

Bakalářská práce

Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích



Chladová odolnost larev octomilky,

Drosophila melanogaster

(Diptera: Drosophilidae)

Je možno nalézt aklimační režim,
který by významně prodloužil skladovatelnost larev za nízkých teplot?

Jaroslava Korbelová

2009

Vedoucí práce: Doc. Ing. Vladimír Košťál, CSc.

Bakalářská práce

Korbelová Jaroslava (2009): Chladová odolnost larev octomilky, *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). [Cold hardiness of larvae of the fruit fly, *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). Bc. Thesis, in Czech.] – 37 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

We assessed survival of larvae of the fruit fly, *Drosophila melanogaster* at low temperatures (0°C and 5°C) after rearing them under seven different acclimation regimes. Larvae that have developed in a standard diet at 25°C showed 50% mortality after 12,6 min of the exposure to 0°C ($Lt_{50} = 0.21$ h). In contrast, larvae that have developed in a diet enriched with glycerol at 15°C, and were cold acclimated at 5°C during last two days of their development, had $Lt_{50} = 38.6$ h. It means that it was possible to increase the Lt_{50} at 0°C more than 108-fold using simple manipulations with rearing temperatures and diet composition. The physiological differences in duration of larval development, fresh mass, dry mass, hydration and total contents of proteins, lipids and glycogen between the larvae belonging to different acclimation variants are described. The samples for future detailed metabolomic analysis were prepared.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně, za pomoci svého školitele a s využitím uvedené literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

České Budějovice, duben 2009

.....

Jaroslava Korbelová

Poděkování:

Děkuji především svému školiteli Doc. Ing. Vladimíru Košťálovi, CSc. za odborné rady, pomoc při provádění pokusů, podporu a trpělivost po celou dobu naší spolupráce. Mé poděkování patří i ostatním kolegům z Entomologického ústavu, kteří mi byli nápomocni.

Obsah

1. Úvod	6
1.1 Chladová odolnost hmyzu.....	6
1.2 Proč studovat chladovou odolnost hmyzu.....	7
1.3 Principy chladové odolnosti hmyzu.....	7
1.4 Výběr modelového organismu.....	9
1.4.1 Co víme o chladové odolnosti larev <i>Chymomyza costata</i> ?.....	10
1.4.2 Co víme o chladové odolnosti <i>Drosophila melanogaster</i> ?.....	10
1.5 Cíle práce.....	11
2. Materiál a metodiky	12
2.1 Chov octomilky.....	12
2.2 Aklimační varianty.....	12
2.3 Testy chladové odolnosti.....	13
2.4 Fyziologické parametry.....	13
2.4.1 Hmotnost, sušina a obsah vody.....	14
2.4.2 Stanovení celkových proteinů.....	14
2.4.3 Stanovení celkových lipidů.....	16
2.4.4 Stanovení glykogenu.....	19
3. Výsledky	22
3.1 Délka vývoje.....	22
3.2 Chladová odolnost.....	22
3.3 Hmotnost, sušina a obsah vody.....	26
3.4 Celkové proteiny.....	27
3.5 Celkové lipidy.....	28
3.6 Glykogen.....	28

4. Diskuse	29
4.1 Chladová aklimace larev <i>D. melanogaster</i>	29
4.2 Fyziologické rozdíly u larev <i>D. melanogaster</i> z různých aklimačních variant.....	29
4.3 Podstata chladové aklimace larev <i>D. melanogaster</i>	31
5. Závěry	33
6. Literatura	34

1. Úvod

1.1 Chladová odolnost hmyzu

Chladovou odolností hmyzu se zabývá obor hmyzí kryobiologie, jehož zakladatelem je R.W. Salt (Salt, 1961). Tento vědní obor studuje na jedné straně poškozující účinky nízkých teplot na hmyzí organismus a na druhé straně adaptivní a aklimatizační změny, které umožňují tomuto poškození zabránit, tolerovat jej, nebo jej napravit. Samotná chladová odolnost je definována jako schopnost organismu přežít vystavení nízkým teplotám pod teplotním prahem pro růst a vývoj. Konkrétní vymezení rozsahu nízkých teplot závisí na (fylogenetickém) druhu, populaci, ekologickém kontextu a fyziologickém stavu jedince. Nízké teploty můžeme obecně definovat jako teploty ležící pod prahovými hodnotami pro aktivitu, růst a vývoj, nebo pod specifickým prahem, po jehož překročení směrem dolů dochází k poškození organismu účinkem nízké teploty. Posledně jmenovaný práh byl definován Nedvědem (Nedvěd et al., 1998) jako "Upper Limit of Cold Injury Zone" (ULCIZ).

Chladovou odolnost ovlivňuje na jedné straně adaptace – evoluční přizpůsobení *genotypu* druhu nebo populace a na druhé straně chladová aklimace a schopnost vstupu do diapauzy (dormance); – *fenotypové* změny vyvolané prostředím. Chladová aklimace je velmi komplexním procesem, který zasahuje všechny úrovně biologické organizace. Je tedy chápána jako komplex změn v chování (migrace, hledání úkrytů atd.), morfologii, fyziologii a biochemii organismu (Lee & Denlinger, 1991).

Diapauza je endokrinně zprostředkovaná dormance, která se vyskytuje v určitém vývojovém stádiu (Beck, 1980; Saunders, 1982; Denlinger, 1985; Tauber et al., 1986; Košťál, 2006). Je dobře známá jak u vajíček, larev a kukel, tak také u dospělců. Jedinci v diapauzním stavu snižují lokomoční aktivitu a příjem potravy, hromadí zásobní látky, zastavují vývoj či reprodukci a jejich fyziologický stav se celkově hluboce mění následkem změn v genové expresi a v hormonálním prostředí (Denlinger, 2002).

1.2 Proč studovat chladovou odolnost hmyzu

Znalost chladové odolnosti hmyzu může napomoci při hledání odpovědí na otázky z různých vědních oblastí: obecné ekologie (ekologické problémy spojené s globálním oteplováním, které s sebou přináší změny druhových areálů), biologie a fyziologie (zodpovězení základních otázek ohledně mechanismů a principů odolnosti a nápravy poškození na organismální, buněčné a molekulární úrovni). Rovněž může najít praktické uplatnění v oblastech kryogeniky (viz níže) a ochrany plodin před škůdci. Boj se škůdci je významným ekonomickým problémem. Pokud budeme znát jejich vývojové cykly a schopnost přezimování, můžeme odhadnout růst a vývoj populace daného škůdce. Můžeme také efektivně zasáhnout do vývojových cyklů a tím kontrolovat populace škůdců.

Kryogenika zkoumá možnosti praktického využití nízkých teplot pro skladování biologického materiálu. Technologické postupy kryoprezervace jsou známy pouze pro izolované živočišné buňky určitých typů, jednobuněčné organismy nebo časná stadia živočišných embryí. V současné době se zatím příliš nedaří postoupit na úroveň tkání, natožpak celých organismů (Pegg, 2001). Další poznatky v oblasti kryogeniky by jistě znamenaly přínos v oblastech medicíny (skladování tkání, organismů) a ve zlevnění a zjednodušení biotechnologií masových chovů modelových organismů (např. *D. melanogaster*). Konkrétně muška *D. melanogaster* má obrovský význam pro základní i aplikovaný výzkum. Po celém světě je chováno tisíce různých kmenů, populací a mutantních linií. Významnými nevýhodami při chovu těchto mušek jsou jejich krátká životnost a neschopnost vstupovat do hluboké diapauzy. A tedy nutnost neustále opakovat drahé a časově náročné procedury chovu, samozřejmě s možností pozměnění genetického složení populace. Jak tedy nejlépe zachovat mutantní linie? Jak uložit určitý genotyp "k ledu"? Na otázku skladování organismů za nízkých teplot se snaží odpovědět právě kryogenika.

1.3 Principy chladové odolnosti hmyzu

Můžeme rozlišit zhruba pět základních strategií (různí autoři rozlišují strategií méně nebo naopak i více), které hmyz využívá pro přežití za nízkých teplot: (1) aktivita za nízkých teplot nebo v tepelně pufovaném prostředí, (2) podchlazení, (3) promrznutí, (4) dehydratace a (5) rychlá chladová aklimace (Košťál, 2004). Strategie se mohou ve svých jednotlivých projevech

prolínat a různé druhy (populace) hmyzu je mohou využívat jak výlučně tak i alternativně či doplňkově pro zabezpečení svého přežití za nízkých teplot.

Aktivitu za nízkých teplot nebo v tepelně pufovaném prostředí (1) využívají například druhy chladného temperátu, které v mikrohabitech jako je půda, opadanka, tlející dřevo nebo subnivální prostředí vytváří vývojová stádia, která zůstávají pohybově aktivní, přijímají potravu, rostou a vyvíjejí se během celého chladného období roku. Typickým příkladem jsou mnozí zástupci dvoukřídlého hmyzu (Aitchison, 1979). Pravděpodobnou adaptivní výhodou této, na první pohled nevýhodné, strategie může být využití relativně "volné" časové a prostorové niky s nízkým tlakem parazitů a predátorů.

Jedinci, kteří využívají strategii podchlazení (2), jsou schopni udržovat tělní tekutiny za teplot pod rovnovážným bodem mrznutí/tání v tzv. podchlazeném stavu. Důležité je, aby se zárodečný krystal ledu buď vůbec nevytvořil nebo alespoň nenabyl kritické velikosti, kdy by došlo k "explozivnímu" promrznutí, tedy k rychlému připojování dalších molekul vody do krystalové mřížky ledu. Proces mrznutí je doprovázen uvolněním značného skupenského tepla, které umožňuje metodicky snadno měřitelný záznam reálného bodu mrznutí ("supercooling point", SCP).

Jedinci využívající strategii promrznutí (3) jsou schopni do jisté míry tolerovat (případně i regulovat) proces promrznutí svých tělních tekutin v mimobuněčných prostorech. U každého druhu existuje specifický práh tolerance, po jehož překročení nastává mortalita. Jde o kombinace minimální teploty (jež určuje jaké množství vody je přeměněno v led) a maximálního času expozice.

Strategie dehydratace (4) spočívá v tom, že po vytvoření se ledu v půdních prostorech je parciální tlak vodní páry nad ledem nižší než tlak vodní páry nad osmoticky aktivní (tzv. volnou) vodou, která je dosud v kapalném stavu v organismu. Protože propustnost kutikuly pro vodu je vysoká, tato voda se poměrně rychle odpaří (protože je jí málo) a připojí se ke krystalům ledu v okolí. Tím dochází k dehydrataci organismu, silnému zahuštění tělních roztoků a tím k zabránění promrznutí uvnitř organismu (Holmstrup & Westh, 1994).

Rychlá chladová aklimace (5) je založena na krátkém vystavení organismu nízké avšak neletální teplotě, což zlepšuje následné přežívání ve velmi nízkých (jinak letálních) teplotách. Tato strategie byla poprvé popsána na masařce *Sarcophaga carassipalpis* (Lee et al., 1987).

Posléze byla rychlá chladová aklimace nalezena u velkého množství druhů hmyzu (vyskytuje se i u nediapauzních stádií hmyzu).

I když může hmyzí jedinec ovládat jednu z pěti výše uvedených strategií, mohou se u něj projevit poškozující vlivy nízkých teplot. Změna teploty se dotkne každé biologické struktury a procesu. Proteiny mění své funkční (nativní) prostorové uspořádání. K disociaci multikomponentních proteinů na jednotlivé monomery běžně dochází již za teplot kolem 0°C a nižší teploty mohou způsobit nevratnou denaturaci, neboli přechod z funkční do nefunkční prostorové konformace – fáze (Privalov, 1990). Fázovým změnám podléhají rovněž lipidické biologické membrány: přechod z funkční fluidní fáze (L_{α}) do nefunkční fáze gelové (L_{β}) (Chapman, 1975) a samozřejmě voda: přechod z kapalné do tuhé fáze. Aby hmyzí organismy předešly nepříznivým vlivům nízkých teplot, akumulují nízkomolekulární látky s kryoprotektivními účinky (Storey & Storey, 1991). Mezi tyto látky patří především vícesytné alkoholy, tzv. polyoly (ribitol, sorbitol, mannitol, glycerol, etylen glykol a další), cukry (trehalóza, sacharóza, glukóza, fruktóza), či aminokyseliny (nejčastěji prolin) (Miller & Smith, 1975; Sømme, 1982; Lee & Denlinger, 1991). U lipidických biologických membrán byly, nejen u hmyzu, ale prakticky u všech exotermních organismů, pozorovány charakteristické změny lipidického složení membrány po vystavení nízkým teplotám: zvýšení počtu dvojných vazeb (desaturace) mastných kyselin; snížení podílu fosfatidyl-cholinů oproti fosfatidyl-etanolaminům; relativní zkrácení řetězců mastných kyselin. Tyto změny jsou základem chladové aklimace membrány (Cossins, 1994).

1.4 Výběr modelového organismu

Výběr modelového organismu byl veden jednak praktickým motivem (viz výše: vyřešení otázky skladování organismů) a navíc je octomilka *Drosophila melanogaster* obecným modelem biologie a genetiky. Jsou k dispozici podrobné znalosti o její fyziologii a kompletně známe její genom.

Octomilka je ovšem původem tropický druh, má tedy nízkou chladovou odolnost a nízkou schopnost aklimace. Nehodí se tedy přímo k výzkumu chladové odolnosti, ale je výhodným srovnávacím modelem pro mušku *Chymomyza costata* (jiný druh téže čeledi Drosophilidae), která má holarktické rozšíření, silnou chladovou odolnost a vysokou schopnost aklimace.

Rozhodli jsme se pracovat s larvami *D. melanogaster* v jejich třetím instaru. Opět jde o srovnání s muškou *C. costata*, jejíž larvy přezimují v diapauze a jsou schopné přežít expozici v kapalném dusíku (-196°C). Je potřeba zdůraznit, že larvy jsou sice jednoduché, ale komplexní organismy. Mají vyvinuté a plně funkční všechny orgánové systémy tak, jak jejich ekvivalenty známe u obratlovců.

1.4.1 Co víme o chladové odolnosti larev *Chymomyza costata*?

Tyto mušky obývají celou chladnější holarktickou oblast, tedy sever Evropy, Asie a Ameriky (žijí i v České republice). Jejich larvy přezimují v dormantním stavu pod kůrou padlých stromů. Během přezimování jsou schopny se podchlazovat, ale přežijí i částečné promrznutí. Larvy mušek *Chymomyza costata* dokážeme v plně hydratovaném stavu zchladit až na teplotu kapalného dusíku (Moon et al., 1996). Podmínkou úspěšné kryoprezervace larev za teploty -196°C je jejich postupná laboratorní aklimace. Během ní dochází k restrukturační buněčných membrán a také k hromadění potenciálních kryo- a anhydro- protektantů, konkrétně trehalózy (20 – 40 nmol/mg čerstvé hmotnosti) a prolinu (90-180 nmol/mg čerstvé hmotnosti) (Shimada & Riihimaa, 1990; Košťál et al., 2003).

1.4.2 Co víme o chladové odolnosti *Drosophila melanogaster*?

V současné literatuře se potvrzuje, že chladová odolnost se liší u různých vývojových stádií mušky *Drosophila melanogaster* (Rako & Hoffmann, 2006). Byly zjištěny signifikantní rozdíly v toleranci chladu mezi larválními stádii (první, druhý a třetí instar a fáze "wandering stage"). Raná larvální stádia (první a druhý instar) byly obecně více tolerantní ke krátkodobému vystavení chladu (-2°C/2 h) než třetí instar. Nicméně "wandering stage" larvy byly více tolerantní vůči dlouhodobějšímu vystavení nízké teplotě (-2°C/7 h) než ostatní stádia (Rajamohan & Sinclair, 2008).

U dospělců se vyskytuje pouze slabě vyjádřená hormonální diapauza (Saunders, 1982; Roberts, 1985). Takzvaná mělká diapauza, kdy jsou dospělci do určité míry schopni reagovat na snížení teploty a zkrácení délky dne pozastavením ovariálního vývoje. Mušky jsou velmi náchylné k poškození chladem, vývojovým prahem je teplota 9 - 10°C (Cohet & David, 1980), při teplotě 7°C ztrácí nervovou a svalovou dráždivost (Hosler et al., 2000) a rozsáhlá

mortalita nastává při méně než -5°C (Czajka & Lee, 1990). Dospělci jsou schopni výrazně zlepšit svou toleranci k chladu díky rychlé adaptaci nazývané rychlá chladová aklimace (Rapid Cold Hardening, RCH). Například z populace mušek, které byly vystaveny teplotě 5°C po dobu 30 minut, přežila přibližně polovina následnou expozici v -5°C po dobu 2 hodin. Schopnost chladové odolnosti byla nejlepší u 3 až 5 dnů starých dospělců (Czajka & Lee, 1990).

1.5 Cíle práce

Cílem práce bylo testovat vliv několika jednoduchých aklimačních režimů, které kombinují vývoj za snížené teploty a obohacení diety obecným kryoprotektantem glycerolem, na chladovou odolnost larev *D. melanogaster*. Cílem je dosáhnout co nejdelší skladovatelnosti za nízkých teplot ($+5^{\circ}\text{C}$ nebo 0°C). Výhledově také skladovatelnosti za teplot pod bodem mrazu, tolerance promrznutí a snad i skladovatelnosti v kapalném dusíku (analogie s *C. costata*).

Konkrétně šlo o to provést základní charakterizaci odlišností larev *D. melanogaster* připravených v různých aklimačních režimech (variantách): přežívání v chladu, délka vývoje, čerstvá a suchá hmotnost, hydratace, obsah celkových proteinů (rozpuštěných ve vodě a v detergentu), lipidů a glykogenu. A dále připravit série vzorků, které budou později využity pro následnou podrobnou metabolomickou analýzu látek, které mohou mít kauzální souvislost se změnou chladové odolnosti (fosfolipidy, volné mastné kyseliny, organické kyseliny, volné aminokyseliny, cukry, polyoly).

2. Materiál a metodiky

2.1 Chov octomilky

Při pokusech jsme používali jako modelový organismus octomilku *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae), laboratorní kmen Oregon. Mušky jsme chovali ve zkumavkách (50 mL) opatřených vatovou zátkou. Jako zdroj potravy slouží mouchám umělá dieta, která se skládá z agaru, kukuřičného šrotu, cukru a kvasnic a je konzervována pomocí parabenu.

Pro úspěšnost naší práce byla zásadní synchronizace larev. Docílili jsme jí tak, že jsme nechali mušky klást na dietě přesně 24 hodin, poté jsme je přemístili do nové zkumavky s dietou, kde jsme je ponechali opět 24 hodin. Chov mušek probíhal za konstantní teploty 18°C (12 hodin světlo : 12 hodin tma). Většina vajec byla nakladena během světelné fáze.

Pro všechny varianty aklimačních pokusů i pro odběr vzorků na biochemické analýzy jsme vybírali tzv. "dospělé" larvy těsně před finální fází jejich třetího instaru, tedy ještě před vstupem do fáze "wandering stage" (v této finální fázi mají larvy maximální hmotnost, vylézají z diety a připravují se ke kuklení).

2.2 Aklimační varianty

Schematický přehled použitých aklimačních variant je v Tab. 1. Larvy jsme chovali při fotoperiodě 12 hodin světlo : 12 hodin tma za teplot: 25°C a 15°C.

V dalších variantách jsme larvy chovali v dietě, do které jsme přidali glycerol (v koncentraci 1, 2 či 3 g glycerolu/10 g diety). Larvy se vyvíjely v konstantních 15°C či 25°C. Další variantou byl vývoj v 15°C po dobu 18 dnů, poté byly larvy vystaveny teplotě 5°C po dobu 2 dnů.

Tab. 1 Schéma aklimačních variant

varianta	barva	zkratka	teplota	g glycerolu/10 g diety	následná aklimace
1	červená	25	25°C	—	—
2	žlutá	25G1	25°C	1	—
3	světle oranžová	25G2	25°C	2	—
4	oranžová	25G3	25°C	3	—
5	zelená	15	15°C	—	—
6	modrá	15G2	15°C	2	—
7	fialová	15G2+2d	15°C	2	2 dny v 5°C

2.3 Testy chladové odolnosti

Larvy jsme vystavili teplotě 5°C či 0°C. Do plastové tubičky s 1 mL diety (průměr 1 cm, výška 5 cm) jsme dali 10 larev. Tubičku jsme zasadili do aluminiového bloku, který byl již umístěn a temperován v nízkoteplotním inkubátoru na cílovou teplotu (teplotu jsme průběžně kontrolovali). Po uplynutí expoziční doby jsme tubičku s larvami přemístili do 18°C (fotoperioda 12 hodin světlo : 12 hodin tma), kde jsme po dalších 5 dnech vyhodnotili procento kuklení, jakožto kritérium přežití.

Každý vzorek 10-ti larev jsme 5 – 8 x opakovali, nezávisle připravili a změřili. Celkem jsme tedy na jednu aklimační variantu potřebovali asi 250 – 300 larev.

2.4 Fyziologické parametry

Abychom zjistili, zda a jak se larvy z různých aklimačních variant od sebe liší, provedli jsme analýzy jejich základních stavebních složek. Zjistili jsme obsah vody a sušiny, proměřili jsme obsah celkových proteinů, lipidů a glykogenu.

2.4.1 Hmotnost, sušina a obsah vody

V každé aklimační variantě jsme zvážili celkem 20 "dospělých" larev a také 10 – 20 larev ve stádiu "wandering stage". Larvy jsme očistili v destilované vodě, osušili a každou jsme jednotlivě zvážili s přesností na setiny miligramu (FM, fresh mass, čerstvá hmotnost; váhy Techniprot, Polsko). Zvážené larvy jsme dávali po jedné do malých zkumavek, zkumavky jsme nechali otevřené a umístili je do sušárny (60°C) na 3 dny. Poté jsme jednotlivě larvy zvážili, čímž jsme získali jejich suchou hmotnost (DM, dry mass). Dopočetali jsme hydrataci (H, hydration).

2.4.2 Stanovení celkových proteinů

Ke stanovení celkových proteinů jsme použili BCA metodu. Metoda využívá sodné soli kyseliny bicinchoninové. Principem metody je reakce peptidové vazby s měďnatými ionty za alkalických podmínek. Měďnaté ionty se redukují na měďné ionty, které jsou komplexovány sodnými solemi kyseliny bicinchoninové. Komplexace měďných iontů se projeví fialovým zbarvením, jehož intenzita se měří při absorbanci vlnové délky 562 nm (Stoscheck, 1990).

V prvním kroku jsme larvy homogenizovali a extrahovali v 0,1 M Tris-HCl (pH 8.0), čímž jsme získali celkové ve vodě rozpustné proteiny (odebrali jsme supernatant). Po centrifugaci jsme peletu rehomogenizovali v 50 mM Tris-HCl s přidavkem 1% TritonX (pH 8.0), čímž jsme získali celkové v detergentu rozpustné proteiny.

Příprava vzorků:

- z každé aklimační varianty jsme odebrali 40 "dospělých" larev. Soubor 10 larev představoval jeden vzorek (celkem tedy 4 opakování), larvy jsme opláchli v destilované vodě, osušili, zvážili a uchovali v Ependorfových zkumavkách v -80°C do analýzy.
- vzorky jsme vyndali z -80°C a umístili je na led, přidali jsme 200 µL 0,1 M Tris-HCl (pH 8.0), důkladně jsme homogenizovali pomocí ručního homogenizátoru s plastovým třecím nástavcem
- centrifugovali jsme při 22 000 g/10 min/4°C, odebrali jsme supernatant (obsahuje ve vodě rozpustné proteiny, peletu jsme si ponechali na stanovení v detergentu rozpustných proteinů)

Reagens:

- reagent A, BCA roztok (Sigma, B-9643):

sodium bicinchoninate (BCA)	1 g	5 g
Na ₂ CO ₃	2 g	10 g
vinan sodný	0.16 g	0.8 g
NaOH	0.4 g	2 g
NaHCO ₃	0.95 g	4.75 g
namíchali jsme v	100 mL	500 mL
pH jsme nastavili na 11.25 pomocí 10 M NaOH		

- reagent B:

CuSO ₄ .5H ₂ O	0.4 g	2 g
namíchali jsme v	10 mL	50 mL

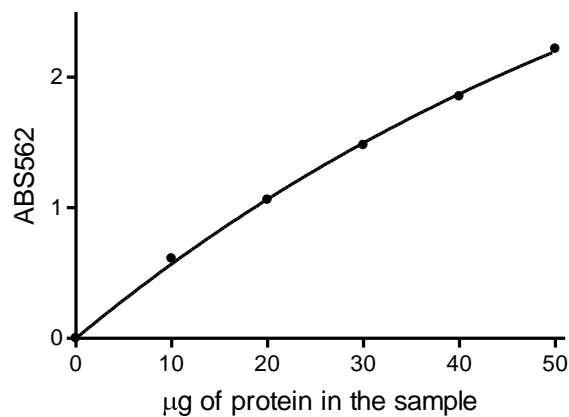
Postup:

- připravili jsme pracovní směs smícháním reagentie A : B v poměru 50 : 1
- připravili jsme BSA standardy:
5 mg BSA jsme rozpustili v 5 mL vody. Tím jsme získali roztok o koncentraci 1 µg/1 µL. Standardy jsme připravili podle následující tabulky:

Tab. 2 Příprava BSA standardů

	voda (µL)	roztok BSA (µL)	mg proteinů/ 50 µL roztoku
S0	50	0	0
S1	40	10	10
S2	30	20	20
S3	20	30	30
S4	10	40	40
S5	0	50	50

- vzorek jsme získali napipetováním 5 μL proteinového extraktu v 0.1 M Trisu a 45 μL vody do nových testovacích mikrozkuvek
- do standardů (S0 – S5) i do vzorků jsme rychle přidali 1 mL pracovní směsi, lehce promíchali
- mikrozkuvky jsme inkubovali ve vodní lázni vyhřáté na 60°C po dobu 30 min
- zkuvky jsme nechali pár minut zchladnout na pokojovou teplotu, změřili jsme absorbanci při 562 nm (je nutné postupovat rychle, hodnoty Abs_{562} podléhají při pokojové teplotě změnám rychlostí 2.3% / 10 min)
- v programu Prism 4 (GraphPad, USA) jsme vytvořili kalibrační křivku (Obr. 1), podle které jsme určovali množství proteinů ve vzorku



Obr. 1 Kalibrační křivka závislosti absorbance na množství proteinů. Křivka je proložena rovnicí: $y = \text{Top} * [1 - \exp(-K * x)]$; $R^2 = 0.9992$

2.4.3 Stanovení celkových lipidů

Lipidy jsme extrahovali z celých larev pomocí rozpouštědla, které jsme pak nechali odpařit (ve skleněné zkuvce zůstaly na stěnách lipidy).

Ke stanovení extrahovaných lipidů jsme použili fosfovanilínovu metodu. Je založena na reakci produktů degradace lipidů s aromatickými aldehydy, jehož výsledkem je růžové zabarvení, které se měří při 528 nm (Zöllner & Kirsch, 1962).

Příprava vzorků:

- z každé aklimační varianty jsme odebrali 20 "dospělých" larev. Soubor 5 larev představoval jeden vzorek (celkem tedy 4 opakování), larvy jsme opláchli v

destilované vodě, osušili, zvážili a uchovali v Ependorfových zkumavkách v -80°C do analýzy.

Extrakce lipidů:

- připravili jsme si extrakční medium; chloroform : methanol v poměru 2 : 1
- vzorky jsme umístili na led, přidali jsme 200 µL chlazeného extrakčního media, důkladně jsme homogenizovali pomocí ručního homogenizátoru s plastovým třecím nástavcem
- centrifugovali jsme při 22 000 g/5 min/4°C, odebrali jsme supernatant S1
- k peletě jsme přidali 200 µL extrakčního media a rehomogenizovali
- centrifugovali jsme při 22 000 g/5 min/4°C, odebrali jsme supernatant S2
- supernatanty S1 a S2 jsme spojili a přidali k nim 60 µL 0.9% NaCl, směs jsme promíchali pomocí Vortexu
- centrifugovali jsme při 22 000 g/5 min/4°C, odebrali jsme spodní organickou fázi obsahující lipidy
- vzorek jsme přemístili do skleněných vialek
- sušili jsme pod proudem dusíku při 40°C (10 – 30 min)
- vialky jsme uzavřeli teflonovým víčkem a uchovávali při -80°C do dalšího zpracování

Fosfovanilínová metoda:

- připravili jsme si fosfovanilínové reagens:

H₃PO₄ (85%) 668 mL

vanillin 1.98 g

chemikálie jsme smíchali, ohřáli na 60°C, nechali rozpustit (přes noc), pak je zchladili na pokojovou teplotu

doplňli vodou do 1 L

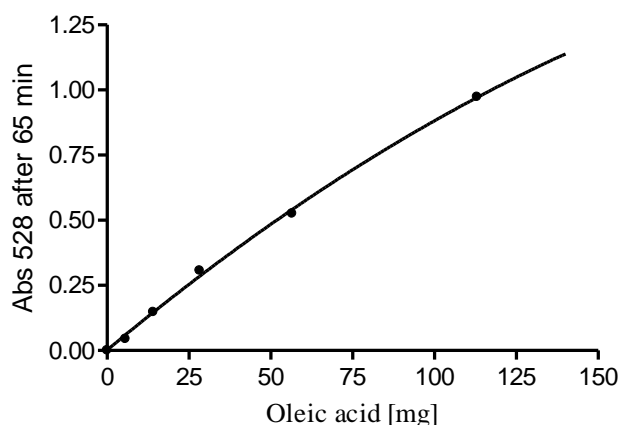
před použitím jsme nechali reagens stát na chladném a tmavém místě po dobu jednoho týdne

- připravili jsme roztoky standardů (Tab. 3):
kyselina olejová, $M_r = 282.5$
10 mM roztok jsme připravili rozpuštěním 2.828 mg kyseliny olejové v 1 mL hexanu

Tab. 3 Příprava standardů kyseliny olejové

standard	μL zásobního roztoku	μg kyseliny olejové
S1	2	5.650
S2	5	14.126
S3	10	28.250
S4	20	56.500
S5	40	113.000

- přidali jsme požadované množství standardního zásobního roztoku do 10 mL skleněných zkumavek (perfektně čistých), hexan jsme nechali vypařit, poté jsme se standardy pracovali stejně jako se vzorky
- extrahované lipidy jsme rozpustili v 1 mL chloroformu
- 100 μL lipidového extraktu jsme napipetovali do skleněných 10 mL zkumavek a nechali jsme odpařit rozpouštědlo (vzorky musí být naprosto suché!)
- přidali jsme 200 μL koncentrované H_2SO_4 a promíchali pomocí Vortexu
- ohřívali jsme po dobu 10 min při 100°C
- vzorky jsme nechali zchladit ve vodní lázni o teplotě 20°C po dobu 5 min
- přidali jsme 2.5 mL fosfovanilínového reagens a promíchali pomocí Vortexu
- vzorky jsme nechali stát na temném místě po dobu 60 – 65 min (dodržení času je důležité pro maximální naměřenou hodnotu absorbance, kdy poměr H_2SO_4 : vanillin odpovídá 1 : 12.5), poté jsme změřili absorbanci při 528 nm
- v programu Prism 4 (GraphPad, USA) jsme vytvořili kalibrační křivku (Obr. 2), podle které jsme určovali množství lipidů ve vzorku



Obr. 2 Kalibrační křivka závislosti absorbance na množství kyseliny olejové. Křivka je proložena rovnicí: $y = A + B \cdot x + C \cdot x^2$; $R^2 = 0.9984$

2.4.4 Stanovení glykogenu

Ke stanovení glykogenu jsme použili celé larvy. Postupovali jsme ve dvou krocích. Prvním krokem byla extrakce volných cukrů a polyolů. Extrahovali jsme je pomocí 70% etanolu; cukry a polyoly byly obsaženy v supernatantu, který byl uskladněn při -20°C (bude použit na další podrobné analýzy). Peleta obsahuje glykogen. V druhém kroku jsme extrahovali glykogen z pelety. Vzorky jsme analyzovali pomocí fenolové metody.

Principem fenolové metody je reakce monosacharidů, oligosacharidů, polysacharidů a jejich derivátů s fenolem a koncentrovanou kyselinou sírovou. Reakce je velmi citlivá a vzniká při ní žluto-oranžové zbarvení, jehož intenzita se měří při absorbanci vlnové délky 490 nm (DuBois, Gilles, Hamilton, Rebers & Smith, 1956).

Příprava vzorků:

- z každé aklimační varianty jsme odebrali 40 "dospělých" larev. Soubor 10 larev představoval jeden vzorek (celkem tedy 4 opakování), larvy jsme opláchli v destilované vodě, osušili, zvážili v Ependorfových zkumavkách, ke každému vzorku jsme přidali 200 μL 70% etanolu a důkladně homogenizovali pomocí ručního homogenizátoru s plastovým třecím nástavcem. Vzorky jsme uložili do -20°C až do analýzy.

Extrakce 1:

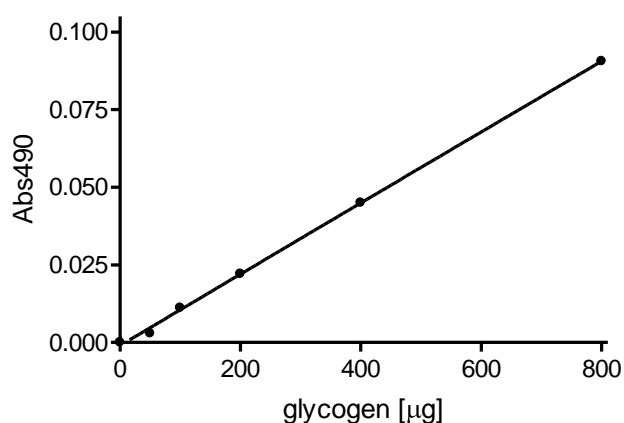
- po roztátí (skladování při -20°C) jsme ke vzorkům přidali dalších $200\ \mu\text{L}$ 70% etanolu a homogenizovali pomocí ručního homogenizátoru s plastovým třecím nástavcem
- třepali jsme vzorky při 1200 RPM po dobu 5 min
- centrifugovali jsme při $20\ 000\ \text{g}/10\ \text{min}/35^{\circ}\text{C}$, odebrali jsme supernatant S1
- peletu jsme rehomogenizovali ve $400\ \mu\text{L}$ 70% etanolu
- třepali jsme vzorky při 1200 RPM po dobu 5 min
- centrifugovali jsme při $20\ 000\ \text{g}/5\ \text{min}/35^{\circ}\text{C}$, odebrali jsme supernatant S2
- S1 + S2 (supernatant jsme uložili do -20°C pro pozdější analýzu cukrů, polyolů a aminokyselin)

Extrakce 2:

- zbytkový etanol jsme z pelety odstranili sušením v pícce při 55°C po dobu 15 min
- přidali jsme $200\ \mu\text{L}$ destilované vody, důkladně jsme homogenizovali pomocí ručního homogenizátoru s plastovým třecím nástavcem
- přidali jsme $1.1\ \text{mL}$ 30% KOH, zamíchali pomocí Vortexu, Ependorfovy zkumavky jsme dobře zavřeli a zahřívali při teplotě 95°C (ve vodní lázni) po dobu 30 min
- vzorky jsme zchladili, centrifugovali při $10\ 000\ \text{g}/10\ \text{min}/20^{\circ}\text{C}$, odebrali jsme $500\ \mu\text{L}$ infranatanu (5/13) do skleněných zkumavek
- přidali jsme $250\ \mu\text{L}$ 10% Na_2SO_4 a $1.5\ \text{mL}$ 99.8% etanolu, zamíchali jsme pomocí Vortexu
- zkumavky jsme nechali 1 hodinu na ledu, dvakrát jsme promíchali pomocí Vortexu (v intervalech 20 min)
- centrifugovali jsme při $3000\ \text{g}/20\ \text{min}/20^{\circ}\text{C}$, supernatant jsme odstranili
- k peletě jsme přidali $500\ \mu\text{L}$ 70% etanolu, důkladně jsme promíchali
- centrifugovali jsme při $3000\ \text{g}/3\ \text{min}/20^{\circ}\text{C}$, supernatant jsme odstranili
- k peletě jsme přidali $500\ \mu\text{L}$ 70% etanolu, důkladně jsme promíchali, centrifugovali při $3000\ \text{g}/3\ \text{min}/20^{\circ}\text{C}$, supernatant jsme odstranili, sušili jsme v pícce při 55°C po dobu 15 min
- peletu jsme rozpustili v $1.0\ \text{mL}$ destilované vody

Analýza:

- Kyselá hydrolyzá: z celkového objemu 1.0 mL jsme odebrali 100 μ L pro analýzu, přidali jsme 500 μ L destilované vody, 200 μ L 5% roztoku fenolu, nakonec jsme rychle přidali 1.0 mL koncentrované H_2SO_4 , promíchali pomocí Vortexu, vzorky jsme okamžitě přenesli do vodní lázně o teplotě 95°C, kde jsme je ponechali 20 min
- vzorky jsme nechali 30 min stát při pokojové teplotě
- změřili jsme absorbanci při 490 nm
- analogické měření jsme provedli se standardy glykogenu (glykogen izolovaný z ústřic, Fluka) a z výsledných hodnot jsme v programu Prism 4 (GraphPad, USA) vytvořili kalibrační křivku (Obr. 3), podle které jsme určovali množství glykogenu ve vzorku

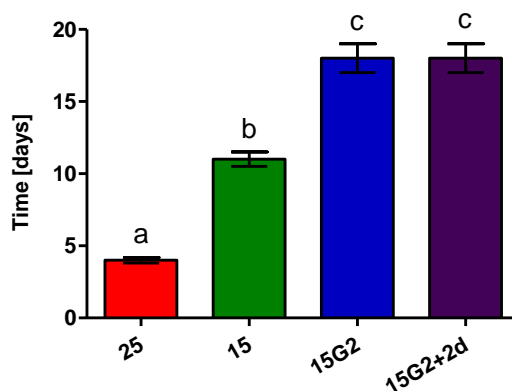


Obr. 3 Kalibrační křivka závislosti absorbance na množství glykogenu. Křivka je proložena rovnicí: $y = A + B \cdot x + C \cdot x^2$; $R^2 = 0.9992$

3. Výsledky

3.1 Délka vývoje

Zjistili jsme, že teplota a přídavek glycerolu do diety mají značný vliv na délku vývoje larev (Obr. 4). V teplotě 25°C proběhne vývoj velmi rychle během 4 dnů, v 15°C se vývoj zpomalí téměř třikrát na 11 dnů. Vývoj larev, které byly v dietě obohacené 2 g glycerolu na 10 g diety, trval za teploty 15°C 17 – 19 dní. Glycerol prodlužuje délku vývoje larev a zvyšuje variabilitu mezi larvami.



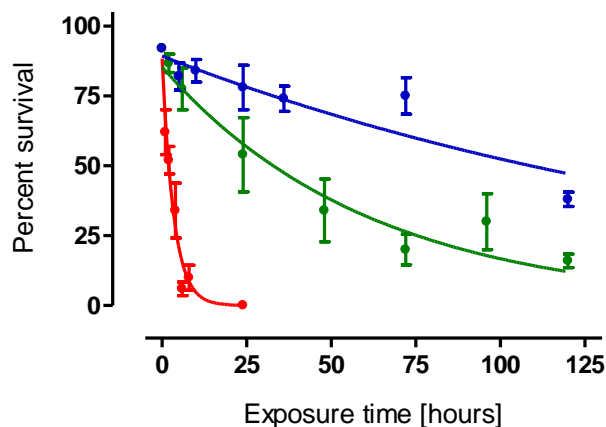
Obr. 4 Délka vývoje larev *D.m.* Aklimační varianty jsou značeny zkratkami (viz Tab. 1). Úsečky ukazují směrodatnou odchylku. Písmena a, b, c výsledky post-hoc Tukeyho testu. ANOVA: $F = 235.4$; $R^2 = 0.9888$; $P < 0.0001$ ($\alpha = 5\%$).

3.2 Chladová odolnost

Výsledky přežívání v chladu u všech aklimačních variant jsou na Obr. 5, 6 a 7. Tabulky 4a, 5a a 6a ukazují Lt_{50} (lethal time), tedy dobu expozice v určité teplotě, kdy přeživalo 50% larev (počítáno vzhledem k přežívání v kontrole 92%; pro variantu 15G2+2d byla kontrola 75%).

Přežívání v jednotlivých variantách uvedených v jednom grafu jsme hodnotili pomocí F-testu (Prism 4, GraphPad), který srovnává parametr K jednotlivých exponenciálních křivek. Parametr K charakterizuje rychlost poklesu přežívání s prodlužující se expoziční dobou. Statistické výsledky jsou v Tab. 4b, 5b a 6b.

Larvy octomilky přežívají v 5°C hodiny až dny. Larvy, které byly chovány při konstantních 25°C mají nízké Lt_{50} (2,29 h) a během 24 hodin všechny v 5°C hynou. Naproti tomu více než 50% larev, které byly chovány v konstantních 15°C, přežije déle než 24 hodin v 5°C. Doba přežití, Lt_{50} (37,97 h), je více než 16-krát vyšší u 15 než u varianty 25. Larvy, které se vyvíjely v 15°C v dietě obohacené 2 g glycerolu/10 g diety přeživaly nejlépe. Polovina larev přežila v 5°C déle než 5 dní ($Lt_{50} = 124,65$ h) (Obr. 5).



Obr. 5 Přežívání "dospělých" larev *D.m.* v 5°C. Křivky jsou proloženy exponenciální rovnicí: $y = Top*[1 - \exp(-K*x)]$. Body ukazují průměr (5 – 8 opakování), úsečky směrodatnou odchylku.

Tab. 4a Přežívání "dospělých" larev *D.m.* v 5°C – Lt_{50}

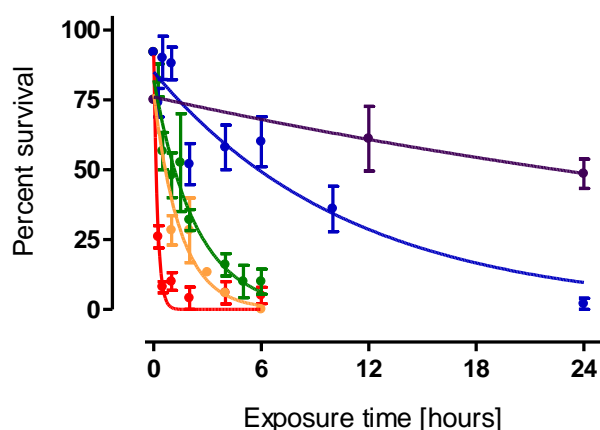
zkratka a barva varianty	Lt_{50} (hodiny)
25 (červená)	2,29
15 (zelená)	37,97
15G2 (modrá)	124,65

Tab. 4b Přežívání "dospělých" larev *D.m.* v 5°C – F-test

zkratka a barva varianty	parametr K	Std. Error
25 (červená)	0,2926	0,0422
15 (zelená)	0,0163	0,0022
15G2 (modrá)	0,0053	0,0013

$F = 47.92$ (2,16); $P < 0.0001$ ($\alpha = 5\%$) Parametry K všech aklimačních variant se od sebe navzájem liší.

Larvy octomilky přežívají v 0°C minuty až hodiny. Larvy z aklimačních variant 25 a 25G2 mají Lt_{50} nižší než jednu hodinu. Larvy, které se vyvíjely v konstantních 15°C, mají Lt_{50} 1,35 h. Larvy těchto tří variant nejsou schopné přežít déle než několik hodin v 0°C. Naproti tomu larvy, které se vyvíjely v 15°C v dietě obohacené glycerolem (15G2), měly Lt_{50} 6,77 h. Larvám, které se vyvíjely za stejných podmínek, ale před testem přežívání v 0°C byly 2 dny chladově aklimovány v teplotě 5°C (15G2+2d), se Lt_{50} zvedl více než 5-krát (až na 38,06 h) oproti larvám varianty 15G2 (Obr. 6).



Obr. 6 Přežívání "dospělých" larev *D.m.* v 0°C. Křivky jsou proloženy exponenciální rovnicí: $y = Top*[1 - \exp(-K*x)]$. Body ukazují průměr (5 – 8 opakování), úsečky směrodatnou odchylku.

Tab. 5a Přežívání "dospělých" larev *Dm.* v 0°C – Lt_{50}

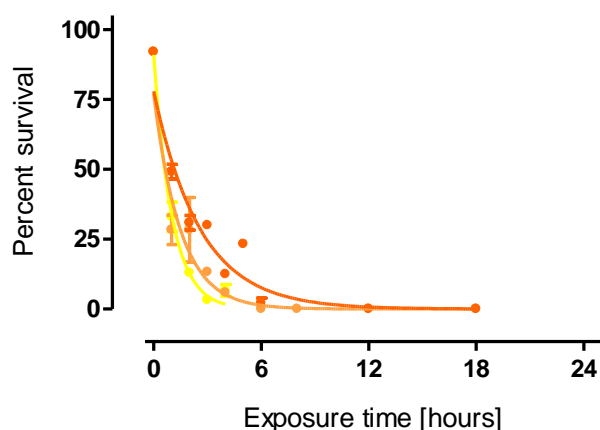
zkratka a barva varianty	Lt_{50} (hodiny)
25 (červená)	0,21
25G2 (světle oranžová)	0,77
15 (zelená)	1,35
15G2 (modrá)	6,77
15G2+2d (fialová)	38,06

Tab. 5b Přežívání "dospělých" larev *D.m.* v 0°C – F-test

zkratka a barva varianty	parametr K	Std. Error
25 (červená)	4,8590	0,8590
25G2 (světle oranžová)	0,6734	0,1660
15 (zelená)	0,4287	0,0687
15G2 (modrá)	0,0906	0,0229
15G2+2d (fialová)	0,0186	0,0007

$F = 28.60 (4,24)$; $P < 0.0001$ ($\alpha = 5\%$) Parametry K všech aklimačních variant se od sebe navzájem liší.

Testovali jsme přežívání larev octomilky, které se vyvíjely v konstantních 25°C v dietě obohacené 1, 2 a 3 g glycerolu/10 g diety (Obr. 7). Ačkoli F-test našel statisticky významné rozdíly mezi přeživacími křivkami jednotlivých variant, tyto rozdíly byly velmi malé. Doba přežití Lt_{50} se u jednotlivých variant prakticky nelišila (Tab. 6a), Pouze u varianty 25G3 jsme pozorovali mírné prodloužení Lt_{50} na 1,36 h.



Obr. 7 Přežívání "dospělých" larev *D.m.* v 0°C. Křivky jsou proloženy exponenciální rovnicí: $y = Top*[1 - \exp(-K*x)]$. Body ukazují průměr (5 – 8 opakování), úsečky směrodatnou odchylku.

Tab. 6a Přežívání "dospělých" larev *Dm.* v 0°C – Lt_{50}

zkratka a barva varianty	Lt_{50} (hodiny)
25G1 (žlutá)	0,69
25G2 (světle oranžová)	0,77
25G3 (oranžová)	1,36

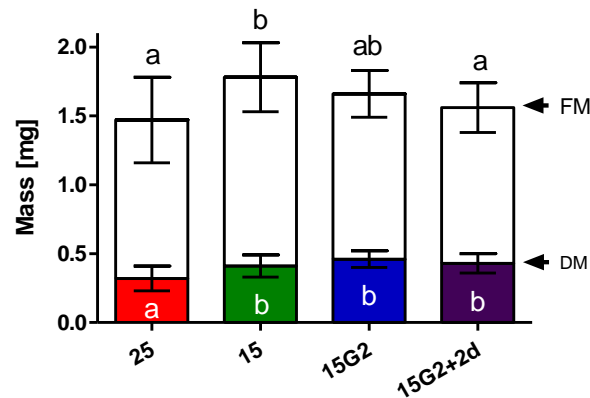
Tab. 6b Přežívání "dospělých" larev *D.m.* v 0°C – F-test

zkratka a barva varianty	parametr K	Std. Error
25G1 (žlutá)	0,9906	0,0859
25G2 (světle oranžová)	0,6738	0,1254
25G3 (oranžová)	0,3873	0,0671

$F = 7.310 (2,17)$; $P = 0.0051 (\alpha = 5\%)$ Parametry K všech aklimačních variant se od sebe navzájem liší.

3.3 Hmotnost, sušina a obsah vody

Nejnižší čerstvou hmotnost (FM) měly larvy, které se vyvíjely v 25°C. Naopak nejvíce vážily larvy, které se vyvíjely v 15°C. Nejnižší suchou hmotnost (DM) měly larvy z aklimační varianty 25. Larvy ze tří dalších aklimačních variant 15, 15G2 a 15G2+2d měly o něco vyšší a statisticky navzájem shodnou suchou hmotnost (Obr. 8).



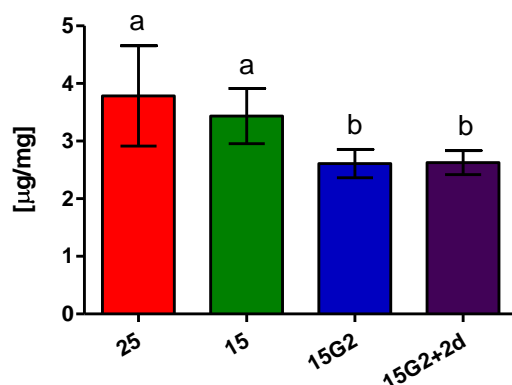
Obr. 8 Čerstvá (FM) a suchá (DM) hmotnost "dospělých" larev *D.m.* Aklimační varianty jsou značeny zkratkami (viz Tab. 1). Úsečky ukazují směrodatnou odchylku; n = 20. Písmena a, b výsledky post-hoc Tukeyho testu. ANOVA_{FM}: $F_{FM} = 6.372$; $R^2_{FM} = 0.2010$; $P_{FM} = 0.0007$ ($\alpha = 5\%$). ANOVA_{DM}: $F_{DM} = 13.63$; $R^2_{DM} = 0.3498$; $P < 0.0001$ ($\alpha = 5\%$).

Protože se doba vývoje v jednotlivých aklimačních variantách značně lišila (viz Obr. 4), jako kritérium pro posouzení stádia ontogenetického vývoje larev jsme použili jejich hmotnost. Čerstvá hmotnost "dospělých" larev třetího instaru by se měla blížit finální hmotnosti larev ve fázi "wandering stage" (Tab. 7). V aklimační variantě 25 jsme vybrali larvy, které vážily 83,5% finální hmotnosti, u varianty 15 vážily 88,1% a u variant 15G2 a 15G2+2d to bylo 96,5%.

Tab. 7 FM "wandering stage" *D.m.*

zkratka a barva varianty	m[mg]"wandering"	S.D."wandering"	% m"dospělé" larvy/"wandering"
25 (červená)	1,76	0,17	83,5
15 (zelená)	2,02	0,19	88,1
15G2 (modrá)	1,72	0,23	96,5

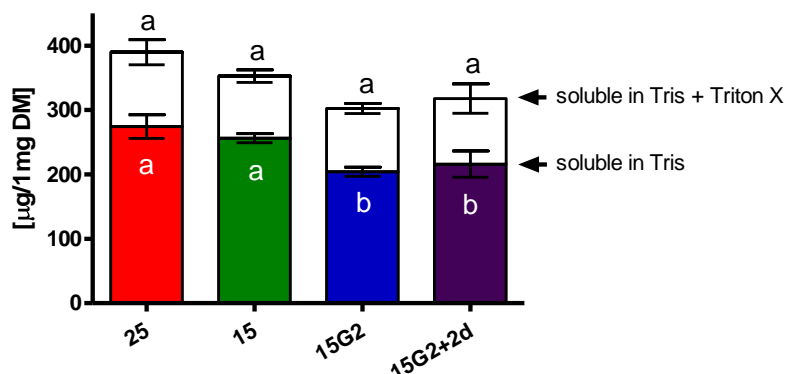
Larvy aklimačních variant 25 a 15 měly relativně vysokou hydrataci (nebyl mezi nimi nalezen statistický rozdíl). Larvy variant 15G2 a 15G2+2d měly hydrataci nižší (než varianty 25 a 15; statisticky významný rozdíl). Varianty 15G2 a 15G2+2d se od sebe statisticky nelišily (Obr. 9).



Obr. 9 Hydratace "dospělých" larev *D.m.* Aklimační varianty jsou značeny zkratkami (viz Tab. 1). Úsečky ukazují směrodatnou odchylku; $n = 20$. Písmena a, b výsledky post-hoc Tukeyho testu. ANOVA: $F = 25.54$; $R^2 = 0.5020$; $P < 0.0001$ ($\alpha = 5\%$)

3.4 Celkové proteiny

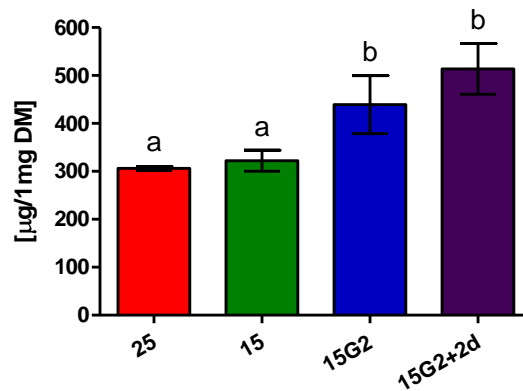
Porovnáme-li statisticky celkové ve vodě rozpustné proteiny, získáme dvě skupiny. Larvy z aklimační varianty 25 se statisticky neliší od larev z 15. Druhou skupinu tvoří larvy, které se vyvíjely v dietě s glycerolem (varianty 15G2 a 15G2+2d), jejichž obsah ve vodě rozpustných proteinů se statisticky neliší a je nižší než u variant 25 a 15. Celkový obsah v detergentu rozpustných proteinů je u všech aklimačních variant statisticky stejný (Obr. 10).



Obr. 10 Obsah celkových ve vodě rozpustných proteinů a v detergentu rozpustných proteinů. Aklimační varianty jsou značeny zkratkami (viz Tab. 1). Úsečky ukazují směrodatnou odchylku, $n = 4$. Písmena a, b výsledky post-hoc Tukeyho testu. ANOVA_{Tris}: $F_{\text{Tris}} = 19.20$; $R^2_{\text{Tris}} = 0.8397$; $P = 0.0001$. ANOVA_{T+TX}: $F_{\text{T+TX}} = 1.157$; $R^2_{\text{T+TX}} = 0.2243$; $P_{\text{T+TX}} = 0.3664$ ($\alpha = 5\%$).

3.5 Celkové lipidy

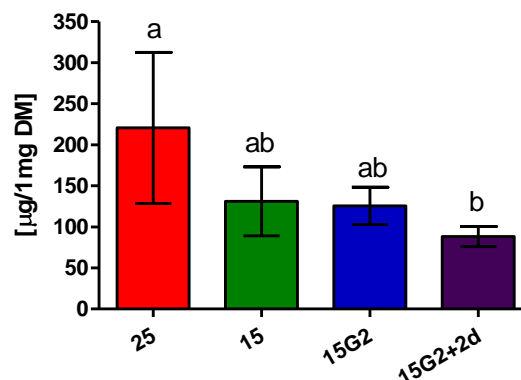
Obsah celkových lipidů larev, které se vyvíjely v dietě bez glycerolu (varianty 25 a 15) byl statisticky stejný a relativně nízký. Larvy, které se vyvíjely v dietě s glycerolem (varianty 15G2 a 15G2+2d) měly obsah celkových lipidů relativně vysoký, statisticky shodný (Obr. 11).



Obr. 11 Obsah celkových lipidů u "dospělých" larev *D.m.* Aklimační varianty jsou značeny zkratkami (viz Tab. 1). Úsečky ukazují směrodatnou odchylku. Písmena a, b výsledky post-hoc Tukeyho testu. ANOVA: $F = 20.57$; $R^2 = 0.8487$; $P < 0.0001$; ($\alpha = 5\%$).

3.6 Glykogen

Numericky nejvyšší obsah glykogenu měly larvy aklimační varianty 25. Larvy variant 15 a 15G2 se statisticky neliší od varianty 25, ani od varianty 15G2+2d. Nejméně glykogenu obsahovaly larvy varianty 15G2+2d (Obr. 12).



Obr. 12 Celkový obsah glykogenu u "dospělých" larev *D.m.* Aklimační varianty jsou značeny zkratkami (viz Tab. 1). Úsečky ukazují směrodatnou odchylku; $n = 4$. Písmena a, b výsledky post-hoc Tukeyho testu. ANOVA: $F = 3.917$; $R^2 = 0.5165$; $P = 0.0398$; ($\alpha = 5\%$).

4. Diskuse

4.1 Chladová aklimace larev *D. melanogaster*

Dokázali jsme, že chladová aklimace u "dospělých" larev *D. melanogaster* je možná. Testovali jsme celkem sedm aklimačních variant (Tab. 1) a následné přežívání mušek v 5°C a v 0°C. Pokud porovnáme Lt_{50} (testování v 5°C) larev aklimační varianty 25 (2,29 h) a nejlépe přežívající varianty 15G2 (124,65 h), zjistíme, že se délka přežívání po aklimaci zvýšila více než 50-krát. Podobným srovnáním krajních variant přežívání v 0°C získáme dokonce 180-tinásobný rozdíl (Lt_{50} varianty 25 bylo 0,21 h a varianty 15G2+2d bylo 38,06 h). Tyto pozitivní výsledky nás motivovaly k dalším pokusům. Larvy nejlepší aklimační varianty (15G2+2d) jsme podrobili testu přežívání za podnulových teplot (-3°C). U larev jsme navodili promrzlý stav inokulací ledem. Žádná z larev ovšem tento pokus nepřežila, což je pro nás výzvou k dalšímu pokračování a bádání. Klademe si otázku, zda je možné nějakou aklimací získat larvy, které přežijí zmrznutí. Snažíme se najít analogie s příbuznou *C. costata* (Drosophilidae), která přežívá podnulové teploty (po aklimaci) bez problémů (Shimada & Riihimaa, 1990). Plánujeme navrhnout a otestovat další aklimační varianty, které by kombinovaly manipulace s teplotou a přidavky dalších potenciálních kryoprotektantů (DMSO, trehalózy, prolinu, cholesterolu, nenasycených mastných kyselin a dalších látek – podle výsledků metabolomické analýzy).

4.2 Fyziologické rozdíly u larev *D. melanogaster* z různých aklimačních variant

Zjistili jsme, že se larvy z různých aklimačních variant od sebe navzájem liší již v základních parametrech jako jsou: délka vývoje, hmotnost, sušina a obsah vody, celkové ve vodě rozpustné proteiny (množství celkových v detergentu rozpustných proteinů bylo shodné), celkové lipidy a glykogen.

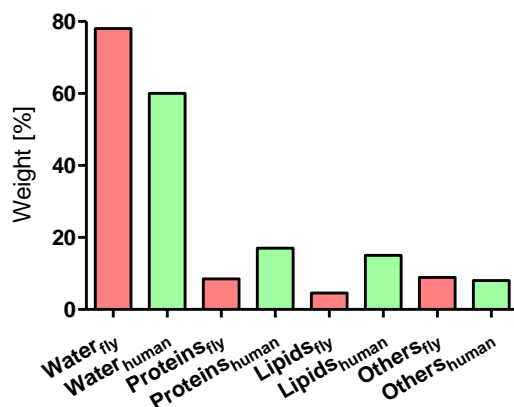
Prokázali jsme, že teplota zpomaluje vývoj a vede k vývoji větších jedinců, což je poměrně dobře známý fakt u většiny studovaných exotermních živočichů. Vývoj larev v 25°C trval 3-krát kratší dobu, než u larev vyvíjejících se v 15°C. Porovnáme-li varianty 15 (vývoj 11 dní) a 15G2 (vývoj 17 – 19 dní), můžeme konstatovat, že nejen teplota zpomaluje larvální vývoj, ale také přidavek glycerolu do diety. Glycerol se běžně používá jako vhodný

kryoprotektant v kryogenických technologiích, protože dobře proniká membránami (dostane se ze střeva do hemolymfy a do všech buněk) a protože má nízkou toxicitu. Také četné druhy hmyzu akumulují glycerol během svého přezimování, jako je tomu u podkorního brouka *Pytho depressus*, u nějž může obsah glycerolu během přezimování dosahovat až 25% z celkové čerstvé hmotnosti (Zachariassen, 1985; Storey & Storey, 1988).

Larvy *D. melanogaster* z variant 25 a 15 se v zásadě příliš nelišily ve sledovaných parametrech (snad až na glykogen, který je statisticky nevýznamně vyšší u varianty 25). Rozdíl v jejich přežívání tedy nelze připsat těmto parametrům a musí mít příčinu jinde. Myslíme si, že půjde o změnu v metabolitech. Zvláště se hodláme zaměřit na studium zvýšení hladiny trehalózy a prolinu, jež bylo pozorováno u příbuzné mušky *C. costata* (Shimada & Riihimaa, 1990). Změny budou možná i v jiných metabolitech, což nám ukáže až kompletní metabolická analýza, pro níž máme vzorky připraveny právě jako výsledek této studie.

Larvy, které se vyvíjely v dietě obohacené glycerolem se velmi lišily (varianty 15G2 a 15G2+2d) od larev, které se vyvíjely ve standardní dietě. Měly nižší hydrataci, relativně nízký obsah ve vodě rozpustných proteinů a naopak vyšší obsah celkových lipidů. Obsah glykogenu byl relativně snížen oproti larvám z varianty 25, byl však podobný jako u larev z varianty 15. Je zřejmé, že glycerol do značné míry ovlivnil metabolismus larev. Nedokážeme přesto říci, zda a jak mohly námi pozorované rozdíly ovlivnit chladovou odolnost. Myslíme si ale, že zásadní roli hrají výše zmíněné nízkomolekulární metabolity (trehalóza a prolin a možná i jiné), spíše než konkrétní obsah makromolekul. Zvýšený obsah lipidů by mohl mít jistou kauzální souvislost s dlouhodobým přežíváním za nízkých teplot. Lipidy jsou významným energetickým substrátem, a proto by velikost jejich zásoby mohla mít vliv na dobu přežití za nízkých teplot, kdy může být schopnost přijímat a zpracovávat potravu silně omezena nebo zcela zastavena.

Rozborem a analýzami larev jsme získali obecnou představu o jejich základních stavebních složkách. Na Obr. 13 je porovnání s člověkem (data podle Hill et al., 2008, str. 111). Vidíme, že hodnoty se v zásadě příliš neliší. Podobné základní složení mají vlastně všechny živočišné i prokaryotické buňky (Alberts, B., 1994, Molecular Biology of the Cell).



Obr. 13 Srovnání biochemického složení "dospělé" larvy mušky *D. melanogaster* a člověka. Vidíme, že larva obsahuje více vody než člověk. Naopak v lidském těle jsou více zastoupeny proteiny a lipidy. Pod pojmem "others" rozumějme další látky jako: minerály, nukleové kyseliny, či karbohydráty. U larvy tyto látky tvoří celkem 8.9% hmotnosti těla a u člověka 8%.

4.3 Podstata chladové aklimace larev *D. melanogaster*

Tato práce neodhaluje přímou podstatu chladové aklimace larev. Je pro nás hlavně přípravou a pevnou půdou pro další výzkum. Jak je uvedeno výše, připravujeme podrobnou metabolickou analýzu látek, které mohou mít kauzální souvislost se změnou chladové odolnosti (fosfolipidy, volné mastné kyseliny, organické kyseliny, volné aminokyseliny, cukry, polyoly). Budeme nadále hledat analogie s příbuznou *C. costata*, která akumuluje prolin a trehalózu (Shimada & Riihimaa, 1990) a také se u ní potvrdila významná změna složení fosfolipidů (Košťál et al., 2003).

Současná literatura nabízí několik článků o metabolických změnách u dospělců *D. melanogaster* během chladové aklimace. Dvěma hlavními předpokládanými mechanismy jak zvýšit chladovou odolnost jsou syntéza kryoprotektantů a přetváření lipidických membrán. Bylo zaznamenáno snižování obsahu volné glukózy u jedinců testovaných v rychlé chladové aklimaci. Ovšem nebyl nalezen žádný korelační vztah mezi množstvím volné glukózy a chladovou odolností dospělých mušek (MacMillan et al., 2009). Membránové lipidy byly proměřeny u dospělců mušky po nízkoteplotní aklimaci (chov v 15°C ve srovnání s chovem ve 25°C). Bylo zaznamenáno zvýšení relativního podílu etanolaminu na úkor cholinu u glycerofosfolipidů. Nebyla zjištěna žádná změna ve stupni nenasycenosti mastných kyselin (Overgaard et al., 2008).

Podstata chladové aklimace a chladové odolnosti u mušek *D. melanogaster* a zvláště pak u jejich larev zůstává do značné míry neznámá. Přesto se nám v této práci podařilo prokázat, že chladovou aklimací larev je možné velmi výrazně zvýšit jejich chladovou odolnost a prodloužit dobu jejich skladovatelnosti za nízkých teplot. Dosažené výsledky jsou sice povzbudivé, ale zatím nedostatečné z hlediska možnosti jejich praktického využití. Doufáme, že dalším výzkumem bude možné dobu skladovatelnosti larev dále prodlužovat. Významnou bariérou na cestě k tomuto cíli je však dosažení tolerance promrznutí, která by otevřela cestu ke skladování za velmi nízkých teplot (snad i v kapalném dusíku). Našimi dosavadními pokusy se tuto bariéru nepodařilo zatím překonat.

5. Závěry

- Zjistili jsme, že larvy jsou schopné chladové aklimace v jednoduchých aklimačních postupech.
- Přežívání larev v 5°C jsme dokázali prodloužit více než 50-krát až na Lt_{50} 124,65 h (varianta 15G2), oproti výchozímu Lt_{50} 2,29 h (varianta 25); přežívání v 0°C jsme dokázali prodloužit 180-krát až na Lt_{50} 38,06 h (varianta 15G2+2d), oproti výchozímu Lt_{50} 0,21 h (varianta 25).
- Larvy jednotlivých variant se liší v těchto parametrech:
 - a) v délce vývoje: vývoj larev aklimační varianty 25 trval 4 dny, u aklimační varianty 15 to bylo 11 dní a u larev, které se vyvíjely v dietě obohacené glycerolem 17 – 19 dní.
 - b) v hmotnosti a hydrataci: nejvíce vážily larvy aklimační varianty 15, statisticky stejně, ale o něco méně larvy varianty 15G2, dále 15G2+2d, nejméně vážily larvy varianty 25. Larvy variant 25 a 15 měly poměrně vysokou hydrataci. Larvy, které se vyvíjely v dietě s glycerolem, měly hydrataci nižší.
 - c) v celkových proteinech: obsah ve vodě rozpustných proteinů byl statisticky stejný u variant 15 a 25, varianty 15G2 a 15G2+2d měly těchto proteinů méně než předchozí varianty. Nenalezli jsme žádný rozdíl v proteinech rozpustných v detergentu.
 - d) v celkových lipidech: larvy variant 25 a 15 měly relativně nízký, statisticky shodný obsah celkových lipidů. Oproti tomu larvy variant 15G2 a 15G2+2d měly vyšší obsah celkových lipidů.
 - e) v glykogenu: nejvíce glykogenu obsahovaly larvy varianty 25, méně, ale statisticky shodně glykogenu měly larvy variant 15 a 15G2, nejméně glykogenu obsahovaly larvy varianty 15G2+2d.
- Připravili jsme vzorky pro následnou podrobnou metabolickou analýzu. Výsledky této analýzy by mohly podhalit biochemickou podstatu chladové aklimace.

6. Literatura

ALBERTS, B. (1994). *Molecular Biology of the Cell* (3rd edition), New York.

AITCHISON C.W. (1979). Winter-active subnivean invertebrates in Southern Canada.I. Collembola. *Pedobiologia* 19, 113-120.

ALBERTS, B. (1994). *Molecular Biology of the Cell* (3rd edition), New York.

BECK, S.D. (1980). *Insect Photoperiodism*, 2nd ed. Academic Press, New York.

CHAPMAN, D. (1975). Phase transitions and fluidity characteristics of lipids and cell membranes. *Quart. Rev. Biophys.* 8, 185-235.

COHET, Y., DAVID, J. (1980). Geographic divergence and sexual behavior – comparison of mating systems in french and afrotropical populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetica* 54: 161-165.

COSSINS, A.R. (1994). *Temperature of Biological Membranes*. Portland Press, London and Chapel Hill.

CZAJKA, M.C, LEE, R.E. Jr (1990) A rapid cold-hardening treatment response protecting against cold shock Indry in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* 148: 245-254.

DENLINGER, D.L. (1985). Hormonal control of diapause. In *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*, Vol. 8, eds. G. A. Kerkut and L. I. Gilbert, pp. 353 – 412. Pergamon Press, Oxford.

DENLINGER, D.L. (2002). Regulation of diapause. *Annual Review of Entomology* 47, 93-122.

DuBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., SMITH, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.*, 350-356.

HILL, R.W., WYSE, G.A., ANDERSON, M. (2008). *Animal Physiology* (2nd edition), Massachusetts, USA, 111.

- HOLMSTRUP, M., WESTH, P.** (1994). Dehydration of earthworm cocoons exposed to cold: a novel cold hardiness mechanism. *J. Comp. Physiol. B* 164, 312-315.
- HOSLER, J.S., BURNS, J.E., ESCH, H.E.** (2000). Flight muscle rating potential and species-specific differences in chill-coma. *J Insect Physiol.* 46: 621 – 627.
- KOŠŤÁL, V., BERKOVÁ, P., ŠIMEK, P.** (2003). Remodelling of membrane phospholipids during transition to diapause and cold-acclimation in the larvae of *Chymomyza costata* (Drosophilidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 135B, 407 – 419.
- KOŠŤÁL, V.** (2004). Fyziologické mechanismy přežití hmyzu za nízkých teplot. Habilitační práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
- KOŠŤÁL, V.** (2006). Ecophysiological phases of insect diapause. *Journal of Insect Physiology* 52, 113 –127.
- LEE, R.E., CHEN, C.P., DENLINGER, D.L.** (1987). A rapid cold-hardening process in insects. *Science* 238, 1415 – 1471.
- LEE, R.E. Jr., DENLINGER, D.L.** (1991). *Insects at Low Temperature*. New York and London, Chapman and Hall, 513.
- MACMILLAN, H.A., GUGLIELMO, C.G., SINCLAIR, B.J.** (2009). Membrane remodeling and glucose in *Drosophila melanogaster*: A test of rapid cold-hardening and chilling tolerance hypotheses. *Journal of Insect Physiology* 55, 243-249.
- MILLER, L.K., SMITH, J.S.** (1975). Production of threitol and sorbitol by an adult insect: association with freezing tolerance. *Nature* 258, 519-520.
- MOON, I., FUJIKAWA, S., SHIMADA, K.** (1996). Cryopreservation of *Chymomyza* Larvae (Diptera: Drosophilidae) at -196°C with Extracellular Freezing. *Cryo-Letters* 17, 105-110).
- NEDVĚD, O., LAVY, D., VERHOEF, H.A.** (1998). Modelling the time-temperature relationship in cold injury and effect of high-temperature interruptions on survival in a chill-sensitive collembolan. *Functional Ecology* 12, 816-824.

- OVERGAARD, J., TOMČALA, A., SØRENSEN, J.G., HOLMSTRUP, M., KROGH, P.H., ŠIMEK, P., KOŠTÁL, V.** (2008). Effects of acclimation temperature on thermal tolerance and membrane phospholipid composition in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology* 54, 619-629.
- PEGG, D.E.** (2001). The current status of tissue cryopreservation. *Cryo-Letters* 22, 105 – 114.
- PRIVALOV, P.E.** (1990). Cold denaturation of proteins. *CRC Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 25, 281-305.
- RAJAMOHAN, A., SINCLAIR, J.** (2008). Short-term hardening effects on survival of acute and chronic cold exposure by *Drosophila melanogaster* larvae. *Journal of Insect Physiology*, 54, 708-718.
- RAKO, L., HOFFMAN, A.** (2006). Complexity of the cold acclimation response in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology* 52, 94-104.
- ROBERTS, D.B.** (1985). Basic *Drosophila* care and techniques. In *Drosophila, A Practical Approach*, pp. 1-38, IRL Press, Oxford.
- SALT, R.W.** (1961). Principles of insect cold-hardiness. *Annual Review of Entomology* 6, 55-74.
- SAUNDERS, D.S.** (1982). *Insect Clocks*, 2nd ed. Pergamon Press, Oxford.
- SHIMADA, K., RIIHIMAA, A.** (1990). Cold-induced Freezing Tolerance in Diapausing and Non-Diapausing Larvae of *Cymomyza costata* (Diptera: Drosophilidae) with Accumulation of Trehalose and Proline. *Cryo-Letters* 11, 243-250.
- SØMME, L.** (1982). Supercooling and winter survival in terrestrial arthropods. *Comp. Biochem. Physiol.* 73, 519 – 543.
- STOREY, K.B., STOREY, J.M.** (1988). Freeze tolerance in animals. *Physiological Reviews* 68, 27-83.
- STOREY, K.B., STOREY, J.M.** (1991). Biochemistry of cryoprotectants. In: **LEE, R.E.Jr., DENLINGER, D.L.** (Eds.), *Insect at Low Temperature*. Chapman and Hall, New York and London, 64 – 93.

STOSCHECK, M. (1990). Quantitation of Proteins. *Methods in Enzymology*, Academic Press, Inc., 50 – 63.

TAUBER, M.J., TAUBER C.A., MASAKI, S. (1986). *Seasonal Adaptations of Insects*. Oxford University Press. New York.

ZACHARIASSEN, K.E. (1985). Physiology of cold tolerance in insect. *Physiol. Rev.* 65, 799-832.

ZÖLLNER, N., KIRSCH, K. (1962). Über die quantitative Bestimmung von Lipoiden (Mikromethode) mittels der vielen natürlichen Lipoiden (allen bekannten Plasmalipoiden) gemeinsamen Sulphosphovanillin-Reaktion. *Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin*, 135, 545 – 561.