439E | 2,886      | -3,271    | 3,158    |
| 2020/21 | S4B  | Farkáň - zahrada                                     | 50.0604028N, 14.3823439E | 1,993      | -10,934   | 4,140    |
| 2020/21 | S6   | Rumburk - nevytápěná kůlna                           | 50.9504417N, 14.4961697E | 1,878      | -11,940   | 4,330    |
| 2020/21 | S6B  | Rumburk - nevytápěná kůlna                           | 50.9504417N, 14.4961697E | 1,766      | -11,903   | 4,292    |
| 2020/21 | S7   | Jarov (Dolní Břežany) - nevytápěná kůlna na chatě    | 49.9528414N, 14.3952978E | 3,566      | -7,771    | 3,586    |
| 2020/21 | S7B  | Jarov (Dolní Břežany) - nevytápěná kůlna na chatě    | 49.9528414N, 14.3952978E | 3,635      | -7,543    | 3,571    |
| 2020/21 | S8B  | Mořina - nevytápěná půda v rodinném domě             | 49.9548464N, 14.2056775E | 6,854      | -4,287    | 3,229    |
| 2020/21 | S9B  | Mořina - nevytápěná půda v bytovce                   | 49.9558217N, 14.2070078E | 7,078      | -0,958    | 2,855    |
| 2020/21 | S10B | Kostelec nad Vltavou - nevytápěná podkrovní místnost | 49.4725303N, 14.2393447E | 8,979      | -1,299    | 2,472    |
| 2020/21 | S11B | Farkáň - dřevěný uzavřený balkon                     | 50.0604028N, 14.3823439E | 10,493     | 4,194     | 2,196    |
| 2020/21 | S12B | Mořina - nevytápěná garáž                            | 49.9558217N, 14.2070078E | 9,554      | 1,778     | 2,137    |
| 2020/21 | S13  | Chlum - nízký trávník vedle dřevníku                 | 50.5807850N, 14.5633406E | 1,980      | -8,730    | 3,929    |
| 2020/21 | S15  | Kozojedy - zděný chlívěk na dvorku                   | 49.9048944N, 13.5171514E | 2,127      | -11,147   | 3,606    |
| 2020/21 | S15B | Kozojedy - zděný chlívěk na dvorku                   | 49.9048944N, 13.5171514E | 2,024      | -10,581   | 3,679    |
| 2020/21 | S17B | Farkáň - nezaizolovaná profukující půda              | 50.0604253N, 14.3821931E | 4,184      | -5,948    | 3,810    |
| 2020/21 | S18  | Únětice - zahradní domek                             | 50.1518875N, 14.3576528E | 3,038      | -14,471   | 4,926    |
| 2020/21 | S18B | Únětice - zahradní domek                             | 50.1518875N, 14.3576528E | 2,799      | -15,791   | 4,778    |

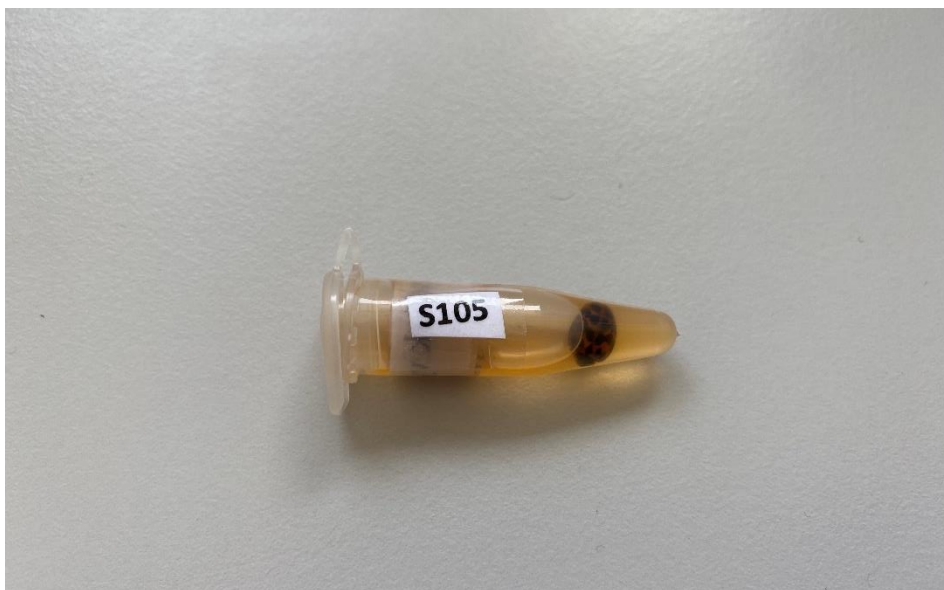
Příloha 1: Seznam přezimovacích lokalit pro fyziologické analýzy s naměřenými teplotami (písmeno B v ID lokality znázorňuje velký box s vodou pro pilotní experiment zkoumající vliv vlhkosti).

| Rok     | ID   | Lokalita   | GPS                      | Hmean (%) | HSD (%) |
|---------|------|--|--------------------------|-----------|---------|
| 2019/20 | S4B  | Farkář - dřevěný uzavřený balkon                     | 50.0604028N, 14.3823439E | 96,748    | 1,917   |
| 2019/20 | S5B  | Jarov (Dolní Břežany) - nevytápěná půda na chatě     | 49.9528414N, 14.3952978E | 97,306    | 10,775  |
| 2019/20 | S8B  | Benešov - nezateplená půda                           | 49.7816667N, 14.6873611E | 94,493    | 6,194   |
| 2020/21 | S1B  | Chlum - nevytápěná půda                              | 50.5807306N, 14.5637931E | 97,196    | 5,898   |
| 2020/21 | S2B  | Chlum - pokoj v nevytápěné půdě                      | 50.5807306N, 14.5637931E | 99,453    | 3,759   |
| 2020/21 | S4B  | Farkář - zahrada                                     | 50.0604028N, 14.3823439E | 98,619    | 4,473   |
| 2020/21 | S6B  | Rumburk - nevytápěná kůlna                           | 50.9504417N, 14.4961697E | 98,948    | 2,308   |
| 2020/21 | S7B  | Jarov (Dolní Břežany) - nevytápěná kůlna na chatě    | 49.9528414N, 14.3952978E | 97,742    | 7,055   |
| 2020/21 | S8B  | Mořina - nevytápěná půda v rodinném domě             | 49.9548464N, 14.2056775E | 91,597    | 10,126  |
| 2020/21 | S9B  | Mořina - nevytápěná půda v bytovce                   | 49.9558217N, 14.2070078E | 98,13     | 3,827   |
| 2020/21 | S10B | Kostelec nad Vltavou - nevytápěná podkrovní místnost | 49.4725303N, 14.2393447E | 85,482    | 4,677   |
| 2020/21 | S11B | Farkář - dřevěný uzavřený balkon                     | 50.0604028N, 14.3823439E | 95,122    | 3,623   |
| 2020/21 | S12B | Mořina - nevytápěná garáž                            | 49.9558217N, 14.2070078E | 89,075    | 4,44    |
| 2020/21 | S15B | Kozojedy - zděný chlívěk na dvorku                   | 49.9048944N, 13.5171514E | 98,927    | 4,346   |
| 2020/21 | S17B | Farkář - nezaizolovaná profukující půda              | 50.0604253N, 14.3821931E | 93,992    | 4,595   |
| 2020/21 | S18B | Únětice - zahradní domek                             | 50.1518875N, 14.3576528E | 95,342    | 6,454   |

Příloha 2: Seznam prezimovacích lokalit pro fyziologické analýzy s naměřenými hodnotami vlhkosti ve velkých boxech s sodou.



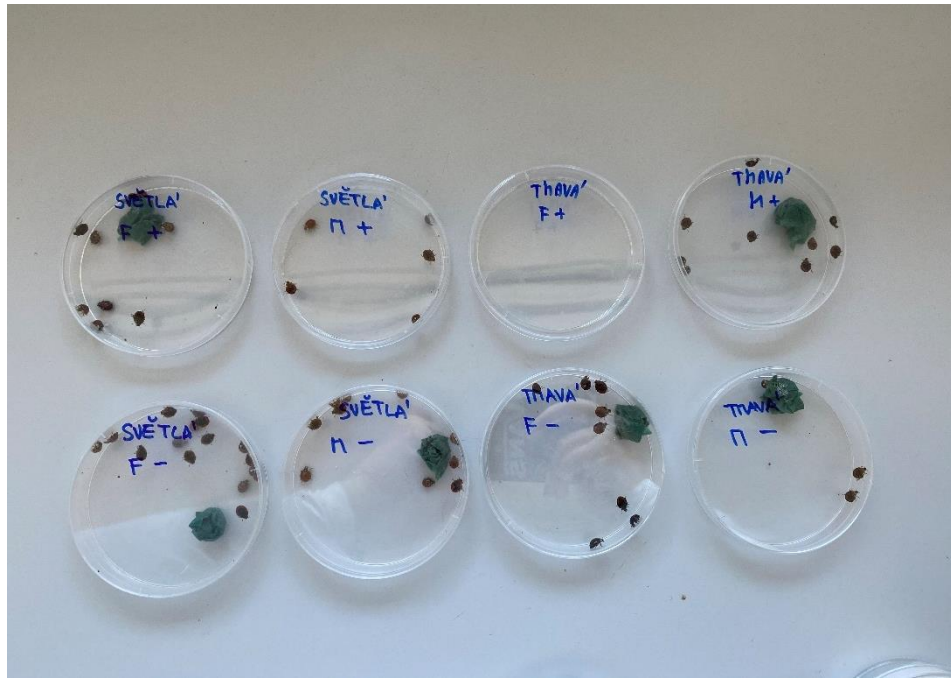
Příloha 3: Sušení sluněček v sušičce v laboratoři Z019 – MCEV I (ČZU FŽP v Praze)



Příloha 4: Louhování slunéček v roztoku diethyletheru s chloroformem (odstranění tuku z těl brouků)



Příloha 5: Vážení slunéček v laboratoři D414 – MCEV II (ČZU FŽP v Praze) – získání suché a suché libové hmotnosti brouků.



Příloha 6: Determinace pohlaví slunéček a dále rozdělení brouků na infikované/neinfikované parazitickou houbou *Hesperomyces virescens* a dále dle zbarvení na světlou formu *Succinea* a tmavě zbarvenou (melanickou) formu.