

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

Vycítí hmyzožraví ptáci rostliny volající o pomoc?

Diplomová práce

Bc. Anna Humlová

Školitelka: Mgr. Kateřina Sam, Ph.D.
Konzultant: doc. RNDr. Oldřich Nedvěd, CSc.

České Budějovice 2016

Humlová, A. (2016): Vycítí hmyzožraví ptáci rostliny volající o pomoc? [Does the insectivorous birds smell plants crying for help? – Mgr. Thesis, in Czech.] – 53 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Two chapters in this thesis try to explain whether insectivorous birds can smell volatile compounds released by plants attacked by herbivorous insect, and use them as a cue to locate prey rich plants. First chapter describes field experiments with chemical induction of volatile compounds similar to those released during real herbivory. Second chapter depicts foraging behaviour of birds towards trees with “true” herbivory caused by live caterpillars in a cage experiment.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 14. prosince 2016

Anna Humlová

Poděkování

Mám radost, že mám prostor, kde mohu vyjádřit vděk mojí školitelce Katce Sam. Optimistický přístup, vytrvalost, pochopení, porozumění, nadšení, ochota a schopnost se mnou komunikovat a v první řadě schopnost motivovat mojí maličkost k práci, to je jen krátký výčet vlastností osoby, bez níž by tato práce nevznikla. Další, komu patří moje poděkování, je celý tým okolo Vojty Novotného, jehož přístup k vědě je mi velkou inspirací. Děkuji také mým kolegyním, členkám občanského sdružení Aksamitník, které celou práci přečetly a kriticky jí zhodnotily.

Ničeho by nebylo, kdyby mě s obětavostí jim vlastní, pochopením a trpělivostí nezahrnovali členové naší rozrůstající se rodiny. Děkuji.

Obsah

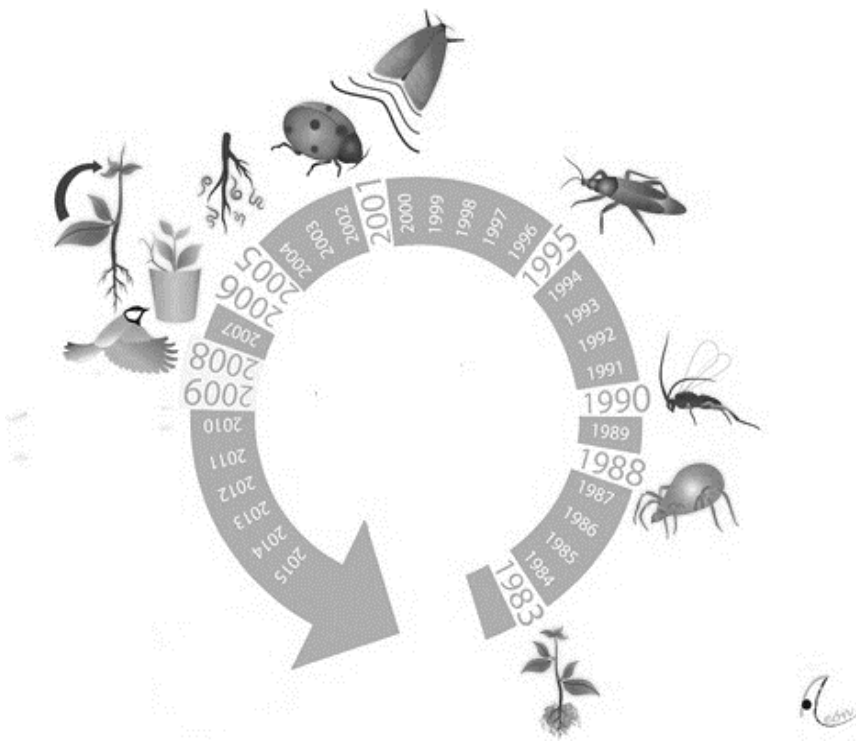
Úvod	1
Cíle práce	6
Použitá literatura	7
Kapitola I	10
Abstrakt	10
Úvod	11
Materiál a metody	13
Pokusná plocha a druhy stromů	13
Seznam běžně se vyskytujících ptáků oblasti	13
Uspořádání pokusu.....	14
Jímání těkavých látek.....	15
Chemická analýza těkavých látek na plynovém chromatografu.....	16
Statistické analýzy	16
Výsledky	18
Diskuze	24
Poděkování	27
Použitá literatura	28
Kapitola II	32
Abstrakt	32
Úvod	33
Materiál a metody	35
Studijní prostory.....	35
Pokusné druhy ptáků.....	35
Pokusné druhy rostlin a hmyzu.....	36
Uspořádání pokusu.....	38
Jímání těkavých látek.....	38

Chemická analýza těkavých látek na plynovém chromatografu.....	39
Statistické analýzy	40
Výsledky.....	41
Diskuze.....	45
Poděkování	47
Použitá literatura	48
Závěr	51
Přílohy	52

Úvod

Rostliny představují jednu ze základních jednotek trofických sítí ležících na nejnižší úrovni potravního řetězce. Reálné trofické systémy jsou často velmi komplikované a skládají se z více než dvou úrovní. Zatímco jednoduché (dvouúrovňové) trofické sítě byly v minulosti studované hojně (např.: Oksanen and Oksanen 2000), tritrofické a multitrofické interakce byly pro svoji složitost studované jen minimálně (např.: Persson 1999). Systémy troficky propojených společenství rostlin, býložravců a jejich nepřátel nicméně patří mezi jedny z nejvíce studovaných multitrofických systémů.

Mnoho vyšších rostlin interaguje s živočichy třetího trofického stupně (karnivory), za účelem získání ochrany od živočichů druhého trofického stupně (býložravého hmyzu a patogenů). „Nepřímá obrana“ je pak termín, který popisuje tento stav, kdy rostlina láká, vyživuje či jinak podporuje jiné organismy za účelem své vlastní ochrany. Tento termín se objevil v literatuře poprvé před třiceti lety (dle review Dicke et al. 2009), ale samotný fenomén byl zkoumán již dříve na systému myrmekofytických rostlin (např.: Marquis and Whelan 1996). V současné literatuře se „nepřímou obranou“ poukazuje zejména na silné vazby mezi organismy a rostlinami, které se proti býložravému okusu brání nepřímo produkcí těkavých obranných látek lákajících karnivory (HIPVs – herbivore-induced plant volatiles); např.: Dicke et al. 2009, Mäntylä et al. 2014. Použitím těchto látek jako vodítek jsou bezobratlí predátoři a parazitoidi (Farag and Paré 2002, Heil and Bueno 2007) schopní detekovat rostliny ničené býložravým okusem, což zvyšuje jejich šanci najít momentálně se živící hmyz.



Obr. 0.1: Časová osa dokumentující milníky výzkumů zabývajících se interakcí organismů a HIP-VOC (Herbivore-Induced Plant – Volatile Organic Compounds). Interakce s: dalšími rostlinami (Baldwin and Schultz 1983, Rhoades 1983), dravými roztoči (Dicke et al. 1988), parazitickými vosami (Turlings et al. 1990), dravými brouky (Drukker et al. 1995), dravými sluněčky (Ninkovic et al. 2001), býložravými můrami (Turlings et al. 1990, De Moraes et al. 2001), hlísticemi (Rasmann et al. 2005), parazitickými rostlinami (Runyon et al. 2006), systémovými částmi té samé rostliny (Karban et al. 2006) a s ptáky (Mäntylä et al. 2008a). Upraveno podle Heila (2014).

Několik nedávných studií vzniklých po roce 2008 naznačuje, že nejenom bezobratlí predátoři a parazitoidi (např.: Turlings et al. 1990, Price et al. 2011), ale také hmyzožraví ptáci mohou reagovat na obranné látky vylučované rostlinou (např.: Mäntylä et al. 2004, Mäntylä et al. 2008a, Amo et al. 2013, Koski et al. 2015; Obr. 0.1). Všechny existující studie prokázaly, že VOC vylučované kontrolními a pokusnými stromy se liší kvalitou a množstvím (Tab. 0.1). Ptáci byli schopni rozlišit stromy s okusem (jak přirozeným, tak chemicky simulovaným) a bez okusu v 55 % existujících studií. Pokusy s živými housenkami v přírodních podmínkách prokázaly pozitivní reakci predátorů vůči býložravému okusu v obou případech (Mäntylä et al. 2008a, Mäntylä et al.

2014). Naopak pokusy s chemicky simulovaným okusem v přírodě pozitivní reakci neprokázaly (Mäntylä et al. 2014, Koski et al. 2015). V klecích bylo provedeno sedm pokusů, z nichž byl v šesti případech využíván pravý býložravý okus a ve dvou z nich nebyla prokázána pozitivní reakce. Jediný klecový pokus s chemicky simulovaným býložravým okusem byl neúspěšný (Koski et al. 2015). V souhrnu lze říci, že v pokusech využívajících živé housenky (N = 8) k vytvoření býložravého okusu u ptáků se téměř vždy (N = 6) povedlo prokázat přitažlivost k takto upravenému listoví. Tři pokusy s chemicky indukovaným (Mäntylä et al. 2014) či simulovaným býložravým okusem (Koski et al. 2015) nevedly ke změně chování ptáků.

Z níže uvedené tabulky (Tab. 0.1) je mimo jiné patrné, že pokusy s chemicky simulovaným býložravým okusem jsou teprve v počátcích. Autoři využívali dva rozdílné mechanismy. Koski et al. (2015) se snažili přímo ovlivnit chování ptáků namíchanou směsí volatilních látek, která se podobá směsi vylučované při býložravém okusu. Mäntylä et al. (2014) se snažili indukovat vlastní produkci obranných VOC přímo rostlinou za pomoci jediné látky. Teprve poté sledovali chování ptáků a kvalitu a množství vylučovaných indukovaných volatilních látek.

Produkce obranných látek vylučovaných rostlinou je částečně zprostředkovaná signální dráhou kyseliny jasmonové (Thaler et al. 1996, Thaler 1999). Proto je možné předpokládat, že MeJA (metyl-jasmonát neboli metyl ester kyseliny jasmonové) může indukovat produkci těkavých látek podobné těm, které jsou vylučovány v případě napadení rostliny býložravým hmyzem. Produkce takto indukovaných rostlinných VOC byla doposud studována zejména na rostlinách pěstovaných v laboratorních podmínkách (např.: Kimmerer and Kozlowski 1982). Jen velmi málo studií zkoumalo tyto látky vylučované některými vegetativními částmi rostlin rostoucích volně v přírodě (Kessler and Baldwin 2001, Mäntylä et al. 2008a, Kigathi et al. 2009). Ještě méně studií popisuje efekty aplikace MeJA na rostliny v přírodě (Zhang et al. 2009, Schiebe et al. 2012).

Tabulka 0.1: Shrnutí tematických prací.

Autor	Rok	Pokusy v		Býložravý okus		Reakce		Odlišné VOC	
		kleci	přírodě	housenkami	simulovaný	neg.	poz.	ano	ne
Mäntylä	2004	1	0	1	0	0	1	NA	
Mäntylä	2008a	0	1	1	0	0	1	1	0
Mäntylä	2008b	1	0	1	0	0	1*	NA	
Mäntylä	2014	0	1	0	1M	1	0	1	0
Mäntylä	2014	0	1	1	0	0	1ns	1	0
Mäntylä	2016	1	0	1	0	0	1	1	0
Koski	2015	1	0	0	1J	1	0	1	0
Koski	2015	0	1	0	1J	1	0	1	0
Koski	2015	1	0	1	0	1	0	1	0
Amo	2013	1	0	1	0	0	1	1	0
Amo	2016	1	0	1	0	1	0	NA	

*Pozitivní reakce jen na stromech pocházejících z velkých fragmentů lesa. Ns = nesignifikantní výsledky. NA = měření nebylo provedeno. M = VOC indukované pomocí MeJA. J = aplikace látek simulující býložravý okus.

Na základě prostudované literatury jsme se rozhodli (**Kapitola I**), že provedeme pokus v přírodních podmínkách, při kterém budeme indukovat těkavé látky. Podobný pokus byl proveden pouze jednou bez pozitivní reakce predátorů. Náš pokus by měl potvrdit funkčnost „býložravého okusu“ indukovaného metyl-jasmonátem a atraktivitu takto připravených stromů pro volně žijící predátory. Doufali jsme, že potvrdíme schopnost MeJA nastartovat produkci VOC, které jsou za normálních podmínek vylučované rostlinami při býložravém okusu (Zhang et al. 2009) a které zvýší zájem predátorů o naše pokusné stromy. S ohledem na existující studie jsme očekávali, že MeJA spustí chemickou reakci, která bude mít za příčinu vylučování například α -pinenu. Ten je jedním z možných lákadel pro bezobratlé (Zhang et al. 2009) a ptáci (Mäntylä et al. 2014) predátory hledající potravu.

Ani studie zabývající se „pravým“ býložravým okusem prozatím jednoznačně neprokázaly, že právě okusované rostliny jsou pro ptáky atraktivní. Zkoumat tritrofický systém v přírodních podmínkách je velmi složité, ne však zcela nemožné. Největším problémem je synchronizace všech zkoumaných subjektů (např. dostupnost býložravého hmyzu, aktivní růst rostlin, přítomnost predátorů) v systému a načasování pokusů vzhledem k počasí. Velkou nevýhodou je pak obtížnost (či nemožnost) jednoznačně oddělit vizuální a chemické signály

vylučované rostlinami. Atraktivitou v přírodě rostoucích rostlin napadených býložravým hmyzem pro ptáky zkoumala zatím pouze Mäntylä (2004). Další autoři prováděli pokusy s odchycenými ptáky v pokusných klecích (Tab. 0.1). Zbavili se tak problému s načasováním a synchronizací. Pokusy s odchycenými divokými zvířaty však přinesly jiné komplikace. Autoři klecových pokusů používali rozdílně adaptované ptáky. Zatímco Amo et al. (2016) a Koski et al. (2015) pracovali s naivními jedinci (a pozorovali jejich nulové či negativní reakce vůči býložravému okusu), Amo et al. (2013) se zaměřili na mladé ptáky, kteří byli po vylíhnutí vybráni z hnízda a poté rok adaptováni v chovech (a pozorovali jejich pozitivní reakce na býložravý okus).

S ohledem na zkušenosti našich kolegů, výhody a nevýhody pokusů v přírodě a v kleci, jsme se dále rozhodli pro klecový pokus (**Kapitola II**). Ten nám kromě možnosti oddělení vizuálního a chemického signálu umožňuje znát druh, individualitu a případně i pohlaví ptáků. To by bylo v přírodních podmínkách sice také možné, ale jen s použitím velkého množství fotopastí nebo kontinuálně běžících kamer. Předpokládali jsme, že klecové pokusy nám umožní jasně identifikovat, jestli u ptáků převažují pozitivní reakce na vizuální či chemické signály (Amo et al. 2013). Doufali jsme, že ověříme, zda různé druhy hmyzožravých ptáků reagují na signály stejně, či jestli se jejich reakce liší. Předěšlé studie ukázaly, že pohlaví jedinců může mít vliv na jejich potravní chování (Lewis et al. 2002, ale Koski et al. 2015). Klecové pokusy dále umožňují přesně kontrolovat identitu a stav pokusných keřů a zaručit, že za okus je opravdu zodpovědný pouze pokusný býložravý hmyz. To je důležité, protože různý hmyz může na stejných (Leitner et al. 2005) nebo různých druzích rostlin (Paré and Tumlinson 1999, Mäntylä et al. 2014) spouštět různé chemické reakce. Klecové pokusy v neposlední řadě umožňují i lepší kontrolu klimatických podmínek, které mají významný vliv na vylučování VOC (Holopainen and Gershenzon 2010, Mäntylä et al. 2014).

Cíle práce

- Zjistit, zda lze chemicky indukovat produkci VOC
- Zjistit, zda jsou chemicky indukované VOC atraktivní pro ptáky či jiné predátory hledající potravu
- Pokusit se vysvětlit, které VOC jsou zodpovědné za případnou změnu chování predátorů, zejména ptáků

- Zjistit, který z podnětů (čichový či zrakový) indukovaný býložravým hmyzem ptáci využívají při hledání potravy
- Porovnat reakce různých druhů ptáků na VOC

Použitá literatura

- Amo, L., J. J. Jansen, N. M. van Dam, M. Dicke, and M. E. Visser. 2013. Birds exploit herbivore-induced plant volatiles to locate herbivorous prey. *Ecology Letters* **16**: 1348-1355.
- Baldwin, I. and J. C. Schultz. 1983. Talking trees. *Science* **221**: 277-279.
- De Moraes, C. M., M. C. Mescher, and J. H. Tumlinson. 2001. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. *Nature* **410**: 577-580.
- Dicke, M., M. W. Sabelis, and M. de Jong. 1988. Analysis of prey preference in phytoseiid mites by using an olfactometer, predation models and electrophoresis. *Experimental & applied acarology* **5**: 225-241.
- Dicke, M., J. J. van Loon, and R. Soler. 2009. Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple attack. *Nature Chemical Biology* **5**: 317-324.
- Drukker, B., P. Scutareanu, and M. Sabelis. 1995. Do anthocorid predators respond to synomones from *Psylla*-infested pear trees under field conditions? *Entomologia Experimentalis et Applicata* **77**: 193-203.
- Farag, M. A. and P. W. Paré. 2002. C 6-Green leaf volatiles trigger local and systemic VOC emissions in tomato. *Phytochemistry* **61**: 545-554.
- Heil, M. 2014. Herbivore-induced plant volatiles: targets, perception and unanswered questions. *New Phytologist* **204**: 297-306.
- Heil, M. and J. C. S. Bueno. 2007. Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 5467-5472.
- Holopainen, J. K. and J. Gershenzon. 2010. Multiple stress factors and the emission of plant VOCs. *Trends in Plant Science* **15**: 176-184.
- Karban, R., K. Shiojiri, M. Huntzinger, and A. C. McCall. 2006. Damage-induced resistance in sagebrush: volatiles are key to intra-and interplant communication. *Ecology* **87**: 922-930.
- Kessler, A. and I. T. Baldwin. 2001. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* **291**: 2141-2144.
- Kigathi, R. N., S. B. Unsicker, M. Reichelt, J. Kesselmeier, J. Gershenzon, and W. W. Weisser. 2009. Emission of volatile organic compounds after herbivory from *Trifolium pratense* (L.) under laboratory and field conditions. *Journal of Chemical Ecology* **35**: 1335-1348.

- Kimmerer, T. W. and T. T. Kozlowski. 1982. Ethylene, ethane, acetaldehyde, and ethanol production by plants under stress. *Plant Physiology* **69**: 840-847.
- Koski, T. M., T. Laaksonen, E. Mäntylä, S. Ruuskanen, T. Li, P. S. Girón-Calva, L. Huttunen, J. D. Blande, J. K. Holopainen, and T. Klemola. 2015. Do insectivorous birds use volatile organic compounds from plants as olfactory foraging cues? Three experimental tests. *Ethology* **121**: 1131-1144.
- Leitner, M., W. Boland, and A. Mithöfer. 2005. Direct and indirect defences induced by piercing-sucking and chewing herbivores in *Medicago truncatula*. *New Phytologist* **167**: 597-606.
- Lewis, S., S. Benvenuti, L. Dall–Antonia, R. Griffiths, L. Money, T. Sherratt, S. Wanless, and K. Hamer. 2002. Sex-specific foraging behaviour in a monomorphic seabird. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **269**: 1687-1693.
- Mäntylä, E., G. A. Alessio, J. D. Blande, J. Heijari, J. K. Holopainen, T. Laaksonen, P. Piirtola, and T. Klemola. 2008a. From plants to birds: higher avian predation rates in trees responding to insect herbivory. *PLoS One* **3**: e2832.
- Mäntylä, E., T. Klemola, P. Sirkiä, and T. Laaksonen. 2008b. Low light reflectance may explain the attraction of birds to defoliated trees. *Behavioral Ecology* **19**: 325-330.
- Mäntylä, E., J. D. Blande, and T. Klemola. 2014. Does application of methyl jasmonate to birch mimic herbivory and attract insectivorous birds in nature? *Arthropod-Plant Interactions* **8**: 143-153.
- Mäntylä, E., S. Kleier, S. Kipper, and M. Hilker. 2016. The attraction of insectivorous tit species to herbivore-damaged Scots pines. *Journal of Ornithology* **157**: 1-13.
- Mäntylä, E., T. Klemola, and E. Haukioja. 2004. Attraction of willow warblers to sawfly-damaged mountain birches: novel function of inducible plant defences? *Ecology Letters* **7**: 915-918.
- Marquis, R. J. and C. Whelan. 1996. Plant morphology and recruitment of the third trophic level: subtle and little-recognized defenses? *Oikos*: 330-334.
- Ninkovic, V., S. Al Abassi, and J. Pettersson. 2001. The influence of aphid-induced plant volatiles on ladybird beetle searching behavior. *Biological Control* **21**: 191-195.
- Oksanen, L. and T. Oksanen. 2000. The logic and realism of the hypothesis of exploitation ecosystems. *The American Naturalist* **155**: 703-723.

- Paré, P. W. and J. H. Tumlinson. 1999. Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant physiology* **121**: 325-332.
- Persson, L. 2005. *Trophic cascades*. eLS. Willey.
- Price, P. W., R. F. Denno, M. D. Eubanks, D. L. Finke, and I. Kaplan. 2011. *Insect ecology: behavior, populations and communities*. Cambridge University Press: 801 pp.
- Rasmann, S., T. G. Köllner, J. Degenhardt, I. Hiltbold, S. Toepfer, U. Kuhlmann, J. Gershenzon, and T. C. Turlings. 2005. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature* **434**: 732-737.
- Rhoades, D. 1983. *Herbivore population dynamics and plant chemistry*. Academic Press, New York. pp. 155.
- Runyon, J. B., M. C. Mescher, and C. M. De Moraes. 2006. Volatile chemical cues guide host location and host selection by parasitic plants. *Science* **313**: 1964-1967.
- Schiebe, C., A. Hammerbacher, G. Birgersson, J. Witzell, P. E. Brodelius, J. Gershenzon, B. S. Hansson, P. Krokene, and F. Schlyter. 2012. Inducibility of chemical defenses in Norway spruce bark is correlated with unsuccessful mass attacks by the spruce bark beetle. *Oecologia* **170**: 183-198.
- Thaler, J. S. 1999. Jasmonate-inducible plant defences cause increased parasitism of herbivores. *Nature* **399**: 686-688.
- Thaler, J. S., M. J. Stout, R. Karban, and S. S. Duffey. 1996. Exogenous jasmonates simulate insect wounding in tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in the laboratory and field. *Journal of Chemical Ecology* **22**: 1767-1781.
- Turlings, T. C., J. H. Tumlinson, and W. J. Lewis. 1990. Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science* **250**: 1251-1253.
- Zhang, Y., Y. Xie, J. Xue, G. Peng, and X. Wang. 2009. Effect of volatile emissions, especially α -pinene, from persimmon trees infested by japanese wax scales or treated with methyl jasmonate on recruitment of ladybeetle predators. *Environmental entomology* **38**: 1439-1445.

Kapitola I

Aplikace metyl-jasmonátu na vrby šedé (*Salix cinerea*) zvyšuje jejich atraktivitu pro hmyzožravé ptáky

Abstrakt

Olfaktorie je u ptáků hojně studována od začátku druhé poloviny 20. století. Teprve nedávné pokusy ale ukázaly, že ptáci využívají čich více, než se předpokládalo. Několik současných studií přineslo více či méně přesvědčivé důkazy o tom, že ptáci mohou detekovat těkavé látky vylučované listy rostlin, které jsou napadeny býložravým hmyzem. Naším cílem proto bylo studovat schopnosti běžných evropských hmyzožravých ptáků detekovat těkavé látky vylučované listy po napadení hmyzem (HIPV - herbivore-induced plant volatiles) při hledání potravy. Během pokusu jsme indukovali vylučování látek (VOC – volatiles organic compounds), které jsou podobné těm produkované při býložravém okusu postřikem metyl-jasmonátu (MeJA) na listy vrby šedé (*Salix cinerea*). Atraktivitu takto upravených a neupravených kontrolních keřů pro predátory býložravého hmyzu jsme studovali pomocí plastelínových housenek. Plastelínové housenky sloužily jako návnada, do které se viditelně vtiskne negativ skusu predátora. Podařilo se nám zjistit, že (1) postřik MeJA indukuje ve vrbách šedých syntézu obranných chemických látek, a že (2) ptáci napadají častěji housenky vystavené na pokusných keřích ošetřených MeJA v porovnání s housenkami vystavenými na keřích kontrolních.

Úvod

Čich ptáků se stal kontroverzním tématem již v 60. letech 20. století, kdy se vědci snažili zjistit, na kolik důležitou roli v životě ptáků hraje. Kromě již více než 40 let zkoumané otázky orientace migrujících ptáků při letu (Gagliardo 2013) a dalších otázek zabývajících se olfaktorii v kontextu sociálního života ptáků (např.: Guilford et al. 1987, Amo et al. 2011), se až relativně nedávno začala zkoumat i schopnost ptačí orientace při hledání potravy (např.: Verheyden and Jouventin 1994, Nevitt et al. 1995, Amo et al. 2013b). Asi nejzajímavější otázkou současnosti je to, zda mohou být ptačí součástí hypotézy „crying for help“. Tato hypotéza je založená na faktu, že rostliny při napadení býložravým hmyzem začnou vylučovat chemické obranné látky. Dobře popsáný je fenomén, kdy jsou parazitoidi a bezobratlí predátoři býložravého hmyzu tyto látky schopni zachytit (např.: Turlings et al. 1990, Price et al. 2011). O testování této hypotézy u ptáků se poprvé pokusila Mäntylä et al. (2008a), přičemž její výsledky naznačují, že zkoumaní ptačí mohou být opravdu schopni zachytit obranné látky vylučované rostlinou a použít je jako vodítko k nalezení potravy.

Komplexnost směsí volatilních látek vylučovaných rostlinami a složitost zkoumání tritrofických systémů, kdy je potřeba při pokusech synchronizovat všechny tři trofické stupně a kontrolovat vnější pokusné podmínky (např. počasí), dala vzniknout myšlence simulace či indukce produkce látek, které jsou za normálních podmínek vylučovány rostlinou při býložravému okusu. Principem simulace VOC je nanášení laboratorně syntetizovaných těkavých organických látek na rostlinu jednotlivě nebo ve směsích. Simulace VOC byla doposud prováděna hlavně v laboratořích, kde se zkoumala jejich produkce (Engelberth et al. 2004) nebo využitelnost při komunikaci mezi jednotlivými rostlinami (Arimura et al. 2000). Jediný pokus zabývající se simulací VOC, jejich nanášením v různých kombinacích na rostliny a studováním reakcí ptáků vůči těmto směsím a jednotlivým látkám provedla Koski a její tým (2015).

Indukce VOC přímo v rostlině je další možností, jak lze kontrolovaně spustit produkci specifických VOC v laboratorních, ale i terénních podmínkách. Kromě možnosti simulovat býložravý okus mechanicky (např.: Turlings et al. 1990, Turlings and Tumlinson 1992, Sam et al. 2015a), existuje také chemická indukce, která vede ke spuštění produkce VOC. Zatímco u mechanické indukce je stále nejasné, jestli vyvolává reakci celostní nebo lokální (Turlings et al. 1995), chemická indukce často vyvolává reakci v celé rostlině (Mäntylä et al. 2014). Produkce

obraných látek vylučovaných rostlinou je alespoň částečně zprostředkovaná signální dráhou kyseliny jasmonové (Thaler et al. 1996, Thaler 1999). Metyl-jasmonát (MeJA) je organická těkavá látka, rostlinný hormon, syntetizovaný rostlinou po napadení patogeny nebo býložravým hmyzem (Cheong and Do Choi 2003, Xu et al. 2003). Můžeme tedy předpokládat, že MeJA může indukovat těkavé látky podobné těm vylučovaným v případě napadení rostliny býložravým hmyzem. Produkce takto (metyl-jasmonátem) indukovaných rostlinných VOC a jejich atraktivita pro predátory byla doposud úspěšně prováděna a testována zejména v laboratorních podmínkách (např.: Kimmerer and Kozlowski 1982, Hopke et al. 1994, Degenhardt and Lincoln 2006). Podobné pokusy mimo laboratoř jsou vzácné (Zhang et al. 2009).

Pouze jediná práce se zabývala schopností ptáků zachytit VOC indukované pomocí MeJA (Mäntylä et al. 2014). Výsledky této studie neprokázaly pozitivní reakci ptáků vůči MeJA indukovaným volatilním látkám při hledání potravy na pokusných (ošetřených MeJA) a kontrolních (bez ošetření) stromech (Mäntylä et al. 2014). Nicméně stejná studie potvrdila, že produkce některých VOC běžně vylučovaných rostlinou při býložravém okusu může být úspěšně indukována právě pomocí MeJA.

Vzhledem k tomu, že je známo, že (1) ptáci aktivně využívají VOC k orientaci při hledání potravy (Amo et al. 2013a), (2) MeJA může být úspěšně použita k indukování VOC, (3) doposud existuje pouze jediný pokus testující reakci ptáků na rostliny ošetřené MeJA (Mäntylä et al. 2014), rozhodli jsme se provést podobný pokus a přispět tak k objasnění tohoto problému. K pokusu jsme si vybrali jiný rostlinný druh (vrbu šedou - *Salix cinerea*), než ten, který byl použit v pokusech předešlých, protože rostlinné druhy se mohou svou reakcí na MeJA lišit (Hopke et al. 1994, Thaler et al. 1996, Degenhardt and Lincoln 2006). U vrb rodu *Salix* bylo již dříve zjištěno, že aplikace kyseliny salicylové a jasmonové zvyšuje jejich schopnost bránit se proti bejlomorkovitým (*Cecidomyiidae*) (Ollerstam and Larsson 2003).

Předpokládali jsme, že potvrdíme, že MeJA dokáže indukovat produkci VOC podobných těm, které jsou zpravidla vylučovány rostlinami při herbivorním okusu a které zvýší zájem predátorů o naše pokusné stromy. S ohledem na existující studie jsme očekávali, že MeJA spustí chemickou reakci, která bude mít za příčinu uvolňování například α -pinenu. Ten je s největší pravděpodobností opravdu jedním z lákadel pro bezobratlé (Zhang et al. 2009) a ptačí (Mäntylä et al. 2014) predátory hledající potravu.

Materiál a metody

Pokusná plocha a druhy stromů

Pokus jsme prováděli v bývalém vojenském prostoru („tankáč“) při SSZ okraji Českých Budějovic [48.9921039N, 14.4445700E] na ploše o rozloze přibližně 12 ha. Jako pokusnou rostlinu jsme zvolili místně hojnou vrbu šedou (*Salix cinerea*). Ta představuje dominantní porost vojenského prostoru a byla již v minulosti hojně studována našimi kolegy (Volf et al. 2015a, Volf et al. 2015b). Právě pro tento druh jsme tedy měli k dispozici seznam těkavých látek, jejichž produkce je potenciálně spouštěna býložravým hmyzem během okusu. V pokusu jsme použili celkem 24 individuálních (12 pokusných a 12 kontrolních) keřů.

Vrby šedé tvoří na zmíněné lokalitě křovinaté (polykormické) formace tzv. genety. Geneta tvoří jediné geneticky totožné individuum, které se skládá z individuálních jednotek tzv. ramet. My jsme z každého vybraného keře použili pro pokus jednu rametu. Pokusné keře (tedy i vybrané ramety) byly od sebe vzdálené nejméně 50 metrů. Vzhledem k tomu, že býložravým hmyzem indukované těkavé látky se šíří zpravidla do okolí 1,5 - 8 m (Braasch and Kaplan 2012), jsme mohli považovat jednotlivé ramety za statisticky nezávislé. Jednotlivé keře dorůstaly maximální výšky 4 metrů. My jsme ale pracovali s rametami dosahujícími výšky přibližně 1,5 až 2,5 m. Vybrané keře neměly neobvykle nápadné, pro náš experiment důležité známky býložravého okusu ani jiné deformace listoví signalizující probíhající napadení hmyzem či patogeny.

Seznam běžně se vyskytujících ptáků oblasti

Ve studované oblasti se během roku vyskytuje 63 druhů ptáků (z řádů brodiví, dlouhokřídlí, hrabaví, měkkozobí, pěvci, potápky, sovy, svišťouni, šplhavci a vrubozobí). Pouze 45 druhů z nich je hmyzožravých. Z těchto se 25 druhů může s ohledem na jejich potravní strategii stát potenciálními predátory býložravého hmyzu (Tab. 1.1; Sčítání ptáků Českých Budějovic, J. Havlíček nepublikováno).

Tabulka 1.1: Seznam hmyzožravých ptáků ve studované oblasti. Hvězdičkou (*) jsou označeni potenciální predátoři býložravého hmyzu s ohledem na jejich potravní ekologii. Seznam je řazen abecedně.

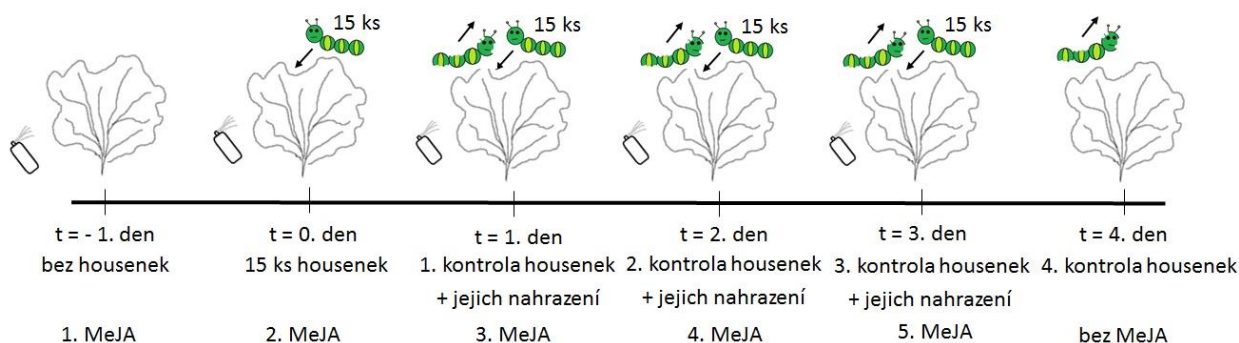
brhlík lesní*	lejsek šedý*	slavík modráček*	šoupálek dlouhoprstý
budníček menší*	mlynařík dlouhoocasý*	slavík obecný*	šoupálek krátkoprstý
budníček větší*	pěnice černohlavá*	sojka obecná*	špaček obecný*
cvrčilka říční	pěnice hnědokřídla*	straka obecná*	vlašťovka obecná
cvrčilka zelená	pěnice pokřovní*	strakapoud malý	vrabec domácí
červenka obecná	pěnkava obecná*	strakapoud velký	vrabec polní
drozd brávník*	rákosník obecný*	strnad obecný	zvonek zelený
drozd kvíčala*	rehek domácí*	strnad rákosní	žluna šedá
drozd zpěvný	rehek zahradní*	sýkora babka*	žluna zelená
konipas bílý*	rorýs obecný	sýkora koňadra*	žluva hajní*
kos černý	sedmihlásek hajní*	sýkora modřínka*	

Uspořádání pokusu

Podél přibližně 2 km dlouhého transektu jsme nejdříve vybrali 24 keřů vrb šedých. Každý lichý keř jsme fáborkem označili jako keř pokusný a každý sudý jako keř kontrolní. Pokusné keře jsme opakovaně a rovnoměrně stříkali 25 ml vodného roztoku 30 mM MeJA. Roztok MeJA jsme připravili z 95% metyl-jasmonátu (Sigma Aldrich J2500 MeJA) a destilované vody (Mäntylä et al. 2014). Ramety keřů, na které jsme aplikovali MeJA, byly vybírány tak náhodně, jak jen to jejich prostorové uspořádání dovolilo. Poprvé jsme aplikovali MeJA na pokusné stromy 19. července 2016, tj. 24 hodin před začátkem vlastních pokusů a měření. Poté jsme stříkali pokusné stromy vždy stejnou dávkou roztoku MeJA o stejné koncentraci každých 24 hodin (Obr. 1.1). Kontrolní keře stříkané nikdy nebyly.

Abychom zachytili atraktivitu jednotlivých keřů pro predátory hledající býložravý hmyz, umístili jsme 20. července 2016 na listy každého pokusného i kontrolního keře 15 plastelínových housenek (tj. dohromady 360 housenek). Plastelínové housenky jsme vyrobili ze světlezelené modelíny (Koh-I-Noor Hardtmuth, České Budějovice, Česká republika). Plastelínu jsme protlačovali injekční stříkačkou, abychom zajistili její zcela hladký povrch (Howe et al. 2009). Do něj se případně otiskl negativ skusu predátora, který jsme později vyhodnotili (Obr. P1 v Přílohách). Housenky měly v průměru 3 mm a byly 2 cm dlouhé. Připomínaly tak některé z nechráněných druhů housenek běžně se vyskytujících na vrbách ve střední Evropě (např.: bělokřídlec vrbový - *Cabera exanthemata*, šedokřídlec vrbový - *Epirrita autumnata*, píďalka

podzimní - *Operophtera brumata*). Tato metoda byla úspěšně použita v několika předešlých studiích (např.: Posa et al. 2007, Sam et al. 2015a).



Obr. 1.1: Schematicky nakreslený průběh a uspořádání pokusu v rámci jednoho pokusného keře, kterých jsme využili celkem 12.

Jímání těkavých látek

Abychom zjistili jaké, a jak rozdílné látky vylučovaly v našem pokusu kontrolní a pokusné keře vrb, provedli jsme analýzu těkavých látek vylučovaných listovím. Těkavé látky jsme jímali na jednotlivých keřích v průběhu čtyř dnů (24. – 27. července 2016). Používali jsme vakuové pumpy (Spectrex, PAS-500, Redwood City, California, USA; s průtokem vzduchu 200 ml/min), silikonové přívodní trubičky a vlastní sběrné skleněné trubičky, které obsahovaly 150 mg Tenaxu TA absorbent (Supelco, mesh 60/80, Bellefonte, PA, USA) (Ras et al. 2009). Vybrané pokusné a kontrolní ramety jsme vsunuli do plastových (polyetylen tereftalát – PET) pytlíků na pečení (35 x 43 cm; Tesco, Polska, Kraków), které byly připevněny k větvi drátkem tak, aby kolem větve mohl proudit vzduch. Jeden z rohů pytlíku jsme ustříhli a do vzniklé dírky vložili tenaxovou trubičku nasazenou na silikonovou trubičku vedoucí k vakuové pumpě. Aby vzduch nemohl unikat kolem vložené trubičky, zajistili jsme ji parafilmem. Každý vzorek byl jímán 30 minut. Každou jímací trubičkou tedy prošlo celkem 6 litrů vzduchu. Šest litrů je množství dostatečné pro podobné analýzy, přičemž někdy je jímáno i jen poloviční množství vzduchu (Mäntylä et al. 2014). Poté byly jímací trubičky odebrány, neprodyšně uzavřeny přiloženými silikonovými krytkami a uloženy v ledničce až do vlastní analýzy na plynovém chromatografu (4°C, přibližně týden).

V rámci pokusu jsme jímali a analyzovali následující vzorky: (1) jediná aplikace MeJA, 30 min před jímáním, (2) jediná aplikace MeJA, 24 hodin před jímáním, (3) dvojí aplikace MeJA, 24 a 48 hodin před jímáním, a (4) trojí aplikace MeJA, 24, 48 a 72 hodin před jímáním. Během každého měření byly simultánně měřeny vždy dvě ramety (kontrolní a pokusná) a „slepý“ vzorek okolního vzduchu.

Chemická analýza těkavých látek na plynovém chromatografu

Vzorky volatilních sloučenin byly analyzovány pomocí plynového hmotnostního spektrometru (Hewlett-Packard GC 6890, MSD 5973; Palo Alto, CA, USA). Najímané sloučeniny byly desorbovány termální desorpční jednotkou (Perkin-Elmer ATD400 Automatic Thermal Desorption system) při teplotě 250°C po dobu deseti minut, kryofokusovány při 230°C a vstříknuty do HP-5 kapilární kolony (50 m dlouhé, 60,2 mm vnitřní průměr, Hewlett-Packard) s heliem jako nosným plynem. Kapilární kolona prošla zahřívacím programem. Nejprve byla teplota držena po dobu 1 minuty na 40°C, poté se zvýšila na 210°C rychlostí 5°C/min a následně se teplota zvyšovala po 20°C/min na konečných 250°C. Sloučeniny (mono-, homo- a seskviterpeny a další těkavé látky; tzv. green leaf volatiles – GLVs) byly identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Protože stabilita, kvalita i kvantita emisí biologického původu se mění v závislosti na světle a teplotě (Guenther et al. 1993), probíhal pokus za konstantních průměrných denních teplot (29 – 30°C). Analýzy byly provedeny na Institutu environmentálních technologií v Ostravě-Porubě pod vedením Mgr. Martiny Vráblové.

Statistické analýzy

Před začátkem analýz jsme z dat vyloučili všechny spadlé a nenalezené housenky (N = 40), u kterých jsme nemohli určit, zda byly napadené či ne. Dále jsme spočetli poměrnou část napadených housenek v rámci jednoho keře za 24 hodin. Podobně jsme připravili i poměrnou část housenek napadených jednotlivými predátory (ptáky a bezobratlými). Abychom dosáhli normálního rozdělení dat, provedli jsme arcsinovou transformaci. Efekt postřiku MeJA (aplikována/neaplikována) a pokusného dne (1-4) jsme analyzovali jako lineární model typu ANOVA, kde identita keře (1-24) byla náhodným efektem. Analýzy jsme provedli v programu R (Team 2013) s použitím funkce *aov*. Funkci *glht* z knihovny *multcomp* (Horthorn et al. 2008) jsme použili pro spočítání Tukey post-hoc testů. V grafech jsme vykreslili procento predovaných housenek.

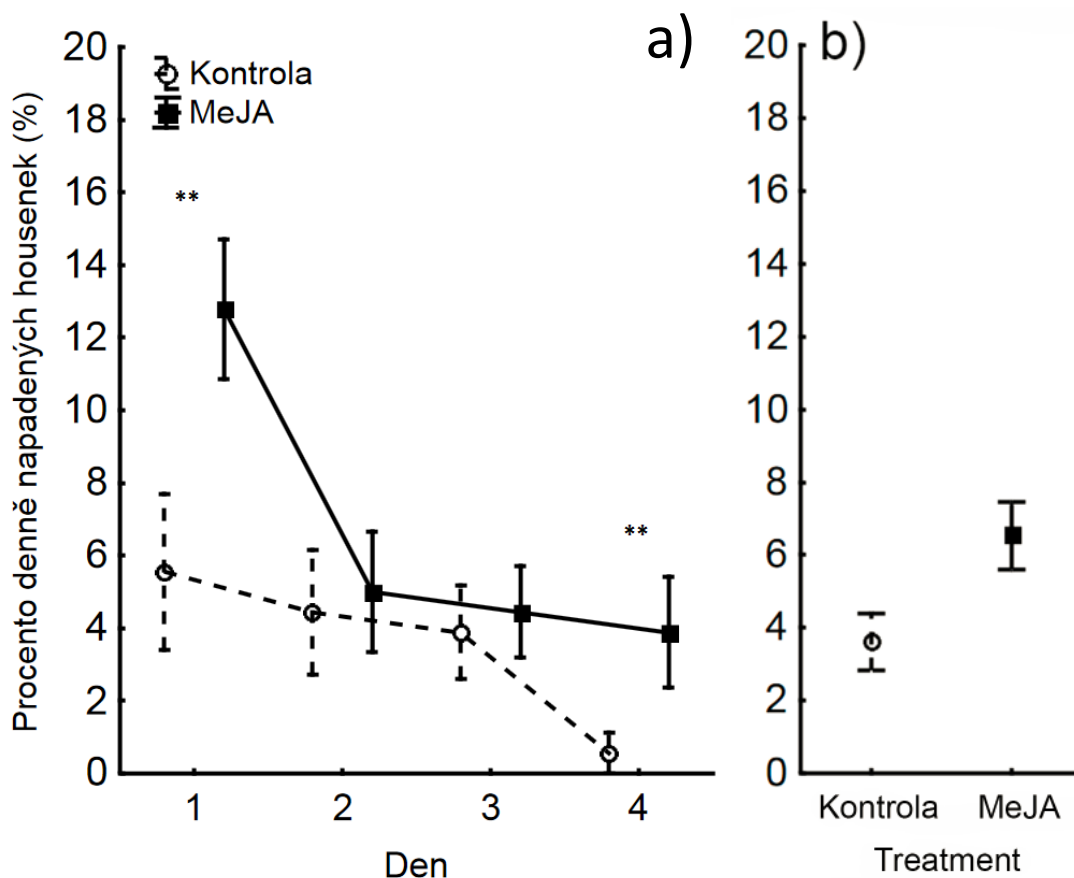
Pro analýzu vztahů mezi jednotlivými těkavými látkami a predací na plastelínových housenkách jsme použili Spearman's Rank korelaci (počítanou ručně). Nestandardizované abundance těkavých látek jsme korelovali s počtem housenek napadených v době těsně následující po měření těkavých látek. Například, hodnoty těkavých látek naměřených půl hodiny po první aplikaci MeJA jsme vztahovali k predaci během 24 hodin po tomto postřiku atd. Obrázky s korelací mezi predací a VOC byly nakresleny pomocí funkce *error crosses* z balíčku a knihovny *psych* (Revelle 2014) v programu R (Team 2013). Pro porovnání chemických látek v pokusných a kontrolních keřích jsme použili Kruskal-Wallis test a funkci *kruskal.test* v základním prostředí programu R (Team 2013).

Výsledky

Denně jsme na pokusné a kontrolní stromy vystavili celkem 360 plastelínových housenek. Čtyřdenní pokus tak ve výsledku akumuloval 1440 housenko-dnů, během kterých jsme identifikovali 74 (5,14 %) napadení. Nebyli jsme schopni dohledat 40 housenek (2,78 %; 14 z kontrolních a 26 z pokusných stromů), které z listů zcela zmizely a nebylo tak možné určit jejich stav. Procento napadených housenek vystavených na jednotlivých pokusných keřích se simulovaným okusem bylo v průměru vyšší ($8,10 \pm 1,3$ % denně) než procento napadených housenek vystavených na keřích kontrolních ($4,28 \pm 0,9$ % denně). Přítomnost simulovaného býložravého okusu (tj. kontrola vs. simulovaný okus) a den (1 – 4) měly signifikantní vliv na míru predace na plastelínových housenkách (Tab. 1.2). V čase se změna míry predace mezi kontrolními a pokusnými keři signifikantně nelišila (Tab. 1.2). V rámci jednotlivých pokusných dnů byl však počet napadených housenek signifikantně vyšší na stromech se simulovaným okusem pouze během prvního a posledního dne pokusu (Obr. 1.2).

Tabulka 1.2: Faktory a jejich interakce ovlivňující míru predace. Výsledky lineárního modelu typu ANOVA, kde rozdíly mezi jednotlivými keři byly náhodným efektem. Treatment = kontrolní keře vs. pokusné keře ošetřené MeJA, den = 1 – 4.

	Dfs	F	P
Treatment	1;22	8,43	0,008
Den	3;66	6,16	<0,001
Den x Treatment	3;66	1,78	0,159

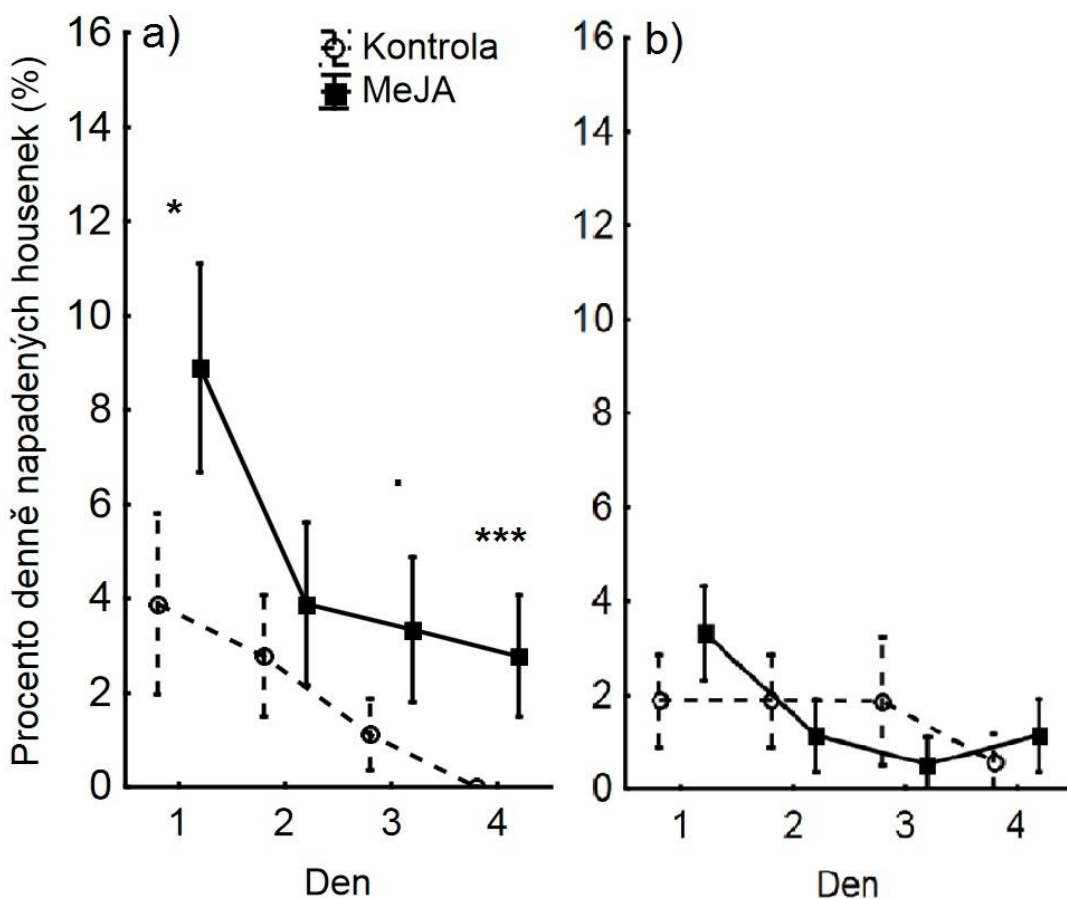


Obr. 1.2: Pravděpodobnost útoku (průměr ± S.E.) na plastelínové housenky na rozdílně upravených keřích vrby šedé (a) v čase a (b) celkově. Den 1 (v části a) = 24 hodin po první aplikaci metyl-jasmonátu (MeJA), den 2 = 48 hodin pokusu a 2 aplikace MeJA, den 3 = 72 hodin pokusu a 3 aplikace MeJA, den 4 = 96 hodin pokusu a 4 aplikace MeJA. Treatment (v části b): Kontrola = kontrolní keř, MeJA = pokusný keř; Výsledky post-hoc Tukey testu v rámci jednotlivých dnů: ** $P \leq 0,01$.

Většinu všech zaznamenaných útoků na housenky ($N = 74$) měli na svědomí ptáci (60 %) a bezobratlí (27 %). Devět housenek bylo ohlodáno hlemýždi nebo slimáky. Ptáci napadli 30 housenek vystavených na keřích s indukovaným okusem a pouze 14 housenek vystavených na kontrolních keřích, zatímco bezobratlí napadli pouze 9 housenek na pokusných keřích a 10 housenek na keřích kontrolních. Rozdíl mezi napadením housenek na pokusných a kontrolních keřích byl signifikantní pro ptáky, nikoli však pro bezobratlé (Tab. 1.3 a Obr. 1.3). Útoky členovců byly reprezentovány mravenci a vosami v poměru 10:9.

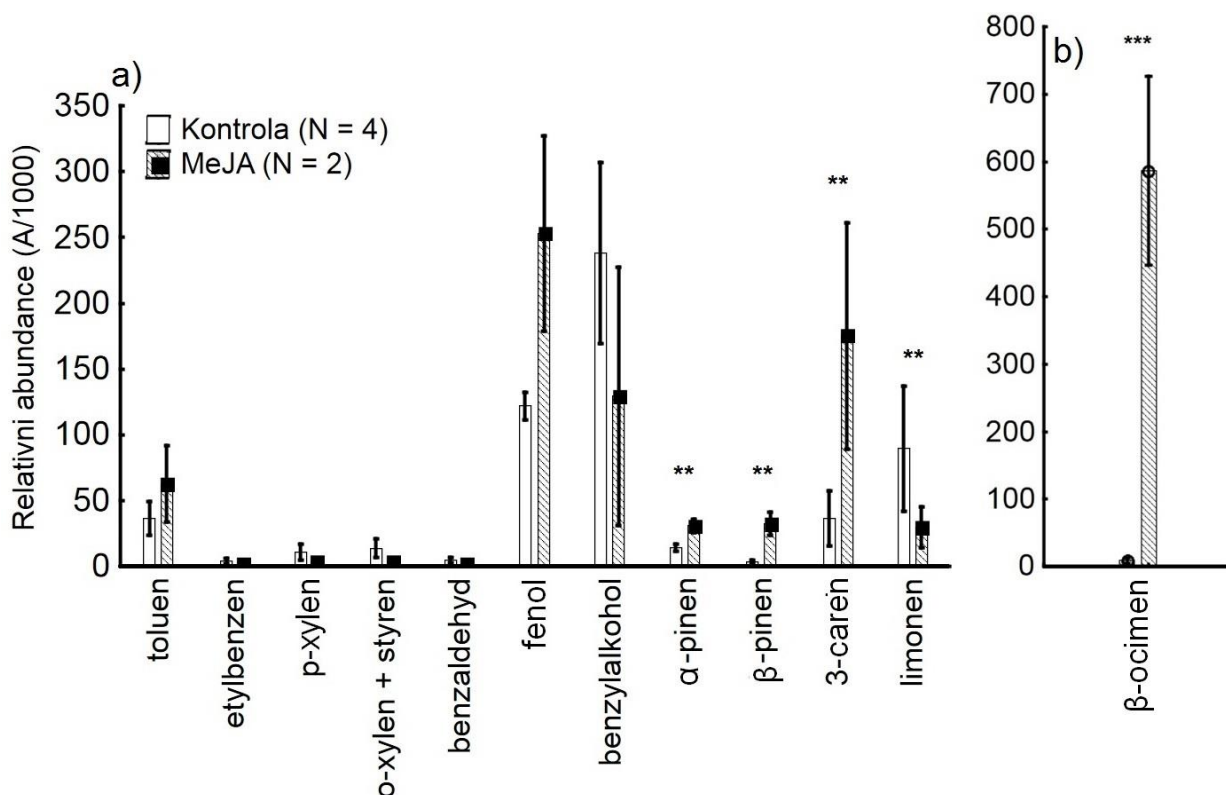
Tabulka 1.3: Faktory a jejich interakce ovlivňující míru predace jednotlivými predátory. Výsledky lineárního modelu typu ANOVA, kde rozdíly mezi jednotlivými keři byly náhodným efektem. Treatment = kontrolní keře vs. pokusné keře ošetřené MeJA.

	Ptáci			Bezobratlí		
	Dfs	<i>F</i>	<i>P</i>	Dfs	<i>F</i>	<i>P</i>
Treatment	1;22	4,95	0,037	1;22	2,27	0,608
Den	3;66	1,88	1,140	3;66	1,23	0,307
Den x Treatment	3;66	0,81	0,495	3;66	1,52	0,219



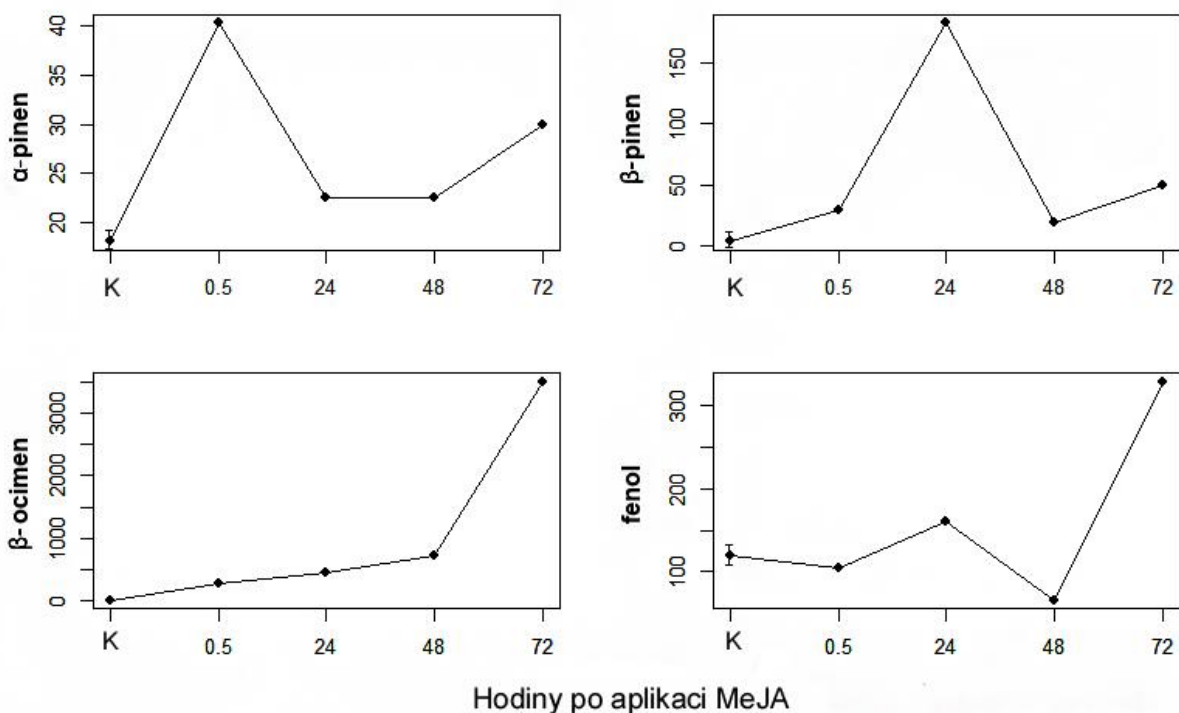
Obr. 1.3: Procento (průměr ± S.E.) plastelínových housenek napadených (na ose y) jednotlivými predátory na rozdílně upravených keřích vrby šedé za jednotlivé dny (na ose x) a) útoky reprezentované ptáky b) útoky reprezentované bezobratlými predátory; * $P = 0,058$; * $P \leq 0,05$; *** $P \leq 0,001$.

Analýza těkavých látek odhalila více než 100 sloučenin. Většina z nich se na pokusných a kontrolních keřích kvantitativně nelišila. Proto jsme se zaměřili pouze na 12 hlavních sloučenin (Obr. 1.4), které se významně lišily nejenom mezi kontrolními a pokusnými stromy, ale také v čase.



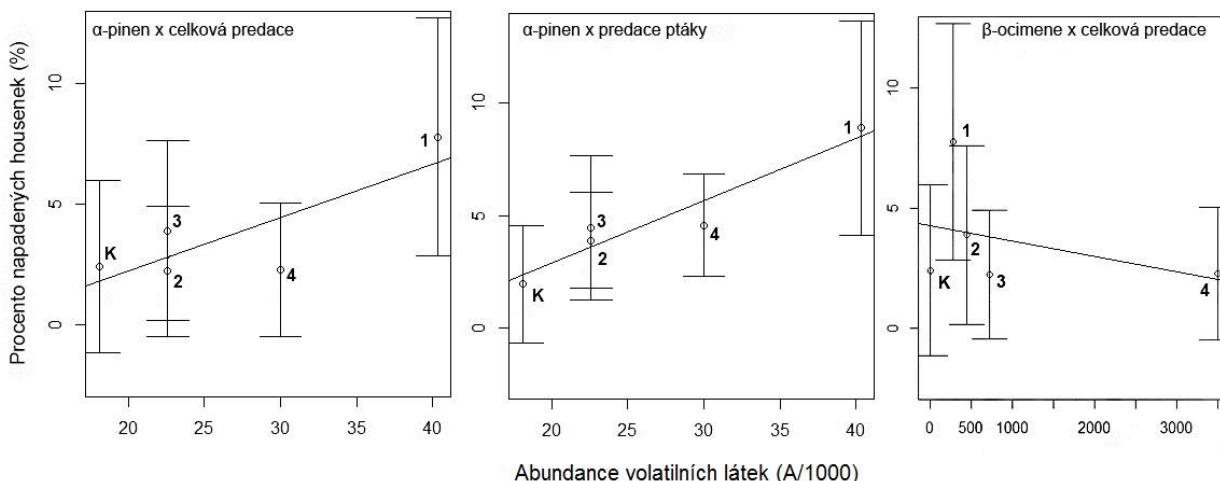
Obr. 1.4: Rozdíl mezi průměrnou (\pm S.E.) relativní abundancí (na ose y) (a) 11 nejvýznamnějších sloučenin a (b) β -ocimenu vylučovaných kontrolními a pokusnými keři ošetřenými MeJA měřených v době mezi prvním a druhým postřikem (24 – 48 hodin), tj. po jediném postřiku MeJA. Výsledky neparametrických Kruskal-Wallis testů: ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$. Všimněte si rozdílných rozsahů y-os v obou částech obrázku.

Nepovedlo se nám vysvětlit přímý vliv postřiku MeJA na vylučování jednotlivých sloučenin. Pouze produkce β -ocimenu a fenolu se postupně zvyšovala s počtem rostoucích postřiků. Také produkce α -pinenu rychle vzrostla záhy po prvním postřiku, vzápětí rychle poklesla a poté opět vzrostla (Obr. 1.5).



Obr. 1.5: Relativní změny v abundanci (abundance/1000, y-osa) těkavých látek vylučovaných kontrolními (písmeno K na x-ose) keři a keři s indukovaným okusem 30 minut po jedné aplikaci MeJA (0,5; průměr \pm S.E.), 24 hodin po jedné aplikaci MeJA, po 48 hodinách a dvou aplikacích MeJA a po 72 hodinách a třech aplikacích MeJA. Data na y-ose nejsou standardizována, a tudíž porovnatelná mezi vzorky, ale ne mezi jednotlivými sloučeninami.

Povedlo se nám prokázat signifikantní korelaci mezi produkcí α -pinenu a celkovou predací a velmi silnou signifikantní korelaci mezi produkcí α -pinenu a predací ptáků na housenkách vystavených na pokusných stromech. Korelace mezi predací a produkcí β -ocimenu, která v čase stoupala, byla silně negativní (Obr. 1.6 a Tab. 1.4).



Obr. 1.6: Pozitivní korelace mezi relativní abundancí (abundance/1000, y-osa) α -pinenu a celkovou predací a predací ptáky a negativní korelace mezi relativní abundancí β -ocimenu a celkovou predací (průměr \pm S.E.). Písmena K uvnitř obrázku představují predaci na kontrolním keři pokusu a volatilní látky naměřené na kontrolním keři v první den. Čísla 1 – 4 uvnitř obrázků představují predaci a volatilní látky zaznamenané na pokusných keřích 1. – 4. den pokusu.

Tabulka 1.4: Spearman's rank korelace množství vyloučených sloučenin a míry predace na plastelínových housenkách.

Vylučované sloučeniny	Spearman's rank korelace (r)	
	Celková predace	Predace ptáků
etylbenzen	0,40	-0,60
o-xylen + styren	0,40	-0,60
benzaldehyd	0,40	-0,60
fenol	0,20	-0,80
benzylalkohol	0,60	0,40
metyl-jasmonát	-0,60	-0,40
α -pinen	0,65	0,95
β -pinen	0,40	-0,60
3-caren	-0,40	0,60
limonen	0,35	-0,55
β -ocimen	-0,80	-0,80

Diskuze

Predátoři býložravého hmyzu preferenčně napadali plastelínové housenky, které byly vystavené na keřích ošetřených postřikem MeJA. Šedesát procent všech napadených housenek měli na svědomí ptáci, zatímco bezobratlí predátoři napadali housenky méně často (27 %). Obdobné výsledky ukazuje podobný temperátní výzkum, který proběhl na Moravě, kde ptáci napadli 60 % a bezobratlí predátoři 40 % plastelínových housenek (Drozdová et al. 2013). Menší rozdíl v celkovém počtu útoků na housenky vystavené na keřích ošetřených MeJA a na housenky vystavené na keřích bez postřiku poukazuje na to, že celkový výsledek byl způsoben zejména predací ze strany ptáků. Nicméně neprůkazný rozdíl v míře predace hmyzu může být způsoben velmi nízkou mírou celkové predace. Pouze na 9 housenkách byly patrné stopy po okusu plži, kteří nemohou být považováni za pravé predátory hmyzu. Ti byli přilákáni nejspíše minerálními látkami či solemi obsaženými v modelíně.

Výše zmíněné výsledky ukazují, že ptáci mohou být schopni rozlišit keře vrb ošetřených MeJA od keřů neošetřených, aniž by měli šanci pozorovat býložravý okus, či jiné známky přítomnosti právě se krmícího hmyzu. Prokázali jsme, že celkový rozdíl v preferenci keřů ošetřených MeJA před keři neošetřenými je vyšší, nikoli však v čase neměnný. Tento poznatek je v rozporu s výsledky, které publikovala Mäntylä a její kolegové (2014). Stromy (bříza pýřitá – *Betula pubescens*) ošetřené postřikem MeJA v této studii vylučovaly více myrcenu a limonenu než stromy s „pravým“ býložravým okusem způsobeným housenkami píďalky podzimní (*Operophtera brumata*) a než stromy kontrolní. Mäntylä (2014) a její tým usoudili, že tyto dvě sloučeniny pravděpodobně ptáky v jejich studii odpuzovaly a proto se jim nepovedlo prokázat větší přitažlivost stromů postříkaných MeJA v porovnání se stromy kontrolními. My jsme během naší studie změnu produkce myrcenu po aplikaci MeJA na vrby šedé nezaznamenali.

Pozorovali jsme nicméně zvýšenou produkci jiných látek, o kterých můžeme soudit, že byly v našich pokusech indukované postřikem MeJA. Tyto volatilní látky byly již dříve na vrbách šedých popsány, jakožto látky aktivní při komunikaci rostliny s hmyzem (Tab. P1 v Přílohách). Zvýšenou produkci jsme zaznamenali například v případě limonenu, ale korelace jeho produkce s predací byla nejasná a ne příliš silná. Již dříve bylo známo, že produkce limonenu je indukovaná okusem hmyzích býložravců také na bříze pýřité (Mäntylä et al. 2008a).

Den (24 hodin) po aplikaci MeJA jsme na pokusných vrbách naměřili zvýšenou produkci α -pinenu, který pozitivně koreloval s trendem míry celkové a zejména ptačí predace. α -pinen je podle několika studií (např.: Zhang et al. 2009, Mäntylä et al. 2014) možným kandidátem na látku atraktivní pro predátory býložravého hmyzu. Některé další studie nicméně neuvádějí ani změnu v produkci (Mäntylä et al. 2008a), ani samotnou přítomnost α -pinenu (Amo et al. 2013a) v souboru látek vylučovaných studovanými rostlinami (v prvním případě břízami, v případě druhém jabloněmi) po vystavení pokusnému býložravému okusu. Protože koncentrace α -pinenu bývá (a byla i v naší práci) v porovnání s jinými látkami velmi nízká, domníváme se, že nebude hrát v koktejlu atraktantů hlavní roli.

V porovnání s α -pinenem se β -ocimen, který se ve vzorcích najímaných na kontrolních keřích nevyskytoval, po aplikaci MeJA objevil ve velmi vysoké koncentraci a zdál se tak být mnohem významnějším potenciálním atraktantem. Přestože analýzami nelze stanovit absolutní objem látky na jednotku vzduchu (diskuze M. Vráblová), můžeme říci, že koncentrace β -ocimenu v okolním vzduchu byla výrazně vyšší než koncentrace α -pinenu (přibližně 7x vyšší než koncentrace limonenu a α -pinenu na stejném pokusném keři). Průkazně vyšší produkci β -ocimenu indukovanou okusem býložravého hmyzu na stromech s „pravým“ býložravým okusem uvádějí Kessler and Baldwin 2001 a Mäntylä et al. 2008a. β -ocimen v naší studii vykazoval naopak negativní korelaci s mírou ptačí predace. Výsledky negativní korelace mohou být však zavádějící. První den, kdy byla naměřena nejvyšší míra predace a kdy byl zároveň patrný největší rozdíl v predaci housenek vystavených na pokusných a kontrolních stromech, se také z nulových (kontrolní strom) na tisícinásobně vyšší hodnoty (pokusný strom) zvýšila produkce β -ocimenu. Zatímco predace na housenkách v čase postupně klesala, produkce β -ocimenu stále velmi prudce stoupala. Domníváme se, že stále stoupající produkce β -ocimenu a klesající predace ptáků během jednotlivých dnů nemusí být kauzální.

Zaznamenaný pokles predace během druhého pokusného dne mohl být způsoben vlivem počasí. Ve velmi časných ranních a dopoledních hodinách dne 22. 7., tedy v době mezi prvním a druhým pokusným dnem, jsme zaznamenali poměrně vydatný krátký déšť. Je možné, že predátoři býložravého hmyzu se tehdy nevydali shánět potravu. Absence rozdílné míry predace bezobratlými predátory na housenkách umístěných na obou typech keřů mohou souviset s celkově velmi nízkou mírou predace. Takto nízká predace bezobratlými predátory se nicméně nevymiká

míře predace běžné v temperátních oblastech (Roslin et al. v tisku). Kromě počasí mohla k poklesu predace ptáky přispět jejich schopnost se učit, která potrava je vhodná a která ne. Plastelínové housenky neposkytují ptákům žádnou odměnu v podobě potravy. Je tedy možné, že ptáci se po určité době začnou plastelínovým housenkám aktivně vyhýbat. Tento efekt by mohl být viditelný právě v mírném pásu během hnízdní sezóny (v době provádění pokusů), kdy je pohyb jednotlivých ptáků omezený na hnízdní okrsky (Newton 2000). Jedinou studií, která ukazuje podobné výsledky a pokles predáčního tlaku v průběhu času je doposud nepublikovaná práce Roslina a kolegů. Většina prací využívajících plastelínové housenky ke studiu predáčního tlaku byla provedena v tropických oblastech, kde autoři žádný pokles nepozorovali, možná kvůli menší „centralizaci“ hnízdní sezóny (Carlo et al. 2015, Sam et al. 2015b, a osobní komunikace s oběma autory).

Další problém, který jsme během studie zaznamenali, je relativně vysoké množství (40 ks) plastelínových housenek, které nebylo možné při zpětné kontrole dohledat. Neměli jsme tedy šanci určit, který predátor byl zodpovědný za potenciální napadení/odnesení housenky, a housenky jsme vyloučili z analýz. Nicméně to, že jsme zaznamenali 14 housenek spadlých z kontrolních a 26 z pokusných keřů by mohlo indikovat, že alespoň část z nich byla kompletně odstraněna ptáky, kteří se za housenku snažili zatáhnout. V průběhu času se počet chybějících housenek neměnil a ani po vydatném dešti jsme nezaznamenali větší procento spadlých housenek. Procento ztracených housenek se významně nelišilo od výsledků z jiných studií (3% - Tvardíková and Novotný 2012, 8% - Sam et al. 2015b, 4% - Drozdová et al. 2013).

Neméně diskutabilní je také fakt, že ačkoli jsme se snažili pracovat s keři, které vykazovaly co nejmenší množství hybridních znaků, nemůžeme s jistotou vyloučit, že jsme s takovými keři doopravdy nepracovali. Hybridní keře mohou vylučovat jiné a jinak koncentrované VOC a mohou být tak pro predátory méně či více atraktivní. Rozdílné výsledky produkce VOC zaznamenali Mäntylä et al. (2014) při měření na bříze pýřité, u které autoři předpokládali, že pozorovaná variabilita v naměřených VOC je způsobena právě zahrnutím hybridních jedinců do analýz. V dalších studiích je třeba lépe podchytit variabilitu VOC na jednotlivých keřích. To ovšem může výrazně zvýšit finanční náročnost budoucích projektů.

Nemůžeme vyloučit ani možnost, že aplikace MeJA vede k jiným, nám neznámým, změnám které mohou přispět k této změně chování. Předěšlé studie ukázaly, že rostliny po

aplikaci MeJA snížily svou fotosyntetickou aktivitu (např. Beltrano et al. 1998, Hristova and Popova 2002), která někdy vede ke změně reflektance listové plochy (Mäntylä et al. 2008a, Mäntylä et al. 2008b). Ke stejnému procesu dochází i při samotném býložravém okusu. Postřikem MeJA jsme tedy mohli nechtěně ovlivnit i reflektanci listů, kterou jsme bohužel neměřili.

Během studie se nám povedlo dokázat, že aplikace MeJA vede u vrb šedých ke zvýšené produkci některých volatilních látek, podobných těm, které jsou ve zvýšené míře vylučované při býložravém okusu. Dále jsme prokázali, že ptáci preferenčně hledají potravu na keřích ošetřených MeJA v porovnání se stromy kontrolními, a tudíž s největší pravděpodobností reagují na některé z těchto látek vylučovaných ve zvýšeném množství. Nepodařilo se nám nicméně zjistit látky či faktory, které by mohly stát přímo za touto změnou chování. V budoucích pracích doporučujeme provádět pokusy i na jiných rostlinných druzích a porovnávat emisi jejich těkavých látek jak v reakci na MeJA, tak na reálný býložravý okus a podrobnější analýzy volatilních látek. Také doporučujeme měřit reflektanci listové nebo fotit listové ve spektrech viditelných predátory pro vyloučení možnosti, že aplikace MeJA vede i k viditelným změnám na pokusných rostlinách.

Poděkování

Za finanční podporu děkuji Grantové agentuře České republiky (GACR 14-32024P udělený Kateřině Sam), dále Petru Šmilauerovi za konzultace ohledně použitých statistických analýz. Díky za nemalý podíl na jímání a analýzách těkavých látek patří také Janě Jersákové (Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity), týmu pod vedením Martině Vráblové (Institut environmentálních technologií v Ostravě-Porubě) a profesoru Manfredu Ayasse (Institut evoluční ekologie a konzervační genomiky v Ulmu).

Použitá literatura

- Amo, L., J. J. Jansen, N. M. Dam, M. Dicke, and M. E. Visser. 2013a. Birds exploit herbivore-induced plant volatiles to locate herbivorous prey. *Ecology Letters* **16**: 1348-1355.
- Amo, L., M. Á. Rodríguez-Gironés, and A. Barbosa. 2013b. Olfactory detection of dimethyl sulphide in a krill-eating Antarctic penguin. *Marine Ecology Progress Series* **474**: 277-285.
- Amo, L., M. E. Visser, and K. v. Oers. 2011. Smelling out predators is innate in birds. *Ardea* **99**: 177-184.
- Arimura, G.-i., R. Ozawa, T. Shimoda, T. Nishioka, W. Boland, and J. Takabayashi. 2000. Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. *Nature* **406**: 512-515.
- Beltrano, J., M. Ronco, E. Montaldi, and A. Carbone. 1998. Senescence of flag leaves and ears of wheat hastened by methyl jasmonate. *Journal of Plant Growth Regulation* **17**: 53-57.
- Braasch, J., and I. Kaplan. 2012. Over what distance are plant volatiles bioactive? Estimating the spatial dimensions of attraction in an arthropod assemblage. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **145**: 115-123.
- Carlo L. S., L. Lehner, M. O. Adams, and K. Fiedler. 2015. Predation on artificial caterpillars is higher in countryside than nearnatural forest habitat in lowland south-western Costa Rica. *Journal of Tropical Ecology* **31**: 241-244.
- Cheong, J.-J., and Y. Do Choi. 2003. Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends in Genetics* **19**: 409-413.
- Degenhardt, D. C., and D. E. Lincoln. 2006. Volatile emissions from an odorous plant in response to herbivory and methyl jasmonate exposure. *Journal of Chemical Ecology* **32**: 725-743.
- Drozdová, M., J. Sipos, and P. Drozd. 2013. Key factors affecting the predation risk on insects on leaves in temperate floodplain forest. *European Journal of Entomology* **110**: 469-476.
- Engelberth, J., H. T. Alborn, E. A. Schmelz, and J. H. Tumlinson. 2004. Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 1781-1785.
- Gagliardo, A. 2013. Forty years of olfactory navigation in birds. *Journal of Experimental Biology* **216**: 2165-2171.

- Guenther, A. B., P. R. Zimmerman, P. C. Harley, R. K. Monson, and R. Fall. 1993. Isoprene and monoterpene emission rate variability: model evaluations and sensitivity analyses. *Journal of Geophysical Research* **98**: 12609-12617.
- Guilford, T., C., Nicol, M., Rotschild, and B. P., Moore. 1987. The biological roles of pyrazines: evidence for a warning odour function. *Biological Journal of the Linnean Society* **31**: 113-128.
- Hopke, J., J. Donath, S. Blechert, and W. Boland. 1994. Herbivore-induced volatiles: The emission of acyclic homoterpenes from leaves of *Phaseolus lunatus* and *Zea mays* can be triggered by a β -glucosidase and jasmonic acid. *Febs Letters* **352**: 146-150.
- Hothorn, T., F. Bretz, and P. Westfall. 2008. Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical journal* **50**:346-363.
- Howe, A., G. L. Lövei, and G. Nachman. 2009. Dummy caterpillars as a simple method to assess predation rates on invertebrates in a tropical agroecosystem. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **131**: 325-329.
- Hristova, V., and L. Popova. 2002. Treatment with methyl jasmonate alleviates the effects of paraquat on photosynthesis in barley plants. *Photosynthetica* **40**: 567-574.
- Kessler, A., and I. T. Baldwin. 2001. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* **291**: 2141-2144.
- Kimmerer, T. W., and T. T. Kozlowski. 1982. Ethylene, ethane, acetaldehyde, and ethanol production by plants under stress. *Plant Physiology* **69**: 840-847.
- Koski, T. M., T. Laaksonen, E. Mäntylä, S. Ruuskanen, T. Li, P. S. Girón-Calva, L. Huttunen, J. D. Blande, J. K. Holopainen, and T. Klemola. 2015. Do Insectivorous Birds use Volatile Organic Compounds from Plants as Olfactory Foraging Cues? Three Experimental Tests. *Ethology* **121**: 1131-1144.
- Mäntylä, E., G. A. Alessio, J. D. Blande, J. Heijari, J. K. Holopainen, T. Laaksonen, P. Piirtola, and T. Klemola. 2008a. From plants to birds: higher avian predation rates in trees responding to insect herbivory. *Plos One* **3**: e2832.
- Mäntylä, E., J. D. Blande, and T. Klemola. 2014. Does application of methyl jasmonate to birch mimic herbivory and attract insectivorous birds in nature? *Arthropod-Plant Interactions* **8**:143-153.

- Mäntylä, E., T. Klemola, P. Sirkiä, and T. Laaksonen. 2008b. Low light reflectance may explain the attraction of birds to defoliated trees. *Behavioral Ecology* **19**: 325-330.
- Nevitt, G. A., R. R. Veit, and P. Kareiva. 1995. Dimethyl sulphide as a foraging cue for Antarctic procellariiform seabirds. *Nature* **376**: 680-682.
- Newton, I. 2000. Movements of Bullfinches *Pyrrhula pyrrhula* within the breeding season. *Bird Study* **47**: 372-376.
- Ollerstam, O., and S. Larsson. 2003. Salicylic acid mediates resistance in the willow *Salix viminalis* against the gall midge *Dasineura marginemtorquens*. *Journal of Chemical Ecology* **29**: 163-174.
- Posa, M. R. C., N. S. Sodhi, and L. P. Koh. 2007. Predation on artificial nests and caterpillar models across a disturbance gradient in Subic Bay, Philippines. *Journal of Tropical Ecology* **23**: 27-33.
- Price, P. W., R. F. Denno, M. D. Eubanks, D. L. Finke, and I. Kaplan. 2011. *Insect ecology: behavior, populations and communities*. Cambridge University Press: 801 pp.
- Ras, M. R., F. Borrull, and R. M. Marcé. 2009. Sampling and preconcentration techniques for determination of volatile organic compounds in air samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **28**: 347-361.
- Revelle, W. 2014. *psych: Procedures for psychological, psychometric, and personality research*. Northwestern University, Evanston, Illinois: 165 pp.
- Roslin, T., Hardwick, B., Novotný, V., Andrew, N., Asmus, A., Barrio I. C., et al. in print. Higher predation risk for insect prey at low latitudes. *Science*.
- Sam, K., B. Koane, and V. Novotný. 2015a. Herbivore damage increases avian and ant predation of caterpillars on trees along a complete elevational forest gradient in Papua New Guinea. *Ecography* **38**: 293-300.
- Sam, K., T. Remmel, and F. Molleman. 2015b. Material affects attack rates on dummy caterpillars in tropical forest where arthropod predators dominate: an experiment using clay and dough dummies with green colourants on various plant species. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **157**: 317-324.
- Team, R. C. 2013. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

- Thaler, J. S. 1999. Jasmonate-inducible plant defences cause increased parasitism of herbivores. *Nature* **399**: 686-688.
- Thaler, J. S., M. J. Stout, R. Karban, and S. S. Duffey. 1996. Exogenous jasmonates simulate insect wounding in tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in the laboratory and field. *Journal of Chemical Ecology* **22**: 1767-1781.
- Turlings, T. C., J. H. Humlington, and W. J. Lewis. 1990. Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasite wasps. *Science* **250**: 1251-1253.
- Turlings, T. C., and J. H. Tumlinson. 1992. Systemic release of chemical signals by herbivore-injured corn. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**: 8399-8402.
- Turlings, T. C. J., J. H. Loughrin, P. J. McCall, S. R. Röse, W. J. Lewis, and J. H. Tumlinson. 1995. How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**: 4169-4174.
- Tvardíková, K., and V. Novotný. 2012. Predation on exposed and leaf-rolling artificial caterpillars in tropical forests of Papua New Guinea. *Journal of Tropical Ecology* **28**: 331-341.
- Verheyden, C., and P. Jouventin. 1994. Olfactory behavior of foraging procellariiforms. *The Auk*:285-291.
- Volf, M., J. Hrček, R. Julkunen-Tiitto, and V. Novotný. 2015a. To each its own: differential response of specialist and generalist herbivores to plant defence in willows. *Journal of Animal Ecology* **84**: 1123-1132.
- Volf, M., R. Julkunen-Tiitto, J. Hrček, and V. Novotný. 2015b. Insect herbivores drive the loss of unique chemical defense in willows. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **156**: 88-98.
- Xu, T., Q. Zhou, W. Chen, G. Zhang, G. He, D. Gu, and W. Zhang. 2003. Involvement of jasmonate-signaling pathway in the herbivore-induced rice plant defense. *Chinese Science Bulletin* **48**: 1982-1987.
- Zhang, Y., Y. Xie, J. Xue, G. Peng, and X. Wang. 2009. Effect of Volatile Emissions, Especially α -Pinene, From Persimmon Trees Infested by Japanese Wax Scales or Treated With Methyl Jasmonate on Recruitment of Ladybeetle Predators. *Environmental Entomology* **38**: 1439-1445.

Kapitola II

Využívají ptáci těkavé látky indukované býložravým hmyzem při hledání potravy?

Abstrakt

Čich ptáků je téma zkoumané bezmála 60 let. V poslední době se výzkum obrací zejména na vyřešení otázky používání ptačí olfaktorie při hledání potravy. Rostliny napadené býložravým hmyzem vylučují obranné chemické látky, které slouží k jeho odpuzení, ke znechucení listů či ztížení příjmu rostlinné potravy. Nedávné studie naznačují, že právě tyto látky mohou sloužit hmyzožravým ptákům jako vodítko k nalezení potravy. Výsledky dosavadních pokusů jsou však rozporuplné. Cílem naší studie proto bylo ukázat, zda jsou sýkory koňadry (*Parus major*) a sýkory modřinky (*Cyanistes caeruleus*) schopny detekovat látky vylučované rostlinami po napadení hmyzem (HIPV – herbivore-induced plant volatiles) a využít je k nalezení potravy, nebo zda se spíše orientují podle vizuálního signálu. Během pokusu jsme jako modelové rostliny použili ptačí zob obecný (*Ligustrum vulgare* 'Atrovirens'). K vytvoření býložravého okusu a indukcii HIPV jsme využívali housenky martináče hedvábného (*Samia cynthia walkeri*). Takto jsme vytvořili keře, které ptákům poskytovaly signál vizuální (okus), chemický (HIPV), jejich kombinaci (okus + HIPV) a keře, které nevysílaly žádný signál. Atraktivitu těchto keřů (tj. poskytovaných signálů) jsme zkoumali ve dvou-výběrových klecových pokusech. Z našich výsledků vyplývá, že (1) sýkory koňadry žádný ze signálů nepreferovaly a na keřích hledaly potravu náhodně, (2) sýkory modřinky hledaly potravu preferenčně na keřích poskytujících vizuální signál ve chvíli, kdy se měly rozhodnout mezi signálem chemickým a vizuálním.

Úvod

Rostliny se proti patogenům a napadení býložravým hmyzem brání mnoha způsoby. Kromě pasivní (přímé) obrany (Chen 2008) umí rostliny využít také nepřímou (vyvolanou či indukovanou) obrannou reakci (Arimura et al. 2005). Příkladem přímé obrany může být exkrece latexu či zvýšená produkce terpenů, které pro hmyz listoví znechutí. Nepřímou obrannou reakcí je poskytování odměny (v podobě potravy, obydlí) organismům, které rostlině pomůžou od náporu býložravého hmyzu, strukturální (Marquis and Whelan 1996), či chemické atraktivity rostliny pro predátory (Turlings et al. 1995). Použití chemické nepřímé obranné reakce je fenomén nejčastěji studovaný na hmyzích predátorech a parazitoidech (např.: Coley et al. 1985, Kessler and Baldwin 2001, Ali and Agrawal 2012).

Aby býložravý hmyz unikl pozornosti predátorů a parazitoidů, snaží se být nenápadný vizuálně (Lev-Yadun and Inbar 2002) a i pachově (Schröder and Hilker 2008). To, co však může predátory býložravého hmyzu upozornit na přítomnost právě se živícího hmyzu, jsou pachy, které vycházejí z listů napadené rostliny (Vet and Dicke 1992). I přes to, že se hmyz živí lokálně pouze na malé části rostliny, obranný signál, který se rychle šíří celou rostlinou, a který je poté vylučován listovím, může být velmi nápadný (Vet and Dicke 1992).

Především studie dokázaly, že i ptáci, jakožto predátoři býložravého hmyzu, mohou látky vylučované rostlinou (VOC) zachytit a řídit se jimi při hledání potravy. Prozatím je ale tato myšlenka doslova v plenkách a mechanismus celého systému je doposud neznámý. Úplně první práce poukazující na možnost chemické orientace ptáků a jejich schopnosti využívat VOC při vyhledávání potravy byla publikována v roce 2008 (Mäntylä et al. 2008a). První úspěšný pokus o oddělení chemického a vizuálního signálu vydávaného rostlinou byl proveden v roce 2013 (Amo et al. 2013). Tento pokus ukázal, že dospělí jedinci sýkory koňadry preferují hledání potravy na jabloních, které jim poskytovaly chemický signál v podobě různých těkavých látek vylučovaných rostlinou po napadení býložravým hmyzem („HIPV“ herbivore-induced plant volatiles) oproti stromečkům poskytujícím pouze vizuální signál v podobě býložravého okusu. Tým vedený stejnou autorkou později ukázal (Amo et al. 2016), že naivní ptáci nejsou schopni odlišit strom, na kterém se živí housenky od stromu bez narušení.

Přestože se v současné době problematikou zabývá již několik autorských týmů, míra využívání olfaktorických schopností při vyhledávání potravy je u ptáků neznámá. Veškeré

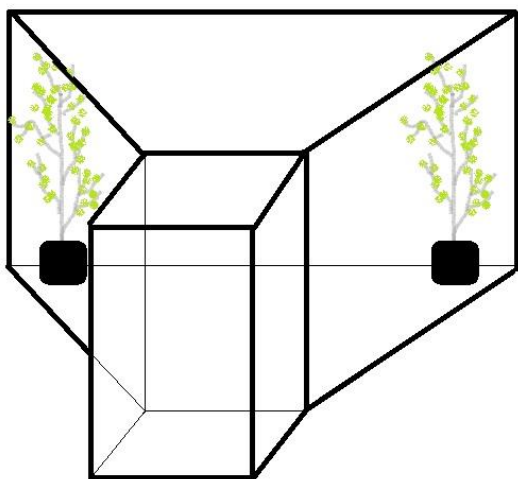
existující pokusy byly prováděny pouze s několika ptačími druhy: sýkora koňadra *Parus major* (jednou úspěšně, dvakrát neúspěšně), lejsek černohlavý *Ficedula hypoleuca* (neúspěšně) a sýkora modřinka *Cyanistes caeruleus* (neúspěšně) (Mäntylä et al. 2008b, Amo et al. 2013, Koski et al. 2015). Všechny ostatní pokusy byly prováděny v přírodě, kde identita predujících ptáků nebyla známa (např.: Mäntylä et al. 2008a). Autoři poslední neúspěšné studie (Koski et al. 2015) poukázali na to, že problém může být i v tom, jak dalece jsou pozorovaní ptáci na danou situaci adaptováni (vycvičení). Zatímco autoři studií podporujících olfaktorické schopnosti ptáků využívali v pokusech dospělé jedince vycvičené na pobyt v kleci, v neúspěšných pokusech bylo pozorováno chování nově odchycených nevyvíčených ptáků (Koski et al. 2015).

Abychom posoudili stávající podezření, že sýkory rozlišují mezi vizuálním (býložravý okus) a chemickým (HIPV) signálem, či jestli preferují využití obou signálů dohromady, vystavili jsme je dvěma párovým výběrovým testům. Krom dříve používaných sýkor koňader jsme zároveň testovali i chování sýkor modřinek. Předpokládali jsme, že potvrdíme, že sýkory koňadry preferují kombinaci obou signálů před signály jednotlivými a že preferují chemický před vizuálním signálem (dle Amo et al. 2013). Dále jsme předpokládali, že rozdíl ve výběru signálů koňadrami a modřinkami bude minimální.

Materiál a metody

Studijní prostory

Studie probíhala v klidné západní části zahrady Přírodovědecké fakulty Jihočeské Univerzity (PřF JU) v Branišovské ulici v Českých Budějovicích (48.9769419N, 14.4449758E) v nadmořské výšce 375 m n. m. Behaviorální pokusy jsem prováděla ve dnech 15. - 21. 6. 2016. Pokusy byly prováděny v pokusné voliére, která sestávala ze vstupní předsínky (1,5 x 1,5 x 2 m) a vlastních pokusných prostor tvaru lichoběžníku (1,5 x 2,5 x 3 x 2,5 m; Obr. 2.1).



Obr. 2.1: Schematický náčrt pokusné klece.

Pokusné druhy ptáků

Behaviorálním pokusem prošly dva druhy místně běžných hmyzožravých ptáků – sýkora koňadra (*Parus major*) a sýkora modřinka (*Cyanistes caeruleus*). Po zkušenostech autorů předchozích podobných studií (např.: Amo et al. 2013, Koski et al. 2015) jsme při studii použili odchované ptáky, kteří se zdají být pro podobné pokusy vhodnější než ptáci nově odchycení v přírodě (Amo et al. 2013). Mláďata zmíněných druhů jsme vybírali 5. a 6. 5. 2016 z ptačích budek umístěných na území lesa Bor (48.9815919N, 14.4219594E). Následně bylo všech 30 jedinců (modřinka N = 12, koňadra N = 18) okroužkováno (číslo licence 1152, Česká republika) a umístěno do ubytovacích klecí (40 x 40 x 60 cm) v akreditovaných chovech PřF JU. Následujících 14 dní byli ptáci ručně každou hodinu od 6:00 do 18:00 hodin dokrmováni střídavě moučnými červy a „míchanicí“ (směs nastrouhaných vařených vajec, mrkve, tvarohu, piškotů a vitamínů v prášku), voda jim byla neustále k dispozici. Později jim byla na miskách, ze kterých se krmili samostatně

a ad libitum, nabízena výše zmíněná potrava spolu se směsí naklíčeného zrní. Abychom podpořili jejich přirozenou schopnost hledání potravy, kterou se ptáci v přírodě učí, a předešli strachu z neznámého prostoru pokusné voliéry, absolvovali všichni jedinci týdenní přívykací program hned poté, co začali samostatně žrát z misky.

Při zvykacím programu jsme cvičili jedince na přítomnost ve voliéře a na hledání potravy na ptačím zobu (*Ligustrum vulgare* 'Atrovirens'). Tento druh dřeviny jsme později používali i při vlastních pokusech. Do voliéry jsme do dvou vzdálených rohů umístili po jednom keříku ptačího zobu a na jejich listy jsme pomocí entomologických špendlíků připevnili živé moučné červy (*Tenebrio molitor*). Každý jedinec strávil v kleci 2 hodiny denně, celkem tedy 14 hodin. Po každém dvouhodinovém pobytu (a později i po testech) byli ptáci odchyceni sítkou a vráceni do ubytovací klece. Všichni ptáci se během pěti cvičení naučili najít a sežrat alespoň 90 % vystavených červů.

Pokusné druhy rostlin a hmyzu

Jako modelový keř pro pokusy jsme vybrali ptačí zob obecný (*Ligustrum vulgare* 'Atrovirens'). Druh jsme zvolili kvůli jeho dostupnosti, rychlému růstu a zejména s ohledem na to, že je živnou rostlinou dostupných, poměrně jednoduše chovatelných housenek, které jsme také potřebovali využít v následných pokusech. Ptačí zoby obecné (15 jedinců) jsme pěstovali od roku 2015 v 30 litrových plastových květináčích (vysokých asi 1,5 m). Pokusný keř se v oblasti, kde jsme prováděli pokusy, vyskytuje hojně a je nedílnou součástí biotopu místních ptáků.

K přípravě pokusných keřů jsme používali housenky martináče hedvábného (*Samia cynthia walkeri*; 3. – 4. instar), které jsme uměle odchovali v chovech hmyzu na Entomologickém ústavu Biologického Centra AV ČR na větvičkách ptačího zobu při teplotě 23°C.

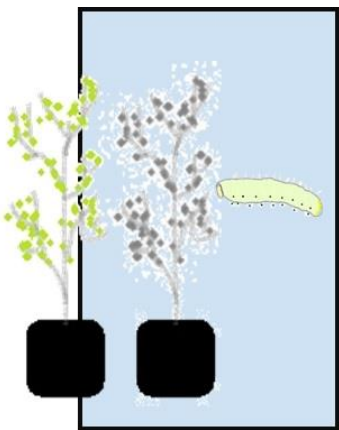
Kontrolní keř bez zásahu („kontrola“): Keře byly po celou přípravnou fázi pokusu umístěny stranou (nejméně 50 m) od dalších pokusných keřů, abychom tak zabránili jejich ovlivnění případnými těkavými látkami vylučovanými rostlinou v reakci na herbivorní okus (HIPV).

Pokusné keře vydávající vizuální signál („vizuální“): Listy tohoto keře byly po dva dny (48 hodin) žrány housenkami. Housenky byly poté odebrány a keř byl další tři dny (72 hodin) ponechán stranou od ostatních keřů tak, aby v době pokusu vykazoval pouze vizuální signál (tj. okus). Čtyři dny jsou dostatečně dlouhá doba k zahojení čerstvých ran způsobených housenkami

a zastavení produkce HIPV (Schoonhoven et al. 2005), ale nedostatečná k zahojení stop po okusu, které jsou zpravidla permanentní. Housenky byly na listy vždy umístovány jednotlivě do sítěk („clip-cages“; Ø 45 mm), které vyhraňovaly oblast, na které mohly housenky žrát a zároveň zabráňovaly jejich úniku (Amo et al. 2013).

Pokusný keř vydávající oba signály („oba signály“): Na listy tohoto keře jsme 48 hodin před pokusem umístili deset housenek (opět v síťkách) tak, aby v době pokusu keře vykazovaly jak vizuální (okus), tak chemický (HIPV) signál. Všechny housenky byly odebrány z keře těsně před začátkem pokusu.

Pokusný keř vydávající chemický signál („chemický“): Tento keř sestával z dvojice keřů. Uvnitř klece byl ptákoví nabízen keř připravený jako kontrolní (tj. nevysílající žádné signály) a těsně za plátěnou stěnou klece (pro ptáka neviditelný) byl umístěn keř připravený úplně stejně jako keř vydávající oba signály („oba“). Větve obou keřů se víceméně dotýkaly a dělilo je jen prodyšné, neprůhledné plátno (1,8 x 1,8 m). Pták proto mohl vnímat chemický signál vylučovaný keřem těsně za plátnem, ale nemohl vidět žádný vizuální signál (Amo et al. 2013; Obr. 2.2). Chemický signál se zpravidla šíří na 1,5 - 8 m a je nezachytitelný nad 10 m (Braasch and Kaplan 2012). Stejně plátno bylo umístěno permanentně na obou polovinách zadní části klece, aby nedocházelo k ovlivňování výsledků.



Obr. 2.2: Nákras řešení keře vysílajícího pouze chemický signál. Barevný keř (v popředí) je kontrolní (nevysílající žádný signál), který stojí uvnitř voliéry. Černobílý (v pozadí) je keř vysílající oba signály (vizuálně- chemický), který stojí vně klece za neprůhlednou, ale prodyšnou bavlněnou plentou. Větvičky obou keřů se těsně dotýkaly plenty.

Uspořádání pokusu

Jeden pokus byl rozdělen do dvou párových výběrových testů (jeden test za den). Před každým samotným testem byl ptačí jedinec hodinu a půl hladověn. V každé části pokusu (tj. testu) byla pokusovanému jedinci představena jiná kombinace dvou různých signálů. V první části pokusu měl jedinec na výběr mezi keři „kontrola“ a „oba signály“. Druhá část pokusu představovala dvou-výběrový test mezi „vizuálním“ a „chemickým“ keřem. Každý ptačí jedinec tak absolvoval celý pokus ve dvou po sobě jdoucích dnech (a ve dvou testech) a hned po nich byl vypuštěn do přírody v blízkosti původního odchytu.

Na začátku každého pokusu jsme do pokusné klece připravili dva keře („kontrolní“ a „oba signály“ či „chemický“ a „vizuální“ signál). Jejich polohu (vpravo, vlevo) v rámci páru jsme vždy losovali. Všechny pokusy byly prováděny za teplých dnů (teplota naměřená ve voliére = 20 – 42 °C) v době mezi 9:00 ráno a 15:00 odpoledne. Je známo, že teplota má signifikantní vliv na množství vyloučených volatilních látek (Vallat et al. 2005). Protože jsme se bohužel zcela nevyhnuli dešti (připravenost ptáků a housenek zároveň nešla příliš ovlivnit), prováděli jsme pokusy za slunečného i mírně deštivého dne s přeháňkami. Vzhledem k tomu, že voliéra byla zastřešena, neměl by mít mírný déšť na výsledky pokusů signifikantní vliv.

Po vpuštění jedince do připravené pokusné klece byl vnitřek klece natáčen po dobu 30 minut (včetně 5 minut pro uklidnění) na kameru Panasonic HC-V510EP-K. Pořízený záznam chování jedince v kleci během obou testů byl následně vyhodnocen. Hodnotícími parametry byly:

- 1) Prvně navštívený keř
- 2) Doba strávená na jednotlivých keřích
- 3) Počet přeletů k jednotlivým keřům

Jímání těkavých látek

Abychom mohli vysvětlit chování pozorované během behaviorálních experimentů, zanalyzovali jsme volatilní látky indukované jednotlivými různě upravenými keři hned po provedení prvního pokusu. Používali jsme vakuové pumpy (Spectrex, PAS-500, Redwood City, California, USA; s průtokem vzduchu 200 ml/min), silikonové přívodní trubičky a vlastní sběrné skleněné trubičky, které obsahovaly 150 mg Tenaxu TA absorbent (Supleco, mesh 60/80, Bellefonte, PA, USA) (Ras et al. 2009). Větvičky vybraných keřů jsme vsunuli do plastových (polyetylen tereftalát – PET)

pytlíků na pečení (35 x 43 cm; Tesco, Polska, Kraków), které byly připevněné drátkem tak, aby kolem větve mohl proudit vzduch. Jeden z rohů pytlíku jsme ustříhli a do vzniklé dírky vložili tenaxovou trubičku nasazenou na silikonovou trubičku vedoucí k vakuové pumpě. Aby vzduch nemohl utíkat kolem vložené trubičky, zajistili jsme ji parafilmem. Každý vzorek byl jímán 30 minut. Každou jímací trubičkou tedy prošlo celkem 6 litrů vzduchu. Šest litrů je množství dostatečné pro podobné analýzy, přičemž někdy je jímáno i jen poloviční množství vzduchu (Mäntylä et al. 2014). Poté byly jímací trubičky odebrány, neprodyšně uzavřeny přiloženými silikonovými krytkami a ihned odeslány na analýzu.

V rámci pokusu jsme jímali a analyzovali následující vzorky: (1) kontrolní keř nevyklučující vizuální ani chemický signál, (2) chemicko-vizuální keř vylučující oba signály, (3) vizuální keř vylučující pouze vizuální signál. Během měření byly simultánně jímány vždy dva vzorky (jeden keř a „slepý“ vzorek okolního vzduchu) a všechny vzorky byly odebrány během dvou hodin.

Chemická analýza těkavých látek plynovým chromatografem

Vzorky volatilních sloučenin byly analyzovány pomocí plynového hmotnostního spektrometru (Hewlett-Packard GC 6890, MSD 5973; Palo Alto, CA, USA). Najímané sloučeniny byly desorbovány termální desorpční jednotkou (Perkin-Elmer ATD400 Automatic Thermal Desorption system) při teplotě 250°C po dobu deseti minut, kryofokusovány při 230°C a vstříknuty do HP-5 kapilární kolony (50 m dlouhé, 60,2 mm vnitřní průměr, Hewlett-Packard) s heliem jako nosným plynem. Kapilární kolona prošla zahřívacím programem. Nejprve byla teplota držena po dobu 1 minuty na 40°C, poté se zvýšila na 210°C rychlostí 5°C/min a následně se teplota zvyšovala po 20°C/min na konečných 250°C. Sloučeniny (mono-, homo- a seskviterpeny a další těkavé látky; tzv. green leaf volatiles – GLVs) byly identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Protože stabilita, kvalita i kvantita emisí biologického původu se mění v závislosti na světle a teplotě (Guenther et al. 1993), probíhal pokus za konstantních průměrných denních teplot (29 – 30°C). Analýzy byly provedeny na institutu environmentálních technologií v Ostravě-Porubě pod vedením Mgr. Martiny Vráblové.

Statistické analýzy

Pro jednotlivé typy keřů jsme počítali počet jednotlivých příletů k danému keři a celkovou dobu pobytu (v sekundách) ptáka na keři strávenou hledáním potravy. Poté jsme vyjádřili poměrný počet příletů k jednotlivým keřům a poměrný čas na nich strávený. První volba ptačího jedince se nám bohužel nepodařila vyhodnotit, protože u ptáků docházelo k viditelnému uklidnění za různě dlouho dobu. Zatímco někteří jedinci hned po vypuštění vletěli do jednoho z keříčků a začali se věnovat jeho prozkoumávání, jiní usedli na odsedávky či na stěnu klece a k některému z keřů se přiblížili až později.

Jako vysvětlující proměnné pozorovaných reakcí jsme použili typ keře (tj. signálu), stranu klece, na které byl keř umístěn, den pokusu a ptačí druh. Identitu ptačího jedince jsme použili jako náhodný efekt, který byl zahrnut v treatmentu (tj. typu keře). K vyhodnocení jsme využili generalizovaných lineárních modelů s náhodným efektem a *glmer* funkci z balíčku *lme4* (Bates et al. 2014) v programu R (Team 2013). Jednotlivé modely jsme stavěli ručně a porovnali funkcí *aov*. Jejich vhodnost jsme vyhodnotili na základě AIC (Akaike information criterion), BIC (Bayesian information criterion) a χ^2 (Bolker et al. 2009). K otestování důležitosti faktoru s náhodným efektem jsme sestavili jednoduchý lineární model (funkce *glm*). Pomocí funkce *aov* jsme ho porovnali s modelem s přidaným náhodným efektem (Šmilauer 1998-2007). Data jsme klasifikovali jako binomická s link logit funkcí. K následným post-hoc testům jsme použili funkce *glht* z balíčku *multcomp* (Hothorn et al. 2008) opět v programu R. V grafech jsme vykreslili procentuální hodnoty (tj. poměrné hodnoty použité v analýzách x 100) doby pobytu a počtu příletů k jednotlivým keřům.

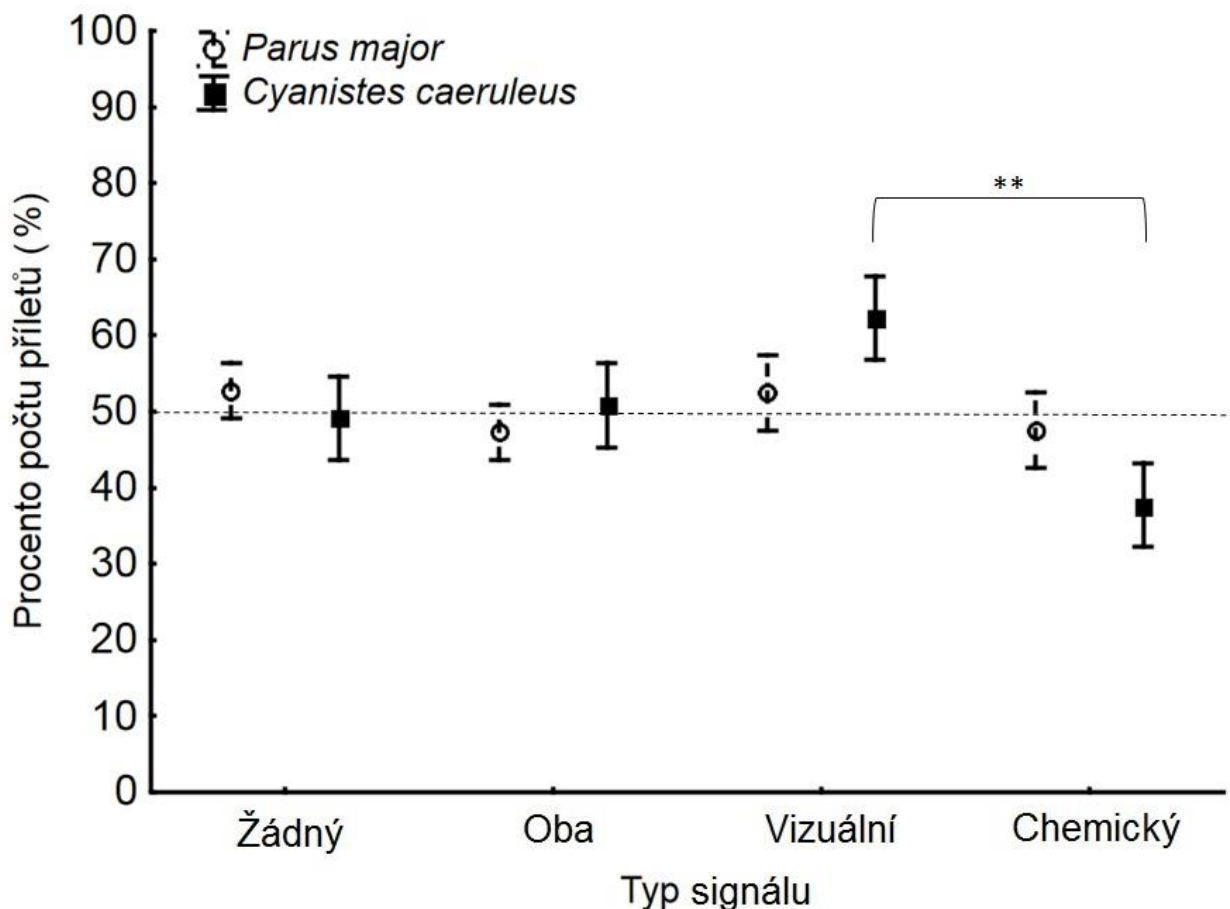
Výsledky

Během 60 pokusů (25 minut každý; tj. 1500 minut celkem) s 30 sýkorami strávili ptáci 106 minut přímo hledáním potravy na jednotlivých keřích. Většinu času ptáci strávili na stranách klece či na odsedávkách. Sýkory koňadry strávili na keřích v průměru $3,94 \pm 1,25$ minuty a sýkory modřinky hledali potravu podobně dlouho (Mann-Whitney test, $U = 1708$, $Z = -0,10$, $P = 0,92$), v průměru $2,91 \pm 2,42$ minuty. Během všech pokusů jsme zaznamenali 2214 přiletů k jednotlivým keřům.

Ptáci přilétali signifikantně častěji ($56,4 \pm 3,75$ % počtu přiletů ke keřům) ke keři s výhradně vizuálním signálem, než ke keřům ostatním ($48,3 \pm 1,87$ % přiletů; Tab. 2.1 a Obr. 2.3). Umístění jednotlivých keřů v kleci, pokusný den a identita ptačího jedince neměly vliv na pozorované výsledky (Tab. 2.1). Druh ptáka také neměl signifikantní vliv na pozorované výsledky. Neprůkaznost interakce mezi druhem ptáka a typem keře značí, že přiletěly obou druhů k jednotlivým typům keřů byly podobně časté (Tab. 2.1). Nicméně sýkory modřinky přilétaly marginálně signifikantně ($F_{3,44} = 3,66$; $P = 0,058$) častěji ke keřům s vizuálním signálem než ke všem ostatním keřům ($62,33 \pm 5,44$ vs. $45,88 \pm 3,23$ % přiletů; Tukey HSD test $P < 0,001$). Sýkory koňadry mezi jednotlivými keři nedělaly žádné rozdíly ($F_{3,68} = 0,56$; $P = 0,64$).

Tabulka 2.1: Výsledky generalizovaného lineárního modelu se smíšeným efektem vlivu jednotlivých faktorů na poměr počtu přiletů k jednotlivým keřům sýkorami koňadrami ($N = 18$) a sýkorami modřinkami ($N = 12$), poté co byly vypuštěny v pokusné kleci se dvěma ptačími zoby: jedním kontrolním nevysílajícím žádný signál a jedním vysílajícím oba signály (vizuální a chemický) a poté jedním vysílajícím pouze chemický a jedním vysílajícím pouze vizuální signál.

Přiletěly ke keřům	Df	AIC	BIC	Log.Like	X ²
Typ keře	5	175,55	189,49	-82,777	0,115
Typ keře + Druh ptáka	6	177,35	194,08	-82,676	0,6537
Typ keře + Druh ptáka + Den pokusu	7	179,35	198,87	-82,676	1
Typ keře + Druh ptáka + Den pokusu + Druh ptáka*Typ keře	10	184,57	212,44	-82,285	0,8538
Typ keře + Druh ptáka + Den pokusu + Druh ptáka*Typ keře + Strana klece	11	186,14	216,8	-82,07	0,5122
Intercept	1	-4,72	9,045		
Identita ptáka	2	-2,72	13,797	7,36	$P = 0,99$

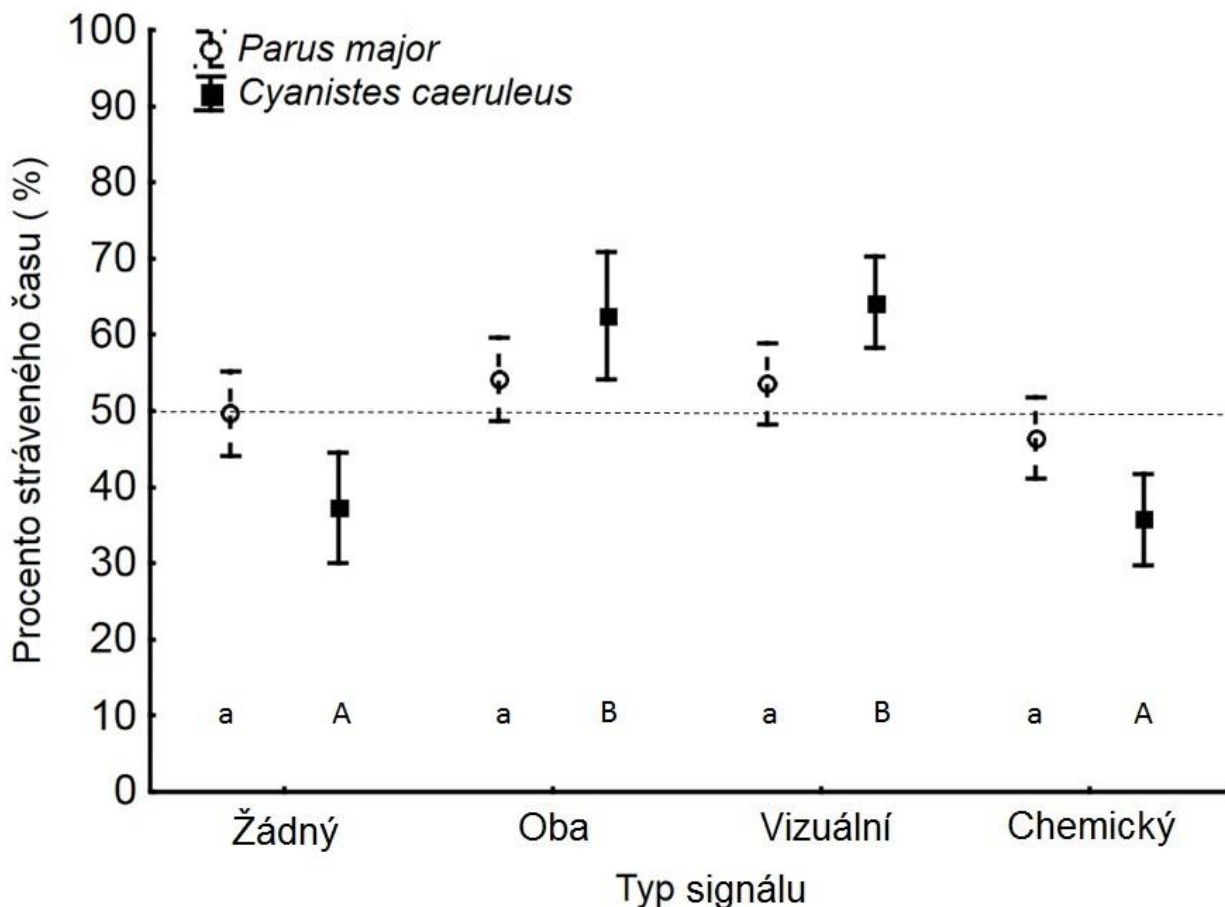


Obr. 2.3: Průměrné (\pm SE) procento počtu přiletů k jednotlivým keřům (sýkora koňadra $N = 18$ a sýkora modřinka $N = 12$), poté co byli ptáci vypuštěni v pokusné kleci se dvěma ptačími zoby: jedním kontrolním nevysílajícím žádný signál a jedním vysílajícím oba signály (vizuelní a chemický) a poté jedním vysílajícím pouze chemický a jedním vysílajícím pouze vizuelní signál. Procento času stráveného hledáním potravy na keři bylo počítáno jako: $(\text{doba na sledovaném keři} / (\text{doba na sledovaném keři} + \text{doba na druhém keři})) * 100$.

Ptáci zůstávali signifikantně delší dobu na keřích vysílajících oba signály a pouze vizuelní signál než na keřích kontrolních (bez signálu) a keřích vysílajících pouze chemický signál (Tab. 2.2 a Obr. 2.3). Oba druhy sýkor se nicméně v reakcích na keře signifikantně lišily (Tab. 2.2). Signifikantní interakce mezi typem keře a druhem ptáka značí, že reakce jednotlivých druhů na různé druhy keřů nebyly shodné.

Tab. 2.2: Výsledky generalizovaného lineárního modelu se smíšeným efektem vlivu jednotlivých faktorů na procento času stráveného hledáním potravy na jednotlivých keřích sýkorami koňadrami (N = 18) a modřinkami (N = 12) poté, co byly vpuštěny do pokusné klece se dvěma ptačími zoby: jedním kontrolním nevysílajícím žádný signál a jedním vysílajícím oba signály (vizuální a chemický) a poté jedním vysílajícím pouze chemický a jedním vysílajícím pouze vizuální signál.

Přilety ke keřům	Df	AIC	BIC	Log.Like	X ²
Typ keře	5	170,29	184,23	-80,147	0,007
Typ keře + Druh ptáka	6	166,24	182,97	-77,121	0,014
Typ keře + Druh ptáka + Den pokusu	7	165,85	185,36	-75,923	0,122
Typ keře + Druh ptáka + Den pokusu + Druh ptáka*Typ keře	10	170,93	184,8	-76,464	0,035
Typ keře + Druh ptáka + Den pokusu + Druh ptáka*Typ keře + Strana klece	11	172,46	203,12	-75,228	0,493
Výsledný model: Typ keře + Druh ptáka + Druh ptáka*Typ keře	7	171,4	196,5	-76,7	0,015
Intercept	1	58,11	71,88	-24,258	
Identita ptáka	2	60,11	76,63	-24,258	P = 0,999



Obr. 2.3: Průměrné (\pm SE) procento času stráveného hledáním potravy na jednotlivých keřích sýkorami koňadrami (N = 18) a modřinkami (N = 12), poté co byly vypuštěny v pokusné kleci se dvěma ptačími zoby: jedním kontrolním nevysílajícím žádný signál a jedním vysílajícím oba signály (vizuelní a chemický) a poté jedním vysílajícím pouze chemický a jedním vysílajícím pouze vizuelní signál. Procento času stráveného hledáním potravy na keři bylo počítáno jako: $(\text{doba na sledovaném keři} / (\text{doba na sledovaném keři} + \text{doba na druhém keři})) \cdot 100$. Rozdíly mezi typy keřů v rámci ptačího druhu označené různými písmeny jsou signifikantní na hladině průkaznosti 0,05. Malá písmena značí sýkory koňadry a velká písmena značí sýkory modřinky.

Analýza těkavých sloučenin potvrdila, že keře mající poskytovat pouze vizuelní signál se emisemi těkavých látek neliší od keře kontrolního. Naopak u keře majícího vysílat signál chemický jsme naměřili zvýšené hodnoty D-limonenu (abundance/1000 = 109,2 vs. 161,1), limonen-oxidu (7,17 vs. 68,6) či benzylacetátu (8,95 vs. 44,9). Produkce α -pinenu, β -pinenu a 3-carenu se mezi jednotlivými keři příliš nelišila.

Diskuze

Z našich výsledků je patrné, že sýkory modřinky preferují při hledání potravy vizuální signál před signálem chemickým a před kontrolním keřem nevydávajícím žádný signál. Sýkory koňadry neukázaly preferenci pro žádný z představených signálů. Nulová reakce koňader je v souladu s výsledky 3. části pokusů Koski et al. (2015) a s výsledky studie Amo et al. (2016). Obě pracovní skupiny testovaly pouze naivní či netréňované koňadry bez předchozího tréninku. Všichni jedinci obou námi testovaných ptačích druhů prošli intenzivním tréninkem. Ten je měl zbavit bázně z neznámého prostoru a vést ke zvýšenému zájmu testovaných jedinců o prozkoumávání nabídnutých keřů.

Je možné, že trénink, kterým všichni naši ptáci jednotně prošli, přesto nebyl dostatečný nebo vhodně uspořádaný. Reakce sýkor modřinek a fakt, že po pěti dnech byli všichni ptáci schopni hledat na keřích potravu a přijímat ji, na druhou stranu vypovídá o opaku. Naše výsledky jsou v rozporu s výsledky Amo et al. (2013), jejíž habituovaní ptáci preferovali chemický a chemicko-vizuální signál před vizuálním signálem. Naše sýkory modřinky projevíly o některé nabízené keře oproti koňadrám jasně zvýšený zájem (či jasnou nechuť). Na základě výše uvedeného se domníváme, že jsme mezi koňadrami a modřinkami pozorovali mezidruhové rozdíly v potravním chování. Podle některých studií zaměřených na klecové pokusy (Turini et al. 2015 a osobní konzultace P. Veselý) jsou to právě modřinky, které se častěji projevují jako neofobici se známkami bázlivého chování. Naopak velmi plaše se na krmítcích v přírodě chovaly sýkory koňadry (např.: Stokes 1962, Tvardíková and Fuchs 2011). U testovaných ptáků jsme nezjišťovali pohlaví, které sice může mít vliv na jejich potravní chování (např.: Gustafsson 1988), ale v pokusech podobných těm našim nebyl tento fenomén pozorován (např.: Mäntylä et al. 2008b, Mäntylä et al. 2016)

Další problém, který mohl negativně ovlivnit výsledky, by mohl být ten, že námi připravený chemický signál nebyl pro ptáky zachytitelný z důvodu jeho specifického řešení. Je známo, že rostlinné těkavé látky se šíří na 1,5 – 8 m (Braasch and Kaplan 2012). Nepředpokládáme tedy, že by se chemický signál vylučovaný keřem vně klece (Obr. 2.2) nešířil dovnitř. Jaké a jak koncentrované látky vylučuje keř mající představovat chemický signál, jsme zkoumali najímáním VOC a jejich analýzou na plynovém chromatogramu. Tím jsme ověřili, že se tyto látky kvalitativně i kvantitativně liší od látek vylučovaných kontrolním a vizuálním keřem.

Dále jsme zvážili možnost odvanutí VOC větrem. Vzhledem k tomu, že jsme nezaznamenali rozdíl v návštěvnosti a v čase stráveném na keřích během pokusných dnů, jsme tuto možnost zavrhlí. Není pravděpodobné, že by byl chemický signál odvanut pouze při pokusech s koňadrami. Ještě méně pravděpodobné je to, že by odvanutí pachu vedlo k negativní reakci sýkor modřinek. To, že modřinky více méně konzistentně preferovaly vizuální keř oproti keři chemickému, by mohlo být způsobeno spíše tím, že chemický keř mohl vylučovat látky, které ptáky odpuzují.

Mäntylä et al. (2014) ve svém článku uvádí, že její pokusné stromy (bříza pýřitá – *Betula pubescens*) vylučovaly signifikantně větší množství limonenu a myrcenu a protože se ptáci těmto stromům vyhýbali, považuje tyto látky pro ptáky za odpudivé. Naopak α -pinen interpretuje jako atraktant, protože množství této jediné látky pozitivně korelovalo s mírou predace. Amo et al. (2013) používali v pokusech jabloně a naměřili na nich zvýšené hodnoty α -farnesenu a dodecanalu, které byly dle všeho pro ptáky atraktivní, ale které jsme v souboru námi naměřených látek nedetekovali. Naše ptačí zoby představující chemický signál měly zvýšenou koncentraci benzyl alkoholu, benzyl acetátu, D-limonenu, limonen-oxidu a pinocarvonu. Tyto látky nebyly dříve na ptačím zobu popsány jakožto látky aktivní při komunikaci rostliny s hmyzem (viz Tab. P2 v Přílohách). Vzhledem ke komplexnosti výstupů chromatogramu a směsí látek vylučovaných rostlinami je nicméně možné, že jsme některé látky odpuzující ptáky nezaznamenali nebo jim nepřikládali takovou váhu. V následujících pokusech je třeba se více zaměřit obecně na všechny látky, které mohou být rostlinou vylučovány.

Během naší práce jsme bohužel neměřili změny reflektance listů, která může hrát v orientaci ptáků při hledání potravy také důležitou roli (Mäntylä et al. 2008b). Ke změně reflektance listů může dojít skrze změnu fotosyntetické aktivity rostliny, která je napadena býložravým hmyzem (např. Beltrano et al. 1998, Mäntylä et al. 2008b). Pokud by naši ptáci opravdu měli využívat takového vizuálního signálu, pozorovali bychom stejné pozitivní reakce na keře vylučující signál vizuální a signál vizuálně-chemický. Tak tomu však v našich pokusech nebylo. Je možné, že ptáci tento faktor spolu s býložravým okusem listů využívají na jiné vzdálenosti než signál chemický, nebo že jsou oba signály využívány v určitých poměrech v závislosti na situaci. Naši ptáci tudíž mohli za daných pokusných podmínek (na krátkou vzdálenost, jednoduchost pokusného uspořádání) používat vizuální signál (tj. viditelný okus) více

než olfaktorii či případnou změnu reflektance listoví. Ačkoliv schopnost detekovat chemické látky vylučované rostlinami může být důležitá pro orientaci hmyzožravých ptáků (například pro koňadry a modřinky živící svá mláďata housenkami), je možné, že se její použití mění v prostoru a v čase.

Touto studií se nám nepovedlo prokázat, že by sýkory koňadry a sýkory modřinky při hledání potravy využívaly čich. Doposud existovaly pouze dvě podobné klecové studie, jedna prokazující (Amo et al. 2013) a jedna vyvracející využívání VOC u ptáků (Koski et al. 2015). Dalším krokem v budoucím zkoumání by tedy mělo být odhalení toho, proč se reakce sýkor v našich a Amo et al. (2013) pokusech lišily a jestli ptáci opravdu dokáží využívat VOC při orientaci či nikoliv. Další otázkou nadále zůstává, které látky vylučované rostlinou lákají či odpuzují ptáky, jakožto predátory býložravého hmyzu. Při budoucích pokusech je také třeba dbát na správnou habituaci ptáků na pokusné podmínky a kontrolu všech potenciálních vizuálních signálů doprovázejících býložravý okus.

Poděkování

V první řadě děkuji za finanční podporu grantové agentury České republiky (GACR 14-32024P), dále děkuji vedení Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity za poskytnutí prostor k provedení pokusů, Petru Šmilauerovi za diskuzi ohledně statistických analýz, Janě Beránkové za odběr a odchov mladých ptáků a Petru Veselému za diskuzi ohledně potravního chování sýkor. Dále děkuji za pomoc při jímání a analýze těkavých látek Janě Jersákové (Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity), týmu pod vedením Martiny Vráblové (Institut environmentálních technologií Ostrava-Poruba) a profesoru Manfredu Ayasse (Institut evoluční ekologie a konzervační genomiky v Ulmu).

Použitá literatura

- Ali, J. G. and A. A. Agrawal. 2012. Specialist versus generalist insect herbivores and plant defense. *Trends in plant science* **17**:293-302.
- Amo, L., M. Dicke, and M. E. Visser. 2016. Are naïve birds attracted to herbivore-induced plant defences? *Behaviour* **153**:353-366.
- Amo, L., J. J. Jansen, N. M. van Dam, M. Dicke, and M. E. Visser. 2013. Birds exploit herbivore-induced plant volatiles to locate herbivorous prey. *Ecology Letters* **16**:1348-1355.
- Arimura, G.-i., C. Kost, and W. Boland. 2005. Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* **1734**:91-111.
- Bates, D., M. Mächler, B. Bolker, and S. Walker. 2014. Fitting linear mixed-effects models using lme4. arXiv preprint arXiv:1406.5823.
- Beltrano, J., M. Ronco, E. Montaldi, and A. Carbone. 1998. Senescence of flag leaves and ears of wheat hastened by methyl jasmonate. *Journal of Plant Growth Regulation* **17**:53-57.
- Bolker, B. M., M. E. Brooks, C. J. Clark, S. W. Geange, J. R. Poulsen, M. H. H. Stevens, and J. S. S. White. 2009. Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution* **24**:127-135.
- Braasch, J. and I. Kaplan. 2012. Over what distance are plant volatiles bioactive? Estimating the spatial dimensions of attraction in an arthropod assemblage. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **145**:115-123.
- Coley, P. D., J. P. Bryant, and F. S. Chapin. 1985. Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science* **230**:895-899.
- Guenther, A. B., P. R. Zimmerman, P. C. Harley, R. K. Monson, and R. Fall. 1993. Isoprene and monoterpene emission rate variability: model evaluations and sensitivity analyses. *Journal of Geophysical Research* **98**:12609-12617.
- Gustafsson, L. 1988. Foraging behaviour of individual coal tits, *Parus ater*, in relation to their age, sex and morphology. *Animal Behaviour* **36**:696-704.
- Hothorn, T., F. Bretz, and P. Westfall. 2008. Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical journal* **50**:346-363.

- Chen, M. S. 2008. Inducible direct plant defense against insect herbivores: a review. *Insect science* **15**:101-114.
- Kessler, A. and I. T. Baldwin. 2001. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* **291**:2141-2144.
- Koski, T. M., T. Laaksonen, E. Mäntylä, S. Ruuskanen, T. Li, P. S. Girón-Calva, L. Huttunen, J. D. Blande, J. K. Holopainen, and T. Klemola. 2015. Do insectivorous birds use volatile organic compounds from plants as olfactory foraging cues? Three experimental tests. *Ethology* **121**:1131-1144.
- Lev-Yadun, S. and M. Inbar. 2002. Defensive ant, aphid and caterpillar mimicry in plants? *Biological Journal of the Linnean Society* **77**:393-398.
- Mäntylä, E., G. A. Alessio, J. D. Blande, J. Heijari, J. K. Holopainen, T. Laaksonen, P. Piirtola, and T. Klemola. 2008a. From Plants to Birds: Higher Avian Predation Rates in Trees Responding to Insect Herbivory. *PLoS ONE* **3**:e2832.
- Mäntylä, E., J. D. Blande, and T. Klemola. 2014. Does application of methyl jasmonate to birch mimic herbivory and attract insectivorous birds in nature? *Arthropod-Plant Interactions* **8**:143-153.
- Mäntylä, E., T. Klemola, P. Sirkiä, and T. Laaksonen. 2008b. Low light reflectance may explain the attraction of birds to defoliated trees. *Behavioral Ecology* **19**:325-330.
- Mäntylä, E., S. Kleier, S. Kipper, and M. Hilker. 2016. The attraction of insectivorous tit species to herbivore-damaged Scots pines. *Journal of Ornithology* **157**: 1-13.
- Marquis, R. J. and C. Whelan. 1996. Plant morphology and recruitment of the third trophic level: subtle and little-recognized defenses? *Oikos* **1**:330-334.
- Ras, M. R., F. Borrull, and R. M. Marcé. 2009. Sampling and preconcentration techniques for determination of volatile organic compounds in air samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **28**:347-361.
- Schoonhoven, L. M., J. J. Van Loon, and M. Dicke. 2005. *Insect-plant biology*. Oxford University Press on Demand: 440 pp.
- Schröder, R. and M. Hilker. 2008. The relevance of background odor in resource location by insects: a behavioral approach. *Bioscience* **58**:308-316.
- Stokes, A. W. 1962. The comparative ethology of great, blue, marsh, and coal tits at a winter feeding station. *Behaviour* **19**:208-218.

- Šmilauer, P. 1998-2007. Moderní regresní metody. Biologická fakulta JU České Budějovice: 168 pp.
- Team, R. C. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Turini, A., P. Veselý, and R. Fuchs. 2015. Five species of passerine bird differ in their ability to detect Batesian mimics. *Biological Journal of the Linnean Society* **117**: 832-841.
- Turlings, T. C., J. H. Loughrin, P. J. McCall, U. S. Röse, W. J. Lewis, and J. H. Tumlinson. 1995. How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**:4169-4174.
- Tvardíková, K. and R. Fuchs. 2011. Do birds behave according to dynamic risk assessment theory? A feeder experiment. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **65**:727-733.
- Vallat, A., H. Gu, and S. Dorn. 2005. How rainfall, relative humidity and temperature influence volatile emissions from apple trees in situ. *Phytochemistry* **66**:1540-1550.
- Vet, L. E. and M. Dicke. 1992. Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. *Annual review of entomology* **37**:141-172.

Závěr

Ve své magisterské práci jsem naplnila téměř všechny cíle, které jsem si vytyčila. Pomocí prvního pokusu se mi podařilo dokázat, že:

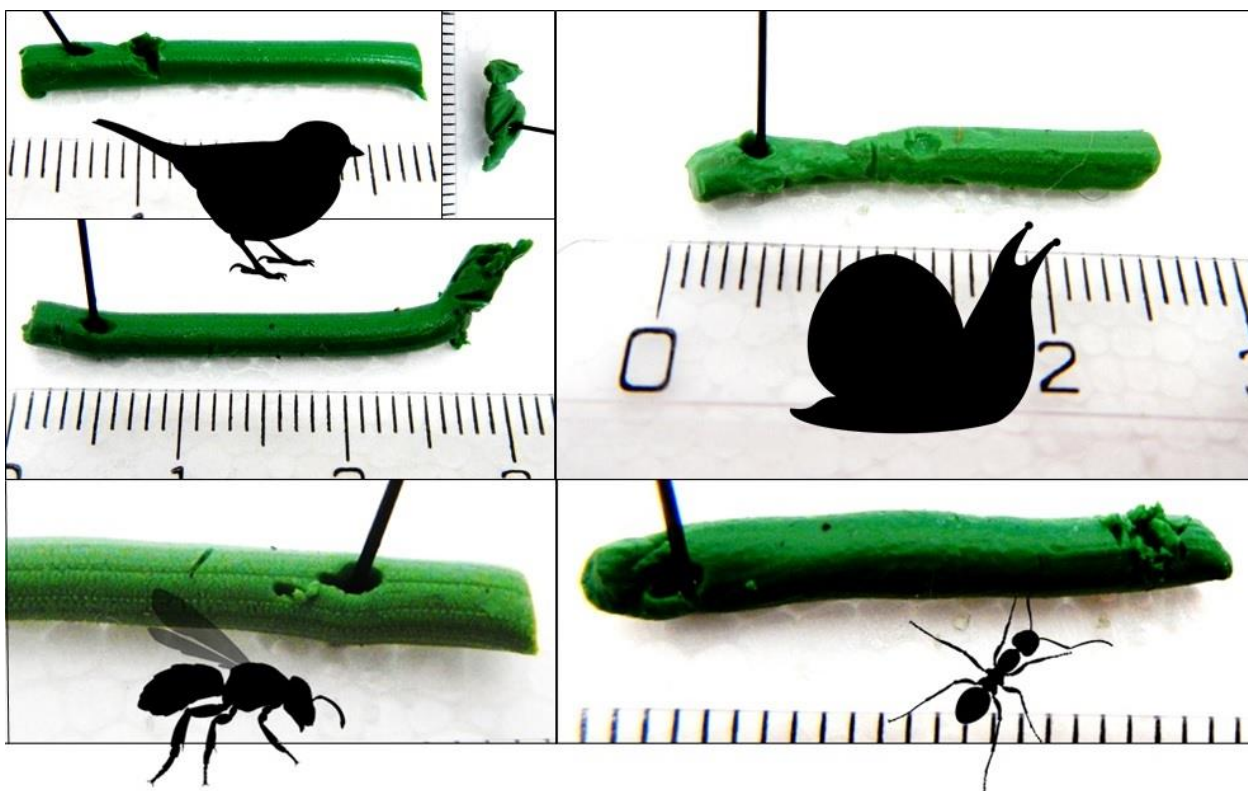
- Pomocí metyl-jasmonátu je možné indukovat produkci VOC podobných těm, které jsou vylučovány rostlinami při napadení býložravým hmyzem.
- Hmyzožraví ptáci hledají potravu preferenčně na rostlinách ošetřených MeJA.
- Nepodařilo se mi však explicitně dokázat, jestli a které chemicky indukované VOC jsou atraktivní pro hmyzožravé ptáky hledající potravu.

V druhém, klecovém, pokusu jsem prokázala, že:

- Sýkory modřinky využívají při hledání potravy na krátkou vzdálenost preferenčně vizuální signál vytvořený býložravým hmyzem.
- Sýkory modřinky se vyhýbají hledání potravy na keři, který vysílal pouze chemický signál indukovaný býložravým hmyzem. Důvody tohoto chování se bohužel nepovedlo vysvětlit.
- Sýkory koňadry naopak nevykazovaly rozdílné reakce na námi předkládané signály (tj. keře vysílající pouze chemický či vizuální signál, kombinace obou nebo žádný signál).

Nepodařilo se nám plně replikovat dřívější pokusy ukazující pozitivní reakci sýkor koňader vůči rostlinám vysílajícím chemický signál.

Přílohy



Obr. P1: Příklady otisku kousanců predátorů v plastelínové housence.

Tabulka P1: Látky, které běžně vylučuje vrba šedá. Sloučeniny jsou uvedeny v původním znění a řazeny abecedně; upraveno podle (Tollsten and Knudsen 1992).

1,4-dimethoxybenzene	camphene	lilac aldehyde	sabinene
2-phenylethanol	cis-beta-ocimene	limonene	salicylaldehyde
8OH	E,E-alpha-farnesene	linalool	sulcatone
alpha-pinene	eucalyptol	methyl salicylate	trans-beta-ocimene
beta-caryophyllene	kewda ether	myrcene	Z3-6Ac
beta-pinene	lilac alcohol	phenylmethanol	Z3-6OH

Tollsten, L. and J. T. Knudsen. 1992. Floral scent in dioecious *Salix* (*Salicaceae*)—a cue determining the pollination system? *Plant Systematics and Evolution* **182**:229-237.

Tabulka P2: Látky, které běžně vylučuje ptačí zob obecný. Sloučeniny jsou uvedeny v původním znění a řazeny abecedně; upraveno podle (Joulain 1987).

1,3,5-trimethoxybenzene	hydroxylinalool
1-phenyl-1-hydroxy-3-2Kt	linalool
1-phenyl-4-2Kt3Kt	me-2-methoxybenzoate
2-phenylacetaldehyde	veratrole
4-E1-propenyl-phenol	
4-Z1-propenyl-phenol	

Joulain, D. 1987. The composition of the headspace from fragrant flowers: further results. *Flavour and fragrance journal* 2:149-155.



Obr. P2: Sbíráání napadených plastelínových housenek.



Obr. P3: Sýkora koňadra hledá na keři v pokusné kleci.