

Číslo a název oboru SOČ: 04 Biologie

**Probouzení potemníka moučného (*Tenebrio molitor*)
z chill coma v závislosti
na expoziční teplotě a době expozice**

Tereza Nedvěďová

Septima, Gymnázium Jírovцова 8, České Budějovice 37161, Jihočeský kraj

Práce byla vyhotovena v Entomologickém ústavu Akademie věd ČR (ENTÚ AV ČR),
Branišovská 31, České Budějovice, 370 05

Autor práce: Tereza Nedvěďová, Gymnázium, Jírovцова 8, adresa: Dlouhá 18, České
Budějovice, 37005, email: tereza.nedvedova@seznam.cz, tel: 724329188

Vedoucí práce: doc. RNDr. Oldřich Nedvěď, CSc., ENTÚ AVČR, email: nedved@prf.jcu.cz,
tel: 389 022 253

PODĚKOVÁNÍ

Za všestranné seznámení s problematikou, poskytnutí zázemí, pokusného materiálu i prostředků k uskutečnění experimentů, cennou pomoc po praktické i teoretické stránce, utlumování mé lenosti ve všech směrech, důkladné a názorné poučení, že vědecká práce se nezakládá na poetickém zamoření papíru mnoha nevýznamnými slovy a za mnoho dalších nezanedbatelných věcí děkuji doc. RNDr. Oldřichu Nedvěďovi CSc.

Zejména za všestranně projevovanou psychickou pomoc, která pro mě byla nesmírně důležitá i za pomoc s formálními záležitostmi děkuji Mgr. Jarmile Ichové i Ing. Mgr. Janě Kalové. Chtěla bych též vyslovit dík učitelům, kteří tolerovali mou zaneprázdněnost a neměli ke mně v souvislosti s ní žádné negativní projevy.

OBSAH

Úvod.....	4 - 8
Cíl práce.....	9
Metodika.....	10 - 11
Výsledky.....	12 - 16
Diskuze.....	17 - 21
Závěr.....	22
Literatura.....	23 - 25
Grafy a obrázky.....	26 -

ÚVOD

Živočichové se z pohledu reakcí na změny teploty dělí na dvě výrazně odlišné skupiny. První, jsou homoiotermní živočichové (se stálou teplotou těla), kteří jsou většinou zároveň endotermní (teplo produkují, udržují teplotu těla vnitřně na úkor energetických zdrojů) – jsme to například my, tedy savci, a ptáci. Druhou kontrastní skupinou živočichů je většina obojživelníků, plazů a především hmyz, kteří se nazývají poikilotermní (studenokrevní) a vyznačují se zároveň svojí závislostí na vnějších zdrojích tepla – tedy ektotermií.

Protože tyto živočichové nemohou vyrovnávat svoji teplotu, musí na vnější nepříznivé vlivy reagovat jinak, aby dokázali přežít. Ve velmi nízkých teplotách jim hrozí zmrznutí hemolymfy, což samo o sobě není ten největší problém. Avšak vytvoření ostrých krystalků může potřhat membrány v buňkách a živočicha tak zabít. Druhá negativní stránka věci je, že při mrznutí dochází k odčerpávání většiny čisté vody do krystalů, rozpuštěné látky pak zůstávají v malém množství nezamrzlé vody ve velmi vysokých, pro organismus toxických koncentracích (Falteisek a kol., 2006).

Obecně jsou dvě strategie, jak se především hmyz vypořádává s rizikem zmrznutí. Některé druhy zmrznutí tolerují a poškození tkání zabraňují tak, že mají v hemolymfě dostatečný počet částic fungující jako krystalizační centra, která zajistí vznik drobných neostrých krystalků (ve velkém množství), což znamená, že mechanicky nepoškodí tkáň. Jiné organismy se zmrznutí chtějí striktně vyhnout, s čímž jim velmi pomáhají kryoprotektanty přítomné v hemolymfě, které výrazně snižují teplotu jejího mrznutí (př. glycerol). Pomocným faktorem je také mechanismus inaktivace krystalizačních jadérek, který způsobí, že tělesné tekutiny jsou schopny zůstat v kapalném stavu až přibližně do $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, kdy se krystaly začnou tvořit samy spontánně. Ke chladové odolnosti může přispět také podíl nasycených a nenasycených lipidů v buněčných membránách. V chladu tyto lipidy tuhnou, proto je výhodnější mít vyšší podíl nenasycených kyselin, které jsou tekutější (Lee, 1991).

Mohlo by se tedy zdát, že studenokrevné organismy jsou ohroženy až teplotou, při které přímo hrozí zmrznutí hemolymfy, avšak i poněkud vyšší teploty výrazně ovlivňují jejich životní funkce. Chlazení pod $5\text{--}10\text{ }^{\circ}\text{C}$ snižuje jejich pohybovou aktivitu, až se dostanou do stavu zvaného chill coma. To je způsobené zastavením činnosti enzymů, tedy i iontových

pump, které transportují Na^+ , K^+ a Ca^{2+} , a tím vytvářejí membránový potenciál potřebný k přenosu nervového vzruchu a práci svalů. To se v důsledku projeví blokací svalů, jedinec se tudíž nemůže hýbat. Tento stav ale není nevratný, po exponování jedinců zpět do pokojové teploty se po určitém čase funkce pump obnoví a nervy a svaly začnou zvolna plnit svou funkci (Košťál a kol., 2004). Po dostatečném obnovení pohyblivosti například brouci začnou projevovat snahu obrátit se do přirozené pozice na břicho.

Schopnost udržovat Na^+ v hemolymfě (a tudíž jeho malou koncentraci v buňkách) byla nejvyšší u ruměnic (*Pyrrhocoris apterus*) aklimovaných v chladu, nižší u diapauzujících ploštic v laboratorní teplotě a nejnižší u reprodukčně aktivních ploštic (Košťál a kol., 2004).

Při měření doby probouzení z nízkých teplot se samozřejmě musí počítat také se schopností zvířat aklimovat se. To znamená, že pokud se před působením nízkých teplot zapříčiňujících ztuhlost organismu aklimují v teplotách o něco vyšších, mechanismy zajišťující svalový stah se mírně přizpůsobí a snadněji pak odolávají nízkým teplotám, což znamená, že doba probouzení (recovery time) se tímto zkracuje. S tím úzce souvisí další faktor, který může zotavování mechanismů ovlivnit. Různé populace v geograficky odlišném prostředí mohou vykazovat jiné hodnoty délky probouzení.

Oblíbeným modelovým druhem pro výzkum chladové odolnosti se spolu s octomilkou (*Drosophila melanogaster*) stali potěmníci mouční (*Tenebrio molitor*). Zejména často se u nich zkoumala přítomnost a funkce protimrazových proteinů. Protimrazový protein přítomný u potěmníka je molekula s malou molární hmotností a vysokým obsahem cysteinu a threoninu. Zvýšený obsah těchto proteinů za normální teploty v těle má poslední larvální instar, což způsobuje, že teplota tání se snižuje více než o 3 °C. Pokud jsou jakékoli larvální instary vystaveny teplotám nízkým, pozorujeme u nich vysoký nárůst koncentrace i aktivity protimrazových proteinů. U kukel a dospělých jedinců se tato aktivita trvale snižuje (Graham a kol., 2000).

Ukázalo se, že stres způsobený ionty kovů snižuje chladovou odolnost u bezobratlých. Pedersen a kol. (2006) zjistili, že kadmium, zinek a měď snižují u larev potěmníků produkci protimrazových proteinů, avšak pouze v letních podmínkách; v zimním období neměly kovy na produkci proteinů vliv.

Suspenze bakterií *Pseudomonas syringae* snižuje chladovou toleranci hmyzu škodícího na uskladněném zrní o 5–12 °C (Lee a kol., 1992).

Narozdíl od dospělců nejsou larvy a kukly potěmnicka moučného zatíženy chladovým stresem, při kterém vznikají peroxidy lipidů, jsou tedy výrazně chladově odolnější (Gulevsky a kol., 2006).

Chladová odolnost se může vnitrodruhově lišit podle místa, odkud daná populace živočicha pochází. U slávky (*Mytilus* sp.) bylo jasně zjištěno, že kritická teplota aerobního metabolismu klesá se zvyšující se zeměpisnou šířkou; populace na jih od Lamanšského průlivu upadaly do chill comatu při vyšších teplotách než populace ze severu (Jansen a kol., 2007). Populace stínky (*Porcelio laevis*) z různých zeměpisných šířek v Chile vykazovaly rozdílnost v čase probouzení z chill coma, která se zároveň lišila v závislosti na použité nízké teplotě. Rozdílné hmotnosti těla neměly vliv na chladovou odolnost (Castaneda a kol., 2005).

U octomilek (*Drosophila melanogaster*) z Austrálie byla pozorována vyšší chladová odolnost u populací z vysoké zeměpisné šířky, avšak u rezistence k vysoké teplotě byl tento gradient opačný a nepřilíš výrazný (Hoffmann a kol., 2005). Dvě subtropické populace *Drosophila subobscura* měly delší dobu probouzení oproti temperátním (David a kol., 2003). U 26 druhů octomilek z mírného pásu bylo probouzení z chill coma navozené 0 °C v rozsahu 0,15-4,9 min, zatímco u 48 tropických druhů se tato doba pohybovala od 24 do 120 minut. U několika kosmopolitních druhů měly populace z mírného pásu kratší dobu probouzení než populace téhož druhu z tropického pásu (Gibert a kol., 2001).

V laboratorních podmínkách bylo mnohokrát dokázáno, že chladovou odolnost hmyzu, konkrétně octomilky (*Drosophila melanogaster*), pozitivně ovlivňuje aklimace v teplotách okolo 10°C. Stejnou schopnost získávají octomilky ve svém přirozeném prostředí v nižších teplotách během noci (Kelty, 2007). Tato rychlá aklimace trvající několik hodin zlepšuje schopnost přežívání velmi nízkých teplot, avšak nezkracuje dobu probouzení z chill coma; pokud se doba aklimace prodloužila na dobu 2 dnů, má pozitivní vliv i na dobu probouzení (Rako a kol., 2006). Samičky, které byly aklimovány v mírných teplotách, měly vyšší procento líhivosti vajíček (Rako a Hoffmann, 2006). Bylo zjištěno, že jednotlivá měřítka chladové odolnosti na sobě nezávisí a jejich mechanismy nejsou totožné (Sinclair a Roberts, 2005).

Tato rychlá aklimace může být zrušena působením oxidu uhličitého nebo anoxií, které se často používají v laboratořích na anestezii zkoumaných jedinců. Oxid uhličitý prodlužuje čas probouzení z chill comatu (Nilson a kol., 2006), této anestezie by se tedy nemělo při zkoumání chladové odolnosti užívat. David a kol. (1998) zjistili, že chill coma má na nervovou soustavu podobný účinek jako anestezie.

Kromě aklimace má na různé parametry chladové odolnosti včetně doby probouzení vliv teplota, ve které organismy trvale žijí. Například octomilky vychované v 25 °C se z chill coma probouzely déle než ty, které byly chovány v 19 °C (Rako a kol., 2006). To samé bylo prokázáno u okáče (*Bicyclus anynana*) chovaného buď ve 20 °C nebo 27 °C (Geister a Fisher, 2007). U ohniváčka (*Lycaena tityrus*) vychovávaného ve stejných dvou teplotách byl přesně změřen rozdíl v čase probouzení a činil 28% (Zeilstra a Fischer, 2005).

David a kol. (1998) zjistili, že čas probouzení u octomilky (*D. melanogaster*) závisí mimo jiné na teplotě, ve které byly octomilky exponované po dobu probouzení.

Linie octomilky (*D. melanogaster*) byly selektovány po 30 generací na krátkou dobu probouzení z chill coma (v 0 °C). Získaná odolnost pak fungovala ve větším rozsahu nízkých teplot, než kde byly octomilky selektovány. Selektované linie si zachovaly schopnost aklimace v mírných teplotách (okolo 10 °C) a jejich chladová odolnost se tím ještě zlepšila (Anderson a kol. 2005). U octomilek z Austrálie bylo pozorováno, že vliv aklimace k zimním oproti letním podmínkám byl 1,5x větší než dědičné dispozice (Hoffmann a kol., 2005).

Testování octomilek z celého světa ukázalo rozdíly v době probouzení z chill coma jak mezi populacemi z tropů a temperátu, tak i mezi skupinami vychovanými v různých teplotách. Při porovnání těchto vlivů připadal na aklimaci podíl více než 80%, zatímco dědičné dispozice vysvětlovaly jen 4% (Ayrinhac a kol., 2004).

Bylo prokázáno, že chladová odolnost octomilek měřená jako doba probouzení z chill coma se s věkem zhoršovala (Burger a Promislow, 2006; David a kol., 1998). Doba probouzení byla průměrně delší u samců octomilek než u samic. Tato veličina vykazovala vysokou vnitroskupinovou variabilitu – koeficient variance byl často vyšší než 25% (David a kol., 1998).

Zlepšení chladové odolnosti nemělo vliv na odolnost ve vysokých teplotách ani na žádné morfologické a anatomické změny. Doba dožití se však touto adaptací zmenšovala (Anderson a kol. 2005).

Několik studií ukazuje, že chladová odolnost a odolnost proti vysychání spolu souvisejí. Sinclair a kol. (2007) selektovali populace octomilek po 50 generací na odolnost vůči vysychání. Zjistili, že schopnost aklimace v mírných teplotách nebyla ovlivněna, zatímco probouzení z chill coma se mírně zkrátila. U octomilek z Austrálie aklimace v zimních podmínkách zkracovala probouzení z chill coma, ale zároveň snižovala odolnost vůči vysokým teplotám (Hoffmann a kol., 2005).

Macdonald a kol. (2004) zkoumali dobu probouzení z chill coma v kombinaci více teplot a více dob expozice a zjistili přítomnost bifázické závislosti. To znamená, že se snižující se teplotou doba probouzení nejdříve rostla, až dosáhla určité hodnoty. Potom znovu prudce rostla v teplotách přibližujících se teplotě letální. Se zvýšeným časem chladové expozice se také zvyšoval čas probouzení. U octomilky (*D. subobscura*) čas probouzení stoupal se snižujícími se teplotami; mezi -4 a -6 °C se nárůst zastavil a opět pokračoval při nižších teplotách. Dvoufázovost závislosti doby probouzení na teplotě naznačuje existenci dvou nezávislých fyziologických mechanismů (David a kol., 2003).

U ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus*) rostl čas probouzení z chill coma z -5 °C (při této teplotě nedocházelo k mrznutí hemolymfy) lineárně s rostoucím časem expozice (Košťál a kol., 2004). Lineární závislost byla změřena též u octomilek (*D. melanogaster*) (David a kol., 1998).

CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo zjistit podrobně průběh závislosti doby probouzení z chill coma na teplotě expozice a na času v ní strávené. Doba probouzení je čas, který uplyne od okamžiku vyjmutí jedinců z chladu a vystavení pokojové teplotě do doby, kdy se každý jedinec obrátí (postaví na nohy, viz pokus s *Drosophila subobscura* – David a kol., 2003). Účelem bylo najít nejvhodnější funkci popisující závislost uvedených veličin. Co nejpřesnějšího aproximujícího průběhu funkce jsem dosáhla aplikací metody nejmenších malých mocnin odchylek (analogie obecně užívané metody nejmenších čtverců) na naměřená data jednotlivých teplot (pro každou teplotu jeden graf). Chtěla jsem zjistit, jestli doba probouzení s dobou expozice a exponovanou teplotou roste lineárně, jednoduše nelineárně, anebo bifázicky (ve smyslu Macdonald a kol., 2004).

METODIKA

K pokusu byli použiti dospělí jedinci potměníka moučného (*Tenebrio molitor*; obrázek 1). Je to druh brouka aktivní hlavně v noci, obvykle dává přednost suchým, teplým stanovištím, přičemž mnoho druhů se dokonale přizpůsobilo k životu v bezvodých pouštích. Živí se hlavně rozkládajícím se dřevem, suchými organickými odpadky, ale našel příznivé podmínky i ve skladech potravin, kde často působí značné škody na mouce a obilí. Larvy tohoto brouka – mouční červi (obrázek 2) – se používají jako krmení pro nejrůznější domácí mazlíčky i exotické živočichy. Jejich růst a vývoj je rychlý, takže je lze chovat nepřetržitě. Jejich chovy se nacházejí i na katedře zoologie na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Potměníci zde žijí v krmné směsi z pšeničného šrotu při teplotě asi 20–25 °C v desetilitrových plastových, popřípadě skleněných nádobách (obrázek 3).

Z těchto chovů jsem vždy vybrala skupinu kukel či dospělců a aklimovala je nejméně 2 týdny při konstantní teplotě 25–27°C. Před pokusem jsem entomologickou pinzetou vybrala potřebné dospělé jedince (10 až 30 na jeden pokus – záleželo na účelu daného pokusu, viz dále) a uložila je jednotlivě do aluminiových mističek od čajových svíček (obrázek 4). Tyto nádoby jsou pro tento účel ideální, protože dobře vodí teplo. Vlastní chlazení brouků probíhalo v chladících boxech firmy SANYO MIR153 s regulovatelnou teplotou (obrázek 5, 6). Vždy několik hodin před započítáním pokusu bylo nutno nastavit v boxu příslušnou teplotu, aby se stačila zkorigovat a doba pobytu potměníků v dané teplotě byla objektivní. Vystavovala jsem je teplotám

- +5 °C,
- +2,5 °C,
- 0 °C,
- –2,5 °C,
- –5 °C.

Stabilita teploty byla ± 1 °C s kolísáním s periodou desítek minut, přesnost průměrné teploty $\pm 0,2$ °C.

Časy pobytu v chladu se pohybovaly od do v závislosti na reakcích potměníků (když v určité teplotě za určitou dobu všichni uhynuli, nemělo cenu měřit ještě delší časy, což však nemuselo platit pro teplotu vyšší).

Teplotě +5 °C byli potemníci vystaveni na doby 3,75; 22; 46; 70; 96; 192 hodin. V + 2,5°C na 15,5; 22; 46; 72; 96; 184; 192 hodin. V 0°C na 4; 8; 15,5; 22; 46; 70 hodin. V -2,5 °C 2; 3; 3,75; 4; 6,5; 8; 16,33; 24 hodin. V -5 °C na 1; 2; 4; 8; 16; 22 hodin.

Po této určité předem stanovené době jsem tedy zkřehlé potemníky (ve stavu chladového komatu = nepohyblivé) z chladicího boxu vyjmula do pokojové teploty (23 °C) a v tom okamžiku spustila stopky na měření času probuzení (obrázek 7). Následně jsem položila nehybné potemníky z aluminiových mističek na smirkový papír (zrnitost 80; obrázek 8). Toto opatření bylo prováděno proto, že mističky byly hladké a poskytovaly minimální opěru pro šátrající potemničí nožičky i u jedinců zcela probuzených (viz dále). Na smirkovém papíře byli rozmístěni rovnoměrně, aby se nezachytávali o sebe a nepomáhali si tak. Jedince, kteří se neprobudili i ty, kteří se nedokázali obrátit na nohy do dvou hodin od vyjmutí z chladu, jsem považovala za uhynulé.

V závislosti na teplotě a času v ní stráveném se začali dříve či později pozvolna probouzet ze strnulosti (chill coma), kdy leží na zádech s nožičkami vytrčenými nahoru. Stěžejní pro můj výzkum nebyl okamžik, kdy se začali hýbat a nemotorně se snažit dostávat do své obvyklé polohy (obrázek 9), ale moment, kdy se opravdu otočili – to jsem považovala za opravdové probuzení (recovery time), jehož čas jsem zapisovala s ním nadále pracovala.

V kombinaci teploty -2,5 °C a doby expozice 4 hodiny jsem na větším počtu jedinců (30) pozorovala vliv pohlaví a stáří dospělých potemníků na dobu probouzení. Dospělé jedince jsem vybírala ze základního chovu tak, aby jedna polovina byla stará 2-7 a druhá 8-11 dní.

Pohlaví bylo určováno až po provedení měření a probuzení potemníků z chill coma, protože pro bezpečné určení pohlaví musí být potemník zmáčknut, aby se ukázaly pohlavní orgány, což by mohlo vést k poškození brouka a mělo by to tedy záporný vliv na jeho dobu probouzení.

Na skupině 28 jedinců přibližně stejného stáří a obou pohlaví jsem zkoumala také vliv hmotnosti na dobu probouzení z chill coma po 4 hodinách v -5 °C. Použila jsem analytické váhy značky KERN s přesností na 0,01 mg.

VÝSLEDKY

Matematické modelování naměřených dat

Pozorování probouzení potměnků z chill coma trvalo nejvýše dvě hodiny. Pokud se do této lhůty nějací jedinci neprobudili, považovala jsem je za mrtvé a nezahrnula je do zpracovávaných dat. Aby výsledky nebyly touto eliminací zkresleny, znamenalo to, že jsem musela vyřadit i stejný počet jedinců s nejkratšími dobami probouzení v dané kombinaci času expozice a teploty. Jako alternativu tohoto řešení jsem pro zhodnocení dat použila mediány každé kombinace času expozice a teploty.

Naměřená surová data jsem potřebovala zpracovat do dvojrozměrného grafu jako závislost doby probouzení (recovery time) ze strnulosti (chill coma) na době expozice potměnků v nízkých teplotách. Křivka závislosti při krátkých časech expozice stoupala prudce, ve vyšších časech nebyl její nárůst už tak markantní. Závislost připomínala odmocninnou funkci (mocninná funkce, kde exponent x je menší než jedna). Stanovili jsme tedy rovnici závislosti $y=a \cdot x^b$, kde y je doba probouzení, x je doba expozice a b je menší než 1.

Obvykle se k odhadu parametrů funkce používá metoda nejmenších čtverců (least squares) – pro všechny případy, kdy z hodnot měřené závislosti dvou fyzikálních veličin zatížených chybami určujeme její nejpravděpodobnější průběh. Tato metoda umožňuje nalézt vhodnou aproximující funkci pro dané hodnoty; vypočítá parametry předem známé funkce a hledá takové řešení, aby součet druhých mocnin chyb nalezeného řešení byl minimální. Čtverce odchylek se používají místo neumocněných odchylek proto, že za předpokladu, že použijeme absolutní hodnoty vzdáleností bodů od aproximující funkce, může nastat případ, že nemůžeme rozhodnout mezi nekonečně mnoha stejně dobrými řešeními.

Vyšší mocniny (absolutních hodnot) odchylek (krychle, hyperkrychle atd.) se nepoužívají z toho důvodu, že přeceňují důležitost mezních hodnot (outliers) a funkci tímto způsobem deformují. Druhá mocnina (čtverec odchylek) tyto mezní hodnoty také mírně nadhodnocuje, avšak je nejfrekventovaněji používána proto, že je to nejmenší možná celá mocnina, a necelé mocniny dříve nešlo počítat bez speciálních pomůcek (logaritmické tabulky, pravítka...).

Abychom se při výpočtu závislostí naměřených veličin vyhnuli přílišnému ovlivňování křivky funkce mezními hodnotami, mohli bychom použít necelou mocninu o málo větší než jedna. Vybrala jsem tedy hodnotu mocniny 1,1. Na grafu 1 a 2 je porovnání odmocninných křivek prokládajících data naměřená v +5 °C. Průběh křivek se odlišuje pouze mírně. Křivka vypočítaná na základě metody nejmenších čtverců skutečně leží blíže extrémně vysokým hodnotám doby probouzení při nejdelší době expozice. Pro metodu nejmenších čtverců je rovnice stanovena na $y=107 \cdot x^{0,456}$, pro naši metodu nejmenších malých mocnin na $y=167 \cdot x^{0,336}$.

Specifika průběhů hodnot doby probouzení v různých teplotách

V každé použité teplotě doba probouzení stoupala s dobou expozice. Nárůst byl jednoduše nelineární, zhruba kopíroval odmocninnou křivku. Doba probouzení při delších dobách expozice dosáhla jisté maximální hodnoty specifické pro každou teplotu, za kterou již docházelo k hnutí potěmníků. V nižších teplotách (-5 °C, -2,5 °C, 0 °C) doby probouzení stoupaly nejen rychleji, ale i do vyšších hodnot, kterých nebylo u vyšších teplot dosaženo ani v nejdelším časovém intervalu (graf 8).

Průměrná doba probouzení byla u nejvyšší teploty +5 °C nejkratší ($y=167 \cdot x^{0,336}$) a to pro jakoukoli dobu expozice (graf 2,3,4,5,6). Funkce aproximující data naměřená pro +2,5 °C leží v celém svém průběhu ($y=97 \cdot x^{0,609}$) nad křivkou pro +5 °C. Odmocninné funkce doby probouzení pro tři nižší teploty mají vyšší hodnoty než funkce teplot +5 °C a +2,5 °C, avšak jejich pořadí není jednoznačné. Při krátkých dobách expozice je pořadí těchto tří funkcí uspořádané podle předpokladu („0 °C < -2,5 °C < -5 °C“ - $y=562 \cdot x^{0,493}$; $y=1064 \cdot x^{0,286}$; $y=1168 \cdot x^{0,288}$). Ovšem při dobách expozice vyšších než přibližně 20 hodin graf funkce pro 0 °C stoupá prudčeji než graf pro -2,5 °C, protíná jej a jeho průběh pokračuje do vyšších hodnot. Při hodnotách doby expozice kolem 40 hodin nastává obdobná situace pro grafy teploty 0 °C a -5 °C, což ale platí pouze když odmocninnou funkcí prokládám jednotlivá naměřená data.

Alternativou pro proložení funkce jednotlivými naměřenými daty je proložení mediány pro jednotlivé kombinace doby expozice a expoziční teploty. Pořadí křivek v grafu je podobné jako v prvním případě až na průběh funkce pro -5 °C, která zde leží nejvýše pro všechny doby expozice (graf 9).

Závislost doby probouzení na době expozice a expoziční teplotě v celé její komplexnosti lze nejlépe pochopit a znázornit prostorovým grafem (graf 7).

Bifázický charakter doby probouzení

Ve všech pěti teplotách jsem naměřila přibližně stejně dat, avšak nevystavovala jsem potměníky nízkým teplotám po stejnou dobu. Pro vyšší teploty jsem samozřejmě použila delší časy expozice, pro nižší teploty kratší časy, protože v delších hynuli. Použité doby expozice se překrývaly pouze v hodnotách 16 až 22 hodin. Proto jsem stanovila dobu 20 hodin pro porovnání všech pěti teplot.

Se snižováním teploty doba probouzení rostla, což se však dělo jen do hodnoty 0°C. Mezi 0 °C a -2,5°C nedošlo k očekávanému nárůstu doby probouzení (graf vytvořil „plateau“). Až při dalším snižování teploty (k -5 °C) opět doba probouzení rostla. Funkce tedy získala bifázický charakter (graf 12).

Variabilita měření

V rámci každé měřené kombinace doby expozice a teploty expozice byly vždy velké rozdíly mezi jednotlivými jedinci. Poměr mezi maximální a minimální naměřenou hodnotou v rámci jedné kombinace se pohyboval od 1,3 do 6,3. Tomu odpovídají vysoké hodnoty koeficientu variance (podíl standardní odchylky a aritmetického průměru), které se pohybují v rozsahu 10–75%. S dobou expozice tato hodnota v každé teplotě mírně klesá, to znamená, že data nepotřebují logaritmickou transformaci. Průměrný koeficient variance pro všechny kombinace byl 37%. Nejnižší koeficienty variance jsem spočítala pro teplotu 0 °C; nebyl pozorován žádný výrazný trend růstu rozptylu s rostoucími teplotami.

Pokud by se data v rámci jednotlivé kombinace zakreslila do histogramu, dostali bychom obvykle mírně šikmé rozdělení. To znamená, že při měření doby probouzení z chill coma jsem naměřila hodně krátkých časů a pár výrazně delších v dané kombinaci.

Pro zjištění možných faktorů podílejících se na velké variabilitě naměřených dat jsem porovnávala doby probouzení samců a samic, doby probouzení různě starých jedinců a zkoumala vliv hmotnosti potěmníků na dobu probouzení.

Vliv pohlaví a stáří

Dobu probouzení v kombinaci teploty -2,5 °C a doby expozice 4 hodiny jsem analyzovala dvoucestnou ANOVOU. Skupina starších potěmníků měla časy probouzení mírně delší, skupina narozená později se probouzela rychleji. Rozdíl mezi skupinami však nebyl signifikantní ($F=1,73$, $p=0,201$; graf 10).

Při zkoumání vlivu pohlaví na dobu probouzení z chill coma jsem zjistila mírný trend, kdy samci se probouzejí o něco rychleji, samice pomaleji (graf 10), avšak rozdíl není opět statisticky dost průkazný ($F=1,092$, $p=0,307$).

Interakce těchto dvou faktorů je velmi neprůkazná ($F=0,406$, $p=0,53$), což znamená, že mladší samci se probouzejí rychleji než mladší samice, stejně jako starší samci srovnatelně rychleji než starší samice (graf 10).

Vliv hmotnosti potěmníků

Hmotnosti vážených jedinců se pohybovaly od 97 mg do 157 mg a průměr byl stanoven na 129 mg. Lineární závislost doby probouzení na hmotnosti nebyla statisticky průkazná ($R=0,055$, $p=0,78$), takže s rostoucí hmotností odolnost vůči nízkým teplotám nestoupala ani neklesala (graf 11). Brouci s průměrnou hmotností měly doby probouzení kratší, brouci s extrémně nízkou i vysokou hmotností výrazně vyšší. Pokud jsem tedy data proložila kvadratickou funkcí (graf 11), vyšla závislost průkazně ($R=0,464$, p pro kvadratickou složku rovnice= $0,0155$).

DISKUZE

Matematické modelování naměřených dat

Ukázalo se, že pro moji metodu nejmenších malých mocnin se průběh použité odmocninné funkce opravdu nenechal tolik ovlivňovat naměřenými extrémními hodnotami, což je žádoucí. Doporučila bych proto tuto statistickou metodu zpracování dat používat hojně tam, kde je nebezpečí nadměrného ovlivnění průběhu regresní křivky extrémními hodnotami.

Specifika průběhů hodnot doby probouzení v různých teplotách

Narozdíl od lineární závislosti doby probouzení na době expozice u octomilky (*D. melanogaster*) (David a kol., 1998) a ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus*) (Košťál a kol., 2004) vykazovaly doby probouzení u potměnků (*Tenebrio molitor*) charakter odmocninné funkce. Přitom bychom mohli předpokládat více možných průběhů – například těsně před začátkem hynutí prudký konkávní vzestup křivky, avšak tato premisa nebyla potvrzena. Doba probouzení stoupala v nižších teplotách ($-5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$) nejen rychleji, ale především do vyšších hodnot, než kterých bylo u vyšších teplot dosaženo v nejdelším časovém intervalu.

Předpoklad, že potměnků se budou probouzet z vyšších teplot snadněji a rychleji, se potvrdil. Je pravda, že došlo k překřížení křivky pro $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ s křivkami nižších teplot, takže se zdá, jako by k probouzení v nižších teplotách docházelo rychleji, ale k tomu dochází pouze za dlouhých dob expozice. Pro nižší teploty v delších dobách nebyly (a nemohly být) naměřeny žádné hodnoty dob probouzení, protože za těchto podmínek už brouci hynuli. Průběh křivek nižších teplot v delších dobách byl jen odhadnut statistickým programem podle skutečně naměřených dat v kratších dobách expozice, proto je irelevantní se jím zabývat.

Když jsem funkci proložila mediány pro jednotlivé kombinace doby expozice a expoziční teploty, větší rozdíly od proložení jednotlivými daty nastaly pouze v delších dobách expozice, kde už nemá smysl se jejím průběhem zabývat. V konkrétních kombinacích expoziční teploty a doby expozice, kde nalézáme šikmé rozdělení dob probouzení jednotlivých potměnků, se však křivka prokládající mediány a původní data může lišit. Je to dáno tím, že v tomto případě medián dat leží výrazně pod aritmetickým průměrem dat.

Prostorový graf vypracovaný ve statistickém programu (použití metody Negative exponential smoothing) znázorňuje pro kratší doby expozice výstižně závislost doby probouzení na teplotě. Avšak v nižších teplotách je jeho průběh zcestný ze stejného důvodu jako je tomu u dvourozměrného grafu, proto jsou tyto hodnoty na grafu vyznačeny bíle. Průběh v kratších exponovaných teplotách nasvědčuje mírné bifázčnosti doby probouzení (viz dále).

Bifázický charakter doby probouzení

U potemníka (*T. molitor*) je z naměřených dat patrný bifázický průběh funkce doby probouzení v závislosti na teplotě expozice. Podobně tomu bylo i u dvou druhů octomilek (*D. subobscura* - Macdonald a kol., 2004; *D. melanogaster* - David a kol., 2003). Se snižující se teplotou doba probouzení nejdříve rostla, až dosáhla určité hodnoty. Potom znovu prudce rostla v teplotách přibližujících se teplotě letální. U octomilky *D. subobscura* se nárůst zastavil mezi -4 a -6 °C, u *D. melanogaster* mezi 0 a -3 °C. U potemníka graf toto „plateau“ vytvořil mezi 0 a $-2,5$ °C. V teplotě -5 °C nebylo dosaženo spodní letální teploty, se snižováním teploty v kratších dobách expozice bychom tedy mohli ještě dále pokračovat.

Dvoufázovost závislosti doby probouzení na teplotě naznačuje existenci dvou nezávislých fyziologických mechanismů (David a kol., 2003). Protože u potemníka je tomu obdobně jako u dřívě zkoumané octomilky, nedá se předpokládat, že by mechanismy jeho odolnosti vůči nízkým teplotám byly jednodušší a tedy lépe zkoumatelné.

Variabilita měření

Vysoká variabilita naměřených dat znesnadňovala přesnou analýzu výsledků a vyžadovala více zkoumaných jedinců. Průměrný koeficient variance byl 37%, také u octomilek byl koeficient variance často vyšší než 25% (David a kol., 1998). Proto jsem se snažila už mezi pokusy najít určité faktory ovlivňující a podporující variabilitu, abych mohla modifikovat experimenty tak, aby byla variabilita menší a zpracování výsledků jednodušší. Variabilita se výrazně neměnila vlivem různých expozičních teplot, ani dob expozice a nevykazovala žádným směrem určitý trend. Naměřená data tedy nemusela být logaritmována, narozdíl od výsledků Davida a kol. (2003), kde variabilita naměřených dob probouzení výrazně rostla se snižující se teplotou expozice.

Z možných faktorů ovlivňujících dobu probouzení, tedy v důsledku zvyšujících její variabilitu, jsem zkoumala vliv stáří, pohlaví a hmotnosti potemníků. Skupina starších potemníků (8-11 dní od imaginální ekdyze) měla časy probouzení mírně delší, skupina narozená později (2-7 dní od imaginální ekdyze) se probouzela rychleji. Rozdíl mezi skupinami však nebyl signifikantní, takže jsem nadále používala potemníky různého stáří. Také u octomilek bylo prokázáno, že chladová odolnost se s věkem zhoršovala a starší jedinci se z chill coma probouzeli delší dobu (Burger a Promislow, 2006; David a kol., 1998). Zajímavé je, že larvy a kukly potemníka moučného nejsou zatíženy chladovým stresem a jsou tedy výrazně chladově odolnější (Gulevsky a kol., 2006), což je pravděpodobně adaptace pro přežití stadií, které se nemohou chladu bránit např. únikem.

Závislost doby probouzení na pohlaví byla prokázána u octomilek, kde byla u samců průměrně delší než u samic. Tato veličina však vykazovala koeficient variance vyšší než 25% (David a kol., 1998). U potemníků jsem pozorovala opačný trend – samci se probouzeli z chill coma o něco rychleji než samice, avšak je to opět statisticky neprůkazný fakt, proto jsem se domnívala, že jej lze zanedbat a při hromadných měřeních doby probouzení na něj dále nebrala zřetel a jedince vybírala náhodně.

Při zkoumání vlivu hmotnosti jedinců na dobu probouzení jsem nezjistila žádný trend jdoucí od nejmenší k největší naměřené hmotnosti nebo naopak. Na druhou stranu brouci s průměrnou hmotností měli kratší doby probouzení než lehčí i těžcí brouci. Mohla by se zdát reálná například možnost, že brouci extrémně těžcí se prohřívají hůře, iontové pumpy jim začnou fungovat později, na čemž jsou tedy závislé pozdější reakce nervů a svalů. Avšak tato možnost může být vyloučena, protože všichni jedinci jsou po přenesení do pokojové teploty v řádu desítek sekund prohřátí. Pravděpodobné vysvětlení pro znevýhodnění hmotnostních extrémů jsem tedy nenalezla.

Další důvody vysoké variability mých výsledků mohly spočívat ve specifitě jedinců. Nebylo neobvyklé, aby některému staršímu dospělci chyběla noha nebo aspoň poslední článek (pretarsus). Důsledkem toho pak je znevýhodnění při kritériu doby probouzení, kdy je nezbytné, aby se jedinec obrátil ze zad na břicho. Potemníci jsou poměrně nemotorní brouci a toto obrácení pro ně není jednoduché. Děje se převážně za pomoci nohou, které se zapřou o nerovnost v podkladě (to je také důvod, proč jsem potemníky z aluminiových mistichek, ve

kterých se chladili, přenesla na smirkový papír). V obracení potměnkům pomáhá také rozvíření krovek a křídel. V hromadných chovech je však zcela běžným úkazem pochroumání krovek a především zadních křídel při líhnutí z kukly. Takto postižení jedinci mají opět samozřejmě sníženou schopnost otočení, tedy relativně delší dobu probouzení.

Existují i další faktory ovlivňující doby probouzení z chill coma, které byly ovšem v mém pokusu jednotné, nemohly tedy způsobovat vysokou variabilitu. Chladová odolnost organismů se vnitrodruhově liší podle klimatu místa, odkud daná populace pochází (Castaneda a kol., 2005). U octomilek (*Drosophila melanogaster*) z Austrálie byla pozorována vyšší chladová odolnost u populací z vysoké zeměpisné šířky (Hoffmann a kol., 2005). Dvě subtropické populace *Drosophila subobscura* měly delší dobu probouzení oproti temperátním (David a kol., 2003).

Chladovou odolnost hmyzu pozitivně ovlivňuje také aklimace v teplotách 5–10 °C. Rychlá aklimace trvající několik hodin zlepšuje schopnost přežívání velmi nízkých teplot; pokud se doba aklimace prodlouží na dobu 2 dnů, má pozitivní vliv i na dobu probouzení (Rako a kol., 2006).

Anestezie oxidem uhličitým prodlužuje probouzení z chill coma u octomilek (Nilson a kol., 2006). U potměnků není potřeba anestezii užívat, nevykazují totiž takovou pohybovou aktivitu.

Kromě aklimace má na různé parametry chladové odolnosti včetně doby probouzení vliv teplota chovu. Například octomilky vychované ve vyšší teplotě se probouzely déle (Rako a kol., 2006). To samé bylo prokázáno u okáče (*Bicyclus anynana*) (Geister a Fisher, 2007) a u ohniváčka (*Lycaena tityrus*) (Zeilstra a Fischer, 2005). Potměnčí byli v chování v konstantní teplotě 25 °C–27 °C. Čas probouzení závisí mimo jiné na teplotě, ve které byli zkoumaní jedinci exponováni po dobu probouzení (David a kol., 1998). Doby probouzení potměnků jsem měřila vždy v teplotě okolo 23 °C.

V laboratoři lze vyselektovat linie téhož druhu méně nebo více odolné k nízké teplotě (Anderson a kol. 2005). Díky tomu je možné, že v jiné laboratoři s potměnkami jinak geneticky disponovanými lze naměřit odlišné časy doby probouzení, ale zjištěné trendy (nárůst s expozičním časem a klesající teplotou) by měly odpovídat.

Chladová odolnost a odolnost proti vysychání u octomilek spolu souvisejí (Sinclair a kol., 2007). Všichni potměnáci jsou však proti vysychání velmi odolní a běžně žijí v substrátu obsahujícím pouze cca 10% vody.

ZÁVĚR

- Funkce závislosti doby probouzení na době expozice měla tvar odmocninné křivky
- Doby probouzení při stejné době expozice byly v nižších teplotách vyšší, jak jsem předpokládala
- Závislost doby probouzení na teplotě expozice nebyla lineární, ale bifázická; předpoklad, že potěmník moučný je jednodušší model pro zkoumání fyziologické podstaty chill coma než různé druhy octomilek, je tedy vyvrácen
- Použitá metoda nejmenších malých mocnin se ukázala jako velmi vhodná pro modelování závislostí při variabilních datech
- Stáří a pohlaví potěmníků uspokojivě nevysvětlovalo vysokou variabilitu naměřených dat
- Zjistila jsem zvláštní závislost doby probouzení na hmotnosti potěmníků, kdy nejnižší hodnoty měli jedinci se střední hmotností
- Znalost míry chladové odolnosti může pomoci při potlačování výskytu potěmníka na místech lidstvu nežádoucích (sýpky, sklady potravin...)

LITERATURA

- [Anderson, A. R.](#), [Hoffmann, A. A.](#), [McKechnie, S. W.](#), 2005: Response to selection for rapid chill-coma recovery in *Drosophila melanogaster*: physiology and life-history traits. *Genetical research* 85 (1): 15–22
- [Ayrinhac, A.](#), [Debat, V.](#), [Gibert, P.](#), [Kister, A. G.](#), [Legout, H.](#), [Moreteau, B.](#), [Vergilino, R.](#), [David, J. R.](#), 2004: Cold adaptation in geographical populations of *Drosophila melanogaster*: phenotypic plasticity is more important than genetic variability. *Functional ecology* 18 (5): 700–706
- Burger, Joep M. S., Promislow, Daniel E. L., 2006: Are functional and demographic senescence genetically independent? *Experimental gerontology* 41 (11): 1108–1116
- [Castaneda, L. E.](#), [Lardies, M. A.](#), [Bozinovic, F.](#), 2005: Interpopulational variation in recovery time from chill coma along a geographic gradient: A study in the common woodlouse, *Porcellio laevis*. *Journal of insect physiology* 51 (12): 1346–1351
- [David, J. R.](#), [Gibert, P.](#), [Moreteau, B.](#), [Gilchrist, G. W.](#), [Huey, R. B.](#), 2003: The fly that came in from the cold: geographic variation of recovery time from low-temperature exposure in *Drosophila subobscura*. *Functional ecology* 17 (4): 425–430
- [David, R. J.](#), [Gibert, P.](#), [Pla, E.](#), [Petavy, G.](#), [Karan, D.](#), [Moreteau, B.](#), 1998: Cold stress tolerance in *Drosophila*: Analysis of chill coma recovery in *D-melanogaster*. *Journal of thermal biology* 23 (5): 291–299
- Falteisek Lukáš, Fikáček Martin, Hodac Ladislav, Chmátal Lukáš, Jedelský Petr L., Koutecká Eva, Koutecký Petr, Krtková Jana, Kubešová Magdalena, Lišková Jana, Mateju Jan, Smýkal Vlastimil, Šípek Petr, 2006: Organismy a abiotické faktory prostředí. Národní institut dětí a mládeže, Praha, 113 str.
- Geister, Thorin L., Fischer, Klaus, 2007: Testing the beneficial acclimation hypothesis: temperature effects on mating success in a butterfly. *Behavioral ecology* 18 (4): 658–664
- [Gibert, P.](#), [Moreteau, B.](#), [Petavy, G.](#), [Karan, D.](#), [David, J. R.](#), 2001: Chill-coma tolerance, a major climatic adaptation among *Drosophila* species. *Evolution* 55 (5): 1063–1068
- [Graham, L. A.](#), [Walker, V. K.](#), [Davies, P. L.](#), 2000: Developmental and environmental regulation of antifreeze proteins in the mealworm beetle *Tenebrio molitor*. *European journal of biochemistry* 267 (21): 6452–6458

- Gulevsky, Alexander K., Relina, Liana I., Grishchenkova, Yelena A., 2006: Variations of the antioxidant system during development of the cold-tolerant beetle, *Tenebrio molitor*. *Cryoletters* 27 (5): 283–290
- [Hoffmann, A. A.](#), [Shirriff, J.](#), [Scott, M.](#), 2005: Relative importance of plastic vs genetic factors in adaptive differentiation: geographical variation for stress resistance in *Drosophila melanogaster* from eastern Australia. *Functional ecology* 19 (2): 222–227
- Jansen, Jeroen, M., Bonga, Sjoerd, Wendelaar, Hummel, Herman, 2007: Differential cold-shock resistance among acclimated European mussel populations. : *Marine and freshwater behaviour and physiology* 40 (4): 233–245
- Kelty, Jonathan, 2007: Rapid cold-hardening of *Drosophila melanogaster* in a field setting. *Physiological entomology* 32 (4): 343–350
- [Kostal, V.](#), [Vambera, J.](#), [Bastl, J.](#), 2004: On the nature of pre-freeze mortality in insects: water balance, ion homeostasis and energy charge in the adults of *Pyrrhocoris apterus*. *Journal of experimental biology* 207 (9): 1509–1521
- Lee, R. E. Jr, 1991: Principles of insect low temperature tolerance. In *Insects at Low Temperature* (ed. R. E. Lee, Jr and D. L. Denlinger), pp. 1746. New York, London: Chapman and Hall.
- [Lee, R. E.](#), [Stronggunderson J. M.](#), [Lee M.R.](#), [Davidson E. C.](#), 1992: Ice-nucleating active bacteria decrease the cold-hardiness of stored grain insects. *Journal of economic entomology* 85 (2): 371–374
- [Macdonald, S. S.](#), [Rako, L.](#), [Batterham, P.](#), [Hoffmann, A. A.](#), 2004: Dissecting chill coma recovery as a measure of cold resistance: evidence for a biphasic response in *Drosophila melanogaster*. *Journal of insect physiology* 50 (8): 695–700
- Nilson, Theresa L., Sinclair, Brent J., Roberts, Stephen P., 2006: The effects of carbon dioxide anesthesia and anoxia on rapid cold-hardening and chill coma recovery in *Drosophila melanogaster*. *Journal of insect physiology* 52 (10): 1027-1033
- Pedersen, Sindre A., Kristiansen, Erlend, Hansen, Bjorn H., Andersen, Rolf A., Zachariassen, Karl E., 2006: Cold hardiness in relation to trace metal stress in the freeze-avoiding beetle *Tenebrio molitor*. *Journal of insect physiology* 52 (8): 846-853
- [Rako, L.](#), [Hoffmann, A. A.](#), 2006: Complexity of the cold acclimation response in *Drosophila melanogaster*. *Journal of insect physiology* 52 (1): 94-104
- [Sinclair B. J.](#), [Roberts S. P.](#), 2005: Acclimation, shock and hardening in the cold. *Journal of thermal biology* 30 (8): 557-562

Sinclair, Brent J., Nelson, Sean, Nilson, Theresa L., Roberts, Stephen P., Gibbs, Allen G.,
2007: The effect of selection for desiccation resistance on cold tolerance of *Drosophila*
melanogaster. *Physiological entomology* 32 (4): 322-327

[Zeilstra, I.](#), [Fischer, K.](#), 2005: Cold tolerance in relation to developmental and adult
temperature in a butterfly. *Physiological entomology* 30 (1): 92-95

PŘÍLOHY

Obrázky

Obrázek 1: Imago potemníka moučného (*Tenebrio molitor*)

Obrázek 2: Larvy potemníka moučného – „mouční červi“ – se chovají v otrubách a často se používají jako krmivo

Obrázek 3: Na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích na katedře zoologie se potemníci chovají ve velkých nádobách s otrubami

Obrázek 4: Plato s aluminiovými mističkami, ve kterých byli potemníci exponováni po dobu chlazení

Obrázek 5: Inkubátor firmy SANYO MIR153 v laboratoři PrFJCU

Obrázek 6: Vnitřek inkubátoru, kde byli potemníci chlazení

Obrázek 7: Aluminiové mističky se ztuhlými potemníky těsně po přenesení z chladicího boxu

Obrázek 8: Smirkový papír (zrnitost 80), na kterém se potemníci probouzeli z chill coma

Obrázek 9: Jedinec potemníka moučného se snaží dostat z nepřírozené polohy na zádech, ve které se nacházel po dobu strnulosti

Grafy

1) Závislost doby probouzení z +5 °C na době expozice proložené odmocninnou funkcí za pomoci metody nejmenších čtverců

2) Závislost doby probouzení z +5 °C na době expozice proložené odmocninnou funkcí za pomoci metody nejmenších malých mocnin

3) Závislost doby probouzení z +2,5 °C na době expozice proložené odmocninnou funkcí za pomoci metody nejmenších malých mocnin

4) Závislost doby probouzení z 0 °C na době expozice proložené odmocninnou funkcí za pomoci metody nejmenších malých mocnin

5) Závislost doby probouzení z -2,5 °C na době expozice proložené odmocninnou funkcí za pomoci metody nejmenších malých mocnin

6) Závislost doby probouzení z -5 °C na době expozice proložené odmocninnou funkcí za pomoci metody nejmenších malých mocnin

7) Prostorový graf vypracovaný ve statistickém programu (použití metody Negative exponential smoothing) znázorňuje závislost doby probouzení na teplotě a době expozice

8) Graf porovnávající doby probouzení proložené jednotlivými naměřenými hodnotami ve všech pěti teplotách

- Červená +5 °C
- Oranžová +2,5 °C
- Žlutá 0 °C
- Zelená -2,5 °C
- Modrá -5 °C

9) Graf porovnávající doby probouzení pro mediány jednotlivých kombinací doby expozice a expoziční teploty

- Červená +5 °C
- Oranžová +2,5 °C
- Žlutá 0 °C
- Zelená -2,5 °C
- Modrá -5 °C

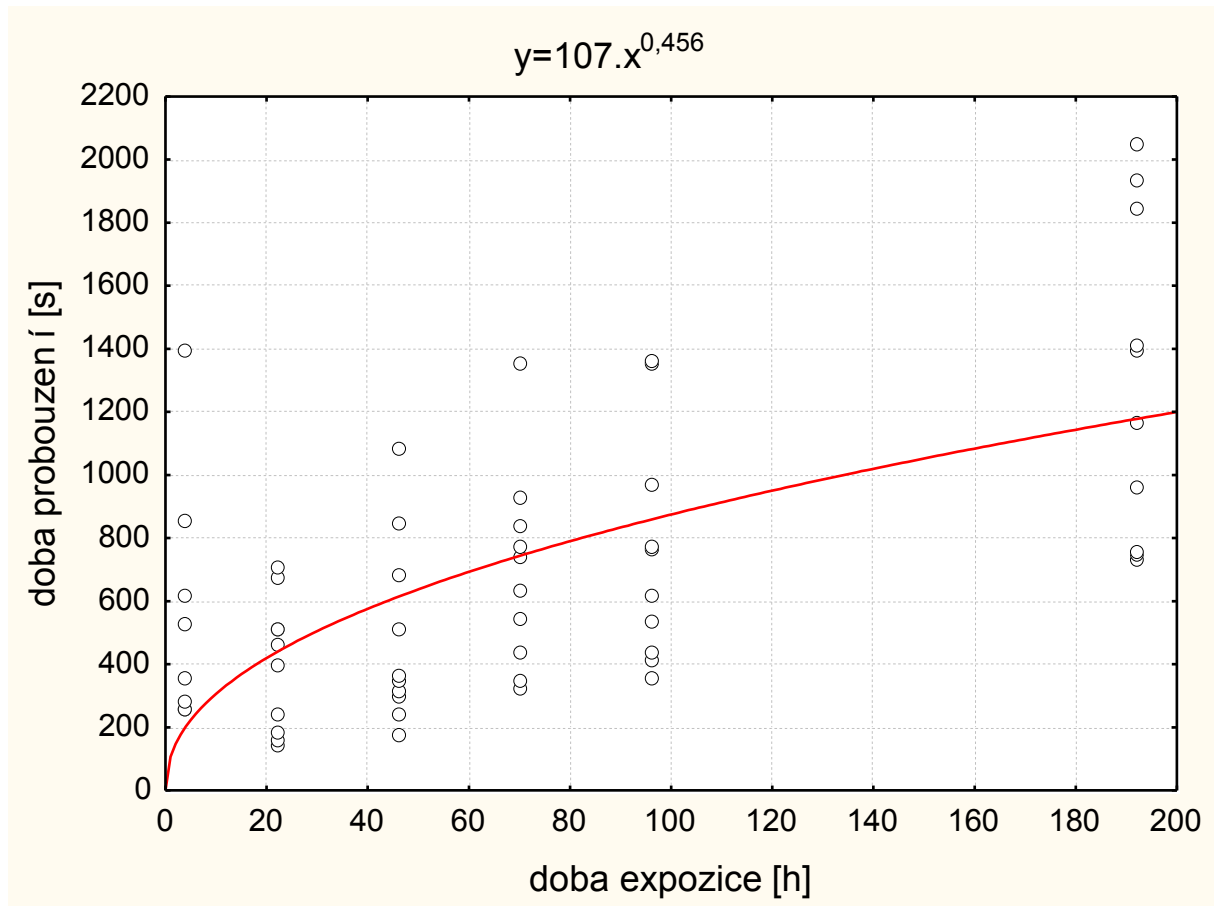
10) Doby probouzení v kombinaci teploty -2,5 °C a doby expozice 4 hodiny analyzované dvoucestnou ANOVOU ukazují závislost na pohlaví a stáří

- m=samci; f=samice
- modrá=2-7 dní od imaginální ekdyze; červená=8-11 dní od imaginální ekdyze

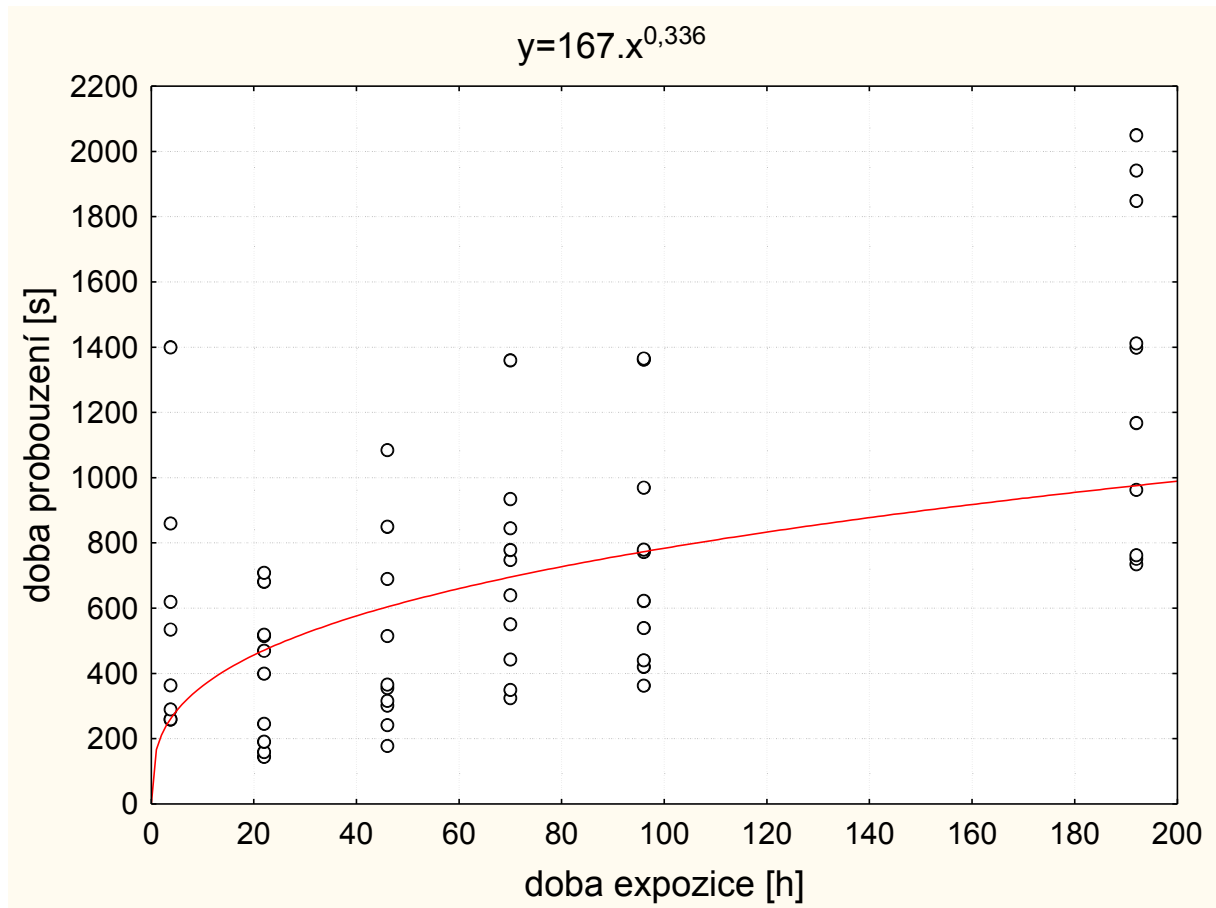
11) Závislost doby probouzení na hmotnosti dospělých potěmníků

- červená=lineární regrese
- modrá=kvadratická regrese

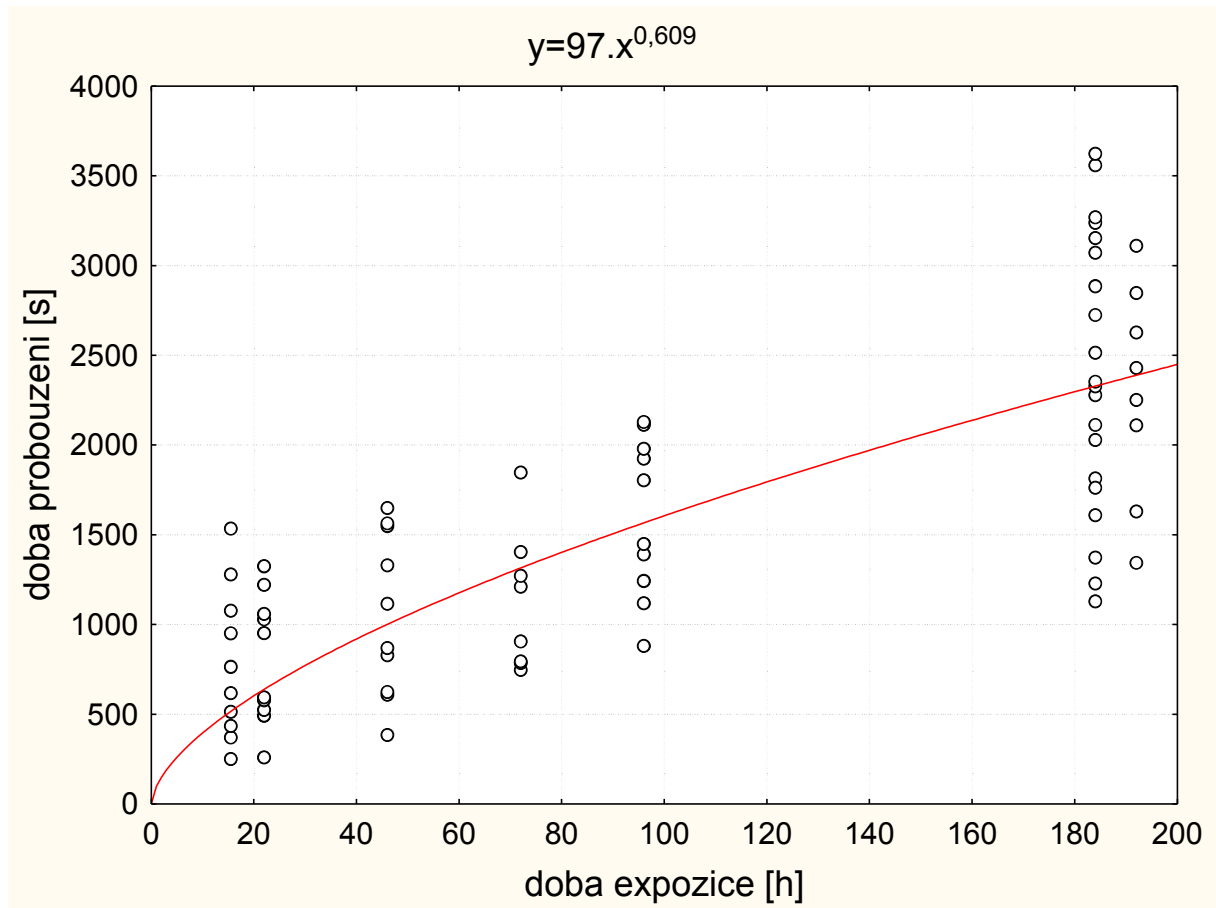
12) Bifázický nárůst doby probouzení s klesající teplotou při expozici 20 hodin



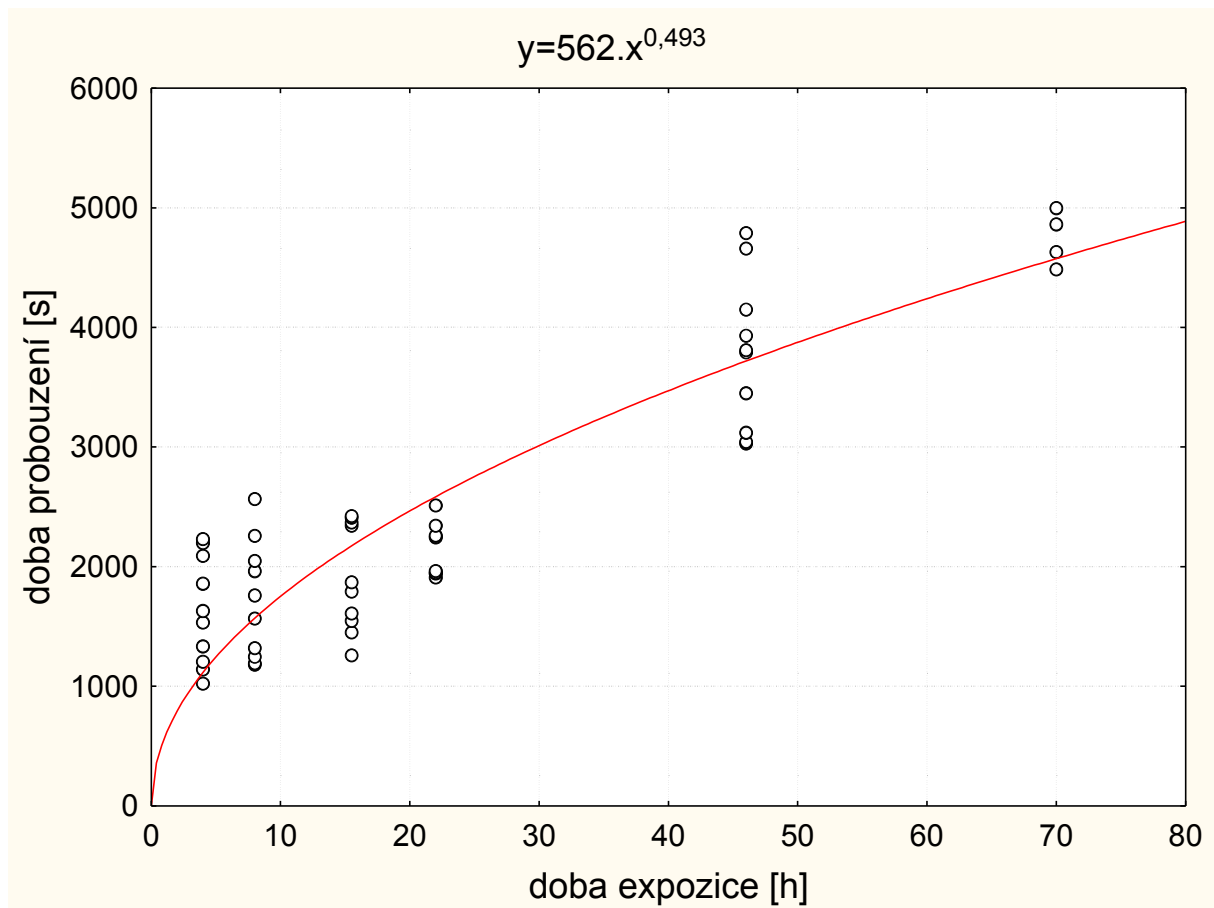
Graf 1) Závislost doby probouzení z +5 °C na době expozice proložené odmocninou funkcí za pomoci metody nejmenších čtverců



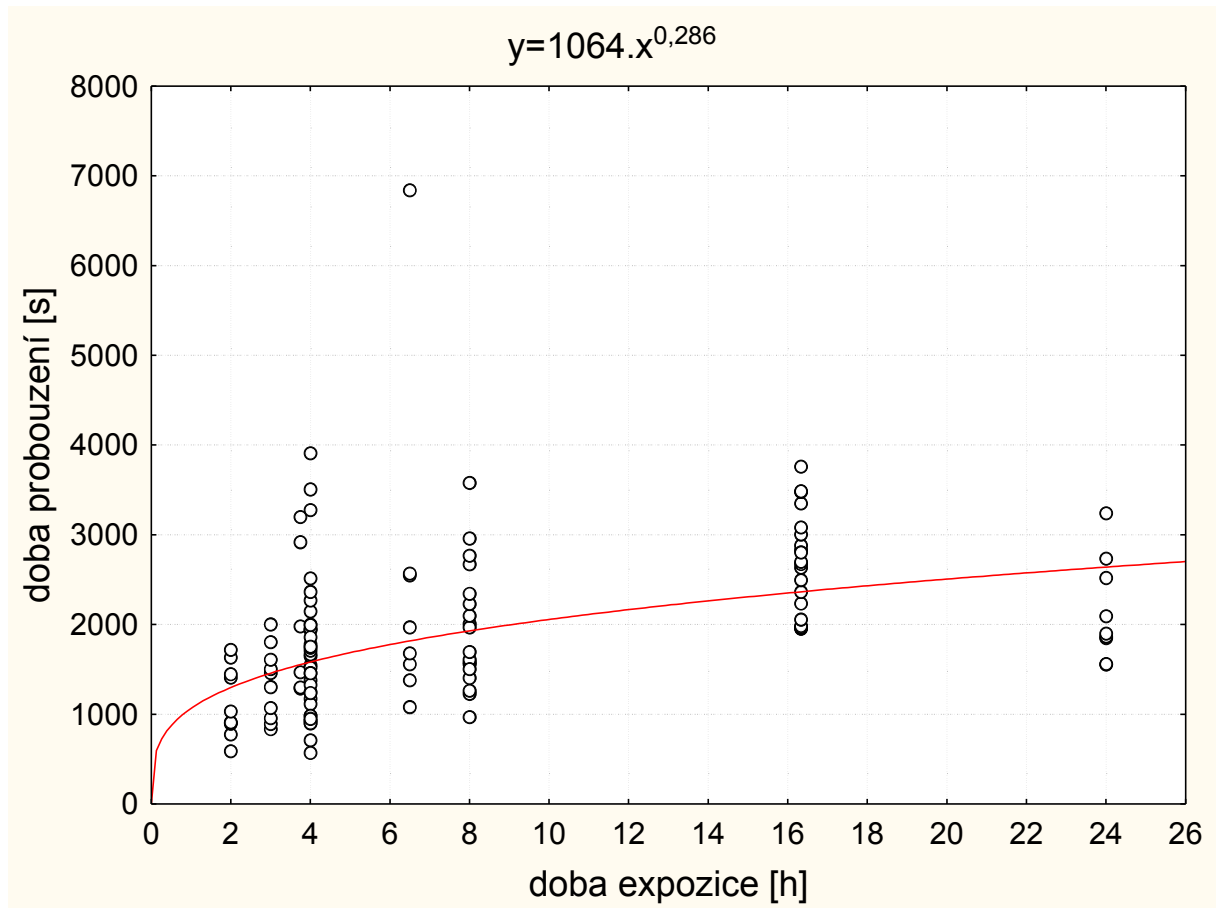
2) Závislost doby probouzení z +5 °C na době expozice proložené odmocninnou funkcí za pomoci metody nejmenších malých mocnin



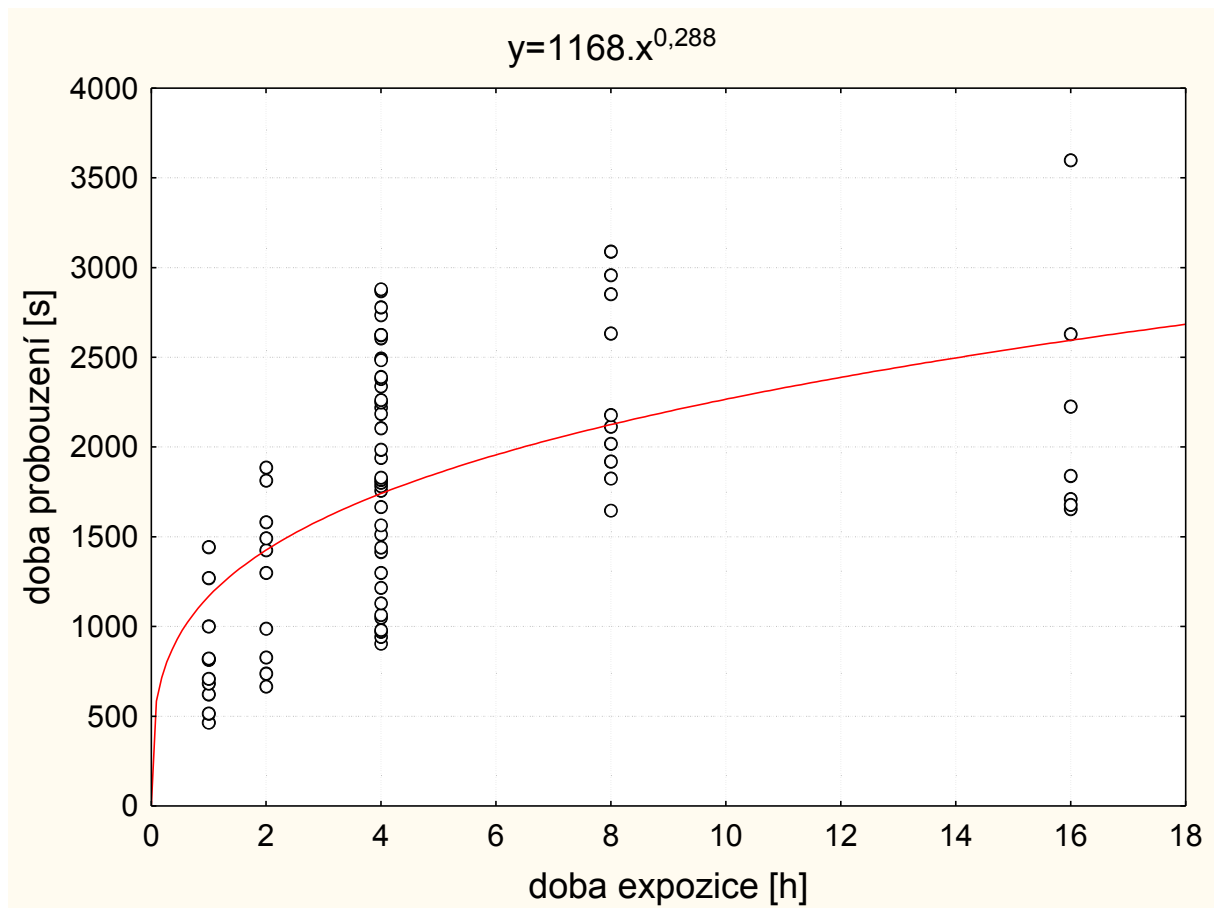
3) Závislost doby probouzení z +2,5 °C na době expozice proložené odmocninnou funkcí za pomoci metody nejmenších malých mocnin



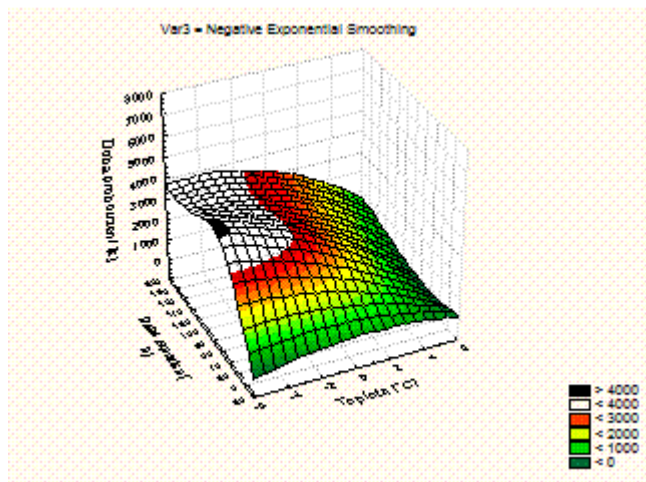
4) Závislost doby probouzení z 0 °C na době expozice proložené odmocninnou funkcí za pomoci metody nejmenších malých mocnin



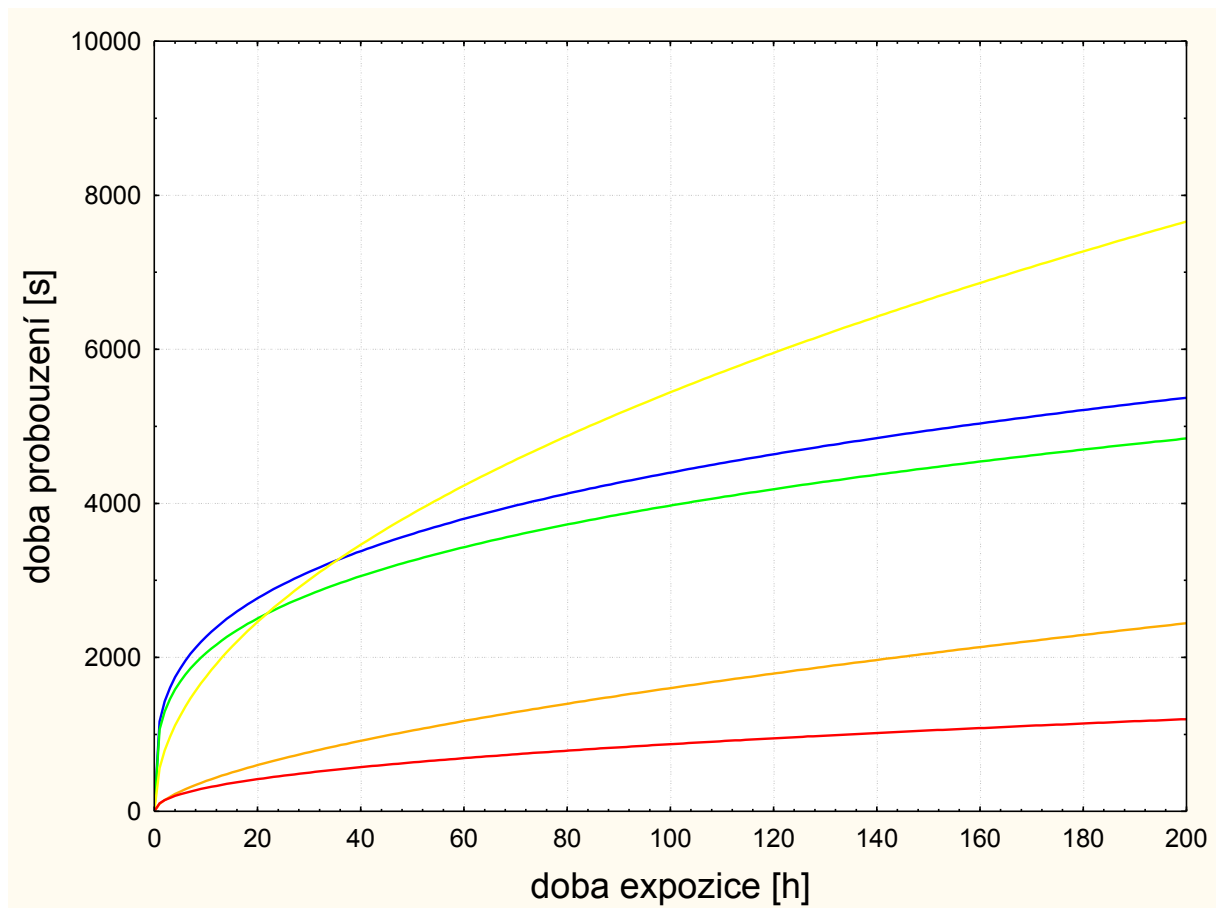
5) Závislost doby probouzení z $-2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ na době expozice proložené odmocninnou funkcí za pomoci metody nejmenších malých mocnin



6) Závislost doby probouzení z $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ na době expozice proložené odmocninnou funkcí za pomoci metody nejmenších malých mocnin

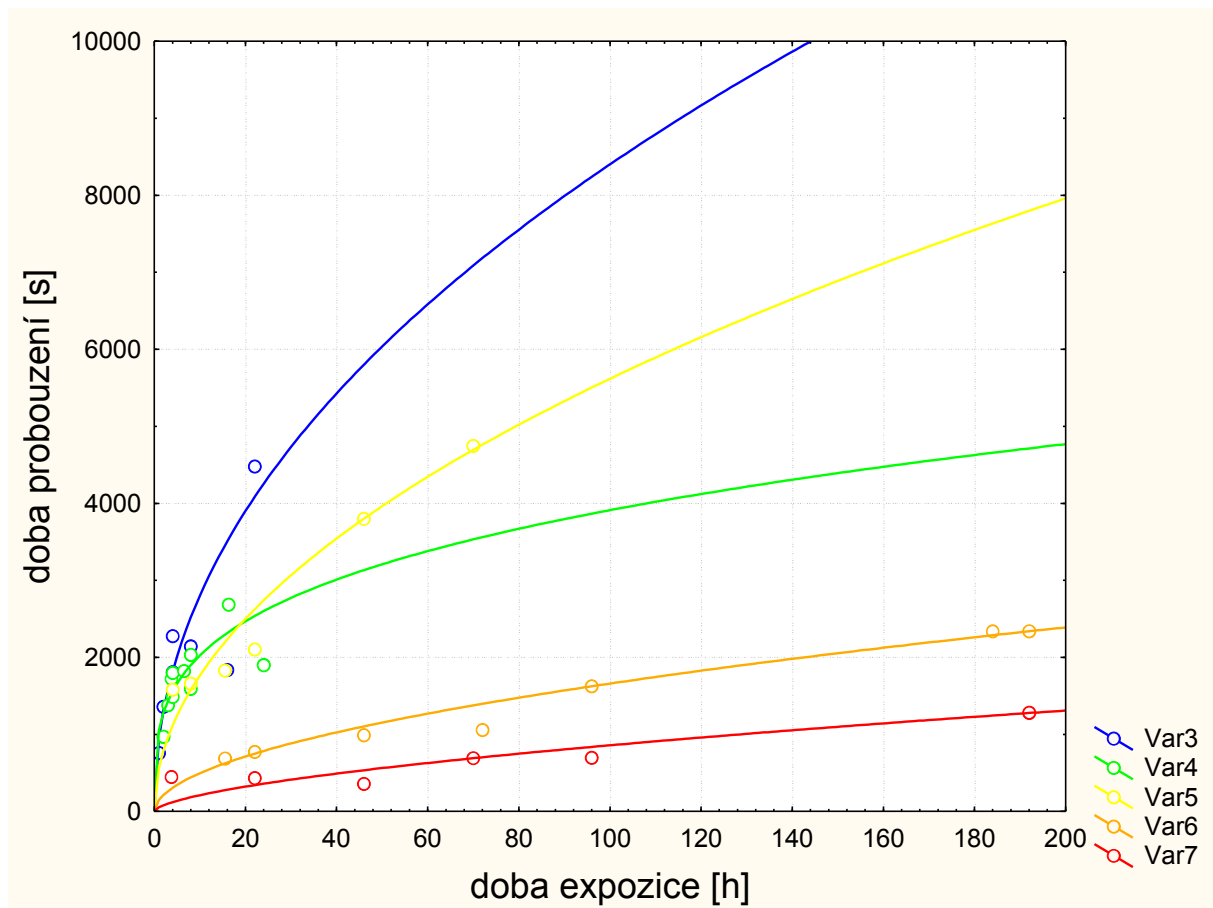


7) Prostorový graf vypracovaný ve statistickém programu (použití metody Negative exponential smoothing) znázorňuje závislost doby probouzení na teplotě a době expozice



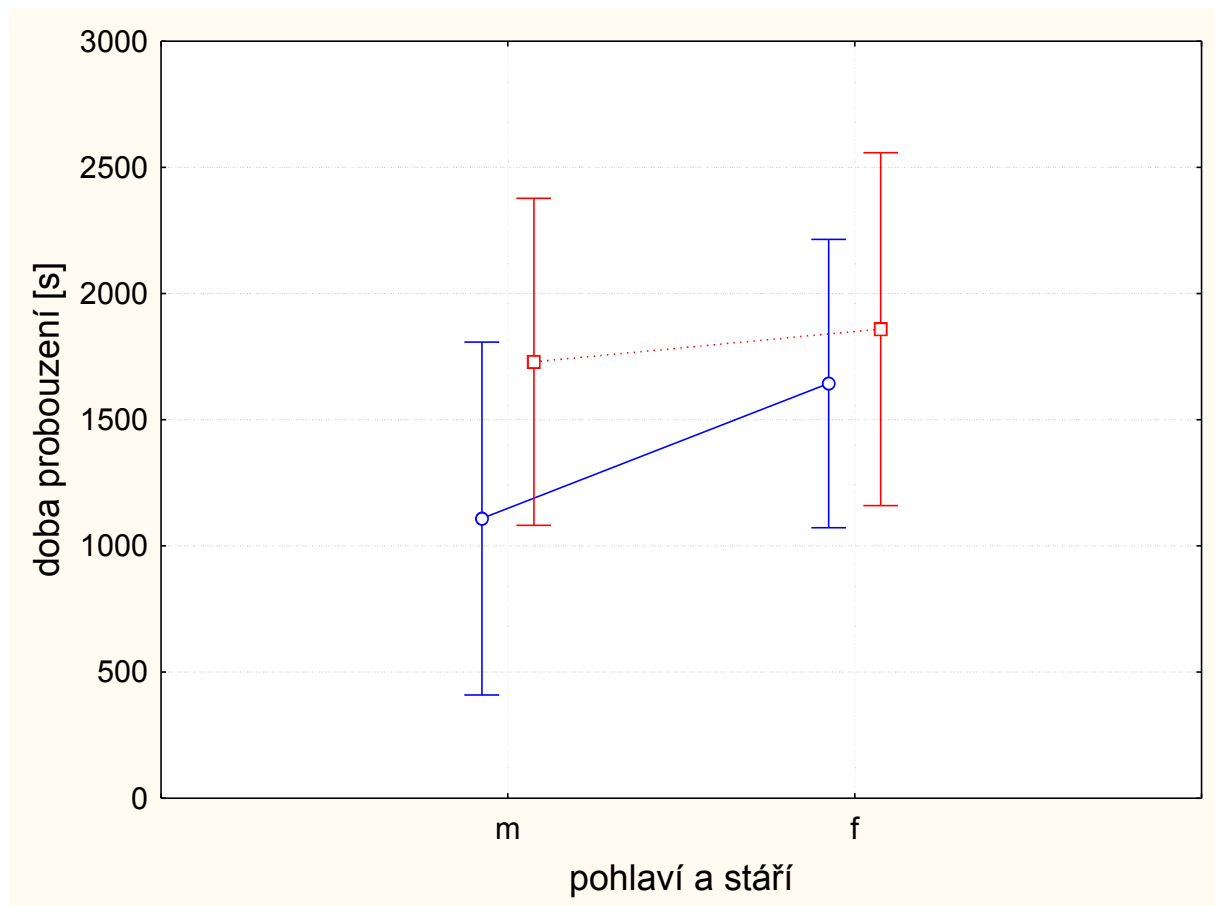
8) Graf porovnávající doby probouzení proložené jednotlivými naměřenými hodnotami ve všech pěti teplotách

- Červená +5 °C
- Oranžová +2,5 °C
- Žlutá 0 °C
- Zelená -2,5 °C
- Modrá -5 °C



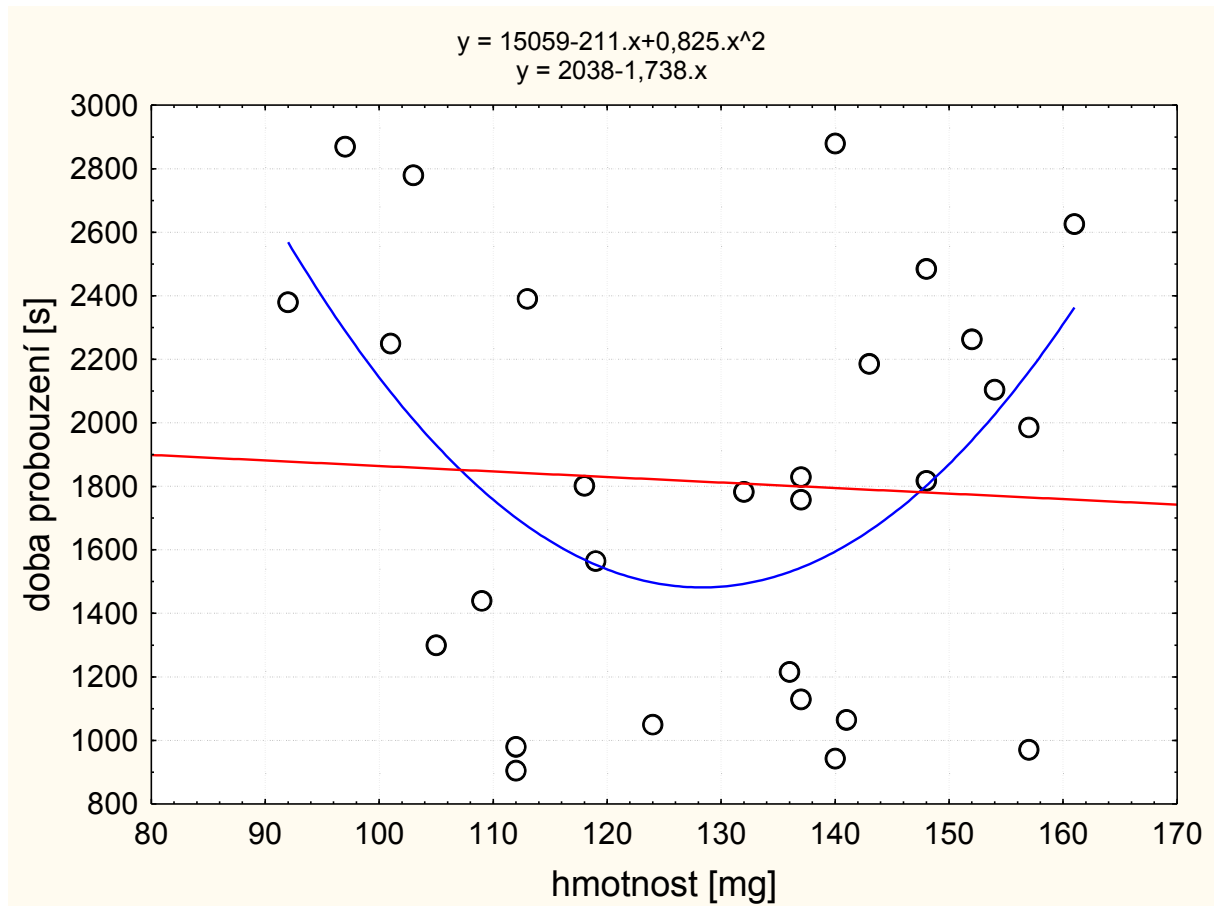
9) Graf porovnávající doby probouzení pro mediány jednotlivých kombinací doby expozice a expoziční teploty

- Červená +5 °C
- Oranžová +2,5 °C
- Žlutá 0 °C
- Zelená -2,5 °C
- Modrá -5 °C



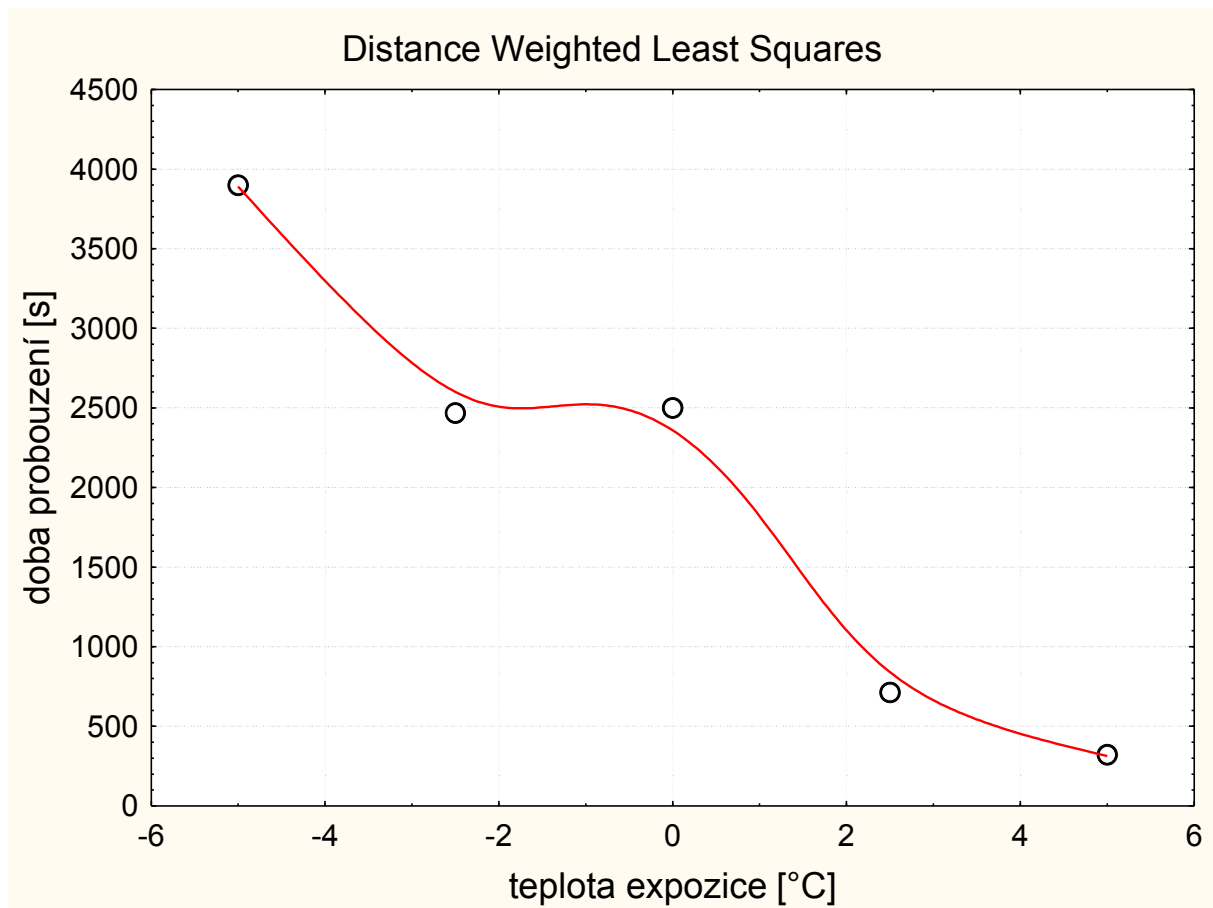
10) Doby probouzení v kombinaci teploty $-2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ a doby expozice 4 hodiny analyzované dvoucestnou ANOVOU ukazují závislost na pohlaví a stáří

- m=samci; f=samice
- modrá=2-7 dní od imaginální ekdyze; červená=8-11 dní od imaginální ekdyze



11) Závislost doby probouzení na hmotnosti dospělých potměníků

- červená=lineární regrese
- modrá=kvadratická regrese



12) Bifázický nárůst doby probouzení s klesající teplotou při expozici 20 hodin