

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
BAKALÁŘSKÁ DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**SEZÓNÍ ZMĚNY HLADINY ADIPOKINETICKÝCH HORMONŮ
U LÝKOŽROUTA SMRKOVÉHO (*IPS TYPOGRAPHUS* L.)**



**MARTINA MORAVCOVÁ
2010**

**VEDOUCÍ PRÁCE:
Doc. RNDr. Dalibor Kodrík, CSc., RNDr. Petr Doležal PhD.**

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své 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.

Finanční podpora:

Výzkum byl podpořen projektem 522/08/P600 Grantové agentury České republiky a projektem číslo 28 v rámci programu Cíl 3 2007 – 2013 Česká republika – Svobodný stát Bavorsko.

Ráda bych na tomto místě upřímně poděkovala svým školitelům Daliborovi Kodříkovi a Petru Doležalovi za ochotu, odborné vedení práce, nespočet cenných připomínek a hlavně trpělivost. Dále patří můj dík všem z laboratoře, kteří mi jakkoliv pomohli během práce. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodině za podporu během celého studia.

.....
Martina Moravcová

V Českých Budějovicích, 22.4.2010

BAKALÁŘSKÁ DIPLOMOVÁ PRÁCE

MORAVCOVÁ, MARTINA, 2010:

SEZÓNŇÍ ZMĚNY HLADINY ADIPOKINETICKÝCH HORMONŮ U LÝKOŽROUTA SMRKOVÉHO (*IPS TYPOGRAPHUS* L.) [SEASONAL CHANGES OF ADIPOKINETIC HORMONE IN SPRUCE BARK BEETLE (*IPS TYPOGRAPHUS* L.). BACHELOR THESIS, IN CZECH] – 29 p., FACULTY OF SCIENCE, THE UNIVERSITY OF SOUTH BOHEMIA, ČESKÉ BUDĚJOVICE, CZECH REPUBLIC.

ANNOTATION:

The aim of the thesis was to analyze and to quantify the adipokinetic hormones (AKHs) of the spruce bark beetle *Ips typographus*. The RP HPLC was employed for the AKHs identification, and a competitive ELISA for their quantification. Those methods indicated that the Peram-CAH-I and Peram-CAH-II could be the AKH representatives, and that their levels fluctuate during a year. The results also suggested that the hormones might substitute themselves within certain periods of the year.

OBSAH:

<u>1. ÚVOD</u>	5 - 13
1.1. Lýkožrout smrkový (<i>Ips typographus</i> L.)	5
1.1.1. Životní cyklus	5 - 6
1.1.2. Přezimování a diapauza	7 - 8
1.2. Endokrinní soustava hmyzu	9
1.2.1. Adipokinetické hormony	9 - 11
1.2.2. AKH a mobilizace energetických zásob	11
1.2.2.1. Mobilizace lipidů	11 - 12
1.2.2.2. Mobilizace glycidů	12 - 13
<u>2. CÍLE PRÁCE</u>	14
<u>3. MATERIÁLY A METODY</u>	14 - 18
3.1. Pokusná zvířata	14
3.2. Získání neurosekretorického komplexu	14
3.3. Příprava extraktu z CNS	15
3.4. Pre -purifikace peptidů na Kolonce C-18 Sep Pak	15
3.5. Izolace adipokinetického hormonu z předčištěného extraktu CNS (HPLC)	15 - 16
3.6. ELISA – kvantitativní stanovení AKH	16 - 18
3.7. Statistické zpracování výsledků	18
<u>4. VÝSLEDKY</u>	19 - 21
<u>5. DISKUZE</u>	22 - 24
<u>6. ZÁVĚR</u>	25
<u>7. POUŽITÁ LITERATURA</u>	26 - 29

1. ÚVOD

1.1. Lýkožrout smrkový (*Ips typographus* L.)

Lýkožrout smrkový je jedním z nejznámějších a zároveň nejzávažnějších škůdců lesních porostů s převahou smrku v celé střední Evropě. Kalamity způsobené lýkožroutem smrkovým jsou zaznamenávány již od 15. století. První rozsáhlé přemnožení proběhlo v 19. století, následovala kalamita po II. světové válce a poslední rozsáhlá gradace propukla v 70. letech dvacátého století. Všechny tři zasáhly významnou měrou i porosty v České republice (Skuhravý, 2002).

Lýkožrout smrkový (*Ips typographus* L.) se řadí do čeledi nosatcovitých (Curculionidae), podčeledi kůrovcovitých (*Scolytinae*), řádu brouků (*Coleoptera*). Jedná se o drobného, hnědočerného, matně lesklého brouka velkého 4,2-5,5 mm. Celé tělo má pokryté jemnými žlutými chloupky, což jej spolu s dalšími znaky odlišuje od ostatních zástupců rodu *Ips* (Skuhravý, 2002). Vajíčka jsou oválná a v poměru k velikosti brouka malá. Vylíhlá larva je bílá a beznohá. Dospělá larva třetího instaru měří 5-7 mm. Kukla je též bílá, dlouhá 5-6 mm a jsou na ní rozpoznatelné budoucí orgány (Zumr, 1985). Lýkožrout smrkový nejčastěji obývá smrk ztepilý (*Picea abies*), a to v jeho spodní a střední části, kde je kůra rozpraskaná a šupinatá. Živí se zde lýkem. Vybírá si hlavně stromy oslabené, poškozené či staré. Tyto stromy se nedokáží efektivně bránit náletu brouků. Při přemnožení brouci napadají i zdravé stromy, které se brání vyléváním pryskyřice. Lýkožrout smrkový se může vyskytovat i na jiných zástupcích smrku případně jiných druhích jehličnatých stromů, například modřínu, borovici nebo jedli (Skuhravý, 2002).

Při napadení stromu lýkožroutem smrkovým hraje významnou roli olfaktorická orientace. V prvé řadě se uplatňují tzv. primární atraktanta vylučovaná samotným smrkem, která jsou však velmi nestálá. Tímto způsobem pionýrství samci z jara vyhledávají vhodný strom. Po napadení stromu začnou samci vylučovat agregační feromony. Tento stav trvá několik hodin až dní (Birgersson a kol., 1984). Na agregační feromony reagují samičky (i další samci), které přilétají do již připravených snubních komůrek, kde poté dochází k rozmnožování.

1.1.1. Životní cyklus

Životní cyklus lýkožrouta smrkového je velmi závislý na teplotě. Teplotně podmíněné je rozmnožování, letová aktivita i mortalita během zimního období. Celý vývoj jedince trvá 6-10 týdnů v závislosti na podmínkách, ve kterých se vyvíjí.

Samec okamžitě po náletu na strom vyhledává snubní komůrku a láká do ní samičky agregačními feromony (viz. výše). Páří se obvykle se dvěma až třemi (při velkém přemnožení až pěti) samičkami. Ty po oplodnění vykusují vertikální matečné chodby, po jejichž stranách snáší vajíčka. V průměru snesou 60-80 vajíček (Wermelinger, 2004) při prvním ovariálním cyklu v optimální teplotě 15-25 °C. V rozmezí těchto teplot trvá vývoj vajíčka 6-12 dnů. Následuje postupné líhnutí larev v závislosti na době, kdy byla vajíčka snesena. Larvy se postupně prožirají do lýka a vytvářejí chodby kolmé na chodbu matečnou. Larva se vyvíjí po dobu 11-30 dnů, přičemž vývoj závisí na abiotických faktorech, a následně se larva třetího instaru přeměňuje v kuklu. Stádium kukly může být občas nalezeno i během přezimování. Po 6-17 dnech se z kukly vylíhne brouk, který je zprvu bílý a postupem času tmavne. Čerstvě svlečená imága nejsou schopna okamžitého rozmnožování. Nejprve musí prodělat tzv. zralostní žír, během něhož se jim vyvíjí letová svalovina a pohlavní orgány. Existují jisté rozdíly mezi pohlavím. Samicím musí během zralostního žíru dozrát ovária, zatímco samci mají zralé pohlavní orgány již po imaginální ekdysi a zralostní žír slouží především k rozvoji létacích svalů před rojením. Samci díky časně zralosti pohlavních orgánů končí žír dříve, takže se projeví jejich převaha na počátku rojení (Doležal, 2002). Během roku se obvykle plně vyvinou dvě generace lýkožrouta smrkového, při příznivých teplotních podmínkách v nižších polohách i tři. Vlivem teploty na rychlost vývoje se zabývá práce Wermelinger a Seiferta z roku 1998 a 1999.

Jedinci tohoto druhu zpravidla hromadně opouštějí zimoviště za teplých a slunečných dnů koncem dubna a na počátku května, aby vyhledali vhodná místa k založení nové generace – tento jev se nazývá jarní rojení. Letní rojení je oproti jarnímu více rozptýlené (Zumr, 1985). Nastává od poloviny července do prvních srpnových dnů. Někdy, jak již bylo zmíněno, pozorujeme i třetí rojení, které probíhá za enormně příznivých podmínek až do poloviny září. Nově založená generace brouků z třetího rojení nedokončuje do nástupu nízkých podzimních a zimních teplot plně svůj vývoj a přezimuje v podobě kukly či pohlavně nedozrálého brouka (Martínek, 1957). Do tří týdnů po hlavních rojeních (jarní, letní) se můžeme setkat s tzv. sesterským přerojením. Samičky opouštějí v tuto dobu mateční chodby a zakládají nové sesterské pokolení na původním nebo častěji nově napadeném stromě bez další kopulace. Avšak před samotným založením sesterské generace musí samička projít kratším regeneračním žírem. Zakládáním sesterského pokolení se zabýval Martínek (1961).

1.1.2. Přezimování a diapauza

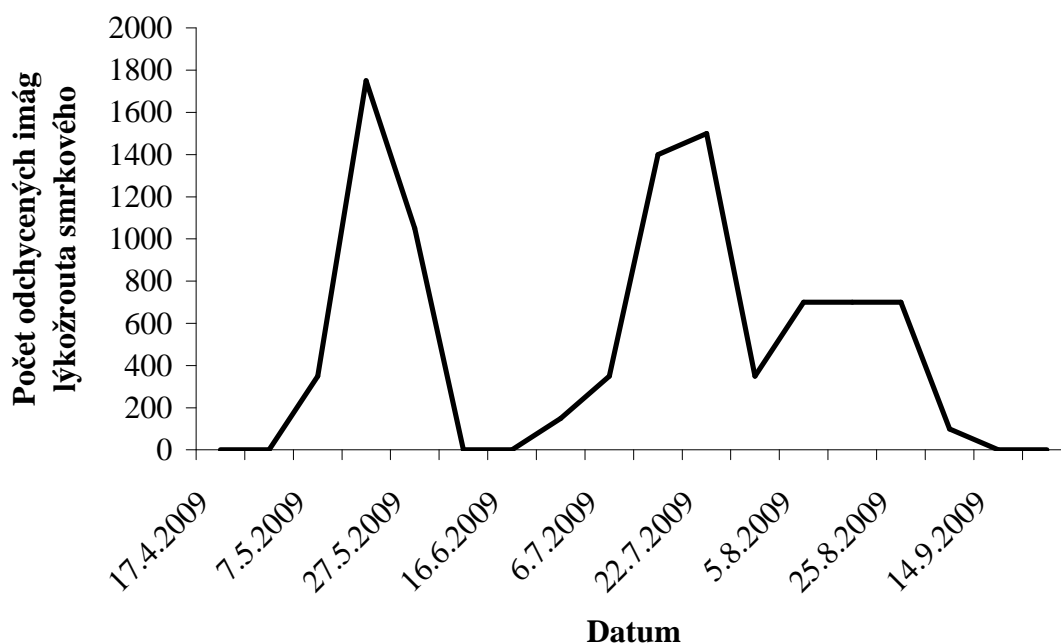
Lýkožrout smrkový přezimuje pod kůrou stromů stojících i padlých, někdy přezimuje i v hrabance v bezprostředním okolí stromu (do 5 m). Počet přezimujících jedinců se vzdáleností od stromu prudce klesá. Procento přezimujících brouků v hrabance se zvyšuje v závislosti na tom, zda-li poslední generace dosáhla vývojového imaginálního stádia a zda-li tato imága prodělala zralostní žír. Kromě dospělců přezimují v kůře v malé míře i ostatní vývojová stádia lýkožrouta smrkového včetně vajíček (Zumr, 1985).

Mortalita během zimního období je velmi vysoká. U dospělých brouků nepřežívá zimu 49 % jedinců, avšak u larev se jedná až o 91 % a u kukel o 86 % (Faccoli, 2002). Z vlastního pozorování jsem zjistila, že v zimním období se v kůře nalézají světlí brouci a larvy či kukly jen výjimečně. Přezimující mladší vývojová stádia je možno častěji pozorovat v nižších polohách, případně v ležících kmenech zapadaných sněhem. Mortalitu lýkožrouta smrkového neovlivňuje pouze teplota, ale i pokrytí napadeného stromu sněhem během zimy. Díky izolačním vlastnostem sněhové vrstvy jsou lýkožrouti konfrontováni s poměrně konstantní teplotou 0 až -2 °C, která pozastaví vývoj, ale nezpůsobí masivnější úhyn (Doležal – osobní sdělení). Dalším faktorem, jenž ovlivňuje mortalitu přezimujících brouků, je přítomnost široce rozšířených parazitoidů (organismus vyvíjející se v těle hostitele v podobě larvy a po dokončení vývoje hostitele usmrtí a zpravidla i zkonsumuje) jako například kovověnka kladélkatá (*Roptrocerus xylophagorum*) či lumčík dutohlav (*Coeloides bostrichorum*) (Faccoli, 2002).

Lýkožrout smrkový přežívá nepříznivé podmínky zimy pod kůrou smrku v klidovém stavu. Základním termínem pro jakékoliv podobné potlačení vývoje, obvykle doprovázené utlumením metabolismu, je dormance. Dormanci můžeme dále dělit na kviescenci a diapauzu. Kviescence je přímá odezva jedince na nedostatek limitujícího faktoru, který poklesne pod fyziologický práh (Košťál, 2006). Jedinec zpomalí či zastaví svůj vývoj, který se opět obnoví po odeznění nepříznivých podmínek. Diapauza je vnitřně řízený proces, který trvá několik dnů až měsíců. Jedná se o hlubší přerušení vývoje spojené se zpomalením fyziologických procesů. Během diapauzy jedinci nepřijímají potravu, a pokud ano, pak jen ve velmi malém množství (Hahn a Denlinger, 2007). Rovněž je zastaveno rozmnožování, dochází k redukci létacích svalů a rozvoji tukového tělesa (Doležal, 2002). Tukové těleso slouží mimo jiné jako zásoba energetických rezerv na překonání nepříznivých podmínek. Diapauzu můžeme dělit do tří fází – pre-diapauza, diapauza a post-diapauza. Během pre-diapauzy pokračuje vývoj, ale díky podnětům z okolí (např. fotoperioda, teplota, vyčerpání zdroje živin, kvalita potravy, ...) přechází jedinci do diapauzy. Post-diapauza (kviescence) nastává při změně limitujících

faktorů, tak aby mohl pokračovat vývoj. Během této fáze se však vnitřními faktory (hormony) inhibuje vývoj. Inhibice slouží například k zabránění předčasného vývoje při krátkodobě zvýšených jarních teplotách (Košťál, 2006).

U lýkožrouta smrkového zahrnuje období dormance jak diapauzu, tak kviescenci. Hlavním faktorem indukujícím imaginální diapauzu (pre-diapauzu) u přírodních populací lýkožrouta smrkového je fotoperioda. V laboratorním experimentu bylo prokázáno, že kritická délka světelné části dne při níž dochází u 50 % jedinců k indukci diapauzního vývoje, je 14,7 hodin (Doležal a Sehnal, 2007a). To odpovídá zhruba polovině srpna. Od této doby dochází v přírodě k postupnému zastavení reprodukce, brouci snižují letovou aktivitu, což souvisí s postupnou redukcí létací svaloviny (Doležal a Sehnal, 2007b), a připravují se intenzivním žírem spojeným s hromaděním energetických rezerv na přezimování. Tomu odpovídají i počty brouků odchycených do feromonových lapačů od 25.8. do 14.9.2009 (**Obr. 1**). Diapauza bývá ukončena v polovině prosince a následně přechází brouci do post-diapauzního stavu - kviescence. U lýkožrouta smrkového není přesně známo, jakým způsobem přechází z diapauzního do kviescenčního stavu. V laboratorních podmínkách při zvýšené teplotě a prodloužení fotoperiody, po prodělání kratšího žíru, začnou být kviescenční brouci plně aktivní již po 10 dnech.



Obr. 1 Počet brouků odchycených do feromonových lapačů v lokalitě Kubova Huť (1100 m n.m.). Průměrné hodnoty ze tří lapačů (Doležal – nepublikováno).

1.2. Endokrinní soustava hmyzu

Endokrinní soustava hmyzu je těsně spjata s nervovou soustavou. Oproti nervové soustavě pracuje relativně pomalu a s dlouhodobějším účinkem. Hormony, které nacházíme u hmyzu, mají nesčetně funkcí. Řídí metabolické děje, vývoj, růst, reprodukci, svalovou aktivitu a mnoho dalších procesů.

U hmyzu nalézáme dvě hlavní endokrinní soustavy, které produkují hormony a několik dalších buněk s endokrinní funkcí. První skupinou je komplex spojený s hmyzím mozem, který zahrnuje jeho neurosekretorické buňky a endokrinní žlázy corpora cardiaca (CC), kde je produkován adipokinetický hormon a některé další neuropeptidy, a corpora allata (CA), v nichž se syntetizuje juvenilní hormon. CC navíc slouží i jako neurohemální orgán pro mozkové neurohormony. Ústí sem zakončení axonů některých neurosekretorických buněk mozku. Druhou soustavou jsou prothorakální žlázy, ve kterých se produkují ekdysteroidy. Prothorakální žlázy mají nepravidelný tvar a nalézají se zpravidla v prvním hrudním článku. Mezi další buňky s endokrinní funkcí patří neurosekretorické buňky ganglií břišní nervové pásky, endokrinní buňky střeva a epitracheální buňky. Hormony jsou syntetizovány i v gonádách, které řídí především rozmnožování.

1.2.1. Adipokinetické hormony

Adipokinetické hormony (AKH) jsou malé neuropeptidy produkované, jak již bylo zmíněno, v CC. Tento orgán je u řady druhů hmyzu tvořen zásobním a žláзовým lalokem. Je umístěn tak, že přiléhá k aortě, kde se z něj do hemolymfy uvolňují hormony (Vullings a kol., 1995). Jedná se o jedny z nejlépe prozkoumaných hormonů, které patří do skupiny peptidů zvané RPCH/AKH rodina (red pigment concentrating hormone/adipokinetic hormone family). Dnes známe zhruba 50 zástupců těchto hormonů, které byly nalezeny u mnoha různých druhů hmyzu (Gäde, 2009). První strukturně charakterizovaný AKH pocházel ze saranče *Locusta migratoria*, a byl to vůbec první hmyzí neurohormon, u nějž byla objasněna primární sekvence aminokyselin (Stone a kol., 1976). Podle dnešní nomenklatury se označuje jako Locmi-AKH-I.

Adipokinetické hormony mají funkci stresových hormonů. Stimulují katabolické reakce a inhibují reakce syntetické. Jsou schopné mobilizovat energetické zásoby a potlačit momentálně méně důležité syntetické procesy, které by mohly odčerpat energii mobilizovanou na řešení stresu. AKH spojujeme se zvýšenou poptávkou po energii při práci hmyzích svalů - při letu, či pohybu všeobecně. Přísun energie k letovým svalům je zajištěn oxidací glycidů, lipidů, aminokyselin prolinu či kombinací zmíněných látek, přičemž výběr

substrátu je druhově specifický (Gäde a Auerswald, 2003). AKH však mají pleiotropní účinky, tzn. zajišťují více funkcí. Laboratorními pokusy bylo dokázáno, že na biochemické úrovni aktivují adenylát cyklázu (Spencer a Candy, 1976), fosfolipázu C (Vroenen a kol., 1997), glykogenfosforylázu (Van Marrewijk a kol., 1980) a inhibují syntézu RNA (Kodrík a Goldsworthy, 1995), proteinů (Carlisle a Loughton, 1979), lipidů (Gokuldas a kol., 1988). Na fyziologické úrovni stimulují srdeční rytmus (Scarborough a kol., 1984), zvyšují pohybovou aktivitu (Socha a kol., 1999), inhibují dozrávání vajíček (Lorenz, 2003). Doposud známé funkce AKH, včetně těch, které nejsou spojeny s produkcí a následnou bezprostřední spotřebou energie jsou uvedeny v **Tab. 1** (Kodrík, 2008).

Tab. 1: Hlavní funkce adipokinetických hormonů v hmyzím těle (Kodrík, 2008).

Základní metabolické funkce	
mobilizace lipidů (diacylglycerol)	
mobilizace sacharidů (trehaóla)	
syntéza prolinu	
Biochemické funkce	
aktivace adenylát cyklázy	Spencer a Candy, 1976
aktivace lipázy	Spencer a Candy, 1976
aktivace fosfolipázy C	Vroenen a kol., 1997
aktivace glykogen fosforylázy	Van Marrewijk a kol., 1980
zvýšení kapacity lipoproteinových přenašečů	Kanost a kol., 1990
aktivace antioxidantního mechanismu	Kodrík a kol., 2007
inhibice syntézy RNA	Kodrík a Goldsworthy, 1995
inhibice syntézy proteinů	Carlisle a Loughton, 1979
inhibice syntézy lipidů	Gokuldas a kol., 1988
Fyziologické funkce	
stimulace srdečního rytmu	Scarborough a kol., 1984
zvýšení svalového tonusu	O'Shea a kol., 1984
stimulace pohybu	Socha a kol., 1999
stimulace imunitní odpovědi	Goldsworthy a kol., 2002 b
inhibice vývoje vajíčka	Lorenz, 2003
regulace hladem indukovaného chování u <i>Drosofil</i>	Lee a Park, 2004

AKH tvoří peptidické řetězce složené z 8 – 10 aminokyselin. Oba konce molekuly jsou blokovány, na N-konci se nalézá zbytek kyseliny pyroglutamové a C-konec je amidován. Na 8 a 9 pozici je navázán tryptofan a glycin, k tomu se na řetězci vyskytují alespoň dvě aromatické aminokyseliny (tryptofan, fenylalanin či tyrosin) (Gäde a kol, 1997). Výjimku tvoří babočka bodláková (*Vanessa cardui*) (Köllisch a kol, 2000), jejíž adipokinetický

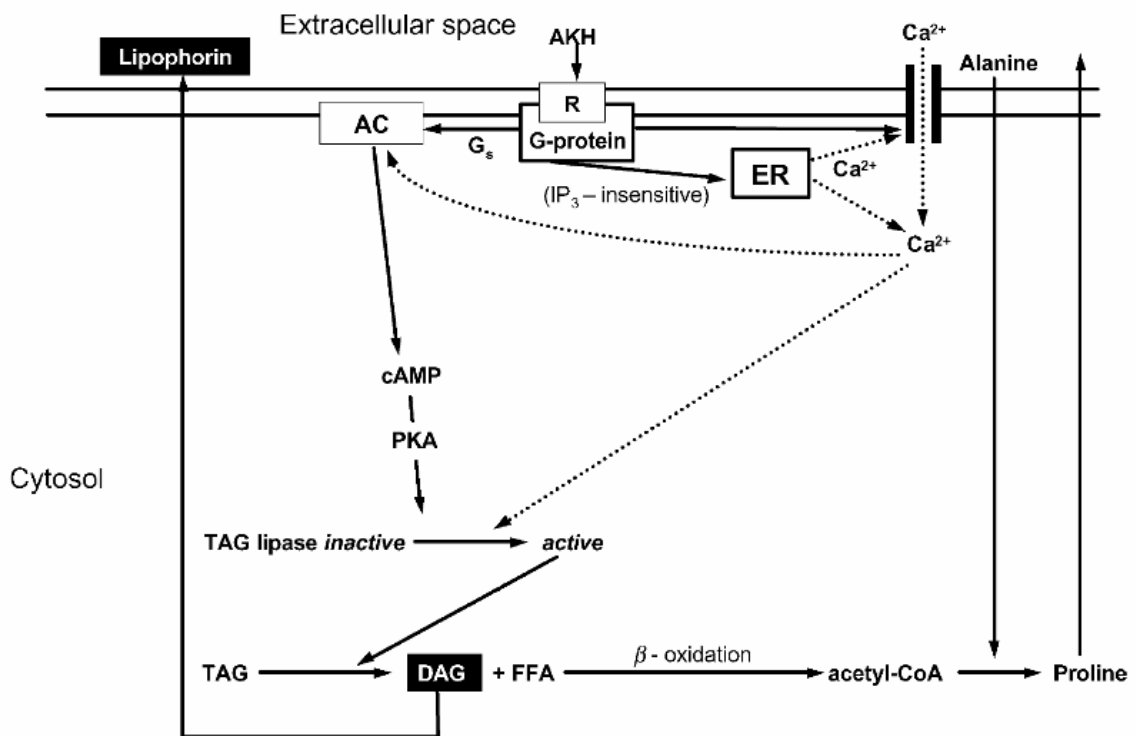
hormon se skládá z 11 aminokyselin. Každý z hormonů má specifickou mRNA, která je translatována do prekursoru pre-pro-AKH o složení: signální peptid + příslušná AKH sekvence + sekvence pro další peptid s neznámou funkcí (Van der Horst a kol., 2001).

1.2.2. AKH a mobilizace energetických zásob

Hmyzí let je energeticky velmi náročná aktivita spojená s působením AKH. Regulace vylévání AKH z CC do hemolymfy během letu není zcela známá. Předpokládá se, že neurony ovlivňující sekreci AKH jsou spojené v CNS s neurony řídicími let (Bloemen a Beenackers, 1985). Podle jiné teorie je uvolňování AKH z CC ovlivněno podněty z tarsálních sensil podrážděných při vzletu (Goldsworthy, 1983). Mechanismus působení AKH na buněčné úrovni je substrátově specifický. AKH nedokáže procházet cytoplazmatickou membránou, využívají proto membránové receptory pro přenos signálu do buňky. Receptor interaguje s G-proteinem, který následně spouští kaskádu reakcí, jenž vedou ke štěpení substrátu.

1.2.2.1. Mobilizace lipidů (Obr. 2)

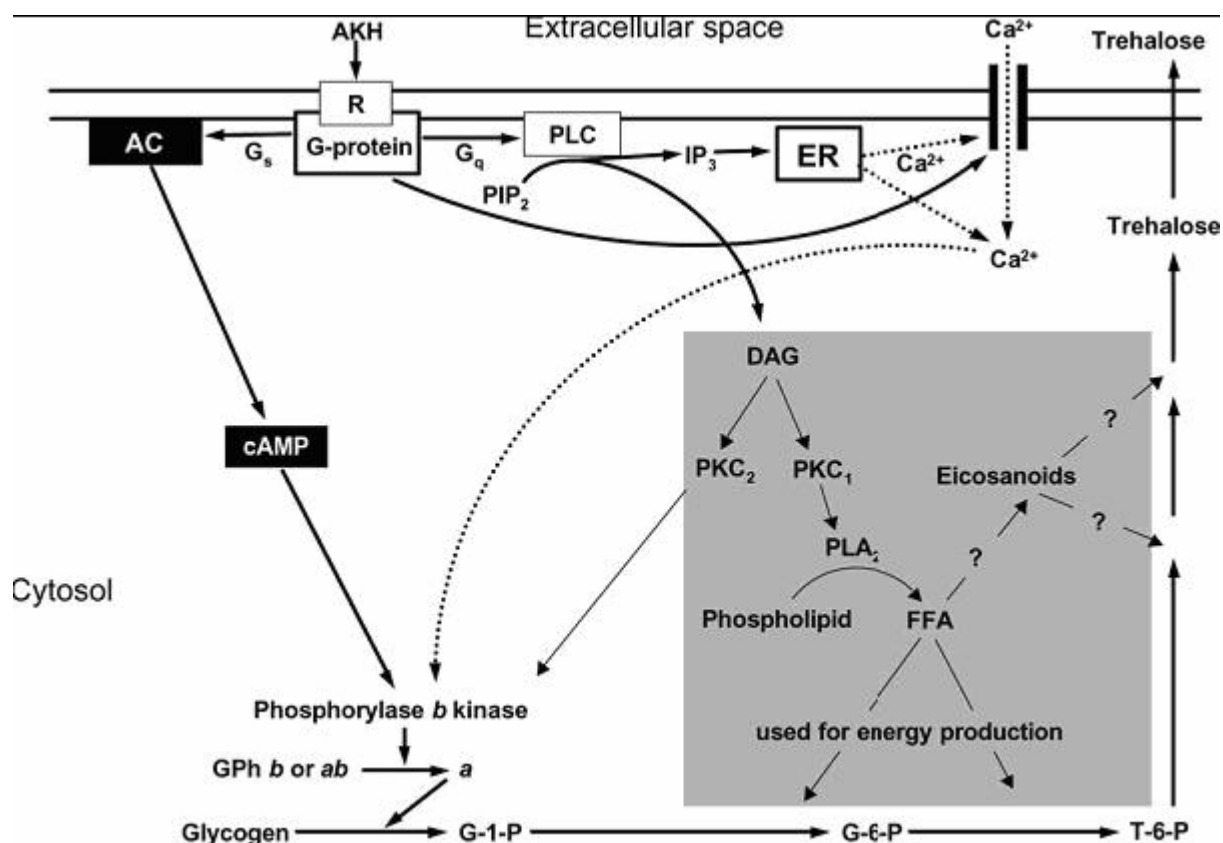
Po navázání AKH na specifický receptor spojený s G-proteinem, dojde ke konformační aktivaci adenylátcyklázy přičemž dochází k produkci druhého posla cAMP závislého na extracelulárních Ca^{2+} iontech. cAMP spouští proteinkinázovou kaskádu, která ve finálním kroku katalyzuje fosforylaci cílové lipázy. Lipáza štěpí triacylglycerol na diacylglycerol (DAG), který je hlavní transportní formou tuků. DAG je po průchodu cytoplazmatickou membránou do hemolymfy vázán na prázdný lipoforinový nosič HDLp (high-density lipophorin), jenž se skládá z apolipoproteinu I a apolipoproteinu II. Vzniklá částice se nazývá LDLp (low-density lipophorin). LDLp přenáší DAG k cílovým buňkám (nejčastěji k létacím svalům), kde se rozštěpí na glycerol a mastné kyseliny, které prodělávají β -oxidaci – ta je hlavním zdrojem energie. Lipoforinový přenašeč se uvolní a je připraven pro další přenos molekuly DAG (Van der Horst a kol., 2001). Některé druhy hmyzu (někteří brouci a dvoukřídlí) využívají jako energetický zdroj aminokyselinu prolinu, jejíž syntéza se považuje za boční větev mobilizace lipidů (viz. **Obr. 2** vpravo dole). Volné mastné kyseliny vznikající činností lipázy prodělávají β -oxidaci a vzniklý acetylkoenzym A, se podílí na produkci prolinu (Auerswald a Gäde, 1999).



Obr. 2 Mobilizace lipidů zprostředkovaná působením AKH. Zkratky: AC, adenylát cykláza; cAMP, cyklický adenosinmonofosfát; CoA, koenzym A; DAG, diacylglycerol; ER, endoplasmatické retikulum; FFA, volné mastné kyseliny; IP₃, inositoltrifosfát; PAK, protein kináza A; R, receptor; TAG, triacylglycerol. (Gäde a Auerswald, 2003).

1.2.2.2. Mobilizace glycidů (Obr. 3)

U některých hmyzích zástupců (např. švábi a někteří brouci) funguje odlišný mechanismus, který vede k mobilizaci glycidů. Po aktivaci G-proteinu dojde ke stimulaci fosfolipázy C, která štěpí inositolový fosfolipid na inositol trifosfát (IP₃) a DAG. IP₃ napomáhá uvolňování Ca²⁺ iontů z endoplasmatického retikula, které spolu s DAG spouští proteinkinázovou kaskádu. Jejím hlavním úkolem je aktivovat glykogen fosforylázu, která štěpí glykogen na glukózu. Ta se přeměňuje na trehalozu (D-glukopyranosyl-D-glukopyranosid), která prochází přes membránové kanály a k přepravě k cílovým buňkám nevyužívá žádné přenašeče. Ve svalových buňkách se přeměňuje opět na glukózu, která je dále štěpena za vzniku potřebné energie.



Obr. 3 Mobilizace glycidů zprostředkovaná působením AKH. Zkratky: AC, adenylát cykláza; cAMP, cyklický adenosinmonofosfát; DAG, diacylglycerol; ER, endoplasmatické retikulum; FFA, volné mastné kyseliny; G-1-P, glukóza-1-fosfát; G-6-P, glukóza-6-fosfát; GPh glykogen fosforyláza; IP₃, inositoltrifosfát; PIP₂, fosfatidytyinositol bisfosfát; PAK, protein kináza A; PKC, protein kináza C; PLC, fosfolipáza C; R, receptor; T-6-P, trehalóza-6-fosfát. Bílým písmem v černém rámečku je naznačena cesta, která je platná pro saranče. (Gäde a Auerswald, 2003).

2. CÍLE PRÁCE

- Analýza adipokinetických hormonů u lýkožrouta smrkového (*Ips typographus* L.).
- Kvantitativní stanovení a porovnání hladiny adipokinetických hormonů v různých obdobích během jednoho roku.

3. MATERIÁLY A METODY

3.1. Pokusná zvířata

Pokusná zvířata používaná v této práci byla odebírána přímo z volné přírody. Zvířata byla odchytávána pomocí lapáků či feromonových lapačů z oblasti Kubovy Hutě v okrese Prachatice. K pokusu byli použiti brouci odebíráni v různých časových obdobích během roku. První skupinu tvořili brouci vybráni z kůry lapáků v období od 29.1.09 – 6.2.09 (dále jen 3.2.). Za pomoci dláta byl odkorněn špalek a následně byli pomocí entomologické pinzety vybráni brouci, kteří byli okamžitě ukládáni v uzavíratelné zkumavce do nádoby s ledem a následně uchováváni při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ v mrazícím zařízení. Další vzorky pocházely z feromonových lapačů, a to z 28.4.09, 22.7.09, 18.8.09 (dále jen 28.4., 22.7., 18.8.), diapauzní jedinci z 27.10.09 (dále jen 27.10.) byli vybíráni opět z lapáků. K pokusu byli použiti samci i samice.

Lapák - jedná se o pokácený strom, jemuž se ponechá kůra; neměl by ležet přímo na zemi, aby byla volná plocha pro nálet lýkožrouta (Zumr, 1985)

Feromonový lapač - jsou to lapací zařízení, v kterých je umístěno médium, na které se nanáší sekundární atraktanta (feromony), která se pozvolna odpařují a lákají lýkožrouta smrkového (Zumr, 1985)

3.2. Získání neurosekretorického komplexu

Pitva vlastního neurosekretorického komplexu se ukázala jako časově neefektivní, proto byly k přípravě extraktu z CNS používány celé hlavy brouků. Pro každé období bylo sběrem získáno 1000 brouků. K získání hlav byl třeba binokulární mikroskop, pinzeta, žiletka, nádoba s ledem a mikrozukavky. Pomocí žiletky byla odříznuta hlava s částí předohrudi, tak aby byla zajištěna přítomnost CNS i s neurosekretorickými žlázami CC. Takto získaný materiál byl ukládán do mikrozukavky, která se nacházela v nádobě s ledem. Poté byly vzorky uskladněny pro další použití v mrazícím zařízení ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$).

3.3. Příprava extraktu z CNS

Připravené hlavy byly vloženy v počtu 500 kusů do homogonizátoru (IKA ULTRA-TURAX Tube Drive) za přidání 5 ml 80 % metanolu a poté 3 minuty homogonizovány kovovými kuličkami. Přístroj byl nastaven na nejvyšší možnou rychlost (6000 otáček/min). Homogonizátor byl po práci důkladně promyt dalšími 2ml metanolu, aby nedocházelo ke ztrátám. Metanolvý homogonát byl dále sonikován jehlovým sonikátorem Ultrasonic homogonizer 4710 (Cole Parmer Instrument Co.). Vzorek byl následně centrifugován (EBA 12 R, Hettich Zentrifugen) při teplotě 4 °C po dobu 5 minut při 15 000 otáčkách. Vzniklý supernatant byl odpipetován do zkumavek. Sediment byl extrahován metanolem ještě dvakrát stejným způsobem. Extrakty byly spojeny a následně vysušeny ve vakuové centrifuze RC 10.22. (Jouan). Poté byly vzorky opět skladovány v mrazícím zařízení.

3.4. Pre -purifikace peptidů na kolonce C-18 Sep Pak

Roztoky:

- roztok A – 0,11 % kyselina trifluoroctová (TFA) v H₂O
- roztok B – 60 % acetonitril v 0,1 % kyselině trifluoroctové v H₂O

Pro další práci bylo nutné extrakt CNS předčistit na koloně Sep Pak C-18 (Waters). Nejprve byla kolona, nasazená na vakuovou komůrku Supelco, aktivována pomalým protékáním (asi 1 ml za minutu) 5-10 ml 100 % roztoku B. Následně byla kolona promývána a ekvilibrována 5-10 ml roztoku A. Vzorek byl důkladně rozpuštěn ve 2,5 ml roztoku A a nanesen na kolonu. Vytékající roztok byl jímán a promyt kolonou znovu. Kolona s navázaným vzorkem byla opět promyta 5-10 ml roztoku A, čímž došlo k odstranění případných navenázaných zbytků vzorku. Nakonec byly navenázané peptidy eluovány 60 % roztokem B o objemu 2-2,5 ml. Poté byl vzorek odpařen ve vakuové centrifuze a následně byl uložen do mrazničky pro další zpracování.

3.5. Izolace adipokinetického hormonu z předčištěného extraktu CNS (HPLC)

Roztoky:

- roztok A – 0,11 % kyselina trifluoroctová (TFA) v H₂O
- roztok B – 60 % acetonitril v 0,1 % kyselině trifluoroctové v H₂O

Extrakt CNS byl dále purifikován pomocí RP HPLC (Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography), na zařízení Waters ovládaném pomocí programu

Clarity (Data Apex, Praha) na koloně Chromolith Performance RP–18e (Merck). Vysušený extrakt CNS z 1000 brouků byl rozpuštěn ve 250 μ l rozpouštědla (35 % roztok B a 65 % roztok A). Vzorek byl sonikován a následně centrifugován 5 minut při 5000 otáčkách. Takto připravený vzorek byl injikován do systému (ekvivalent 300-400 hlav) a dělen pomocí gradientu acetonitril - voda za následujících podmínek: 0-8 min 35 % roztok B, 8-20 min 35-80 % roztok B, průtok – 1ml/min, fluorometrická detekce – λ_{ex} = 280 nm, λ_{em} = 348 nm. Pro zjištění oblasti eluce hormonů z kolony byly použity retenční časy syntetických hormonů Peram-CAH-I (RT=4,83 min) a Peram-CAH-II (RT= 10,64 min), které byly nanесeny na kolonu za stejných podmínek. Vzorky sebrané podle těchto časů byly opět vysušeny a kvantifikace AKH provedena pomocí ELISA testu.

3.6. ELISA – kvantitativní stanovení AKH

Enzyme – linked immunosorbent assay je imunochemická metoda, která existuje v mnoha variantách (přímá, nepřímá, sendvičová a kompetitivní). Tato metoda se používá poměrně často díky jednoduché aplikaci antigenu či protilátky na mikrodestičky. Výsledkem reakce je zbarvení jednoduše změřitelné spektrofotometrem (Crowther, 1995). Při kvantitativním stanovení hladiny AKH byla použita kompetitivní ELISA, kde značený AKH o známém množství soupeří o vazbu na limitovaném množství protilátky se stanovovaným AKH. Pro práci byla použita králičí protilátka proti AKH z *Pyrrhocoris apterus* Pyrap–AKH, která je schopna rozeznat i Peram-CAH-I a Peram-CAH-II (Goldsworthy a kol., 2002a)

Roztoky:

- aplikační pufr: pH = 9,6; 0,1 M bikarbonátový pufr (uhličitan sodný Na_2CO_3 , hydrogenuhličitan sodný NaHCO_3)
- promývací pufr: pH = 7,5; 10 nM PBS pufr (hydrogenfosforečnan sodný $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, dihydrogenfosforečnan sodný $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, chlorid sodný NaCl), 0,1 % Tween 20 (polyoxyethylensorbitanmonopalmitát)
- blokovací pufr: 5 % roztok sušeného mléka, 0,1 % Tween-20 v promývacím pufu
- OPD substrát: 12,15 ml kys. citrónové + 12,85 ml Na_2HPO_4 + 4,25 mg OPD (ortofenylendiamin) + 1,25 μ l 30 % H_2O_2 (peroxid vodíku)

Postup:

1. Navázání protilátky na mikrodestičku Costar 3590 (Corning Incorporated) při 4 °C přes noc. Králičí protilátka (IgG) proti Pyrap–AKH byla naředěna v poměru 1:5000 v aplikačním pufru. V množství 100 µl byla protilátka nanášena do jamek mikrodestičky.

2. Trojnásobné promývání destičky promývacím pufrům s Tween 20 o koncentraci 0,1 %. Na promývání se používal objem 200 µl na jamku.

3. Nanesení blokovacího pufru o objemu 200 µl na jamku. Inkubace 2 hodiny při 37 °C za stálého třepání na třepačce Titramax 1000 (Heidolph) v inkubátoru Inkubator 1000 (Heidolph).

4. Postup viz. bod 2.

5. Nanesení vzorků odpovídajících ekvivalentu 100 CNS rozpuštěných v 50 µl promývacího pufru bez Tween-20 a 50 µl (100 fmol) roztoku Pyrap–AKH značeného biotinem (BLAM-Pyrap-AKH, Biotin Long Arm Malaimide) na jamku. Do dalších sloupců destičky byly místo vzorků z CNS aplikovány jako standardy syntetické hormony Peram-CAH-I a Peram-CAH-II. Hormony byly rozředěny dvojkovou řadou (vždy po 50 µl) od 10 pmol v první jamce. Jako negativní kontrola sloužily jamky se 100 µl promývacího pufru bez Tween-20. Jako pozitivní kontrola sloužily jamky s 50 µl promývacího pufru bez Tween-20 a 50 µl BLAM. Tím začala kompetice o vazbu na protilátku, která probíhala 1 hodinu při 37 °C opět za stálého třepání.

6. Postup viz. bod 2.

7. Aplikace HRPS (horsradish peroxidase streptavidin). HRPS byl ředěn v poměru 1:500 v promývacím pufru a nanášen v množství 100 µl na jamku. Inkubace probíhala 1 hodinu při 37 °C.

8. Šestinásobné promývání pufrům – viz. bod 2.

9. Aplikace 100 µl OPD substrátu do každé jamky za přítomnosti peroxidu vodíku, který se přidal do substrátu těsně před nanesením na destičku. Během inkubace, která trvala 40 minut při 37 °C, ve tmě (zabalení destičky do hliníkové fólie), peroxidáza štěpí peroxid vodíku a vzniklý kyslík reaguje s OPD za vzniku barevného žluto-oranžového roztoku.

10. Zastavení reakce přidáním 50 µl 0,5 M kyseliny sírové do každé jamky.

Poté byla spektrofotometricky (Spectra MAX 340_{PC}, Molekular Devices) změřena absorbance při vlnové délce 492nm a hodnoty byly přepočítány na procenta kompetice dle rovnice:

$$100 - ((\text{Abs vzorku} - \text{pozadí}) / (\text{max Abs} - \text{min Abs})) \cdot 100$$

pozadí = průměr hodnot naměřených pro negativní kontrolu

min, max Abs = nejnižší a nejvyšší naměřená absorbance na destičce

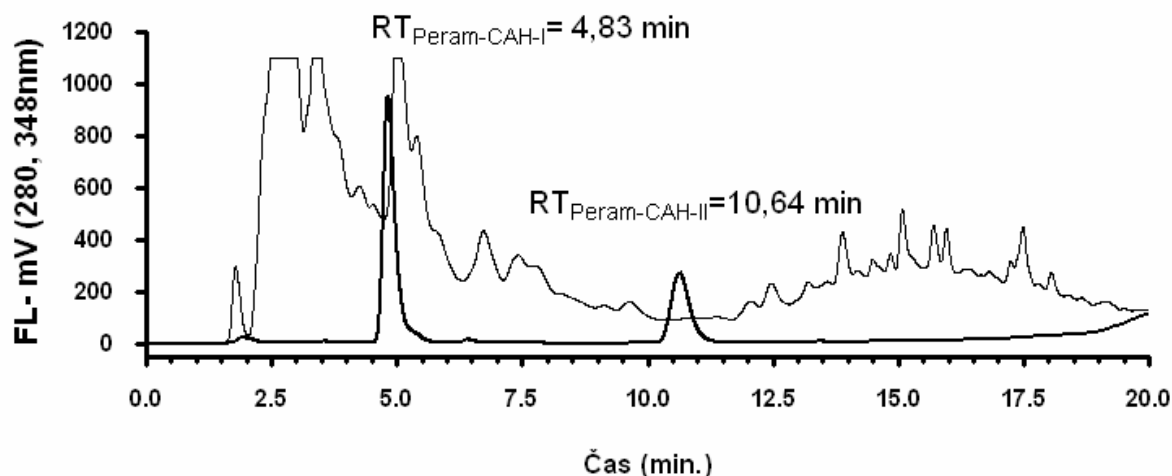
Množství hormonu v každé jamce bylo odečteno ze sestrojených kalibračních křivek ze syntetických hormonů Peram-CAH-I a Peram-CAH-II.

3.7. Statistické zpracování výsledků

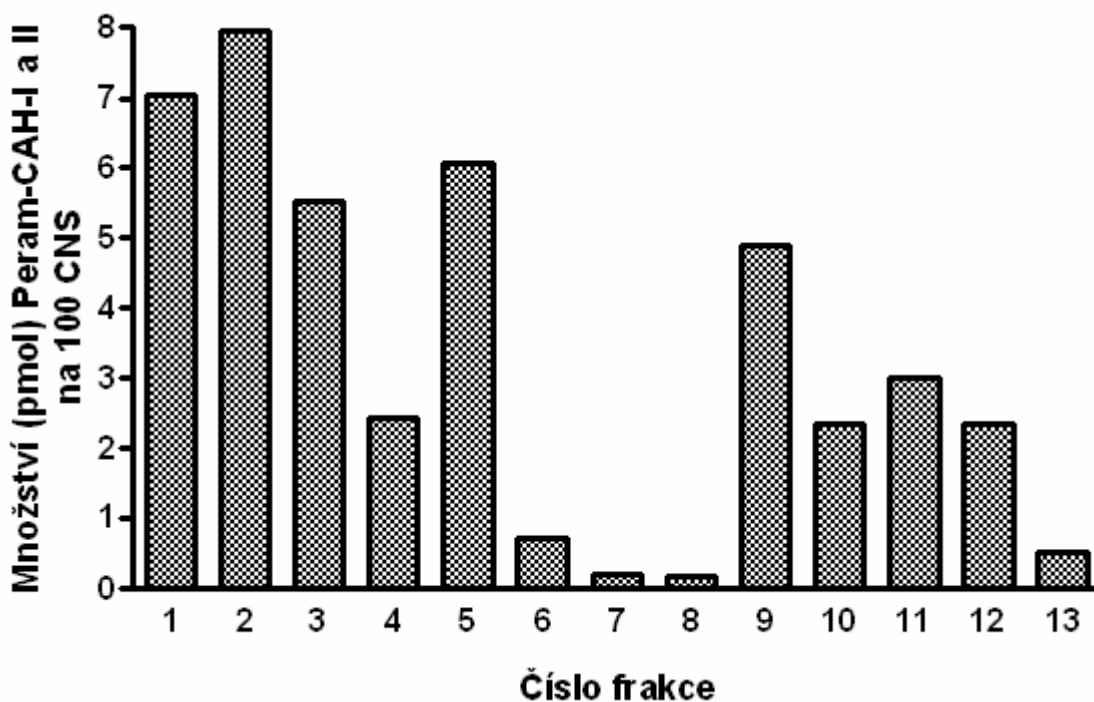
Pro statistické hodnocení průkaznosti výsledků byl použit program Statistica 99 Edition (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Hodnoty byly testovány na ověření normality dat, následně byla použita jednocestná ANOVA a Post Hoc Tukey-test. Oba testy byly hodnoceny na 5 % hladině významnosti. Pro tvorbu grafů byl použit program Prism (GraphPad Software, version 4, CA, USA). V grafech jsou uvedeny průměry naměřených hodnot \pm SD (n = 3 – 6).

4. VÝSLEDKY

Zástupci RPCH/AKH rodiny nejsou u lýkožrouta *Ips typographus* známi. Podle dostupných literárních údajů (Gäde, 2009) byli 2 zástupci – Peram-CAH-I a Peram-CAH-II vytipováni jako jejich možní kandidáti. Tato hypotéza byla ověřena následujícím pokusem. Nejprve byla provedena RP HPLC analýza metanolového extraktu CNS *I. typographus* (**Obr. 4**) a všechny frakce vytékající z kolony byly jímány. Za stejných podmínek byla na kolonu nanesena směs syntetických hormonů Peram-CAH-I a Peram-CAH-II a zaznamenávány jejich retenční časy (Peram-CAH-I = 4,83 min, Peram-CAH-II = 10,64 min). Se všemi frakcemi byla provedena kompetitivní ELISA (**Obr. 5**) Výsledky ukázaly, že nejvyšší aktivita byla zaznamenána u frakcí č. 2 a 5. Retenční časy těchto frakcí (frakce č. 2 byla odebírána v rozmezí 3,69-5,56 min a frakce č. 5 byla odebírána v rozmezí 9,58-11,24 min) odpovídaly retenčním časům standardů. Tento výsledek se značnou pravděpodobností naznačuje, že by se mohlo jednat o identické látky. V budoucnu však bude nutné tuto domněnku ověřit pomocí LC/MS analýzy. Také frakce č. 9 vykazovala poměrně velkou aktivitu. Je však jen velmi málo pravděpodobné, že by se mohlo jednat o zástupce z RPCH/AKH rodiny, protože v této oblasti se z kolony žádný ze známých AKH za daných podmínek neuvolňuje. V dalších testech byly z RP HPLC jímány pouze frakce odpovídající retenčním časům syntetických standardů, u kterých byla následně stanovena hladina obou hormonů.



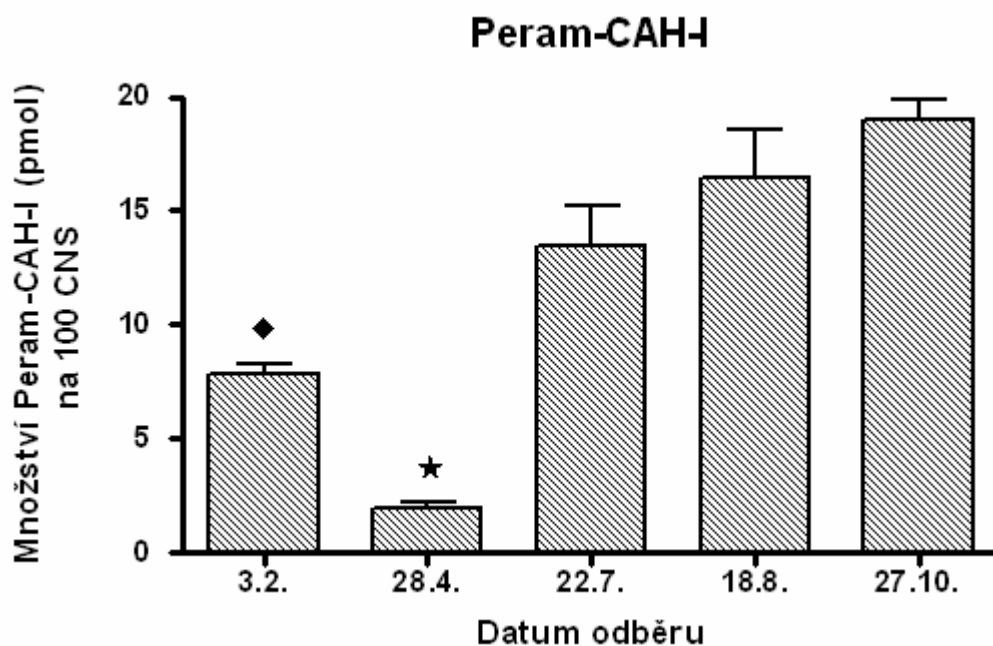
Obr. 4 Příklad RP HPLC fluorometrického profilu metanolového extraktu 100 hlav lýkožrouta smrkového (slabší křivka) a syntetických standardů Peram-CAH-I a Peram-CAH-I (silnější křivka) dělených za stejných podmínek (viz. kap. 3.5.).



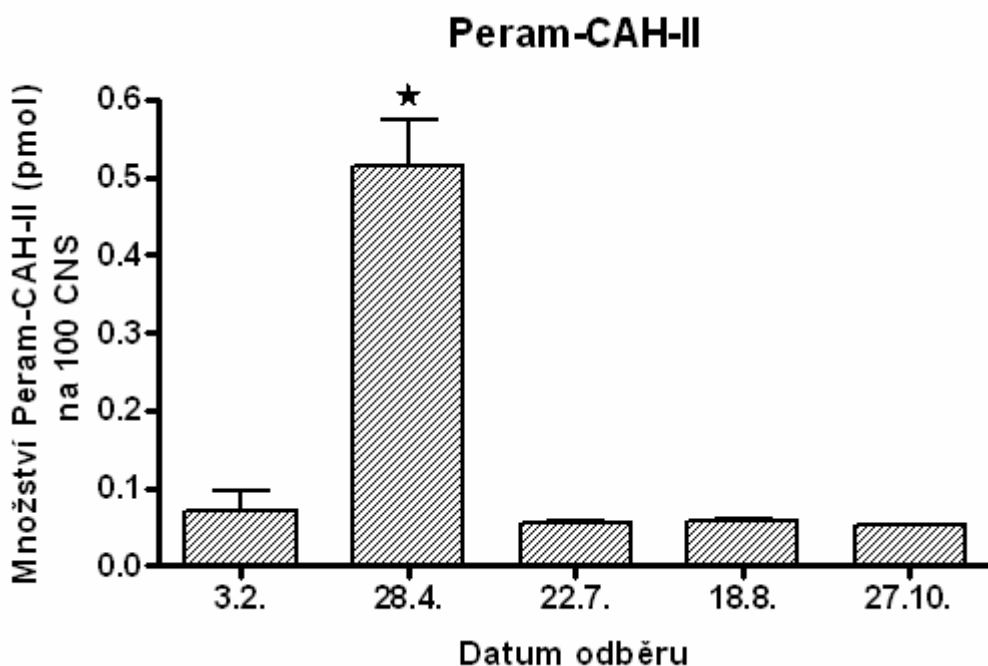
Obr. 5 Teoretické množství AKH v jednotlivých frakcích z RP HPLC dělení extraktu 100 CNS (**Obr. 4**) v ELISA testu. Hladina hormonů byla počítána pouze z kalibrační křivky pro Peram-CAH-I. Frakce byly odebírány v následujících intervalech: **1.** 1,68-3,69; **2.** 3,69-5,56; **3.** 5,56-7,53; **4.** 7,53-9,58; **5.** 9,58-11,24; **6.** 11,24-12,33; **7.** 12,33-13,48; **8.** 13,48-14,56; **9.** 14,56-15,54; **10.** 15,54-16,78; **11.** 16,78-17,87; **12.** 17,87-18,79; **13.** 18,79-20,00.

Výsledky těchto testů ukázaly, že hladina obou sledovaných hormonů během roku kolísá. U Peram-CAH-I (**Obr. 6**) hladina během zimního období klesala, 3.2. dosáhla množství 7,87 pmol na 100 jedinců a minima - 1,92 pmol na 100 jedinců - dosáhla při jarním odběru, který proběhl první den jarního rojení lýkožrouta smrkového. Obě tyto hodnoty se statisticky významně liší ($p < 0,05$, $F = 33,65$, $r^2 = 0,8763$) od všech dalších sledovaných období i navzájem mezi sebou. Následně během roku došlo k nárůstu hladiny hormonu, která dosáhla maxima v odběru koncem října (18,98 pmol na 100 jedinců). Tato skutečnost je o to zajímavější, že během října se všichni brouci nacházeli v diapauzním stavu. Tato maximální hodnota je asi 10 krát vyšší než hladina v jarním odběru.

Velmi zajímavé výsledky přineslo také měření hladiny druhého hormonu – Peram-CAH-II (**Obr. 7.**). Bylo zjištěno, že hladina Peram-CAH-II byla během sledování několikanásobně nižší než hladina Peram-CAH-I – pro odběr z 3.2. – 112 krát, 28.4. – 3,7 krát, 22.7. – 242 krát, 18.8. – 291 krát a 27.10. – 362 krát). Tato skutečnost a její možný vztah k životnímu cyklu *I. typographus* je diskutována v další kapitole. Podobně jako v předchozím případě i zde byl zjištěn statisticky průkazný rozdíl ($p < 0,0001$, $F = 67,27$, $r^2 = 0,9373$) mezi hladinami Peram-CAH-II ze sběru z 28.4. a ostatními sběry během roku.



Obr. 6 Množství Peram-CAH-I naměřené v různých časových obdobích během roku 2009. Statisticky významný rozdíl na 5 % hladině významnosti je označen ◆ (množství hormonu ze sběru 3.2. a ostatními sběry) a ★ (množství hormonu ze sběru 28.4. a ostatními sběry) (Post Hoc Tukey-test). Sloupce uvádějí průměr ($n = 3 - 6$) a úsečky směrodatnou odchylku.



Obr. 7 Množství Peram-CAH-II naměřené v různých časových obdobích během roku 2009. Statisticky významný rozdíl na 5 % hladině významnosti mezi množstvím hormonu ze sběru 28.4. a ostatními sběry je označen ★ (Post Hoc Tukey-test). Sloupce uvádějí průměr ($n = 3 - 6$) a úsečky směrodatnou odchylku.

5. DISKUZE

Oba vytipovaní zástupci RPCH/AKH rodiny Peram-CAH-I a Peram-CAH-II byli již dříve nalezeni u zástupce z řádu Coleoptera mandelinky bramborové *Leptinotarsa decemlinata* (Chrysomelidae). Peram-CAH-I se také vyskytuje u dalších brouků jako jsou tesaříci *Phrynetia spinator* (Cerambycidae) a *Ceroplesis thunbergi* (Gäde, 2009). Naše výsledky naznačují s velkou pravděpodobností, že by se tyto hormony mohly nacházet také u *I. typographus*. Používaná protilátka proti značenému Pyrap-AKH velmi dobře reaguje s Peram-CAH-II a dobře rozpoznává i Peram-CAH-I. Nejdůležitější součástí epitopu jsou poslední tři aminokyseliny Pro⁶, Asn⁷, Trp⁸ na C-konci blokováným amidem (**Tab. 2**) (Goldsworthy a kol, 2002a), kterou obsahují oba hormony. To nám umožnilo monitorovat změny hladiny těchto neurohormonů v těle lýkožrouta smrkového během celého roku. V rámci objektivnosti je třeba připomenout, že existuje určitá, i když malá, pravděpodobnost výskytu jiných zástupců RPCH/AKH rodiny u sledovaných brouků. Z retenčních časů aktivních RP HPLC frakcí lze však soudit, že by se příliš nelišily od aminokyselinových sekvencí Peram-CAH-I a II a tudíž by pravděpodobně s použitou protilátkou také reagovaly. Potvrzení přítomnosti vytipovaných hormonů bude v brzké době provedeno LC/MS analýzou u příslušných vzorků.

Tab. 2: Primární struktura neurohormonů z RPCH/AKH rodiny.

Název	Primární struktura
Peram-CAH-I	pGlu – Val – Asn – Phe – Ser – Pro – Asn – Trp amid (Scarborough a kol., 1984)
Peram-CAH-II	pGlu – Leu – Thr – Phe – Thr – Pro – Asn – Trp amid (Scarborough a kol., 1984)
Pyrap-AKH	pGlu – Leu – Asn – Phe – Thr – Pro – Asn – Trp amid (Kodřík a kol, 2000)

Množství AKH v těle by mohlo vypovídat o vývoji a aktivitě lýkožrouta smrkového. Jedním z nejdůležitějších faktorů, které ovlivňují životní cyklus u polyvoltinního hmyzu, je periodicky se měnící délka dne během roku. Vliv fotoperiody však může být potlačen jinými vnějšími faktory, nejčastěji teplotou (Tauber a kol., 1986). Lýkožrout smrkový se řadí mezi dlouhodobní druhy hmyzu. Kritická délka světelné části dne (KD) pro nástup diapauzy je 14,7 hod. (Doležal a Sehnal, 2007a), ale při překročení kritické teploty 23°C je vliv KD zcela potlačen a brouci prodělávají normální vývoj. Na druhou stranu však působení nízké teploty

6°C za dlouhého dne také nezpůsobí indukci diapauzy, ale pouze zpomalení vývoje (Doležal, 2002).

3.2. se brouci nacházejí ve stádiu post-diapauzní kviescence. Mechanismus přechodu z diapauzního stavu do postdiapauzní kviescence není přesně znám. Během ledna a února se u lýkožroutů smrkových z lokality Kubova Huť zvyšuje celkové množství bílkovin a lipidů (Bartošová, 2010). Jedinci vykazují vyšší fyzickou aktivitu, ale mají neustále utlumený metabolismus. Přijímají potravu, čímž si nahrazují energetické ztráty po přezimování. Hladina obou hormonů v tomto období dosahuje nízkých hodnot. Pokud vystavíme lapáky odebrané z přírody s jedinci, kteří se nacházejí v kviescenci, optimální fotoperiodě a teplotě, začnou brouci po kratším žíru vylétávat ze dřeva a normálně se vyvíjí (Doležal, 2002).

28.4. v ranních hodinách bylo zaznamenáno jarní rojení brouků a ještě během dopoledne téhož dne byli brouci sebráni z feromonových lapačů. Rozhodujícím stimulem pro rojení brouků je v tomto období nárůst teploty (Doležal a Sehnal, 2007a). Pokles Peram-CAH-I v době rojení je velmi překvapivý a je obtížné ho vysvětlit. Je málo pravděpodobné, že by byla utlumena jeho syntéza a vyčerpány jeho zásoby z CC. Syntéza AKH v CC probíhá během vývoje hmyzu více méně konstantně a jeho uvolňování do hemolymfy s tím není spojováno (Van der Horst a kol., 2001). Zajímavé je současné prudké navýšení Peram-CAH-II v tomto termínu (tj. 28.4.), i když je jeho celková hladina u *I. typographus* nižší než hladina Peram-CAH-I. Naměřené hladiny by mohly naznačovat specializaci obou zástupců AKH pro různé funkce, v tomto případě specializaci Peram-CAH-II pro jarní rojení. Vzhledem k nedostatku dalších dat se však úvaha tímto směrem zatím jeví jako spekulace. Je možné, že případné vysvětlení lze hledat v jevu, který není zdaleka objasněn. Jedná se o problematiku tzv. pionýrských brouků, kteří bývají často spojováni s jarním rojením. Jak bylo zmíněno v úvodu, jedná se o první vylétávající samce, kteří vyhledávají nové stromy, kde bude založena nová generace. Na počátku rojení je zaznamenáváno větší množství samců oproti samicím, které vylétávají ze zimoviště až po 1-3 dnech od počátku rojení (Doležal, 2002). Pionýrští brouci nalétávají na strom v takovou denní dobu, kdy jsou stromy nejméně zásobeny vodou a mohou se tedy nejméně bránit výronem pryskyřice. Usazují se také v místech, kde je tlak vody nejnižší – těsně pod zelenou korunou a okolí větví (Mrkva, 1999). Hledání vhodných stromů pro další vývoj však může být letální pro mnoho samců, což způsobuje snížení poměru samců vůči samicím (Facolli a Buffo, 2004). Pokud samci naleznou nový vhodný strom, který je poškozený či oslabený a nebrání se proti napadení vyléváním velkého množství pryskyřice, začnou brouci požírat lýko a vylučovat agregační feromony. To způsobí, že velká část populace, která se nalézá v blízkém okolí, reaguje na feromony a následuje své

druhy (Byers, 1996). Způsob výběru stromů pionýrskými brouky a následné rozptýlení populace při letu není zcela dobře prozkoumáno.

22.7. jsou brouci plně aktivní. Prodělávají druhé letní rojení, při kterém zakládají druhou generaci. Hladina Peram-CAH-I odpovídá nejspíš množství, které je potřeba pro udržení rovnováhy mezi jeho syntézou a spotřebou. Množství Peram-CAH-II opět klesá na hodnotu kolem 55 fmol ve 100 CNS, která je během dalších měření konstantní.

18.8. se již zvířata připravují na přezimování. Jsou neustále aktivní, což lze dokázat nálezem brouků ve feromonových lapačích (**Obr. 1**), ale oproti předchozímu odběru z 22.7. je jejich pohyb nanejvýš omezen na vyhledávání vhodných zimovišť. Hladina Peram-CAH-I se v CNS zvyšuje pravděpodobně díky tomu, že hormon je neustále produkován a ukládán v CC (viz. výše - 28.4.), ale klesají nároky brouka na mobilizaci energetických rezerv, takže se prakticky nespotebovává. Brouci začínají v tomto období přecházet do stádia zvaného pre-diapauza. Stimulem pro toto stádium je zkracující se fotoperioda, která ve zdejší zeměpisné šířce v půlce srpna dosahuje kritické hodnoty 14,7 hodiny. Zkracující se délka světelné části dne inhibuje u lýkožrouta smrkového vývoj létací svaloviny a zabraňuje dozrávání pohlavních orgánů u čerstvě svlečených dospělců (Doležal a Sehnal, 2007a).

27.10. se všichni jedinci nacházejí v diapauzním stavu. Fotoperioda (méně jak 14,7 hod. světelné části dne) i teplota (méně jak 6 °C) již přesáhly kritickou hodnotu pro indukci diapauzy. Typickým projevem diapauzy je žádný, či velmi omezený příjem potravy. Jedinci spotřebovávají energetické rezervy, které si nastřádali před nástupem diapauzy (Hahn a Denlinger, 2007), není však výjimkou, že během teplejšího období zimy lýkožrout smrkový přijímá potravu (Annala, 1969). Diapauzní stav je ukončen během poloviny prosince a nastává tzv. post-diapauzní kviescence. Hladina Peram-CAH-I je 27.10. nejvyšší naměřenou hodnotou z celého roku, jak bylo již několikrát zmíněno hormon se syntetizuje zřejmě neustále, avšak během diapauzy se nespotebovává. Je však třeba připomenout, že literární údaje o hladině AKH u diapauzních či kviescenčních jedinců jsou velmi kusé. U mandelinky bramborové bylo zjištěno, že u diapauzních jedinců je hladina AKH v CNS i v hemolymfě statisticky významně nižší než u aktivních jedinců (Kodrík – nepublikováno). Také u *P. apterus* byl zjištěn podobný vztah – hladina AKH v těle diapauzních ploštic byla během vývoje významně nižší než u reproduktivních ploštic (Kodrík a kol., 2003).

6. ZÁVĚR

Lýkožrout smrkový, jako nezávažnější škůdce smrkových porostů v celé střední Evropě, je dnes cílem výzkumu mnoha autorů. Ti se nejčastěji snaží zefektivnit doposud známé strategie boje proti němu. Výzkum AKH by mohl přinést nový úhel pohledu na jeho životní cyklus a rozšířit poznatky o něm.

U lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*) nebyly doposud identifikovány hormony z RPCH/AKH rodiny. Nepřímou metodou bylo v této práci naznačeno, že se pravděpodobně jedná o Peram-CAH-I a Peram-CAH-II. ELISA metodou bylo potvrzeno kolísání hladiny těchto hormonů v CNS lýkožrouta smrkového během roku, což poukazuje na jejich významnou úlohu v životním cyklu. Hladina Peram-CAH-I dosahuje minima během jarního rojení, což se nepodařilo spolehlivě vysvětlit, avšak během roku dosahuje vysokých hodnot s nejvyšším naměřeným množstvím v období diapauzy. Celkové množství Peram-CAH-I je u lýkožrouta smrkového podstatně větší než množství Peram-CAH-II. Hladina tohoto hormonu dosahuje nejvyšší hodnoty během jarního rojení, kdy se hodnota mnohonásobně zvyšuje a oproti Peram-CAH-I je pouze 4 krát nižší – je možné, že tento hormon hraje svou roli u právě vylétávajících pionýrských brouků a přebírá funkci Peram-CAH-I. Během ostatních období roku je hladina Peram-CAH-II poměrně konstantní a dosahuje nízkých hodnot.

7. POUŽITÁ LITERATURA

- ANNILA, E.** (1969): Influence of temperature upon the development and voltinism of *Ips typographus* L. (Coleoptera, Scolytidae). *Annales Zoologici Fennici*, 6: 161 - 208.
- AUERSWALD, L. a GÄDE, G.** (1999): The fate of proline in the African fruit beetle *Pachnoda sinuata*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29: 687 – 700.
- BARTOŠOVÁ, E.** (2010): Vliv energetických rezerv na úspěšnost přezimování a reprodukční potenciál lýkožrouta smrkového (*Ips typographus* (L.)). Biologická fakulta JU, Magisterská diplomová práce, 37pp.
- BLOEMEN, R. E. B. a BEENAKKERS, A. M. T.** (1985): The effect of sense organ deprivation on the release of adipokinetic hormone in *Locusta migratoria*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 81: 915 – 919.
- BYERS, J. A.** (1996): An encounter rate model for bark beetle populations searching at random for susceptible host trees. *Ecological Modelling* 91, pp. 57–66.
- BIRGERSSON, G., SCHLYTER, F., LOFQVIST, J., BERGSTROM, G.** (1984): Quantitative variation of pheromone components in spruce bark beetle *Ips typographus* from different attack phases. *Journal of Chemical Ecology*, 10: 1029 – 1055.
- CARLISHE, J., LOUGHTON, B.G.** (1979): Adipokinetic hormone inhibits protein synthesis in locusta. *Nature*. 282: 420 – 421.
- CROWTHER, J. R.** (1995): ELISA: Theory and Practise. *Methods in Molecular Biology*. 42
- DOLEŽAL, P.** (2002): Diapauza u lýkožrouta smrkového *Ips typographus* (L.), Biologická fakulta JU, Magisterská diplomová práce, 51pp.
- DOLEŽAL, P., SEHNAL, F.** (2007a): Effects of photoperiod and temperature on the development and diapause of the bark beetle *Ips typographus*. *Journal of Applied Entomology*, 131(3): 165 – 173.
- DOLEŽAL, P., SEHNAL, F.** (2007b): A simple method for the detection of imaginal diapause in beetles. *Journal of Applied Entomology*, 131: 221 – 223.
- FACCOLI, M.** (2002): Winter mortality in sub-corticolous populations of *Ips typographus* (Coleoptera, Scolytidae) and its parasitoids in the south-eastern Alps. *Journal of Pest Science* 75: 62 - 68.
- FACCOLI, M., BUFFO, E.** (2004): Seasonal variability of sex-ratio in *Ips typographus* (L.) pheromone traps in multivoltine population in the Southern Alps. *Journal of Pest Science* 77: 123 – 129.
- GÄDE, G.** (2009): Peptides of the adipokinetic hormone/red pigment-concentrating hormone family. A new taken on biodiversity. *Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology*, 1163: 125 – 136.
- GÄDE, G., AUERSWALD, L.** (2003): Mode of action of neuropeptides from the adipokinetic hormone family. *General and Comparative Endocrinology*, 132: 10-20.

GÄDE G., HOFFMANN K. H., SPRING J. H. (1997): Hormonal regulation insects: facts, gaps, and future directions. *Physiological Reviews*, 77: 963-1032.

GOKULDAS, M., HUNT, P. A., CANDY, D. J. (1988): The inhibition of lipid synthesis in vitro in the locust, *Schistocerca gregaria*, by factors from corpora cardiaca. *Physiological Entomology*, 13: 43 – 48.

GOLDSWORTHY, G. J., KODRÍK, D., COMLEY, R., LIGHTFOOT, M. (2002a): A quantitative study of adipokinetic hormone of the firebug, *Pyrrhocoris apterus*. *Journal of Insect Physiology*, 48: 1103 – 1109.

GOLDSWORTHY, G. J., OPOKU-WARE KAND CHANDRAKANT, MULLEN, L. (2002b): Adipokinetic hormone enhances laminarin and bacterial lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase cascade in the African migratory locust. *Locusta migratoria*. *Journal of Insect Physiology*, 48: 601 - 608

GOLDSWORTHY, G. J. (1983): The endocrine control of flight metabolism in locust. *Advances in Insect Physiology*, 17: 149 – 204.

HAHN, D. A., DENLINGER, D. L. (2007): Meeting the energetic demands of insect diapause: Nutrient storage and utilization. *Journal of Insect Physiology*, 53: 760 – 773.

KANOST, M. R., KAWOOYA, J. K., LAW, J. H. a kol. (1990): Insect hemolymph proteins. *Advances in Insect Physiology*, 22: 299 – 369.

KODRÍK, D. (2008): Adipokinetic hormone functions that are not associated with insect flight. *Physiological Entomology*, 33: 171 – 180.

KODRÍK, D. a GOLDSWORTHY, G. J. (1995): Inhibition of RNA synthesis by adipokinetic hormones and brain factors in adult fat body of *Locusta migratoria*. *Journal of Insect Physiology*, 4: 127–133.

KODRÍK, D., SOCHA, R. a SYROVÁ, Z. (2003): Developmental and diel changes of adipokinetic hormone in CNS and hemolymph of the flightless wing-polymorphic bug. *Pyrrhocoris apterus*. *Journal of Insect Physiology*, 49: 53 – 61.

KODRÍK, D., KRISHNAN, N. a HABUŠTOVÁ O. (2007): Is the titer of adipokinetic peptides in *Leptinotarsa decemlineata* fed on genetically modified potatoes increased by oxidation stress? *Peptides*, 28: 974 – 980.

KÖLLISCH, G. V., LORENZ, M. W., KELLNER, R., VERHEART, P. D., HOFFMANN, K. H. (2000): Structure elucidation and biological activity of an unusual adipokinetic hormone from corpora cardiaca of the butterfly, *Vanessa cardui*. *European Journal Biochemistry*, 267: 5502-5508.

KOŠŤÁL, V. (2006): Eco-physiological phases of insect diapause. *Journal of Insect Physiology*, 52: 113 – 127.

LEE, G. a PARK, J. H. (2004): Hemolymph sugar homeostasis and starvation-induced hyperactivity affected by genetic manipulations of the adipokinetic hormone-encoding gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 167: 311 – 323.

LORENZ, M. W. (2003): Adipokinetic hormone inhibits the formation of energy stores and egg production in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology part B*. 136: 197 – 206.

MARTÍNEK, V. (1957): K otázce zakládání tzv. sesterského pokolení u kůrovce *Ips typographus* L. v horské a chlumní oblasti. *Sborník československé akademie zemědělských věd – Lesnictví* 3 (10): 687 – 722.

MARTÍNEK, V. (1961): Problém natality a gradace kůrovce *Ips typographus* L. ve střední Evropě – Nakladatelství Československé akademie věd, Praha, Ročník 71/1961. Řada MPV. Sešit 3.

MRKVA, R. (1999): Kdo je lýkožrout smrkový? *Veronica* 6: 24 – 25.

O'SHEA, M., WITTEN, J., SCHAFFER, M. (1984): Isolation and characterization of two myoactive neuropeptides: further evidence for an invertebrate peptide family. *Journal of Neuroscience*. 4: 521 – 529.

SCARBOROUGH, R. M., JAMIESEON, G. C., KALISZ, F. a kol. (1984): Isolation and primary structure of two peptides with cardio acceleratory and hyperglycemic activity from corpora cardiaca of *Periplaneta americana* of the National Academy of Science of the United States of America. 81: 5575 – 5579.

SKUHRAVÝ, V. (2002): Lýkožrout smrkový (*Ips typographus*) a jeho kalamity – Agrospoj, Praha, 196 pp.

SOCHA, R., KODRÍK, D., A ZEMEK, R. (1999): Adipokinetic hormone stimulates insect locomotor activity. *Naturwissenschaften*. 88: 85 – 86.

SPENCER, I. M. a CANDY, D. J. (1976): Hormonal control of diacylglycerol mobilization from fat body of the desert locust. *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochemistry*. 6: 289 – 296.

STONE, J. V., MORDUE, W., BATLEY, K. E., MORRIS, H. R. (1976): Structure of locust adipokinetic hormone, a neurohormone that regulates lipid utilisation during flight. *Nature*. 263:207–211.

TAUBER, M. J., TAUBER, C.A., MASAKI, S. (1986): Seasonal adaptations of insect. Oxford University Press, New York & Oxford, 411 pp.

VAN DER HORST, D. J., VAN MARREWIJK, W. J. A., DIEDEREN, J. H. B., (2001): Adipokinetic hormones of insect: release, signal transduction, and responses. *International Review of Cytology* 211: 179-240.

VAN MARREWIJK, W. J. A., VAN DER BROEK, A. T. M., a BEENAKKERS, A. M. T. (1980): Regulation of glycogenolysis in the locust fat body during flight. *Insect Biochemistry*. 10: 675 – 679.

VROENEN, S. F., VAN MARREWIJK, W. J. A., DE MEIJER, J., a kol. (1997): Differential induction of inositol phosphate metabolism by three adipokinetic hormones. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 130: 131 – 139.

VULLINGS, H. G. B., PASSIER, P. C. C. M., VAN DER JAGT, E. M., DIEDEREN, J. H. B. (1995): Morphology of neurons in the storage part of corpus cardiacum of *Locusta migratoria*: No evidence for their involvement in regulation of adipokinetic cell activity. *Cell Tissue Research*, 282: 321 – 329.

WERMELINGER, B. (2004): Ecology and management of the spruce bark beetle *Ips typographus*-a review of recent research. *Forest Ecology and Management* 202 (2004): 67-82.

WERMWLINGER, B., SEIFERT, M., (1998): Analysis of temperature dependent development of the spruce bark beetle *Ips typographus* (L.) (Col., Scolytidae). *Journal of Applied Entomology*, 122: 185-191.

WERMWLINGER, B., SEIFERT, M., (1999): Temperature-dependent reproduction of the spruce bark beetle *Ips typographus*, and analysis of the potential population growth. *Ecological Entomology*, 24: 103-110.

ZUMR, V. (1985): Biologie a ekologie lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*) a ochrana proti němu – Academia, Praha, 124 p.