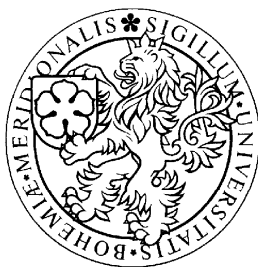


Přírodovědecká fakulta
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích



Bakalářská diplomová práce

**Sledování rozdílů mezi autogeními
a anautogeními populacemi komára *Culex pipiens quinquefasciatus* Say**

Rozsypalová Petra

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Ivan Gelbič, CSc.

České Budějovice 2010

Bakalářská diplomová práce:

Rozsypalová, P., 2010: Sledování rozdílů mezi autogeními a anautogeními populacemi komára *Culex pipiens quinquefasciatus* Say [Differences of autogeny and anautogeny population of mosquitoes *Culex pipiens quinquefasciatus* Say, Bc. Thesis in Czech- 37 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Cíle práce:

Cílem této práce bylo přispět k objasnění rozdílů mezi autogeními a anautogeními samicemi jednoho a téhož druhu. [The aim of my Thesis was to contribute to illustration on differences between autogeny and anautogeny female of the same kind of mosquitoes.]

Tato práce je součástí projektu GA ČR – 22/08/1407 a MŠMT – 2 B08003.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím v ní citované 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.

.....

V Českých Budějovicích dne 28.4.2010

Anotace:

Cílem předložené práce bylo přispět k objasnění rozdílů ve vývoji pohlavních orgánů u samic autogenních a anautogenních populací komára *Culex pipiens quinquefasciatus* Say. Současně se testoval účinek agonisty ekdysonu na vývoj a plodnost tohoto druhu. Získané výsledky ukázaly, že u anautogenní populace je průběh vitellogenese závislý na sání krve. U autogenních populací během prvního gonotrofického cyklu není nezbytné přijímat krev. Testovaná látka v subletálních dávkách indukovala vitellogenezi s následným vykladem autogenní snůšky. Aplikace vyšších dávek naopak vykazovala účinky sterilizační. Získané výsledky signalizují vhodnost využití této látky k regulaci přemnožených komářích populací, zejména v oblastech výskytu jimi přenosných chorob.

Anotation:

The aim of submitted Thesis was to contribute to illustration on differences in development of female genital organs in autogeny and anautogeny population of mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus* Say. Currently, a consequence of ekdyson agonists was tested for change evoked in the development and fertility this species. Gained results showed that in anautogeny population is process of vitellogenesis depended on blood-feeding. In autogeny population, there is no need to blood-fed during the first gonotrophic cycle. Tested compound indicated vitellogenesis in a sublethal doses then egg-laying was followed. In comparison with that, application of higher doses showed sterilisation effect. Gained results show this compound useful for regulation of mosquitoes population, especially in the area of disease transmitted by them.

Poděkování:

Ráda bych touto cestou poděkovala mému školiteli Doc. RNDr. Ivanu Gelbičovi CSc. za jeho odborné vedení a za poskytnutí veškerého studijního materiálu a pomůcek. Dále bych chtěla poděkovat paní Barboře Kozelkové, a to především za cenné praktické rady během celé práce na Entomologickém Ústavu AV ČR v Českých Budějovicích. Děkuji také za plnou podporu své rodiny, díky níž mohla tato práce vzniknout.

Obsah:

| | |
|--|-----------|
| 1. Úvod..... | 6 |
| 2. Literální přehled..... | 7 |
| 2.1. Autogenie a anautogenie..... | 7 |
| 2.2. Tebufenozide RH- 5992..... | 10 |
| 2.3. Struktura ovárií u komárů..... | 12 |
| 2.4. Vývoj a zrání hmyzích oocytů, proces vitellogeneze..... | 14 |
| 3. Materiál a metodika..... | 18 |
| 3.1. Pokusný materiál..... | 18 |
| 3.2. Testovaná látka..... | 19 |
| 3.3. Metodika pokusů..... | 19 |
| 3.4. Histologické studie..... | 20 |
| 4. Výsledky..... | 22 |
| 4.1. Průběh prvního gonadotropního cyklu..... | 22 |
| 4.2. Morfologie vaječnicků..... | 23 |
| 4.3. Histologie..... | 24 |
| 4.4. Vliv testované látky na vývoj komára..... | 24 |
| 5. Diskuse..... | 26 |
| 6. Shrnutí..... | 29 |
| 7. Seznam citované literatury..... | 30 |
| 8. Příloha..... | 34 |

1. Úvod.

Hmyzí říše je nejrozmanitější říší na světě. Tito drobní živočichové jsou součástí našich každodenních životů. Jejich přičiněním vznikají jak člověkem využitelné produkty (včelí med, hedvábí aj.), tak i krásná architektonická díla (termiště). Díky pracovitosti opylovačů se každoročně můžeme radovat z podzimní úrody ovoce. Hmyz je samozřejmě jako všechny organismy začleněn do potravního řetězce, kde tvoří neopomenutelnou část potravy, zejména pro ptactvo.

Přesto se činností některých z nich stala tato říše poněkud nepopulární. Těžko lze zapomenout na pohromy způsobené hejny sarančat stěhovavých, které při svých migracích po africkém kontinentu devastují už tak bídnou úrodu. Neustále diskutovaný problém se šumavským kůrovcem přeci jen hmyzu na popularitě nepřidá.

Rozhodně bychom neměli zapomenout ani na nemoci, které při své migraci rozšiřují (morblecha) a to zejména na ty nemoci, které rozšiřují při sání krve. Komáři jsou zodpovědní za přenos mnoha zdravotně významných patogenů a parazitů jako jsou viry, bakterie, protozoa a nematodi. Patogenní organismy přenášené komáry způsobují vážné choroby jako jsou malárie, horečka dengue, Žlutá horečka, encefalitida nebo filariosa. Z tohoto hlediska se komáři řadí mezi druhy mající značný vliv na zdraví člověka, domácích zvířat a v souvislosti s tímto i na ekonomiku státu.

Komár jako jeden z mnoha představitelů krev sajícího hmyzu potřebuje ke svému vývoji přijímat krev. U komárů, narozdíl od mouchy tse-tse, sají krev pouze samičky.

Krev a speciálně proteiny v krvi jsou esenciální pro produkci vajíček anautogeními samičkami. Pouze několik druhů komárů je schopno produkovat první snůšku vajíček bez příjmu krve, tvoří tzv. autogení snůšku. Většina samic však saje krev během ovariálního cyklu a tvoří tzv. anautogení snůšky. Autogenie byla také popsána u komára *Culex pipiens quinquefasciatus* původem z Hyderabadu, Indie.

Cílem mé práce bylo přispět k objasnění rozdílů mezi autogení a anautogení snůškou a zjistit, jestli existuje možnost ovlivnit hematofágní chování hmyzu analogy hmyzích hormonů.

2. Literální přehled.

2.1. Autogenie a anautogenie.

Ústní ústrojí komárů se během fylogeneze vyvinulo v bodavě sací ústrojí, které u sameček slouží pouze k příjmu rostlinných šťáv (zdroj uhlovodíků) a u samic navíc slouží i k získání krve. K sání krve mají samičky také přizpůsobeny cibariální a pharyngeální pumpu, které pumpují krev do střeva. Samičky jsou schopné přijmout více než trojnásobek svojí váhy (Clements, 1992).

U většiny komárů může být vývoj vajíčka dokončen pouze v případě, že dojde k nasátí krve anautogeními samičkami. Z tohoto důvodu jsou samičky přizpůsobeny i k tomu, aby našly potenciálního hostitele. K tomu jim slouží čichové, vizuální a teplotní stimuly. Receptory na samičích anténách dokáží reagovat na změnu koncentrace CO₂, obsah kyseliny mléčné, acetonu, octenolu a fenolických sloučenin vylučovaných potenciálním hostitelem (Becker, 2003).

Autogenie byla původně definována jako schopnost komářích samic vyvinout snůšku vajíček bez příjmu krve. V 80-tých letech byla autogenie potvrzena u více jak 60-ti druhů komárů a nejedná se tedy o natolik ojedinělý jev. Dříve se věřilo, že autogení samičky nesají krev, dokud nedojde k první ovipozici a to i v přítomnosti hostitele. Tato myšlenka ale byla vyvrácena a bylo prokázáno, že samičky sají krev pokud jsou v kontaktu s hostitelem a to téměř ve všech případech nehledě na to, jestli jsou autogení nebo anautogení (Trpis, 1978).

Existují dva typy autogenie: obligatorní a fakultativní. Obligatorní autogenie byla pozorována u samic, které nesály krev během prvního ovarialního cyklu, dokonce i když byl hostitel k dispozici. Fakultativní autogenie nastává pokud geneticky determinované autogení samičky během prvního ovarialního cyklu ochotně sají krev i přes to, že mohou vyvinout jednu snůšku vajíček aniž by došlo k příjmu krve. Autogenie byla poprvé popsána u skupiny *Culex pipiens*, která žila v Palearktickém regionu (Clements, 1992).

Tyto autogení formy *Cx. pipiens* byly stenogamní (na páření vyžadovaly malé prostory), žily v prostorách s omezeným přístupem pod rovinou země (septiky a zaplavené sklepy), po prvním ovarialním cyklu ochotně sály lidskou krev a nebyly schopné navodit diapauzu během chladných zimních měsíců. Anautogení *Cx. pipiens* žili ve znečištěných vodách nad zemí, byli eurygamní orthophilní a měli schopnost diapauzy během chladných zimních měsíců. Populace

Culex pipiens, u které se často vyskytuje autogenie, byla často klasifikována jako forma *Cx. p. molestus* Forskal. Někdy také byla považována za fyziologickou variantu *Cx. pipiens* Linné. Autogenie se mnohem častěji vyskytuje u populací objevujících se ve vyšších zeměpisných šířkách (Clements, 1992).

U naprosté většiny autogeních druhů samice dokončí jeden ovariaální cyklus autogením způsobem a poté sají krev a zahájí další vývoj jako anautogení (Olejníček, 1995; Clements, 1992). Jen dva druhy rodu *Aedes* nikdy nesají krev a produkují všechny jejich snůšky autogeně. Jde o *Ae. churchillensis*, který ztratil schopnost letu, a arktický druh *Ae. rempeli* (Clements, 1992).

Zkušenosti s populacemi *Cx. pipiens* v Evropě naznačují, že *Cx. molestus* je vždy autogení, zatímco *Cx. pipiens* je téměř vždy anautogení (Olejníček, 1995). V roce 2000 byla Olejníčkem a Gelbičem prokázána autogenie i u druhu *Culex pipiens quinquefasciatus* získaného z Indie. Tento druh komára je chován jako autogení v laboratoři více jak 15 let bez možnosti sát krev. Spárené i nespárené autogení samičky byly schopné dokončit vitellogenezi vajíček, ačkoliv nespárené samičky tyto vajíčka nedokázaly naklást (Olejníček and Gelbič, 2000).

Mezi autogeními a anautogeními populacemi jsou poměrně zřetelné rozdíly v jejich velikosti, v množství vajíček ve snůšce, v délce larválního vývoje i ve složení a způsobu získávání živin pro vitellogenezi.

Ovariaální folikuly samiček většiny autogeních druhů jsou při líhnutí v prvním vývojovém stádiu a během prvního dne stáří samic se začnou vyvíjet. Oocyty autogení samičky *Ae. taeniorhynchus* dozrávají během následujících 5 dnů po vylíhnutí (Clements, 1992). U některých autogeních druhů komárů dochází k předčasnému vývoji. U severní populace *Wyeomyia smithii* začíná vitellogeneze ve stádiu kukly a při líhnutí jsou už jejich primární folikuly ve třetím stádiu (O'Meara, 1981). Některé druhy mohou dokončit více jak jeden autogení ovariaální cyklus (Clements, 1992).

Autogení samičky jsou větší než anautogení a také produkují více vajíček (Sota and Mogi, 1994). Snůška anautogení samice *Cx. pipiens* obvykle obsahuje 150-200 vajíček (při sání krve na ptácích), zatímco autogení samice *Cx. pipiens* mají průměrnou snůšku okolo 80-120 vajíček (Christophers, 1945). U *Ae. aegypti* kladou autogení samičky snůšku čítající pouhých 17-30 vajíček, zatímco u anautogení snůšky se počty vajíček pohybují okolo 70-120 (Trpis, 1977).

Srovnání autogeních a anautogeních populací stejných druhů chovaných za standardních podmínek odhalilo delší larvální vývoj u geneticky determinovaných autogeních jedinců. Nově vylíhnuté autogení samice měly vyšší váhu, širší tukové těleso a vyšší celkové množství lipidů, glykogenu, proteinů, ale nižší procentuální složení dusíku než anautogení samičky (Clements, 1992).

Expres autogenie nezávisí pouze na genetických faktorech ale i faktorech prostředí. Laboratorní experimenty ukazují, že velikost dospělců a exprese autogenie *Ae. togoi* z Karatsu (na jižním pobřeží Japonska) se lišila v závislosti na teplotě, fotoperiodě a na nutriční hodnotě stravy. Poměr autogeních samiček se zvyšoval za nižších teplot a kratších dní. Tyto laboratorní výsledky byly ve shodě s trendem v přírodě, kdy je autogenie nejvyšší na jaře a na podzim. Množství autogeních vajíček je pozitivně ovlivněno velikostí těla. Při vysokých teplotách a při nízkých nutritivních hodnotách stravy se velikost těla snižuje (Sota and Mogi, 1994).

U autogeních komárů se získávání proteinů pro vitellogenezi přesouvá do larválního stádia. V této době je proto nutná poměrně vysoká nutritivní hodnota stravy. Autogení jedinci chovaní při vysoce výživné larvální stravě produkovali ve snůšce průměrně 102 vajíček. Jedinci s chudší stravou nakladly pouhých 66 vajíček (Service, 1985).

Zásoby lipidů se liší v rámci jednotlivých druhů komárů. *Ae. cantans* vyžaduje určité období mezi vylíhnutím a sáním krve k získání zásob lipidů, které jsou ale přesto nedostačující k umožnění ovipozice. Oproti tomu *Ae. punctor* zahajuje sání krve a ovipozici při nižší hladině lipidických rezerv než *Ae. cantans* a samičky jsou schopné akumulovat požadované množství lipidů už 24-48 hodin po vylíhnutí (Renshaw et al., 1995).

Jedním z možných zdrojů proteinů je larvální svalstvo, které je histolyzováno dva dny po vylíhnutí (Clements, 1992). Oocyty rodu *Aedes* dozrávaly na dietě 10% roztoku cukru ve 47% případů autogením způsobem (Service, 1985). Omezení stravy v larválním stádiu mělo velice negativní vliv na velikost dospělců a produkci autogeních vajíček (Sota a Mogi, 1994).

Anautogení komáři potřebují krev především k produkci zralých vajíček. Autogenie nebo anautogenie je důležitou částí životní strategie hmyzu. Přestože je zvířecí krev bohatým zdrojem živin, její vyhledávání stojí vektora poměrně dost energie. V důsledku toho dochází často k úmrtím během vyhledávání zdroje krve i během vlastního sání. Krevsající hmyz také může hynout v důsledku obranných reakcí hostitele. V přírodě je autogenie podporována při

dobrych výživových podmínkách larválního habitatu a nízkému osídlení hostitelem. Autogenie je výhodou nad anautogenií, jelikož autogení produkce vajíček má kratší preoviposiční období a k vývoji není třeba hostitele. Nicméně autogenie během larvální periody vyžaduje vysoký energický příjem. Tato larvální perioda trvá déle než u anautogeních jedinců a díky tomu často vede i k vyšší mortalitě způsobené larválními predátory a občasným vysušením stanovišť, především v letním období (Sota a Mogi, 1994).

2.2. Tebufenozid RH- 5992.

Hmyzí intergument je na povrchu kryt kutikulou. Tato tvrdá vrstva chrání tělo hmyzu proti mechanickému poškození i před škodlivými vlivy vnějšího prostředí. Je však natolik tvrdá, že nemůže růst společně s tělem hmyzu, proto se hmyz periodicky svléká. Klíčovou roli při ekdysy a při zrání folikulů hraje zejména lipofilní steroid 20-hydroxyekdyson (vzniká v prothorakálních žlázách), jehož vylučování je řízeno v mozku pomocí prothoracikotropního hormonu PTTH. Zásadní vliv na metamorfózu hmyzu má lipofilní sesquiterpenoid juvenilní hormon (vzniká v corpora allata). V dospělosti jsou oba tyto hormony zapojeny do regulace pohlavní dospělosti (Dhadialla et al., 1998). Vzájemný poměr JH a 20E během životního cyklu kolísá.

Proces svlékání je rozdělen do třech fází. První fáze je význačná začátkem cyklu svlékání a začátkem sekrece ekdysteroidů. Další fázi charakterizuje ukončení ekdysteroidálního píku a rozšíření ekdyse staré pokožky. Následná mezisvlékačí fáze začíná od nově svlečené larvy a končí bezprostředně před zvýšením ekdysteroidního píku. Během období mezi jednotlivými svlékáními chybí 20-hydroxyekdyson. Geny, které byly tímto hormonem (20E) represovány, jsou nyní expresovány (Retnakaran, 2001, Deitsch et al., 1994).

Ekdysteroidy mají také zásadní vliv na zrání folikulů a tím na produkci vajíček následující generace. Hladina ekdysteroidů kolísá během celého cyklu vitellogeneze. Průměrná hladina ekdysteroidů od vylíhnutí do 20h se pohybovala mezi 150-200 pg na samičku. Prudké zvýšení této hladiny bylo pozorováno při 24h po vylíhnutí a pokračovalo až do 28h (s maximem pozorovaným při 32h po vylíhnutí). Hladina ekdysteroidů při 48h po vylíhnutí prudce klesla až na bazální hladinu a nezměnila se nijak zvlášť až do stáří 72h. Pík pozorovaný při 32h byl velice častý a analýza ukazovala, že průměrná hodnota byla při 28 a 32h významně vyšší než při vylíhnutí a 72h poté. (Fuchs, 1981).

Neustále se hledají látky, které by omezily populaci komárů a zároveň by byly co nejvíce šetrné k životnímu prostředí. Jednou z nich by mohla být i RH- 5992 (tebufenozid). Tebufenozid RH-5992 je nesteroidní agonista hmyzího svlékacího hormonu, 20-hydroxyekdysonu (20E). RH-5992 hraje podobnou roli jako endogenní ekdyteroid 20E, a to při iniciování svlékacího procesu (Dhadialla et al., 1998). Tebufenozid je výborným insekticidem nejen díky jeho vysoké účinnosti, dlouhé životnosti, ale také pro jeho levnější výrobu a levnější aplikaci. V určité koncentraci působí toxicky a přímo zabíjí hmyz. U Lepidopter zahajuje předčasné svlékání larev, které však není dokončeno (Swevers and Iatrou, 1999).

Před aplikací této látky je důležité ji předem testovat, abychom zjistili jaká je její optimální dávka pro jednotlivé druhy škůdců, jestli má hmyz na látku resistenci a také testovat jeho cross- resistenční účinky. Laboratorní selekce ukazovaly, že některé druhy hmyzu mají poměrně vysokou resistenci vůči tebufenozidu (*Spodoptera exigua* a *Planotortrix octo*). Byla také nalezena cross-resistence mezi tebufenozidem a jinými insecticidy a to u rodu *S. exigua* a *P. octo* mezi tebufenozidem a methoxyfenozidem a azinphos-methylem. Existují populace několika škůdců (jako je *S. exigua.*, *Spodoptera littoralis*, *Choristoneura rosaceana* a *C. pomonella*), které byly resistantní k běžným insekticidům, ale vykazovaly toleranci k látce RH-5992, pokud s ní už dříve nebyly v kontaktu. U *Plutella* byla stanovena LD50 na 18,39 (16.72–20.22) mg/l (Cao and Han, 2006).

Výzkum relativní afinity ekdyteroidů a jejich nesteroidních agonistů (včetně RH-5992) ukazuje, že RH-5992 se váže na ekdyteroidní receptorový komplex s významně vyšší afinitou u Lepidopter než u Dipter (Dhadialla et al., 1998) a proto obsazuje vazebné místo na komplexu receptorů ekdysonu (Swevers and Iatrou, 1999). Buňky *D. melanogaster* (Diptera) mají mechanismy, jimiž aktivně vytěsňují RH-5992 ze svých buněk (Sundaram, 1998).

Bylo zjištěno, že aplikace RH-5992 do vývojově zastaveného abdomenu *Bombix mori* způsobuje změny v normální expresi genů (ovlivněných v první části ekdyteroidy kontrolované kaskády) a tím je zodpovědný za přerušení vývoje. Injekce RH-5992 do vývojově zastaveného abdomenu indukuje také vývoj vitellogeninu, ale neindikuje vývoj chorionu ve vaječnicích *Bombix mori*. Folikuly zastavené působením tebufenozidu in vivo nejsou schopné iniciovat choriogenezi in vitro. RH-5992 způsobuje apolýzu staré kutikuly u larvální epidermis a syntézu nové endokutikulární lamely a ekdysi staré larvální kutikuly (Swevers and Iatrou, 1999).

Je také známé, že RH 5992 je zodpovědný za aktivaci receptorů ekdysonu již při mnohem nižší koncentraci než je nutná koncentrace přirozeně se objevujících hormonů (Sundaram et al., 1998). Přestože Swevers a Iatrou (1999) demonstrovali, že RH-5992 indukuje expresi ESP (hlavního žlutkového proteinu, produkovaného folikulárními buňkami), nebyl doposud zkoumán jeho možný vliv na expresi syntézy vitellogeninů samiččím tukovým tělesem. Zatímco tebufenozide je specifický pro Lepidoptera, jeho analog RH-5849 je účinný na Diptera (Retnakaran, 2001; Smaghe, 1994).

RH-látky by také mohly být užitečné při studiu funkce ekdysonu. Dále by mohly být využity k mapování steroidů nebo jako ligandy při purifikaci steroidů. Tyto látky by mohly pomoci k lokalizaci receptorů *in vivo* a také ke klasifikaci receptorů v tkáních nebo celých organismech u bezobratlých (Wing, 1988; Wing et al., 1988).

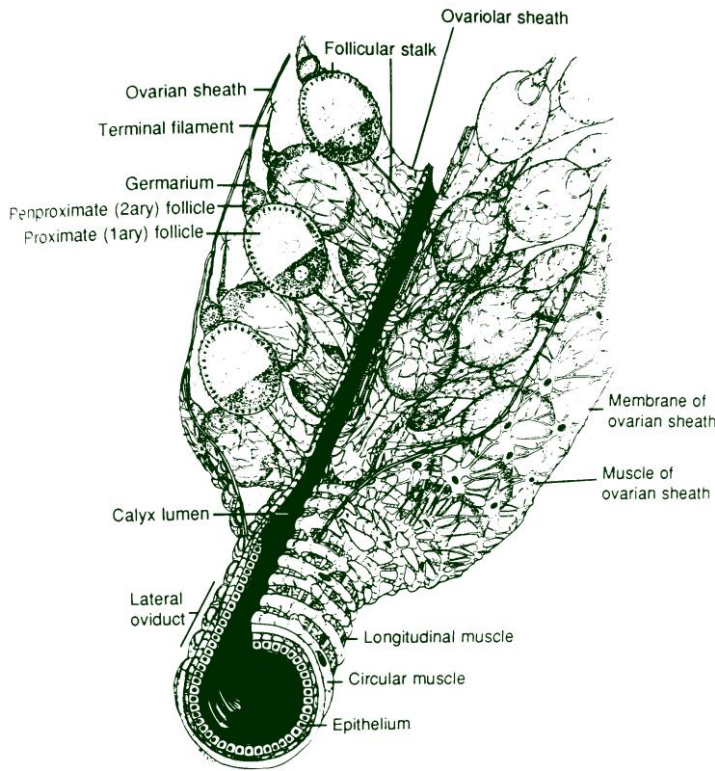
2.3. Struktura ovárií u komárů.

Struktura ovária a ovarioly.

Dorsolaterálně u posteriorní oblasti abdomenu je situován pár ovárií. Ovária jsou spojena dvěma laterálními ovidukty vedoucími do vejcovodu. Do každého ovaria vstupují dvě trachee, které se hojně větví až na tracheoly (Clements, 1992).

Každé ovárium se skládá z několika funkčních jednotek, ovariol. V přední části každé ovarioly se nachází germarium, kde dochází k mitotickému dělení zárodečných (germálních) buněk. Zbylá část ovarioly, vitellarium, obsahuje jeden nebo dva folikuly. Komáří ovarioly jsou klasifikovány jako meroistické, protože obsahují vyživovací (sesterské) buňky i oocyty. Dále jsou řazeny mezi polytrofní ovarioly a to z toho důvodu, že skupina vyživovacích buněk je ve folikulu uzavřena společně s oocytem. Nejvyvinutější folikuly se nazývají primární folikuly, mladším folikulům se říká folikuly preprimární. Po každém ovarialním cyklu se z preprimárních folikulů vytvoří nová sada primárních folikulů. Tyto folikuly můžete najít v některé literatuře pod heslem primární a sekundární folikuly (Clements, 1992).

Ovariolu obaluje tenká membrána, kterou z vnějšku obklopuje svalová vrstva. Tato membrána je rozprostřena od germánia až k terminálnímu filamentu. Množství ovariol se pohybuje mezi 50 až 500 a je často ovlivněno velikostí samotných samic (Clements, 1992).



Obr.1: Část ovária a laterálního oviduktu nulliparní samice *Anopheles melas* (převzato od Giglioli, 1964).

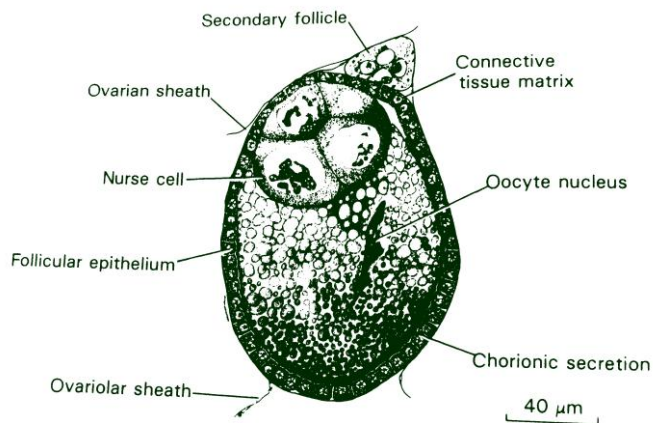
Penproximate-preprimární, sekundární folikul.

Proximate- primární folikul.

Struktura ováriálních folikulů.

Každý folikul je složený z jednoho oocytu, několika nutritivních buněk a vnějšího epitelia. Nutritivní buňky syntetizují mateřské ribosomy a maternální mRNA. Krychlovité epiteliální buňky obsahují velká jádra a řídkou cytoplazmu, která je sice bohatá na ribosomy ale vyskytuje se v ní relativně málo RER a GA. Sousední buňky jsou mezi sebou propojeny v průměru asi 20nm desmosomy. Buňky epitelu jsou navzájem propojeny pomocí mezibuněčných můstků. Můstky mají tvar barelu, jsou 0,25- 0,5 μm dlouhé a vyčnívají do obou mezi sebou propojených buněk (Anderson and Spielman, 1971). Počet těchto můstků vzrůstá během prvního dne po příjmu krve. Folikulární epitelium obsahuje shluky více jak 30 navzájem propojených buněk (Clements, 1992).

Nutritivní buňky *Ae. aegypti* jsou velké v průměru asi 27 μm a jejich samotná jádra mají šířku o velikosti třech epiteliálních buněk. Cytoplazma nutritivních buněk je velmi bohatá na mitochondrie, ribozomy a místy se vyskytují i tukové kapénky a základy RER. Oocyt a několik vyživovacích buněk (u rodu *Aedes* 7) tvoří syncytium. Oocyt je přímo napojen mezibuněčnými můstky na tři nutritivní buňky (Fiil, 1978). U *Ae. aegypti* je bazální lamina folikulu tvořena pravidelně orientovanými proteinovými částicemi. Každá proteinová partikule je spojena se čtyřmi dalšími a celá struktura tvoří póry, které zpevňují tkáň. Jejich největší rozměr dosahuje asi 20 nm (Clements, 1992).



Obr.2: Podélný řez ovariálním folikulem komára *Anopheles atroparvus* během vitellogeneze (převzato od Nicholson, 1921).

Nurse cell- nutritivní buňka (sesterská, vyživovací).

2.4. Vývoj a zrání hmyzích oocytů, proces vitellogeneze.

Zrání hmyzích oocytů.

Během gonotropního cyklu dochází k výrazným změnám folikulů nejvíce vzdálených od germánie. Ooplama se zahustí nahromaděným žloutkem (vitellogeneze) a ribosomy, také dochází k ukládání chorionu. Těmito všemi procesy roste oocyt do velikosti (Clements, 1992). Špička ovarioly, germarium, obsahuje primární germinální buňky (oogonia), ze kterých se diferencují vyvíjející se vajíčka (oocyty), vyživovací buňky (trofocyty a sesterské buňky) a folikulární epiteliální buňky (Clements, 1992; Fuchs, 1981). Oocyty postupně rostou od oogonia směrem dolů po ovariole. Oocyty nabývají na velikosti díky akumulaci žloutku, složeného z lipidů, proteinů, glykogenu a dalších složek. Folikulární epiteliium sekretuje chorion a vitelinní membránu a poté degeneruje stejně tak, jak to dělají nutritivní buňky.

Pod oocyty na konci ovariol je úzká spojovací část epiteliálních buněk (pedicel), která těsně uzavírá vývod vedoucí z ovariole do oviduktu. Když je oocyt plně vyvinutý, tento spoj se naruší a oocyt je uvolněn do oviduktu. Část ovariole, která obsahovala vyvinuté vajíčko se smrskne a vytvoří se nový spoj pod dalším oocytem. Vajíčko je v době uvolňování do oviduktu obklopeno chorionem. Chorion je perforovaný v jednom nebo více místech drobounkými póry nebo mikropyly.

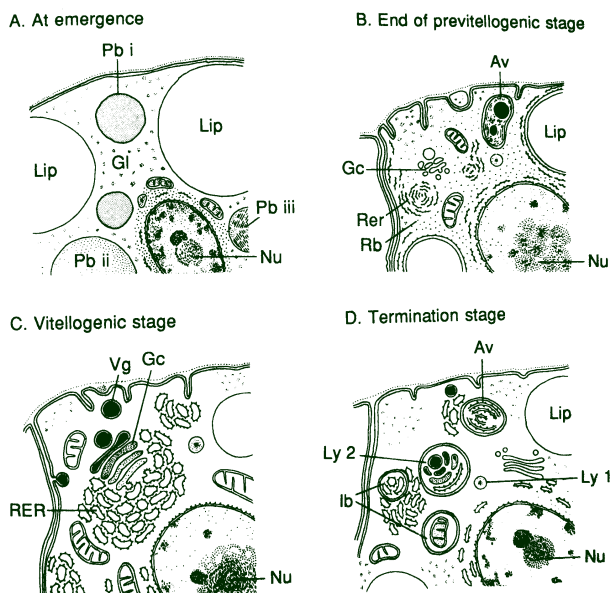
Spermatozoa získá přístup k vnitřní části vajíčka, pokud se tyto drobounké póry otevrou. K oplození dojde během sestupování oocytů oviduktem do vaginy (pomocí peristaltických pohybů), ze spermateky se vynoří spermatozoa a vnikne přes mikropyle do vajíčka. Prvním

redukčním dělením vzniká samičí prvojádro s polárním tělískem. Spermatozoa ztratí ocásek a změní se v samčí prvojádro. Obě prvojádra splynou a vzniká zygota (Ross, 1982).

Vitellogeneze.

Vitellogeneze je proces, kdy se do oocytů dostávají energetické a výživující zásoby ve formě vitellinu (žloutku). Zahrnuje produkci samičích fosfolipoglykoproteinů o molekulové hmotnosti několik set kDa (vitellogeninů) a jejich transport do oocytů (Kodrík, 2004). Vitellogeneze je zahájena již v terminální části ovariooly, ale její hlavní část probíhá ve vitelláriu. Na konci vitellogeneze vzniká zralý oocyt. Vitellogenezi můžeme rozdělit do previtellogení, vitellogení a postvitellogení fáze. Jejich průběh je popsán a znázorněn níže.

Vitellogeniny jsou syntetizovány v trofocytech v tukovém tělese a u vyšších dvoukřídlých přímo v ováriích. Trofocyty prodělávají během tohoto období řadu změn, jelikož se z buněk sloužících k ukládání zásobních tuků a glykogenu stávají buňky s obrovskou produkcí proteinů viz. obrázek 3. Během previtellogení fáze mají malé jádro a obsahují velké tukové inkluze a glykogen. Při přechodu do vitellogení fáze se zvyšuje množství složek biosyntetického aparátu jako je endoplasmatické retikulum, Golgiho aparát a mitochondrie. Dojde také ke zvětšení jádra. V postvitellogení fázi dojde k omezení organel biosyntetického aparátu a trofocyty obsahují hlavně velké množství lysosomů. (Kodrík, 2004; Clements, 1992).



Obr.3: Ultrastrukturální změny komářích trofocytů během ovariálního cyklu. (Převzato z Raikhel and Lea, 1983).

Av- autofágní vakuoly, Gc-Golgiho complex, Gl- glykogen, Ib- odloučené tělísko, Lip- lipidické inkluze, Ly 1- primární lysosom, Ly 2 – sekundární lysosom, Nu – jáderko, Pb- proteinové granule, Rb- ribosomy, RER- hrubé endoplasmatické retikulum, Vg- vitellogeninové granule.

Previtellogenní fáze se odehrává u anautogenních samiček před příjmem krve. Primární folikuly jsou téměř kulovité a mají v průměru 50 μ m. Jakmile folikuly dosáhnou shromažďování zásobních látek délky mezi 90-100 μ m, vstoupí primární folikuly

anautogéních samiček do previtellogenního klidového stádia (Fuchs, 1981; Clements, 1992). Do příjmu krve se folikuly u anautogéních samiček dále nevyvíjejí. U *Ae. aegypti* mají epitelární buňky klidového stádia folikulů krychlovitý tvar a velké jádro s malým množstvím cytoplazmy. Jádro obsahuje nápadná polymorfní jádérka. Cytoplasma je řídká a obsahuje poměrně hodně ribosomů a lipidických kapének, ale relativně málo RER a GA. Folikulární buňky jsou na sebe s oocytem těsně nasedlé (Roth a Porter, 1964; Raikhel a Lea, 1982; Clements, 1992).

Tukové inkluze vyskytující se u *Cx. p. quinquefasciatus* obsahují velké množství fosfolipidu (Nath et al., 1958). Bylo objeveno, že hlavními lipidy previtellogenní fáze u *Ae. aegypti* jsou mastné kyseliny (Troy et al., 1975). Během prvních 12h po vylíhnutí *Ae. aegypti* se na povrchu oocyta vytvoří hladká plasmatická membrána folikulárních buněk, která má málo glykokalixu, a kortikální oblasti ooplazmy obsahují hodně ribosomů. 24 h po vylíhnutí už jsou na povrchu membrány vytvořeny mikrovilli a několik vesikulů uvnitř kortikální cytoplazmy. 48 h po vylíhnutí mají oocyty plně vyvinuté mikrovilli a endocytotický komplex. Povrch plasmatické membrány oocyta je pokryt hustší vrstvou glykokalixu prostoupenou mikrovilli. Roth et al. (1976) zjistil, že oocyty při previtellogení fázi jsou schopné navázat vitellogenin in vitro (Clements, 1992).

Vitellogenní fáze je zahájena naplněním střeva krví, což je velice důležitý děj pro zahájení ovariálního vývoje a uvolnění faktorů stimulujících syntézu ovariálních proteinů (egg developmental neurosecretory hormon- EDNH) a faktorů zvyšujících kapacitu pro příjem vitellogeninu (Koller and Raikhel, 1991). EDNH vzniká v mediálních neurosekretorických buňkách a je uskladněn v corpus cardiacum. EDNH dokáže stimulovat folikulární buňky k produkci ekdysonu. Ke stimulaci dojde pouze v případě, že folikuly byly dříve ošetřeny juvenilním hormonem (Fuchs, 1981). Folikuly vyprodukovaný ekdyson je podle všeho transportován do tukového tělesa, kde je hydrolyzován enzymem, ekdyson-20-monooxygenáza na 20E. 20E aktivuje tukové těleso k syntéze vitellogeninu, který je pak transportován do ovárií (Fuchs, 1981).

Nejvyšší akumulace vitellogeninů dohraje *Ae. aegypti* asi 40h po příjmu krve. Ooplazma zralých komářích oocytů je naplněna krystalky vitellinu, kapkami lipidického žloutku a množstvím volných ribosomů. Oocyty obsahují taky tzv. ovariálně specifické proteiny pocházející zřejmě z endocytozy, ovaria jsou však schopné syntetizovat tyto proteiny in vitro, kdy se maximum jejich produkce pohybuje 12h po piku syntézy vitellogeninů. Jako u

ostatních organismů mají proteiny žloutku v oocytech a zásoby RNA v ooplasmě nepochybně velký význam při syntéze embryonálních proteinů během ranné embryogeneze (Clements, 1992).

U *Ae. aegypti* trvá iniciace vitellogeninové fáze minimálně 3 a maximálně 10h u *Anopheles albimanus* trvá 8-16h. Jednu hodinu po příjmu krve byla u samic *Ae. aegypti* detekována mRNA vitellogeninu, ten se poté syntetizoval v tukovém tělese (Raikhel and Lea, 1983). Schopnost přijímat vitellogenin u *Ae. aegypti* se dramaticky zvyšoval od první hodiny po příjmu krve až do konce prvního dne (Koller and Raikhel, 1991). Je zajímavé, že u samic, které přijmuly nepřiměřené množství krve je ovariální vývoj omezen (Clements, 1992).

Podle několika autorů se folikulární epiteliální buňky mezi 4 až 6h po příjmu krve lehce oddělily, což umožnilo přístup hemolymfy k oocytům (Roth and Porter, 1964). To bylo ale zamítnuto Andersonem a Spielmanem v roce 1971, když prokázali, že epiteliální buňky se velice úzce dotýkají jedna druhé od počátku až do konce ukládání žloutku a jsou odděleny jen 20 nm širokými kanálky.

Díky nálezům lipidických kapiček v ooplasmě *Cx. p. quinquefasciatus* je možné, že oocyty také syntetizují lipidy (Nath et al., 1958). 24h po příjmu krve komárem *Anopheles stephensi* byly folikulární epitelové buňky polyploidní (Redfern, 1981). 12h po nakrmení se krví obsahovala cytoplazma folikulárních buněk velké množství RER a GA (Koller a Raikhel, 1991; Clements, 1992).

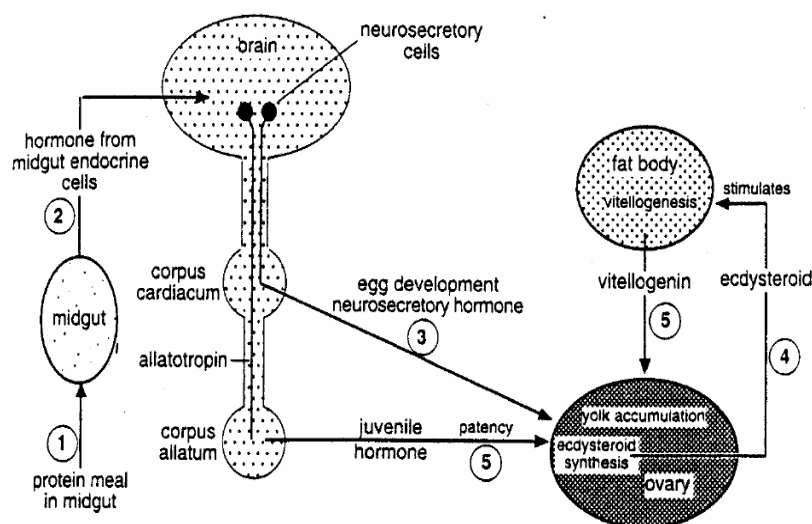


Schéma 1:

Proces aktivace folikulů
(Kodrík, 2004).

Oocyty rostou během **postvitellogenní fáze** do jejich konečné velikosti a získávají konečný tvar. Při této fázi dochází k oplodnění a naklazení vajíček. Před naklazením vajíček (ovipozice) dochází k sekreci chorionu. Tato sekrese má 2 fáze, kde na konci vznikají činnosti sekrečních tělísek spojených s Golgiho komplexem 2 vrstvy chorionu, exo- a endo-chorion. U *Ae. aegypti* a u *Cx. pipiens* dochází k sekreci chorionu jen mezi buňkami epitelu a oocytem, nikoli mezi epiteliálními a nutritivními buňkami. Výjimku tvoří *Anoph. atroparvus*, u kterého se tyto globule nachází nejenom mezi epitelovými buňkami a oocytem ale také mezi oocytem a nutritivními buňkami. Jakmile dosáhne ovariální oocyt *Anopheles atroparvus* jedné třetiny své definitivní velikosti, objevují se v periotickém prostoru malé globule se schopností sekretovat chorion. (Clements, 1992).

Tvorba chorionu se zahybuje již 24h po sání krve. Folikulární epitelové buňky začnou syntetizovat dopa-dekarboxylázu, která dekarboxyluje dopa za produkce domaminu. Dopamin je pravděpodobně acetylován na formu N- acetyldopaminu- tzv. sklerotizující agens (Fuchs, 1981). Vitellogenní fáze končí ukončením syntézy vitellogeninů, jeho uložením do endochorionických vrstev mezi oocyt a epitelární buňky (Clements, 1992).

3. Materiál a metodika.

3.1. Pokusný materiál.

Základní materiál pro chov komárů druhu *Culex pipiens quinquefasciatus* Say byl získán z Bangalore University. Jedná se o populaci pocházející z oblasti Hyderabadu, Indie.

Cx. p. quinquefasciatus se řadí do třídy hmyz (Insecta) podtřídy křídlatých (Pterygota) řádu dvoukřídlych (Diptera) čeledi komárovitých (Culicidae) podčeleč (Culicinae) rod *Culex*.

Jde o hematofágní převážně ornitofilní druh hmyzu (Apperson, 2002). Bylo také prokázáno, že saje krev i na člověku (Service, 1985). *Culex pipiens quinquefasciatus* je cirkum tropitální druh a významný přenašeč filariósy a dalších arbovirálních chorob (Regis et al., 1995). Je také blízkým příbuzným přenašeče West Nile viru, komára *Cx. p. pipiens* (Becker, 2003; Ribeiro, 2004).

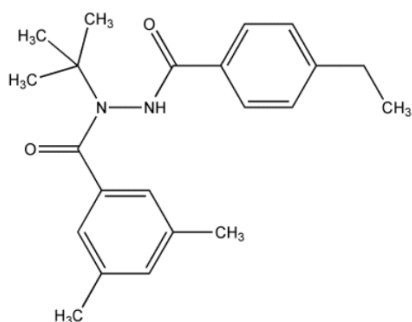
Chov komárů *C. p. quinquefasciatus* byl standardizován – teplota 25±1°C, 75% relativní vlhkost a fotoperioda 16L:8D. Dospělci byli chováni v plexisklových boxech (Olejníček,

1993). Jako potrava jim sloužil 10% roztok sacharózy. Anautogéním populacím byla jednou týdně podávána laboratorní myš. V boxech byla umístěna nádoba s vodou, do které samičky kladly snůšky vajíček. Larvy byly krmeny lyofilizovanými kvasnicemi PANGAMIN® ad libidum.

3.2. Testovaná látka.

K pokusům se využíval nesteroidní analog ekdysonu tebufenozid RH- 5992, s chemickým názvem 3,5-dimethylbenzoic acid 1-(1,1-dimethylethyl)-2-(4-ethylbenzoyl)-hydrazide.

Tebufenozid je potenciální insekticid s přímými toxickými účinky na škodlivý hmyz, také zahajuje předčasné svlékání, které však není ukončeno. Dále by mohlo jít o látku, díky níž by se dalo při určitém označení sledovat rozmístění receptorů ekdysonu in vivo.



Vzorec: Tebufenozid RH- 5992
(převzato a upraveno od Retnakarana et al., 2001).

3.3. Metodika pokusů.

Studovaná látka byla aplikována v koncentracích 1μl/ 100 ml vody; 0,1μl/ 100 ml vody; 0,01μl/ 100 ml vody; 0,001μl/ 100 ml vody. Sledovala se mortalita v jednotlivých koncentracích a na jejím základě byla stanovena letální dávka LD 50. Je to množství látky vyvolávající mortalitu u 50% pokusných jedinců.

Testovaná látka se aplikovala do 100 ml odstáté vodovodní vody. Hodinu po aplikaci bylo do každé koncentrace přeneseno 100 larviček prvního instaru starých v průměru 2 hodiny. Kontrola mortality probíhala ve 24-hodinových intervalech. Larvy, které dokončily vývoj a zakuklily se byly využity v dalších studiích. Pro histologické studie se využívaly pouze samice. Z tohoto důvodu byly kukly separovány po jedné do epruet. Po vylíhnutí byly stejně staré samice umístěny do malých boxů a krmeny 10% roztokem sacharózy. Histologické studie se prováděly u samic během celého prvního ovariačního cyklu v 24-hodinových intervalech.

3.4. Histologické studie.

Samice byly anestetizovány chladem. Pitva znehybněných samic byla provedena ve fyziologickém roztoku Ringer (Jírovec, 1958; Wolf, 1954). Ovaria byly vypreparovány z posledního článku abdomenu pod mikroskopem Olympus SZX 12.

Jako fixační činidlo byl použit alkoholový Bouin modifikace Duboscq- Brassil. Tkáně v této fixáži dobře snáší prefixování a objekty se v ní velmi dobře barví (Jírovec, 1958). Doba fixace ve všech vzorcích přesahovala 3 dny.

Ze vzorků byla vymyta kyselina pikrová a postupně byly zality do parafinu. Po vymytí kyseliny pikrové 70% ethanolem byl vzorek odvodněn vzestupnou alkoholovou řadou. Vzorek byl postupně převeden přes alkoholmethylbenzoat, methylbenzoat, benzol, benzol-parafin do parafinu. Celý proces zalévání je podrobně popsán v tab. I.

Parafinové bločky obsahující studovanou tkáň byly krajeny na mikrotomu Leica RM 2165. Byly zhotoveny řezy 5 μ m silné. Jednotlivé parafinové pásky složené z pěti po sobě následujících řezů byly pomocí štetečku přeneseny na podložní sklíčka potřená tenkou vrstvou glycerinbílku (1:1) a pokryta destilovanou vodou (Hladík, 1968). Sklíčka s napnutými řezy byla ponechána na vyhřívané destičce přes noc, kdy došlo k vysušení preparátu.

Usušená podložní sklíčka s řezovými preparáty byla barvena následným způsobem. Nejprve byla sklíčka zbavena parafinu, převedena sestupnou alkoholovou řadou do vody a poté došlo k vlastnímu barvení. To probíhalo podle následovné tabulky II.

K barvení řezů byla použita Malloryho barvicí technika. Obarvené řezové preparáty byly uzavřeny pryskyřicí Poly-mount Polysciencis, Inc. a pokryty krycím sklíčkem.

Fotodokumentace byla pořízena pomocí digitální kamery DP-50 umístěné na mikroskopu Olympus BX-51.

Tab. I: Odvodnění a zalévání objektů do parafínu.

| | Chemická látka | Doba působení | Poznámky |
|--|-----------------------------|----------------------|--|
| Odvodnění objektů | 3x 70% Ethanol | à 8 h | Pokaždé vyměnit za nový roztok. |
| | 3x 96% Ethanol | à 8 h | Pokaždé vyměnit za nový roztok. |
| ----- | | | |
| Postup zalévání objektů do parafínu | Alkohol:methylbenzoat (1:1) | 1h | - |
| | 3x Methylbenzoat | à 6 h | Pokaždé vyměnit za nový roztok. |
| | 2x Benzol | à 5 min | Celková doba působení nesmí přesáhnout 10 min- jinak hrozí ztvrdnutí vzorku. |
| | Benzol-parafin (1:1) | 30 min | Při pokojové teplotě 20°C. |
| | Benzol-parafin (1:1) | 1 hod | V termostatu 40°C |
| | 4x Parafin | à 4-6 h | V termostatu při 54°C. Pokaždé vyměnit za nový parafin. |

Tab. II: Malloryho barvicí technika- průběh barvicího procesu.

| | Pořadí | Chemická látka | Doba působení |
|-----------------------|---------------|--------------------------|----------------------|
| Odparafinování | 1. | 2x Xylol | à 10 min |
| | 2. | 2x 96% Alkohol | à 5 min |
| | 3. | 2x 80% Alkohol | à 5 min |
| | 4. | 2x 70% Alkohol | à 5 min |
| | 5. | Destilovaná voda | 5 min |
| ----- | | | |
| Barvení | 6. | Porceau-kys.fuchsin | 3,5 min |
| | 7. | Destilovaná voda | 5 min |
| | 8. | 1% kys. fosfomolybdenová | 5 min |
| | 9. | Mallory směs | 9 min |
| ----- | | | |
| Montování | 10. | Dest. Voda | 5 min |
| | 11. | 96% alkohol | 5 min |
| | 12. | Aceton-xylol (1:1) | 1 min |
| | 13. | Karbol-xylol (1:7) | 5 min |
| | 14. | 2x Xylol | à 5 min |
| | 15. | Poly-mount | do zaschnutí |

4. Výsledky.

4.1. Průběh prvního gonotrofického cyklu.

Zralá vajíčka prvního ovarialního cyklu se utváří ve vaječniku autogenních samic *Cx. pipiens quinquefasciatus* během 7-10 dnů od imaginární ekdysy. Již během prvního dne po imaginární ekdysy dochází k ukládání prvních žlutkových zrn do vyvíjejících se oocytů. Během dalších dnů je proces vitellogeneze velice intenzivní a kolem pátého dne se ve vajíčcích nachází kompaktní žlutková hmota. V tuto dobu dochází ke změně funkce folikulárního epitelu z vyživovací na sekreční. Od šestého dne jsou zralá vajíčka připravena k vykladení.

Podobný obraz vývoje vajíček byl pozorován u samic ovlivněných látkou RH- 5992 v larválním stádiu. Naproti tomu u kontrolní anautogenní populace tohoto druhu proces vitellogeneze nebyl většinou vůbec zahájen. U 40% samic se ve vyvíjejících oocytech objevovala jednotlivá žlutková zrna. Dokončení procesu vitellogeneze u anautogenních samic je závislé na příjmu krve. Čím dříve samice přijímá krev, tím více se proces vitellogeneze podobá průběhu vitellogeneze u autogenních jedinců.

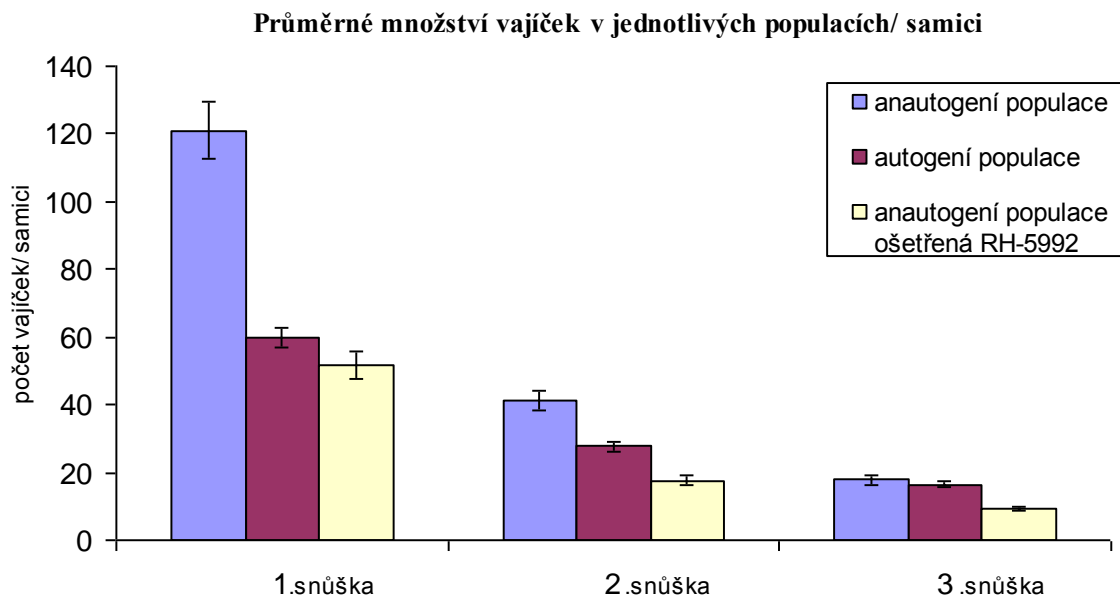
Vyskytovaly se výrazné rozdíly v počtu vajíček ve snůškách vykladených autogenými a anautogenými samicemi během prvního ovarialního cyklu viz. tab. III a graf 1.

Množství vajíček vykladených samicemi ošetřenými látkou RH-5992 je víceméně stejné jako u autogenních populací (tab.III graf 1). Je zajímavé, že autogenie, která byla indukována v rodičovské generaci, se projevila i v následujících dvou F₁ a F₂ generacích. I v těchto generacích odpovídalo množství vykladených vajíček rodičovské generaci.

Tab. III: Průměrné množství vajíček v jednotlivých snůškách na samici.

| Populace | 1.snůška | 2. snůška | 3. snůška |
|---------------|------------|-----------|-----------|
| Anautogení | 121,1±14.8 | 41,1±8.9 | 17,8±6,2 |
| Autogení | 59,9±9,6 | 27,7±8.3 | 16,5±3,9 |
| Vliv RH- 5992 | 51,7 ±12,6 | 17,5±5,6 | 9,2±4.1 |

Graf 1: Množství nakladených vajíček ve snůškách u jednotlivých populací *Cx. p. quinquefasciatus*.



4.2. Morfologie vaječníků.

Preparace vaječníků prokázala následující:

- A) Vaječnky autogéních samic již byly větší než u anautogéních samic a jsou mléčně zabarvené.
- B) U anautogéních samic nedošlo k významné změně velikosti ovárií a ve většině případů ani ke změně zabarvení vaječníků.
- C) Vliv RH-5992 na vaječnky byl velmi pozoruhodný. Takto ošetřené samice měly ovária na rozdíl od kontrolních ovárií často natolik drobná, že bylo poměrně pracné jednotlivá ovária vypreparovat. Na druhé straně ale docházelo i k opačnému jevu, kdy takto ošetřené samice měly vaječnky podobné autogéní populaci viz. 4.2. bod A.

4.3. Histologie.

Histologie autogeních a anautogeních samiček a vliv RH- 5992 na vaječníky anautogeních samiček byla pozorována u samiček druhu *Culex pipiens quinquefasciatus* na úrovni jednotlivých folikulů. Naše výsledky ukázaly následující:

A) Autogení samice dokázaly dokončit vývoj první ovariální snůšky bez příjmu krve. Folikuly autogeních samiček druhu *Cx. p. quinquefasciatus* obsahovaly 3 nutritivní buňky (viz. příloha- foto 1B), které vyživovaly oocyt. Postupným růstem folikulu se velikost nutritivních buněk zmenšovala a měnil se s ním i tvar folikulárních buněk z kubického na deskiovitý (viz. příloha 1, 2, 3- sloupce B). I bez příjmu krve se uvnitř folikulů probíhala vitellogeneze (viz. příloha- foto 1B) i tvorba vaječných obalů (viz. příloha- foto 7B). Tvorba sekundárních folikulárních obalů u autogení populace je patrná už okolo čtvrtého dne vývoje (viz. obrazová příloha 2).

B) U většiny anautogeních samic došlo k zahájení procesu tvorby a ukládání žloutku. Vitellogeneze však neproběhla úplně. Vývoj vajíček se zastavil a pokračoval až po nasátí krve. U několika samic se přesto vajíčko vytvořilo (viz. příloha 2- sloupec A), došlo i k vytvoření vaječných obalů (viz. příloha-foto 4A). Zralá vajíčka (viz. příloha 2- sloupec A), však byla vykladena až po nasátí krve samicemi.

C) Vliv látky RH-5992 aplikované v larválním stádiu se projevoval u dospělých samiček dvojnásobem. Na jedné straně subletální dávky indukovaly vitellogenezi (viz. příloha - foto 1C, 2C, 3C, 7C). Samice byly schopné tuto snůšku vyklást bez potřeby sát krev. Naproti tomu vyšší dávky vykazovaly sterilizační účinek. Ten se projevoval v degeneraci vaječníků. Docházelo k resorpci ooplasmu a ve vaječnicích byly pozorovány četné pyknotické struktury (viz. příloha- foto 4C).

4. 4. Vliv testované látky na vývoj komára *Cx. pipiens quinquefasciatus*.

Testovaná látka vykazovala vysokou toxickou aktivitu u larev *Cx. pipiens quinquefasciatus* v závislosti na aplikované dávce a na vývojovém stádiu viz. tabulka IV.

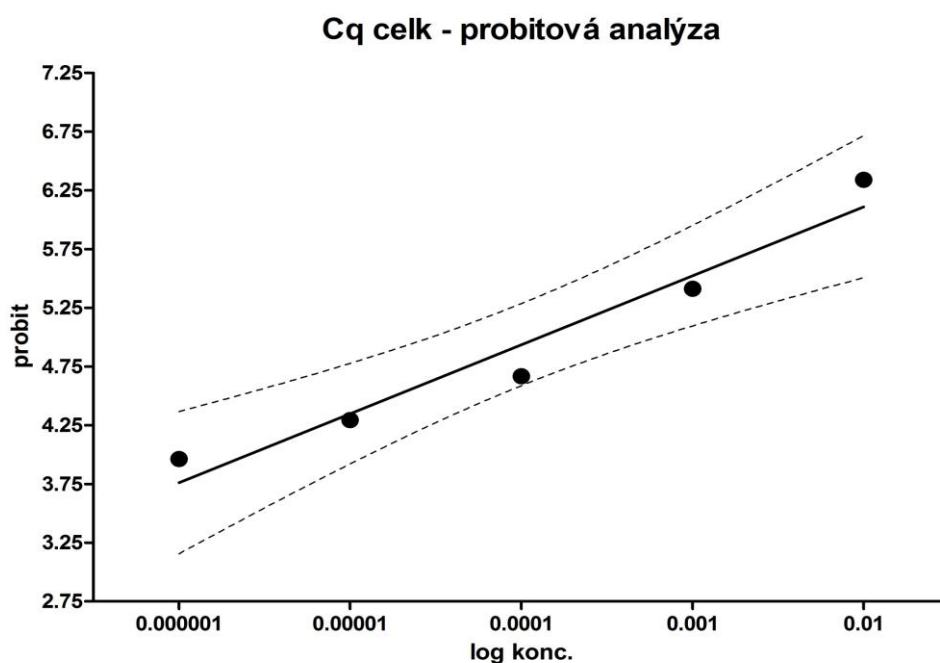
Vysoká koncentrace byla toxická zejména pro larvy prvního a druhého larválního instaru. U larev třetího a čtvrtého instaru se projevoval kumulativní účinek této látky, kdy docházelo ke

zvýšení toxicity, která však nebyla tak vysoká jako u prvního a druhého larválního instaru. Bylo stanoveno množství RH-5992 vyvolávající mortalitu u 50% larev naší populace *Culex pipiens quinquefasciatus* Say, tzv. LD₅₀, na koncentraci $1,29 \times 10^{-4}$ µg/100ml vody viz. graf 2.

Tab. IV: Působení látky RH-5992 na jednotlivá vývojová stádia komára *Cx. pipiens quinquefasciatus*.

| Látka RH-5992 [µl] | Mortalita | | | | | Počet dospělců | Poměr pohlaví ♂:♀ | Celková mortalita [%] |
|-----------------------|-----------|----------|----------|----------|-------|-------------------|-------------------------|-----------------------------|
| | 1.instar | 2.instar | 3.instar | 4.instar | Kukla | | | |
| 1 | 100 | - | - | - | - | - | - | 100 |
| 0.1 | 100 | - | - | - | - | - | - | 100 |
| 0.01 | 48 | 22 | 8 | 7 | 6 | 9 | 6:3 | 91 |
| 0.001 | 19 | 15 | 11 | 16 | 5 | 34 | 19:15 | 66 |
| 0.0001 | 9 | 9 | 4 | 7 | 8 | 63 | 31:32 | 37 |
| 0.00001 | 7 | 6 | 1 | 9 | 1 | 76 | 37:39 | 24 |
| 0.000001 | 6 | 1 | 3 | 3 | 2 | 85 | 45:40 | 15 |
| Kontrola | 2 | 3 | 1 | 5 | 3 | 86 | 44:42 | 14 |

Graf 2: Mortalita u jednotlivých vývojových stádií komára *Culex pipiens quinquefasciatus* Say v závislosti na koncentraci RH-5992.



5. Diskuse.

5.1. Toxicita.

Testovaná látka tebufenozid RH-5992 je nesteroidní agonista ekdysonu. RH- 5992 obsazuje vazebná místa na receptoru pro ekdyson in vitro (Wing, 1988; Perera et al., 1999; Retnakaran et al., 2001; Smagghe et al., 2002; Hu et al., 2004). Obsazením těchto vazebných míst agonistou ekdysonu dojde k aktivaci genů, které by při navázání ekdysonu na tyto vazebná místa byly blokovány a genová transkripce by neprobíhala (Baker et al., 2000). Vzhledem k tomu, že RH-5992 není steroidním ekdysonem, nedojde k uvolnění této látky z vazebných míst pro ekdyson, proto nedojde k dokončení ekdyse (Retnakaran et al., 2001; Zitnan et al., 1999).

Jak vyplývá z našich výsledků je tato látka u druhu *Culex pipiens quinquefasciatus* vysoce toxická. Larvy mladších larválních instarů při aplikaci vyšších dávek RH-5992 (vyšší než LD₅₀) hynou do 24h po aplikaci. Úhyn larev při nižších aplikovaných koncentracích je důsledkem předčasného svlékání vyvolaného RH-5992. Tyto larvy nedokončí larvální ekdyse a hynou ve staré neodloučené kutikule. Dávka LD₅₀ pro tebufenozid RH-5992 je u naší populace *Culex pipiens quinquefasciatus* $1,29 \times 10^{-4}$ μg/100ml vody.

Látku RH-5992 testovali i Beckage et al. (2004), kteří uvádějí její letální koncentraci LC₅₀= 44,04 μg/100ml vody. Bekage et al. (2004) používají několikanásobně vyšší dávku. Tohoto rozdílu zřejmě bylo dosaženo tak, že námi použitá látka byla formulována a připravena pro aplikaci ve vodném roztoku, kdežto uvedení autoři používali čistou látku rozpuštěnou v ethanolu. Navíc tebufenozid aplikovali na larvy třetího instaru, oproti tomu naše pokusy probíhaly s kontinuální aplikací během celého larválního vývoje.

Tebufenozid RH-5992 je látkou převážně toxickou na škůdce rodu Lepidoptera (Dhadialla et al., 1998; Sundaram et al., 1998, 2002). Existují ale i studie na Dipterech, kde tebufenozid také vykazoval významnou toxicitu (Darvas et al., 1992). Přestože u většiny komárů ošetřených v larválním stádiu agonisty ekdysonu nedošlo k dokončení předčasné ekdyse, vyskytovaly se i případy, kdy docházelo k syntéze nové kutikuly. V těchto případech by mohla svlečená kutikula být roztrhána na kusy a larva by se v tomto případě jevila jako nedotčená. Nová kutikula, která se vytvořila byla normálně sklerotizovaná a to i v případech

kdy nedošlo k ekdysy. U studovaných Lepidopter byla apolýza pokožky zahájena a do vzniklého prostoru mezi epidermis a kutikulu byla sekretována svlékáací tekutina, svlékání ale bylo náhle ukončeno před produkcí nové kutikuly (Wing, 1988; Dhadialla et al., 1998; Smagghe et al., 1996).

5.2.Vliv RH-5992 na vývoj samičích pohlavních orgánů.

Culex pipiens quinquefasciatus Say je anautogením druhem. To znamená, že samice potřebují již během prvního gonotrofického cyklu sát krev. Olejníček a Gelbič (2000) však popisují selekci autogení populace tohoto druhu u kmene pocházejícího z oblasti Hyderabadu, Indie. Tito autoři vyseletovali autogení populaci, která již více jak 15 let neměla možnost sát krev. Námi získané výsledky poukazují na to, že autogenie je závislá na hladině hormonů v těle, zejména ekdysonu. Aplikace agonisty ekdysonu indukovala vitellogenezi a následné kladení vajíček bez nutnosti sát krev.

Naše výsledky dokonce ukazují urychlení těchto procesů u komára *Cx. p. quinquefasciatus*, což je v souladu s údaji O' Meara (1981). Zahájení vitellogeneze je závislé na aplikované dávce. U subletálních dávek (kolem LD₅₀) dochází k indukci vitellogeneze. Aplikace vyšších dávek vyvolává vyšší mortalitu u pokusných jedinců. U samic, které dokončily vývoj i po aplikaci vyšších dávek, se projevovaly také účinky sterilizační, kdy docházelo k postupnému rozpadu jednotlivých oocytů. Je to podobný účinek jako byl pozorován u analogů juvenilního hormonu (Nayar et al., 2002).

Testovaná látka RH-5992 je pro druh *Culex pipiens quinquefasciatus* toxická zejména u prvního a druhého larválního instaru. V aplikovaných subletálních dávkách byl pozorován nepatrný kumulativní účinek u larev třetího a čtvrtého larválního instaru.

Podobnou toxicitu vykazuje například s-methopren (Nayar et al., 2002).

Retnakaran (2001) tvrdí, že RH-5992 je specifický pro druhy Lepidopter. Dokonce zamítá vliv RH-5992 na parasity Hymenopter a Dipter. Výsledky naší práce ale ukazují, že u Dipter z čeledi Culicidae (*Cx. pipiens quinquefasciatus*) je tato látka účinnější než pro některá stádia u Lepidopter.

Vliv tebufenozidu na vývoj vaječníku ukazuje, že je možné indukovat autogenii u anautogéních komárů, pouze působením této látky.

Tato studie společně s prací Hahn et al. (2001) a Smagghe et al. (2002) u pakomárů naznačuje, že toxicita těchto složek na vodní hmyz je významná. Celosvětový průzkum v oblasti agonistů ekdysonu a jeho výsledky v současné době nám nabízejí alternativní cestu regulace těchto vektorů přenášejících choroby, zejména v rozvojových zemích. Z důvodu masového využívání methoprenu Při masovém využívání methoprenu k potlačení přemnožených populací komárů hrozí resistance k k methoprenu (analog JH), která se dnes bezne používá. Toto může zlepšit ochranu a zdraví člověka a domácích zvířat.

Tato studie společně s prací Hahn et al. (2001) a Smagghe et al. (2002) u pakomárů naznačuje, že toxicita těchto složek na vodní hmyz je významná. Současný celosvětový výzkum komářích druhů ukazuje, že nám RH-látky nabízejí alternativní způsob regulace těchto vektorů přenášejících choroby. Hojnost komářích larev v těchto oblastech a snaha tyto larvy zlikvidovat pomocí methoprenu (analog JH) a to s důrazem na rozvojové země, kde je hojnost komářích larev může nakonec vyvinout resistenci k methoprenu.

Vliv tebufenozidu na vývoj vaječníku ukazuje, že je možné indukovat autogenii u anautogéních komárů, pouze působením této látky.

6. Shrnutí.

1. Velikost vaječníků se liší v rámci stejného dne vývoje u jednotlivých populací:

- a) U autogéních populace *Cx.p. quinquefasciatus* je díky probíhající vitellogenezi velikost vaječníků větší než u stejně starých anautogéních samic.
- b) U anautogéních populace *Cx.p. quinquefasciatus* jsou vaječnící menší ve srovnání s vaječnící stejně starých autogéních samic.
- c) Samice ošetřené v larválním stádiu látkou RH-5992 mají obdobný průběh vývoje vaječníků jako autogéní populace.
- d) V ojedinělých případech, zejména u vyšších koncentrací testované látky, byly ve vaječnících pozorovány patologické změny.

2. Průměrné množství vajíček ve snůškách studovaného druhu se liší v závislosti na studované populaci a pořadí snůšky:

- a) U autogéní populace *Cx.p. quinquefasciatus* se množství vajíček ve snůšce pohybuje okolo 60.
- b) U anautogéní populace *Cx.p. quinquefasciatus* je množství vajíček ve snůšce téměř dvojnásobné. Pohybuje se okolo 121 vajíček na snůšku.
- c) U anautogéní populace *Cx.p. quinquefasciatus* ošetřené v larválním stádiu látkou RH-5992 se množství vajíček ve snůšce pohybuje v rozmezí 40-64 vajíček.
- d) Počet vajíček v jednotlivých snůškách se snižuje v každé následující snůšce.

3. Vitellogeneze je ovlivněna způsobem hematofágního chování *Cx.p. quinquefasciatus*

- a) Pokud nedojde k příjmu krve samicemi, vitellogeneze u anautogéní populace neprobíhá. Ve výjimečných případech může dojít k ukládání žlutkových zrn, i přes to tyto vajíčka nejsou samice schopny bez příjmu krve naklást.
- b) U autogéních samic vitellogeneze probíhá. Dochází k ukládání žlutkových zrn i ke tvorbě sekundárních folikulárních obalů.
- c) U anautogéní populace ošetřené v larválním stádiu látkou RH-5992 k vitellogenezi dochází. Někdy ale dojde k degeneraci folikulů.

7. Seznam citované literatury.

- ANDERSON, W. A.; SPIELMAN, A. (1971) Permeability of the ovarian follicles of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Submicroscop. Cytol.*, Vol. 5, p. 181-198.
- APPERSON, Ch. S. (2002) Host-feeding habits of *Culex* and other mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the borough of Queens in New York City, with characters and techniques for identification of *Culex* mosquitoes. *Med. Entomol.* Vol. 39, No. 5, p. 777-785.
- BAKER, K. D. et al. (2000) Transcriptional activation of the *Drosophila* ecdysone receptor by insect and plant ecdysteroids. *Insect Biochem Mol Biol.* Vol. 30, p. 1037-1043.
- BECKAGE, N. E et al. (2004) Comparative larvicidal toxicities of three ecdysone agonists on the mosquitoes *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, and *Anopheles gambiae*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology.* Vol. 57, p. 111–122
- BECKER, N., et al. (2003) *Mosquitoes and their control*. New York : Kluwer Academic/ Plenum Publishers, 498 p. ISBN 0-306-47360-7.
- CAO, G.; HAN, Z. (2006) Tebufenozide resistance selected in *Plutella xylostella* and its cross-resistance and fitness cost. *Pest Management Science.* Vol. 62, p. 746-751.
- CLEMENTS, A. N. (1992) Mosquitoes : Volume 1 Development, nutrition and reproduction. 1st edition. London : Chapman and Hall, 509 p. ISBN 0-412-40180-0.
- DARVAS, B. et al. (1992) Developmental disturbances in different insect orders caused by an ecdysteroid agonist, RH-5849. *J Econ Entomol.* Vol. 85, p. 2107–2112.
- DEITSCH, K. W.; CHEN, J.-S.; RAIKHELM, A. S. (1994) Indirect control of yolk protein genes by 20-hydroxyecdysone in the fat body of the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* Vol. 25, No. 4, p. 449-454.
- DHADIALLA, T.S.; CARLSON, G.R.; LE, D.P. (1998) New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annu. Rev. Entomol.* Vol. 43, p. 545–569.
- FIL, A. (1978) Follicle cell bridges in the mosquito ovary: Syncytia formation and bridge morphology. *J.Cell Sci.* Vol.31, p. 137-143.
- FUCHS, M. S., et al. (1981) Endocrine control of ovarian development in an autogenous mosquito. *Regulation of Insect Development and Behaviour International Conference*, p. 569-590.
- GIGLIOLI, M. E. C. (1964) The female reproductive system of *Anopheles gambiae melas*. II. Ovary. *Riv. Malariol.*, Vol. 43, p. 265-275.
- HAHN, T., et al. (2001) Effects of the hormone mimetic insecticide tebufenozide on *Chironomus riparius* larvae in two different exposure setups. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* Vol. 49, Iss. 2, p. 171-178.

- HLADÍK, V. (1968)** *Základy teorie barvení*. 1st edition. Praha : SNTL- Nakladatelství technické literatury, n. p., 180 p. 04-815-68.
- HU, W. et al., (2004)** Morphological and molecular effects of 20-hydroxyecdysone and its agonist tebufenozide on CF-203, a midgut-derived cell line from the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *Arch Insect Biochem Physiol*. Vol. 55, p. 68-78.
- CHRISTOPHERS, S.R. (1945)** Structure of the *Culex* egg and egg-raft in relation to function (Diptera). *Trans. R. Entomol. Soc. Lond.* Vol. 95, p. 25-34.
- JÍROVEC, O. (1958)** *Zoologická technika*. 3rd edition, Praha : SPN, n. p., 314 p. 76-06-01.
- KOLLER, C. N.; RAIKHEL, A. S. (1991)** Initiation of vitellogenin uptake and protein synthesis in the mosquito (*Aedes aegypti*) ovary in response to a blood meal. *Insect Physiol.*, Vol. 37, p. 703-711.
- NATH, V. et al. (1958)** Histochemical and morphological studies of the lipids in oogenesis. V. The egg follicle of *Culex fatigans*, *Res. Bull. Panjab Univ.*, No. 148, p. 135-148.
- NAYAR, J. K. et al. (2002)** Effectiveness and residual activity comparison of granular formulations of insect growth regulators pyriproxyfen and s-methoprene against Florida mosquitoes in laboratory and outdoor conditions. *Journal of the American Mosquito Control Association*, Vol. 18, No. 3, p. 196-201.
- NICHOLSON, A. J. (1921)** The development of the ovary and ovarian egg of a mosquito, *Anopheles maculipennis*, Meig. *Quart. J. Microscop. Sci.* Vol. 65, p. 396-448
- O'MEARA, G. F.; LOUNIBOS, L. P. (1981)** Reproductive maturation in the pitcher-plant mosquito, *Wyeomyia smithii*. *Physiol. Entomol.*, Vol. 6, p. 437- 443.
- OLEJNÍČEK, J. (1995)** Influence of males on the blood-feeding behaviour of female *Culex pipiens* Complex mosquitoes during the first gonotrophic cycle. *Journal of Vector Ecology*. Vol. 20, No. 2, p. 147-152.
- OLEJNÍČEK, J., (1993)** Plexiglass box system for mosquito rearing. *Bull. Soc. Vector. Ecol.*, Vol. 38, p. 39-58.
- OLEJNÍČEK, J.; GELBIČ, I. (2000)** Autogeny in *Culex pipiens quinquefasciatus* Say. *J. Vector Ecol.* Vol. 25, p. 118-122.
- PERETA, S. C. et al. (1999)** Studies on two ecdysone receptor isoforms of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *Mol. Cell Endocrinol.* Vol. 152, p. 73-84.
- RAIKHEL, A. S.; LEA, A. O. (1982)** Abnormal vitelline envelope induced by unphysiological doses of ecdysterone in *Aedes aegypti*. *Physiol. Entomol.* Vol. 7, p. 55-64.
- RAIKHEL, A. S.; LEA, A. O. (1983)** Previtellogenic development and vitellogenin synthesis in the fat body of a mosquitoes: an ultrastructural and immunocytochemical study. *Tissue & Cell*, Vol. 15, p. 281-300.

- REDFERN, C. P. F. (1981)** Satellite DNA of *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). Chromosomal location and under- replication in polytene nuclei. *Chromosoma*, Vol. 82, p. 561-581.
- REGIS, L., et al. (1995)** Integrated control measures against *Culex quinquefasciatus*, the vector of filariasis in Recife. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Vol. 90, No. 1, p. 115-119.
- RENSHAW, M.; SILVER, J. B.; SERVICE, M. W. (1995)** Differential lipid reserves influence host-seeking behaviour in the mosquitoes *Aedes cantans* and *Aedes punctor*. *Medical and Veterinary Entomology*, Vol. 9, p. 382-387.
- RETNAKARAN, A., et al. (2001)** Mode of action of the ecdysone agonist tebufenozide (RH-5992), and an exclusion mechanism to explain resistance to it . *Pest Management Science*. Vol. 57, No. 10, p. 951-957.
- RIBEIRO, J. M.C., et al. (2004)** An insight into the salivary transcriptome and proteome of the adult female mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. Vol. 34, p. 543–563.
- ROSS, H. H.; ROSS, Ch. A.; ROSS, J. R. P. (1982)** *A textbook of entomology*. Fourth edition. Canada : John Wiley and Sons, Inc., 666 p. ISBN 0-471-73694-5.
- ROTH, T. F.; PORTER, K. R. (1964)** Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquitoes *Aedes aegypti* L. *J. Cell Biol.*, Vol. 20, p. 313-332.
- ROTH, T. F., et al. (1976)** Protein transport: a selective membrane mechanism. *J. Supramolec. Res.*, Vol. 4, p. 527-548.
- SERVICE, M. W. (1985)** The biology of *Aedes caspius* (Pallas) and *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) in Dubai. *Insect Sci. Applic.* Vol. 7, No. 1, p. 11-18.
- SMAGGHE, G.; DEGHEELE, D. (1994)** Action of a novel nonsteroidal ecdysteroid mimic, tebufenozide (RH-5992), on insects of different orders. *Pest Management Science*. Vol. 42, Iss. 2. Abstract.
- SMAGGHE, G. et al. (1996)** In vivo and in vitro effects on cuticle formation in *Spodoptera exigua*: an ultrastructural approach. *Arch. Insect. Biochemic. Physiol* Vol. 32, p. 121-130.
- SMAGGHE, G. et al. (2002)** Comparative toxicity and ecdysone receptor affinity of non-steroidal ecdysone agonists and 20-hydroxyecdysone in *Chironomus tentans*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* Vol. 32, p. 187-192.
- SOTA, T.; MOGI. M. (1994)** Seasonal life cycle and autogeny in the mosquito *Aedes togoi* in northern Kyushu, Japan, with experimental analysis of the effects of temperature, photoperiod and food on life- history traits. *Res. Popul. Ecol.* Vol. 36, p. 105-114.
- SUNDARAM, M. et al. (1998)** Basis for selective action of a synthetic molting hormone agonist, RH-5992 on lepidopteran insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. Vol. 28, Iss. 9, p. 693-704.

- SWEVERS, L.; IATROU, K. (1999)** The ecdysone agonist tebufenozide (RH-5992) blocks the progression into the ecdysteroid-induced regulatory cascade and arrests silkworm oogenesis at mid-vitellogenesis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. Vol. 29, Iss. 11, p. 955-963.
- TROY, S. et al. (1975)** Lipid content of maturing ovaries of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 50B, p. 457- 461.
- TRPIS, M. (1977)** Autogeny in diverse populations of *Aedes aegypti* from East Africa. *Tropenmed. Parasit.* Vol. 28, p. 77-82.
- TRPIS, M. (1978)** Genetics of hematophagy and autogeny in the *Aedes scutellaris* Complex (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* Vol. 15, No. 1, p. 73-80.
- WING, K. D. (1988)** RH- 5849, a nonsteroidal ecdysone agonist: Effects on a *drosophila* cell line. *Science, New Series*, Vol. 241, No. 4864, p. 467-469.
- WING, K.D.; SLAWECKI, R.A.; CARLSON, G. R. (1988)** RH-5849, a nonsteroidal ecdysone agonist: Effects on larval Lepidoptera. *Science, New Series*, Vol. 241, No. 4864, p. 470-472.
- WOLF, J. (1954)** *Mikroskopická technika*. 2nd edition. Praha : Státní zdravotnické nakladatelství, n. p., 656 p. ED.53 139.
- ZITNAN, D. et al. (1999)** Steroid induction of a peptide hormone gene leads to orchestration of a defined behavioral sequence. *Neuron*. Vol. 23, p. 523-535.

8. Příloha.

PŘÍLOHA 1

8.1. Popisky k obrazové příloze 1:

1A- folikul z anautogéní snůšky samice staré 1-24h ,

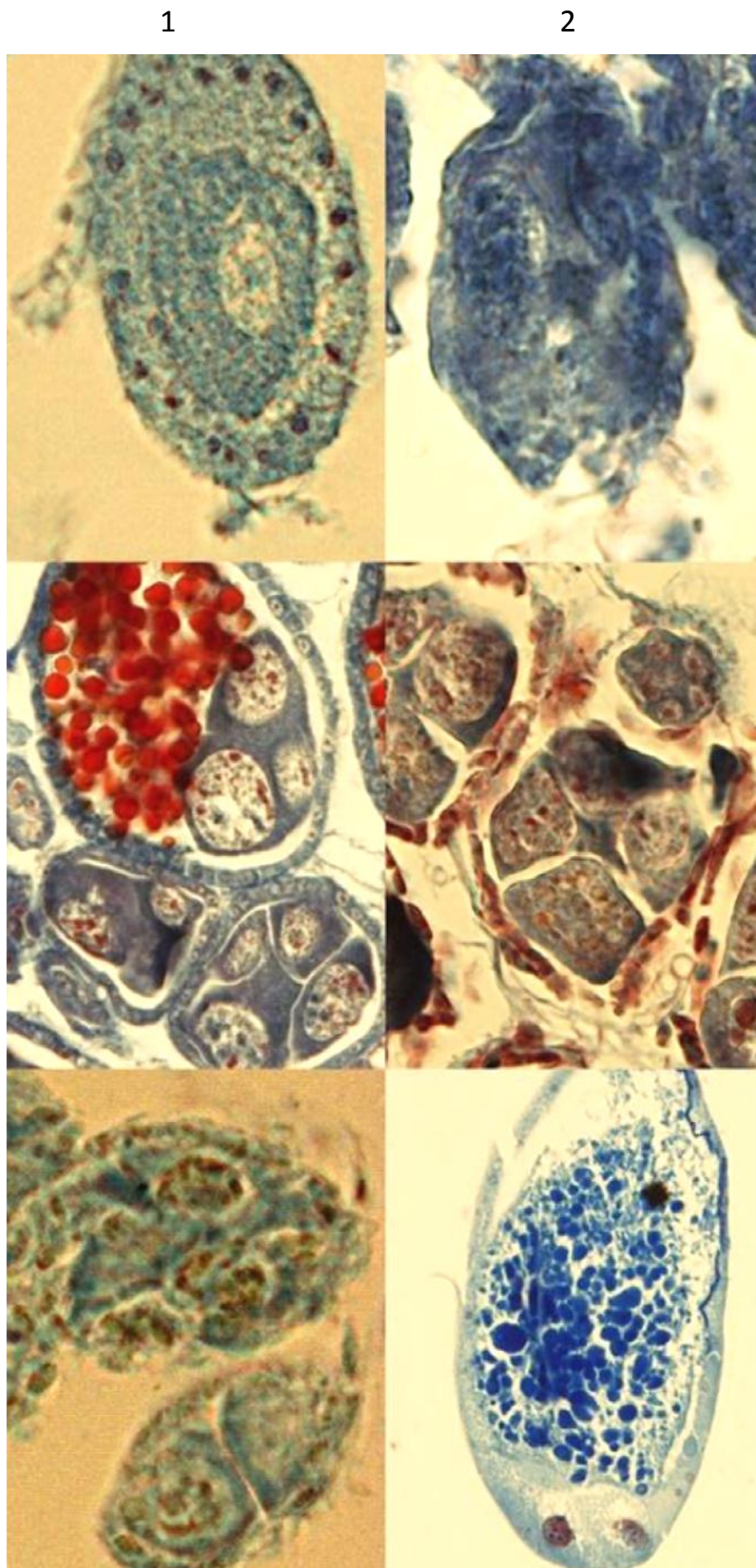
1B- folikul z autogéní snůšky samice staré 1-24h , ,

1C- folikul z anautogéní snůšky samice ošetřené v larválním stádiu látkou RH-5992 staré 1-24h,

2A- folikul z anautogéní snůšky samice staré 24-48h ,

2B- folikul z autogéní snůšky samice staré 24-48h , ,

2C- folikul z anautogéní snůšky samice ošetřené v larválním stádiu látkou RH-5992 staré 24-48h.



8. 2. Popisky k obrazové příloze 2:

3A- folikul z anautogéní snůšky samice staré 48-72h ,

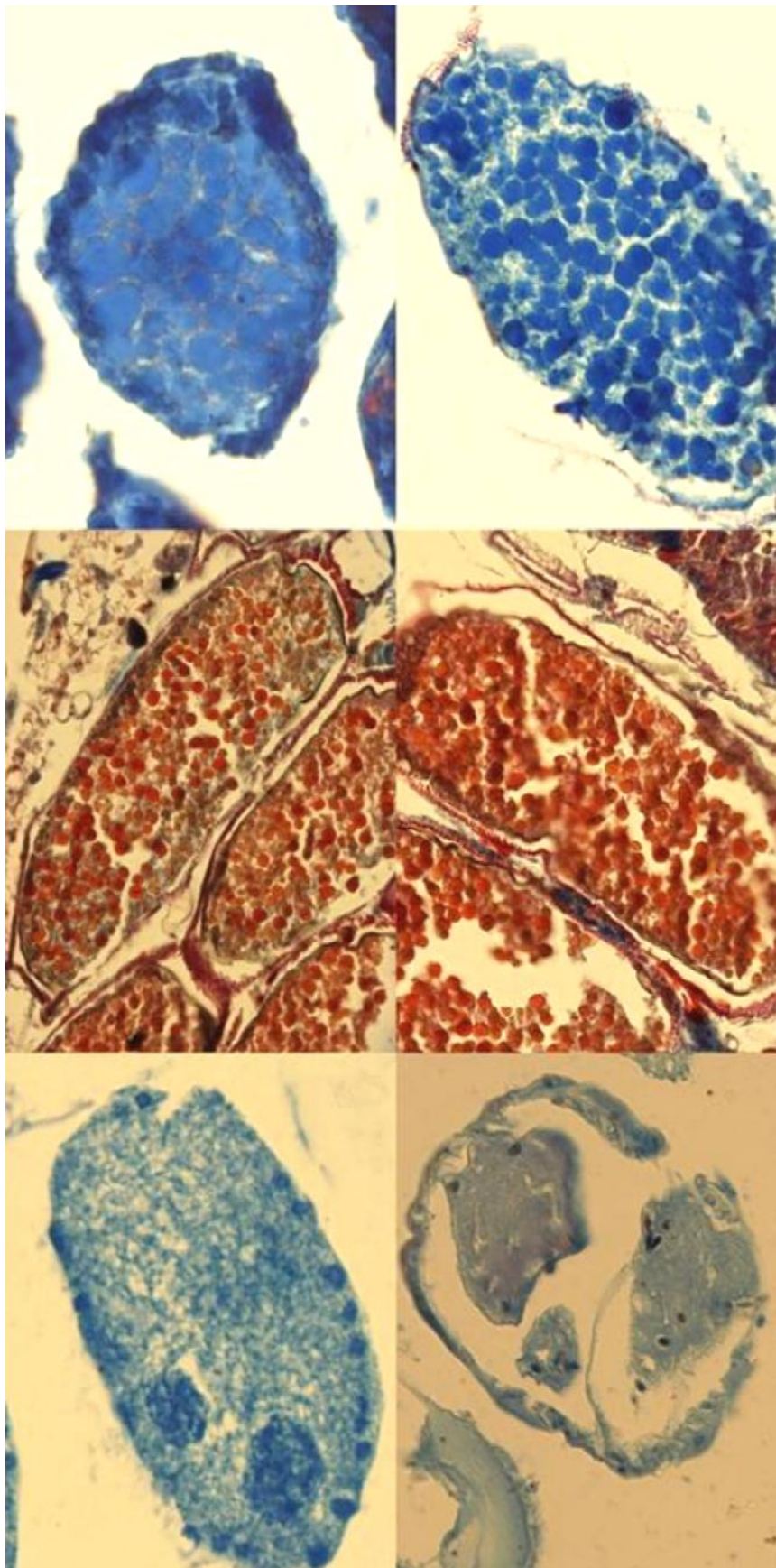
3B- folikul z autogéní snůšky samice staré 48-72h ,

3C-folikul z anautogéní snůšky samice ošetřené v larválním stádiu látkou RH-5992 staré 48-72h,

4A- folikul z anautogéní snůšky samice staré 72-120h ,

4B- folikul z autogéní snůšky samice staré 72-120h ,

4C-folikul z anautogéní snůšky samice ošetřené v larválním stádiu látkou RH-5992 staré 72-120h.



8.3. Popisky k obrazové příloze 3:

6A- folikul z anautogéní snůšky samice staré 120-144h ,

6B- folikul z autogéní snůšky samice staré 120-144h, ,

6C-folikul z anautogéní snůšky samice ošetřené v larválním stádiu látkou RH-5992 staré 120-144h,

7A- folikul z anautogéní snůšky samice staré 144-168h ,

7B- folikul z autogéní snůšky samice staré 144-168h, ,

7C-folikul z anautogéní snůšky samice ošetřené v larválním stádiu látkou RH-5992 staré 144-168h.

