

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Zoologie
Studijní obor: Etologie a ekologie



Bc. Anna Stránská

Reakce ptačích predátorů na automimikry u ploštic z čeledi Lygaeidae
Reactions of avian predators to automimicry in milkweed bugs (Heteroptera: Lygaeidae)

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. Mgr. Alice Exnerová, Ph.D.

Praha, 2023

Poděkování

Chtěla bych velice poděkovat své školitelce, doc. Mgr. Alici Exnerové, Ph.D., za odborné rady a konzultace po celou dobu experimentů a po celou dobu psaní této diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat své rodině, Márovi a přátelům za podporu během celého studia.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze

Bc. Anna Stránská

.....

Abstrakt

Automimikry, neboli vnitrodruhová variabilita obranných mechanismů u aposematické kořisti, jsou v přírodě velice častým jevem. Zejména pak u chemicky chráněné kořisti. Tato práce obsahuje dva experimenty. První experiment sledoval reakci naivních predátorů, kterými byly sýkory koňadry (*Parus major*), na automimetickou kořist. Kořisti byly ploštičky pestré (*Lygaeus equestris*). Sýkory byly rozděleny do třech experimentálních skupin a každé skupině byly předkládány tři ploštice, které byly krmeny na umělé potravě s rozdílným množstvím kardenolidů. Kontrolní skupině byla předkládána kořist, která neměla v potravě kardenolidy. Skupina testovaná s nízkou koncentrací dostávala ploštice, které se živily na potravě s nízkou koncentrací kardenolidů a skupina testovaná s vysokou koncentrací dostávala ploštice, které se živily na potravě s vysokou koncentrací kardenolidů. V rámci generalizačního testu pak byla všem skupinám nabízena jedna ruměnice pospolná (*Pyrrhocoris apterus*). Bylo zjištěno, že u skupiny testované s vysokou koncentrací docházelo k rychlejšímu averznímu učení. Tato skupina také zabila a konzumovala méně ruměnic, než druhé dvě skupiny. Skupina testovaná s vysokou koncentrací nejvíce generalizovala na novou černo-červenou kořist, protože měla nejmenší pravděpodobnost útoku na ruměnice. Druhý experiment testoval dospělé sýkory koňadry s umělou kořistí v podobě fotografií hmyzu. Sýkory byly rozděleny do dvou experimentálních skupin. Bylo jim nabízeno deset kartiček s neaposematickou kořistí a deset kartiček s chráněnou aposematickou kořistí (*L. equestris*). Sýkory se musely naučit mezi touto kořistí rozlišovat. Jedné skupině byla nabízena v rámci deseti bloků nepalatabilní kořist s variabilní obranou a druhé skupině s uniformní obranou. Poté následovaly dva bloky generalizačního testu, kde byly sýkorám předkládány jiné chráněné druhy z černo-červeného mimetického komplexu. Ukázalo se, že skupina s variabilní nepalatabilní kořistí se rychleji učila této kořisti vyhýbat, a to zejména v prvních několika blocích. V generalizačním testu se šířka generalizace mezi experimentálními skupinami nelišila.

Klíčová slova: Automimikry, sýkora koňadra, *Lygaeus equestris*, variabilní obrana, averzní učení, generalizace

Abstract

Automimicry, or intraspecific variation in defence mechanisms in aposematic prey, is very common in nature. Especially in chemically protected prey. This study contains two experiments. The first experiment investigated the reaction of naive predators, which were Great tits (*Parus major*), to automimetic prey. The prey was the black-and-red-bug (*Lygaeus equestris*). The tits were divided into three experimental groups and each group was presented with three bugs that were fed on an artificial diet with different amounts of cardenolides. The control group was presented with prey that had no cardenolides in the diet. The group tested with the low concentration received bugs that fed on a diet with a low concentration of cardenolides and the group tested with the high concentration received bugs that fed on a diet with a high concentration of cardenolides. In a generalization test, all groups were then offered a single firebug (*Pyrrhocoris apterus*). It was found that the group tested with the high concentration experienced a higher rate of aversive learning. This group also killed and consumed fewer firebugs than the other two groups. The group tested with high concentration generalized most to novel red-and-black prey because they were least likely to attack the firebug. The second experiment tested adult Great tits with artificial prey in the form of photographs of insects. The tits were divided into two experimental groups. Ten cards with non-aposematic prey and ten cards with protected aposematic prey (*L. equestris*) were offered. The tits had to learn to discriminate between these prey. Within the ten blocks, one group was offered non-palatable prey with variable defenses and the other group was offered prey with uniform defenses. This was followed by two blocks of generalization test where the tits were presented with other protected species from the black-red mimetic complex. It appeared that the group with variable non-palatable prey learned to avoid this prey more quickly, especially in the first few blocks. In the generalization test, the generalization did not differ between the experimental groups.

Keywords: Automimicry, Great tit, *Lygaeus equestris*, variable defense, aversion learning, generalization

Obsah

Úvod	1
Automimikry	2
Aposematismus	2
Automimikry	2
Reakce predátorů na automimetickou kořist.....	3
Čeleď Lygaeidae	5
<i>Lygaeus equestris</i>	6
Sýkora koňadra (<i>P. major</i>).....	7
Experiment 1- Vliv kvantity sekvestrovaných kardenolidů na efektivitu obrany ploštic	8
Cíle a otázky.....	8
Metodika	8
Modeloví predátoři	9
Kořist.....	10
Experiment	10
Statistické metody	11
Latence manipulace s první kořistí.....	11
Učení	11
Projevy diskomfortního chování	12
Generalizace	12
Výsledky	13
Latence manipulace s první kořistí.....	13
Učení	13
Projevy diskomfortního chování	17
Generalizace	18
Diskuze	22
Latence manipulace s kořistí	22
Učení	23
Projevy diskomfortního chování	26
Generalizace	26
Experiment 2- Efekt variability chemické obrany kořisti na rychlost učení a generalizaci	28
Cíle a otázky.....	28
Metodika	28
Modeloví predátoři	28
Umělá kořist	29
Průběh experimentu	30

Pre- trénink	30
Příprava kořisti	30
Trénink	31
Generalizace	31
Statistické metody	37
Rychlost učení	37
Generalizace	37
Výsledky	37
Rychlost učení	37
Generalizace	38
Diskuze	42
Rychlost učení	42
Generalizace	45
Závěr	46
Literární zdroje	48

Úvod

Kořist má dvě hlavní strategie, jak se vyhnout predaci. Jednou strategií je krypte, kdy se kořist snaží být predátorem nezpůsobována. Druhou strategií je, že kořist vysílá predátorovi signál, například ve formě výstražného zbarvení, a tím ho upozorňuje na jeho obranu proti predátorům (Aronsson a Gamberale-Stille, 2008). Výstražné zbarvení můžeme definovat také jako aposematické zbarvení. Je zejména využíváno hmyzí kořistí, ale lze ho nalézt i u jiných živočišných druhů (Komárek, 2004). Predátoři, kteří zaútočí na aposematickou kořist, se mohou následně naučit této kořisti vyhýbat na základě vizuálního signálu. Toho mohou využívat druhy, které mají takzvané Batesovské mimikry. Jeden, nebo několik druhů, které mají Batesovské mimikry, jsou zcela nechráněni a využívají svojí podobnost s chráněným druhem. Obdobným způsobem využívají své podobnosti automimetici, kde někteří jedinci jsou zcela nechráněni, nebo jsou méně chráněni oproti jedincům stejného druhu (Brower et al., 1967; Speed et al., 2006). Jelikož jsou vizuálně nerozeznatelní od chráněných jedinců, jedná se o velice úspěšnou strategii (Svenningsen a Holen, 2007). V přírodě má chemicky chráněná kořist velkou pravděpodobnost, že v rámci druhu bude mít variabilní chemickou obranu (Speed et al., 2012). Variabilita tedy není tak vzácným jevem, jak se dříve myslelo (Skelhorn a Rowe, 2007). Automimikry byly poprvé popsány u motýla monarchy stěhovavého (*Danaus plexippus*) (Brower et al., 1967). Největší výhoda automimetiků, oproti automodelům se zdá být to, že nemají žádné, nebo snížené náklady na svojí obranu (Jones et al., 2013; Speed et al., 2012). Jednou z podčeledí, ve které se automimetici nacházejí, je podčeleď Lygaeinae. Nachází se v ní druhy, které mají aposematické zbarvení (Scudder a Duffey, 1972). Tato podčeleď si ze své potravy sekvestruje srdeční glykosidy a často se živí na takových rostlinách, ze kterých jsou si jedinci schopni obranné látky sekvestrovat. Některé druhy jsou však potravními generalisty a můžeme je vidět, jak se živí na rostlinách z různých čeledí a ne ze všech si mohou obranné látky sekvestrovat (Petschenka et al., 2022). Jedním ze zástupců této čeledi je ploštička pestrá (*Lygaeus equestris*). Ta byla vybrána jako modelová kořist pro experimenty v této práci.

U predátorů může vyvolat přítomnost automimetické kořisti různou reakci. Přítomnost automimetiků může u predátorů vyvolávat větší averzi (Barnett et al., 2014). Dále však může přítomnost automimetiků způsobit větší napadání aposematické kořisti predátory (Singh et al., 2022; Skelhorn a Rowe, 2007).

Tato práce je zaměřená na reakci ptačích predátorů, konkrétně sýkory koňadry (*Parus major*), na automimetickou kořist, která patří do černo-červeného mimetického komplexu.

Práce se skládá ze dvou experimentů. První experiment zkoumá reakci naivních jedinců sýkory koňadry na živé ploštičky pestré (*L. equestris*) a v rámci generalizačního testu reakci na ruměnici pospolnou (*Pyrrhocoris apterus*). Ptáci byli rozděleni do třech experimentálních skupin a každé skupině byly nabízeny ploštice s rozdílnou mírou chemické obrany. Druhý experiment zkoumá reakci sýkor na umělou aposematickou kořist a to, jak rychle se sýkory naučí této kořisti vyhýbat. Ptáci jsou rozděleni do dvou experimentálních skupin a je jim předkládána kořist se stejnou, nebo rozdílnou mírou chemické obrany. Poté je zkoumán vliv variabilní a nevariabilní obrany kořisti na následnou generalizaci. Pro tento experiment byly dospělé sýkory odchyceny v přírodě.

Automimikry

Aposematismus

Aposematismus, neboli výstražný signál je složen ze dvou složek. První složkou je primární obrana, což je například výstražné zbarvení, nebo výstražný zvuk. Tato obrana funguje před samotným napadnutím predátora. Druhá složka je sekundární obrana, která může být například chemická, nebo mechanická (Rojas et al., 2015).

Aposematické zbarvení můžeme popsat jakožto výstražné zbarvení, kdy na sebe kořist upoutává pozornost. Kořist je proti predátorům chráněná. Typickým představitelem tohoto zbarvení je hmyz, ale lze ho najít i u jiných živočišných zástupců. Nejčastěji se vyskytuje ve formě červené, žluté, nebo oranžové barvy. Tyto barvy jsou často doprovázeny barvou černou (Komárek, 2004).

Automimikry

Koncept automimikry byl poprvé popsán u motýla monarchy stěhovavého (*D. plexippus*), kdy bylo ukázáno, že chráněnost dospělců závisí na tom, jestli se larvy živily na toxických, či netoxických rostlinách. Na základě tohoto pozorování se definovaly automimikry jako úplná absence antipredační obrany u jedinců, kde ale ostatní jedinci tohoto druhu jsou chráněni a všichni mají aposematické zbarvení (Brower et al., 1967). Automimikry lze však definovat jako jakoukoliv variabilitu v míře antipredační obrany u aposematické kořisti. Automimikry jsou v přírodě velice častým jevem, zvláště pokud tvoří sekundární obranu

toxiny, protože je složitější rozeznat chemickou obranu oproti například viditelné obraně (příkladem může být přítomnost trnů) (Speed et al., 2006).

Automimeticci využívají své podobnosti s automodely. Predátoři nedokáží jednoduše rozlišit mezi chráněnou a nechráněnou kořistí. Predátoři se mohou naučit vyhýbat se chráněné kořisti. Tuto rovnováhu narušují nechránění jedinci, kdy se pravděpodobnost útoku zvyšuje s počtem automimetiků v populaci (Jones et al., 2013). Pokud je obrana nákladná, nesou tyto náklady pouze automodelové. Být chráněný a žít se na toxické potravě se ale může například vyplatit v případě larev. Pokud žijí na jedovatých rostlinách, tak mají menší pravděpodobnost zkonsumování herbivorem, který se takové potravě vyhýbá (Guilford, 1994). Automodelové častěji přežijí napadení predátorem a zůstanou nezranění (Jones et al., 2013). Naopak náklady spojené s chráněností jedince jsou například sníženost fyzické aktivity, nebo snížený růst (Speed et al., 2012).

Je důležitou otázkou, jestli automimeticci vznikají jen díky rozdílnému prostředí ve kterém žijí, nebo zda-li mají evoluční výhody. Jednou z výhod automimetiků jsou již zmiňované náklady na obranu, jelikož nemají skoro žádné, nebo je mají snížené (Speed et al., 2012). Dále se ukázalo, že kořist, která má variabilní obranu, může u predátora vyvolat větší averzi (Barnett et al., 2014). Automimeticci mohou vznikat na základě toho, že kořist která obsahuje chemické látky, které nejsou v populaci tak časté jako chemické látky jiných jedinců stejného druhu, mají sníženou pravděpodobnost úmrtí po setkání s predátorem. Predátor tak ovlivňuje frekvenci jedinců, kteří mají rozdílné složení svých obranných látek (Skelhorn a Rowe, 2005). Ukázalo se, že pokud je v populaci malá frekvence automimetiků například 25%, predátor tuto kořist nerozlišuje. Pokud je však tato frekvence vyšší například 50%, nebo 75%, tak predátoři mezi nimi dokáží rozlišit. Tudiž výhody automimetismu, jako například snížené náklady na obranu, předčí nižší pravděpodobnost úmrtí automodelů po setkání s predátorem. Tento fakt dělá aposematismus stabilní. Z toho vyplývá, že pro automimetiky je výhodné aby se ve fázi, kdy se predátor učí averzi vůči aposematické kořisti, nacházeli v populaci v malé frekvenci, například 25% (Skelhorn a Rowe, 2007).

Reakce predátorů na automimetickou kořist

Predátoři mají několik způsobů, jak reagovat na automimetickou kořist. Jednou z variant je „go-slow“ reakce. Při této taktice nevyvolává aposematické zbarvení u predátorů averzní reakci, při které nechá kořist být, ale toto zbarvení predátorovi signalizuje, že je vysoká šance, že kořist náleží do skupiny, která má velkou pravděpodobnost být chráněná. Proto predátor

přistupuje ke kořisti opatrně a zjišťuje na základě chuti, jestli je kořist chemicky chráněná (Guilford, 1994). Ptáci jsou schopni podle chuti rozlišit kořist, která obsahuje kardenolidy i v takovém množství, které u nich nevyvolá zvracení (Brower a Fink, 1985). „Go-slow“ strategie se vyplatí, pokud diskriminace mezi automimetiky a automodely není pro predátory moc náročná a nákladná hlavně při manipulaci s kořistí. Zároveň tato manipulace nesmí predátorovi ublížit. Díky tomu, že predátor podle chuti pozná chráněnost kořisti se počet automimetiků v populaci snižuje (Guilford, 1994). Když byla ptákům nabídnuta umělá kořist, která byla buď chráněná, nebo nechráněná, ptáci okamžitě zahodili chráněnou kořist a konzumovali nechráněnou kořist. Sice byla použita umělá kořist, ale dá se předpokládat, že automodelové by tento útok predátora, na rozdíl od automimetiků, přežili (Gamberale-Stille a Guilford, 2004).

Podobnou strategii můžeme nalézt u skákavky *Phidippus audax*. Když byly skákavce nabízeny chránění a nechránění jedinci ploštice *Oncopeltus fasciatus*, konzumovaly pouze nechráněnou kořist. Mají mimotělní trávení a po napadení kořisti vstříknou do jejího těla trávicí enzymy a poté potravu nasají. Pokud je však kořist chráněná (pomocí kardenolidů), skákavka ucítí hořkou chuť a přestane kořist konzumovat. Jelikož ochutná jen malé množství kořisti, nedostane do těla mnoho toxinů a není pro ní tato konzumace příliš nebezpečná (Skow a Jakob, 2006). Kudlanky *Hierodula patellifera* jsou dalším živočišným druhem, který dokáže ochutnat a odhodit kořist na základě hořké chuti (Singh et al., 2022). Kudlankám byla nabízena kořist v podobě pilatky *Athalia rosae*. Pilatky si z živné rostliny (*Ajuga reptans*) dokáží prostřednictvím farmakofágie vytvářet toxické látky zvané klerodanoidy. Ty pilatky, které měly přístup k rostlinám, byly chráněné a setkání s kudlankou většinou přežily a pilatky bez přístupu k této rostlině pak byly zpravidla konzumovány a setkání s kudlankou pro ně bylo smrtelné (Singh et al., 2022).

Další strategií je odstraňování nejvíce toxické části těla kořisti. Při pozorování dlaskovců (*Pheucticus melanocephalus*) ptáci velké množství chycených monarchů stěhovavých (*D. plexippus*) pustili. Tu část motýlů, kterou se rozhodli konzumovat, vypreparují a zbytek odhodí na zem. Tato odvržená část je tím větší, čím větší je koncentrace kardenolidů v kořisti. Tímto způsobem pták sníží množství přijatých kardenolidů. V tomto experimentu dlaskovci odvrhovali zejména kutikulu, ve které je obsaženo velké množství kardenolidů (Fink a Brower, 1981). Něco podobného můžeme pozorovat u kudlanek *Tenodera sinensis*. Když se krmily na larvách monarchy stěhovavého (*D. plexippus*), všechny kudlanky vykazovaly stejné chování a nechávaly z těchto larev vypadnout střevo. Takto odvrhly přibližně 40% biomasy.

Pokud jim byla nabídnuta nechráněná kořist, toto chování kudlanky nevykazovaly (Rafter et al., 2013).

Čeď Lygaeidae

Čeď Lygaeidae patří do úspěšné skupiny ploštic a můžeme zde nalézt hodně druhů, které jsou aposematicky zbarvené (Aldrich, 1988). Konkrétně podčeď Lygaeinae obsahuje druhy, které mají výstražné zbarvení. Zbytek čeledi má většinou kryptické zbarvení v odstínech hnědé a černé (Scudder a Duffey, 1972). Nejčastějšími predátory této čeledi jsou ptáci a létající hmyz. Jsou chemicky chráněny dvojitým způsobem. Prvním je sekrece z metathorakálních žláz (Schaefer, 1972) a jsou tedy chemicky chráněné, i pokud se živí na netoxické potravě. Zároveň mají ale i druhý způsob obrany, který však je závislý na potravě (Tullberg et al., 2000). Tato čeď se živí na toxických rostlinách čeledi toješťovití (Apocynaceae), ze kterých si sekvestrují obranné látky (Aldrich, 1988). Látky, které si ploštice z potravy sekvestrují, se nazývají kardenolidy a patří do skupiny srdečních glykosidů. Můžeme je nalézt na dorzolaterální straně jejich těla (Scudder a Duffey, 1972). Kardenolidy se ukládají v bilaterálním rozvětveném systému, který vznikl přeměnou integumentu (Bramer et al., 2017). Aby byly ploštice schopné sekvestrace obranných látek, musejí mít několik adaptací. Je to například rezistence na kardenolidy, obsažené v jejich živných rostlinách. Jejich Na⁺/K⁺ ATPázy jsou z velké míry rezistentní vůči kardenolidům, dokonce více rezistentní než u motýla monarchy stěhovavého (*Danaus plexippus*), který si také dokáže sekvestrovat kardenolidy ze své potravy (Bramer et al., 2015). Dále jsou ploštice schopny si toxiny akumulovat z potravních zdrojů a transportovat je do těla přes střevní epitel (Petschenka et al., 2022).

Ve výsledku má tato čeď sadu vlastností, která souvisí s chemickou obranou tvořenou sekvestrací. Jedná se o aposematické zbarvení, odolné Na⁺/K⁺ ATPázy a mechanismy, díky kterým dokáží nahromadit, skladovat a uvolňovat toxiny. Tyto vlastnosti mohou být jako fyziologická preadaptace k sekvestraci toxinů z nových zdrojů (Petschenka et al., 2022). Tato čeď vyhledává především potravu obsahující srdeční glykosidy, některé druhy jsou však potravní generalisté a živí se na rostlinách z mnoha rostlinných čeledí (Petschenka et al., 2022). Příkladem je *Lygaeus equestris*, který byl nalezen na přibližně 60 rostlinách z přibližně 20 čeledí (Kugelberg a Solbreck, 1972). Část z těchto rostlinných druhů neobsahuje toxiny, a tak nejsou ploštice schopné si z nich sekvestrovat své obranné látky. Tato čeď je spojována s rostlinou čeledi toješťovití (Apocynaceae). Dokáží si však obranné látky sekvestrovat i

z jiných hostitelských druhů rostlin. Ukázalo se, že 3 druhy ploštic z čeledi Lygaeidae ploštička pestrá (*L. equestris*), ploštička nádherná (*Horvathiolus superbus*) a ploštička jižní (*Spilostethus pandurus*) se mohou nacházet na rostlinách z čeledi chřestovité (Asparagaceae), brukvovité (Brassicaceae), jitrocelovité (Plantaginaceae) a pryskyřníkovité (Ranunculaceae). Všechny tyto rostlinné čeledi produkují srdeční glykosidy, ze kterých pak ploštice mohou sekvestrovat svoji obranu (Petschenka et al., 2022). Také bylo zjištěno, že jsou ploštičky luční (*Spilostethus saxatilis*) schopné sekvestrovat i kolchicin z rostliny ocún podzimní (*Colchicum autumnale*) (Colchicaceae). Jedná se sice o chemicky zcela odlišnou látku, která má však shodně malé lipofilní molekuly a nepotřebuje enzymatickou aktivitu pro to, aby byla toxická (Petschenka et al., 2022). Díky této potravní různorodosti ploštic je tato čeleď ideální pro studium automimetismu.

Jelikož jsou ptáci hlavními predátory této čeledě (Schaefer, 1972), jsou schopni se naučit těmto plošticím vyhýbat, pokud s nimi mají negativní předchozí zkušenost (Gamberale-Stille a Tullberg, 1999; Sillén-Tullberg et al., 1982). Stejně tak i bezobratlí jsou schopni se naučit vyhýbat aposematickým plošticím. Například kudlanka *Tenodera ardifolia sinens* je schopna se naučit vyhýbat ploštici *O. fasciatus* (Berenbaum a Miliczky, 1984).

Jelikož se mohou ploštice živit na různé potravě, tak nechránění jedinci mohou těžít z podobnosti k jedincům, kteří jsou stejného druhu, ale jsou chráněni (Burdfield-Steel a Shuker, 2014). Pokud má například kudlanka předchozí zkušenost s chráněnou ploštici *O. fasciatus*, vyhýbá se pak i takovým jedincům *O. fasciatus*, kteří se živili pouze na semenech slunečnice. To poukazuje na to, že se nechránění jedinci mohou vyhnout predaci na základě podobnosti s chráněnou kořistí (Berenbaum a Miliczky, 1984). Ukázalo se také, že pokud má nymfa ploštice na výběr mezi semeny klejchovitých rostlin a semeny slunečnice, dá přednost semenům klejchovitých rostlin (Burdfield-Steel et al., 2013). Chemická obrana může být předána rodiči do potomstva (Newcombe et al., 2013). Ploštice *O. fasciatus* je schopna naklást vajíčka, které v sobě mají obsažené kardenolidy a jsou tak chráněny proti predátorům. Tento přenos kardenolidů je z velké části zajištěn od matky, ale část kardenolidů se přenáší i od otce (Newcombe et al., 2013).

Lygaeus equestris

L. equestris, neboli ploštička pestrá se řadí do čeledi Lygaeidae, podčeledi Lygaeinae, rodu *Lygaeus*. Jedná se monofiletickou skupinu (Bramer et al., 2015). To, z jaké rostliny si ploštice sekvestrují své obrané látky, ovlivňuje jejich účinek (Pokharel et al., 2020). V

pokusech se zlatoočkou obecnou (*Chrysoperla carnea*) jako s predátorem se ukázalo, že živná rostlina ovlivňuje pravděpodobnost přežití plošnice. Plošnice se v tomto experimentu krmily buď na hlaváčku jarním (*Adonis vernalis*), nebo na náprstníku červeném (*Digitalis purpurea*). Pouze ty plošnice, které se živily na semenech *D. purpurea*, byly chráněné proti larvám zlatooček. U zlatoočky byla v tomto případě pozorována chuťová averzní reakce, která se projevila čištěním mandibul po ochutnání kořisti. Ukázalo se však, že si *L. equestris* sekvestruje menší množství kardenolidů z *D. purpurea* oproti *A. vernalis*. To naznačuje, že nezáleží tak na množství sekvestrovaných látek, ale spíše na strukturním rozdílu (Pokharel et al., 2020). Když se porovnaly plošnice živící se na slunečnici a na *A. vernalis*, zjistilo se, že ty které byly vychovávané na *A. vernalis* vykazovaly nižší ochotu uvolňovat autogenně syntetizovanou sekreci než ty, které byly krmeny na slunečnici. Některé autogenně syntetizované látky, které byly dominantní u ploštic krmených na slunečnici, u ploštic krmených *A. vernalis* úplně chyběly, nebo se nacházely v menším množství. To naznačuje trade-off mezi sekvestrací obranných látek z živných rostlin a autogenně syntetizovanou sekrecí (Havlikova et al., 2020).

Sýkora koňadra (*P. major*)

Modelovým predátorem pro experimenty této práce byla vybrána sýkora koňadra (*P. major*). Dospělé sýkory patří mezi středně velké ptáky a dorůstají velikost 13,5-15 cm. Jsou to insektivori a živí se převážně hmyzem a semeny (Exnerová et al., 2003; Svensson et al., 2012). Mají palearktické rozšíření. Žijí v lesích, ale i v městských parcích a zahradách. Lze je často nalézt v okolí krmítek. V průběhu roku žijí převážně solitérně, ale v zimě se shlukují do smíšených hejn (Cramp, 1993; Svensson et al., 2012).

U sýkor rozlišujeme dvě rozdílné personality. První variantou jsou „fast“ jedinci, kteří jsou smělí, více riskují, jsou agresivnější, rychleji prozkoumávají nové prostředí, ale jen povrchově a mají častou tendenci ke kopírování chování jiných jedinců. Druhou variantou jsou „slow“ jedinci, kteří jsou naopak nesmělí, méně riskují, jsou méně agresivní, více inovativní, nové prostředí prozkoumávají pomalu, ale více pečlivě a jsou méně závislí na ostatních jedincích (Exnerová et al., 2010).

Sýkory koňadry nejsou příliš neofobní stejně jako sýkora uhelníček (*Periparus ater*) a jsou méně neofobní než sýkora modřinka (*Cyanistes caeruleus*). U modřinek neofobie déle přetrvává. Sýkory koňadry jsou ve výsledku nejvíce smělé, což by se dalo přikládat k tomu, že jsou z těchto tří druhů největší (Adamová-Ježová et al., 2016). U naivních jedinců sýkory

koňadry se neprokázala vrozená averze vůči černo-červené kořisti (Exnerová et al., 2007) a musí se až v průběhu času naučit této kořisti vyhýbat. Díky tomuto faktu jsou ideálním modelem pro studium averzního učení u aposematické kořisti. Naopak naivní modřinky se této kořisti vyhýbají, a proto jsou dobrým modelem pro studium vrozeného vyhýbání se kořisti. Jak už ale bylo zmíněno výše, může v tom hrát velkou roli neofobie modřinek (Exnerová et al., 2007). Sýkory jsou schopny generalizace, která následuje po averzním učení. V ní hraje důležitou roli černo-červené zbarvení kořisti. Pokud byla v averzním učení použita černo-žlutá kořist, nebyly pak sýkory v generalizaci tak úspěšné (Svádová et al., 2009). I v případě, kdy byla kořist zbarvena dočerna, se u ptáků neukázala schopnost generalizace na tuto kořist, jelikož zaútočili na stejný počet kořisti, jako při averzním učení (Doktorovová et al., 2019). Dospělým sýkorám, odchyceným v přírodě, byla nabídnuta ruměnice pospolná (*Pyrrhocoris apterus*). Ta byla barevně modifikována tak, aby část kořisti neměla aposematické zbarvení. Sýkory více útočily na kořist bez aposematického zbarvení, a když byla sýkoře nabídnuta kořist s aposematickým barvením, naučila se této kořisti rychleji vyhýbat. Také reakce na kořist se lišila. Aposematická kořist útok sýkory přežila a sýkora s ní manipulovala velice opatrně. Neaposematická kořist byla po manipulaci často zabita (Exnerová et al., 2003).

Experiment 1- Vliv kvantity sekvestrovaných kardenolidů na efektivitu obrany ploštic

Cíle a otázky

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit vliv kvantity sekvestrovaných kardenolidů na efektivitu obrany ploštic a na mimetické vztahy k dalším druhům z černo-červeného mimetického komplexu.

Otázky, které jsme si položili, jsou:

- Má kvantita sekvestrovaných kardenolidů vliv na efektivitu obrany ploštice?
- Ovlivňuje kvantita sekvestrovaných kardenolidů vztah k dalším druhům z černo-červeného mimetického komplexu?

Metodika

Tento experiment probíhal na Přf UK v experimentálních chovech obratlovců. V místnosti byla umístěna dřevěná klec o rozměrech 70 x 70 x 70 cm. Jedna strana klece byla

tvořena jednosměrně průhledným sklem, aby testovaný pták neviděl experimentátora a nebyl jím vyrušován. V přední části klece byl umístěn otáčivý karusel, pomocí kterého byla predátorovi nabízena experimentální kořist. Ve vzdálenosti 30 cm od přední strany a 30 cm od spodu klece bylo umístěno bidýlko, odkud měl predátor dobrý výhled na karusel. V rohu klece byla umístěna miska s vodou. Celá klec byla osvětlena seshora dvěma zářivkami (Biolux, Osram), které simulují denní světlo.

Modeloví predátoři

Modelovými predátory pro tento experiment byly juvenilní sýkory koňadry, které byly ve věku 12-14 dní vybrány z hnízdních budek a odchovány ručně. Budky se nacházely v lesoparku Cibulky a na Velké Skále v Troji. Sýkory byly vychovávány na jaře roku 2022 a 2023. V době, kdy byly umístěny v boxech, byly krmeny směsí pro ruční odchov ptáků (Handmix, Orlux) a larvami potěmníka moučného (*Tenebrio molitor*), (dále jako moučný červ). Po dosažení vzletnosti byly přemístěny do menších klecí, kde byly také krmeny směsí pro ruční odchov ptáků (Handmix, Orlux) a moučnými červy. Když se naučily samostatnému krmení, byly přesunuty do klece, kde jim byla nabízena vaječná směs Expert Egg Food (Orlux), směsi pro hmyzožravé ptáky Uni Patee (Orlux), Gold Patee (Orlux), Insect Patee (Orlux) a piškoty. Krmivo bylo doplňováno o vitamíny Roboran a Kombisol AD3E. Klec v experimentálních chovech obratlovců měla rozměry 50 x 50 x 40 cm, měla tři plastová bidýlka a na dně filtrační papír. Dále zde byly dvě napáječky s vodou a dvě misky s potravou- mouční červi a vaječná směs Expert Egg Food (Orlux), směsi pro hmyzožravé ptáky Uni Patee (Orlux), Gold Patee (Orlux), Insect Patee (Orlux) a piškoty. Klece byly označeny magnetickou cedulkou, která obsahovala informace o jednotlivých jedincích. Ptáčata byla individuálně označena barevnými kroužky. K čištění podlahy klece, k výměně vody a k doplňování potravy docházelo každý den. Zároveň byla kontrolována vlhkost a teplota místnosti. Vlhkost se pohybovala v rozmezí 30-50% a teplota v rozmezí 18-24°C. V místnosti byla nastavena fotoperioda, aby měli ptáci světelné podmínky podobně, jako tomu bylo v přírodě. Ruční odchování v laboratorních podmínkách zajistilo, že mláďata neměla předchozí zkušenost s černo-červenou aposematickou kořistí.

Sýkory byly rozděleny do tří experimentálních skupin. V každé skupině bylo 18 jedinců. První skupina byla testována s kořistí s nízkou koncentrací cymarinu. Druhá skupina byla testována s kořistí s vysokou koncentrací cymarinu. Třetí kontrolní skupinu tvořily sýkory, kterým byla prezentována kořist bez cymarinu.

Kořist

Jako kořist byli pro tento experiment použiti dospělci ploštičky pestré *L. equestris* a cvrčci (*Gryllus assimilis*). Cvrčci představovali novou kontrolní kořist, se kterou pták neměl žádnou předchozí zkušenost a je jedlá.

Ploštice pocházely z laboratorních chovů. Jednalo se o F1 generaci z jedinců odchycených v přírodě. Jedna část byla odchycena v Praze a druhá část byla odchycena v Berghausenu. Tato F1 generace byla nejdříve vychována na semenech slunečnice (*Helianthus annuus*) v klimaboxech za stálé teploty 28°C a světelném režimu 16L:8D. Ploštice byly na slunečnici vychovávány do třetího instaru. Od čtvrtého instaru byly krmeny umělou potravou. Přesné složení a průběh výroby umělé potravy jsou uvedeny v práci Pokharel et al., (2021). Pro kontrolní skupinu nebyly do této umělé potravy přidány toxiny. Do potravy pro skupiny s nízkým a vysokým podílem cymarínu byl přidán krystalický ouabain a digitoxin. Tyto dvě skupiny měly v potravě obsaženou rozdílnou koncentraci toxinů, která však odpovídá nízkým a vysokým hodnotám naměřeným u jedinců odchycených na živné rostlině (*Adonis vernalis*) v přírodě (Pokharel et al., 2021). To má vliv na množství sekvestrovaných kardenolidů. Bylo to potvrzeno u ploštic *O. fasciatus*, u kterých se hladina sekvestrovaných kardenolidů signifikantně zvyšovala v závislosti na zvyšujícím se množství kardenolidů v potravě (Heyworth et al., 2023). Ploštice tedy byly rozděleny na tři skupiny a každá skupina byla krmena na rozdílné umělé potravě. Kontrolní skupina měla umělou potravu, ve které nebyly obsaženy kardenolidy. Skupina testovaná s nízkou koncentrací měla v umělé potravě menší množství kardenolidů (2 µg/mg na hmotnost sušiny) a skupina testovaná s vysokou koncentrací měla v umělé potravě větší množství kardenolidů (6 µg/mg na hmotnost sušiny). Původní jedinci byli odchyceni na obou lokalitách a vzniklé F1 generace byly použity pro všechny tři experimentální skupiny.

Jako kořist v generalizačním testu byly použity dospělé ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus*), které byly nasbírané na lípách (*Tilia cordata*) v Botanické zahradě PřF UK.

Experiment

Na začátku experimentu nejdříve probíhal pre-trénink, kterému předcházela přibližně dvouhodinová potravní deprivace. Sýkora byla umístěna v experimentální kleci, na kterou si

musela nejdříve zvyknout. Následně jí byl pomocí otočného karuselu podán moučný červ. Sýkora se tedy musela naučit nebát se karuselu a vzít si z Petriho misky moučného červa.

Poté následoval samotný experiment. Ten byl složen celkem z osmi kol, kdy každé kolo trvalo 5 minut. Prvních šest kol probíhal trénink a poslední dvě kola probíhal generalizační test. Jako první byl sýkoře nabídnut cvrček, kterého musela alespoň částečně zkonzumovat. Pokud ho během prvního kola nezkonsumovala, bylo toto kolo opakováno. Poté byla sýkoře nabídnuta ploštice. Takto se to opakovalo třikrát. Poslední dvě kola byl prováděn generalizační test. V prvním kole generalizačního testu byl sýkoře nabídnut cvrček. V druhém kole byla sýkoře nabídnuta ruměnice pospolná.

Celý experiment byl natáčen na kameru. Dále byl průběh experimentu zaznamenáván v programu Observer XT. Byl psán papírový protokol, kde byla popsána reakce sýkory na kořist a co po manipulaci s kořistí z ploštice zbylo.

Statistické metody

Statistické hodnocení dat pro tento experiment bylo provedeno pomocí programu R 3.5.2 (R Core Team 2018). Byly použity balíčky geepack, MuMIn, lme4 a car (Bartoň, 2009; Bates et al., 2015; Fox a Weisberg, 2019; Halekoh et al., 2006). Nulová hypotéza byla zamítnuta na hladině významnosti 5%.

Latence manipulace s první kořistí

Latence prvního kontaktu predátora s plošticí, kdy se predátor poprvé dotkl kořisti zobákem, byla počítána od začátku kola, kdy byla predátorovi ploštice nabídnuta. Pro hodnocení dat, zda se jednotlivé skupiny liší v délce latence, byl použit lineární model (LM). Data byla logaritmicky transformována. Mezi experimentálními skupinami byla porovnána latence manipulace s první předloženou plošticí a latence manipulace s prvním cvrčkem. Latence byla počítána pomocí lineárního modelu (LM) pro normální rozdělení dat, která byla nejprve logaritmicky transformována. Rozdíl latence útoku na první ploštici u všech jedinců, bez ohledu na experimentální skupinu, byl počítán pomocí párového t-testu.

Učení

Latence útoku na ploštice v porovnání mezi jednotlivými koly a mezi experimentálními skupinami byla analyzována metodou Generalized Estimating Equations (GEE), kde latence

byla logaritmicky transformována. Bylo použito normální rozdělení dat. Experimentální skupiny byly porovnávány za pomoci Waldova testu. Referenční skupinou byla kontrolní skupina a vůči ní byly porovnávány skupiny testované vysokou a nízkou koncentrací.

Byl analyzován útok, zabití, konzumování ploštic a lokalita sběru ploštic v jednotlivých kolech v závislosti na experimentální skupině. Pro statistickou analýzu dat byla využita metoda Generalized Estimating Equations (GEE). Bylo použito binomické rozdělení dat, jedinec a lokalita byli zvoleni jako náhodný faktor a kořist (kontrolní, s nízkou koncentrací, s vysokou koncentrací) a kolo jako fixní faktor. Závislou proměnnou byla manipulace s kořistí (manipuloval/nemanipuloval), zabití kořisti (ano/ne) a konzumace kořisti (ano/ne) v jednotlivých kolech. Pro porovnání jednotlivých skupin, pomocí Waldova testu, byla referenční skupinou kontrolní skupina, vůči které byly porovnávány skupiny testované s vysokou koncentrací a testované s nízkou koncentrací.

Projevy diskomfortního chování

Za projevy diskomfortního chování sýkor jsme považovali čištění zobáku a otřepávání. Toto chování bylo zaznamenáváno v průběhu celého prvního kola, ve kterém pták manipuloval s ploštici. Počítán byl celkový počet čištění zobáku a otřepávání během celého kola. Pro analýzu diskomfortního chování byl použit zobecněný lineární model (GLM) pro poissonovské rozdělení dat.

Generalizace

V generalizačním testu byla vyhodnocována latence útoku predátora na ploštici a dále jestli predátor zaútočil, zabil, nebo konzumoval ploštici v závislosti na experimentální skupině. Latence útoku na ploštici byla počítána od doby, kdy byla ploštice predátorovi nabídnuta. Byl využit lineární model a data byla logaritmicky transformována. Latence byla porovnávána mezi experimentálními skupinami. Pro analýzu útoku, zabití a manipulaci ploštice v závislosti na experimentální skupině v generalizačním testu byl využit zobecněný lineární model (GLM) pro binomické rozdělení dat.

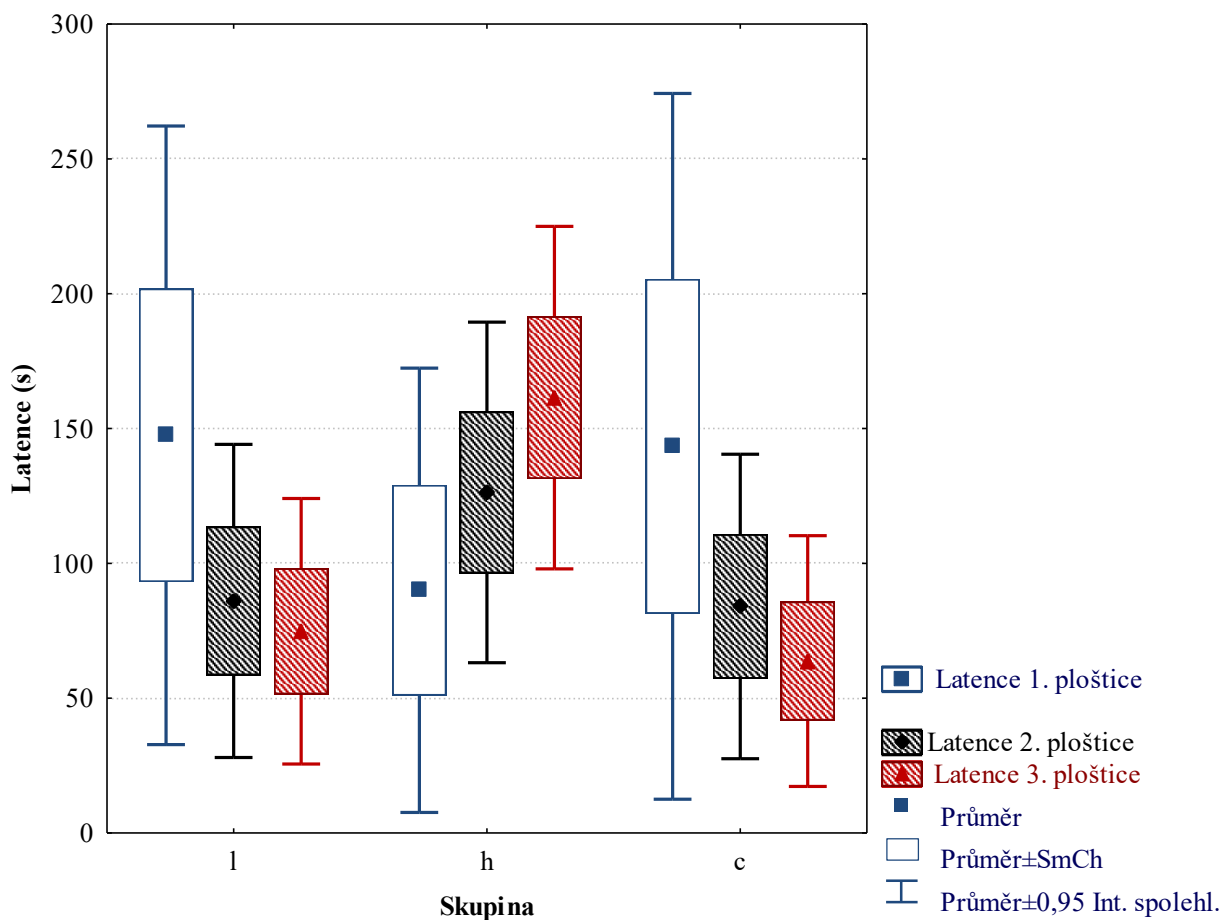
Výsledky

Latence manipulace s první kořistí

Latence manipulace s první plošticí se mezi skupinami nelišila (LM: $F = 0,271$; $df = 2, 51$; $p = 0,764$). Také se mezi experimentálními skupinami nelišila latence první manipulace s cvrčkem (LM: $F = 0,750$; $df = 2, 51$ $p = 0,478$). Latence manipulace s první plošticí se mezi všemi jedinci nelišila (t-test: $t = -0,068$; $df = 53$; $p = 0,946$).

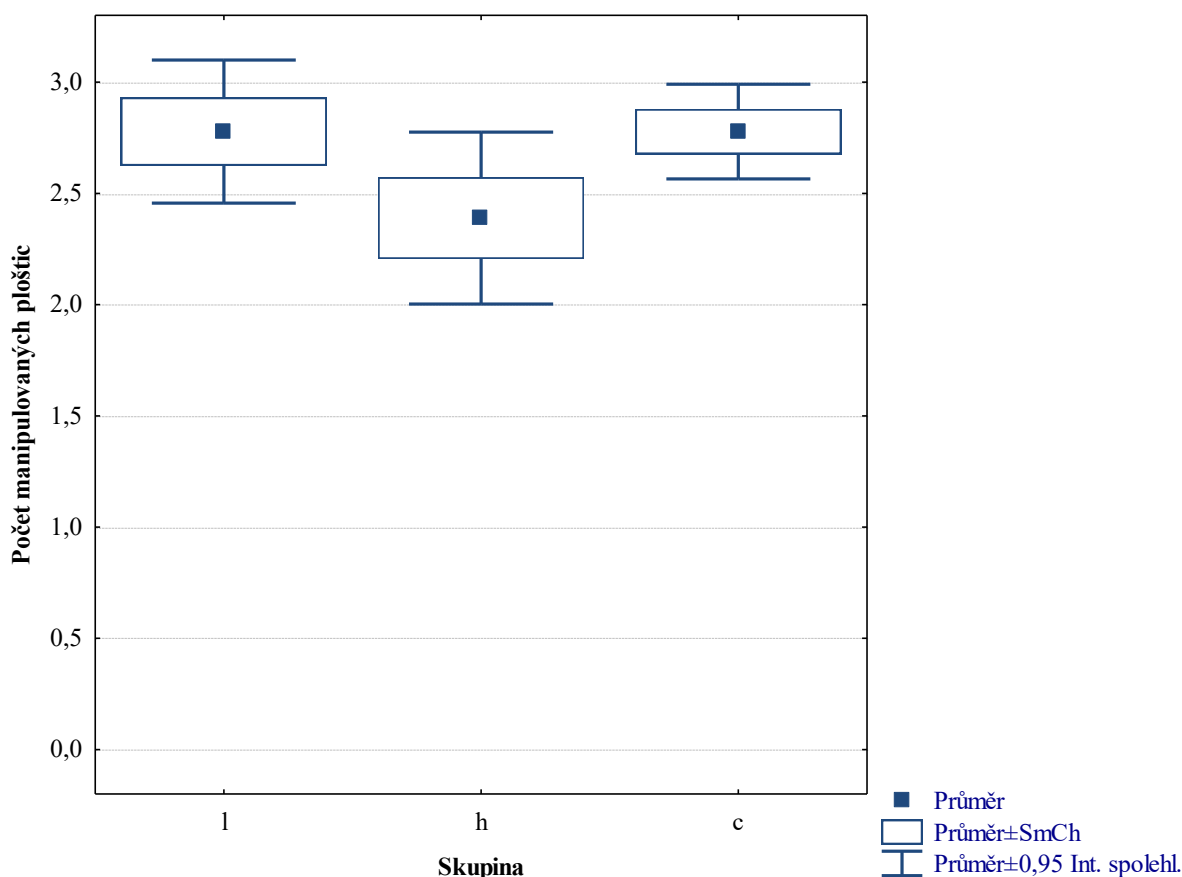
Učení

Na latenci manipulace v průběhu všech tří kol měla vliv interakce experimentální skupiny a kola (GEE: $\text{Chisq} = 6,93$; $df = 2$; $p = 0,031$). Vliv kola (GEE: $\text{Chisq} = 1$; $df = 1$; $p = 0,317$) a experimentální skupiny (GEE: $\text{Chisq} = 1,92$; $df = 2$; $p = 0,382$) se neprokázal. Při porovnání kontrolní skupiny vůči skupině testované s vysokou koncentrací a skupině testované s nízkou koncentrací se prokazatelně liší skupina testovaná s vysokou koncentrací (GEE: Wald statistic = $6,17$; $p = 0,013$), která má opačný trend a latence se mezi koly prodlužuje (viz Graf 1). Skupina testovaná s nízkou koncentrací nebyla prokazatelně odlišná (GEE: Wald statistic = $0,18$; $p = 0,669$).



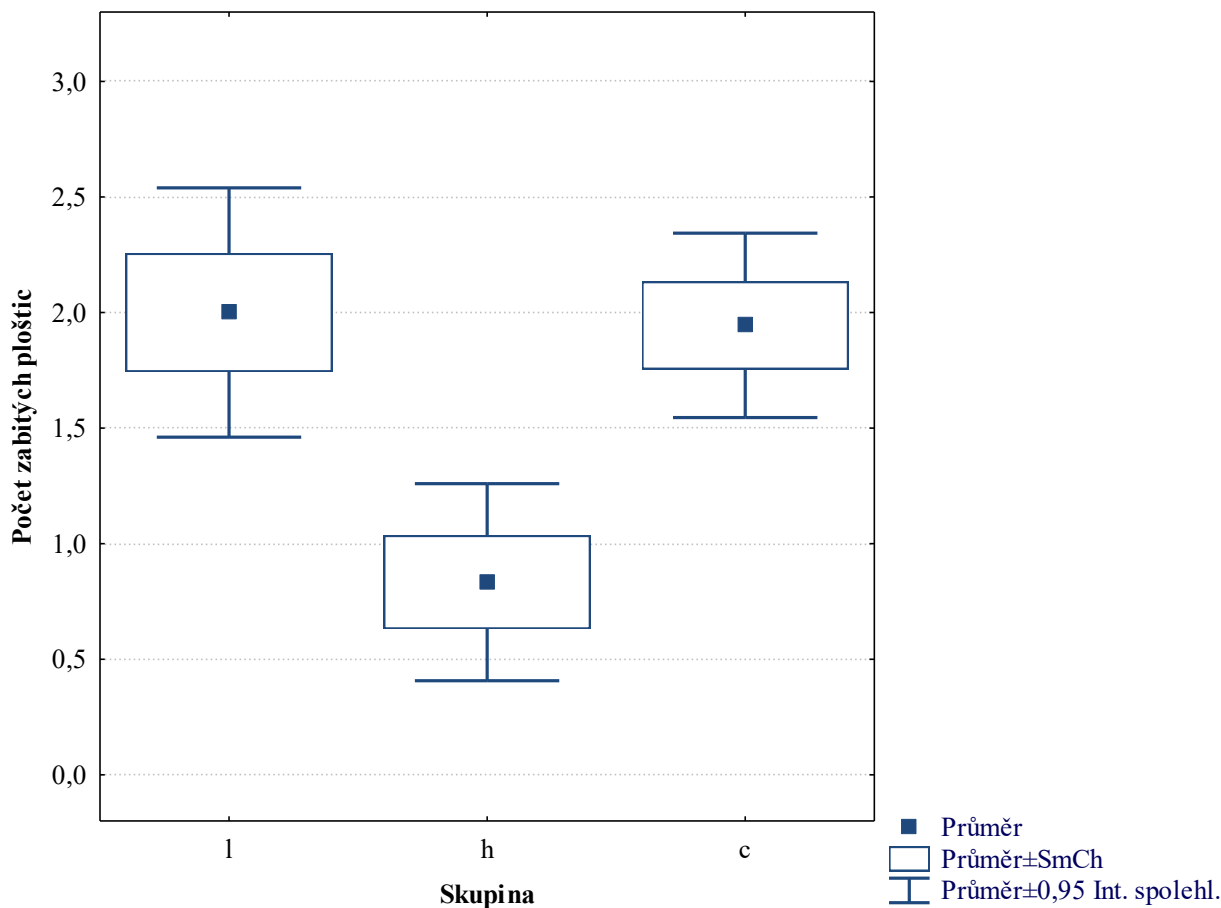
Graf 1: Vliv kola na latenci zaútočení na ploštici během tréninku u tří experimentálních skupin. Osa X znázorňuje tři experimentální skupiny- testovaná s nízkou koncentrací (l), testovaná s vysokou koncentrací (h) a kontrolní skupina (c). Osa Y znázorňuje rychlost zaútočení na ploštici.

Během učení byly sýkorám nabízeny celkem tři ploštice. Na pravděpodobnost útoku mělo vliv kolo (GEE: Chisq= 23,02; df= 1; $p < 0,001$), pravděpodobnost útoku se postupně snižovala. Ve vlivu experimentální skupiny je trend, který však není průkazný (GEE: Chisq= 4,63; df= 2; $p = 0,099$). Na pravděpodobnost útoku neměla vliv lokalita (GEE: Chisq= 0,006; df= 1; $p = 0,939$). Při porovnání skupiny testované s vysokou koncentrací a testované s nízkou koncentrací vůči kontrolní skupině se skupina testovaná s vysokou koncentrací, jak je vidět v Grafu 2, marginálně liší (GEE: Wald. statistic: 3,61; $p = 0,057$). Porovnání skupiny testované s nízkou koncentrací není statisticky významné (GEE: Wald. statistic: 0,01; $p = 1,000$).



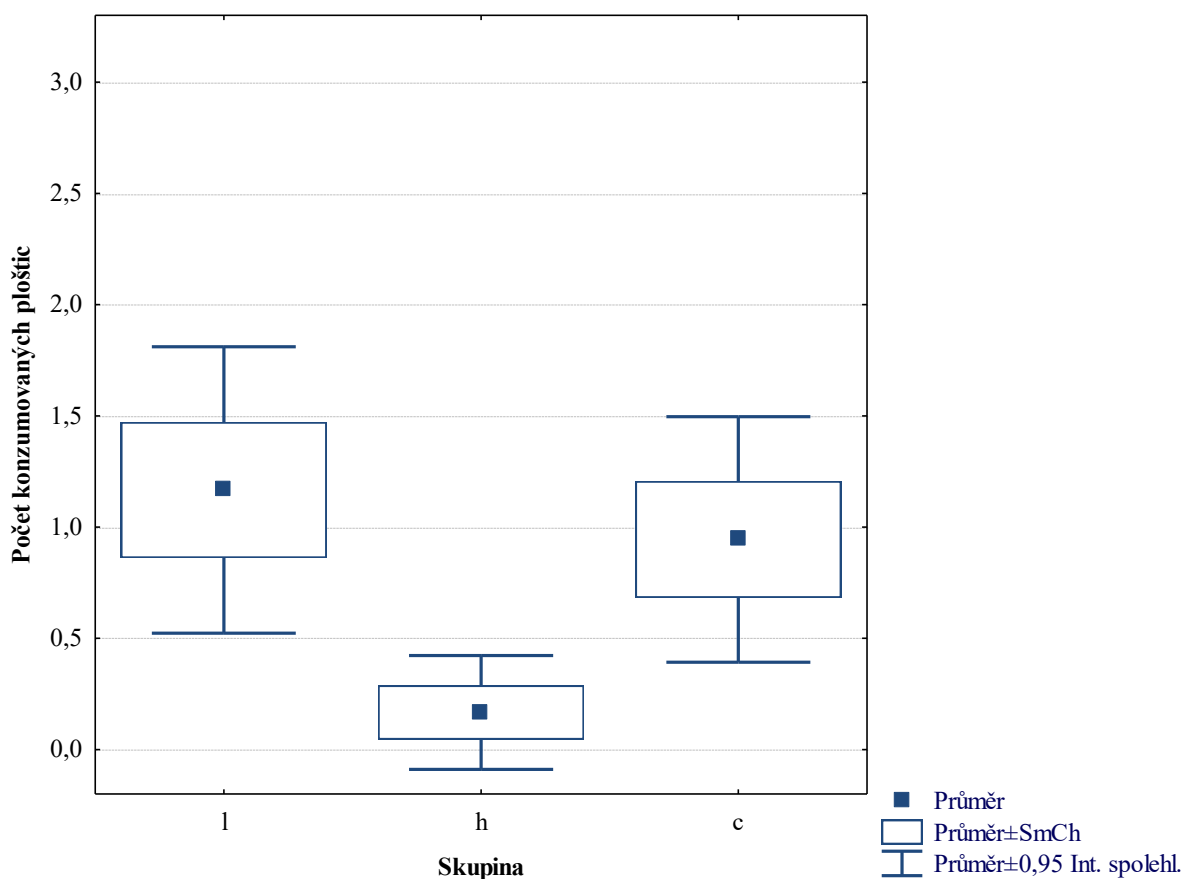
Graf 2: Vliv experimentální skupiny na pravděpodobnost zaútočení na ploštice během tří kol tréninku. Osa X znázorňuje tři experimentální skupiny- testovaná s nízkou koncentrací (l), testovaná s vysokou koncentrací (h) a kontrolní skupina (c). Osa Y znázorňuje počet ploštíc, na které bylo zaútočeno.

Při porovnávání pravděpodobnosti zabití ploštice ve třech kolech tréninku se prokázal vliv kola (GEE: $\text{Chi}^2 = 15,068$; $\text{df} = 1$; $p < 0,001$), kdy se pravděpodobnost zabití snižuje a zároveň se prokázal i vliv experimentální skupiny (GEE: $\text{Chi}^2 = 12,068$; $\text{df} = 2$; $p = 0,002$). Na pravděpodobnost zabití neměla vliv lokalita (GEE: $\text{Chi}^2 = 2,598$; $\text{df} = 1$; $p = 0,107$). Při porovnání kontrolní skupiny vůči skupině testované s vysokou koncentrací a skupině testované s nízkou koncentrací se skupina s vysokou koncentrací výrazně liší (GEE: Wald. statistic: 8,98; $p = 0,002$) a tato skupina má nižší pravděpodobnost zabití ploštice (viz. Graf 3). Skupina testovaná s nízkou koncentrací se neliší (GEE: Wald. statistic: 0,12; $p = 0,732$), (viz. Graf 3).



Graf 3: Vliv experimentální skupiny na pravděpodobnost zabít ploštic během tří kol tréninku. Osa X znázorňuje tři experimentální skupiny- testovaná s nízkou koncentrací (l), testovaná s vysokou koncentrací (h) a kontrolní skupina (c). Osa Y znázorňuje počet ploštíc, které byly zabity.

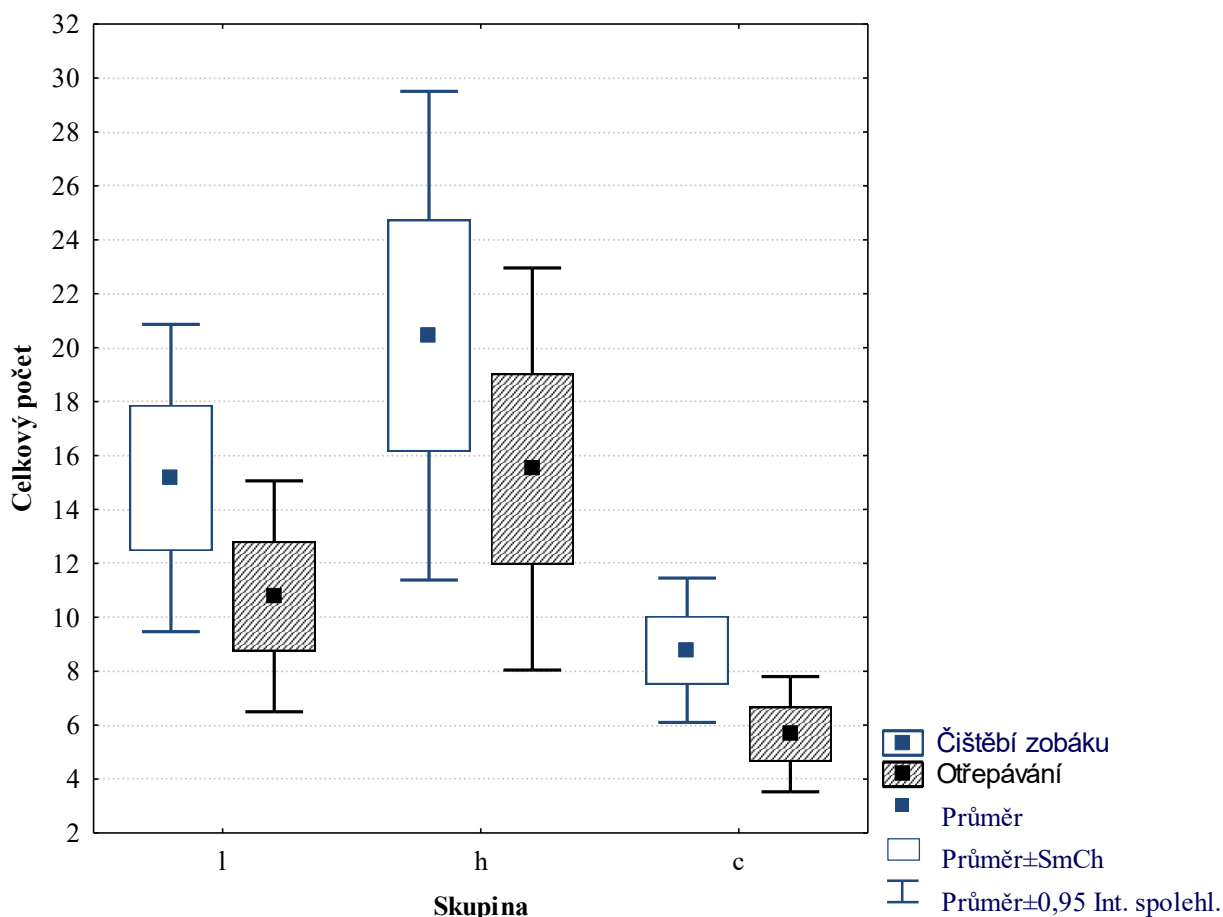
Při porovnání počtu konzumovaných ploštíc během kol v tréninku byl vliv kola statisticky významný (GEE: $\text{Chisq} = 5,653$; $\text{df} = 1$; $p = 0,017$) a pravděpodobnost konzumace ploštíc se v průběhu kol snižovala. Na pravděpodobnost konzumace kořisti neměla vliv lokalita (GEE: $\text{Chisq} = 2,851$; $\text{df} = 1$; $p = 0,101$). Vliv experimentální skupiny byl marginální (GEE: $\text{Chisq} = 7,47$; $\text{df} = 2$; $p = 0,061$). Když se porovnávala skupina testovaná s vysokou koncentrací a skupina testovaná s nízkou koncentrací vůči kontrolní skupině, tak se skupina testovaná s vysokou koncentrací prokazatelně lišila a docházelo u ní ke konzumaci s nižší pravděpodobností (viz. Graf 4), (GEE: Wald. statistic: 3,57; $p = 0,048$). Skupina testovaná s nízkou koncentrací se nelišila (GEE: Wald. statistic: 0,52; $p = 0,472$).



Graf 4: Vliv experimentální skupiny na pravděpodobnost konzumace ploštice během tří kol tréninku. Osa X znázorňuje tři experimentální skupiny- testovaná s nízkou koncentrací (l), testovaná s vysokou koncentrací (h) a kontrolní skupina (c). Osa Y znázorňuje počet ploštíc, které byly konzumovány.

Projevy diskomfortního chování

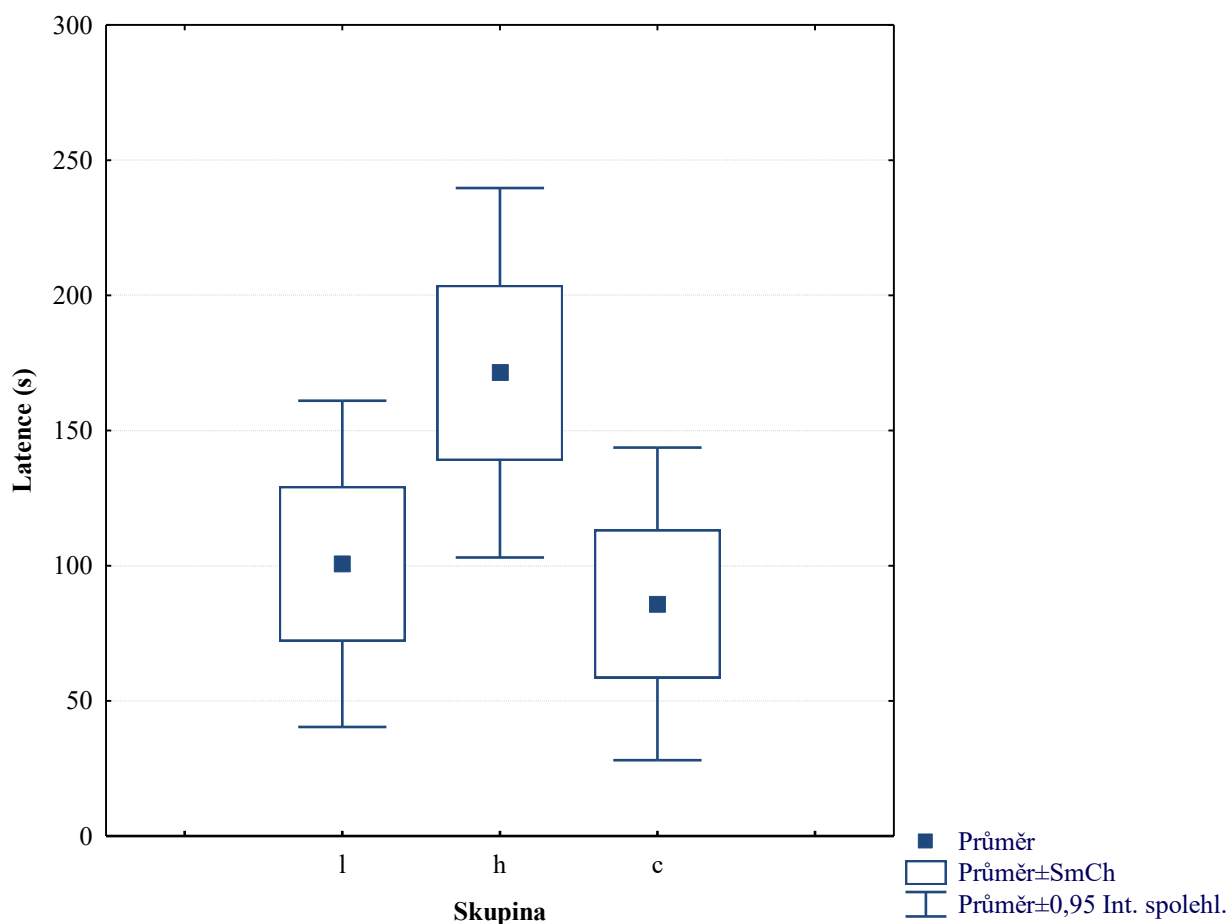
Za diskomfortní chování se považovalo čištění zobáku a otřepávání. Na celkový počet čištění zobáku (viz Graf 5) měla průkazný vliv skupina ($\chi^2 = 86,472$; $df = 2$; $p < 0,001$). Skupina testovaná s vysokou koncentrací (GLM: $z = 8,889$; $p < 0,001$), i skupina testovaná s nízkou koncentrací (GLM: $z = 5,471$; $p < 0,001$) se po manipulaci s plošticí čistila více než kontrolní skupina. Na celkový počet otřepávání, jak je vidět v Grafu 5, měla také průkazný vliv skupina ($\chi^2 = 85,518$; $df = 2$; $p < 0,001$). Skupina testovaná s vysokou koncentrací (GLM: $z = 8,696$; $p < 0,001$), i skupina testovaná s nízkou koncentrací (GLM: $z = 5,256$; $p < 0,001$) se po manipulaci s plošticí otřepávaly více v porovnání s kontrolní skupinou.



Graf 5: Vliv experimentální skupiny na počet čištění zobáku a otřepávání během tří kol tréninku. Osa X znázorňuje tři experimentální skupiny- testovaná s nízkou koncentrací (l), testovaná s vysokou koncentrací (h) a kontrolní skupina (c). Osa Y znázorňuje počet čištění zobáku a otřepávání.

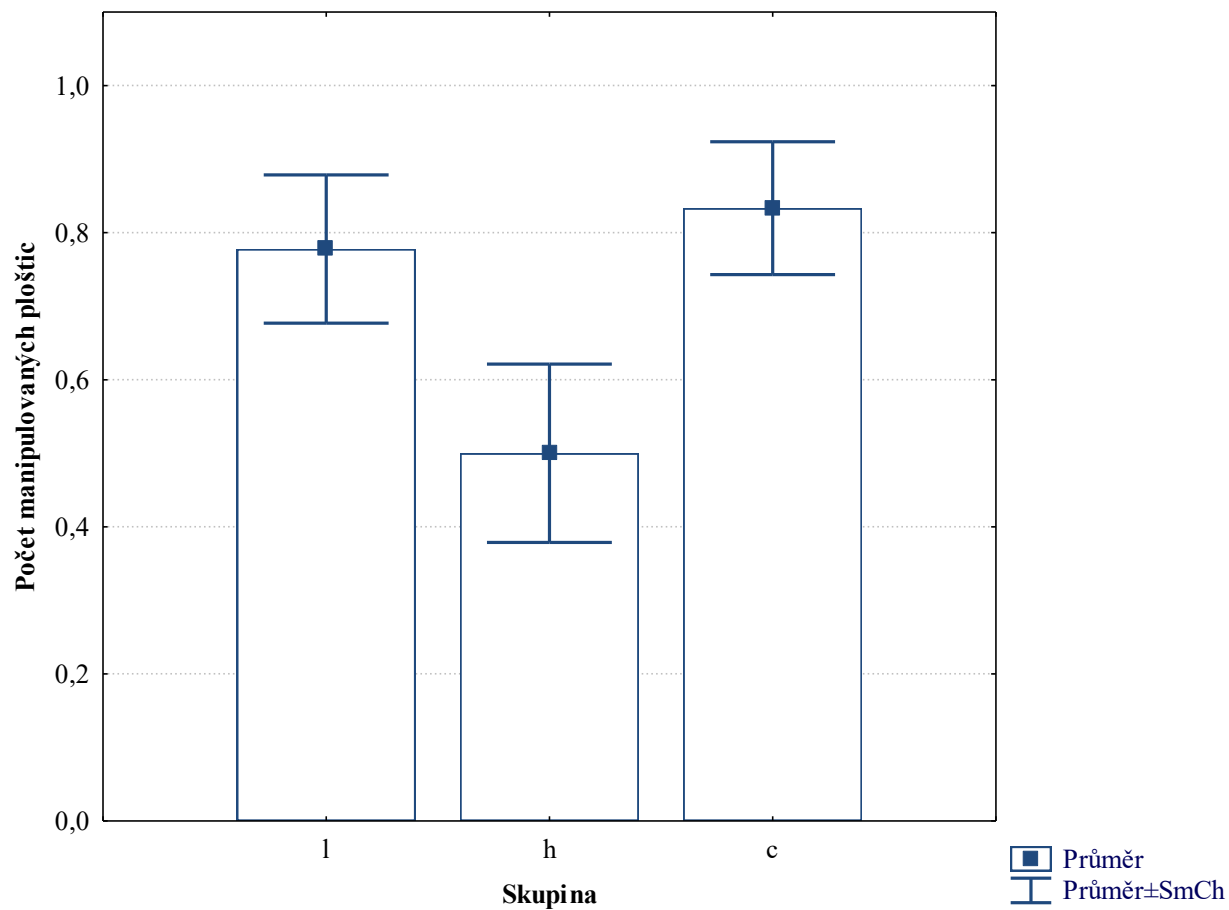
Generalizace

Na latenci útoku na plošnici v generalizaci neměla prokazatelný vliv skupina (LM: $F=1,767$; $df=2, 51$; $p=0,181$). U skupiny testované s vysokou koncentrací, jak je vidět v Grafu 6, můžeme vidět určitý trend, že latence je o něco vyšší, nejedná se však o průkazný rozdíl.



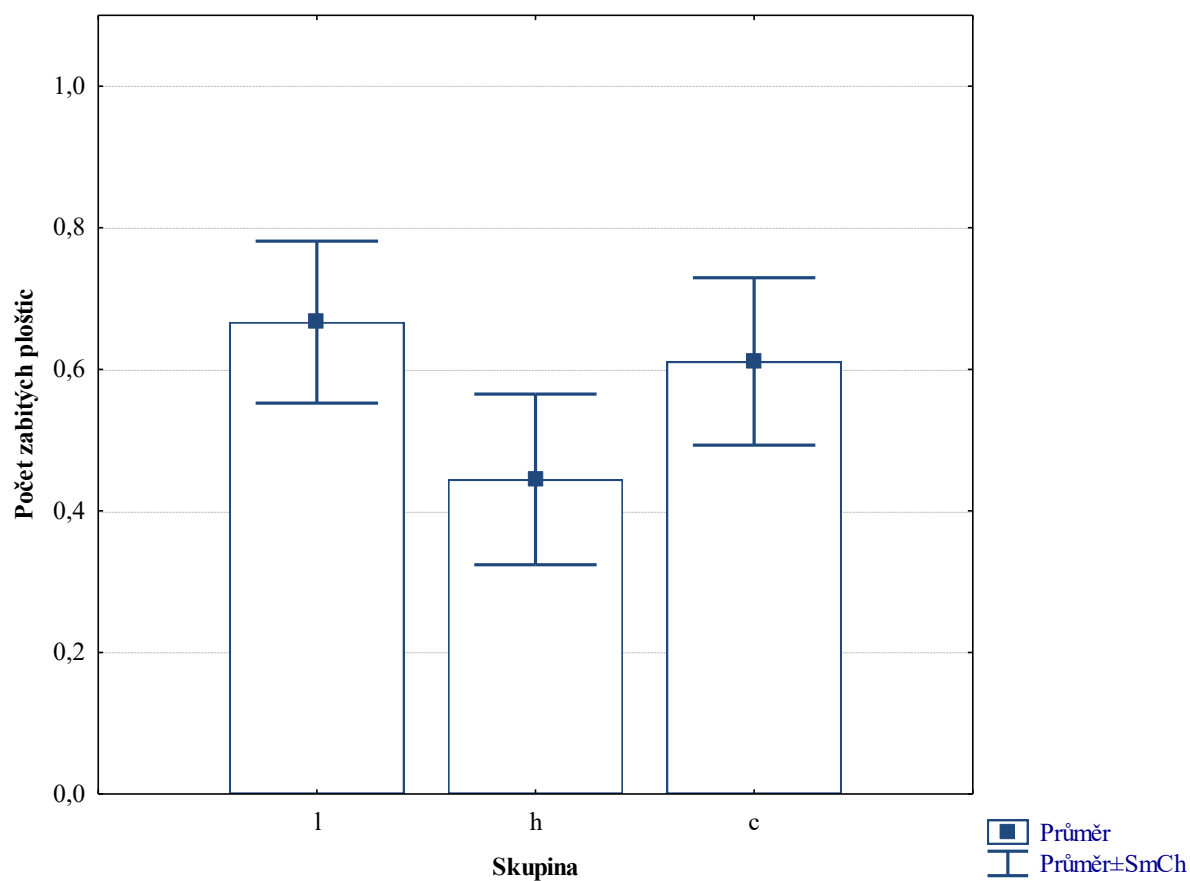
Graf 6: Vliv experimentální skupiny na latenci zaútočení na plošnici během generalizace. Osa X znázorňuje tři experimentální skupiny- testovaná s nízkou koncentrací (l), testovaná s vysokou koncentrací (h) a kontrolní skupina (c). Osa Y znázorňuje dobu latence.

Na pravděpodobnost útoku na plošnici během generalizačního testu měla marginální vliv experimentální skupina (GLM: $\chi^2 = 5,388$; $df = 2$; $p = 0,068$). Jak je vidět v Grafu 7, rozdíl v pravděpodobnosti útoku na plošnici při srovnání s kontrolní skupinou se ukázal být průkazný u skupiny testované s vysokou koncentrací (GLM: $z = -2,040$; $p = 0,041$), kdy tato skupina útočila na plošnici méně. U skupiny testované s nízkou koncentrací se pravděpodobnost útoku nelišila (GLM: $z = -0,420$; $p = 0,675$).



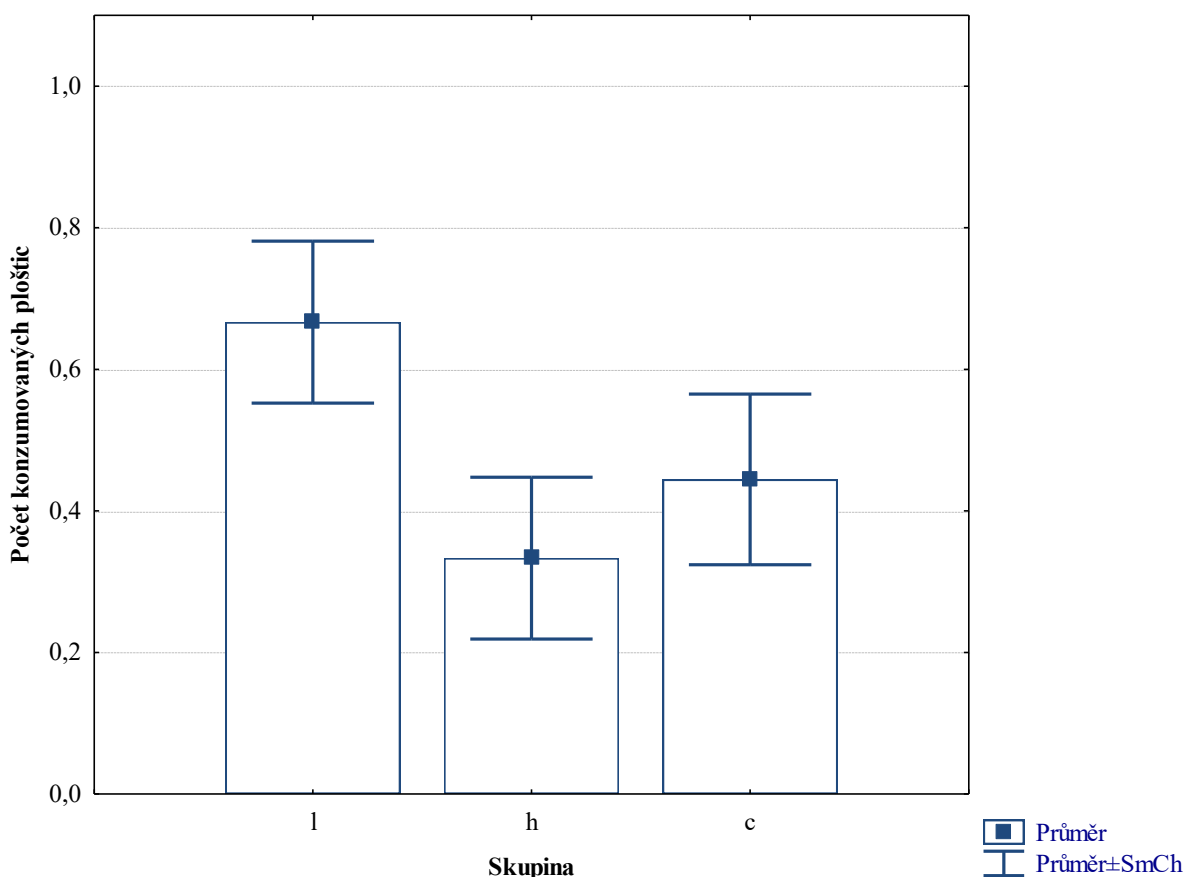
Graf 7: Vliv experimentální skupiny na pravděpodobnost zaútočení na ploštici během generalizace. Osa X znázorňuje tři experimentální skupiny- testovaná s nízkou koncentrací (l), testovaná s vysokou koncentrací (h) a kontrolní skupina (c). Osa Y znázorňuje počet ploštíc, na které bylo zaútočeno.

Na zabití ploštice v generalizaci, jak je vidět v Grafu 8, neměla experimentální skupina vliv (GML: Chisq= 1,968; df= 2; p= 0,374).



Graf 8: Vliv experimentální skupiny na pravděpodobnost zabití ploštice během generalizace. Osa X znázorňuje tři experimentální skupiny- testovaná s nízkou koncentrací (l), testovaná s vysokou koncentrací (h) a kontrolní skupina (c). Osa Y znázorňuje počet ploštic, které byly zabity.

Na konzumaci ploštice v generalizaci, jak je vidět v Grafu 9, neměla také skupina vliv (GML: $\chi^2 = 4,226$; $df = 2$; $p = 0,121$).



Graf 9: Vliv experimentální skupiny na pravděpodobnost konzumace plošnice během generalizace. Osa X znázorňuje tři experimentální skupiny- testovaná s nízkou koncentrací (l), testovaná s vysokou koncentrací (h) a kontrolní skupina (c). Osa Y znázorňuje počet ploštic, které byly konzumovány.

Diskuze

Během tohoto experimentu byly sýkorám nejdříve v rámci tréninku předkládány tři živé plošnice *L. equestris*. Plošnice byly rozděleny na tři skupiny. Jedna skupina se živila na umělé potravě bez přidaných kardenolidů, druhá skupina se živila na umělé potravě s malou koncentrací kardenolidů a třetí skupina se živila na potravě s vysokou koncentrací kardenolidů. V rámci generalizačního testu jim pak byla předložena jedna ruměnice *P. apterus*.

Latence manipulace s kořistí

Latence první manipulace s plošticí a s kontrolním cvrčkem se nelišila mezi experimentálními skupinami. To ukazuje na to, že všechny experimentální skupiny vstupovaly do tréninku se stejnou mírou iniciální opatrnosti vůči nové kořisti, ať už byla kořist aposematická (*L. equestris*) nebo kontrolní (*G. assimilis*). Latence první manipulace s první

ploštici byla u všech jedinců podobná. To podporuje hypotézu, že sýkory koňadry nemají vrozenou averzi vůči černo-červené aposematické kořisti. Ke stejnému výsledku dospěly i další experimenty, které pracovaly s naivními mláďaty sýkory koňadry (Exnerová et al., 2007; Hotová Svádová et al., 2013; Kotlíková, 2023). Černo-žluté zbarvení však může mít pro naivní sýkory averzní účinky. Sýkory tedy mají jistou vrozenou averzi vůči kořisti s černo-žlutým zbarvením (Lindstrom, 1999). Vrozenou averzi vůči černo-červenému zbarvení zkoumala práce, kde kuřatům byli nabídnuti tři hnědě obarvení a tři červeně obarvení mouční červi. Kuřata preferovala hnědě zbarvené červy (Roper, 1990). V tomto experimentu však byli červi nabízeni najednou a tudíž nemuselo nutně jít o vrozenou averzi, ale o potravní preferenci. Další vliv na latenci může mít neofobie predátora. V našem experimentu byla jak aposematická (*L. equestris*), tak kontrolní kořist (*G. assimilis*) pro predátora nová a neofobie se u sýkor koňader neprojevila. Neofobii můžeme nalézt například u sýkor modřinek (Adamová-Ježová et al., 2016; Exnerová et al., 2007). Na neofobii může mít vliv také personalita sýkor. Dalo by se předpokládat, že „slow“ jedinci budou mít větší latenci útoku na kořist (Exnerová et al., 2010). Personalitu jsme však v tomto experimentu netestovali.

Učení

V průběhu učení byly sýkorám nabízeny tři ploštice *L. equestris*. Latence manipulace s plošticemi se mezi koly měnila. U skupiny testované s vysokou koncentrací se latence mezi koly postupně prodlužovala. Tento výsledek je ve shodě s prací (Petschenka et al., 2022), kde se latence útoku naivních sýkor na chráněné ploštice *L. equestris* prodlužovala mezi koly oproti plošticím *L. equestris*, které byly vychovávány na slunečnici. V našem experimentu se u skupiny testované s nízkou koncentrací a u kontrolní skupiny latence mezi koly postupně zkracovala. Ploštice s vysokou koncentrací kardenolidů byly pravděpodobně pro sýkory nejvíce chráněné, takže po nabídnutí další ploštice více váhaly.

Pravděpodobnost útoku na ploštici se mezi koly postupně snižovala. To naznačuje, že u sýkor docházelo k averznímu učení u všech třech experimentálních skupin. Kardenolidy mají hořkou chuť (Renwick, 1996), která mohla pro sýkory sloužit jako averzní podnět. Sýkory jsou schopny averzního učení na základě chuti (Sillén-Tullberg et al., 1982a). Ke stejnému výsledku dospěla i práce Petschenka et al. (2022). Tam se také snižovala pravděpodobnost útoku na chráněnou kořist během tří kol. I u kontrolní skupiny, která se krmila na netoxické potravě se pravděpodobnost útoku mezi koly snižovala. Ploštice, které byly předkládány kontrolní skupině si sice nesequestrovaly kardenolidy z umělé potravy, byly však alespoň částečně chráněny

sekretem z metathorakálních žláz (Schaefer, 1972). I když se míra chemické ochrany u kořisti liší, může být však všechna tato kořist napadána se stejnou pravděpodobností. (Chouteau et al., 2019). To se však v našem experimentu neprokázalo. Pravděpodobnost útoku na chráněné ploštice (*Oncopeltus fasciatus*), krmené na semenech *Asclepias syriaca*, se v průběhu kol snižovala i v případě bezobratlého predátora, konkrétně skákavky (*Phidippus audax*). To ale neplatilo, pokud se ploštice krmila pouze na semenech slunečnice (Skow a Jakob, 2006). Skákavka má mimotělní trávení a chráněnost jedinců pozná okamžitě po zahájení konzumace (Skow a Jakob, 2006). V tomto případě není ochrana pouze pomocí sekretu z metathorakálních žláz dostatečná.

Experimentální skupina testovaná s vysokou koncentrací manipulovala s menším množstvím ploštic, oproti kontrolní skupině. Skupina testovaná s nízkou koncentrací se od kontroly nelišila. Z toho vyplývá, že skupina testovaná s vysokou koncentrací se učila rychleji vyhýbat chráněné kořisti, než skupina testovaná s nízkou koncentrací. Avšak ani jedna experimentální skupina se nenaučila plošticím zcela vyhýbat. To může být způsobeno malým počtem prezentované kořisti. V práci Hotové Svádové et al. (2013) bylo zjištěno, že naivním sýkorám bylo potřeba předložit přibližně 23 ploštic *L. equestris*, aby dodržely kritérium nemanipulovat se třemi plošticemi v řadě. Dle tohoto výsledku měly sýkory v našem experimentu opravdu nízkou pravděpodobnost naučit se plošticím zcela vyhýbat. V práci Petschenka et al. (2022) byly také sýkorám předkládány tři ploštice. Jak bylo zmíněno výše, snižovala se pravděpodobnost útoku na ploštice v průběhu kol a to zejména u kořisti, která se krmila na toxické potravě, ale k úplnému vyhýbání nedošlo (Petschenka et al., 2022). Co se týká bezobratlých živočichů, tak kudlankám stačilo šest a méně setkání s chráněnou plošticí *O. fasciatus*, krmenou na semenech *A. syriaca*, aby se naučily této kořisti vyhýbat.

Pravděpodobnost zabití ploštic se mezi koly postupně snižovala a to u všech experimentálních skupin. Ke stejnému výsledku dospěla i studie Sillén-Tullberg et al. (1982), kde dospělým sýkorám byly předkládány živé ploštice *L. equestris*. V tomto experimentu jim bylo nabízeno celkem 8 ploštic, které byly vychovávané na toliť lékařské (*C. vincetoxicum*) a v posledních kolech byl zabit menší počet ploštic. Pravděpodobnost konzumace ploštic se mezi koly také postupně snižovala u všech experimentálních skupin. To ukazuje na to, že ploštice nebyly pro sýkory atraktivní potravou. Jelikož se konzumace snižovala u všech experimentálních skupin, byla i kontrolní skupina proti ptákům alespoň částečně chráněná a to díky produkci obranných látek pomocí metathorakálních žláz (Schaefer, 1972).

Co se týče pravděpodobnosti zabití a konzumace ploštic mezi experimentálními skupinami, lišila se pravděpodobnost zabitých a konzumovaných ploštic ve prospěch skupiny

testované s vysokou koncentrací. Tato skupina zabila a konzumovala méně ploštic, než druhé dvě skupiny. Experiment (Petschenka et al., 2022) ukázal, že ploštice *L. equestris*, které jsou živeny na toxické potravě (konkrétně na semenech *A. vernalis*), ze které si sekvestrují své obranné látky, často přežívají útok naivních sýkor a téměř nikdy nejsou konzumovány. Ke stejnému výsledku se dospělo i v případě kudlanek (*T. ardifolia sinensis*), kterým když byly nabízeny ploštice *O. fasciatus*, které se krmily na semenech *A. syriaca*, zůstávaly ploštice často naživu, byly puštěny a chyběla jim pouze malá část těla (Berenbaum a Miliczky, 1984). Naproti tomu ploštice živené na slunečnici, byly často sýkorou zabity a alespoň částečně zkonsumovány (Petschenka et al., 2022). Stejně tak tomu bylo i v případě kudlanek, které často zabily nechráněnou plošticí *O. fasciatus* a částečně, nebo zcela ji zkonsumovaly (Berenbaum a Miliczky, 1984). V našem experimentu se ukázalo, že ploštice živené na méně toxické potravě nemají tak účinnou obranu a jsou častěji zabíjeny a konzumovány. Skupina testovaná s vysokou koncentrací a skupina testovaná s nízkou koncentrací si ze své potravy byly schopny sekvestrovat obranné látky (Aldrich, 1988; Schaefer, 1972). U ploštice *O. fasciatus* se ukázalo, že hladina kardenolidů sekvestrovaných plošticí signifikantně vzrůstá s koncentrací kardenolidů v potravě (Heyworth et al., 2023). To stejné můžeme předpokládat i v případě *L. equestris* v našem experimentu. Aby byla chemická obrana co nejúčinnější, měla by mít aposematická kořist toxiny obsažené v orgánech, které jsou na povrchu těla, a na místech, se kterými se predátor setká jako první (Ruxton a Speed, 2006). Ploštice z podčeledi Lygaeinae mají kardenolidy uložené v bilaterálním rozvětveném systému, který vznikl přeměnou integumentu. (Bramer et al., 2017). Nachází se tedy blízko povrchu ploštice.

Sýkory manipulovaly se skupinou testovanou s vysokou koncentrací opatrněji, než s kontrolní skupinou a skupinou testovanou s nízkou koncentrací. Tato strategie se nazývá „go slow“ Při této strategii predátor s aposematickou kořistí zachází opatrně a podle chuti poznává, jestli a jak moc je kořist chráněná (Guilford, 1994). Ptáci jsou schopni rozeznat množství kardenolidů, obsažených v kořisti na základě chuti, a to i v takovém množství, které u nich nevyvolá zvracení (Brower a Fink, 1985). Stejný závěr můžeme vidět i v práci Sillén-Tullberg et al. (1982), kde dospělé sýkory po předchozí zkušenosti s chráněnou *L. equestris* manipulovaly s kořistí více opatrně a nedocházelo vždy k usmrcení ploštice (Sillén-Tullberg et al., 1982b). Když byla kuřatům (*G. gallus domesticus*) nabízena umělá kořist v podobě červených granulí, kuřata zaútočila na tuto kořist a pokud byla chráněná (potřená roztokem chininu), kuřata tuto kořist okusila a zahodila. Dá se předpokládat, že pokud by byla kořist živá, tak by útok přežila. To se ale nedá říct o nechráněné aposematické kořisti (potřená vodou), kterou zcela zkonsumovala (Gamberale-Stille a Guilford, 2004). V dalším experimentu byla

naivním kuřatům *G. gallus domesticus* nabízena kořist v podobě obarvených granulí, které byly fialové a představovaly středně (1% chininu) a silně (4% chininu) chráněnou kořist. Ptáci více odmítali silně chráněnou kořist (Halpin a Rowe, 2010). Tak tomu bylo i v našem experimentu. To se ale neprokázalo v práci Chouteau et. al. (2019) kde se nelišila pravděpodobnost útoku na kořist, i když měla kořist odlišnou míru chemické obrany. Když byla kuřatům předkládána kořist se střední i vysokou mírou obrany najednou, kuřata mezi touto kořistí nediskriminovala, což může dávat výhodu méně chráněné kořisti, která těží z podobnosti se silně chráněnou kořistí (Halpin a Rowe, 2010).

Projevy diskomfortního chování

Po dobu kol, kdy byla sýkorám předložena ploštice, byl zaznamenáván počet čištění zobáku a otřepávání. V porovnání s kontrolní skupinou vykazovala skupina testovaná s vysokou koncentrací i skupina testovaná s nízkou koncentrací větší počet prvků diskomfortního chování. S větším množstvím sekvestrovaných kardenolidů z potravy stoupá i celková frekvence diskomfortního chování (Petschenka et al., 2022). Projevy diskomfortního chování se projeví i u kontrolní skupiny. Z toho vyplývá, že kořist krmená na potravě bez cymarínu je částečně chráněná proti ptačím predátorům a vyvolává u nich známky diskomfortního chování, a to díky produkci sekretu z metathorakálních žláz (Schaefer, 1972). Avšak v porovnání s kořistí, která si sekvestovala obranné látky z potravy, vyvolávala menší počet tohoto chování. Projevy diskomfortního chování můžeme pozorovat i u bezobratlých živočichů. Zlatoočka (*Chrysoperla carnea*) si po manipulaci s chráněnou kořistí čistila mandibuly, což může být projevem diskomfortního chování (Pokharel et al., 2020). Lze také říci, že si ptáci ve všech experimentálních skupinách častěji čistili zobák, než se otřepávali. Ke stejnému závěru dospěla i práce (Kotlíková, 2023), kde si sýkory po předložení aposematické černo-červené kořisti více čistily zobák. Jak však autorka naznačuje, může to být způsobeno tím, že čištění zobáku je více jednoznačné chování, než otřepávání, a tak nemuselo být všechno otřepávání detekováno (Kotlíková, 2023).

Generalizace

V generalizačním testu byla sýkorám předkládána ruměnice pospolná (*P. apterus*). Tuto ploštici můžeme v přírodě nalézt, jak se živí na rostlinách čeledi Malvaceae. Živí se na semenech těchto rostlin (Socha, 1993). Ruměnice jsou chemicky chráněné pomocí sekretu z metathorakálních žláz. (Farine et al., 1992). To, že představují pro sýkory chráněnou kořist,

bylo zjištěno již v několika předchozích experimentech (Exnerová et al., 2007, 2003; Hotová Svádová et al., 2014).

Latence útoku na plošnici v generalizačním testu byla delší u experimentální skupiny, která měla předchozí zkušenost s *L. equestris* s vysokou koncentrací cymarinu. Rozdíl však není tak markantní. Velký rozdíl je však vidět na pravděpodobnosti útoku na plošnici během generalizačního testu ve srovnání experimentálních skupin. Skupina, která měla předchozí zkušenost s *L. equestris* s vysokou koncentrací cymarinu, útočila na ruměnice s menší pravděpodobností. Z toho vyplývá, že skupina testovaná s vysokou koncentrací nejvíce generalizovala na novou černo-červenou kořist. Co se týče zabití a konzumace plošnice, tak se od sebe experimentální skupiny výrazně neliší. *P. apterus* nevyvolává v porovnání s *L. equestris* takovou averzní reakci u ptačích predátorů, protože nemá tak účinné obranné mechanismy (Hotová Svádová et al., 2013). Generalizaci ovlivňuje míra obrany kořisti během averzního učení. Čím více je kořist chráněná během averzního učení, tím více dochází u predátora ke generalizaci. Netýká se to pouze kořisti, která je stejného druhu a liší se pouze v míře své obrany. Na generalizaci má vliv druh kořisti, který je predátorovi prezentován během averzního učení. Čím je druh kořisti v averzním učení chráněnější, tím je během generalizační fáze napadáno méně ruměnic (Hotová Svádová et al., 2013). V experimentu Kotlíkové (2023) se také ukázalo, že na generalizaci měl vliv druh kořisti, která byla sýkorám nabízena během učení. Když měly sýkory předešlou zkušenost s více chráněným druhem (*Clytra laeviuscula*), v generalizačním testu útočily, zabíjely a konzumovaly menší množství černo-červené kořisti. Generalizaci tedy ovlivňuje míra chemické obrany kořisti během averzního učení a to jak rozdílná mezidruhov故事 obrana, tak i rozdílná obrana v rámci jednoho druhu. Generalizaci může ovlivnit i rozdíl barev kořisti během averzního učení a během generalizační fáze. Pokud byla kuřatům předkládána během averzního učení kořist s méně sytou červenou barvou (*L. equestris*) a během generalizačního testu jim byla předložena kořist se sytější červenou barvou (*Tropidothorax leucopterus*), vykazovala kuřata na sytě červenou kořist větší averzní reakci (Gamberale-Stille a Tullberg, 1999). Dalo by se usuzovat, že *L. equestris* má méně sytě červené zbarvení oproti *P. apterus*. Kombinace sytější červené barvy a zkušenosti s více chráněnou kořistí vyvolala u sýkor silnější averzní reakci na ruměnice. V naší práci měla vliv míra chráněnosti kořisti v tréninku pouze na pravděpodobnost útoku. Důvodem, proč se ale nelišilo zabití a konzumace plošnic v generalizačním testu, bude nejspíše to, že u predátorů, kteří se rozhodli na kořist zaútočit, vyvolala černo-červená barva reakci „go-slow“, a tak na plošnici zaútočili opatrně (Guilford, 1994). Jelikož je *P. apterus* chráněna pouze sekretem

z metathorakálních žláz (Farine et al., 1992), nepředstavovala pro predátora silně chráněnou kořist a došlo k zabití a případné konzumaci.

Experiment 2- Efekt variability chemické obrany kořisti na rychlost učení a generalizaci

Cíle a otázky

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, jaké má variabilita v chemické obraně účinky na chování predátorů a jestli variabilita ovlivňuje rychlost učení a šířku generalizace. Pro tento experiment byly tedy vybrány dvě experimentální skupiny ptáků, kdy jedna skupina měla chráněnou kořist se stejnou koncentrací chemické obrany a druhá skupina s variabilní koncentrací chemické obrany.

Otázky, které jsme si položili, jsou:

- Má variabilita v obraně účinky na chování predátora?
- Má variabilita v obraně vliv na rychlost učení?
- Má variabilita v obraně vliv na šířku generalizace?

Metodika

Experiment byl prováděn v experimentálních chovech obratlovců Přf UK. Pro experiment byla využita dřevěná klec s rozměry 70 x 70 x 70 cm. Jedna strana klece byla vybavena jednosměrně průhledným sklem, které bránilo ptákovi, aby viděl experimentátora a byl tak rušen jeho přítomností. Ve vzdálenosti 30 cm od spodu klece a 30 cm od jednosměrně průhledného skla se nacházelo dřevěné bidýlko, které predátorovi umožňovalo dobrý výhled na karusel. V rohu klece byla umístěna miska s vodou. Tato klec byla osvětlena dvěma zářivkami (Biolux, Osram), které simulují denní světlo a které byly umístěny na vrchu klece.

Modeloví predátoři

Modelovými predátory pro tento experiment byly zvoleny dospělé sýkory koňadry. Ty byly odchyceny v Botanické zahradě Přf UK. Jejich odchyt byl proveden nejdříve v období leden- březen 2023 a poté v říjnu 2023. Sýkory byly vybrány tak, aby v experimentální skupině byla rovnoměrná distribuce věku a pohlaví. Rovnoměrná distribuce věku byla provedena tak,

aby zde byl rovnoměrný počet mladých jedinců (do jednoho roku života) a starších jedinců (starší než jeden rok). Ptáci byli po dobu experimentu umístěni v klecích v experimentálních chovech obratlovců Přf UK. Ptáci byli v klecích krmeni moučnými červy a vaječnou směsí Expert Egg Food (Orlux) a dalšími směsmi pro hmyzožravé ptáky značky Orlux (Uni Patee, Gold Patee a Insect Patee). Dále zde měli dvě napáječky s vodou. Klec měla rozměry 50 x 50 x 40 cm. V kleci se nacházela tři bidýlka. Ve spodu klece byl umístěn filtrační papír. Každý den bylo doplňováno krmivo, vyměňován filtrační papír a vyměňována voda. V místnosti, kde se ptáci nacházeli, byla udržována teplota v rozmezí 18-22°C a vlhkost v rozmezí 30-50%. Světelná perioda byla řízena časovačem tak, aby podmínky co nejvíce odpovídaly světelným podmínkám ve volné přírodě. Každý pták byl označen štítkem umístěným na kleci, na kterém se nacházel kód experimentu, věk a pohlaví.

Titó ptáci byli rozděleni do dvou experimentálních skupin. Každá skupina byla tvořena deseti jedinci. První skupina měla aposematickou kořist s variabilní obranou a druhá skupina měla aposematickou kořist s uniformní obranou.

Umělá kořist

Kořist byla pro tento experiment umělá. Jednalo se o papírové kartičky s fotografií příslušného hmyzu, kdy ve spodu kartičky byla umístěna část moučného červa. Hmyz, který byl použit pro pořízení fotografií, byl vypůjčen ze sbírek katedry zoologie na Přf UK a dále z Moravského zemského muzea v Brně. Hmyz byl poté vyfotografován. Byl použit fotoaparát Canon EOS 70D, který měl objektiv EF-S 60 mm F/2.8 USM pro fotografování větších druhů hmyzu. Pro menší druhy hmyzu byl použit objektiv MP -E 65 mm f/2.8 1-5x Macro Photo. Jednotlivé fotografie daného jedince, které byly zaostřené na jiné části jeho těla, byly složeny v programu Zerene Stacker. U všech jedinců byla sjednocena jejich velikost na 1,5 cm a fotografie byly ořezány v programu Gimp 2.10.30, aby měly shodné bílé pozadí. Kartičky měly výslednou velikost 25 mm x 25 mm.

Kartičky byly vytištěny na matný papír v tiskárně CopyGeneral na „hlazený papír jasně bílý 350g/m²“ na tiskárně Versant s barevným profilem FOGRA 39. Tiskárna pracuje se systémem CMYK a grafické programy s RGB systémem, takže mohlo dojít v průběhu tisku k nepatrnému zkreslení barev. Ze spodu kartičky byla umístěna část moučného červa, přibližně 3-5 segmentů. Tato část moučného červa byla připravována tak, že nejdříve byla nůžkami odstrižena hlava a zadní část a bylo vytaženo střevo. Dále byla část moučného červa injikována roztokem vody nebo roztokem chininu, podle typu kořisti (viz „průběh experimentu“).

Průběh experimentu

Pre- trénink

Před začátkem experimentu probíhal trénink, kdy se sýkora musela naučit otáčet kartičku, pod kterou byla umístěna část moučného červa. Sýkora hladověla přibližně dvě hodiny a byla umístěna v experimentální kleci. Za pomoci karuselu jí byl nejdříve nabídnut kus moučného červa, který byl položen na bílé kartičce. Tato kartička byla umístěna na Pertiho misce. Když se sýkora naučila slétnout na karusel a vzít si tam moučného červa, byl moučný červ částečně kartičkou zakryt. Tato fáze byla opakována 2-3 krát. Nakonec byl již moučný červ zakryt úplně a sýkora musela kartičku otočit a tím odkrýt moučného červa. Tato poslední fáze byla zopakována přibližně 10 krát.

Příprava kořisti

Ptákům bylo předloženo 10 kartiček s fotografií *L. egestris*, kde na každé kartičce se nacházel jiný jedinec, a 10 kartiček s fotografií neaposematického hmyzu. Kartičky s *L. egestris*, označené jako S-, představovaly chráněnou aposematickou kořist, která byla nejedlá. Kartičky s neaposematickou kořistí, označené jako S+, představovaly jedlou nechráněnou kořist.

Pro palatabilní (S+) kořist byla část moučného červa injikována pouze vodou. Pro nepalatabilní (S-) kořist se příprava lišila v rámci dvou skupin, do kterých byly sýkory rozděleny. Do moučných červů se injikoval roztok chlorochininu difosfátu (Merck), který má velice hořkou chuť. Injektivání probíhalo pomocí inzulínové stříkačky. Pro skupinu s uniformní obranou kořisti byla všechna nepalatabilní (S-) kořist injikována roztokem chininu o koncentraci 6%. Pro skupinu s variabilní obranou kořisti byla nepalatabilní (S-) kořist injikována buď 3% roztokem chininu, nebo 12% roztokem chininu, kdy každá z těchto dvou koncentrací byla v S- setu obsažena pětkrát. Fotografie s experimentální palatabilní (S+) a nepalatabilní (S-) kořistí, se nachází v Tabulce 1 a v Tabulce 2. Pořadí, ve kterém se kartičky předkládaly sýkorám, bylo pseudonáhodné a dodržovalo se kritérium, kdy za sebou nesměly být použity více než tři nepalatabilní (S-), nebo palatabilní (S+) kartičky.

Trénink

Před začátkem experimentu byla ptákovi odebrána potrava na 1-2 hodiny. Trénink probíhal v deseti blocích v deseti dnech. V každém bloku měl pták 20 kol, kdy mu byly prezentovány všechny palatabilní (S+) a nepalatabilní (S-) kartičky. Každé kolo trvalo 2 minuty.

Pokud byla ptákovi prezentována palatabilní (S+) kořist, musel zkonzumovat alespoň část moučného červa. Pokud tak neučinil, bylo kolo znovu opakováno po dvou minutách. Pokud ani potom nebyla kořist zkonzumována, kolo bylo zopakováno po deseti minutách. Pakliže nebyla kořist zkonzumována ani napotřetí, přešlo se na další kartičku v pořadí. Vše bylo zaznamenáno v protokolu.

Během prvního bloku musel pták manipulovat alespoň s pěti nepalatabilními (S-) kartičkami, aby si mohl vytvořit zkušenost s nejdou kořistí. Pokud se tak nestalo, bylo kolo opakováno stejně, jako v případě palatabilní (S+) kořisti. Sledovaná reakce na kořist, kterou jsme zaznamenávali do protokolu, byla:

„Absence manipulace“ (Left untouched) – pták se kartičky vůbec nedotkl

„Dotknutí se kartičky“ (Touched) – pták se kartičky pouze dotkl

„Otočení kartičky“ (Turned) – pták otočil, nebo odhodil kartičku, ale nedotkl se moučného červa

„Ochutnání a odhození“ (Tasted and thrown away) – pták otočil kartičku a ochutnal část moučného červa, kterého následně zahodil

„Částečná konzumace“ (Partly eaten) – pták zkonzumoval část moučného červa

„Úplná konzumace“ (Entirely eaten) – pták zkonzumoval celou nabízenou část moučného červa

Aby bylo kolo hodnocené jako úspěšně vyřešené, musel pták částečně, nebo úplně zkonzumovat palatabilní (S+) kořist a nesměl manipulovat s nepalatabilní (S-) kořistí. Průběh tréninku byl zachycen na kameru, byl zaznamenáván v programu The Observer XT a byl psán papírový protokol

Generalizace

Po tréninku následovaly 2 bloky generalizačního testu. Pták byl před začátkem potravně deprivován po dobu 1-2 hodiny. Pro generalizační test byly zvoleny nové S+ a S- sety, které jsou zobrazeny v Tabulce 3 a v Tabulce 4. S- set obsahoval různé druhy hmyzu, které byly

černo-červeně zbarvené. Zatímco během tréninku obsahoval S- set pouze ploštice *L. equestris*, v tomto setu byly obsaženy další druhy z řádu polokřídělých (Hemiptera) a z řádu brouci (Coleoptera). S+ obsahoval také jiné druhy, ale ty byly vybrány ze stejných vyšších taxonů, jako v tréninku.

Každý blok měl 20 kol, 10 kol s palatabilní (S+) kořistí a 10 kol s nepalativní (S-) kořistí. Pořadí kartiček bylo stejně jako v tréninku v pseudonáhodné sekvenci. Každé kolo trvalo 2 minuty a byla sledována stejná reakce na kořist, jako v tréninku. Nepalatibilní (S-) kořist byla jak v případě uniformní skupiny, tak v případě variabilní skupiny injikována 6% roztokem chininu. Experiment byl zachycen na kameru, byl zaznamenáván v programu The Observer XT a byl psán papírový protokol.

Trénik: S+ kořist			
	<i>Vadonia livida</i> VALI		<i>Lochmaea caprea</i> LCAP
	<i>Rhizotragus aestivus</i> RAES		<i>Phytonomus punctatus</i> PHYP
	<i>Tetrix tenuicornis</i> TENU		<i>Aphrophora alni</i> APAL
	<i>Athous subfuscus</i> ASUB		<i>Stenobothrus sp.</i> STEN
	<i>Ectobius balcani</i> EBAL		<i>Ledra aurita</i> LAUR

Tabulka 1: Přehled palatabilní (S+) kořisti pro trénink uniformní i variabilní skupiny

Trénink: S- kořist

	<i>Lygaeus equestris</i> LE01		<i>Lygaeus equestris</i> LE02
	<i>Lygaeus equestris</i> LE03		<i>Lygaeus equestris</i> LE04
	<i>Lygaeus equestris</i> LE05		<i>Lygaeus equestris</i> LE06
	<i>Lygaeus equestris</i> LE07		<i>Lygaeus equestris</i> LE08
	<i>Lygaeus equestris</i> LE09		<i>Lygaeus equestris</i> LE10

Tabulka: Přehled nepalatabilní (S-) kořisti pro trénink uniformní i variabilní skupiny

Generalizace: S+ kořist

	<i>Phyllodromica maculata</i> PMAC		<i>Centrotus cornutus</i> CECO
	<i>Tetrix subulata</i> TSUB		<i>Galeruca pomonae</i> GAPO
	<i>Stenurella melanura</i> SMEL		<i>Adelocera murina</i> AMUR
	<i>Otiorhynchus raucus</i> ORAU		<i>Philaenus spumarius</i> PHIL
	<i>Pholidoptera griseoaptera</i> PGRI		<i>Anisoplia austriaca</i> ANAU

Tabulka 2: Přehled palatabilní (S+) kořisti pro generalizaci uniformní i variabilní skupiny

Generalizace: S- kořist

	<i>Eurydema ornata</i> EUOR		<i>Rhynocoris iracundus</i> RIRA
	<i>Graphosoma italicum</i> GITA		<i>Pyrrhocoris apterus</i> PYAP
	<i>Rhynocoris iracundus</i> RIRA		<i>Coccinella septempunctata</i> COSE
	<i>Clytra laeviuscula</i> CLYT		<i>Prostemma guttula</i> PGUT
	<i>Trichodes apiarius</i> TAPI		<i>Cercopis vulnerata</i> CERC

Tabulka 3: Přehled nepalatabilní (S-) kořisti pro generalizaci uniformní i variabilní skupiny

Statistické metody

Statistické vyhodnocování dat bylo prováděno pomocí programu Statistica 7 (StartSoft 2004). Při pětiprocentní hladině významnosti byla zamítnuta nulová hypotéza.

Rychlost učení

Byl sledován vliv experimentální skupiny, bloku, věku a pohlaví a jejich vzájemná interakce, na podíl správně vyřešených kol v průběhu diskriminačního tréninku. Palatabilní (S+) a nepalatabilní (S-) kořist byla počítána dohromady. Aby bylo kolo správně vyřešeno, nesměla být nepalatabilní (S-) kořist manipulována a palatabilní (S+) kořist musela být částečně, nebo úplně zkonsumována. Pro hodnocení dat byla využita repeated measures ANOVA.

Generalizace

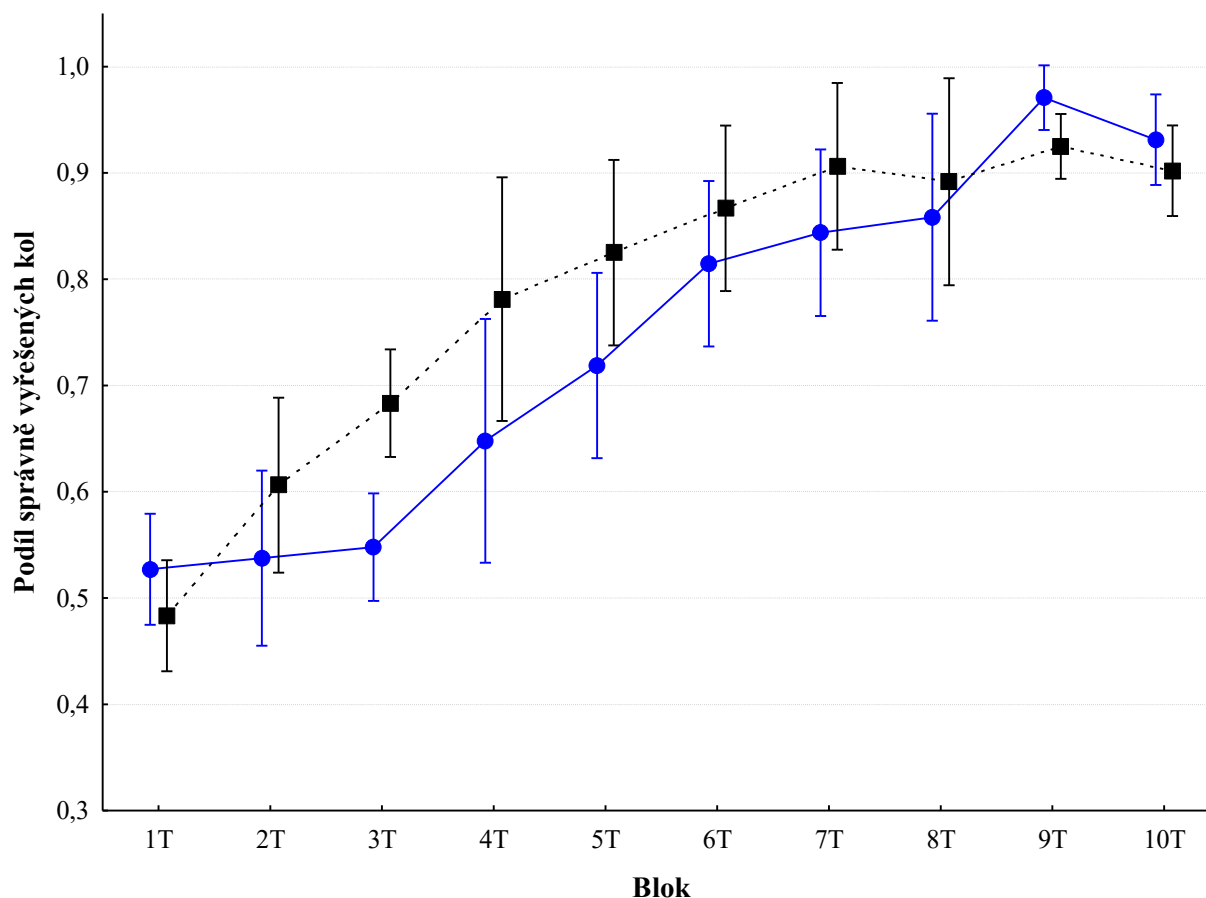
Dále byl sledován vliv obou experimentálních skupin, bloku, věku a pohlaví a jejich vzájemná interakce na podíl správně vyřešených kol (palatabilní (S+) a nepalatabilní (S-) počítána dohromady) v generalizačním testu. Poté byl srovnán první blok tréninku a první blok generalizačního testu. A nakonec byl ještě srovnán poslední blok tréninku a první blok generalizačního testu. Pro správné vyřešení kola nesmělo být s nepalatabilní (S-) kořistí manipulováno a palatabilní (S+) kořist musela být částečně, nebo úplně zkonsumována. Data byla hodnocena pomocí repeated measures ANOVA.

Výsledky

Rychlost učení

Bylo zjištěno, že napříč všemi bloky docházelo u sýkor k učení ($F=44,941$; $df=9, 108$; $p<0,001$). Ukázalo se, že skupina testovaná s variabilní nepalatabilní (S-) kořistí byla úspěšnější, což je vidět z průkazného vlivu interakce mezi skupinou a blokem ($F=2,203$; $df=9, 108$; $p=0,027$). Jak je vidět v Grafu 10, byla úspěšnější zejména v první polovině bloků. Na konci bloků se u obou skupin vyrovnala jejich úspěšnost. Skupina měla marginálně průkazný efekt ($F=4,569$; $df=1, 12$; $p=0,054$). Vliv věku ($F=0,611$; $df=1, 12$; $p=0,450$) ani pohlaví ($F=0,268$; $df=1, 12$; $p=0,614$) nebyl průkazný. Interakce věku a bloku ($F=0,825$; $df=9, 108$; $p=0,594$), věku a experimentální skupiny ($F=0,135$; $df=1, 12$; $p=0,720$), věku a pohlaví ($F=0,065$;

df= 1, 12; $p= 0,804$), pohlaví a bloku ($F= 0,642$; df= 9, 108; $p= 0,760$) a pohlaví a experimentální skupiny ($F= 0,767$; df= 1, 12; $p= 0,398$) také nebyla průkazná.

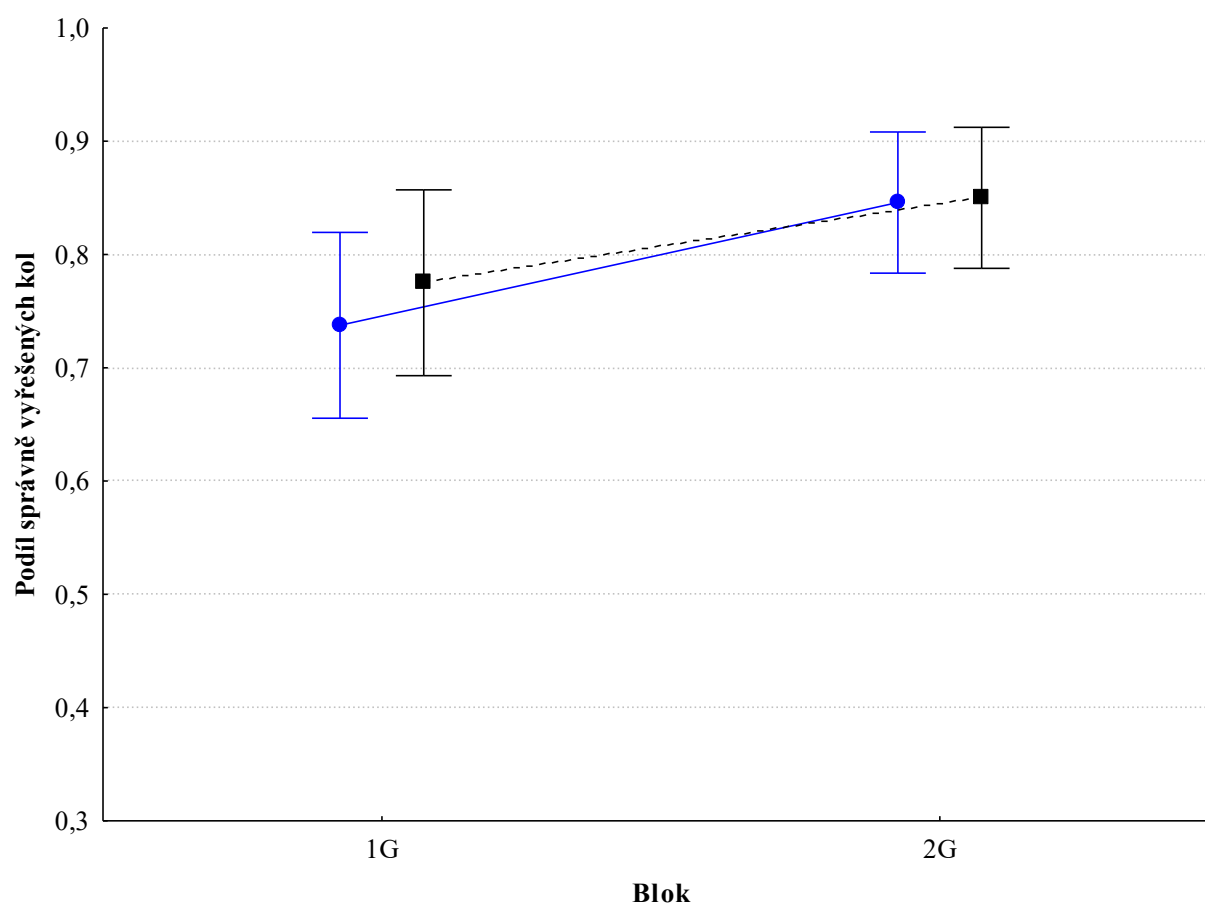


Graf 100: Podíl správně vyřešených kol v rámci diskriminačního tréninku. Osa X představuje jednotlivé bloky tréninku a osa Y představuje podíl správně vyřešených kol. Modrá barva znázorňuje skupinu testovanou s uniformní nepalatabilní (S-) kořistí a černá barva znázorňuje skupinu testovanou s variabilní nepalatabilní (S-) kořistí.

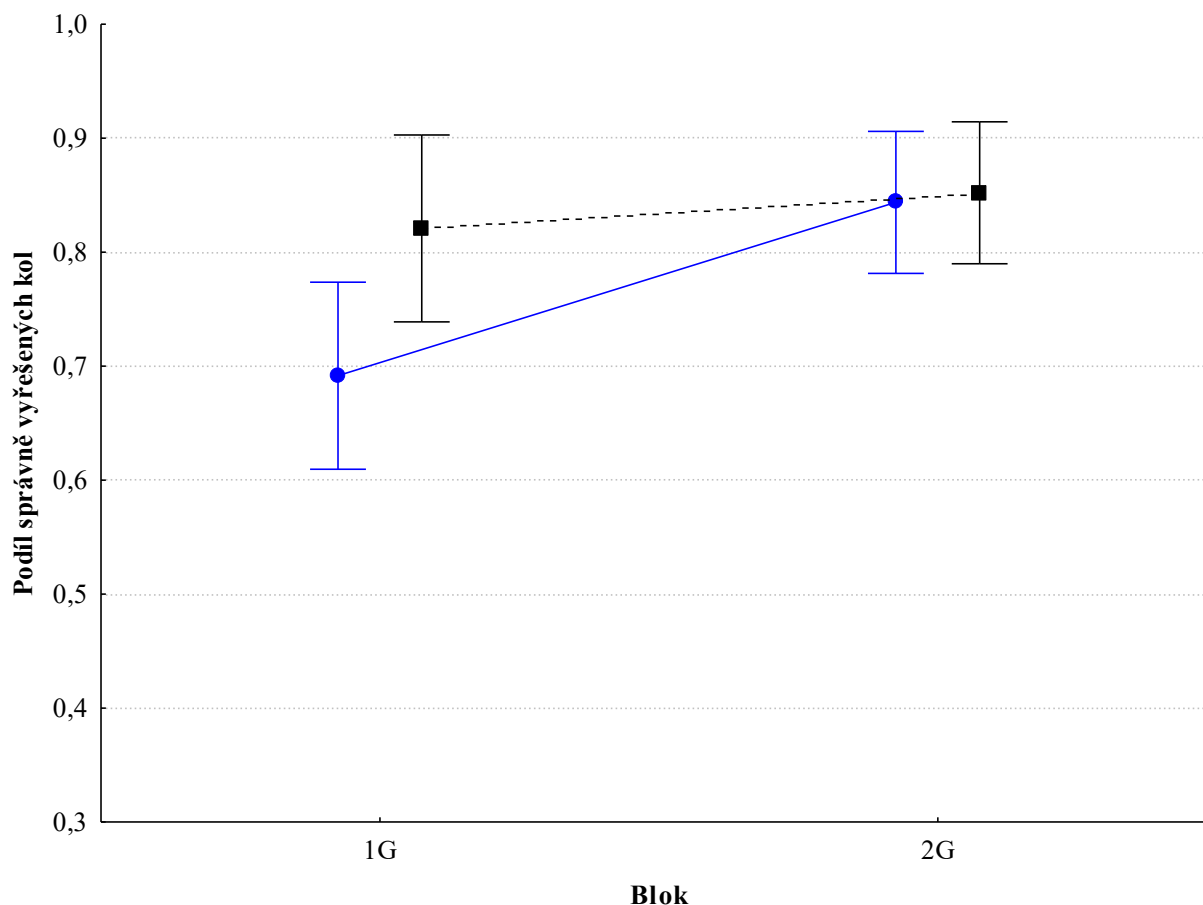
Generalizace

Mezi dvěma bloky generalizačního testu se průkazně zlepšila úspěšnost ($F=12,979$; df= 1, 12; $p= 0,004$). Interakce bloku a věku byla průkazná ($F= 5,638$; df= 1, 12; $p= 0,035$). Jak je vidět v Grafu 12, adulti byli v prvním bloku generalizačního testu úspěšnější, ale v druhém bloku generalizačního testu se úspěšnost dorovnala. Vliv experimentální skupiny se neukázal ($F= 0,273$; df=1, 12; $p= 0,611$). Interakce experimentální skupiny a bloku, jak je vidět v Grafu 11, se neprokázala ($F= 0,429$; df= 1, 12; $p= 0,525$). Dále nebyl prokázán vliv věku ($F= 2,977$; df= 1, 12; $p= 0,110$) a pohlaví ($F= 0,025$; df= 1, 12; $p= 0,878$). Interakce experimentální skupiny a věku ($F= 0,221$; df=1, 12; $p= 0,646$), experimentální skupiny a pohlaví ($F= 0,221$; df= 1, 12;

$p = 0,646$), věku a pohlaví ($F=0,175$; $df= 1, 12$; $p= 0,683$) a bloku a pohlaví ($F= 5,638$; $df= 1, 12$; $p= 0,35$) nebyla průkazná.

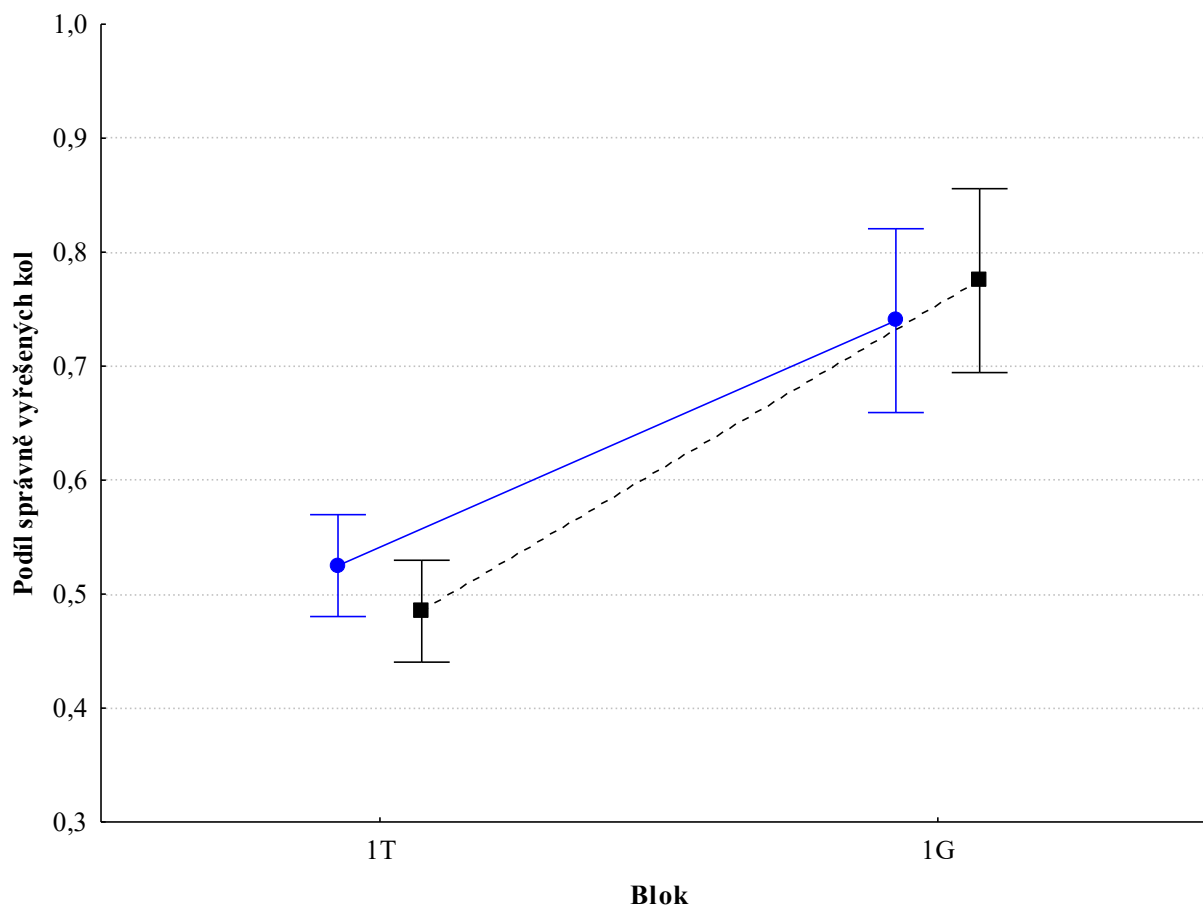


Graf 11: Vliv interakce bloku a experimentální skupiny na podíl správně vyřešených kol v rámci generalizačního testu. Osa X znázorňuje dva bloky generalizačního testu a osa Y znázorňuje podíl správně vyřešených kol. Modrá barva znázorňuje skupinu testovanou s uniformní nepalatabilní (S-) kořistí a černá barva znázorňuje skupinu testovanou s variabilní nepalatabilní S-kořistí.



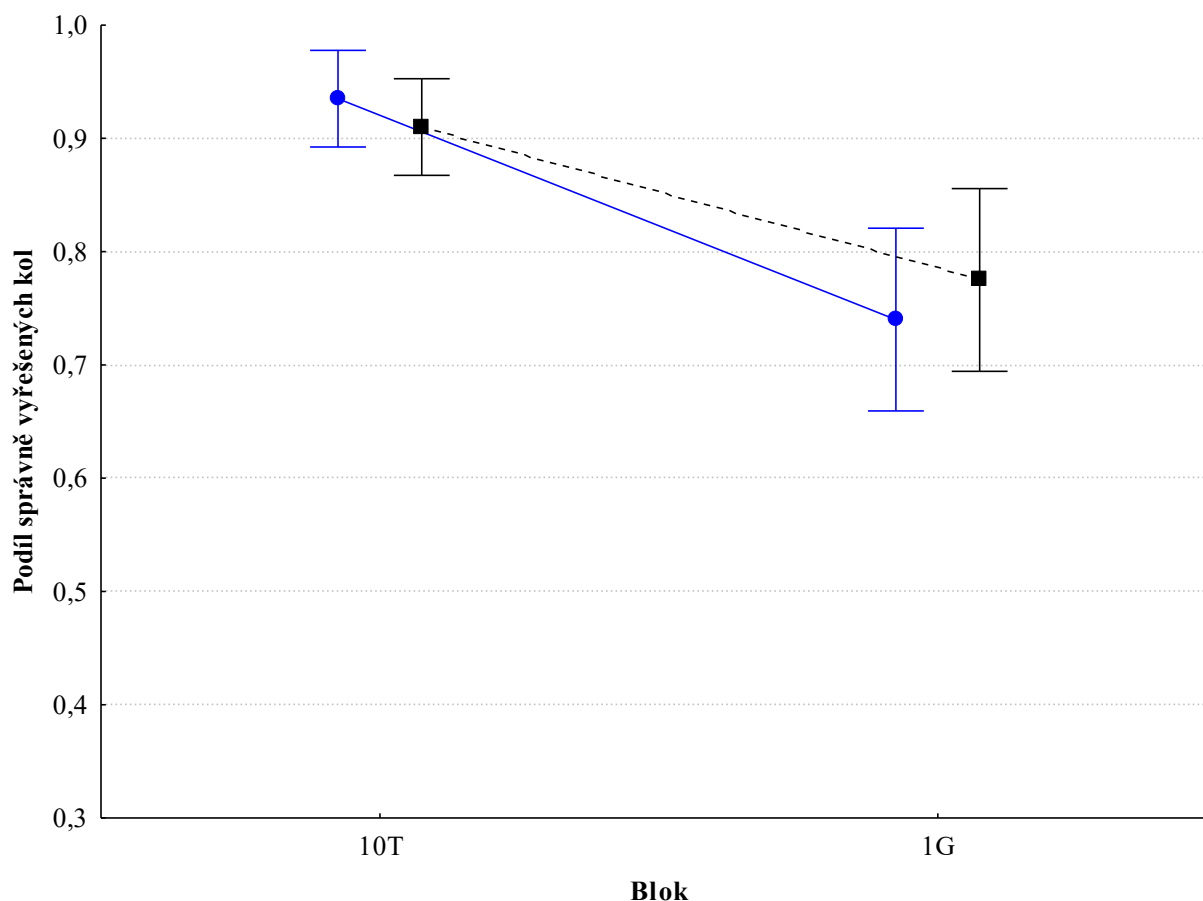
Graf 12: Vliv interakce věku a bloku na podíl správně vyřešených kol v rámci generalizačního testu. Osa X znázorňuje dva bloky generalizačního testu a osa Y znázorňuje podíl správně vyřešených kol. Modrá barva znázorňuje juvenilní jedince a černá barva znázorňuje adultní jedince.

Při srovnání prvního bloku tréninku a prvního bloku generalizačního testu se neukázal vliv experimentální skupiny ($F = 0,009$; $df = 1, 18$; $p = 0,927$). Průkazný vliv měl však blok ($F = 52,855$; $df = 1, 18$; $p < 0,001$). Jak je vidět v Grafu 13, ke generalizaci docházelo u obou experimentálních skupin, tudíž jim zkušenost z tréninku pomohla při diskriminaci nové kořisti. Interakce bloku a experimentální skupiny nebyla průkazná ($F = 1,166$; $df = 1, 18$; $p = 0,294$).



Graf 13: Vliv bloku v interakci s experimentální skupinou na podíl správně vyřešených kol v prvním kole tréninku a v prvním kole generalizačního testu. Osa X znázorňuje první blok tréninku a první blok generalizačního testu. Osa Y znázorňuje podíl správně vyřešených kol. Modrá barva znázorňuje skupinu testovanou s uniformní nepalatelivou (S-) kořistí a černá barva znázorňuje skupinu testovanou s variabilní nepalatelivou (S-) kořistí.

Při srovnání posledního bloku tréninku a prvního bloku generalizačního testu, pro zjištění, jak se zhoršila jejich úspěšnost, se neukázala interakce bloku a experimentální skupiny ($F = 1,108$; $df = 1, 18$; $p = 0,307$). Průkazný také nebyl vliv experimentální skupiny ($F = 0,023$; $df = 1, 18$; $p = 0,880$). Průkazný se ukázal vliv bloku ($F = 33,508$; $df = 1, 18$; $p < 0,000$). Jak je vidět v Grafu 14, docházelo u obou skupin ke generalizaci, ale úspěšnost byla nižší než na konci tréninku.



Graf 14: Vliv bloku v interakci s experimentální skupinou na podíl správně vyřešených kol v posledním bloku tréninku a v prvním bloku generalizačního testu. Osa X znázorňuje poslední blok tréninku a první blok generalizačního testu a osa Y znázorňuje podíl správně vyřešených kol. Modrá barva znázorňuje skupinu testovanou s uniformní nepalatabilní (S-) kořistí a černá barva znázorňuje skupinu testovanou s variabilní nepalatabilní (S-) kořistí.

Diskuze

Rychlost učení

V této části experimentu byl sledován podíl správně vyřešených kol v rámci deseti po sobě jdoucích bloků. Za správně vyřešené kolo se považovala taková situace, kdy s nepalatabilní (S-) kořistí nebylo vůbec manipulováno a predátor se kartačky ani nedotkl a palatabilní (S+) kořist byla částečně, nebo zcela zkonsumována. Sýkorám bylo v průběhu jednoho bloku nabízeno deset nepalatabilních (S-) kořistí a deset palatabilních (S+) kořistí, které byly rozdělené do dvou skupin s uniformní a variabilní obranou nepalatabilní (S-) kořistí. Dle výsledků z předešlých experimentů jsme si pokládali otázku, jestli skupina testovaná s variabilní nepalatabilní (S-) kořistí bude mít na kořist s variabilní chemickou obranou větší averzní reakci a bude u ní docházet k rychlejšímu učení, nebo naopak bude na tuto kořist více útočit a učení bude probíhat pomaleji (Barnett et al., 2014; Singh et al., 2022; Skelhorn a Rowe,

2007). Jak je vidět v Grafu 1, u obou skupin sýkor docházelo v průběhu bloků k zvyšování počtu správných reakcí na kořist, tudíž se sýkory učily správné řešení úlohy. To, že jsou ptáci schopni naučit se vyhýbat umělé kořisti, která je složena z papírové kartičky a moučného červa se ukázalo již v několika předchozích studiích. (Barnett et al., 2014; Kazemi et al., 2014; Kuklová et al., 2023). Jsou tedy schopni averzního učení u nepohyblivé kořisti, která je pouze dvourozměrná.

Co se týče rozdílu rychlosti v učení vyhýbat se chráněné kořisti, byla skupina s variabilní S- kořistí úspěšnější. Učila se rychleji a to hlavně v první polovině bloků (viz Graf 1). Skupina s uniformní S- kořistí ji poté dohnala a na konci všech deseti bloků už měly téměř stejnou pravděpodobnost správného vyřešení úlohy. To, že variabilní obrana kořisti může mít pro predátory averzní účinky, se ukázalo ve studii Barnett et al. (2014). Autor si tento výsledek vysvětluje tak, že při setkání s kořistí s variabilní obranou, kde má kořisti v populaci různou úroveň toxicity, predátoři zažívají zvýšenou nejistotu. Kvůli této nejistotě nemůže predátor předpovědět množství přijatých toxinů. V důsledku této nejistoty je potrava s variabilní obranou pro predátory averznější. Naopak u potravy s konstantní obranou může predikovat příjem přijatých toxinů (Barnett et al., 2014). To by mohlo platit i pro náš experiment, kde byla kořist s variabilní obranou pro ptáky averznější, zvláště v prvních kolech. Je zajímavé, že v experimentu Barnett et al. (2014) byla skupině predátorů testovaných s variabilní aposematickou kořistí předkládána kořist, která byla injikována vodou (tudíž byla zcela nechráněná) a kořist která byla injikována chininem. V našem experimentu byla všechna nepalatabilní (S-) kořist chráněná a jen se lišila úroveň její obrany. Více chráněný model může profitovat z přítomnosti méně chráněného, nebo zcela nechráněného mimetika v rámci Quasi-müllerovské mimeze a super-müllerovské mimeze. U predátorů může přítomnost méně chráněného mimetika zrychlovat proces učení díky efektu překvapení, kdy kořist není chráněná tak, jak predátor původně očekával (Balogh et al., 2008). Variabilní obrana kořisti může tedy být pro predátory averznější jak v rámci jednoho druhu, tak v rámci mezidruhové interakce. Na averzi predátorů vůči automimetické kořisti může mít vliv i rozdílné chemické složení obranných látek kořisti. Chráněná kořist má výhodu, pokud má v populaci méně časté obranné látky. Jedinci s méně běžnou obranou mají po útoku větší pravděpodobnost zabití (Skelhorn a Rowe, 2005). V našem experimentu se nelišilo složení chemické obrany, ale lišila se pouze koncentrace, bylo by však zajímavé pro budoucí studie zahrnout i vliv rozdílné chemické obrany.

Jedním z vysvětlení, proč se variabilní skupina zvláště na začátku rychleji učila vyhýbat se kořisti, může být i to, že v této skupině byla část nepalatabilní (S-) kořisti injikována vysokou koncentrací chininu. Tato koncentrace mohla být pro ptáky silně averzní a hořká, a tak se rychleji učili této kořisti vyhýbat.

Zásadní bude také počet automimetiků, který byl ve skupině s aposematickým zbarvením. V našem experimentu byla všechna nepalatabilní (S-) kořist chráněná, ale bylo zde 50% kořisti s nižší mírou obrany, která se považuje za automimetickou. Ve studii Skelhorn a Rowe (2007) bylo zjištěno, že pokud se automimetiků nachází v populaci 25%, pak predátoři nerozlišují mezi automimetiky a automodely a této kořisti se vyhýbají. Když je však v populaci automimetiků 50% a 70%, predátoři více útočí na chráněnou kořist a dělají tak aposematismus nestabilní. (Skelhorn a Rowe, 2007). To je v rozporu s výsledky Barnett et al., (2014), kde byla frekvence automimetiků 50%. Obě studie však používaly jiného modelového predátora. V experimentu, kdy byly kudlankám nabízeny chráněné a nechráněné pilatky *Athalia rosae*, se byly kudlanky schopné naučit pilatkám vyhýbat, ale učení bylo pomalejší za přítomnosti nechráněných pilatek. Přítomnost chráněných jedinců byla pro nechráněné jedince prospěšná, protože se pak snížila míra jejich úmrtí (Singh et al., 2022).

V práci Kotlíkové (2023), s velice obdobnou metodikou, byly sýkory rozděleny do dvou skupin a každé skupině byla nabízena rozdílná nepalatabilní (S-) kořist. Jedna skupina měla nepalatabilní (S-) kořist s nízkou diverzitou aposematického zbarvení (jednalo se pouze o jedince *L. equestris*) a druhou skupinu s vysokou diverzitou aposematického zbarvení (různí zástupci z podčeledi Lygaeinae). Nebyl zde pozorován rozdíl v rychlosti učení vyhýbat se této kořisti. Může to být vysvětleno například tím, že plošnice z podčeledi Lygaeinae si jsou vzájemně velice podobné a tím negativně neovlivňují rychlost učení. Když se však porovná rychlost učení se skupinou s nepalatabilní (S-) kořistí, která měla variabilní obranou, učila se tato skupina nejrychleji, a to hlavně během prvních několika bloků oproti skupině s vysokou diverzitou aposematického zbarvení. Variabilní obrana kořisti může tedy způsobovat rychlejší učení především v prvních blocích (Kotlíková, 2023).

Vliv věku ani pohlaví se v tomto experimentu neprojevil. To je v rozporu se studií Exnerové et al. (2015), ve které se ukázalo, že samci mají tendenci více útočit na aposematickou kořist a samice se této kořisti více vyhýbají (Exnerová et al., 2015). Také ve studii Kuklové et al. (2023) byly samice úspěšnější v diskriminačním učení oproti samcům. Ale v pracích Kotlíkové (2023) a Truhlářové (2022) se vliv věku a pohlaví na rychlosti učení u sýkor neprojevil. V několika předešlých pracích se ukázalo, že starší jedinci byli úspěšnější v rychlosti diskriminačního učení (Franks a Thorogood, 2018; Kuklová et al., 2023; Mirville et

al., 2016). Pro mladé jedince mohlo být setkání s chráněnou kořistí zcela nové, takže jim diskriminační učení trvalo déle (Kuklová et al., 2023). Mladí jedinci nemuseli mít předešlou zkušenost s chráněnou kořistí, se kterou se v experimentu setkali poprvé, a tak jim diskriminační učení trvalo déle (Kuklová et al., 2023). Je možné, že se vliv věku a pohlaví v našem experimentu neprojevil z důvodu malého počtu testovaných jedinců.

Generalizace

Obě experimentální skupiny úspěšně generalizovaly na novou kořist. Neprokázal se zde však vliv experimentální skupiny a obě skupiny generalizovaly v podstatě stejně. Pravděpodobně to bude způsobeno tím, že na konci tréninku byly obě skupiny skoro vyrovnané a shodně se vyhýbaly stejnému počtu nepalatabilní (S-) kořisti. Mezi dvěma bloky generalizačního testu však docházelo k výraznému zlepšení počtu správných reakcí na kořist. Nepalatabilní (S-) kořist, která byla sýkorám nabízena v generalizačním testu, patří do černo-červeného mimetického komplexu (Hotová Svádová et al., 2010). Do tohoto barevného komplexu patří i *L. equestris*, který byl sýkorám předkládán ve fázi učení. Zdá se, že právě barva je pro generalizaci ptáků zásadní (Aronsson a Gamberale-Stille, 2008; Kazemi et al., 2014). V experimentu Kazemi et al. (2014) byly predátorem sýkory modřinky. Sýkorám byla předkládána umělá kořist v podobě kartiček. Sýkory se v první fázi naučily, na základě vzhledu, vyhýbat se chráněné kořisti. V druhé fázi generalizačního testu se ukázalo, že se ptáci vyhýbali dokonalým mimetikům. Také se vyhýbali takové kořisti, která měla shodnou barvu. Ta kořist, která se shodovala pouze ve tvaru a vzoru, byla napadána stejně, jako úplně odlišná kořist (Kazemi et al., 2014). Ke stejnému výsledku dospěla i práce Aronsson a Gamberale-Stille (2008), kde kuřata *G. gallus domesticus* generalizovala na kořist, která měla shodnou barvu, jako kořist v tréninku.

Práce Kotlíkové (2023) ukázala, že když je skupině ve fázi učení předkládána nepalatabilní (S-) kořist s větší diverzitou aposematického zbarvení, dochází pak k lepší generalizaci a to hlavně v prvním ze dvou bloků. V druhém bloku již byla skupina s menší diverzitou aposematického zbarvení kořisti stejně úspěšná jako první skupina (Kotlíková, 2023). Důvodem, proč se efekt experimentální skupiny (variabilní a uniformní obrany nepalatabilní kořisti) neukázal v tomto experimentu, bude nejspíše ten, že oběma experimentálními skupinám byla předkládána nepalatabilní (S-) kořist stejného druhu, a to *L. equestris*. Je však zajímavé že variabilní kořist byla sice predátory vnímána jako averznější, ale na generalizaci to vliv nemělo.

Z výsledků vyplývá, že starší jedinci generalizovali lépe, než mladí jedinci, a to hlavně v prvním bloku generalizačního testu. V druhém bloku se podíl správných odpovědí dorovnal. Vysvětleno to může být tím, že starší ptáci mají více zkušeností z přírody a mohli mít větší pravděpodobnost setkat se s kořistí, která byla zobrazena na kartičce, v přírodě. Dalším vysvětlením může být to, že starší ptáci se během svého života v přírodě již naučili generalizovat, a to jim pomohlo v generalizačním testu našeho experimentu. Ke stejnému výsledku dospěla i Kotlíková (2023), kdy starší jedinci byli také, zejména v prvním kole generalizačního testu, úspěšnější. Ve studii Kuklová et al. (2023) se ukázalo, že při diskriminačním učení neměli dospělci preferenci pro umělou kořist určité barvy a na všechny kořist útočili ze začátku stejně. Je to vysvětleno tím, že dospělí ptáci negeneralizují umělou aposematickou kořist s živou aposematickou kořistí, kterou potkali v přírodě (Kuklová et al., 2023).

Závěr

Tématem této práce byly reakce ptačích predátorů na automimikry u plošnice z čeledi Lygaeidae. V této práci byly prováděny dva experimenty. První experiment se zabýval vlivem kvantity sekvestrovaných kardenolidů na efektivitu obrany ploštic. Jako predátoři byla použita naivní mláďata sýkory koňadry, která byla ručně odchovaná. Sýkory byly rozděleny do třech experimentálních skupin. Každé skupině byly v tréninku nabízeny tři plošnice *L. equestris* s rozdílnou mírou chemické obrany. Jedné skupině byla prezentována kořist, která se živila na umělé stravě bez kardenolidů. Druhé skupině byla prezentována kořist, která se živila na umělé stravě s malou koncentrací kardenolidů a třetí byla prezentována kořist, která se živila na umělé stravě s vysokou koncentrací kardenolidů. V rámci generalizačního testu byla všem skupinám nabízena jedna ruměnice *P. apterus*. Z výsledků můžeme říci, že u skupiny testované s vysokou koncentrací docházelo k rychlejšímu averznímu učení. Latence útoku na plošnici se pouze u této skupiny mezi koly prodlužovala. Menší pravděpodobnost útoku na plošnici, oproti kontrolní skupině, se u této skupiny projevila marginálně. Skupina testovaná s vysokou koncentrací také zabíjela a konzumovala plošnice s menší pravděpodobností. Můžeme tedy shrnout, že vysoká koncentrace kardenolidů v potravě ploštic měla na ptačí predátory velký efekt a poskytovala plošticím větší pravděpodobnost přežití po setkání s predátorem. Všechny tři skupiny ploštic byly alespoň částečně chráněné vůči predátorům, ale nejvíce se obrana projevila u skupiny živící se na potravě s vysokou koncentrací kardenolidů. Množství sekvestrovaných kardenolidů

tedy stoupá s množstvím kardenolidů v potravě. Co se týká generalizačního testu, tak skupina testovaná s vysokou koncentrací nejlépe generalizovala na novou černo-červenou kořist a útočila na ruměnici s nejmenší pravděpodobností.

Druhý experiment se zabýval efektem variability chemické obrany kořisti na rychlost učení a generalizaci. Predátory byly zvoleny dospělé sýkory koňadry odchycené v přírodě. Byla jim předkládána umělá kořist, kterou tvořila kartička s fotografií hmyzu a část moučného červa injikovaného vodou, nebo roztokem chininu. Během deseti bloků v rámci učení, bylo sýkorám nabízeno deset kartiček palatabilní (S+) kořisti. Kartičky tvořily fotografie neaposematyckého druhu a mouční červi byli injikováni vodou. Nepalatabilní (S-) kořist tvořily kartičky s fotografií *L. equestris* a mouční červi byli injikováni roztokem chininu. Ptáci byli rozděleni do dvou experimentálních skupin, kde jedné skupině byla nabízena nepalatabilní (S-) kořist s variabilní obranou (3% a 12% roztok chininu) a druhé skupině s uniformní obranou (6% roztok chininu). Během dvou generalizačních bloků byla sýkorám předkládána nová palatabilní (S+) kořist a nová nepalatabilní (S-) kořist, kde na kartičkách byly různé druhy z černo-červeného mimetického komplexu. Nepalatabilní (S-) kořist pro obě experimentální skupiny byla injikována 6% roztokem chininu. V rámci tohoto experimentu se ukázalo, že u skupiny testované s variabilní obranou kořisti docházelo k rychlejšímu učení a to zejména během prvních bloků. Dalo by se tedy shrnout, že pokud měla chráněná kořist variabilní obranu, byla během učení napadána méně. Co se týká generalizačního testu, nebyl zde patrný rozdíl experimentálních skupin na generalizaci nové černo-červené kořisti. Variabilní obrana chráněné kořisti tedy neovlivňuje šířku generalizace. Lepší generalizace, hlavně při první prezentaci nové černo-červené chráněné kořisti v rámci prvního bloku generalizačního testu, byla pozorována u starších jedinců.

V rámci shrnutí obou experimentů se dá říct, že prezentace silně chráněné kořisti, je proti predátorům velice účinná a dochází u nich k větší averzní reakci a k rychlejšímu averznímu učení. To platí jak pro silně chráněnou kořist, která se v populaci nachází samostatně, tak i pro takovou populaci, ve které se nachází i méně chránění jedinci. Co se týká generalizace na novou černo-červenou kořist, neovlivnila ji přítomnost méně chráněných jedinců v rámci kořisti s variabilní obranou, oproti kořisti se uniformní chemickou obranou. Pokud je však silně chráněná kořist předkládána predátorovi samostatně, predátor pak více generalizuje na novou černo-červenou kořist. Oba experimenty ukazují, že variabilita v chemické obraně ovlivňuje chování predátorů a má klíčový vliv na interakce mezi predátory a kořistí, což může ovlivňovat mimetické vztahy.

Literární zdroje

- Adamová-Ježová, D., Hospodková, E., Fuchsová, L., Štys, P., Exnerová, A., 2016.** Through experience to boldness? Deactivation of neophobia towards novel and aposematic prey in three European species of tits (Paridae). *Behavioural Processes* 131, 24–31.
- Agrawal, A.A., Petschenka, G., Bingham, R.A., Weber, M.G., Rasmann, S., 2012.** Toxic cardenolides: chemical ecology and coevolution of specialized plant–herbivore interactions. *New Phytologist* 194, 28–45.
- Aldrich, J., 1988.** Chemical Ecology of the Heteroptera. *Annu. Rev. Entomol.* 33, 211–238.
- Aronsson, M., Gamberale-Stille, G., 2008.** Domestic chicks primarily attend to colour, not pattern, when learning an aposematic coloration. *Animal Behaviour* 75, 417–423.
- Balogh, A.C.V., Gamberale-Stille, G., Leimar, O., 2008.** Learning and the mimicry spectrum: from quasi-Bates to super-Müller. *Animal Behaviour* 76, 1591–1599.
- Barnett, C.A., Bateson, M., Rowe, C., 2014.** Better the devil you know: avian predators find variation in prey toxicity aversive. *Biol. Lett.* 10
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., Walker, S., 2015.** Fitting Linear Mixed-Effects Models Using *lme4*. *J. Stat. Soft.* 67.
- Berenbaum, M.R., Miliczky, E., 1984.** Mantids and Milkweed Bugs: Efficacy of Aposematic Coloration Against Invertebrate Predators. *American Midland Naturalist* 111, 64.
- Bramer, C., Dobler, S., Deckert, J., Stemmer, M., Petschenka, G., 2015.** Na^+/K^+ -ATPase resistance and cardenolide sequestration: basal adaptations to host plant toxins in the milkweed bugs (Hemiptera: Lygaeidae: Lygaeinae). *Proc. R. Soc. B.* 282.
- Bramer, C., Friedrich, F., Dobler, S., 2017.** Defence by plant toxins in milkweed bugs (Heteroptera: Lygaeinae) through the evolution of a sophisticated storage compartment. *Systematic Entomology* 42, 15–30.
- Brower, L.P., Fink, L.S., 1985.** A Natural Toxic Defense System: Cardenolides in Butterflies versus Birds^a. *Annals of the New York Academy of Sciences* 443, 171–188.
- Brower, L.P., Van Brower, J., Corvino, J.M., 1967.** Plant poisons in a terrestrial food chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 57, 893–898.
- Burdfield-Steel, E.R., Dougherty, L.R., Smith, L.A., Collins, L.A., Shuker, D.M., 2013.** Variation in social and sexual behaviour in four species of aposematic seed bugs (Hemiptera: Lygaeidae): The role of toxic and non-toxic food. *Behavioural Processes* 99, 52–61.
- Burdfield-Steel, E.R., Shuker, D.M., 2014.** The evolutionary ecology of the Lygaeidae. *Ecology and Evolution* 4, 2278–2301.
- Cramp, S., 1993.** Flycatchers to shrikes, *Handbook of the birds of Europe, the Middle East and North Africa: the birds of the Western Palearctic* / Stanley Cramp (Ed.). Oxford Univ. Press, Oxford.
- Dimarco, R.D., Fordyce, J.A., 2017.** Not all toxic butterflies are toxic: high intra- and interspecific variation in sequestration in subtropical swallowtails. *Ecosphere* 8

- Doktorovová, L., Exnerová, A., Hotová Svádová, K., Štys, P., Adamová-Ježová, D., Zverev, V., Kozlov, M.V., Zvereva, E.L., 2019.** Differential Bird Responses to Colour Morphs of an Aposematic Leaf Beetle may Affect Variation in Morph Frequencies in Polymorphic Prey Populations. *Evol Biol* 46, 35–46.
- Exnerová, A., Ježová, D., Štys, P., Doktorovová, L., Rojas, B., Mappes, J., 2015.** Different reactions to aposematic prey in 2 geographically distant populations of great tits. *BEHECO* 26, 1361–1370.
- Exnerová, A., Landová, E., Štys, P., Fuchs, R., Prokopová, M., Cehláriková, P., 2003.** Reactions of passerine birds to aposematic and non-aposematic firebugs (*Pyrrhocoris apterus*; Heteroptera): *Biological Journal of the Linnean Society* 78, 517–525.
- Exnerová, A., Štys, P., Fučíková, E., Veselá, S., Svádová, K., Prokopová, M., Jarošík, V., Fuchs, R., Landová, E., 2007.** Avoidance of aposematic prey in European tits (*Paridae*): learned or innate? *Behavioral Ecology* 18, 148–156.
- Exnerová, A., Svádová, K.H., Fučíková, E., Drent, P., Štys, P., 2010.** Personality matters: individual variation in reactions of naive bird predators to aposematic prey. *Proc. R. Soc. B.* 277, 723–728.
- Farine, J.P., Bonnard, O., Brossut, R., Le Quere, J.L., 1992.** Chemistry of defensive secretions in nymphs and adults of fire bug, *Pyrrhocoris apterus* L. (Heteroptera, Pyrrhocoridae). *J Chem Ecol* 18, 1673–1682.
- Fink, L.S., Brower, L.P., 1981.** Birds can overcome the cardenolide defence of monarch butterflies in Mexico. *Nature* 291, 67–70.
- Fox, J., Weisberg, S., 2019.** *An R Companion to Applied Regression*. Sage 3.
- Franks, V.R., Thorogood, R., 2018.** Older and wiser? Age differences in foraging and learning by an endangered passerine. *Behavioural Processes* 148, 1–9.
- Gamberale-Stille, G., Guilford, T., 2004.** Automimicry destabilizes aposematism: predator sample-and-reject behaviour may provide a solution. *Proc. R. Soc. Lond. B* 271, 2621–2625.
- Gamberale-Stille, G., Tullberg, B.S., 1999.** Experienced chicks show biased avoidance of stronger signals: an experiment with natural colour variation in live aposematic prey. *Evolutionary Ecology* 13, 579–589.
- Guilford, T., 1994.** “Go-slow” Signalling and the Problem of Automimicry. *Journal of Theoretical Biology* 170, 311–316.
- Halpin, C.G., Rowe, C., 2010.** Taste-rejection behaviour by predators can promote variability in prey defences. *Biol. Lett.* 6, 617–619.
- Havlikova, M., Bosakova, T., Petschenka, G., Cabala, R., Exnerova, A., Bosakova, Z., 2020.** Analysis of defensive secretion of a milkweed bug *Lygaeus equestris* by 1D GC-MS and GC×GC-MS: sex differences and host-plant effect. *Sci Rep* 10, 3092.
- He, R., Barnett, C., Pagani-Núñez, E., Goodale, E., 2021.** It’s a Matter of Taste: Avian Predators Taste Reject Mimetic Prey in Relation to Signal Reliability (preprint). In Review.

- He, R., Pagani-Núñez, E., Goodale, E., Barnett, C.R.A., 2022.** Avian predators taste reject mimetic prey in relation to their signal reliability. *Sci Rep* 12, 2334.
- Hotová Svádová, K., Exnerová, A., Kopečková, M., Štys, P., 2010.** Predator dependent mimetic complexes: Do passerine birds avoid Central European red-and-black Heteroptera? *Eur. J. Entomol.* 107, 349–355.
- Hotová Svádová, K., Exnerová, A., Kopečková, M., Štys, P., 2013.** How Do Predators Learn to Recognize a Mimetic Complex: Experiments with Naive Great Tits and Aposematic Heteroptera. *Ethology* 119, 814–830.
- Hotová Svádová, K., Exnerová, A., Štys, P., 2014.** Gregariousness as a defence strategy of moderately defended prey: experiments with *Pyrrhocoris apterus* and avian predators. *Behav* 151, 1617–1640.
- Kazemi, B., Gamberale-Stille, G., Tullberg, B.S., Leimar, O., 2014.** Stimulus Salience as an Explanation for Imperfect Mimicry. *Current Biology* 24, 965–969.
- Komárek, S., 2004.** Mimikry, aposematismus a příbuzné jevy: mimetismus v přírodě a vývoj jeho poznání, 2. vyd. v českém jazyce. V nakl. Dokořán 1. ed. Dokořán, Praha.
- Kotlíková, L., 2023.** Reakce predátorů vůči druhům červeno-černého mimetického komplexu.
- Kugelberg, O., Solbreck, C., 1972.** Field observations on the seasonal occurrence of *lygaeus equestris* (L.)(Het., Lygaeidae) with special reference to food plant phenology. *Insect Systematics & Evolution* 3, 189–210.
- Kuklová, L., Jůnová, L., Kišlová, M., Kuncová, A., Exnerová, A., 2023.** Does the type of task affect prey discrimination learning in avian predators? *Ethology* 129, 527–540.
- Landová, E., Hotová Svádová, K., Fuchs, R., Štys, P., Exnerová, A., 2017.** The effect of social learning on avoidance of aposematic prey in juvenile great tits (*Parus major*). *Anim Cogn* 20, 855–866.
- Lindstrom, L., 1999.** Reactions of hand-reared and wild-caught predators toward warningly colored, gregarious, and conspicuous prey. *Behavioral Ecology* 10, 317–322.
- Mappes, J., Marples, N., Endler, J., 2005.** The complex business of survival by aposematism. *Trends in Ecology & Evolution* 20, 598–603.
- Mattila, A.L.K., Jiggins, C.D., Opedal, Ø.H., Montejo-Kovacevich, G., Pinheiro De Castro, É.C., McMillan, W.O., Bacquet, C., Saastamoinen, M., 2021.** Evolutionary and ecological processes influencing chemical defense variation in an aposematic and mimetic *Heliconius* butterfly. *PeerJ* 9.
- Mirville, M.O., Kelley, J.L., Ridley, A.R., 2016.** Group size and associative learning in the Australian magpie (*Cracticus tibicen dorsalis*). *Behav Ecol Sociobiol* 70, 417–427.
- Newcombe, D., Blount, J.D., Mitchell, C., Moore, A.J., 2013.** Chemical egg defence in the large milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*, derives from maternal but not paternal diet. *Entomologia Exp Applicata* 149, 197–205.
- Perrins, C.M., 1991.** Tits and their caterpillar food supply. *Ibis* 133, 49–54.
- Petschenka, G., Halitschke, R., Roth, A., Stiehler, S., Tenbusch, L., Züst, T., Hartwig, C., Gámez, J.F.M., Trusch, R., Deckert, J., Chalušová, K., Vilcinskis, A., Exnerová, A., 2020.** Predation drives

specialized host plant associations in preadapted milkweed bugs (Heteroptera: Lygaeinae) (preprint). *Evolutionary Biology*.

Petschenka, G., Halitschke, R., Züst, T., Roth, A., Stiehler, S., Tenbusch, L., Hartwig, C., Moreno Gámez, J.F., Trusch, R., Deckert, J., Chalušová, K., Vilcinskis, A., Exnerová, A., 2022. Sequestration of Defenses against Predators Drives Specialized Host Plant Associations in Preadapted Milkweed Bugs (Heteroptera: Lygaeinae). *The American Naturalist* 199, E211–E228.

Pokharel, P., Sippel, M., Vilcinskis, A., Petschenka, G., 2020. Defense of Milkweed Bugs (Heteroptera: Lygaeinae) against Predatory Lacewing Larvae Depends on Structural Differences of Sequestered Cardenolides. *Insects* 11, 485.

Pokharel, P., Steppuhn, A., Petschenka, G., 2021. Dietary cardenolides enhance growth and change the direction of the fecundity-longevity trade-off in milkweed bugs (Heteroptera: Lygaeinae). *Ecology and Evolution* 11, 18042–18054.

Rafter, J.L., Agrawal, A.A., Preisser, E.L., 2013. Chinese mantids gut toxic monarch caterpillars: avoidance of prey defence? *Ecological Entomology* 38, 76–82.

Renwick, J.A.A., 1996. The Role of Cardenolides in a Crucifer-Insect Relationship, in: Waller, G.R., Yamasaki, K. (Eds.), *Saponins Used in Food and Agriculture, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer US, Boston, MA, pp. 111–121.

Rojas, B., Valkonen, J., Nokelainen, O., 2015. Aposematism. *Current Biology* 25, R350–R351.

Ruxton, G.D., Speed, M.P., 2006. How can automimicry persist when predators can preferentially consume undefended mimics? *Proc. R. Soc. B.* 273, 373–378. S. Jones, R., C. Davis, S., Speed, M.P., 2013. Defence Cheats Can Degrade Protection of Chemically Defended Prey. *Ethology* 119, 52–57.

Schaefer, C.W., 1972. Degree of Metathoracic Scent-Gland Development in the Trichophorous Heteroptera (Hemiptera). *Annals of the Entomological Society of America* 65, 810–821.

Scudder, G.G.E., Duffey, S.S., 1972. Cardiac glycosides in the Lygaeinae (Hemiptera: Lygaeidae). *Can. J. Zool.* 50, 35–42.

Sillén-Tullberg, B., Wiklund, C., Järvi, T., Sillen-Tullberg, B., Jarvi, T., 1982. Aposematic Coloration in Adults and Larvae of *Lygaeus equestris* and Its Bearing on Müllerian Mimicry: An Experimental Study on Predation on Living Bugs by the Great Tit *Parus major*. *Oikos* 39, 131.

Singh, P., Grone, N., Tewes, L.J., Müller, C., 2022. Chemical defense acquired via pharmacophagy can lead to protection from predation for conspecifics in a sawfly. *Proc. R. Soc. B.* 289.

Skelhorn, J., Rowe, C., 2005. Frequency-dependent taste-rejection by avian predation may select for defence chemical polymorphisms in aposematic prey. *Biol. Lett.* 1, 500–503.

Skelhorn, J., Ruxton, G.D., 2008. Ecological factors influencing the evolution of insects' chemical defenses. *Behavioral Ecology* 19, 146–153.

Skow, C.D., Jakob, E.M., 2006. Jumping spiders attend to context during learned avoidance of aposematic prey. *Behavioral Ecology* 17, 34–40.

- Socha, R., 1993.** *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera)-an experimental model species: A review. Eur. J. En.
- Speed, M.P., Ruxton, G.D., Broom, M., 2006.** Automimicry and the evolution of discrete prey defences: AUTOMIMICRY AND PREY DEFENCES. Biological Journal of the Linnean Society 87, 393–402.
- Speed, M.P., Ruxton, G.D., Mappes, J., Sherratt, T.N., 2012.** Why are defensive toxins so variable? An evolutionary perspective. Biological Reviews 87, 874–884.
- Svádová, K., Exnerová, A., Štys, P., Landová, E., Valenta, J., Fučíková, A., Socha, R., 2009.** Role of different colours of aposematic insects in learning, memory and generalization of naïve bird predators. Animal Behaviour 77, 327–336.
- Svenningsen, T.O., Holen, Ø.H., 2007.** The evolutionary stability of automimicry. Proc. R. Soc. B. 274, 2055–2063.
- Svensson, L., Mullarney, K., Zetterström, D., Grant, P.J., Doležal, R., 2012.** Ptáci Evropy, severní Afriky a Blízkého východu, 2., opr. a rozš. vyd. ed. Ševčík, Plzeň.
- Truhlářová, M., 2022.** Reakce ptáků vůči pestřenkám (Syrphidae) a jejich modelům (Aculeata).
- Tullberg, B.S., Gamberale-Stille, G., Solbreck, C., 2000.** Effects of food plant and group size on predator defence: differences between two co-occurring aposematic Lygaeinae bugs: Food plant, aggregation and predator defence. Ecological Entomology 25, 220–225.