

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra Zoologie**

**Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Zoology**

Doktorský studijní program: Zoologie
Ph.D. study program: Zoology

Autoreferát disertační práce
Summary of the Ph.D. Thesis



**Význam jednotlivých složek repelentní sekrece *Graphosoma lineatum* vůči
různým druhům predátorů.**

**Role of individual chemical compounds of repellent secretion of *Graphosoma
lineatum* towards different predator species**

Martina Gregorovičová

Školitel/Supervisor: prof. RNDr. Ivan Horáček, CSc.

Praha, červenec / Prague, July (2015)

OBSAH / CONTENTS

1. Seznam zkratk/ <i>List of abbreviations</i>	1
2. Abstrakt	2
3. Úvod	3
3.1. Repellentní sekrece kněžice páskované (<i>Graphosoma lineatum</i>)	3
3.2. Modelové organismy	4
4. Cíle práce	5
5. Materiál a Metodika	5
6. Výsledky	9
6.1. Gekončík noční	9
6.2. Ještěrka zelená	10
6.3. Sýkora koňadra	12
6.4. Sýkora modřinka	13
7. Diskuze a Závěry	14
8. Abstract	17
9. Introduction	18
9.1. Repellent secretion of <i>Graphosoma lineatum</i>	18
9.2. Model organisms	19
10. Aims of the study	19
11. Materials and Methods	20
12. Results	23
12.1. Leopard gecko	23
12.2. Green lizard	25
12.3. Great tit	27
12.4. Blue tit	28
13. Discussion and Conclusions	29
14. Příloha / <i>Supplement</i>	32
15. Použitá literatura / <i>References</i>	34
16. Životopis / <i>Curriculum vitae</i>	38

1. Seznam zkratek / *List of abbreviations*

MTG – metathorakální pachové žlázy / *metathoracic scent glands*

UM – larva potemníka moučného bez chemikálie / *untreated mealworm*

HX – hexan / *hexane*

PYR – pyrazín / *pyrazine*

3A – směs tří aldehydů / *mixture of three aldehydes*

TA – směs tří aldehydů obohacená o tridekan / *mixture of three aldehydes and tridecane*

OXO – oxoaldehyd / *oxoaldehyde*

GS – sekrece knežice páskované / *Graphosoma lineatum secretion*

LG/3A – živá kněžice páskovaná předkládaná před vlastní sérii pokusů se směsí tří aldehydů / *living specimen of Graphosoma lineatum offered before the trials with the mixture of three aldehydes*

LP/3A – živá ruměnice pospolná předkládaná před vlastní sérii pokusů se směsí tří aldehydů / *living specimen of Pyrrhocoris apterus offered before the trials with the mixture of three aldehydes*

2. Abstrakt

Skupina ploštice (Heteroptera) má vynikající schopnost produkovat/uchovávat velké množství chemických látek, jež tvoří základ jejich komplexní repelentní sekrece. Mezi nejlépe prostudované repelentní sekrece patří sekrece *Graphosoma lineatum* skládající se z mnoha složek, které mohou působit jako iritanty nebo přímo jako toxiny. Mezi hlavní chemické složky sekrece patří aldehydy s krátkými řetězci.

Dizertační práce se zaměřuje na hlavní chemické složky této repelentní sekrece – aldehydy – stejně jako na extrahovanou sekreci metathorakálních pachových žláz *Graphosoma lineatum*. Celkem byly testovány aversivní reakce čtyř vybraných druhů predátorů: (1) gekončík noční (*Eublepharis macularius*); (2) ještěrka zelená (*Lacerta viridis*); (3) sýkora koňadra (*Parus major*) a (4) sýkora modřinka (*Cyanistes caeruleus*).

Vybrané druhy predátorů byly konfrontovány s majoritními složkami obranné sekrece *Graphosoma lineatum*: (1) směs tří aldehydů: (E)-hex-2-enal, (E)-oct-2-enal, (E)-dec-2-enal; (2) směs těchto tří aldehydů obohacená o tridekan; (3) oxoaldehyd: (E)-4-oxohex-2-enal; (4) extrahovaná sekrece metathorakálních pachových žláz dospělé *Graphosoma lineatum*; (5) hexan, jakožto nepolární rozpouštědlo a (6) pyrazín: 2-isobutyl-3-methoxypyrazín u experimentů s gekončíky nočními jako pozitivní kontrola k vyloučení efektu neofobie. Všechny chemikálie byly aplikovány na požitelnou kořist (*Tenebrio molitor* larva).

Aversivní reakce jednotlivých druhů predátorů byly vyhodnocovány na základě sledování následujících charakteristik chování: (1) latence přiblížení se ke kořisti, (2) latence zaútočení na kořist, (3) interval mezi přiblížením a vlastním útokem na kořist a (4) interval mezi útokem a vlastní konzumací kořisti.

U gekončků nočních výsledky ukazují, že gekončík reagoval aversivně vůči směsi tří aldehydů. Stejná směs obohacená o tridekan vykazovala dokonce silnější aversivní reakci. Oxoaldehyd nevyvolal žádný aversivní efekt. Celková sekrece metathorakálních pachových žláz měla jasný aversivní účinek. Přítomnost živé ploštice *Graphosoma lineatum* před vlastní testovanou sekvencí směsi tří aldehydů zesílila aversivní reakce na tuto směs. Tato směs může tedy fungovat jako potenciální signál nepoživatelnosti této kořisti.

V případě ještěrek zelených byla aversivní reakce na směs tří aldehydů silnější, než reakce na tuto směs obohacenou o tridekan. Směs s tridekanem měla však silnější aversivní efekt, než tomu bylo u oxoaldehydu. Aversivní reakce na oxoaldehyd byla sice nejslabší, ale stále signifikantní. Celková sekrece metathorakálních pachových žláz měla jasný aversivní účinek. Navíc, pokud byla přítomna ploštice *Graphosoma lineatum*/*Pyrrhocoris apterus* před vlastní sekvencí směsi tří aldehydů, byl tento efekt zesílený a díky tomu může být tato směs potenciálním signálem nepoživatelnosti dané kořisti.

Výsledky experimentů u obou ptačích druhů, sýkory koňadry a sýkory modřinky, ukazují, že oba druhy reagovaly aversivně na směs tří aldehydů. U sýkor koňader byla navíc testována tato směs tří aldehydů obohacená o tridekan a přítomnost tridekanu nevyvolala žádnou aversivní reakci. Oxoaldehyd měl silný aversivní efekt u sýkor koňader, zatímco u sýkor modřinek byla aversivní reakce opožděná. Celková sekrece metathorakálních pachových žláz měla jasný aversivní účinek pro oba ptačí druhy. Koňadry váhaly nejvíce na přítomnost oxoaldehydu, zatímco modřinky váhaly nejvíce na celkovou sekreci *Graphosoma lineatum*.

Závěrem lze říci, že všechny vybrané druhy predátorů reagovaly aversivně vůči aldehydům. Navíc směs tří aldehydů fungovala jako signál nepoživatelnosti ploštice *Graphosoma lineatum*.

Klíčová slova: aldehydy, aversivní reakce, gekončík noční, ještěrka zelená, sýkora koňadra, sýkora modřinka, repelentní sekrece

3. Úvod

Skupina ploštic (Heteroptera) představuje skupinu bohatou na taxony s velmi dobře vyvinutou chemickou obranou proti různým druhům predátorů. Obranná sekrece ploštic je velmi komplexní a obsahuje velké množství chemických složek (Aldrich 1988). Antipredační funkce by měla být zajišťována složkami, které jsou v sekreci hojné jako jsou například aldehydy nebo tridekan (Aldrich 1988; Farine et al. 1992; Šanda et al. 2012).

Ačkoliv je chemická analýza repelentní sekrece známá u mnoha druhů ploštic (Hamilton et al. 1985; Aldrich 1988; Farine et al. 1992; Aldrich et al. 1996, 1997; Krall et al. 1999; Aliabadi et al. 2002; Prudic et al. 2008; Fávaro et al. 2011; Šanda et al. 2012), otázkou stále zůstává, které chemické složky jsou zodpovědné za aversivní reakce různých druhů predátorů.

Až dosud se jen velmi málo studií zabývalo otázkou týkající se reakce predátorů na aposematický hmyz (Krall et al. 1999; Exnerová et al. 2006; Bonacci et al. 2008; Svádová et al. 2009) a/nebo efekty vlastní obranné sekrece na predátory – obratlovce, např. studie Benfield (1972) nebo Härlin (2005), kteří použili obrannou sekreci brouků čeledi Gyrinidae. Nicméně vliv jednotlivých složek repelentní sekrece aposematických ploštic na predátory – obratlovce je překvapivě velmi málo známý. Předkládaná studie se proto zabývá mírou aversivní reakce vybraných potencionálních druhů predátorů na repelentní sekreci kněžice páskované (*Graphosoma lineatum*).

Dizertační práce se zaměřuje na hlavní složky repelentní sekrece – aldehydy (Šanda et al. 2012). Tyto složky jsou vysoce volatilní – těkavé a aromatické a mohou mít funkci potenciálního signálu nepoživatelnosti kořisti stejně dobře jako vlastní obranu jako takovou (Eisner 1970; Hamilton et al. 1985).

3.1. Repelentní sekrece kněžice páskované (*Graphosoma lineatum*)

Kněžice páskovaná je oblíbeným modelem chemické analýzy obranné sekrece metathorakálních žláz (Stránský et al. 1998; Durak a Kalender 2009; Šanda et al. 2012). Chemická obrana kněžice *G. lineatum* je složena z vysoce těkavé tekutiny, která obsahuje iritanty i toxiny (Stránský et al. 1998; Durak a Kalender 2009; Šanda et al. 2012). Tato tekutina se vytváří v metathorakálních žlázách (MTG) dospělců (Aldrich 1988). Díky svému volatilnímu složení, může mít tato repelentní sekrece vliv i na větší vzdálenosti a díky tomu ji potenciální predátor (pták či ještěr), může rozpoznat a vyhnout se pak takovéto kořisti na základě olfaktorického aposematismu (Eisner a Grant 1981).

Zatímco iritanty, jako třeba *n*-tridekan (Gunawardena a Herath 1991), jsou efektivní proti členovcům – např. proti kudlankám, pavoukům nebo mravencům (Aldrich 1988), toxiny, jako α,β - nenasycené oxoaldehydy (Šanda et al. 2012), mohou ploštici chránit převážně proti ptákům a jiným obratlovcům (Aldrich 1988).

Následující aldehydy patří k nejběžnějším složkám sekrece kněžice páskované: (E)-2-hexenal, (E)-2-decenal, (E)-2-octenal, tridekan, (E)-4-oxohex-2-enal (Šanda et al. 2012). Proto se předkládaná studie zaměřuje na tyto složky MTG sekrece dospělců.

Na základě osobní komunikace s Ludvíkem Streinzem a Bohumírem Koutkem z Ústavu Organické chemie a Biochemie, AV ČR, v.v.i., (E)-2-hexenal, (E)-2-decenal a (E)-2-octenal byly testovány dohromady jako směs, protože takto se v repelentní sekreci ploštic nejčastěji vyskytují (Aldrich 1988; Farine et al. 1992; Aldrich et al. 1996; Stránský et al. 1998; Durak a Kalender 2009; Šanda et al. 2012). Proto se zdá, že by tato směs mohla mít funkci olfaktorického signálu – typický výrazný zápach kněžice páskované (L. Streinz, osobní sdělení).

3.2. Modelové organismy

Předkládaná studie představuje šest modelových organismů – čtyři modelové organismy byly vybrány jako představitelé potenciálních predátorů: dva druhy ještěřů – gekončík noční (*Eublepharis macularius*) a ještěrka zelená (*Lacerta viridis*) a dva druhy ptáků – sýkora koňadra (*Parus major*) a sýkora modřinka (*Cyanistes caeruleus*). Jako aposematická kořist byly vybrány ploštice kněžice páskovaná (*Graphosoma lineatum*) a ruměnice pospolná (*Pyrrhocoris apterus*).

Vybrané druhy ještěřů představují protikladné druhy predátorů – noční a denní. Oba druhy jsou však hmyzožraví (Angelici et al. 1997; Seufer et al. 2005) aktivní lovci (Cooper 1995) a spoléhají se více na chemickou diskriminaci než predátoři číhající v záloze (Huey a Pianka 1981). Nicméně, vlastní chemická diskriminace se u těchto dvou druhů mírně liší.

Gekončík noční při vlastní chemické diskriminaci vyhledávání kořisti může využívat dva hlavní smysly – čich a vomerolfakci (Schwenk 1993, Rehorek et al. 2000). U gekonů obecně je čichová komora velmi dobře vyvinuta stejně jako čichové laloky v mozku (Pratt 1948). Oproti tomu chuť je vyvinuta velmi špatně (Schwenk 1985). U gekončíka nočního dokonce nebyla zjištěna žádná přítomnost chuťových pohárků v tlamě (Schwenk 1985, Jamniczky et al. 2009).

V případě ještěrek zelených smysly, které mohou zprostředkovávat chemickou diskriminaci kořisti, jsou vomerolfakce, čich a chuť (Schwenk 1985, 1993; Bonacci et al. 2008). Čich neboli olfakce je u ještěrek velmi dobře vyvinuta podobně jako u gekonů (Gabe a Saint Girons 1976; Cooper 1996). Co se týče chuti, která je v čeledi Lacertidae velmi dobře vyvinutým smyslem, chuťové pohárky jsou početné zvláště pak na ventrolaterálním povrchu přední části jazyka a dále jsou roztroušeny i po jeho zadní části (Schwenk 1985). U ještěrky zelené jsou chuťové pohárky přítomny i na dlouhých špičkách jazykové vidlice (Schwenk 1985). Dalším smyslem, který by mohl být zodpovědný za rozeznávání kořisti a potravy, je velmi dobře vyvinutá vomerolfakce (Cooper 1991, 1996). Všechny tyto strategie mohou být nápomocny při vyhýbání se chemicky chráněné kořisti jakou je kněžice páskovaná *G. lineatum*.

U obou ptačích druhů bylo zjištěno a vzáno v potaz, že se oba druhy vyhýbají červenočerným plošticím (Hotová Svádová et al. 2010). Otázkou však zůstává, která specifická chemická složka může být zodpovědná za konkrétní aversivní reakci u jednotlivých druhů. Oba druhy jsou insektivorní (del Hoyo et al. 2007) a jejich potrava je složena i z ploštic (Exnerová et al. 2003a; del Hoyo et al. 2007). Ačkoliv čich není u ptáků dobře vyvinut (Mason a Clark 2000), chemická obrana *G. lineatum* může stále hrát roli jako signál v rámci olfaktorického aposematismu (Eisner a Grant 1981), protože její diskriminace může být zprostředkována chutí (Schlee 1986) nebo chemestézi (Mason a Clark 2000; Conner 2007); a to na základě svého těkavého složení (Šanda et al. 2012). Podle Exnerové et al. (2003b) bylo prokázáno, že i velmi blízce příbuzné druhy, jako je čeleď Paridae, mohou reagovat rozdílně při vyhýbání se stejné aposematické kořisti.

Dva druhy ploštic byly vybrány jako potenciální kořist. První, kněžice páskovaná (*Graphosoma lineatum*), na jejíž repelentní sekreci je založena tato studie a druhý, ruměnice pospolná (*Pyrrhocoris apterus*), která byla vybrána jako jiný chemicky chráněný druh červenočerných aposematických středoevropských ploštic (Hotová Svádová et al. 2010).

4. Cíle práce

Hlavním cílem předkládané práce bylo studium vlastních aversivních efektů na běžné složky repelentní MTG sekrece druhu kněžice páskované u různých druhů potenciálních predátorů a otestovat hypotézu, že repelentní účinnost této sekrece spočívá především v aldehydech. Konkrétní cíle dizertační práce byly tyto:

- (1) Stanovit aversivní efekt konkrétní chemické složky MTG sekrece a také efekt celkové MTG sekrece *G. lineatum* proti čtyřem různým typům predátorů – gekončíku nočnímu (*Eublepharis macularius*), ještěrce zelené (*Lacerta viridis*), sýkoře koňadře (*Parus major*) a sýkoře modřince (*Cyanistes caeruleus*).
- (2) Porovnat aversivní efekt konkrétní chemické složky a celkové MTG sekrece *G. lineatum* pro všechny typy vybraných predátorů.
- (3) Vyhodnotit, zda směs tří aldehydů může mít funkci potenciálního olfaktorického signálu nepoživatelnosti kořisti pro všechny typy predátorů.
- (4) Ověřit hypotézu, že tridekan má funkci katalyzátoru této aldehydové směsi a tím zesiluje aversivní reakce testovaných predátorů – gekončíků nočních, ještěrek zelených a sýkor koňader.
- (5) Vyhodnotit, zda oxoaldehyd může fungovat jako přímý toxin pro všechny druhy vybraných predátorů.
- (6) Zjistit, jaký vliv má u gekončíků nočních přítomnost živé kněžice páskované (*G. lineatum*) na aversivní reakci vůči směsi tří aldehydů.
- (7) Zjistit, jaký vliv má u ještěrek zelených přítomnost kněžice páskované (*G. lineatum*) a ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus*) na aversivní reakci vůči směsi tří aldehydů.

5. Materiál a metodika

Gekončíci noční

Celkově bylo testováno 77 jedinců gekončíka nočního (*Eublepharis macularius*) v letech 2010 – 2012. Pokusy byly prováděny v období následujícím po rozmnožovací sezóně a před vlastní hibernací: od září do prvního týdne v prosinci.

Týden před vlastním pokusem byly gekončíci odebráni z jejich chovné skupinky a byli ubytováni jednotlivě v teráriích o rozměrech 20x40x20 cm, aby si zvykli na laboratorní podmínky při teplotě 27 °C a 50 % vlhkosti; již nebyli krmení, ale voda byla k dispozici ad libitum. Světelné podmínky byly nastaveny podle dvanáctihodinového cyklu světlo/tma (6:00 – 18:00).

Ještěrky zelené

Mezi lety 2010 – 2012 bylo celkově testováno 84 ještěrek zelených (*Lacerta viridis*), které byly chyceny na jižní Moravě v Národním Parku Podyjí (48° 48' 59.20''S – 15° 58' 37.80''V) a to v období po rozmnožování a před vlastní hibernací: od července do začátku srpna.

Ještěrky byly ubytovány jednotlivě v teráriích o rozměrech 20x40x20 cm, teplotě 29 °C, 45 % vlhkosti, ve dvanáctihodinovém cyklu světlo/tma (6:00 – 18:00). Ještěrky se habituovaly na laboratorní prostředí jeden týden před vlastními pokusy s přístupem k vodě ad libitum.

Sýkory koňadry a sýkory modřinky

Dohromady bylo testováno 196 sýkor koňader (*Parus major*) a 91 sýkor modřinek (*Cyanistes caeruleus*) v průběhu let 2009 – 2011 vždy od září do března. Odchycení ptáci byli ubytováni jednotlivě v plastových klecích o rozměrech 50x40x40 cm s přední stěnou tvořenou z drátěného pletiva.

Ptáci se habituovali na laboratorní podmínky 2 – 7 dnů před vlastním pokusem. Světelné podmínky byly nastaveny podle aktuální roční sezóny za teploty v rozmezí 18 – 22 °C. Pokusy byly prováděny v dřevěných klecích (70x70x70 cm) s drátěnými stěnami a stropem a reflexním zrcadlem, skrze něj byli ptáci pozorováni.

Graphosoma lineatum

Kněžice páskovaná (*Graphosoma lineatum*, Heteroptera: Pentatomidae) byla vybrána jako hlavní model aposematického druhu plošnice. Kněžice byly sbírány na několika lokalitách v Praze a drženy v klimaboxu s dlouhou denní periodou (16S:8T) a teplotou oscilující v rozmezí mezi 24 °C (den) a 20 °C (noc).

Kněžice byly krmeny zelenými částmi a semeny jejich hostitelských rostlin: mrkev (*Daucus carota*), kerblík lesní (*Anthriscus sylvestris*) a andělka lékařská (*Angelica archangelica*) s neomezeným přístupem k vodě.

Pyrrhocoris apterus

Ruměnice pospolná (*Pyrrhocoris apterus*, Heteroptera: Pyrrhocoridae) byla vybrána jako druhý modelový druh plošnice pouze pro pokusy s ještěrkami zelenými, jakožto jiný druh aposematicky zbarvených červenočerných ploščic (Hotová Svádová et al. 2010).

Ruměnice byly sbírány na několika lokalitách v Praze a drženy ve stejných podmínkách jako kněžice páskované. Ruměnice byly krmeny zelenými částmi a semeny svých hostitelských rostlin čeledí Malvaceae, Tiliaceae, Bombacaceae a Sterculiaceae s neomezeným přístupem k vodě.

Larvy potemníka moučného

Larvy potemníka moučného (*Tenebrio molitor*, délka okolo 20 mm) byly použity jako požitelná kořist. Testované chemikálie byly aplikovány doprostřed zadní části těla larvy potemníka moučného.

Přidání chemikálie na povrch těla larvy potemníka moučného nezměnilo v žádných aspektech její chování. Larvy potemníka moučného bez jakékoli chemikálie byly použity jako kontrolní kořist.

Chemikálie

Testované chemikálie představují hlavní složky repelentní MTG sekrece dospělců kněžice páskované *G. lineatum* (Stránský et al. 1998; Šanda et al. 2012). Byly testovány následující chemické složky: (1) směs tří aldehydů (3A): (E)-hex-2-enal, (E)-oct-2-enal, (E)-dec-2-enal v poměru 10:1:10; (2) směs tří aldehydů obohacená o tridekan (TA), poměr 10:1:10:10; (3) oxoaldehyd (OXO): (E)-4-oxohex-2-enal; (4) extrahovaná MTG sekrece dospělců kněžice páskované (GS); (5) hexan (HX) – použit jako nepolární rozpouštědlo pro ostatní chemikálie (6) pyrazín (PYR): 2-isobutyl-3-methoxypyrazine jako pozitivní kontrola k vyloučení efektu neofobie v pokusech s gekončiky nočními.

Směs tří aldehydů, tato směs obohacená o tridekan a oxoaldehyd byly použity jako 2 % roztok v hexanu. Pyrazín byl rozpuštěn v malém množství glycerolu a dále rozředěn v destilované vodě do 0.003 % roztoku, což byla dostatečná koncentrace k vyvolání potencionální aversivní reakce u kuřat (Marples a Roper, 1996). A proto byla tato koncentrace vybrána také pro gekončiky vzhledem k jejich lepší čichové/vomeronasální citlivosti.

Všechny chemikálie byly nanášeny Hamiltonovou stříkačkou doprostřed zadní části larvy potemníka moučného v množství 2 μ l, což je množství, které je obvykle uvolněno kněžicí páskovanou, pakliže se cítí ohrožena (M. Šanda, osobní sdělení). Metathorakální sekrece (GS) byla získána simulací útoku na kněžici. Jakmile kněžice uvolnila sekreci, byla tato sekrece aplikována přímo na zadní stranu larvy potemníka moučného.

Testovací protokol

Stejná základní testovací sekvence byla použita pro všechny typy predátorů s výjimkou sýkor modřinek, kde byla tato sekvence zkrácena. Každé zvíře bylo testováno pouze jednou.

Testovací sekvence se skládala z deseti larev potemníka moučného (dále jen moučný červ) předkládaných za sebou v pětiminutových pokusech. V případě testovaných chemikálií (3A-TA-OXO-GS-PYR), sekvence začínala s moučným červem, na kterém byl nanesen hexan, a následovala sekvencí pěti moučných červů s nanesenými konkrétními chemikáliemi odpovídající testované skupině. Sekvence byla zakončena sérií čtyř moučných červů s naneseným hexanem. V případě sýkor modřinek byla tato sekvence zkrácena na šest moučných červů a to kvůli jejich menší velikosti a rychlejšímu zasyčení potravou. Daná sekvence vypadala následovně: první moučný červ byl s hexanem, následován třemi červy s konkrétní chemikálií a celá sekvence byla zakončena dvěma červy s hexanem. Zvířatům z kontrolní skupiny moučného červa bez jakékoli chemikálie (UM) bylo předloženo deset/šest čistých červů bez jakékoliv chemikálie. Zvířatům z hexanové skupiny (HX) bylo předloženo deset/šest moučných červů s naneseným hexanem. Touto metodou bylo možné porovnat reakce zvířat proti testované chemikálii s potenciální repelentní funkcí hexanu vůči moučnému červu bez jakékoli chemikálie.

Chování v odlišných částech testovací sekvence bylo také porovnááno: (1) “pre-chemické“ pokusy na začátku, (2) “chemické“ pokusy s testovanou chemikálií, a (3) “post-chemické“ pokusy, které následovaly po zkušenosti s danou chemikálií k rozlišení mezi okamžitým a přetrvávajícím efektem dané chemikálie. V každém pokusu mělo zvíře pět minut na potenciální manipulaci a konzumaci moučného červa, jinak byl pokus zastaven. Pokus byl zastaven dříve, pokud zvíře sežralo danou kořist během pěti minut.

Pro otestování reakce ještěřích predátorů vůči živé kněžici páskované *G. lineatum* (LG/3A), nebo ruměnici pospolné *P. apterus* (LP/3A), bylo použito střídání čistého moučného červa a živé ploštice tak dlouho, dokud ještěř neodmítl ploštici třikrát v řadě bez

jakékoli manipulace. Ploštice byla předkládána maximálně pětkrát. Tuto sekvenci následovala standardní sekvence deseti červů potřených směsí tří aldehydů.

V případě ještěřích predátorů byly zaznamenávány tyto behaviorální charakteristiky: (1) Latence přiblížení se ke kořisti (approach) – představující čas, kdy se zvíře začalo cíleně přibližovat ke kořisti; (2) Latence zaútočení na kořist (attack) – představující čas, kdy zvíře začalo manipulovat s kořistí, poté, co se k ní přiblížilo; a (3) Interval mezi přiblížením se ke kořisti a její vlastní manipulací (approach-attack intervals) – představuje míru váhání mezi přiblížením se ke kořisti a vlastním útokem na kořist.

U ptačích predátorů byly zaznamenávány tyto behaviorální charakteristiky: (1) Latence manipulace s kořistí (attack) – představující čas, kdy pták začal s kořistí manipulovat (dotknul se, klovnul nebo vzal kořist do zobáku); a (2) Interval mezi útokem na kořist a její konzumací (attack-eating interval) – představující interval od prvního útoku na kořist a momentu, kdy pták začal kořist žrát.

Statistická analýza

Data byla analyzována pomocí programu R 3.0.1. Protože data neměla normální rozdělení (Shapiro–Wilk normality test), byla aplikována robustnější metoda analýzy založená na pořadích. ANCOVA byla použita pro zpracování základního modelu a pro vyhodnocení vlivu jednotlivých chemikálií. Jedním z předpokladů klasické ANCOVY je normální rozdělení dat. Vzhledem k tomu, že data neměla normální rozdělení, byla původní metoda upravena (inspirována Kruskal–Wallis ANOVA). Namísto původních časových hodnot, byla použita jejich pořadí (latence vybraných prvků chování) jako závislá proměnná. Následně bylo vyhodnoceno, jak jsou tato pořadí závislá na ostatních proměnných: na konkrétní chemikálii, části experimentální sekvence (pre-chemické, chemické and post-chemické pokusy), věku, pohlaví a hmotnosti (věk a hmotnost vstupovaly do modelu jako numerické proměnné, ostatní proměnné jako kategorické proměnné). Byl zjišťován i vliv interakce mezi částí experimentální sekvence a chemikálií. Analýza rozptylu druhého typu (Type II ANOVA) byla použita k vyhodnocení vlivu jednotlivých proměnných. Tento typ analýzy rozptylu vyhodnocuje vliv jednotlivých proměnných s ohledem na ostatní závislé proměnné v modelu, ale už bez ohledu na interakce. Jelikož model obsahuje pouze jednu interakci (ostatní ne), byla tato metoda pro naše potřeby nejvhodnější. Tukeyho metoda mnohonásobného porovnání průměrů (Tukey Contrasts) byla použita k porovnání chemikálií uvnitř jednotlivých částí experimentální sekvence. Pro vyhodnocení rozdílů byl použit optimální model, v rámci něhož byla vytvořena speciální proměnná pro interakci mezi částí experimentální sekvence a chemikálií, aby bylo vyhodnocení vůbec možné. Všechny testy byly realizovány na hladině významnosti 0.05.

Grafy zobrazují originální naměřené hodnoty (pozorované časy vlastních reakcí), zatímco numerické výsledky vycházejí z pořadí těchto časů.

Etická poznámka

Pokusy byly prováděny na základě licencí číslo 24773/2008-10001 a CZ 00059 vydaných Ústřední komisí pro ochranu zvířat ČR (UKOZ). Ještěrky zelené byly chytány na základě výjimky z odchyty získané v Národním Parku Podyjí se sídlem ve Znojmě (SZ NPP 0108/2010/8, NPP 0967/2010).

Odchyt ptáků a pokusy na nich byly provedeny na základě povolení 29532/2006-30, CZU150/99 a CZ 00059 vydaných Ústřední komisí pro ochranu zvířat ČR (UKOZ), a MHMP-154521/04/OOP-V-25/R-40/09/Pra vydané Magistrátem hlavního města Prahy.

Odchyt a kroužkování ptáků bylo prováděno na základě získaných licencí od Kroužkovací stanice Národního Muzea v Praze (Nos 876, 1110).

6. Výsledky

6.1. Gekončík noční

Pro všechny behaviorální charakteristiky a ve všech částech testovací sekvence (pre-chemické, chemické a post-chemické pokusy), se reakce gekončíků nočních ze skupiny hexanu (HX) a pyrazínu (PYR) výrazně nelišily od kontrolní skupiny moučného červa bez jakékoli chemikálie. Proto mohl být vyloučen efekt neofobie.

Pro všechny behaviorální charakteristiky se reakce gekončíků nočních v pre-chemickém pokusu pro všechny testované skupiny (3A-TA-OXO-GS-LG/3A) nelišily v porovnání se skupinou hexanu. Gekončíci začínali pokusy se stejnou motivací.

Latence přiblížení se ke kořisti

Latence přiblížení se ke kořisti byly ovlivněny testovanými chemikáliemi ($p < 0.001$; $F = 13.539$; $df1 = 7$; $df2 = 734$), pohlavím gekončíků nočních ($p < 0.01$; $F = 7.371$; $df1 = 1$; $df2 = 734$) a jejich hmotností ($p < 0.001$; $F = 37.064$; $df1 = 1$; $df2 = 734$). Težší zvířata obvykle váhala s přiblížením se ke kořisti déle než zvířata lehčí. Samice většinou váhaly déle než samci. Také zde byla pozorována signifikantní interakce mezi vlivem chemikálie a částí testovací sekvence ($p < 0.05$; $F = 1.971$; $df1 = 14$; $df2 = 734$).

V chemických pokusech gekončíci noční testovaní s GS váhali s přiblížením se ke kořisti signifikantně nejdéle v porovnání s HX skupinou (Tukey Contrasts: $p < 0.001$). Nicméně, zbytek testovaných chemikálií se významně nelišil od reakcí gekončíků v HX skupině. Pokud se srovná efekt testovaných chemikálií, získáme následující pořadí vlivu chemikálií na aversivní reakci gekončíka: GS, 3A, LG/3A, TA, OXO, HX a UM. Latence přiblížení se ke kořisti byly tedy nejkratší v kontrolní UM skupině (Tab. 1).

V post-chemických pokusech byly reakce nejdelší ve skupině 3A. Dále lze chemikálie seřadit podle síly aversivního efektu takto: TA, GS, OXO, UM, LG/3A a HX. Latence přiblížení se ke kořisti byly nejkratší v HX skupině.

Latence zaútočení na kořist

Latence manipulace s kořistí byly ovlivněny testovanými chemikáliemi ($p < 0.001$; $F = 14.384$; $df1 = 7$; $df2 = 734$) a hmotností gekončíků nočních ($p < 0.001$; $F = 18.041$; $df1 = 1$; $df2 = 734$), nikoliv však jejich pohlavím ($p = 0.903$; $F = 0.015$; $df1 = 1$; $df2 = 734$). Težší zvířata obvykle váhala s manipulací kořisti déle než zvířata lehčí. Také zde byla pozorována signifikantní interakce mezi efektem chemikálie a testovací sekvencí ($p < 0.001$; $F = 3.381$; $df1 = 14$; $df2 = 734$).

V chemických pokusech gekončíci noční testovaní s GS a LG/3A nejvíce váhali předtím, než zaútočili na kořist v porovnání s gekončíky v HX skupině (Tukey Contrasts: obojí $p < 0.001$). Latence manipulace s kořistí se také významně lišily ve skupině TA ($p < 0.01$) a 3A ($p < 0.05$). Latence manipulace s kořistí u skupiny OXO se významně nelišila od skupiny HX ($p = 1.000$) (Obr.1).

Nejdelší latence při manipulaci s kořistí byly pozorovány pro skupinu GS. Aversivní efekt ostatních chemikálií můžeme seřadit takto: LG/3A, TA, 3A, OXO, HX a UM. Latence manipulace s kořistí byla tedy nejkratší v kontrolní UM skupině (Tab. 1).

Interval mezi přiblížením se ke kořisti a vlastním útokem na kořist

Intervaly mezi přiblížením se ke kořisti a vlastním útokem na kořist byly ovlivněné testovanou chemikálií ($p < 0.001$; $F = 12.768$; $df_1 = 7$; $df_2 = 734$) a hmotností gekončků nočních ($p < 0.001$; $F = 10.925$; $df_1 = 1$; $df_2 = 734$), nikoliv však jejich pohlavím ($p = 0.348$; $F = 0.883$; $df_1 = 1$; $df_2 = 734$). Těžší zvířata byla pomalejší. Také zde byla pozorována signifikantní interakce mezi efektem chemikálie a částí testovací sekvence ($p < 0.001$; $F = 3.563$; $df_1 = 14$; $df_2 = 734$).

Nejdelší intervaly mezi přiblížením se ke kořisti a vlastní manipulací s kořistí v chemických pokusech byly pozorovány pro skupinu LG/3A. Vliv ostatních chemikálií může být seřazen takto: GS, TA, 3A, OXO, HX a UM. Nejkratší intervaly byly tedy pozorovány v kontrolní UM skupině (Tab. 1).

Manipulace s kněžicí páskovanou

Během testování reakce gekončků na živou kněžici páskovanou bylo pozorováno, že z deseti gekončků šest manipulovalo s plošticí dvakrát (z maximálního množství 5 nabídnutých ploštic), 2 gekončici pouze jednou a zbylí dva nemanipulovali s plošticí vůbec (ze tří nabízených). Pouze dvě kněžice páskované byly zabity, zbylé ploštice byly propuštěny nezraněné. Výsledky naznačují, že pět nabízených ploštic je dostatečný počet k získání zkušenosti vyhnout se dané ploštici.

Shrnutí

- (1) Hexan neměl žádný aversivní efekt na gekončiky noční. Proto mohl být použit jako nepolární rozpouštědlo pro ostatní chemikálie.
- (2) Pyrazín neměl žádný aversivní účinek na gekončiky noční podobně jako hexan. Efekt neofobie tedy mohl být vyloučen.
- (3) Směs tří aldehydů měla aversivní efekt a může tak sloužit jako signál nepoživatelnosti ploštice.
- (4) Směs tří aldehydů obohacená o tridekan měla ještě výraznější aversivní efekt než směs tří aldehydů jako taková. Tridekan pravděpodobně zvyšuje vliv směsi tří aldehydů.
- (5) Oxoaldehyd jako takový neměl žádný aversivní účinek na gekončiky noční.
- (6) Celková MTG sekrece měla silný aversivní účinek.
- (7) Přítomnost živé ploštice kněžice páskované zvyšovala aversivní efekt směsi tří aldehydů jako signál nepoživatelnosti kořisti.

6.2. Ještěrka zelená

Pro všechny behaviorální charakteristiky se v chemických pokusech reakce ještěrek zelených v hexanové skupině významně lišily od kontrolní skupiny UM. A proto byly reakce ještěrek zelených v ostatních chemických skupinách porovnávány přímo s kontrolní skupinou UM.

Pro všechny behaviorální charakteristiky se reakce ještěrek zelených pro všechny testované skupiny (HX-3A-TA-OXO-GS-LG/3A-LP/3A) v pre-chemickém pokusu nelišily od kontrolní skupiny (Tukey Contrasts). Ještěrky začínaly pokusy se stejnou motivací.

Latence přiblížení se ke kořisti

Latence přiblížení se ke kořisti byly ovlivněny pouze testovanými chemikáliemi ($p < 0.001$; $F = 13.438$; $df_1 = 7$; $df_2 = 812$), nikoliv však hmotností ($p = 0.453$; $F = 0.565$; $df_1 = 1$; $df_2 = 812$), jejich pohlavím ($p = 0.095$; $F = 2.359$; $df_1 = 2$; $df_2 = 812$) ani věkem ($p = 0.555$; $F = 0.348$; $df_1 = 1$; $df_2 = 812$). Interakce mezi efektem chemikálie a částí testovací sekvence také nevyšla významně ($p = 0.067$; $F = 1.626$; $df_1 = 14$; $df_2 = 812$).

Při porovnání síly efektu jednotlivých chemikálií vyšlo následující pořadí: GS, LG/3A, LP/3A, 3A, TA, OXO, HX a UM. Nejkratší latence přiblížení se ke kořisti měla u ještěrek zelených kontrolní UM skupina (Tab. 2).

Latence zaútočení na kořist

Latence manipulace s kořistí byly opět ovlivněny pouze testovanými chemikáliemi ($p < 0.001$; $F = 14.806$; $df_1 = 7$; $df_2 = 812$), nikoliv však hmotností ($p = 0.373$; $F = 0.793$; $df_1 = 1$; $df_2 = 812$), pohlavím ($p = 0.162$; $F = 1.825$; $df_1 = 2$; $df_2 = 812$) ani věkem ($p = 0.541$; $F = 0.374$; $df_1 = 1$; $df_2 = 812$). Byla zde pozorována signifikantní interakce mezi testovanou chemikálií a částí testované sekvence ($p < 0.05$; $F = 2.047$; $df_1 = 14$; $df_2 = 812$).

V chemických pokusech měly všechny testované skupiny chemikálií signifikantní aversivní efekt na ještěrky v porovnání s kontrolní UM skupinou (Tukey Contrasts: vše $p < 0.001$) (Obr.2). Nejdelší latence manipulace s kořistí byly pozorovány ve skupině LG/3A. Ostatní chemikálie lze seřadit takto: GS, LP/3A, 3A, TA, OXO, HX a UM. Latence manipulace s kořistí byly tedy nejrychlejší v kontrolní UM skupině (Tab. 2).

V post-chemických pokusech ještěrky zelené, které měly předchozí zkušenost s GS a LP/3A váhaly významně dlouho oproti ještěrkám z kontrolní UM skupiny, ačkoliv mouční červi již na sobě danou chemikálii/sekreci neměli (Tukey Contrasts: $p < 0.05$; $p < 0.01$). Latence manipulace s kořistí v post-chemických pokusech u ostatních chemikálií se významně nelišily od kontrolní UM skupiny (Tukey Contrasts).

Interval mezi přiblížením se ke kořisti a vlastní manipulací s kořistí

Intervaly mezi přiblížením se ke kořisti a vlastní manipulací s kořistí byly signifikantně ovlivněny testovanými chemikáliemi ($p < 0.001$; $F = 14.138$; $df_1 = 7$; $df_2 = 812$) a hmotností ještěrek zelených ($p < 0.01$; $F = 7.360$; $df_1 = 1$; $df_2 = 812$), nikoli však jejich pohlavím ($p = 0.200$; $F = 1.614$; $df_1 = 2$; $df_2 = 812$) ani věkem ($p = 0.435$; $F = 0.609$; $df_1 = 1$; $df_2 = 812$). Těžší zvířata byla v intervalech mezi přiblížením se ke kořisti a vlastní manipulací s kořistí rychlejší. Navíc zde byla pozorována signifikantní interakce mezi efektem testovaných chemikálií a částí testovací sekvence ($p < 0.001$; $F = 2.693$; $df_1 = 14$; $df_2 = 812$).

Intervaly mezi přiblížením se ke kořisti a vlastní manipulací s kořistí byly nejdelší u skupiny LG/3A. Aversivní efekty ostatních chemikálií následují v pořadí: GS, LP/3A, TA, 3A, OXO, HX a UM. Intervaly mezi přiblížením se ke kořisti a vlastní manipulací s kořistí byly nejkratší v kontrolní UM skupině (Tab. 2).

Manipulace s kněžicí páskovanou

Během testování reakcí ještěrek na živou kněžici páskovanou bylo pozorováno, že z osmi ještěrek tři zvířata manipulovala s plošticí dvakrát (z maximálního množství 5 nabídnutých ploštic), tři zvířata pouze jednou a zbylé dvě ještěrky nemanipulovaly s kněžicí páskovanou vůbec. Ani jedna ploštice nebyla zabita.

Manipulace s ruměnicí pospolnou

Reakce ještěrek zelených na živou ruměnici pospolnou se lišily od pozorování s kněžicí páskovanou. Ze sedmi zvířat pouze jedna ještěrka (mladý jedinec) manipulovala a zabila jednu ruměnici. Zbýlých šest zvířat nemanipulovalo s žádnou z nabízených ploštic. Všechny ploštice, až na jednu, byly nedotknuté.

Shrnutí

- (1) Hexan měl nejslabší aversivní efekt na ještěrky zelené ze všech testovaných chemikálií v chemických pokusech. Nicméně v post-chemických pokusech, kdy byl hexan stále přítomen, se již ještěrky habituovaly. Jeho vliv se tedy prokázal jako minimální.
- (2) Aversivní účinek směsi tří aldehydů by se dal označit jako střední a silnější než u této směsi obohacené o tridekan, což je v rozporu s hypotézou tridekanu jako katalyzátoru.
- (3) Směs tří aldehydů obohacená o tridekan měla silnější aversivní efekt než oxoaldehyd.
- (4) Oxoaldehyd měl druhý nejslabší vliv (hned po hexanu) ze všech testovaných chemikálií, což lze přičítat jeho charakteru, který je bez zápachu.
- (5) Celková MTG sekrece měla silný aversivní efekt na ještěrky zelené.
- (6) Přítomnost živé kněžice páskované/ruměnice pospolné zvyšovala aversivní efekt směsi tří aldehydů. Silnější efekt byl pozorován v přítomnosti kněžice páskované než v přítomnosti ruměnice pospolné.

6.3. Sýkora koňadra

Pro všechny behaviorální charakteristiky a ve všech částech testovací sekvence reakce sýkor koňader se mezi kontrolní skupinou UM a hexanovou skupinou HX významně nelišily.

Pro všechny behaviorální charakteristiky reakce sýkor koňader z ostatních testovaných skupin (3A-TA-OXO-GS) se v pre-chemické testu nelišily od hexanové skupiny HX. Všechny sýkory koňadry tedy začínaly pokus se stejnou motivací.

Latence zaútočení na kořist

Latence manipulace s kořistí byly ovlivněny testovanými chemikáliemi ($p < 0.001$; $F = 41.777$; $df1 = 5$; $df2 = 1940$) a jejich pohlavím ($p < 0.001$; $F = 14.630$; $df1 = 1$; $df2 = 1940$), nikoli však jejich věkem ($p = 0.857$; $F = 0.032$; $df1 = 1$; $df2 = 1940$). Samice byly rychlejší než samci. Byla pozorována signifikantní interakce mezi efektem testovaných chemikálií a částí testovací sekvence ($p < 0.001$; $F = 3.129$; $df1 = 10$; $df2 = 1940$).

V chemických pokusech byly signifikantně nejdelší latence manipulace s kořistí ve skupinách GS a OXO (Tukey Contrasts: obojí $p < 0.001$) v porovnání s HX skupinou. Skupina 3A měla také signifikantní efekt na dané latence, nicméně tento efekt byl slabší než u předešlých chemikálií (Tukey Contrasts: $p < 0.05$). Latence manipulace s kořistí ve skupině TA se signifikantně nelišily s reakcemi v HX skupině (Tukey Contrasts: $p = 0.884$) (Obr. 3).

Sýkory koňadry váhaly nejvíce s manipulací kořisti potřené OXO. Aversivní efekt ostatních chemikálií jde v tomto pořadí: GS, 3A, UM, TA a HX. Latence manipulace s kořistí byly tedy nejkratší v HX skupině (Tab. 3).

V post-chemických pokusech sýkory koňadry, které měly předtím zkušenost s GS, OXO a 3A, váhaly signifikantně déle, ačkoliv vlastní moučný červ již nebyl chemikálií potřen (Tukey Contrasts: all $p < 0.001$).

Interval mezi útokem a vlastní konzumací kořisti

Interval mezi útokem a vlastní konzumací kořisti byl ovlivněn testovanými chemikáliemi ($p < 0.001$; $F = 82.401$; $df1 = 5$; $df2 = 1940$) a věkem sýkor koňader ($p < 0.001$; $F = 11.061$; $df1 = 1$; $df2 = 1940$), nikoli však jejich pohlavím ($p = 0.827$; $F = 0.048$; $df1 = 1$; $df2 = 1940$). Mladší ptáci byli pomalejší než starší ptáci. Byla zde také pozorována signifikantní interakce mezi efektem testovaných chemikálií a částí testovací sekvence ($p < 0.001$; $F = 3.138$; $df1 = 10$; $df2 = 1940$).

Při posuzování intervalů mezi manipulací s kořistí a vlastní konzumací kořisti, sýkory koňadry v chemických pokusech váhaly nejvíce u chemikálie OXO. Efekt ostatních chemikálií byl následující: GS, 3A, TA, UM a HX. Intervaly mezi manipulací s kořistí a vlastní konzumací kořisti byly nejkratší v HX skupině (Tab. 3).

V post-chemických pokusech koňadry, které měly předchozí zkušenost s GS, OXO a 3A, váhaly signifikantně déle než ptáci z HX skupiny, ačkoliv vlastní moučný červ již nebyl chemikálií potřen (Tukey Contrasts: all $p < 0.001$).

Shrnutí

- (1) Sýkory koňadry nevykazovaly žádnou aversivní reakci vůči hexanu.
- (2) Směs tří aldehydů měla aversivní efekt na sýkory koňadry, když manipulovaly s kořistí a v intervalech mezi manipulací s kořistí a vlastní konzumací. Směs tří aldehydů může mít úlohu signálu nepoživatelnosti kořisti.
- (3) Směs tří aldehydů obohacená o tridekan neměla žádný aversivní efekt na sýkory koňadry, když manipulovaly s kořistí. Slabý aversivní efekt byl pozorován v chemických pokusech v intervalech mezi manipulací s kořistí a vlastní konzumací kořisti. Tridekan pravděpodobně snižuje vliv směsi tří aldehydů jako takové.
- (4) Oxoaldehyd měl silný aversivní účinek na sýkoru koňadru.
- (5) Celková MTG sekrece měla jasný aversivní účinek.

6.4. Sýkora modřinka

Pro všechny behaviorální charakteristiky se reakce sýkor modřinek pro všechny testované skupiny (HX-3A-OXO-GS) v pre-chemickém testu nelišily od kontrolní skupiny UM (Tukey Contrasts). Všechny sýkory modřinky tedy začínaly pokus se stejnou motivací.

Latence zaútočení na kořist

Latence zaútočení na kořist byly ovlivněny testovanými chemikáliemi ($p < 0.001$; $F = 25.128$; $df1 = 4$; $df2 = 529$), nikoli však pohlavím ptáků ($p = 0.390$; $F = 0.739$; $df1 = 1$; $df2 = 529$) či jejich věkem ($p = 0.536$; $F = 0.384$; $df1 = 1$; $df2 = 529$). Interakce mezi efektem chemikálie a částí testované sekvence byla rovněž nevýznamná ($p = 0.113$; $F = 1.630$; $df1 = 8$; $df2 = 529$).

V chemických pokusech byly latence manipulace s kořistí signifikantně delší pouze ve skupině GS (Tukey Contrasts: $p < 0.001$) v porovnání s kontrolní UM skupinou. Latence zaútočení na kořist v ostatních skupinách, 3A, OXO a HX vyšly nevýznamně v porovnání s kontrolní UM skupinou (Tukey Contrasts: $p = 0.122$; $p = 0.873$; $p = 0.994$) (Fig. 4).

Sýkory modřinky nejvíce váhaly nad kořistí potřenou GS. Efekt ostatních chemikálií lze seřadit takto: 3A, OXO, HX a UM. Latence manipulace s kořistí byly tudíž nejkratší v kontrolní UM skupině (Tab. 4).

Interval mezi útokem a vlastní konzumací kořisti

Intervaly mezi manipulací s kořistí a vlastní konzumací kořisti byly ovlivněny pouze testovanými chemikáliemi ($p < 0.001$; $F = 16.697$; $df1 = 4$; $df2 = 529$), nikoli pohlavím ptáků ($p = 0.095$; $F = 2.802$; $df1 = 1$; $df2 = 529$), či jejich věkem ($p = 0.249$; $F = 1.330$; $df1 = 1$; $df2 = 529$). Interakce mezi efektem chemikálie a částí testované sekvence byla rovněž nevýznamná ($p = 0.359$; $F = 1.103$; $df1 = 8$; $df2 = 529$).

Pokud posuzujeme intervaly mezi manipulací s kořistí a vlastní konzumací kořisti sýkory modřinky nejvíce váhaly nad kořistí potřenou GS. Efekt ostatních chemikálií může být seřazen následujícím způsobem: HX, OXO, 3A a UM. Tyto intervaly byly nejkratší v kontrolní UM skupině (Tab. 4).

Shrnutí

- (1) Hexan měl na sýkory modřinky aversivní přetrvávající účinek, když manipulovaly s kořistí. Na druhé straně, pokud hodnotíme intervaly mezi manipulací s kořistí a vlastní konzumací kořisti, byly sýkory modřinky v post-chemických pokusech schopné tuto toxickou zátěž překonat.
- (2) Směs tří aldehydů měla jasný aversivní účinek v post-chemických pokusech v rámci latence manipulace s kořistí.
- (3) Na sýkory modřinky měl oxolaldehyd zpožděný účinek, když manipulovaly s kořistí (v post-chemických pokusech), zatímco u intervalu mezi manipulací s kořistí a vlastní konzumací kořisti měl aversivní účinek přímo v chemických pokusech. Zdá se tedy, že oxoaldehyd by mohl mít vliv jako přímý toxin.
- (4) Celková MTG sekrece měla jasný aversivní účinek na sýkory modřinky.
- (5) Sýkory modřinky váhaly nejvíce právě na celkovou MTG sekreci kněžice páskované.

7. Diskuse a Závěry

Získané výsledky souhlasí s hypotézou, že repelence závisí obzvláště na aldehydech (Eisner 1970; Hamilton et al. 1985; Gunawardena a Herath 1991). Gekončící a ještěrky, stejně jako ptáci, byli vystaveni dilematu – hladovět nebo sežrat potenciálně jedovatou kořist (Glendinning 2007). U gekončků je odmítnutí chemicky bráněné kořisti pravděpodobně založeno na čichu a/nebo vomerolfakci (Halpern 1987; Schwenk 1993). A tudíž by hlavní roli mohl hrát olfaktorický aposematismus (Eisner a Grant 1981; Weldon 2013). Gekončící jsou velmi citliví na vzdušné těkavé látky – volatily, více než jakákoli jiná skupina ještěrů (Schwenk 1993). Zatímco čich má za funkci zejména vyhledávat potravu a potenciální predátory a reaguje převážně na těkavé látky, vomeronasální systém se zaměřuje především na nové podněty a reprodukční chování a je proto sensitivní také na netěkavé látky (Schwenk 1993).

U ještěrek zelených odmítnutí kořisti s repelentní sekrecí je pravděpodobně založeno na (1) chuti (Schwenk 1985; Bonacci et al. 2008) a (2) čichu/vomerolfakci (Cooper 1991, 1996). Předchozí experimenty založené na chemické diskriminaci ukázaly, že u ještěrů je chemická diskriminace zprostředkována spíše vomerolfakcí než čichem (Cooper 1997). Protože MTG sekrece je vysoce zápašná a těkavá (např. aldehydy), ukazuje se, že gekončící

stejně jako ještěrky se mohou vyhnout takovéto kořisti pouze na základě zápašného signálu jako takového.

Vyhnutí se chemicky bráněné kořisti u ptáků je založeno pravděpodobně na (1) chuti (Schlee 1986; Skelhorn a Rowe 2006a,b,c,d), ale roli může hrát také (2) olfaktorický aposematismus (Eisner a Grant 1981; Weldon 2013) a (3) chemestéze (Conner et al. 2007).

Ptáci si vyvinuli několik strategií chování, jak se s chemicky bráněnou kořistí vypořádat (Skelhorn a Rowe 2006a). Tyto “manipulační techniky” se vyhýbají nebo minimalizují kontakt s danou sekrecí (Schlee 1986). V našich pokusech ptáci tyto techniky běžně používali. Žrali jen vnitřní části moučného červa, trhali ho na kousky a otírali si zobáky během a/nebo po krmení moučným červem. Ptáci umí selektivně vybírat mezi vizuálně identickou potravou pouze na základě jejich chemického obsahu (Skelhorn and Rowe 2006d). Také bylo pozorováno aversivní chování na dálku – jako třeba mrkání v přítomnosti červa natřeného směsí tří aldehydů a celé MTG sekrece v případě ptáků stejně jako v případě ještěrů (ne však v přítomnosti oxoladehydu, pyrazínu a hexanu). Proto se zdá, že některé chemikálie, jako například směs tří aldehydů, a celá MTG sekrece mají silnou zápašnou funkci jako signál na dálku stejně jako jsou schopny vyvolat pálení (bolest) pokud jsou inhalovány (oko, dýchací systém). To by mohl být spolehlivý signál spojený s úrovní obrany a také by mohl indikovat to, že chemická sekrece může sloužit jako signál i jako druhotná složka obrany (Gohli a Högstedt 2009).

Srovnávací studie aversivních efektů jednotlivých chemických složek repelentní sekrece kněžice páskované proti čtyřem různým druhům predátorů odhalila širokou míru podobností mezi predátory, zejména v reakci na celkovou MTG sekreci. Také potvrdila základní roli aldehydů jako repelentních složek sekrece, nicméně v jednotlivých reakcích se zmíněné druhy predátorů liší. Chemická komplexita repelentní sekrece by tedy mohla být ovlivněna následným výběrem daným různými druhy predátorů. Výstupy z jednotlivých pokusů je možno shrnout takto:

1. Hexan (použit jako nepolární rozpouštědlo pro ostatní chemikálie)

Hexan neměl aversivní účinek na gekončiky noční ani na sýkory koňadry. V případě ještěrek zelených měl hexan slabý aversivní účinek v chemických pokusech, zatímco v post-chemických pokusech (moučný červ byl hexanem stále potřen) byly ještěrky zelené na něj již habituovány. Obdobné chování bylo pozorováno i u sýkor modřinek (v intervalech mezi manipulací a vlastní konzumací kořisti). Na druhou stranu hexan měl přetrvávající účinek při manipulaci s kořistí v post-chemických pokusech.

2. Pyrazín (pozitivní kontrola v pokusech s gekončiky nočními)

Pyrazín byl použit jako pozitivní kontrola v pokusech s gekončiky nočními, aby mohl být vyloučen efekt neofobie proti novému neznámému zápachu. Výsledky ukázaly, že pyrazín neměl žádný aversivní účinek v žádném hodnoceném chování. Proto mohla být neofobie u gekončiků nočních vyloučena.

3. Směs tří aldehydů

Směs tří aldehydů měla aversivní účinek na všechny druhy vybraných predátorů, ačkoliv jednotlivé druhy reagovaly různě. V případě predátorů – ještěrů měla tato směs aversivní účinek, byla-li přítomna na moučném červu (chemické pokusy). Sýkory koňadry byly schopné generalizovat tuto kořist dříve potřenou touto směsí. V případě sýkor modřinek měla tato směs přetrvávající účinek (manipulace s kořistí). Zdá se tedy, že směs tří aldehydů může mít funkci signálu nepoživatelnosti kořisti a může vyvolat generalizaci.

4. Směs tří aldehydů obohacená o tridekan

Směs tří aldehydů obohacená o tridekan měla jasný a silný aversivní účinek na gekončíky noční. V tomto případě tridekan pravděpodobně zesiloval vliv vlastní směsi tří aldehydů. V případě ještěrek zelených, tridekan tento vliv pro změnu snižoval, ale stále zde byl silný aversivní účinek v porovnání s oxoaldehydem. Podobný efekt byl pozorován u sýkor koňader, kde směs tří aldehydů a tridekan měla velmi slabý aversivní účinek (intervaly mezi manipulací a vlastní konzumací kořisti).

5. Oxoaldehyd

Oxoaldehyd neměl žádný aversivní účinek na gekončíky noční, zatímco v případě ještěrek zelených zde byl pozorován slabý efekt. Co se týká ptačích predátorů, oxoaldehyd měl silný aversivní účinek na sýkory koňadry, zatímco u sýkor modřinek byl tento efekt zpožděn. Oxoladehyd může mít funkci přímého toxinu pro sýkory koňadry. Na sýkory modřinky měl silný přetrvávající účinek. Důvod různých reakcí predátorů proti oxoaldehydu může být vysvětlen různou úrovní chuti mezi predátory.

6. Celková MTG sekrece *G. lineatum*

Pro všechny vybrané druhy predátorů měla celková MTG sekrece kněžice páskované jasný aversivní účinek a může tak mít funkci nejen signálu ale i druhotné chemické obrany jako takové.

7. Přítomnost živé kněžice páskované před testovanou chemickou sekvencí směsi tří aldehydů

Přítomnost živé kněžice páskované zvyšovala aversivní účinek směsi tří aldehydů jako signálu nepoživatelnosti kořisti u gekončíků nočních stejně jako u ještěrek zelených.

8. Přítomnost živé ruměnice pospolné před testovanou chemickou sekvencí směsi tří aldehydů

Přítomnost živé ruměnice pospolné také zvýšila aversivní účinek směsi tří aldehydů a navíc vyvolala generalizaci u ještěrek zelených. Nicméně, silnější efekt byl pozorován spíše v přítomnosti kněžice páskované než v přítomnosti ruměnice pospolné.

8. Abstract

The chemical defence of Heteroptera is based on the repellent secretion that is very complex and consists of dozens chemical compounds. Heteroptera have good ability to produce/store large amounts of chemical components. The repellent secretion of *Graphosoma lineatum* is composed of many chemicals, such as short-chained aldehydes, which may signal the unpalatability of the bug to its potential predators or be directly toxic for them.

The thesis is aimed at the major components of defensive secretion of *Graphosoma lineatum* – aldehydes – as well as the whole metathoracic scent-glands secretion of *Graphosoma lineatum*. The aversive reactions of four selected predators were evaluated: (1) leopard gecko (*Eublepharis macularius*); (2) green lizard (*Lacerta viridis*); (3) great tit (*Parus major*) and (4) blue tit (*Cyanistes caeruleus*).

The following major compounds of the repellent secretion were tested: (1) the mixture of three aldehydes: (E)-hex-2-enal, (E)-oct-2-enal, (E)-dec-2-enal; (2) the mixture of three aldehydes and tridecane; (3) oxoaldehyde: (E)-4-oxohex-2-enal; (4) extracted metathoracic scent-glands secretion of *Graphosoma lineatum* adults; (5) hexane as a non-polar solvent and (6) pyrazine: 2-isobutyl-3-methoxypyrazine in experiments with leopard geckos as a positive control for excluding the effect of neophobia. All chemicals were applied on a palatable food (*Tenebrio molitor* larvae).

The aversive reactions of predators were evaluated by observing following behavioural characteristics: (1) approach latencies, (2) attack latencies, (3) approach-attack intervals and (4) attack-eating intervals towards the mealworms.

Leopard geckos exhibited aversive reactions to the mixture of three aldehydes and also to this mixture and tridecane. The mixture enriched by tridecane had even stronger aversive effect. On the other hand, oxoaldehyde did not have any aversive effect. The whole metathoracic scent-glands secretion had clearly an aversive effect on leopard geckos. Furthermore, when living specimen of *Graphosoma lineatum* was offered to leopard geckos before the trials with the mixture of three aldehydes, the impact of this mixture was enhanced thus acting as a potential signal of unpalatability.

Green lizards exhibited an aversive reaction to the mixture of three aldehydes. Tridecane reduced the aversive effect of the aldehydes mixture. Oxoaldehyde had the weakest but still significantly aversive effect on green lizards. The whole metathoracic scent-glands secretion had clearly an aversive effect for green lizards. Moreover, when living specimen of *Graphosoma lineatum*/ *Pyrhocoris apterus* was presented to green lizards before the trials with the mixture of three aldehydes, the effect of this mixture was enhanced hence acting as a potential signal of unpalatability.

The results of great tits and blue tits showed that both bird species had aversive reactions to the mixture of three aldehydes. On the other hand, the mixture of three aldehydes and tridecane did not have any aversive effect in case of great tits. Oxoaldehyde had strong aversive effect for great tits, whereas for blue tits this effect was delayed. The whole metathoracic scent-glands secretion of *Graphosoma lineatum* had clearly an aversive effect for both bird species. Great tits hesitated most to oxoaldehyde, while blue tits hesitated most to the whole metathoracic scent-glands secretion of *Graphosoma lineatum*.

In conclusion, aldehydes show a promise as deterrents for different types of chosen predators. The mixture of three aldehydes plays role as a strong signal of unpalatability of *Graphosoma lineatum*.

Key words: aldehyde, aversive reaction, leopard gecko, green lizard, great tit, blue tit, repellent secretion

9. Introduction

The Heteroptera represent a group rich in taxa with well-developed chemical defensive secretion towards predators. The defensive secretion of true bugs is very complex and it contains numerous chemical compounds (Aldrich 1988). The antipredatory function is supposed to be mediated by the compounds, which are abundant in the secretion – such as aldehydes or tridecane (Aldrich 1988; Farine et al. 1992; Šanda et al. 2012).

Although the chemical analysis is well-known in many heteropteran species (Hamilton et al. 1985; Aldrich 1988; Farine et al. 1992; Aldrich et al. 1996, 1997; Krall et al. 1999; Aliabadi et al. 2002; Prudic et al. 2008; Fáváro et al. 2011; Šanda et al. 2012), it is still unknown, which components are responsible for the aversive reactions of different types of predator species.

Yet, only few studies evaluated predators' reactions towards aposematic insect (Krall et al. 1999; Exnerová et al. 2006; Bonacci et al. 2008; Svádová et al. 2009) and/or effects of the defensive secretion on vertebrate predators, such as Benfield (1972) or Härlin (2005) using the defensive secretion of beetles of family Gyrinidae. However, little is known about testing individual components of the chemical defence secretion of heteropteran aposematic insect in relation to vertebrate predators. Therefore, the present study provides, probably for the first time, evaluation of the aversive reactions of selected potential predators towards the defensive repellent secretion of the stink bug *G. lineatum*.

This study is focused on the major compounds of the repellent secretion – aldehydes of *G. lineatum* (Šanda et al. 2012). These compounds are highly volatile and odorous and can function as a potential signal of unpalatability as well as a secondary chemical defence itself (Eisner 1970; Hamilton et al. 1985). However, little is known how the major compounds of the repellent secretion of the striated shieldbug precisely work.

9.1. Repellent secretion of *Graphosoma lineatum*

The striated shieldbug is a widely used model for chemical analysis of the MTG secretion (Stránský et al. 1998; Durak and Kalender 2009; Šanda et al. 2012). The chemical defence of *G. lineatum* is composed of a highly volatile liquid, which contains irritants as well as toxins (Stránský et al. 1998; Durak and Kalender 2009; Šanda et al. 2012) and it comes from MTG in adults (Aldrich 1988). Thanks to this volatile composition, the repellent secretion could operate over greater distance and therefore, there is a bigger chance that potential predator, bird or lizard, could discriminate and avoid such a prey due to olfactory aposematism (Eisner and Grant 1981).

While irritants, such as *n*-tridecane (Gunawardena and Herath 1991), are effective against arthropod predators, e.g. mantids, spiders or ants (Aldrich 1988); toxins, such as α,β -unsaturated oxoaldehydes (Šanda et al. 2012), can protect the bugs mostly against birds and other vertebrates (Aldrich 1988).

The following aldehydes belong to the most common compounds of the striated shieldbug repellent secretion: (E)-2-hexenal, (E)-2-decenal, (E)-2-octenal, tridecane, (E)-4-oxohex-2-enal (Šanda et al. 2012). The present study is therefore focused on these compounds from adult MTG secretion.

According to personal communication with Ludvík Streinz and Bohumír Koutek from the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, (E)-2-hexenal, (E)-2-decenal and (E)-2-octenal were tested together as a mixture, because of their common occurrence in the repellent secretion of true bugs (Aldrich 1988; Farine et al. 1992; Aldrich et al. 1996; Stránský et al. 1998; Durak and Kalender 2009; Šanda et al. 2012). Therefore, this mixture could function as a potential olfactory signal – typical nasty smell of the striated shieldbug (L. Streinz, personal communication).

9.2. Model organisms

For the present study six model organisms were selected. Four model organisms were chosen as predators: two species of lizards – leopard gecko (*Eublepharis macularius*) and green lizard (*Lacerta viridis*) and two species of birds – great tit (*Parus major*) and blue tit (*Cyanistes caeruleus*). Two true bug species were chosen as a prey: striated shieldbug (*Graphosoma lineatum*) and firebug (*Pyrrhocoris apterus*).

The two lizard species represent opposing types of the predator – diurnal and nocturnal. Both are active foragers (Cooper 1995) and insectivorous predators (Angelici et al. 1997; Seufer et al. 2005) and they are more dependent on the chemical senses than sit-and-wait predators (Huey and Pianka 1981). However, the prey discrimination in these two types of predators is slightly different.

In leopard gecko, two major senses can be used for the prey detection – olfaction and vomerolfaction (Schwenk 1993, Rehorek et al. 2000). In geckos, the olfactory chamber is well developed as well as the olfactory bulbs in brain (Pratt 1948). On the other hand, gustation is poorly developed (Schwenk 1985). Moreover, there is no evidence of the taste buds in leopard geckos (Schwenk 1985, Jamniczky et al. 2009).

In green lizard, the senses, which can mediate the chemical discrimination of the prey, are vomerolfaction, olfaction and gustation (Schwenk 1985, 1993; Bonacci et al. 2008). The olfaction is similarly well-developed as in case of geckos (Gabe and Saint Girons 1976; Cooper 1996). As for the gustation, which is well developed sense in the family Lacertidae (Schwenk 1985), the taste buds are numerous, especially on the ventrolateral surfaces of the foretongue and become scattered in the glandular portion of the hindtongue (Schwenk 1985). In green lizard, the taste buds are even present on the long tines of the forked tongue tip (Schwenk 1985). The other sense, which could be responsible for food discrimination, is vomerolfaction that is also well developed in green lizards (Cooper 1991, 1996). Both strategies could be useful in avoiding chemically defended prey such as striated shieldbug *G. lineatum*.

In case of selected bird species, the finding that both species avoid red-and-black Heteroptera was taken into account (Hotová Svádová et al. 2010). The question is, which chemical compound could be responsible for the aversive reactions of particular species. Both species are insectivorous (del Hoyo et al. 2007) and their diet contains true bugs (Exnerová et al. 2003a; del Hoyo et al. 2007). Although the nasal sense in birds is not well developed (Mason and Clark 2000), the chemical defence of *G. lineatum* still could play a role as signal in olfactory aposematism (Eisner and Grant 1981) as well as in gustation (Schlee 1986) or chemesthesis (Mason and Clark 2000; Conner 2007) thanks to its volatile composition (Šanda et al. 2012). According to Exnerová et al. (2003b), it was shown that even closely related species, such as Paridae, reacted differently in avoiding similar aposematic prey.

Two true bug species were chosen as a prey. Firstly, the striated shieldbug (*Graphosoma lineatum*), on which defence secretion this study is based, and secondly the firebug (*Pyrrhocoris apterus*), which was used as another chemically defended prey of red-and-black Central European aposematic Heteroptera (Hotová Svádová et al. 2010).

10. Aims of the study

The aim of this work was to study the effects of common chemical compounds of MTG secretion of *G. lineatum* towards different types of potential predators and to test the hypothesis that the repellent potency of this secretion is dependent mostly on the aldehydes. The specific aims of the thesis were:

- (1) To assess the aversive effect of particular chemical components of MTG secretion and the whole MTG secretion of *G. lineatum* towards four different types of predators – leopard geckos (*Eublepharis macularius*), green lizards (*Lacerta viridis*), great tits (*Parus major*) and blue tits (*Cyanistes caeruleus*).
- (2) To compare the aversive effect of selected chemical compounds and the whole MTG secretion of *G. lineatum* for all selected types of predators.
- (3) To evaluate whether the mixture of three aldehydes could function as a potential signal of unpalatability for all tested predators.
- (4) To verify the hypothesis that tridecane may function as catalyst for the mixture of three aldehydes thus potentiating aversive reactions of tested predators (leopard geckos, green lizards and great tits).
- (5) To evaluate the hypothesis that oxoaldehyde has function as a direct toxin for all tested predators.
- (6) To investigate how the presence of living specimen of *G. lineatum* influences aversive reactions of leopard geckos to the mixture of three aldehydes.
- (7) To investigate how the presence of living specimen of *G. lineatum* and *P. apterus* influences aversive reactions of green lizards to the mixture of three aldehydes.

11. Material and Methods

Leopard geckos

In total 77 leopard geckos (*Eublepharis macularius*) were tested during the years 2010 – 2012. The experiments were carried out in the period after breeding season and before hibernation: in autumn from September to the first week in December.

One week before the experiments, geckos were removed from their breeding groups and were housed individually in terraria of sizes 20x40x20 cm for allowing habituation to the laboratory environment. At this time, they were kept at temperature 27 °C, 50 % of humidity, without feeding but offering water ad libitum. The light conditions were set according to the twelve hour light/dark cycle (6:00 am – 6:00 pm).

Green lizards

In total 84 green lizards (*Lacerta viridis*) were tested during the years 2010 – 2012. Lizards were captured in Podyjí National Park (48° 48' 59.20''N – 15° 58' 37.80''E of Greenwich) in South Moravia after the breeding season and before hibernation: from July to early August.

Lizards were housed individually in glass terraria of size 20x40x20 cm, temperature 29 °C, 45 % humidity, twelve hour period of light/dark cycle (6:00 am – 6:00 pm). Lizards

were allowed to habituate to the laboratory environment for one week before the experiments with offering water ad libitum.

Great tits and Blue tits

In total 196 great tits (*Parus major*) and 91 blue tits (*Cyanistes caeruleus*) were tested. Birds were captured using the mist nets in Prague from September 2009 to March 2011. Captured birds were housed individually in plastic cages of size 50x40x40 cm with a wire-mesh front wall. Cages were equipped with wooden perches, water bowls and feeders.

Birds were allowed to habituate to the laboratory conditions for 2 – 7 days before the experiments. The light conditions were set according to the outdoor photoperiod and the temperature was between 18 – 22 °C. The birds were provided with mealworms, sunflower seeds and water ad libitum.

The experiments were carried out in wooden cages (70x70x70 cm) with wire-mesh walls and ceiling and the one-way mirror front wall through which the birds were observed.

Graphosoma lineatum

Striated shieldbug (*Graphosoma lineatum*, Heteroptera: Pentatomidae) was selected as a primary model true bug species. Shieldbugs were picked up at several locations in Prague and kept in a thermostat-controlled environment at long-day photoperiod (16L:8D) and the temperature oscillating between 24 °C (day) and 20 °C (night).

They were supplied with tops, leaves and seeds of their host plants: carrot (*Daucus carota*), cow parsley (*Anthriscus sylvestris*) and garden angelica (*Angelica archangelica*) and water.

Pyrrhocoris apterus

The firebug (*Pyrrhocoris apterus*) was chosen as a second model organism only for the tests with green lizards as another living specimen of red-and-black aposematic Heteroptera (Hotová Svádová et al. 2010).

Firebugs were collected at several localities in Prague and kept in captivity under natural conditions similarly to the striated shieldbug. The firebugs were fed on host plants and seeds of Malvaceae, Tiliaceae, Bombacaceae and Sterculiaceae with supplement of water.

Larvae of *Tenebrio molitor*

Mealworms (larvae of *Tenebrio molitor*, length approx. 20 mm) were used for the experiments as a palatable prey. Tested chemicals were applied on the middle part of the dorsal side of the body of a mealworm.

Adding chemicals on the surface of the middle part of the dorsal side of mealworms did not change their behaviour in any way. Untreated mealworms were used as a control prey.

Chemicals

Tested chemicals represent major components of adult MTG secretion of striated shieldbug *G. lineatum* (Stránský et al. 1998; Šanda et al. 2012). Following chemicals and mixtures were tested: (1) the mixture of three aldehydes (3A): (E)-hex-2-enal, (E)-oct-2-enal, (E)-dec-2-enal at a volume ratio 10:1:10; (2) the mixture of three aldehydes and tridecane (TA), ratio 10:1:10:10; (3) oxoaldehyde (OXO): (E)-4-oxohex-2-enal; (4) extracted MTG

secretion of *G. lineatum* adults (GS); (5) hexane (HX) – it was used as a non-polar solvent for all the other chemicals and (6) pyrazine (PYR): 2-isobutyl-3-methoxypyrazine as a positive control to exclude the effect of neophobia in the experiments with leopard geckos.

The mixtures of three aldehydes, tridecane and oxoaldehyde were used as their 2 % solution in hexane; pyrazine was dissolved in the small amount of glycerol and then diluted in distilled water to form its 0.003 % solution, which was sufficient to elicit potential aversive reactions in chicks (Marples and Roper, 1996). Therefore, this concentration was chosen for geckos as well due to their better nasal/vomeronasal sensitivity.

All chemicals were applied using a Hamilton syringe on the middle part of the dorsal side of the mealworms in the amount of 2 μ l, an amount of secretion that is usually discharged by the striated shieldbug (M. Šanda, personal communication). Metathoracic scent-glands secretion (GS) was obtained by simulated attacks to the striated shieldbugs. When the shieldbug had released the secretion, it was applied directly on the dorsal side of the mealworm.

Testing procedure

The same basic testing sequence was used for all types of the predators with the exception of blue tits, where the testing sequence was shortened. Each animal was tested only once.

The testing sequence consisted of ten mealworms presented successively in five-minute trials. For the experimental groups tested with the chemicals (3A-TA-OXO-GS-PYR), the sequences started with a hexane-treated mealworm followed by five mealworms treated with the particular chemical corresponding to the experimental group, and ended with a sequence of four hexane-treated mealworms. In case of blue tits, due to their smaller size, the sequence was reduced to 6 mealworms – first mealworm treated with hexane followed by 3 mealworms with the particular chemical, and ended with two hexane-treated mealworms. Animals from the control group (UM) were offered ten/six untreated mealworms; animals from the hexane group (HX) were offered ten/six hexane-treated mealworms. This way, it was possible to compare the reactions of animals towards the tested chemicals with potentially repellent function with their reactions to hexane and to untreated mealworms.

The behaviour in different parts of the experimental sequence was also compared: (1) “pre-chemical“ trials in the beginning, (2) “chemical“ trials with tested chemicals, and (3) “post-chemical“ trials following the experience with chemicals to differentiate between immediate and persisting effect of the tested chemicals. In each trial, the animal was allowed for five minutes to attack and potentially consume the mealworm, otherwise the trial was stopped. The trial was stopped earlier, if the animal consumed the prey.

For the testing of lizard predators' reactions to the living specimen of *G. lineatum* (LG/3A) or *P. apterus* (LP/3A), the alternation of the untreated mealworm and the bug was used until the lizard rejected the bug three times without any handling (manipulation by touching and/or taking it into the mouth). The bug was offered maximally five times. This sequence was followed by the standard sequence of ten mealworms treated by the mixture of three aldehydes.

For lizard's predator species following behavioural characteristics were recorded: (1) Approach latencies – representing the time when the animal started to come purposefully towards the prey; (2) Attack latencies – representing the time when the animal started to handle the prey (after approaching it); and (3) Approach-attack intervals – representing the degree of hesitation between approaching the prey and attacking the prey. The whole time interval is evaluated during which the tested chemical could influence the predator's behaviour.

For bird's predators following behavioural characteristics were recorded: (1) Attack latencies – representing the time when the bird started to handle the prey (touching, pecking or seizing); and (2) Attack-eating intervals – representing the interval between the first attack and the moment the bird started eating the prey.

Statistical analyses

The data were analysed using the statistical program R 3.0.1. Since the data were not normally distributed (Shapiro–Wilk normality test), robust methods of analysis based on ranks were applied. ANCOVA was used to estimate the underlying model and to evaluate the impact of the chemicals. One of the assumptions of classical ANCOVA is normal distribution of the data. Since this assumption was violated, the original method had to be adjusted (inspired by Kruskal–Wallis ANOVA). Instead of the real time values, the ranks of the recorded data (latencies of chosen behavioural elements) were used as the dependent variable, and it was evaluated in which way these ranks depended on the other covariates: chemicals, part of the experimental sequence (pre-chemical, chemical and post-chemical trials), age, sex and weight (with age and weight entering the model as numerical variables, the other covariates as categorical variables). An interaction between the time period and the chemical was also assumed. Type II ANOVA table was used to evaluate the impact of the particular covariates, and Tukey contrasts were used to compare chemicals within parts of the experimental sequence. Type II ANOVA, which assesses the impact of each covariate, controlling for the other covariates (their main effect) but not for interactions, was chosen since not all types of interactions were anticipated in the model. The comparison of particular chemicals was carried out in the final model which included only the covariates with a significant impact on the dependent variable. A new “interaction variable” (chemical vs. part of the experimental sequence) was used for this purpose. In all tests, significance was assumed at $p < 0.05$.

Note, that the figures reflect the original recorded values (i.e. observed time of reactions), whereas the numerical results come from the ranks of these times.

Ethical note

The experiments were carried out under the permission no. 24773/2008-10001 and CZ 00059 issued by the Central Commission for Animal Welfare of the Czech Republic (UKOZ). Green lizards were caught under the permission obtained from Podyjí National Park in headquarter Znojmo (SZ NPP 0108/2010/8, NPP 0967/2010).

Bird capturing and experiments were carried out under the permissions 29532/2006-30, CZU150/99 and CZ 00059 issued by Central Commission for Animal Welfare of the Czech Republic (UKOZ), and MHMP-154521/04/OOP-V-25/R-40/09/Pra issued by Prague City Hall. Catching and ringing birds were performed under the licenses from Czech Ringing Centre in Prague (Nos 876, 1110).

12. Results

12.1. Leopard gecko

For all behavioural characteristics and in all parts of the experimental sequence (pre-chemical trials, chemical trials and post-chemical trials), the reactions of leopard geckos from the hexane (HX) and pyrazine (PYR) groups did not significantly differ from untreated mealworm (UM) control group. Therefore, the effect of neophobia could be excluded.

For all behavioural characteristics, the reactions of leopard geckos for all tested groups (3A-TA-OXO-GS-LG/3A) in the first control (pre-chemical) trial did not significantly differ compared to the hexane group. Therefore, all geckos started the experiment with the same motivation.

Approach latencies

Approach latencies were affected by tested chemicals ($p < 0.001$; $F = 13.539$; $df1 = 7$; $df2 = 734$), sex of the leopard geckos ($p < 0.01$; $F = 7.371$; $df1 = 1$; $df2 = 734$) and their weight ($p < 0.001$; $F = 37.064$; $df1 = 1$; $df2 = 734$). Heavier animals usually hesitated longer than lighter animals before approaching the mealworms. Females mostly hesitated longer than males before approaching the mealworms. There was also a significant interaction between the effect of chemicals and part of the experimental sequence ($p < 0.05$; $F = 1.971$; $df1 = 14$; $df2 = 734$).

In chemical trials, leopard geckos tested with GS hesitated significantly longer before approaching the chemical-treated mealworms compared to the geckos from the HX group (Tukey Contrasts: $p < 0.001$). However, approach latencies of leopard geckos tested with the rest of the chemicals did not significantly differ from geckos' reactions in the HX group. When the effects of tested chemicals on the approach latencies in chemical trials were compared, following sequence was obtained: GS, 3A, LG/3A, TA, OXO, HX and UM. The approach latencies in the UM group were thus the shortest (Tab. 1).

In post-chemical trials, the approach latencies could be again ordered based on the effect of the tested chemicals. The approach latencies were the longest in the group previously treated with 3A. The effect of other chemicals on approach latencies was following: TA, GS, OXO, UM, LG/3A and HX. The approach latencies in the HX group were the shortest (Tab. 1).

Attack latencies

Attack latencies were affected by the tested chemicals ($p < 0.001$; $F = 14.384$; $df1 = 7$; $df2 = 734$) and the weight of leopard geckos ($p < 0.001$; $F = 18.041$; $df1 = 1$; $df2 = 734$), but not by their sex ($p = 0.903$; $F = 0.015$; $df1 = 1$; $df2 = 734$). Heavier animals usually hesitated longer than lighter animals before attacking the mealworms. There was also a significant interaction between the effect of chemicals and part of the experimental sequence ($p < 0.001$; $F = 3.381$; $df1 = 14$; $df2 = 734$).

In chemical trials, leopard geckos tested with GS and LG/3A hesitated significantly longer before attacking the chemical-treated mealworms compared to the geckos from the HX group (Tukey Contrasts: both $p < 0.001$). Attack latencies were also significantly longer in the group treated with TA ($p < 0.01$) and 3A ($p < 0.05$). Attack latencies of leopard geckos tested with OXO did not significantly differ from geckos' reactions in the HX group ($p = 1.000$) (Fig.1). The attack latencies in chemical trials were the longest in the group treated with GS. The effect of other chemicals on attack latencies was following: LG/3A, TA, 3A, OXO, HX and UM. The attack latencies in the UM group were the shortest (Tab. 1).

Approach-attack intervals

Approach-attack intervals were affected by the tested chemicals ($p < 0.001$; $F = 12.768$; $df1 = 7$; $df2 = 734$) and the weight of leopard geckos ($p < 0.001$; $F = 10.925$; $df1 = 1$; $df2 = 734$), but not by their sex ($p = 0.348$; $F = 0.883$; $df1 = 1$; $df2 = 734$). Heavier animals were slower when evaluating approach-attack intervals. There was also a significant interaction between

the effect of chemicals and part of the experimental sequence ($p < 0.001$; $F = 3.563$; $df1 = 14$; $df2 = 734$).

The approach-attack intervals in chemical trials were the longest in the group treated with LG/3A. The effect of other chemicals on approach-attack intervals was following: GS, TA, 3A, OXO, HX and UM. The approach-attack intervals in the UM group were the shortest (Tab. 1).

Manipulation with *Graphosoma lineatum*

During the testing of gecko's reactions to the living specimen of *G. lineatum* following characteristics in the bug handling were observed. Out of 10 tested animals, 6 geckos manipulated the bug twice (out of a maximum of 5 offered bugs), 2 geckos only once and remaining 2 geckos did not manipulate any of three offered bugs. It means that leopard geckos manipulated the bug maximally twice. As a result of the manipulation, only two bug specimens were killed, the remaining bugs were released unharmed. The results indicated that 5 offered bugs was sufficient number to gain the experience to avoid the bugs.

Summary

- (1) Hexane did not have aversive effect on leopard geckos. Therefore, hexane could be used as a non-polar solvent for the other chemical compounds.
- (2) Pyrazine did not have aversive effect on leopard geckos as well as hexane. Therefore, the effect of neophobia could be excluded.
- (3) The mixture of three aldehydes had an aversive effect and it could also play a role as a signal of unpalatability.
- (4) The mixture of three aldehydes and tridecane had even more pronounced aversive effect than the mixture of three aldehydes. Tridecane probably increases the impact of the mixture of aldehydes to leopard geckos.
- (5) Oxoladehyde alone did not have any aversive effect for leopard geckos.
- (6) Whole MTG secretion had a strong aversive effect for leopard geckos.
- (7) Presence of living specimen of *G. lineatum* increased the effect of the mixture of three aldehydes as a signal of unpalatability.

12.2. Green lizard

For all behavioural characteristics in the chemical trials, the reactions of green lizards from the hexane (HX) group significantly differed from untreated mealworm (UM) control group. Therefore, the reactions of green lizards in the other groups (3A-TA-OXO-GS-LG/3A-LP/3A) were compared with those of the untreated mealworm control group.

For all behavioural characteristics, the reactions of green lizards for all tested groups (HX-3A-TA-OXO-GS-LG/3A-LP/3A) in the first control (pre-chemical) trial did not significantly differ compared to the untreated mealworm control group (Tukey Contrasts). Therefore, all lizards started the experiment with the same motivation.

Approach latencies

Approach latencies were influenced only by the tested chemicals ($p < 0.001$; $F = 13.438$; $df1 = 7$; $df2 = 812$), but not by the weight of the animals ($p = 0.453$; $F = 0.565$; $df1 = 1$; $df2 = 812$), their sex ($p = 0.095$; $F = 2.359$; $df1 = 2$; $df2 = 812$) nor their age ($p = 0.555$; $F =$

0.348; $df_1 = 1$; $df_2 = 812$). An interaction between the effect of chemicals and part of the experimental sequence was also not significant ($p = 0.067$; $F = 1.626$; $df_1 = 14$; $df_2 = 812$).

The aversive effect of the tested chemicals on the approach latencies of the green lizards was evaluated similarly to leopard geckos – based on a coefficient of the rank-based regression model – the higher its value the slower reaction of the animal and thus stronger aversion towards the particular chemical. Following sequence was obtained: GS, LG/3A, LP/3A, 3A, TA, OXO, HX and UM. The approach latencies in the UM group were thus the shortest (Tab. 2).

Attack latencies

Attack latencies were influenced only by the tested chemicals ($p < 0.001$; $F = 14.806$; $df_1 = 7$; $df_2 = 812$), but not by the weight of the animals ($p = 0.373$; $F = 0.793$; $df_1 = 1$; $df_2 = 812$), their sex ($p = 0.162$; $F = 1.825$; $df_1 = 2$; $df_2 = 812$) nor their age ($p = 0.541$; $F = 0.374$; $df_1 = 1$; $df_2 = 812$). There was a significant interaction between the effect of chemicals and part of the experimental sequence ($p < 0.05$; $F = 2.047$; $df_1 = 14$; $df_2 = 812$).

In chemical trials, all tested chemicals had significant effect on the attack latencies of green lizards compared to the UM group (Tukey Contrasts: all $p < 0.001$) (Fig.2). The attack latencies were the longest in the group treated with LG/3A. The effect of the other chemicals on attack latencies was following: GS, LP/3A, 3A, TA, OXO, HX and UM. The attack latencies in the UM group were thus the shortest (Tab. 2).

In trials following the experience with the chemicals (post-chemical trials), green lizards that had previous experience with GS and LP/3A hesitated significantly longer than lizards from the UM group before attacking the mealworms, even when they were no longer treated with the chemicals (Tukey Contrasts: $p < 0.05$; $p < 0.01$ respectively). Attack latencies of the groups previously treated with the other chemicals did not significantly differ from the UM group (Tukey Contrasts).

Approach-attack intervals

Approach-attack intervals were influenced by the tested chemicals ($p < 0.001$; $F = 14.138$; $df_1 = 7$; $df_2 = 812$) and the weight of green lizards ($p < 0.01$; $F = 7.360$; $df_1 = 1$; $df_2 = 812$), but not by their sex ($p = 0.200$; $F = 1.614$; $df_1 = 2$; $df_2 = 812$) nor their age ($p = 0.435$; $F = 0.609$; $df_1 = 1$; $df_2 = 812$). Heavier animals were faster when assessing approach-attack intervals. Additionally, there was a significant interaction between the effect of chemicals and part of the experimental sequence ($p < 0.001$; $F = 2.693$; $df_1 = 14$; $df_2 = 812$).

The approach-attack intervals were the longest in the group treated with LG/3A. The effect of other chemicals on approach-attack intervals was following (Tab. 2): GS, LP/3A, TA, 3A, OXO, HX and UM. The approach-attack intervals in the UM group were thus the shortest.

Manipulation with *Graphosoma lineatum*

During the testing of lizard's reactions to the living specimen of *G. lineatum* following characteristics in the bug handling were observed. Out of 8 tested animals, 3 lizards manipulated the bug twice (out of a maximum of 5 offered bugs), 3 lizards only once and remaining 2 lizards did not manipulate any of three offered bugs. It means that green lizards manipulated the bug maximally twice. All bugs were released unharmed, no one was killed.

Manipulation with Pyrrhocoris apterus

Lizard's reactions to the living specimen of *P. apterus* were different from the observation made with *G. lineatum*. Following characteristics in the bug handling were observed. Out of 7 tested animals, only 1 manipulated and killed the firebug. Remaining 6 animals did not manipulate any of three offered firebugs. All bugs were thus untouched, except for one.

Summary

- (1) Hexane had the weakest aversive effect on green lizards. Lizards hesitated with mealworms treated with hexane in chemical trials. In the following trials (post-chemical trials) they were already habituated to hexane.
- (2) The aversive effect of the mixture of aldehydes was moderately stronger than the same mixture enhanced by tridecane, which is in contradiction with hypothesis of tridecane acting as a catalyst.
- (3) The mixture of aldehydes enhanced by tridecane had a stronger aversive effect than oxoaldehyde.
- (4) Oxoaldehyde had the weakest aversive effect on green lizards from the tested chemicals, which may be attributed to its odourless nature.
- (5) Whole MTG secretion had a strong aversive effect for green lizards.
- (6) The presence of living *G. lineatum*/*P. apterus* increased the effect of the mixture of three aldehydes. The strongest effect was observed in the presence of living specimen *G. lineatum*, rather than *P. apterus*.

12.3. Great tit

For all behavioural characteristics and in all parts of the experimental sequence (pre-chemical trials, chemical trials and post-chemical trials), the reactions of great tits from the hexane (HX) group did not significantly differ from untreated mealworm (UM) control group.

For all behavioural characteristics, the reactions of great tits for all tested groups (3A-TA-OXO-GS) in the first control (pre-chemical) trial did not significantly differ compared to the hexane group. Therefore, all great tits started the experiment with the same motivation.

Attack latencies

Attack latencies were influenced by the tested chemicals ($p < 0.001$; $F = 41.777$; $df1 = 5$; $df2 = 1940$) and sex of the great tits ($p < 0.001$; $F = 14.630$; $df1 = 1$; $df2 = 1940$), but not by their age ($p = 0.857$; $F = 0.032$; $df1 = 1$; $df2 = 1940$). Females were faster than males. There was also a significant interaction between the effect of chemicals and part of the experimental sequence ($p < 0.001$; $F = 3.129$; $df1 = 10$; $df2 = 1940$).

In chemical trials, the attack latencies were significantly longer in the group treated with GS and OXO (Tukey Contrasts: both $p < 0.001$) compared to the birds from the HX group. 3A had also significant effect on attack latencies (Tukey Contrasts: $p < 0.05$), but its strength was weaker compared to previous chemicals. Attack latencies of birds tested with TA did not significantly differ from birds' reactions in the HX group (Tukey Contrasts: $p = 0.884$) (Fig. 3).

The great tits hesitated most before attacking the prey treated with OXO (Tab. 3). The effect of the other chemicals on attack latencies was following: GS, 3A, UM, TA and HX. The attack latencies in the HX group were thus the shortest.

In trials following the experience with the chemicals (post-chemical trials), great tits that had previous experience with GS, OXO and with 3A hesitated significantly longer before attacking the prey, even when the mealworms were no longer treated with the chemical (Tukey Contrasts: all $p < 0.001$).

Attack-eating intervals

Attack-eating intervals were affected by the tested chemicals ($p < 0.001$; $F = 82.401$; $df1 = 5$; $df2 = 1940$) and the age of great tits ($p < 0.001$; $F = 11.061$; $df1 = 1$; $df2 = 1940$), but not by their sex ($p = 0.827$; $F = 0.048$; $df1 = 1$; $df2 = 1940$). Younger birds were slower than older birds. There was also a significant interaction between the effect of chemicals and part of the experimental sequence ($p < 0.001$; $F = 3.138$; $df1 = 10$; $df2 = 1940$).

When assessing attack-eating intervals, the great tits hesitated most to the prey treated with OXO in chemical trials (Tab. 3). The effect of the other chemicals on attack-eating intervals was following: GS, 3A, TA, UM and HX. The attack-eating intervals in the HX group were thus the shortest.

In trials following the experience with the chemicals (post-chemical trials), when assessing attack-eating intervals, the great tits that had previous experience with GS, OXO and 3A hesitated significantly longer than birds from the HX group, even when the mealworms were no longer treated with the chemicals (Tukey Contrasts: all $p < 0.001$).

Summary

- (1) Great tits did not show any aversive reaction to hexane.
- (2) The mixture of three aldehydes had aversive effect on great tits when they attacked the prey and when evaluating attack-eating intervals. Therefore, it could play a role as a signal of unpalatability.
- (3) The mixture of three aldehydes and tridecane did not have any aversive effect on great tits when they attacked the prey. Weak aversive effect was observed when evaluating attack-eating intervals in the chemical trials. Tridecane probably decreases the impact of the mixture of three aldehydes on great tits.
- (4) Oxoaldehyde had a strong aversive effect for great tits.
- (5) Whole MTG secretion had clearly an aversive effect for great tits.

12.4. Blue tit

For all behavioural characteristics, the reactions of blue tits for all tested groups (HX-3A-OXO-GS) in the first control (pre-chemical) trial did not significantly differ compared to the untreated mealworm control group (Tukey Contrasts). Therefore, all birds started the experiment with the same motivation.

Attack latencies

Attack latencies were affected by the chemicals ($p < 0.001$; $F = 25.128$; $df1 = 4$; $df2 = 529$), but not by the sex of the birds ($p = 0.390$; $F = 0.739$; $df1 = 1$; $df2 = 529$) nor their age (p

= 0.536; $F = 0.384$; $df_1 = 1$; $df_2 = 529$). An interaction between the effect of chemicals and part of the experimental sequence was also not significant ($p = 0.113$; $F = 1.630$; $df_1 = 8$; $df_2 = 529$).

In chemical trials, the attack latencies were significantly longer only in the group treated with GS (Tukey Contrasts: $p < 0.001$) compared to the birds in the UM group. The attack latencies of birds tested with 3A, OXO and HX did not significantly differ from birds' reactions in the UM group (Tukey Contrasts: $p = 0.122$; $p = 0.873$; $p = 0.994$ respectively) (Fig. 4).

The blue tits hesitated most before attacking the prey treated with GS. The effect of the other chemicals on attack latencies was following (Tab. 4): 3A, OXO, HX and UM. The attack latencies in the UM group were thus the shortest.

Attack-eating intervals

Attack-eating intervals were influenced only by the tested chemicals ($p < 0.001$; $F = 16.697$; $df_1 = 4$; $df_2 = 529$), not but the sex of blue tits ($p = 0.095$; $F = 2.802$; $df_1 = 1$; $df_2 = 529$) nor their age ($p = 0.249$; $F = 1.330$; $df_1 = 1$; $df_2 = 529$). An interaction between the effect of chemicals and part of the experimental sequence was not significant ($p = 0.359$; $F = 1.103$; $df_1 = 8$; $df_2 = 529$).

When evaluating attack-eating intervals, the blue tits hesitated most before attacking the prey treated with GS. The effect of the other chemicals on attack-eating intervals was following: HX, OXO, 3A and UM. The attack-eating intervals in the UM group were thus the shortest (Tab. 4).

Summary

- (1) For blue tits hexane had an aversive after-effect when attacking the prey. On the other hand, when evaluating attack-eating intervals blue tits were able to overcome the toxin burden of hexane in the post-chemical trials.
- (2) The mixture of three aldehydes had clearly an aversive effect on blue tits in the post-chemical trials when evaluating attack latencies.
- (3) For blue tits oxoaldehyde had delayed effect when attacking the prey (post-chemical trials), whereas it had aversive effect in the chemical trials when evaluating attack-eating intervals. Therefore, oxoaldehyde could function as a direct toxin.
- (4) Whole MTG secretion had clearly an aversive effect for blue tits.
- (5) Blue tits hesitated most to the whole MTG secretion of *G. lineatum*.

13. Discussion and Conclusions

The obtained results agree with the hypothesis, that repellency is dependent mostly on the aldehydes (Eisner 1970; Hamilton et al. 1985; Gunawardena and Herath 1991). Geckos and lizards as well as birds faced the predator's dilemma – to starve or to eat a potentially toxic prey (Glendinning 2007). The rejection of chemically defended prey in geckos is probably based on olfaction/vomerolfaction (Halpern 1987; Schwenk 1993). Therefore, the major role may play olfactory aposematism (Eisner and Grant 1981; Weldon 2013). Geckos are highly sensitive to airborne volatiles, more than the other lizard species (Schwenk 1993). Whereas olfaction is involved particularly in the detection of food and potential predators and responds primarily to volatiles, the vomeronasal system is focused on novel stimuli and reproductive behaviour and it is sensitive also to nonvolatiles (Schwenk 1993).

For green lizards rejection of chemically defended prey is probably based on (1) gustation (Schwenk 1985; Bonacci et al. 2008) and (2) olfaction/vomerolfaction (Cooper 1991, 1996). The previous experiments showed that prey chemical discrimination is mediated by vomerolfaction rather than olfaction in lizards (see Cooper 1997). Since MTG secretion is highly odorous and volatile (e.g. aldehydes) (Durak and Kalender 2009; Šanda et al. 2012), it seems that geckos as well as lizards can avoid chemically defended prey based on odorous signal alone.

The rejection of chemically defended prey in birds is probably based on (1) taste (Schlee 1986; Skelhorn and Rowe 2006a,b,c,d), but role may play also (2) olfactory aposematism (Eisner and Grant 1981; Weldon 2013) and (3) chemesthesis (Conner et al. 2007).

Birds have very different behavioural strategies when dealing with prey that have internal/external chemical defences (Skelhorn and Rowe 2006a). These “handling techniques” avoid or minimize contact with the secretion (Schlee 1986). In our experiments birds clearly used such handling techniques. They ate only inner parts, tore mealworms into pieces and wiped their beaks on perches during/after eating the mealworms. Birds can selectively reject visually identical prey based on their chemical investment (Skelhorn and Rowe 2006d). It was also observed aversive behaviour from distance such as blinking in the presence of the mealworm treated with the mixture of three aldehydes (not in the presence of oxoaldehyde, hexane and pyrazine) and with the whole MTG secretion (the same behaviour was observed also in case of lizards). Therefore, it seems that some applied chemicals (such as the mixture of three aldehydes) and the whole MTG secretion have strong odorous function as a signal from distance as well as the potential to elicit pain when inhaled (eye, respiratory system). This could be reliable signal related to the level of defence and it also indicates that chemical secretion could work as a signal and a secondary defence component (Gohli and Högstedt 2009).

The comparative study of aversive effects of individual chemical compounds of repellent secretion of *Graphosoma lineatum* toward four different predator species revealed a broad measure of similarities among them particularly in response to a complete MTG secretion. It also confirmed the essential role of aldehydes in the repellent effect, yet in the response toward particular aldehydes the tested taxa significantly differ. It suggests that the chemical complexity of the repellent secretion might result from subsequent selection by predators of different groups. The outputs of particular experiments can be summarized as follows:

1. Hexane (used as a non-polar solvent for the other chemicals)

Hexane did not have any aversive effect on leopard geckos and great tits. In case of green lizards hexane had slightly aversive effect in the chemical trials, whereas in the post-chemical trials (when hexane was still present on the mealworms) green lizards were already habituated to it. The same behaviour was observed in case of blue tits when evaluating attack-eating intervals. On the other hand, hexane had an aversive after-effect on blue tits when birds attacked the prey in the post-chemical trials.

2. Pyrazine (positive control in the experiments with leopard geckos)

Pyrazine was used as a positive control in the experiments with leopard geckos in order to exclude the effect of neophobia towards new malodours. The results showed that pyrazine did not have any aversive effect on leopard geckos in any scored behaviour. Therefore, neophobia could be excluded for leopard geckos.

3. The mixture of three aldehydes

The mixture of three aldehydes had an aversive effect for all chosen predator species although the predators reacted differently. In case of lizard predators, this mixture caused aversive reaction when present on the mealworms (chemical trials). On the other hand, great tits were able to generalize the prey previously treated with the mixture of three aldehydes. In case of blue tits, this mixture caused an aversive after-effect (attack latencies). It seems that the mixture of three aldehydes could play a role as a signal of unpalatability and it could elicit generalization.

4. The mixture of three aldehydes and tridecane

The mixture of three aldehydes and tridecane had a strong aversive effect for leopard geckos. In this case tridecane probably increases the impact of the mixture of aldehydes to leopard geckos. In case of green lizards, tridecane decreased the potency of the mixture of three aldehydes, but still there was a stronger effect of this mixture and tridecane compared to oxoaldehyde. Similar effect was observed also for great tits where the mixture of three aldehydes and tridecane had only a weak effect in one of the two scored behaviours (attack-eating intervals).

5. Oxoaldehyde

Oxoaldehyde did not have any aversive effect for leopard geckos, whereas in case of green lizards there was observed a weak aversive effect. As for the bird predators, oxoaldehyde had a strong aversive effect for great tits, whereas for blue tits this effect was delayed. Oxoaldehyde could function as a direct toxin for great tits. For blue tits it had a strong after-effect. The reason why the predators reacted so differently towards oxoaldehyde could be explained by different levels of the gustation among the predators.

6. *Graphosoma* secretion

For all four chosen predators MTG secretion of *G. lineatum* had clearly an aversive effect and may function as a signal as well as a secondary chemical defence.

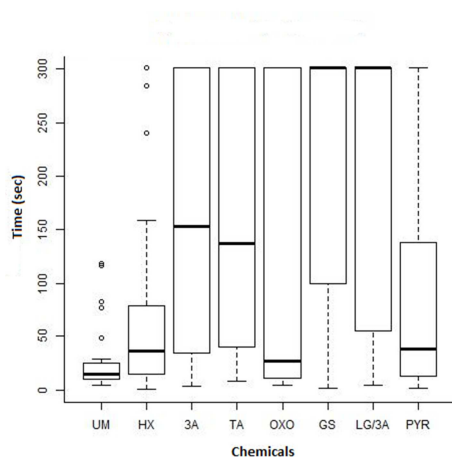
7. Presence of living specimen of *G. lineatum* before chemical sequence test

The presence of living specimen of *G. lineatum* increased the effect of the mixture of three aldehydes as a signal of unpalatability in leopard geckos as well as in green lizards.

8. Presence of living specimen of *P. apterus* before chemical sequence test

The presence of living specimen of *P. apterus* also increased the effect of the mixture of three aldehydes and also elicited generalization in green lizards. However, the strongest effect was observed in the presence of *G. lineatum*, rather than *P. apterus*.

14. Příloha / Supplement



Obr. 1: Latence manipulace s kořistí v pokusech s testovanými chemikáliemi (originální hodnoty) u gekončků nočních

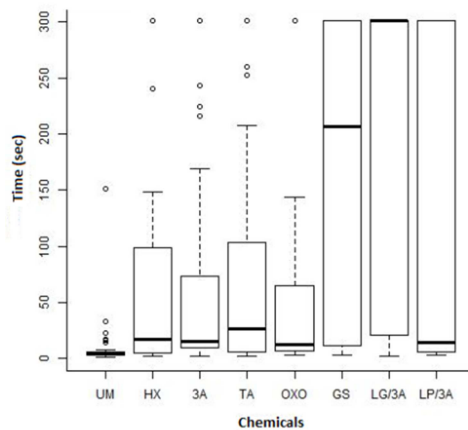
Latence manipulace s kořistí jsou znázorněny na ose y. Graf odráží originální hodnoty (čas, kdy gekončík začal manipulovat s kořistí).

(vnitřní linie = medián; box = dolní a horní kvartil; vousy = neodlehá pozorování; kroužky = odlehlé hodnoty)

Fig. 1: Attack latencies in trials with tested chemicals – chemical trials (original values) in leopard geckos

Attack latencies are presented on y-axis. The figures reflect the original recorded values (the time when the gecko started to handle the prey).

(band inside the box = median; box = lower and upper quartile; whiskers = nonoutlier range; circles = outlier data)



Obr. 2: Latence manipulace s kořistí v pokusech s testovanými chemikáliemi (originální hodnoty) u ještěrek zelených

Latence manipulace s kořistí jsou znázorněny na ose y. Graf odráží originální hodnoty (čas, kdy ještěrka začala manipulovat s kořistí).

(vnitřní linie = medián; box = dolní a horní kvartil; vousy = neodlehá pozorování; kroužky = odlehlé hodnoty)

Fig. 2: Attack latencies in trials with tested chemicals – chemical trials (original values) in green lizards

Attack latencies are presented on y-axis. The figures reflect the original recorded values (the time when the lizard started to handle the prey).

(band inside the box = median; box = lower and upper quartile; whiskers = nonoutlier range; circles = outlier data)

Chemicals	UM	HX	PYR	3A	TA	OXO	GS	LG/3A
Estimate (regression coefficient)								
A – Approach latencies								
Chemical trials	-263.7	-215.8	-212.4	-93.9	-123.6	-187.7	14.7	-120.9
Post-chemical trials	-260.0	-310.4	-309.2	-116.5	-133.1	-209.5	-138.8	-308.2
B – Attack latencies								
Chemical trials	-301.9	-216.8	-165.8	-63.4	-45.1	-170.8	22.5	2.9
C – Approach-attack intervals								
Chemical trials	-219.0	-131.8	-77.0	40.3	40.4	-72.2	73.7	107.2

Tab. 1: Aversivní vliv testovaných chemikálií na jednotlivé behaviorální charakteristiky u gekončků nočních

Regresní koeficient odhadu (Estimate): regresní model založený na pořadí (čím nižší číslo tím rychlejší reakce na danou chemikálii).

Tab. 1: The aversive effect of the tested chemical compounds on the individual behavioural characteristics of leopard geckos

Estimate: effect on behavioural characteristics estimated by a rank-based regression model (the lower the number the faster the reaction to the chemical).

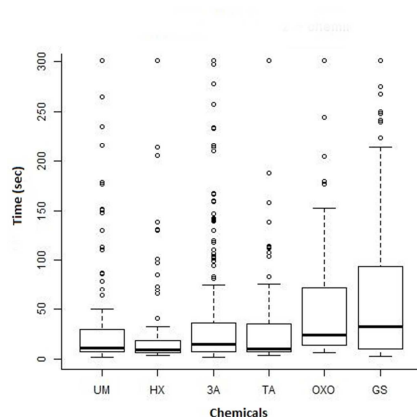
Chemicals	UM	HX	3A	TA	OXO	GS	LG/3A	LP/3A
Estimate (regression coefficient)								
A – Approach latencies								
Chemical trials	-256.2	-59.1	3.2	-22.2	-25.9	127.1	92.6	5.4
B – Attack latencies								
Chemical trials	-248.4	-45.1	11.2	-0.9	-12.8	157.9	162.0	33.2
C – Approach-attack intervals								
Chemical trials	-245.1	-22.1	17.8	31.1	-16.2	171.3	174.1	45.2

Tab. 2: Aversivní vliv testovaných chemikálií na jednotlivé behaviorální charakteristiky u ještěrek zelených

Regresní koeficient odhadu (Estimate): regresní model založený na pořadí (čím nižší číslo tím rychlejší reakce na danou chemikálii).

Tab. 2: The aversive effect of the tested chemical compounds on the individual behavioural characteristics of green lizards

Estimate: effect on behavioural characteristics estimated by a rank-based regression model (the lower the number the faster the reaction to the chemical).



Obr. 3: Latence manipulace s kořistí v pokusech s testovanými chemikáliemi (originální hodnoty) u sýkor koňader

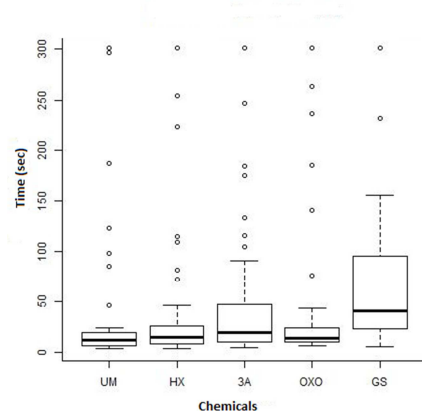
Latence manipulace s kořistí jsou znázorněny na ose y. Graf odráží originální hodnoty (čas, kdy sýkora koňadra začala manipulovat s kořistí).

(vnitřní linie = medián; box = dolní a horní kvartil; vousy = neodlehá pozorování; kroužky = odlehlé hodnoty)

Fig. 3: Attack latencies in trials with tested chemicals – chemical trials (original values) in great tits

Attack latencies are presented on y-axis. The figures reflect the original recorded values (the time when the bird started to handle the prey (touching, pecking or seizing)).

(band inside the box = median; box = lower and upper quartile; whiskers = nonoutlier range; circles = outlier data)



Obr. 4: Latence manipulace s kořistí v pokusech s testovanými chemikáliemi (originální hodnoty) u sýkor modřinek

Latence manipulace s kořistí jsou znázorněny na ose y. Graf odráží originální hodnoty (čas, kdy sýkora modřinka začala manipulovat s kořistí).

(vnitřní linie = medián; box = dolní a horní kvartil; vousy = neodlehá pozorování; kroužky = odlehlé hodnoty)

Fig. 4: Attack latencies in trials with tested chemicals – chemical trials (original values) in blue tits

Attack latencies are presented on y-axis. The figures reflect the original recorded values (the time when the bird started to handle the prey (touching, pecking or seizing)).

(band inside the box = median; box = lower and upper quartile; whiskers = nonoutlier range; circles = outlier data)

Chemicals	UM	HX	3A	TA	OXO	GS
Estimate (regression coefficient)						
A – Attack latencies						
Chemical trials	92.2	-39.4	177.4	90.0	407.2	387.2
Post-chemical trials	149.3	-49.1	392.8	102.3	665.6	531.3
B – Attack-eating intervals						
Chemical trials	31.2	-81.9	279.7	174.4	649.2	628.3
Post-chemical trials	181.1	-9.5	336.5	113.9	611.0	644.0

Tab. 3: Aversivní vliv testovaných chemikálií na jednotlivé behaviorální charakteristiky u sýkor koňader

Regresní koeficient odhadu (Estimate): regresní model založený na pořadí (čím nižší číslo tím rychlejší reakce na danou chemikálii).

Tab. 3: The aversive effect of the tested chemical compounds on the individual behavioural characteristics of great tits

Estimate: effect on behavioural characteristics estimated by a rank-based regression model (the lower the number the faster the reaction to the chemical).

Chemicals	UM	HX	3A	OXO	GS
Estimate (regression coefficient)					
A – Attack latencies					
Chemical trials	-72.2	-33.2	14.8	-19.2	104.8
Post-chemical trials	-122.1	8.5	13.6	-2.3	123.4
B – Attack-eating intervals					
Chemical trials	7.3	144.7	28.0	125.6	146.5

Tab. 4: Aversivní vliv testovaných chemikálií na jednotlivé behaviorální charakteristiky u sýkor modřinek

Regresní koeficient odhadu (Estimate): regresní model založený na pořadí (čím nižší číslo tím rychlejší reakce na danou chemikálii).

Tab. 1: The aversive effect of the tested chemical compounds on the individual behavioural characteristics of blue tits

Estimate: effect on behavioural characteristics estimated by a rank-based regression model (the lower the number the faster the reaction to the chemical).

15. Použitá literatura / References

Aldrich JR (1988) Chemical ecology of the Heteroptera. *Ann Rev Entomol* 33: 211-238

Aldrich JR, Avery JW, Lee CJ, Graf JC, Harrison DJ, Bin F (1996) Semiochemistry of Cabbage Bugs (Heteroptera: Pentatomidae: *Euryderma* and *Murgantia*). *J Entomol Sci* 31(2): 172-182

Aldrich JR, Leal WS, Nishida R, Khrimian AP, Lee CJ, Sakuratani Y (1997) Semiochemistry of aposematic seed bugs. *Entomol Exp Appl* 84:127-135

Aliabadi A, Renwick JAA, Whitman DW (2002) Sequestration of glucosinolates by harlequin bug *Murgantia histrionica*. *J Chem Ecol* 28(9): 1749-1761

Angelici FM, Luiselli L, Rugiero L (1997) Food habits of the green lizard, *Lacerta bilineata*, in central Italy and a reliability test of faecal pellet analysis. *Ital J Zool* 64: 267-272

Benfield EF (1972) A Defensive Secretion of *Dineutes discolor* (Coleoptera: Gyrinidae). *Ann Entomol Soc Am* 65(6): 1324-1327.

Bonacci T, Aloise G, Brandmayr P, Brandmayr TZ, Capula M (2008) Testing the predatory behaviour of *Podarcis sicula* (Reptilia: Lacertidae) towards aposematic and non-aposematic preys. *Amphibia-Reptilia* 29: 449-453

Conner WE, Alley KM, Barry JR, Harper AE (2007) Has vertebrate chemesthesis been a selective agent in the evolution of arthropod chemical defenses? *Biol Bull* 213: 267-273

Cooper WE, Jr. (1991) Responses to prey chemicals by a lacertid lizard, *Podarcis muralis*: prey chemical discrimination and poststrike elevation in tongue-flick rate. *J Chem Ecol* 17(5): 849-863

Cooper Jr, W. E. (1995). Foraging mode, prey chemical discrimination, and phylogeny in lizards. *Anim Behav* 50(4): 973-985

Cooper WE, Jr. (1996) Preliminary reconstructions of nasal chemosensory evolution in Squamata. *Amphibia-Reptilia* 17(4): 395-415

Cooper WE (1997) Correlated evolution of prey chemical discrimination with foraging, lingual morphology and vomeronasal chemoreceptor abundance in lizards. *Behav Ecol Sociobiol* 41: 257-265

del Hoyo J, Elliott EA, Sargatal J, Christie DA (eds) (2007) Handbook of the Birds of the World. 12 Picathartes to Tits and Chickadees. Lynx Edicions, Barcelona

Durak D, Kalender Y (2009) Fine structure and chemical analysis of the metathoracic scent gland secretion in *Graphosoma lineatum* (Linnaeus, 1758) (Heteroptera, Pentatomidae). C R Biol doi: 10.1016/j.crvi.2008.10.004

Eisner T (1970) Chemical defense against predation in arthropods. In: Sondheimer E, Simeone SB (eds). Chemical Ecology. New York: Academic Press

Eisner T, Grant RP (1981) Toxicity, odor aversion and "olfactory aposematism". Science 213: 476

Exnerová A, Štys P, Krištín A, Volf O, Pudil M (2003a) Birds as predators of true bugs (Heteroptera) in different habitats. Biologia 58: 253-264

Exnerová A, Landová E, Štys P, Fuchs R, Prokopová M, Cehláriková P (2003b) Reactions of passerine birds to aposematic and non-aposematic firebugs (*Pyrrhocoris apterus*; Heteroptera). Biol J Linnean Soc 78: 517-525

Exnerová A, Štys P, Barcalová S, Landová E, Prokopová M, Fuchs R, Socha R (2006) Importance of colour in the reaction of Passerine predators to aposematic prey: Experiments with mutants of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera). 88: 143-153

Farine JP, Bonnard O, Brossut R, Le Quere JL (1992) Chemistry of defensive secretions in nymphs and adults of fire bug, *Pyrrhocoris apterus* L. (Heteroptera, Pyrrhocoridae). J Chem Ecol 18(10): 1673-1682

Fávaro CF, Rodrigues MACM, Aldrich JR, Zarbin PHG (2011) Identification of semiochemicals in adults and nymphs of the stink bug *Pallantia macunaima* Grazia (Hemiptera: Pentatomidae). J Braz Chem Soc 22(1): 58-64

Gabe M, Saint Girons H (1976) Contribution a la morphologie comparee des fosses nasales et de leur annexes chez les Lépidosauriens. Mém Mus Nat Hist Nat A98:1-87

Glendinning JI (2007) How do predators cope with chemically defended foods? Biol Bull 213(3): 252-266

Gohli J, Högstedt G (2009) Explaining the evolution of warning coloration: secreted secondary defence chemicals may facilitate the evolution of visual aposematic signal. Plos One 4(6): e5779

Gunawardena NE, Herath HMWKB (1991) Significance of medium chain n-alkanes as accompanying compounds in hemipteran defensive secretions: An investigation based on the defensive secretion of *Coridius janus*. J Chem Ecol 17(12): 2449-2458

Hamilton JGC, Gough AJE, Staddon BW, Games DE (1985) Multichemical defense of plant bug *Hotea gambiae* (Westwood) (Heteroptera: Scutelleridae): (E)-2-Hexenol from abdominal gland in adults. J Chem Ecol 11(10): 1399-1409

Halpern M (1987) The organization and function of the vomeronasal system. *Annu Rev Neurosci* 10: 325-362

Härlin C (2005) To have and have not: volatile secretions make a difference in gyrinid beetle predator defence. *Anim Behav* 69(3): 579-585

Hotová Svádová K, Exnerová A, Kopečková M, Štys P (2010) Predator dependent mimetic complexes: Do passerine birds avoid Central European red-and-black Heteroptera? *Europ J Entomol* 107: 349-355

Huey RB, Pianka E (1981) Ecological consequences of foraging mode. *Ecology* 62: 991-999

Jamniczky HA, Russell AP, Johnson MK, Montuelle SJ, Bels VL (2009). Morphology and histology of the tongue and oral chamber of *Eublepharis macularius* (Squamata: Gekkonidae), with special references to the foretongue and its role in fluid uptake and transport. *Evol Biol* doi: 10.1007/s11692-009-9072-9

Krall BS, Bartlet RJ, Lewis CJ, Whitman DW (1999) Chemical defense in the stink bug *Cosmopepla bimaculata*. *J Chem Ecol* 25(11): 2477-2494

Marples NM, Roper TJ (1996) Effects of novel colour and smell on the response of naive chicks towards food and water. *Anim Behav* 51(6): 1417-1424

Mason RJ, Clark L (2000) The chemical senses in birds. In: Whittow GC, ed. *Sturkie's Avian Physiology*, fifth edition. Online access via Elsevier

Pratt CWMcE (1948) The morphology of the ethmoidal region of *Sphenodon* and lizards. *Proc Zool Soc* 118: 171-201

Prudic KL, Noge K, Becerra JX (2008) Adults and nymphs do not smell the same: The different defensive compounds of the giant mesquite bug (*Thasus neocalifornicus*: Coreidae). *J Chem Ecol* 34: 734-741

Rehorek SJ, Firth BT, Hutchinson MN (2000) The structure of the nasal chemosensory system in squamate reptiles. 1. The olfactory organ, with special reference to olfaction in geckos. *J Biosci* 25(2): 173-179

Seufer H, Kaverkin Y, Kirschner A (eds) (2005) *The eyelash geckos: Care, breeding and natural history*. Karlsruhe: Kirschner & Seufer Verlag

Schlee MA (1986) Avian predation on Heteroptera: Experiments on the European Blackbird *Turdus m. merula* L. *Ethol* 73(1): 1-18

Schwenk K (1985) Occurrence, distribution and functional significance of taste buds in lizards. *Copeia*: 91-101

Schwenk K (1993) Are gecko olfactory specialist? *J Zool* 229: 289-302

Skelhorn J, Rowe C (2006a) Predator avoidance learning of prey with secreted or stored defences and the evolution of insect defences. *Anim Behav* 72: 827-834

Skelhorn J, Rowe C (2006b) Prey palatability influences predator learning and memory. *Anim Behav* 71: 1111-1118

Skelhorn J, Rowe C (2006c) Avian predators taste-reject aposematic prey on the basis of their chemical defence. *Biol Lett* 2: 348-350

Skelhorn J, Rowe C (2006d) Taste-rejection by predators and the evolution of unpalatability in prey. *Behav Ecol Sociobiol* 60: 550-555

Skelhorn J, Rowe C (2007). Predator's toxin burdens influence their strategic decisions to eat toxic prey. *Curr Biol* 17: 1479-1483

Stránský K, Valterová I, Ubik K, Čejka J, Křeček J (1998) Volatiles from stink bug, *Graphosoma lineatum* (L.), and from green shield bug, *Palomena prasina* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae). *J High Resolut Chrom* 21(8): 475-476

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. *Anim Behav* 77: 327-336

Šanda M, Žáček P, Streinz L, Dračínský M, Koutek B (2012) Profiling and characterization of volatile secretions from the European stink bug *Graphosoma lineatum* (Heteroptera: Pentatomidae) by two dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr B* 881-882: 69-75

Weldon PJ (2013) Chemical aposematism. *Chemoecology* 23: 201-202

16. Životopis / *Curriculum Vitae*

Mgr. Martina Gregorovičová

martina.greg@email.cz

Narozena / *Born*

1. 5. 1984 v Praze / *May 1, 1984; Prague*

Vzdělání / *Education*

od / since 2008 postgraduální studium, katedra Zoologie, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta

Téma dizertační práce: Význam jednotlivých složek repelentní sekrece *Graphosoma lineatum* vůči různým druhům predátorů. Školitel: doc. Mgr. Alice Exnerová, Ph.D. (2008-2014) / prof. RNDr. Ivan Horáček, CSc (od 2014).

/ Ph.D. study, Department of Zoology, Charles University in Prague, Faculty of Science;

Dissertation: *Role of individual chemical compounds of repellent secretion of Graphosoma lineatum towards different predator species. Supervisor: doc. Mgr. Alice Exnerová, Ph.D. (2008-2014) / prof. RNDr. Ivan Horáček, CSc (since 2014).*

2006 – 2008 magisterské studium, katedra Zoologie, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta

Téma diplomové práce: Vývoj dentice ve skupině Toxicofera (Lepidosauria, Squamata): dentice varana mangrovového (*Varanus indicus*). Školitel: prof. RNDr. Ivan Horáček, CSc.

/ MSc. study, Department of Zoology, Charles University in Prague, Faculty of Science;

Diploma thesis: *Dental development in Toxicofera (Lepidosauria, Squamata): Varanus indicus. Supervisor: prof. RNDr. Ivan Horáček, CSc.*

2003 – 2006 bakalářské studium oboru Biologie, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta

Téma bakalářské práce: Morfologie trusu a defekační dávka velkých herbivorů. Školitel: RNDr. Miloslav Homolka, CSc.

/ Bc. study, Biology, Charles University in Prague, Faculty of Science;

Bachelor's thesis: *Faeces morphology and defecation frequencies in large herbivores. Supervisor: RNDr. Miloslav Homolka, CSc.*

Pedagogická činnost / Teaching

2008 – 2014 **výuka předmětů/ teaching lectures:**

Etologické metody / *Ethological methods*;

Terénní cvičení ze zoologie / *Field course in zoology*;

Praktikum z morfologie živočichů / *Practicals in animal morphology*;

Zoologie obratlovců – praktická část / *Vertebrate zoology – practical part*

2013 – 2014 **školitel** bakalářské práce: Diskriminace a generalizace nejedlé kořisti u ještěřů (Squamata: Sauria) / **supervisor of bachelor's thesis: Discrimination and generalisation of unpalatable prey in lizards (Squamata: Sauria)** (Martin Vohralík)

2013 – 2014 **školitel** bakalářské práce: Potravní preference a foraging mode u ještěřů (Squamata: Sauria) / **supervisor of bachelor's thesis: Food preferences and foraging mode in lizards (Squamata: Sauria)** (Jan Křivánek)

2011 **oponent** bakalářské práce: Hormonální kontrola agresivního chování u ještěřů / **opponent of bachelor's thesis: Hormonal control of aggressive behaviour in lizards** (Petr Rauner)

Granty / Grants

GAČR P505/11/1459 Faktory ovlivňující variabilitu v reakcích predátorů na aposematickou kořist / *Factors responsible for variation in behaviour of predators towards aposematic prey*: 2011-2014 (člen řešitelského týmu / *team member*)

Členství ve vědeckých organizacích / Membership in scientific societies

Česká herpetologická společnost / *Czech Herpetological Society*

Society of Experimental Biology (SEB)

Publikace / Publications

1. Publikace in extenso, které jsou podkladem dizertace / Publications in extenso related to the Dissertation

Gregorovičová, M., Černíková A. (2015a): Reactions of green lizards (*Lacerta viridis*) to major repellent compounds secreted by *Graphosoma lineatum* (Heteroptera: Pentatomidae). *Zoology* 118: 176 – 182 doi: 10.1016/j.zool.2015.02.001 (IF= 1,670)

Gregorovičová, M., Černíková A. (2015b): Reactions of leopard geckos (*Eublepharis macularius*) to defensive secretion of *Graphosoma lineatum* (Heteroptera Pentatomidae): an experimental approach. *Ethology Ecology & Evolution* doi: 10.1080/03949370.2015.1059895 (IF= 1,103)

2. Publikace *in extenso* bez vztahu k tématu dizertace / *Publications in extenso unrelated to the Dissertation*

Gregorovičová, M., Zahradníček, O., Tucker, AS., Velenský, P., Horáček, I. (2012): Embryonic development of the monitor lizard, *Varanus indicus*. *Amphibia – Reptilia* 33: 451 – 468 (IF= 0,680)

Vybrané konferenční příspěvky / *Selected conference presentations*

2013 **Reactions of green lizards (*Lacerta viridis*) to the defensive secretion of *Graphosoma lineatum* (Heteroptera: Pentatomidae)**, 17th European Congress of Herpetology; Veszprém, Hungary – plakátové sdělení / *poster*

2012 **Reactions of leopard geckos (*Eublepharis macularius*) to defensive secretion of *Graphosoma lineatum* (Heteroptera: Pentatomidae)**, Zoologické dny Olomouc – přednáška / *oral presentation*

2011 **Reactions of avian predators to chemical defences of Heteroptera**, Zoologické dny Brno – přednáška / *oral presentation*

Seznam publikací / *Selected publications*

Gregorovičová, M., Černíková A. (2015a): Reactions of green lizards (*Lacerta viridis*) to major repellent compounds secreted by *Graphosoma lineatum* (Heteroptera: Pentatomidae).

Zoology 118: 176 – 182

The chemical defence of Heteroptera is primarily based on repellent secretions which signal the potential toxicity of the bug to its predators. We tested the aversive reactions of green lizards (*Lacerta viridis*) towards the major compounds of the defensive secretion of *Graphosoma lineatum*, specifically: (i) a mixture of three aldehydes: (E)-hex-2-enal, (E)-oct-2-enal, (E)-dec-2-enal; (ii) a mixture of these three aldehydes and tridecane; (iii) oxoaldehyde: (E)-4-oxohex-2-enal; (iv) secretion extracted from metathoracic scent glands of *G. lineatum* adults and (v) hexane as a non-polar solvent. All chemicals were presented on a palatable food (*Tenebrio molitor* larvae). The aversive reactions of the green lizards towards the mealworms were evaluated by observing the approach latencies, attack latencies and approach–attack intervals. The green lizards exhibited a strong aversive reaction to the mixture of three aldehydes. Tridecane reduced the aversive reaction to the aldehyde mixture. Oxoaldehyde caused the weakest, but still significant, aversive reaction. The secretion from whole metathoracic scent glands also clearly had an aversive effect on the green lizards. Moreover, when a living specimen of *G. lineatum* or *Pyrrhocoris apterus* (another aposematic red-and-black prey) was presented to the green lizards before the trials with the aldehyde mixture, the aversive effect of the mixture was enhanced. In conclusion, the mixture of three aldehydes had the strong aversive effect and could signal the potential toxicity of *G. lineatum* to the green lizards.

Gregorovičová, M., Černíková A. (2015b): Reactions of leopard geckos (*Eublepharis macularius*) to defensive secretion of *Graphosoma lineatum* (Heteroptera Pentatomidae): an experimental approach.

Ethology Ecology & Evolution doi: 10.1080/03949370.2015.1059895

Chemical protection of Heteroptera is mostly based on repellent secretion, which might signal the unpalatability of the bug to its potential predators or be directly toxic to predators. The aversive reactions of leopard geckos (*Eublepharis macularius*) were tested towards the major compounds of defensive secretion of *Graphosoma lineatum*: (1) a mixture of three aldehydes: (E)-hex-2-enal, (E)-oct-2-enal, (E)-dec-2-enal; (2) a mixture of three aldehydes and tridecane; (3) oxoaldehyde: (E)-4-oxohex-2-enal; (4) extracted metathoracic scent-glands secretion of *Graphosoma lineatum* adults and (5) hexane as a non-polar solvent. Additionally, (6) 2-isobutyl-3-methoxypyrazine was used to exclude the effect of neophobia. All chemicals were applied on a palatable food (*Tenebrio molitor* larvae). The aversive reactions of leopard geckos towards the mealworms were evaluated by observing the approach latencies, attack latencies and approach–attack intervals. Leopard geckos exhibited aversive reactions to the mixture of three aldehydes and also to this mixture and tridecane. Oxoaldehyde did not have any aversive effect. The whole metathoracic scent-glands secretion clearly had an aversive effect on geckos. Furthermore, when a living specimen of *Graphosoma lineatum* was offered to the geckos before the trials with the mixture of three aldehydes, the impact of this mixture was enhanced, thus acting as a potential signal of unpalatability.