

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta



**Proteolytické enzymy středního střeva diapauzních a  
aktivních dospělců lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*)**

Magisterská diplomová práce

Bc. Kristýna Štefková

Vedoucí práce: RNDr. Petr Doležal, PhD.  
České Budějovice 2010

## Magisterská diplomová práce

Štefková K., 2010: Proteolytické enzymy středního střeva diapauzních a aktivních dospělců lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*). [Midgut proteinases in diapausing and post-diapausing adults of the spruce bark beetle (*Ips typographus*). Mgr. Thesis, in Czech] – 45 pp, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

## Anotace

My work concentrates on feeding behavior of overwintering diapausing and post – diapausing bark beetles and developmental threshold. This is done either biochemically by measuring the enzymatic activity in the midgut and by assessing the feeding status from the size and consistence of the food bolus in the gut. Detailed knowledge of feeding behaviour and development threshold may help to predict the overwintering success of local populations with all the consequences for spring dispersal and reproduction.

## 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.

Prohlašuji, že jsem tuto magisterskou diplomovou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

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

.....  
Kristýna Štefková

V Českých Budějovicích 25.4.2010

Děkuji mému školiteli RNDr. Petru Doležalovi, PhD. za trpělivé vedení, Mgr. Honzovi Okrouhlíkovi za odborné rady a Mgr. Evě Bartošové za příjemné chvíle strávené v laboratoři. V neposlední řadě patří můj dík všem, kdo mi během mého studia pomáhali.

## OBSAH

<b>1</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>6</b>
1.1	Morfologie .....	6
1.2	Vývojový cyklus .....	6
1.3	Přezimování a diapauza .....	7
1.4	Vývojový a rozmnožovací potenciál .....	8
1.5	Fyziologie trávení bílkovin u hmyzu .....	9
1.5.1	<i>Trávení celulózy.....</i>	<i>10</i>
1.6	Přirozená obrana rostlin proti škůdcům .....	11
1.7	Ochrana .....	12
<b>2</b>	<b>Cíl práce.....</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>Metodika .....</b>	<b>14</b>
3.1	Vývoj lýkožrouta smrkového v nízkých teplotách .....	14
3.2	Odběr, uchování a zpracování materiálu .....	14
3.3	Stanovení proteolytické aktivity .....	15
3.3.1	<i>BCA protein assay (bicinchoninic acid assay).....</i>	<i>15</i>
3.3.1.1	Princip metody .....	15
3.3.1.2	Postup.....	15
3.3.2	<i>Azokaseinová assay.....</i>	<i>16</i>
3.3.2.1	Princip metody .....	16
3.3.2.2	Postup.....	16
3.3.3	<i>Specifické substráty.....</i>	<i>16</i>
3.3.3.1	Princip metody .....	16
3.3.3.2	Postup.....	16
3.3.4	<i>Inhibitory .....</i>	<i>17</i>
3.4	Stanovení amylázové aktivity .....	17
3.4.1	<i>Amylázová assay .....</i>	<i>17</i>
3.4.1.1	Princip metody .....	17
3.4.1.2	Postup.....	17
3.5	Stanovení celulázové aktivity .....	18
3.5.1	<i>Celulázová assay.....</i>	<i>18</i>

3.5.1.1	Princip metody .....	18
3.5.1.2	postup.....	18
3.6	Extrakce fenolů z lýka, jejich stanovení a vliv na proteolytickou aktivitu.....	19
3.6.1	<i>Extrakce fenolů</i> .....	19
3.6.2	<i>Folin Denis test</i> .....	19
3.6.2.1	Princip metody .....	19
3.6.2.2	Postup.....	20
3.6.3	<i>Vysušení vzorku a stanovení proteolytické aktivity</i> .....	20
3.7	Složení umělé stravy .....	20
3.8	Určení pH ve střevě lýkožrouta smrkového .....	21
<b>4</b>	<b>Výsledky</b> .....	<b>22</b>
4.1	Změny proteolytické aktivity u lýkožrouta smrkového během roku .....	22
4.2	Detekce proteolytické aktivity po podání umělé stravy.....	24
4.3	Detekce proteolytické aktivity s využitím specifických substrátů.....	25
4.4	Inhibitory .....	26
4.5	Stanovení amylázové aktivity .....	26
4.6	stanovení celulázové aktivity.....	27
4.7	Vliv fenolů na nespecifickou proteolytickou aktivitu.....	28
4.8	Vývoj lýkožrouta smrkového v nízkých teplotách .....	29
4.9	Stanovení pH ve středním střevě lýkožrouta smrkového .....	33
<b>5</b>	<b>Diskuze</b> .....	<b>34</b>
5.1	Příjem potravy u lýkožrouta smrkového.....	34
5.2	Celková enzymatická aktivita u lýkožrouta smrkového .....	34
5.3	Vývoj lýkožrouta smrkového v nízkých teplotách .....	37
<b>6</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>38</b>
<b>7</b>	<b>Seznam literatury</b> .....	<b>39</b>
<b>8</b>	<b>Přílohy</b> .....	<b>43</b>

# 1 Úvod

Lýkožrout smrkový, *Ips typographus* (L.), je zástupcem čeledi nosatcovitých (Curculionidae, Coleoptera), podčeledi kůrovcovitých (Scolytinae). Je jedním z nejvážnějších kalamitních hmyzích škůdců lesních porostů s převahou smrku ztepilého (*Picea abies*) v Evropě. Jedná se o typického sekundárního škůdce, který přednostně napadá oslabené lesní porosty (Křístek a spol., 2004).

Lýkožrout smrkový potřebuje ke svému vývoji silnější vrstvu čerstvého lýka, proto zpravidla napadá smrky staré 60 až 100 let, oslabené abiotickými (bouřky, vichřice, teplo, sucho, námraza atd.) nebo antropogenními vlivy (kyselá deště, vysazování smrkových monokultur). Při silném přemnožení však brouci osidlují i zdravé dřeviny a mladší věkové třídy porostů. Výjimečně napadají i borovici lesní (*Pinus sylvestris*), jedlí bělokorou (*Abies alba*) a modřín opadavý (*Larix decidua*) (Skuhravý, 2002; Křístek a spol., 2004).

## 1.1 Morfologie

Lýkožrout smrkový prodělává životní cyklus vajíčko - larva - kukla - dospělec. Vajíčko je eliptické, bílé, o rozměrech pouhých 0,6 x 0,9 mm. Larvy jsou také bílé, beznohé, s hnědavou hlavovou schránkou. Kukla je mléčně bílá a zřetelně se na ni rýsují tykadla, nohy i křídla. Brouci jsou po vylíhnutí z kukly bílí, později žlutnou a nakonec jsou černí a lesklí, s délkou těla 4,2 – 5,5 mm a šířkou 1,9 mm (Skuhravý, 2002).

## 1.2 Vývojový cyklus

Lýkožrout smrkový je polygamní druh (jeden samec se páří s několika samicemi). Brouci po přezimování pod kůrou nebo v hrabance opouštějí svá zimoviště za příznivých denních teplot 18 až 20°C (hranice pro let je zhruba 14 - 20°C, údaje se liší dle autorů). Pokud se v místě zimoviště nenachází vhodný potravní zdroj pro prodělání tzv. úživného žíru (zhruba 10 – 20 dnů trvající období žíru, během nějž dochází ke zrání pohlavních orgánů, případně rozvoji létací svaloviny), dospělci přelétají na nejbližší vhodné stromy. V opačném případě vyletují již pohlavně zralí jedinci, připravení k rozmnožování.

Samec v kůře vykusuje snubní komůrku, do níž pomocí tzv. agregačních feromonů láká samičky. Každá samička po oplodnění hloubí svou vlastní matečnou chodbu dlouhou 6-12 cm a po jejích stranách klade vajíčka. Chodba je umístěna vertikálně a je opatřena větracími otvory. Za den jedna samice naklade 1 – 2 vajíčka, průměrně 60 - 150 vajíček za život. Z vajíček se vylíhnou larvy, které vytvářejí postranní chodbičky. Ty jsou kolmé na matečnou chodbu a bývají od sebe vzdáleny 2 – 10 mm. Larva posledního třetího instaru vytváří na konci chodbičky kukelní komůrku, kde se kuklí. Z kukly se líhnou mladí brouci, kteří pohlavně dospívají během 2 – 3 týdenního zralostního žíru (Kudela, 1970, Pfeffer, 1954).

Mnohé samice po ukončení první snůšky prodělají krátký regenerační žír a mohou založit, i bez předchozího nového oplození, první i druhou tzv. sesterskou generaci, a to na stejném, nebo po přeletu, na jiném stromě (Anderbrant a kol., 1998).

Požerek lýkožrouta smrkového bývá zpravidla hvězdicovitý, dvouramenný. Požerek sesterského pokolení nemá snubní komůrku a je pouze jednoramenný (Křístek a kol., 2004).

Poměr pohlaví rojících se brouků je 1:1. Naproti tomu na stromech je poměr samců k samicím 1:2 až 1:3 (Lindenlów a spol., 1986).

### **1.3 Přezimování a diapauza**

Pokud již nejsou vhodné podmínky pro vytvoření dalšího pokolení, dospělci nejčastěji přezimují pod kůrou nebo v hrabance v bezprostředním okolí napadeného stromu a to nečastěji ve stádiu dospělého, ve výjimečných případech i ve stádiu kukly či larvy třetího instaru (Skuhrový, 2002). Dle některých údajů zimu nepřežije až 50% dospělců, obecně však lze říci, že nezralá stádia jsou k úhynu vlivem nízkých teplot náchylnější (Wermelinger, 2004).

Nepříznivé období imága přežívají ve stavu sníženého metabolismu, který je nazýván diapauza. Signálem pro její spuštění je nejčastěji fotoperioda, teplota okolí, nedostatek potravy atd. Dochází k zastavení rozmnožování, vývoje (Kodrík, 2000) a k minimálnímu či žádnému příjmu potravy. Hmyz je tak více či méně závislý na energetických rezervách získaných před nástupem do diapauzy (Hahn a kol., 2007).

Diapauza se plně rozvíjí v polovině září až začátkem října a je ukončena zhruba v polovině prosince. Poté se lýkožrouti nacházejí ve stavu tzv. postdiapauzní kviescence, kdy je rozhodujícím stimulem k obnovení normálního vývoje nárůst teploty (Doležal a Sehnal, 2007).

## 1.4 Vývojový a rozmnožovací potenciál

Růst populace je určován nejen produkcí vajíček, ale i vývojem, poměrem pohlaví, mortalitou a teplotou. Teplota je jedním z nejdůležitějších faktorů, které ovlivňují vývoj a rozmnožování lýkožrouta smrkového.

Počet generací závisí na průběhu počasí během roku. V nižších nadmořských výškách se vyvíjejí 2 – 3, ve vyšších jen 1 – 2 úplné generace lýkožrouta a různý počet rozdílně výrazných sesterských pokolení (Pfeffer, 1954).

Lýkožrout smrkový klade vajíčka v rozmezí teplot 12 – 33 °C, optimum představuje 29°C. Při použití nelineárního Logan/Lactinova modelu (Logan a spol., 1976, Lactin a kol., 1995) je minimální teplota pro kladení vajíček 7,9 °C (Wermelinger a kol., 1999).

Mezi 15 – 30°C stoupá rychlost vývoje lineárně s teplotou. Stádium vajíčka trvá 3 – 12 dní, stádium larvy 11 – 30 dní a stádium kukly 2 – 11 dní v závislosti na teplotě (viz. Tab.1). Stádium kukly zahrnuje asi 60 % celého preimaginálního vývoje, stádium vajíčka a kukly po 20 % .

**Tab. 1** – Délka vývoje Lýkožrouta smrkového za konstantních teplot (Wermelinger a kol., 1998).

Teplota (°C)	Vývojová rychlost (dny) (vajíčko – kukla)	Zralostní žír (dny)
15	49	-
20	29	17
25	20	13
30	17	11

Při použití nelineárního vztahu (Logan a kol., 1976, Lactin a kol., 1995) je nejnižší vývojový práh pro vajíčka 7,9 °C, pro larvy 8,7 °C, pro kukly 1,6 °C, pro celkový preimaginální vývoj (ze stádia vajíčka na kuklu) je 5,8 °C (Wermelinger a kol., 1998).

Různí autoři publikují rozdílné prahové teploty pro vývoj, přijímání potravy a chladovou strnulost lýkožrouta smrkového. Data z období 1907 - 1957 shrnul ve svém článku Annila (1969).

Při pokusech založených na přímém pozorování lýkožrouta v nízkých teplotách je jeho vývojový práh podle Hennigse (1907) 12°C, podle Schimitscheka (1931) 10°C. Willmann (1951) udává nejnižší vývojový práh pro vajíčka 8°C, pro larvy 7,8°C a pro kukly 7°C. Annila (1969) určil jako vývojový práh lýkožrouta smrkového 5°C .



Vité (1952) pozoroval u lýkožrouta chladovou strnulost pod 0°C, chladovou imobilitu mezi 0 – 7°C, nepravidelný pohyb v rozmezí teplot 5 – 10,5°C a přirozený pohyb nad 14°C. Escherich (1923) a Seitner (1923, 1924) určili chladový práh pro pohyb 12°C, zatímco podle Merkerové (1957) je to 7°C a pod 7°C není lýkožrout schopný přijímat potravu. Merkerová a kol. (1954) tvrdí, že dospělci nejsou schopni kontinuálně přijímat potravu pod 12°C. Chararas (1962) popsal nejnižší teplotu pro projev aktivity v rozmezí 5 – 5,5°C. Annala (1969) (u dostatečně chladově adaptovaných lýkožroutů) zaznamenal aktivitu v rozmezí 0 – 5°C a již při teplotě 5°C pozoroval přijímání teploty.

Naopak při teplotě okolo 40°C dochází k útlumu aktivity, strnulosti a následně úhynu (Skuhravý, 2002).

Celkový vývoj jedné generace od vajíčka až po výlet dospělých jedinců trvá šest až deset týdnů, v horách i déle (Skuhravý, 2002).

## 1.5 Fyziologie trávení bílkovin u hmyzu

Ačkoli trávení u hmyzu je studováno již po staletí (Wigglesworth, 1972), naše znalosti jsou v tomto oboru nedostačující. Přesto informace o trávicích enzimech jsou nezbytné, neboť trávicí enzymy (např. proteázy) katalyzují uvolnění aminokyselin z bílkovin a dodávají nezbytné živiny pro růst a vývoj hmyzu.

Chemické složení potravy je u hmyzu velice různorodé, proto se v zažívacím ústrojí hmyzu vyskytují odlišné trávicí enzymy (Wigglesworth, 1972). Z toho vyplývá, že adaptace na potravu je důležitější, než fylogeneticky dané typy trávicích enzymů nalezených v hmyzím střevě (Terra a kol., 1994). Na druhou stranu autoři jiného článku předpokládají, že veškerý hmyz má kompletní výbavu trávicích enzymů a jen určité množství z nich je aktivní jako reakce na konkrétní složení stravy. Tato sekrece určitých enzymů se může objevit v průběhu konzumace potravy jedincem, nebo jako důsledek adaptace taxonomické třídy hmyzu na konkrétní stravu (Applebaum, 1985; Terra a kol., 1994).

Množství enzymů ve středním střevě vzrůstá na počátku trávení. Stimul k jejich sekreci je zpravidla příjem potravy. Později jejich koncentrace klesá a ve střevním obsahu zadního střeva nejsou již v detekovatelném množství (Wigglesworth, 1972).

Jedním z faktorů, které ovlivňují trávicí enzymy, je pH. Hmyz má trávicí trubici rozdělenou na tři části: přední, střední a zadní střevo. pH lumen střeva bylo detekováno u mnoha skupin hmyzu. Liší se u jednotlivých druhů, ale i v jednotlivých oddílech

trávicí trubice (Terra a kol., 1994). Obecně platí, že pH ve střevě je neutrální (6 – 7), u býložravých druhů zásadité (8,4 – 10,3), u masožravého hmyzu kyselé (3 – 5,2), existuje však mnoho výjimek (Wigglesworth, 1976). Curculionidae – obsah předního střeva má pH 5,2; středního střeva – pH 6,9, zadního střeva - pH 8,4 (Terra a kol., 1994).

Existují čtyři třídy endoproteáz: aspartátové, cysteinové, serinové a metaloproteázy (Terra a kol., 1994). Hmyzí trávicí enzymy patří do prvních tří skupin (Applebaum, 1985).

Serinové proteázy (trypsin, chymotrypsin) jsou nejvíce aktivní v rozmezí pH 7 – 10 a jsou dobře inhibovány inhibitorem z fazole *Phaseolus limensis* (lime-bean inhibitor). Cysteinové proteázy (papain, katepsin B, H) jsou nejvíce aktivní v pH 5 – 7 a jsou inhibovány těžkými kovy, cystatinem a E – 64. Aspartátové proteázy (pepsin, katepsin D) jsou nejvíce aktivní v kyselém pH, obecně pod 4,5, a jsou inhibovány pepstatinem (Purcell a kol., 1992; Murdock a kol., 1987, Terra a kol., 1994, Barrett, 1977, North, 1982).

Mezi hmyzem existuje obrovská rozmanitost v proteolytické aktivitě, která může probíhat v různém pH (od 3 do 12). U některých skupin hmyzu je více pH, ve kterých je proteolytická aktivita vysoká. To potvrzuje, že hmyz využívá více druhů enzymů (Wolfson a kol., 1990; Purcell a kol., 1992). Nebyl prokázán žádný zřejmý vztah mezi potravními návyky hmyzu a pH optimem proteolytické aktivity (Wolfson a kol., 1990).

V řádu Coleoptera jsou široce rozšířeny cysteinové thiol-dependentní proteázy a zdá se, že hrají hlavní roli v trávení bílkovin. Nevyskytují se však u všech čeledí. Byly nalezeny u brouků z čeledí Meloidae, Coccinelidae, Tenebrionidae, Bruchidae, Chrysomelidae a Curculionidae (Murdock a kol., 1987; Terra a kol., 1996). Všechny čeledi patří do infrařádu Cucujiformia (všežravých brouků). Autoři článku Terra a kol. (1996) se domnívají, že předchůdci infrařádu Cucujiformia byli brouci adaptovaní přijímat potravu v podobě semen bohatých na přirozeně se vyskytující serinové proteinázové inhibitory, proto bílkoviny trávili pomocí cysteinových proteáz. Ve většině případů se spolu s cysteinovými proteázami vyskytují i aspartátové proteázy (Terra a kol., 1996).

### 1.5.1 Trávení celulózy

Celulóza, polymer glukózy, je hlavní stavební látkou rostlinných buněčných stěn. Ačkoli celulóza je nejrozšířenější polysacharid na zemi, jen malá část zvířat je schopna

jej efektivně využívat. Úplná hydrolýza celulózy je běžná pouze u hub a bakterií (Goodenought a spol., 1993).

Za trávení celulózy u hmyzu je zodpovědný soubor enzymů. Tento tzv. celulázový komplex obsahuje tři hlavní třídy enzymů: endoglukanázy, celobiohydrolázy a  $\beta$ -glukosidázy (Martin, 1983). Celulóza se při trávení rozpadá na glukózu, která je u některých skupin hmyzu fermentována na nestabilní mastné kyseliny. Glukózu a mastné kyseliny využívá hmyz jako zdroj uhlíku a energie (Martin a kol. 1991).

U hmyzu byly popsány čtyři mechanismy trávení celulózy. Principem prvního je využití symbiotických bakterií nebo prvoků, kteří dokáží rozkládat celulózu. Symbionti se obvykle nacházejí v zadním střevě. Mimo to může hmyz vylučovat kompletní celulázový systém, případně celulózu trávit s pomocí ektosymbiózy s houbou, kdy houba natráví rostlinné pletivo (celulózu) a následně hmyz přijme houbové pletivo nebo již dřevo s celulázou (Martin a kol., 1991; Klepzig a kol., 2009).

Trávení celulózy bylo prokázáno u 78 druhů hmyzu z 20 čeledí (Martin, 1983). Nejznámější jsou pravděpodobně termiti, kteří to dokážou s účinností až 99%. Xylofágní larvy blanokřídlých z čeledí Xiphydriidae, Siricidae a brouků z čeledí Anobiidae, Cerambycidae a Buprestidae jsou schopni využívat celulózu na 12 – 68%. Trávení celulózy se vyskytuje i u všežravého hmyzu jako jsou např. *Thysanura*, konkrétně u rybenky skleníkové (*Thermobia domestica*). Zástupci této podtřídy tráví celulózu s účinností 40 – 90%. U detritivorního hmyzu je trávení celulózy vzácné a účinnost je malá v rozmezí 11 – 50%. Využití celulózy u hmyzu živícího se listím je velmi vzácné (Martin a kol., 1991).

## 1.6 Přirozená obrana rostlin proti škůdcům

Mnoho rostlin používá k obraně proti hmyzu rostlinné proteinové inhibitory, které mohou mít dopad na růst a vývoj jedince. Rostlinné inhibitory mají omezené spektrum aktivity a často jsou aktivní pouze proti jedné třídě proteináz (Wolfson a kol., 1990; Purcell a kol., 1992). Například inhibitory serinových proteáz se běžně vyskytují v semenech a v listí (Murdock a kol., 1987).

Hmyz se brání působení těchto inhibitorů expresí tzv. inhibitor rezistentních proteáz (Aguirre a kol., 2009).

Při obraně jehličnatých stromů hrají důležitou roli fenolické sloučeniny. Po napadení lýkožrouty dojde ke změně spektra a množství vylučovaných fenolů, což má

přímý dopad na pokles příjmu potravy u lýkožrouta (Faccoli a kol., 2007; Lieutier a kol., 2003).

## **1.7 Ochrana**

K ochraně lesa před lýkožroutem smrkovým se používají lapáky a feromonové lapače. Lapáky jsou zdravé, skácené (popř. polomové) a odvětvené smrky o tloušťce nejméně 20 cm. Dávají se na slunné místo a zakrývají se po celé délce větvemi, které ho chrání proti předčasnému vysychání. Feromonové lapače přitahují lýkožrouta smrkového pomocí syntetických analogů agragačních feromonů (Kalandra a spol., 1946).

## 2 Cíl práce

1. Sledovat změny proteolytické aktivity u lýkožrouta smrkového během roku a zjistit, jaké typy proteolytických enzymů využívá.
2. Ověřit, zda lýkožrout smrkový nevyužívá rovněž jiné typy trávicích enzymů – např. celulázy a amylázy.
3. Objasnit vliv fenolů na proteolytickou aktivitu středního střeva u lýkožrouta smrkového.
4. Určit teplotní vývojový práh lýkožrouta smrkového a doplnit údaje o proteolytické aktivitě různě starých brouků.

## 3 Metodika

### 3.1 Vývoj lýkožrouta smrkového v nízkých teplotách

V polovině října byly z Národního parku Šumava v nadmořské výšce 1100 m. n. m. odebrány smrkové výřezy o délce cca 20 cm obsahující larvy, kukly a dospělé lýkožrouta smrkového. Výřezy byly následně převezeny do Českých Budějovic a umístěny do chladících inkubátorů (Sanyo MIR 153, Sanyo, Japonsko) s konstantní teplotou 10°C, 5°C a 0°C a na zahradu před entomologický ústav na slunné a stinné místo. Na obou místech byla po celou dobu pokusu měřena teplota s pomocí dataloggerů Cometter (Comet Systems, Česká republika). V inkubátorech nebyl nastaven žádný světelný režim, což mělo imitovat podmínky pod sněhem.

Výřezy byly po 2, 6 a 12 týdnech odkorněny a byl zjištěn počet larev, kukel a dospělců. Jako kontrola sloužil výřez rozebraný ihned po přivezení. U přeživších dospělců bylo pitvou určeno pohlaví, stáří, přítomnost potravy v trávicí trubici a proteolytická aktivita středního střeva.

### 3.2 Odběr, uchování a zpracování materiálu

Pro experimenty týkající se proteolytické aktivity byli lýkožrouti každý měsíc odebíráni ze čtyř různých lokalit v okolí Národního parku Šumava a Českých Budějovic. Ty se lišily nadmořskými výškami (350, 600 a 1100 m n.m., viz. **Tab. 3**). Odběr byl prováděn od srpna do března z lapáků a feromonových lapačů.

Brouci z feromonových lapačů byli do Českých Budějovic dopravováni na ledu a až do zpracování umístěni v mrazáku s konstantní teplotou – 18 °C. Brouci z lapáku (výřezu) byli nejpozději do druhého dne po převezení vybráni z kůry a též umístěni do teploty –18°C.

Pro následující pokusy bylo ve všech případech použito střední střevo lýkožrouta smrkového. Pomocí sonikátoru (Ika Labortechnik, GMBH, Germany) bylo střevo homogenizováno ve 100 µl Ringerova fyziologického roztoku pro hmyz, následně centrifugováno (1min, 12000 ot/min) a odpipetován supernatant, který sloužil jako vzorek pro experimenty. Vždy byl použit supernatant z jednoho lýkožrouta na stanovení proteolytické aktivity pro pH od 5 do 11 odstupňované po celých číslech. K pokusům

týkající se enzymatické a celulázové aktivity sloužil pufr podle Brittona a Robinsona, který je účinný v rozmezí pH 1,8 – 12 (Küster-Thiel, 1988).

### 3.3 Stanovení proteolytické aktivity

#### 3.3.1 BCA protein assay (bicinchoninic acid assay)

##### 3.3.1.1 Princip metody

Metoda stanovuje celkovou hladinu proteinů ve vzorku. Reakce probíhá ve dvou krocích:

- 1) Peptidické vazby, které jsou součástí proteinu redukují  $\text{Cu}^{2+}$  ionty ze sulfidu měďnatého na  $\text{Cu}^+$ . Množství zredukovaných iontů je přímo úměrné množství proteinů ve vzorku.
- 2) Ve druhém kroku na sebe dvě molekuly bicinchoninické kyseliny vážou jeden iont  $\text{Cu}^+$ . Tvoří se konečný fialový produkt, který absorbuje světlo o vlnové délce 562 nm.

Rychlost reakce závisí přímo úměrně na teplotě.

##### 3.3.1.2 Postup

Pro stanovení proteinů byl použit komerčně dostupný BCA kit (Sigma). Reakční směs byla připravena smícháním 50 dílů BCA a 1 dílu  $\text{CuSO}_4$ . Pokus probíhal v mikrotitrační destičce. Do každé jamky bylo napipetováno 200  $\mu\text{l}$  reakční směsi a 1  $\mu\text{l}$  vzorku. Ke slepému vzorku byl přidán pouze Ringerův roztok. Jako standart sloužil roztok BSA (bovine serum albumin) (Serva) o různých koncentracích, kterých bylo dosaženo ředěním pomocí dvojkové řady. Rozpětí koncentrací bylo 0 - 8  $\mu\text{g}$  BSA/jamka. Zásobní roztok BSA rozpuštěný v destilované vodě měl koncentraci 1mg/ml.

Následně proběhla 30 min inkubace při 60°C. Absorbance byla změřena na spektrofotometru (Remote, Tecan, Austria, software: KIM 2001, Daniel Kittrich) při vlnové délce 562 nm. Podle kalibrační křivky byly pomocí rovnice regrese dopočítány koncentrace proteinu ve vzorku (Simpson a kol., 1975; Stoscheck, 1990).

BCA metoda sloužila k určení stejného množství proteinů ve vzorcích jednotlivých brouků.

### **3.3.2 Azokaseinová assay**

#### **3.3.2.1 Princip metody**

Azokasein patří do skupiny nescifických proteázových substrátů a pomocí něj se ve vzorku stanovuje celková proteolytická aktivita. Proteázy hydrolyzují kasein, ze kterého se uvolní fotometricky detekovatelné azo- barvivo s absorpčním maximem 442 nm.

#### **3.3.2.2 Postup**

Azokasein (Sigma) byl rozpuštěn v pufru podle Brittona a Robinsona o různých pH (5 – 11) v koncentraci 5 mg/ml. Poté bylo smícháno 10 $\mu$ l vzorku s 40 $\mu$ l roztoku azokaseinu o příslušném pH. Jako kontrola byl použit vzorek s trypsinem o koncentraci 2,5  $\mu$ g/ml a slepý vzorek, kde byl přidán pouze Ringerův roztok.

Následně proběhla inkubace při teplotě 25°C po dobu 180 min. Po jejím ukončení přidána 20% TCA (trichloroctová kyselina) (Sigma) v množství 15 $\mu$ l a vzorky 10 minut centrifugovány při 12000 ot/min a 4°C. Poté byl odsán supernatant, vzorek promíchán a ponechán 30 min v pokojové teplotě. Po 30 minutách byla reakce zastavena přidáním 50 $\mu$ l 1M NaOH (Lachema), vzorek opět promíchán. Nakonec byly vzorky přepipetovány do mikrotitrační destičky a absorbance změřena na spektrofotometru (Remote, Tecan, Austria, software: KIM 2001, Daniel Kittrich) při vlnové délce 442 nm. Výpočet enzymatické aktivity byl vypočítán jako procento aktivity proti trypsinu po odečtení slepého vzorku (Charney a kol., 1947)

### **3.3.3 Specifické substráty**

#### **3.3.3.1 Princip metody**

Metoda je založená na stejném principu jako azokaseinová assay. Specifické substráty však dokáže hydrolyzovat jen určitý typ proteázy a absorbují světlo o jiné vlnové délce (405 nm).

#### **3.3.3.2 Postup**

Byly použity tři specifické substráty (Sigma): 1mM N-Benzoyl-D,L-Arg-pNA pro určení aktivity trypsinové proteázy, 1mM N-Suc-(Ala)<sub>3</sub>-Pro-pNA pro určení aktivity chymotrypsinové proteázy a 15mM L-Arg p-nitroanilid dihydrochlorid pro stanovení aminopeptidáz. Pokus probíhal v mikrotitrační destičce. Specifické substráty o příslušné



koncentraci byly rozpuštěny nejprve v 10 $\mu$ l DMSO (dimethylsulfoxid) a následně přepipetovány do pufru podle Brittona a Robinsona s pH v rozmezí 5 – 11. Poté byl smíchán 10 $\mu$ l vzorku s 40 $\mu$ l roztoku specifického substrátu o příslušném pH. Jako kontrola posloužil vzorek s trypsinem o koncentraci 2,5  $\mu$ g/ml a slepý vzorek, kde byl přidán pouze Ringerův roztok.

Následně proběhla inkubace při teplotě 30°C po dobu 30 min. Poté byla k reakce zasavena přidáním 50 $\mu$ l 30% kyseliny octové. Absorbance byla změřena na spektrofotometru (Remote, Tecan, Austria, software: KIM 2001, Daniel Kittrich) při vlnové délce 405 nm. K pokusu byl použit směsný vzorek střev z plně aktivních a žeroucích brouků, u kterých byla azokaseinovou assayí prokázána proteolytická aktivita.

### **3.3.4 Inhibitory**

Byly použity dva typy inhibitorů (Sigma): pepstatin, který inhibuje kyselé (aspartátové) proteázy (pepsin, katepsin D) a E-64, který patří mezi cysteinové inhibitory (papain, katepsin B, H). Oba inhibitory byly namíchány v koncentraci 1mM, přičemž pepstatin byl rozpuštěn v metanolu a E-64 ve vodě. K 10 $\mu$ l vzorku bylo přidáno 3  $\mu$ l inhibitoru, poté vzorek ponechán 15 minut v pokojové teplotě a následně provedena azokaseinová assay. Jako kontrola sloužil vzorek bez inhibitorů. K pokusu byl použit stejný směsný vzorek střev z plně aktivních a žeroucích brouků jako u pokusu se specifickými substráty.

## **3.4 Stanovení amylázové aktivity**

### **3.4.1 Amylazová assay**

#### **3.4.1.1 Princip metody**

Tato metoda slouží k určení koncentrace maltosy ve vzorku. Je založena na hydrolyze škrobu amylázami. Škrob se rozpadá na maltózu, která je následně spektrofotometricky stanovena při vlnové délce 550 nm. Detekce maltozy ve vzorku svědčí o přítomnosti amyláz.

#### **3.4.1.2 Postup**

Bylo smícháno 20 $\mu$ l vzorku s 80  $\mu$ l citráto-fosfátovým pufrem s pH 7 (viz.Tab.2) a 100 $\mu$ l 2% rozpustného škrobu (Merck) (který se 3 minuty vařil v citráto-

fosfátovém pufru a následně byl přefiltrován přes filtrační papír). Jako standart sloužila D(+)-maltosa (Fluka) o koncentraci 0,1 – 0,8 mg/ml.

Následně proběhla inkubace při teplotě 35°C po dobu 60 minut. Po skončení inkubace bylo přidáno 100µl Samnersova roztoku (viz. Tab.2) a vzorek ohřát? Nemám páru? na 99°C po dobu 5 min. Poté byl zchlazen na ledu a přepipetován do mikrotitrační destičky. Absorbance byla změřena na spektrofotometru (Remote, Tecan, Austria, software: KIM 2001, Daniel Kittrich) při vlnové délce 550 nm. Podle kalibrační křivky byly pomocí rovnice regrese dopočítány koncentrace maltózy ve vzorku.

**Tab. 2** –Chemikálie obsažené v citráto-fosfátovém pufru a Samnerově roztoku.

<b>Citráto-fosfátový pufr</b>	<b>Samnerův roztok</b>
0,1M kyselina citrónová . H <sub>2</sub> O (Lachema)	30% (Lachema)
0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O (Fluka)	1,6% hydroxid sodný (Lachema) 1% 3,5-dinitrosalicylová kyselina (BDH Chemicals, Poole, England)

## 3.5 Stanovení celulózy aktivity

### 3.5.1 Celulózy assay

#### 3.5.1.1 Princip metody

Tato metoda je založena na hydrolýze celulózy celulózy. Celulóza se rozpadá na glukózu, která je následně spektrofotometricky stanovena při vlnové délce 550 nm . Detekce glukózy ve vzorku svědčí o přítomnosti celulózy.

#### 3.5.1.2 postup

Byly použity dva typy substrátů (Sigma): mikrokrytalická celulóza (MCC) a karboxymethyl celulóza (CMC). Každý substrát byl odděleně rozpuštěn v pufru podle Brittona a Robinsona v pH 5, 7, 9 a 11 v koncentraci 0,1 mg na 5 ml. Poté bylo smícháno 150µl vzorku s 150µl roztoku substrátu o příslušném pH. Jako standart sloužil monohydrát glukózy o různých koncentracích, kterých bylo dosaženo ředěním pomocí dvojkové řady. Rozpětí koncentrací bylo 1 – 0 nM/l glukóza/mikrozkumavka. Zásobní roztok glukózy rozpuštěný v destilované vodě měl koncentraci 2mM/l. Jako slepý

vzorek sloužil 300 $\mu$ l roztoku substrátu v jedné mikrozkuhavce, který zachytí případný samovolný rozklad substrátu během inkubace a 1000 $\mu$ l TCA s 150 $\mu$ l vzorku v druhé mikrozkuhavce, který zachytí zabarvení a obsah tkáňové glukózy ve vzorku. Obě složky se po 24 hodinové inkubaci před stanovením glukózy smíchají a tvoří jedinou kontrolu.

Následně proběhla inkubace při teplotě 37°C po dobu 24 hod. Po ukončení inkubace byla k vzorkům přidána TCA (5g/100ml) (Sigma) v množství 1000 $\mu$ l a vzorky byly 10 min centrifugovány při 12000 ot/min a 4°C. Poté bylo odsáno 50 $\mu$ l supernatantu a přepipetováno na mikrotitrační destičku, kde již předem bylo napipetováno 250 $\mu$ l činidla pro stanovení glukózy GLU GOD (Lachema). Poté proběhla inkubace při 37°C po dobu 15 min a absorbance byla změřena na spektrofotometru (Remote, Tecan, Austria, software: KIM 2001, Daniel Kittrich) při vlnové délce 492 nm. Podle kalibrační křivky byly pomocí rovnice regrese dopočítány koncentrace glukózy ve vzorku.

### **3.6 Extrakce fenolů z lýka, jejich stanovení a vliv na proteolytickou aktivitu.**

#### **3.6.1 Extrakce fenolů**

Bylo smícháno 40 mg zhomogenizovaného a vody zbaveného lýka (Simsek a kol., 1993) s 1ml 50% metanolu (Sigma). Následovala inkubace při teplotě 60°C po dobu 20 minut. Po ukončení inkubace byly vzorky 5 minut centrifugovány na 2500 ot/min. Supernatant byl odebrán a přefiltrován přes vat. Tento postup byl čtyřikrát opakován se stejným lýkem. Vyextrahované fenoly v metanolu byly uchovávány v mrazáku s konstantní teplotou -18°C.

#### **3.6.2 Folin Denis test**

##### **3.6.2.1 Princip metody**

Tato metoda slouží k určení koncentrace fenolů ve vzorku. Jedná se o oxidačně-redukční reakci. Folin-Ciocalteu's phenol reagent obsahuje kyselinu fosfomolybdenovou a fosfowoframovou, které jsou redukovány fenoly obsaženými ve vzorku a tím dochází k barevné změně. Tvoří se výrazně barevnější produkt, který absorbuje světlo o vlnové délce 750 nm.

### 3.6.2.2 Postup

V pokusu byly použity dvě reagensie: I. 2g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Sigma) + 100 ml 0,1 M NaOH (Lachema), druhá reagensie II. Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Fluka). Bylo smícháno 0,05 ml vzorku (vyextrahovaného fenolu v 50% metanolu) s 3 ml destilované vody, 2 ml roztoku I. a 0,1 ml roztoku II. Jako slepý vzorek byla použita destilovaná voda. Po smíchání jednotlivých substancí proběhla inkubace při teplotě 60°C po dobu 15 minut. Následně byla změřena absorbance na spektrofotometru (Remote, Tecan, Austria, software: KIM 2001, Daniel Kittrich) při vlnové délce 750 nm. Výpočet koncentrace zásobního vzorku byl vyjádřen v nmol fenolů/mg lýka, která se vypočítá jako (absorbance \* celkové množství 50% metanolu (ml) přidaného v pokusu extrakce fenolů)/(počáteční váha lýka (mg) v pokusu extrakce fenolů \* množství měřeného vzorku (ml) v pokusu Folin Denis test).

### 3.6.3 Vysušení vzorku a stanovení proteolytické aktivity

Vzorky ze obsahující fenoly byly v množství 40, 80 a 160 µl napipetovány do mikrozkušavek a vloženy do exsikátoru, kde bylo po celou dobu vakuum. V exsikátoru se ze vzorků odpařil metanol. Následně byla provedena azokaseinová assay s konkrétním množstvím fenolů, které bylo vypočítáno viz. kap. 3.6.2.2. Fenoly zbavené metanolu byly až do začátku pokusu skladovány v mrazáku s konstantní teplotou -18°C. Tesně před pokusem byly vyjmuty a rozpuštěny v 10µl metanolu, který v takto malém množství nemá vliv na proteolytickou aktivitu. Jako kontrola sloužila azokaseinová assay bez fenolů.

## 3.7 Složení umělé stravy

Byly použity 4 typy strav následujícího složení:

- 1) 78% vody, 4% agaru (Sigma), 16% zhomogenizovaného a vody zbaveného lýka, 2% glukózy (Sigma)
- 2) 80% vody, 4% agaru (Sigma), 16% zhomogenizovaného a vody zbaveného lýka
- 3) 76% vody, 4% agaru (Sigma), 20% kaseinu (Sigma)
- 4) 73% vody, 4% agaru (Sigma), 20% kaseinu (Sigma), 3% škrobu (Merck)

Jako kontrola byla použita strava připravená pouze z 96% vody a 4% agaru. Umělá strava byla dána na Petriho misky a i s lýkožrouty vložena do inkubátoru s konstantní teplotou 25°C. V inkubátorech nebyl nastaven žádný světelný režim (Simsek a kol., 1993).

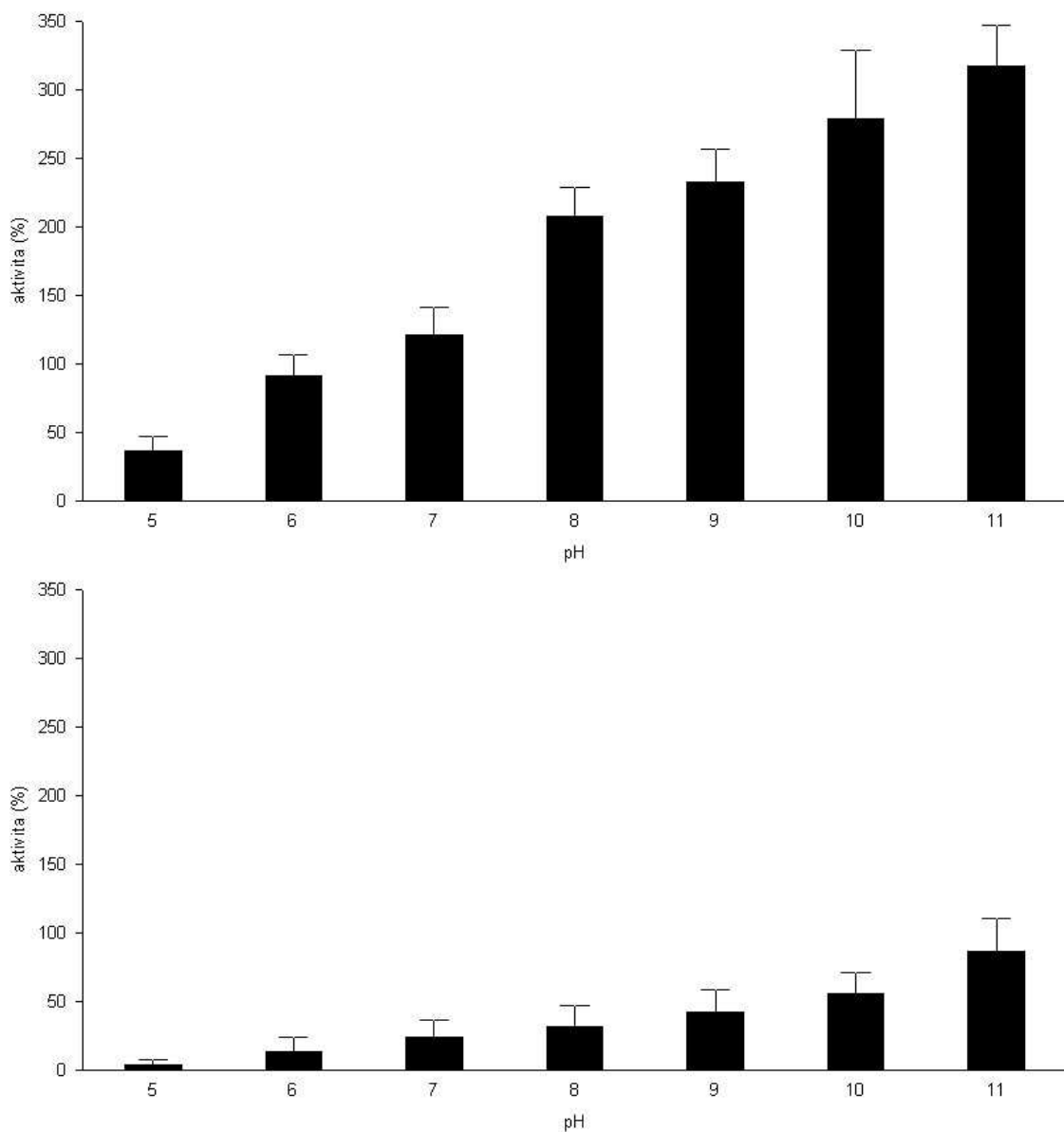
### 3.8 Určení pH ve střevě lýkožrouta smrkového

Přibližná hodnota pH střeva byla určena podle barevné změny po ponoření střeva a následném zhomogenizováním pomocí jehly do pH indikátorů. Thymolová modř (TB) měnila barvu z červené do žluté v rozmezí pH 1,2 – 2,8 a ze žluté do modré v rozmezí pH 8,0 – 9,2. metylová oranž (MO) měnila barvy z červené do žluté v rozmezí pH 3,0 – 4,4, benzolová - krezolová zeleň (BCG) ze žluté do modré v rozmezí pH 3,8 – 5,4, metylová červeně (MR) z růžové do žluté v rozmezí pH 4,4 – 6,2, brom thymolová modř (BTB) ze zelené do modré v rozmezí pH 6 – 7,6 a neutrální červeně (NR) měnila barvu z červené do žluté v rozmezí pH 6,8 – 8. Pokus probíhal v Tarasakiho mikrotitrační destičce, kde do 200  $\mu$ l jednotlivých pH indikátorů bylo vloženo střední střevo z jednoho brouka.

Byli použiti nediapauzní lýkožrouti s plným střevem (u kterých byla detekována proteolytická aktivita) a s prázdným střevem (u kterých nebyla detekována proteolytická aktivita).

## 4 Výsledky

### 4.1 Změny proteolytické aktivity u lýkožrouta smrkového během roku



**Obr. 1** – Grafy znázorňují proteolytickou aktivitu lýkožrouta smrkového přepočítanou na procento aktivity trypsinu o koncentraci 2,5  $\mu\text{g/ml}$  v rozmezí pH od 5 do 11. Data jsou pořízena z mladých, světlých jedinců - graf A a z tmavých, starých dospělců - graf B. Lýkožrouti byli odebráni 23. 9. 2009 z lokality Včelná - graf A, Kubova Huť - graf B. Koncentrace proteinu ve vzorcích byla 0,1 mg/l. Vyneseny jsou průměr ( $n=10$ ) a směrodatné odchylky.

**Tab. 3** – Tabulka znázorňuje příjem potravy a změny proteolytické aktivity u lýkožrouta smrkového od srpna do března na různých lokalitách lišících se nadmořskou výškou.

FL – feromonový lapač (umístěn na slunci); L – lapák (není-li uvedeno jinak, umístěn na slunci); TB tmavý brouk ; SB světlý brouk; + plné střevo, - prázdné střevo. Tučně vyznačená a podtržená data znázorňují naměřenou proteolytickou aktivitu. Jeden údaj je vždy měření z 10 dospělců v pH (5 – 11).

	<u><i>Prameny Vltavy</i></u> (1100 m.n.m.)	<u><i>Kubova Huť</i></u> (1100 m.n.m.)	<u><i>Včelná</i></u> (600 m.n.m.)	<u><i>Hluboká nad Vltavou</i></u> (350 m.n.m.)
26. 8.2008	FL, TB, -	<u>L, SB, +</u> FL, TB, -	FL, TB, -	<u>L, SB, +</u>
23.9.2008		<u>L, TB, +</u>	<u>L, SB, +</u>	<u>L, SB, +</u>
21.10.2008		L (stín), TB, - L (slunce) SB, -	<u>L, SB, +</u> L, TB, -	
18.11.2008		L (stín) TB, - L (slunce) TB, -	L (stín) SB, -	L, TB, -
16.12.2008	L, TB, -	L, TB, -	L, SB, -	L, TB, -
20.1.2009	L (stín), TB, -		L (stín) SB, -	L, SB, -
17.2.2009			L, SB, -	L, SB, -
31.3.2009			L (stín) SB, -	<u>L, SB, +</u>

Byla měřena proteolytická aktivita u brouků odebraných z feromonových lapačů (FL) a lapáků ze tří různých lokalit v okolí Národního parku Šumava a Hluboké nad Vltavou v období od 26.8. 2008 do 31.3. 2009. Brouci z FL byli vždy tmaví s prázdným střevem, naopak v lapáku se nacházeli převážně světlí, mladí brouci. Z tabulky 3 je patrné, že lýkožrouti přijímali potravu pouze do října a to jen na lokalitě Včelná. Přijímat potravu začali opět až v březnu a to jen na lokalitě Hluboká nad Vltavou. Na všech lokalitách byla po celou dobu měřena teplota.

Proteolytická aktivita měřená azokaseinovou assayí byla detekována pouze u lýkožroutů, kteří měli plné střevo, zatímco u lýkožroutů s prázdným střevem nebyla žádná aktivita naměřena. Výjimku tvoří brouci z lokality Kubova huť (21.10.2008), kde byli nalezeni dva světlí a jeden tmavý brouk s plným střevem u kterých nebyla naměřena proteolytická aktivita. Proteolytická aktivita vždy stoupala s pH a nejvyšší hodnoty byly zaznamenány v pH 10 a 11.

U mladých, světlých brouků s plným střevem nejvyšší naměřená aktivita v pH 11 dosahovala 320% aktivity trypsinu, zatímco u starých, tmavých brouků dosahovala pouze 75% (viz. obr. 1).

## 4.2 Detekce proteolytické aktivity po podání umělé stravy

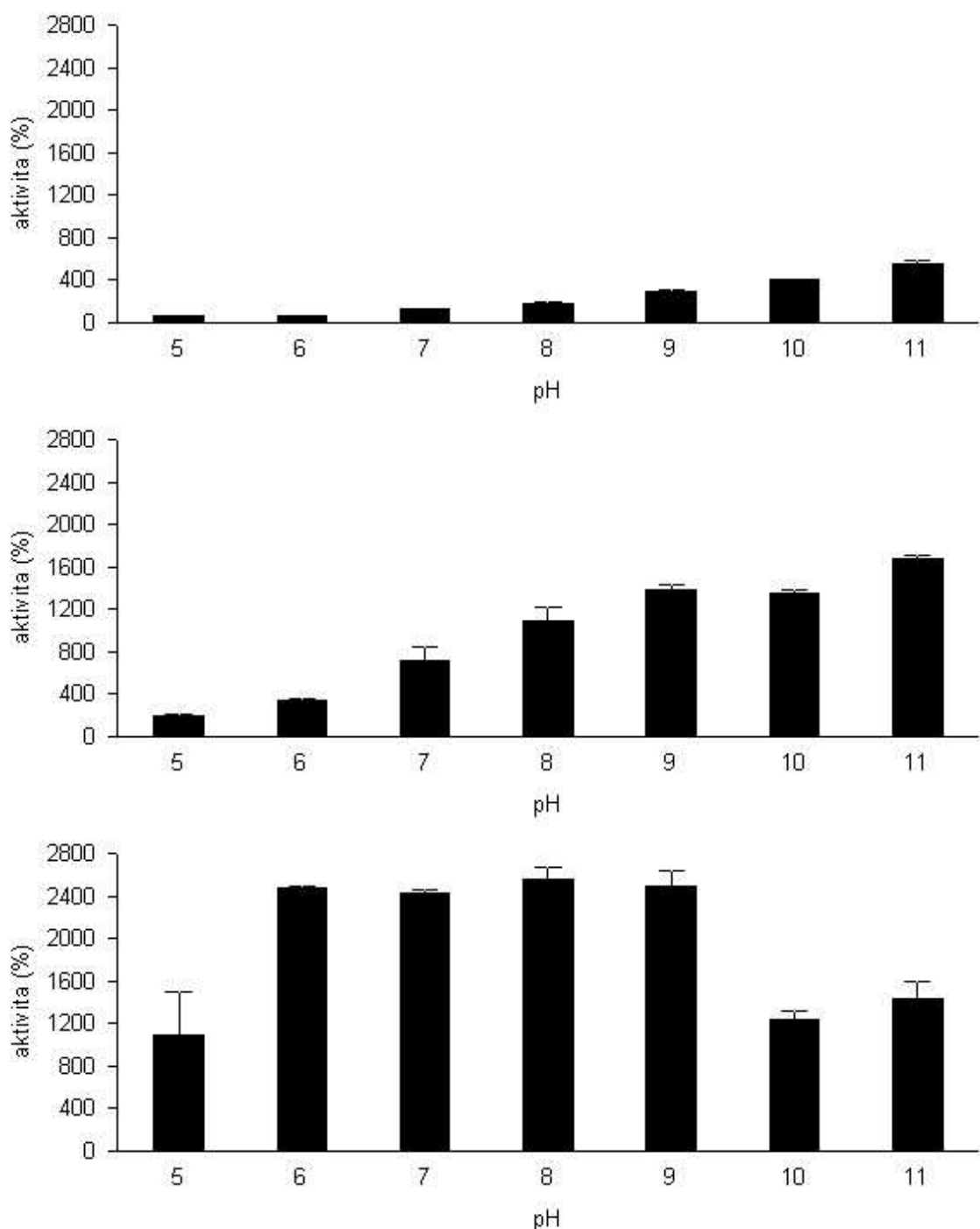
Z 30 vypitvaných světlých, mladých brouků ze 4. 11. 2009 (lapák) měli naplněné střevo pouze 4. Přestože měli plné střevo nebyla u nich zaznamenána žádná, nebo jen velmi nízká proteolytická aktivita stejně jako u lýkožroutů s prázdným střevem.

Stejní brouci po jednom dnu hladovění přijímali po dobu 24 a 48 hodin (25°C, žádný světelný režim) umělou stravu obsahující floém a glukózu. U těchto brouků, přestože měli plné střevo nebyla azokaseinovou assayí detekována žádná, nebo jen velmi malá proteolytická aktivita.

Stejní jedinci byli vystaveni hladovění 5 dnů a poté přijímali po dobu 60 hodin (25°C, žádný světelný režim) různé typy umělých strav uvedené v kapitole 3.7. Přestože měli plná střeva nebyla detekována žádná proteolytická aktivita. U stravy obsahující lýko byla zaznamenána o něco vyšší proteolytická aktivita, než u ostatních typů potravy, ale i přes to zcela zanedbatelná.



### 4.3 Detekce proteolytické aktivity s využitím specifických substrátů



**Obr. 2** - Grafy znázorňují specifickou proteolytickou aktivitu u lýkožrouta smrkového přepočítanou na procento aktivity trypsinu o koncentraci 2,5  $\mu\text{g/ml}$  v závislosti na pH od 5 do 11. Graf A znázorňuje aktivitu proteázy trypsinového typu, graf B ukazuje aktivitu proteázy chymotrypsinového typu a na grafu C je znázorněna aktivita aminopeptidáz. Data jsou pořízena ze směsného vzorku mladých, světlých jedinců u kterých byla azokaseinovou assayí naměřena pozitivní nespecifická proteolytická aktivita. Koncentrace proteinu ve vzorcích byla 0,1 mg/l. Vyneseny jsou průměr ( $n=5$ ) a směrodatné odchylky.

U světlých, mladých brouků odebraných z lapáků 23. 9. 2009, byla s pomocí specifických substrátů pro trypsin, chymotrypsin a pro stanovení aminopeptidáz prokázána proteolytická aktivita. V případě proteáz trypsinového typu enzymatická aktivita stoupala s pH a nejvyšší hodnoty byly zaznamenány v pH 11, kde dosahovaly 550% aktivity trypsinu o koncentraci 2,5 µg/ml. U proteáz chymotrypsinového typu bylo pH optimum detekováno v rozmezí 9 – 11, kde enzymatická aktivita dosahovala 1300 – 1700 % aktivity trypsinu. U aminopeptidázy byla nejvyšší aktivita zaznamenána v pH 8, kdy dosahovala 1670% aktivity trypsinu. pH optimum bylo detekováno v rozmezí 6 – 9.

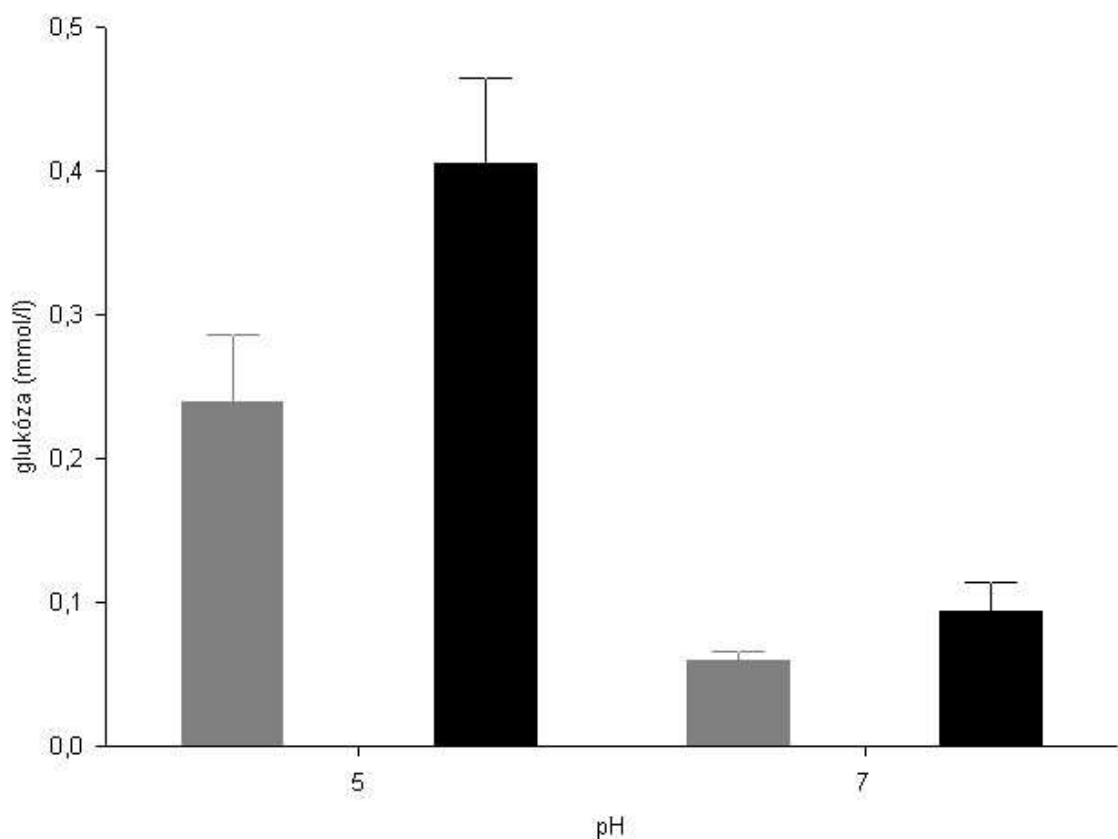
#### **4.4 Inhibitory**

V porovnání s enzymatickou aktivitou kontroly (bez přidání inhibitoru) pepstatin A inhiboval proteolytickou aktivitu v pH 11 o 28%, v pH 10 o 22,5% a v pH 9 o 25%. Inhibitor E-64 inhiboval proteolytickou aktivitu v pH 11 o 7,5%, v pH 10 o 10 % a v pH 9 o 7%. Statistické vyhodnocení prokázalo, že inhibitory významně snižují proteolytickou aktivitu vzorku (Dvoucestná ANOVA;  $F=14,02$ ;  $p=0,000008$ ). Z výsledku post-hoc Tukey testu je zřejmé, že signifikantní vliv má z obou testovaných inhibitorů pouze pepstatin ( $p=0,000235$ ), E-64 nemělo v žádném pH statisticky průkazný vliv na proteolytickou aktivitu ( $p=0,905978$ ). Při pokusu byl použit tentýž směsný vzorek jako v kapitole 4.3 z mladých, světlých brouků odebraných 23. 9. 2009.

#### **4.5 Stanovení amylázové aktivity**

Pro pokus byl použit směsný vzorek nediapauzních lýkožroutů z chovů, který před stanovením nebyl zmražen. U vzorků nebyla v žádném pH (rozmezí 5 – 11) detekována amylázová aktivita.

## 4.6 stanovení celulázové aktivity



**Obr. 3** – Grafy znázorňují množství uvolněné glukózy v mmol/l při hydrolýze mikrokrystalické celulózy (graf A) a karboxymetylcelulózy (graf B). Data jsou pořizena ze směšného vzorku mladých, světlých jedinců z chovů u kterých byla azokaseinovou assayí naměřena pozitivní nescifická proteolytická aktivita. Koncentrace proteinu ve vzorcích byla 0,45 mg/l. Vyneseny jsou průměr (n=3) a směrodatné odchylky.

Celulázová aktivita byla měřena v pH 5, 7, 9 a 11 prostřednictvím uvolněné glukózy z mikrokrystalické (MCC) a karboxymetyl (CMC) celulózy. Byl použit směšný vzorek střev z mladých, světlých brouků z chovů, kteří před stanovením nebyli zmrazeni a byla u nich detekována proteolytická aktivita azokaseinovou assayí. Tento vzorek obsahoval 0,45 mg proteinů/litr (byl použit koncentrovanější vzorek, neboť metoda není dostatečně citlivá na malé množství enzymů). U CMC byla naměřena vyšší celulázová aktivita než u MCC. U MCC bylo nejvíce uvolněné glukózy v pH 5 a to 0,240 mM/l, v pH 7 se celulázová aktivita snižovala, glukózy ve vzorku bylo naměřeno 0,059 mM/l. Ve vyšších pH již nebyla detekována žádná glukóza. V případě CMC bylo nejvíce uvolněné glukózy detekováno v pH 5 a to 0,4 mM/l, v pH 7 se celulázová

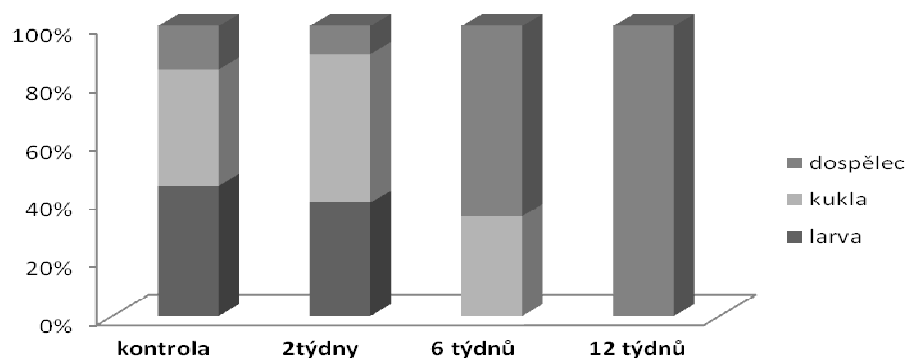
aktivita snižovala, glukózy ve vzorku bylo naměřeno 0,09 mM/l. Ve vyšších pH nebyla detekována žádná glukóza.

#### **4.7 Vliv fenolů na nespecifickou proteolytickou aktivitu**

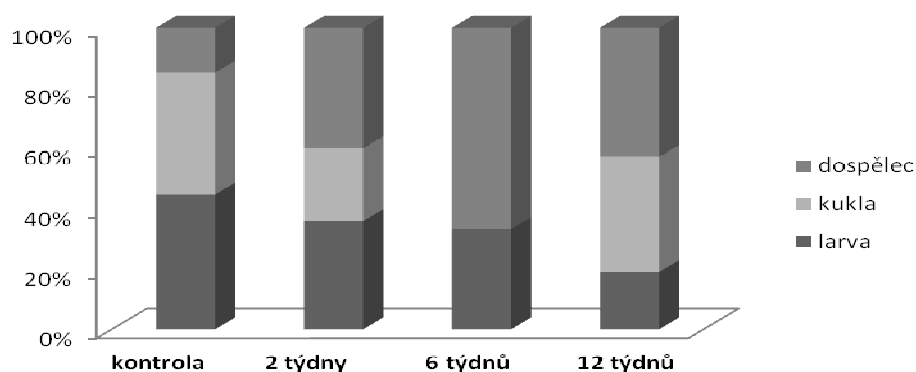
Koncentrace fenolů (94, 187 a 374 nmol/ml) v roztoku azokaseinu o pH 5 – 11 neměla žádný vliv na proteolytickou aktivitu stanovenou azokaseinovou assayí. Byl použit směsný vzorek střev z mladých, světlých brouků z chovů.

## 4.8 Vývoj lýkožrouta smrkového v nízkých teplotách

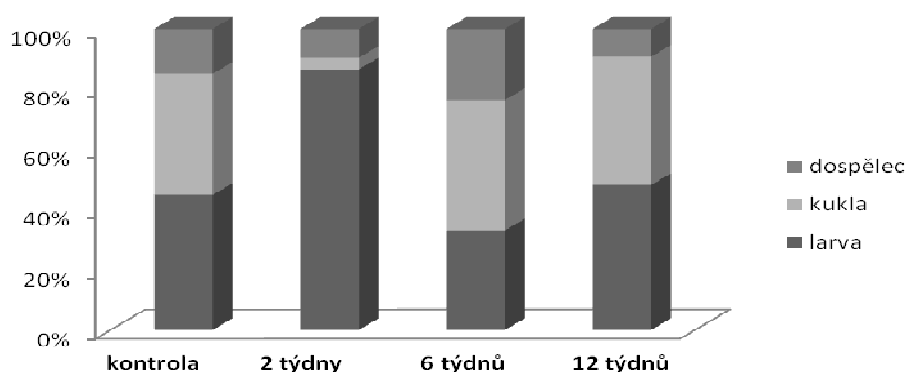
A



B



C



**Obr. 4:** Přehled vývoje lýkožrouta smrkového po dobu 2 - 12 týdnů v konstantních teplotách 10°C (graf – A), 5°C (graf – B), 0°C (graf – C). Procenta vyjadřují celkový počet larev, kukel a dospělců lýkožrouta smrkového zahrnující živé i mrtvé jedince (viz. **tab. 4**). Smrkové výřezy byly odebrány v polovině října z Národního parku Šumava v nadmořské výšce 1100 m. n. m.

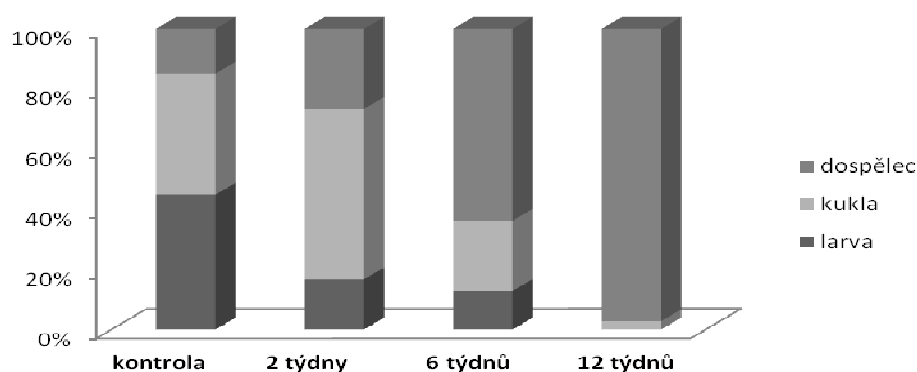
**Tab. 4** – Celkový počet živých i mrtvých larev, kukel a dospělců lýkožrouta smrkového ve výřezech umístěných do konstantní teploty 10°C (tab. A), 5°C (tab. B), 0°C (tab. C) po dobu 2 - 12 týdnů.

<b>A</b>	<b>Kontrola</b>	<b>2 týdny</b>	<b>6 týdnů</b>	<b>12 týdnů</b>
<b>Dospělec</b>	13	9	36	150
<b>Kukla</b>	35	47	33	0
<b>Larva</b>	39	36	0	0

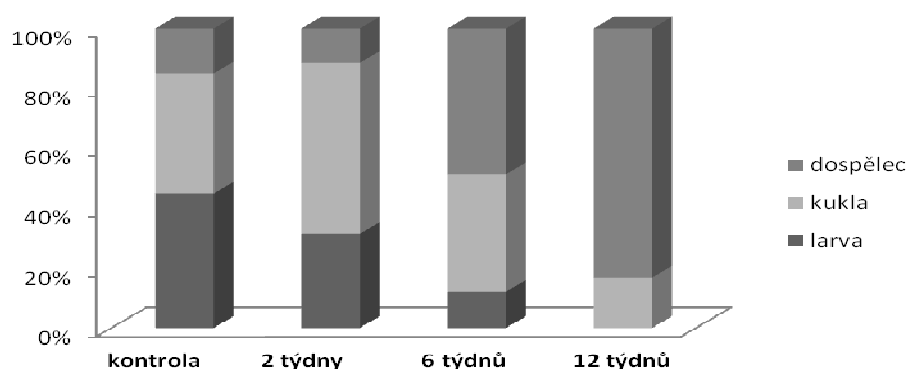
<b>B</b>	<b>Kontrola</b>	<b>2 týdny</b>	<b>6 týdnů</b>	<b>12 týdnů</b>
<b>Dospělec</b>	13	10	8	9
<b>Kukla</b>	35	6	0	8
<b>Larva</b>	39	9	4	4

<b>C</b>	<b>Kontrola</b>	<b>2 týdny</b>	<b>6 týdnů</b>	<b>12 týdnů</b>
<b>Dospělec</b>	13	10	8	9
<b>Kukla</b>	35	6	0	8
<b>Larva</b>	39	9	4	4

A



B



**Obr. 5** - Přehled vývoje lýkožrouta smrkového po dobu 2 - 12 týdnů v na slunném (graf – A) a stinném (graf – B) místě v zahradě Entomologického ústavu v Českých Budějovicích. Procenta vyjadřují celkový počet larev, kukel a dospělců lýkožrouta smrkového zahrnující živé i mrtvé jedince (viz. **tab. 5**). Smrkové výřezy byly odebrány v polovině srpna z Národního parku Šumava v nadmořské výšce 1100 m. n. m. Po celou dobu pokusu byla v okolí výřezů měřena teplota vzduchu (viz. příloha).

**Tab. 5** – Celkový počet živých i mrtvých larev, kukel a dospělců lýkožrouta smrkového ve výřezech umístěných na slunném (tab. A) a na stinném (tab. B) místo po dobu 2 - 12 týdnů.

A	Kontrola	2 týdny	6 týdnů	12 týdnů
Dospělec	13	8	30	70
Kukla	35	17	11	2
Larva	39	5	6	0

B	Kontrola	2 týdny	6 týdnů	12 týdnů
Dospělec	13	8	40	69
Kukla	35	40	32	14
Larva	39	22	10	0

**Tab. 6:** Tabulka znázorňující stáří brouků a naplnění střev. Data pocházejí z brouků, kteří byli vystaveni různým teplotním podmínkám po dobu 2, 6 a 12 týdnů. Údaje zahrnují pouze živé jedince (jejich počet je zaznamenán v závorce). Lýkožrouti pocházeli ze smrkových výřezů, které byly odebrány v polovině října z Národního parku Šumava v nadmořské výšce 1100 m. n. m.

SB světlý brouk, TB tmavý brouk, + potrava v lumenu střeva, - prázdné střevo.

	10°C	5°C	0°C	Slunce	Stín
<b>2 týdny</b> (konec října)	SB, + (2), - (4) TB - (2)	SB, + (2), - (1) TB, - (2)	TB, - (4)	SB, + (2), - (2)	SB, + (2), - (1) TB, - (3)
<b>6 týdnů</b> (konec listopadu)	SB + (38) TB - (11)	TB, + (1), - (6) SB, + (2)	SB, + (16) TB, - (10)	SB, + (21) TB, - (3)	SB, + (20) TB, - (4)
<b>12 týdnů</b> (konec ledna)	SB, + (8), - (6) TB, + (6), - (11)	TB, - (2)	TB, - (3)	SB, + (11), - (33)	SB, + (8), - (30) TB, - (10)

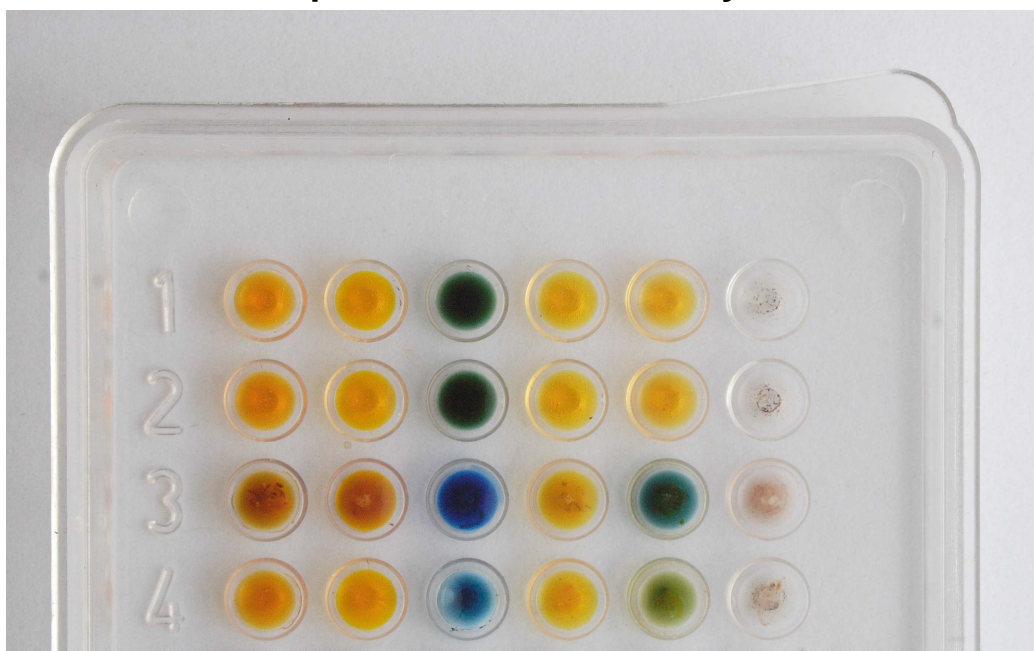
Kontrola ihned po přivezení z Šumavského Národního parku v polovině října obsahovala přibližně z 50% larvy posledního instaru, 40% kukel a 10% dospělců. Z grafů vyplývá, že postupný vývoj probíhal ve všech teplotách kromě 0°C, kde byl sice vývoj rovněž zaznamenán avšak není statisticky signifikantní. Nejrychlejší vývoj probíhal v 10°C, kde po 12 týdnech všichni jedinci dokončili preimaginální vývoj a pod kůrou byli nalezeni pouze dospělci. V ostatních teplotách vývoj probíhal pomaleji. I v 0°C byla u několika lýkožroutů zaznamenána probíhající imaginální ekdyse. Vysoká mortalita byla zaznamenána po 12 týdnech sledování v důsledku vyschnutí lýka výřezů.

Pitva dospělů prokázala, že světlí mladí brouci přijímají potravu. Staří tmaví brouci (rodičovská generace) přijímali potravu velice zřídka a jejich trávicí trakt byl zpravidla prázdný.

Proteolytická aktivita středního střeva byla detekována až druhý den po imaginální ekdysi, i když příjem potravy byl prokázán již první den. Obecně lze říci, že lýkožrouti s naplněným střevem měli vysokou enzymatickou aktivitu, zatímco u lýkožroutů s prázdným střevem nebyla žádná aktivita detekována. Nejvyšší hodnoty byly zaznamenány v pH 10 a 11.



#### 4.9 Stanovení pH ve středním střevě lýkožrouta smrkového



**Obr. 6** – Výsledky stanovení pH středního střeva lýkožrouta smrkového. Řádky 1 a 2 zahrnují jamky s indikátory bez přidaných vzorků, řádek 3 obsahoval aktivní dospělce s naplněným střevem, řádek 4 obsahoval aktivní dospělce s prázdným střevem. Zkratky indikátorů znamenají: TB - thymolová modř; MO - metylová oranž, BCG - benzolová - krezolová zeleň; MR - metylová červeň; BTB - brom thymolová modř; NR - neutrální červeň. Změna barvy indikátoru určuje rozmezí pH.

Bylo zjištěno, že pH středního střeva s potravou je v rozmezí 7,6 – 8, bez potravy se pH pohybuje v intervalu 6 – 7,6 (viz. **obr. 6**). K pokusu byli použiti nediapauzní lýkorouti s plným střevem (prokázána proteolytická aktivita) a s prázdným střevem, u kterých nebyla detekována žádná aktivita. Vždy do jednoho pH indikátoru bylo vloženo jedno střední střevo.

## 5 Diskuze

### 5.1 Příjem potravy u lýkožrouta smrkového

Pitvou byl u sledovaných lýkožroutů prokázán příjem potravy pouze do října a to výhradně na lokalitě Včelná – slunce. Po tomto datu již nebyla potrava v lumen střeva nalezena. Žír byl znovu pozorován až v březnu, nejdříve na lokalitě Hluboká - slunce. Průchod potravy trávicím traktem je poměrně rychlý a brouci byli odebíráni pouze jedenkrát měsíčně. Je tedy pravděpodobné, že pokud bylo při pitvě zjištěno prázdné střevo, nemusí to znamenat, že brouci nepřijímají potravu, ale pouze to, že ji nepřijímali bezprostředně před odběrem z přírody. To nepřímo potvrzují i výsledky stanovení celkového obsahu lipidů uvedené v diplomové práci Bartošové (2010) (pracovala s jedinci odebranými ve stejných datech), které mají již od ledna vzestupnou tendenci. To naznačuje, že lýkožrouti zhruba od tohoto termínu přijímali potravu a tvořili si energetické rezervy pro jarní rojení. Zastavení či snížení příjmu potravy během diapauzy a jeho obnovení během postdiapauzní kviescence je popsáno v celé řadě prací, recentní souhrn publikoval např. Hahn (2007).

Dalším faktorem ovlivňujícím příjem potravy je teplota. Žír byl pozorován u lýkožroutů v inkubátorech v konstantních teplotách 0°C, 5°C a 10°C i na stinném a slunném místě v zahradě Entomologického ústavu, přičemž na stinném místě bylo nalezeno méně žeroucích lýkožroutů. Na výše položených lokalitách, kde během zimního období dochází k většímu poklesu teplot, je jejich vliv na přezimující lýkožrouty často do jisté míry kompenzován faktem, že ležící kmeny překrývá různě vysoká sněhová pokrývka, která působí jako izolační vrstva.

### 5.2 Celková enzymatická aktivita u lýkožrouta smrkového

U mnoha druhů hmyzu slouží jako stimul k sekreci trávicích enzymů přítomnost potravy ve střevě (Wigglesworth, 1972). To zřejmě platí i v případě lýkožrouta smrkového, jelikož nespecifickou proteolytickou aktivitu se podařilo prokázat jen u brouků, kteří přijímali potravu. Pokud bylo při pitvě zjištěno prázdné střevo, nebyla biochemicky detekována žádná proteolytická aktivita. Azokaseinovým testem byla prokázána nejvyšší proteolytická aktivita v rozmezí pH 10 – 11, lze tedy předpokládat, že u lýkožrouta smrkového převládají enzymy, které jsou nejvíce aktivní v silně alkalickém prostředí. U mladých, světlých jedinců byla pozorována třikrát vyšší

proteolytická aktivita než u starých, tmavých dospělců. To je pravděpodobně důsledkem toho, že mladí, světlí jedinci nejsou plně vyvinuti a potřebují dostatek energie na dokončení vývoje jako je vývoj létací svaloviny, sklerotizace kutikuly, vývoj pohlavních orgánů atd.

pH sřeva jedinců, kteří nepřijímali potravu, bylo stanoveno jako neutrální. Přítomnost potravy změnila hodnotu pH na mírně alkalickou. Tyto údaje odpovídají práci Wiggleswortha (1976), kde je uvedeno, že býložravý hmyz má ve středním střevě zpravidla alkalické pH.

S využitím specifických substrátů na bázi nitroanilidu byla prokázána přítomnost proteáz trypsinového, chymotrypsinového a aminopeptidázového typu. Aktivita trypsinové proteázy stoupala s pH, pro chymotrypsinovou bylo stanoveno pH optimum mezi 8 – 11 a pro aminopeptidázy v rozmezí pH 6 – 9. Z výsledků azokaseinové assaye je patrné, že převládají enzymy s optimem v alkalickém prostředí. pH sřeva naplněného potravou je však mírně alkalické, což nasvědčuje tomu, že u lýkožroutů jsou nejvíce aktivní aminopeptidázy, které hydrolyzují potravu ve svém pH optimu. Trypsinové a chymotrypsinové proteázy jsou též aktivní, ale posunem od pH optima je jejich aktivita snížena.

Inhibiční testy potvrdily přítomnost aspartátových proteáz. Mírná inhibice byla zjištěna i u cysteinových inhibitorů (které inhibují i trypsin). Nízké hodnoty svědčí spíše o inhibici trypsinu, jehož přítomnost byla prokázána specifickým substrátem. Cysteinové proteázy spolu s aspartátovými proteázami nebyly detekovány. Dle Terry a kol. (1996) je společný výskyt cysteinových a aspartátových proteáz běžný, avšak nikoli u všech zástupců řádu Coleoptera.

Zdá se, že v trávení bílkovin u lýkožroutů hrají velkou roli serinové proteázy, což je v kontrastu s literárními údaji, podle nichž u řádu Coleoptera převažují cysteinové thiol-dependentní proteázy (Murdock a kol., 1987).

Proteolytická aktivita nebyla detekována u lýkožroutů krmených umělou stravou obsahující lýko (před začátkem pokusu měli všichni dospělci prázdné střevo a nebyla zjištěna žádná enzymatická aktivita). Tyto údaje naznačují, že během imaginální diapauzy a postdiapauzní kviescence (od listopadu do února) je mechanismus trávení potravy zcela odlišný od toho, který byl popsán u aktivních jedinců. U diapauzních jedinců zřejmě dochází k inhibici proteolytické aktivity, případně k zastavení exprese příslušných enzymů. Vzhledem k tomu, že i brouci v přírodních podmínkách běžně

přijímají potravu (Annala, 1969), musí jako zdroj energie sloužit jiné složky potravy (sacharidy).

Přestože mnoho skupin býložravého hmyzu nedokáže trávit celulózu a získává potřebný uhlík a energii trávením rostlinných složek jako je sacharóza a jiné oligosacharidy, škrob, fosfolipidy a proteiny (Applebaum, 1985), u lýkožrouta smrkového byla zjištěna celulázová aktivita. Její pH optimum bylo stanoveno na přibližně 5. S rostoucím pH aktivita rapidně klesala a ve vyšších pH již nebyla detekovatelná.

pH lumenu střeva světlých, mladých a plně žeroucích brouků (stejná kohorta, u níž byla zjišťována celulázová aktivita) se pohybovalo v rozmezí 7,6 – 8. Tato hodnota neodpovídá pH optimu celulázové aktivity a může svědčit o přítomnosti symbiotických bakterií, jejichž pH optima celulázové aktivity leží v kyselém prostředí, jak je tomu např. u termitů (Smith, 2009).

Naměřené hodnoty jsou odlišné od dat uvedených ve článku Martina (1983), který uvádí, že lýkožrout smrkový není schopen (nebo jen velmi omezeně) trávit celulózu (Chararas, 1979).

Porovnáním substrátů byla prokázána dvojnásobná aktivita u substrátu s obsahem CMC než MCC. To může být způsobeno chemickou modifikací CMC pro lepší rozpustnost ve vodě, a tím i lepší hydrolýzou v porovnání s MCC, která je ve vodě nerozpustná.

U lýkožroutů nebyla detekována amylázová aktivita, což je možno vysvětlit tím, že na rozdíl od celulázové aktivity, kdy je v lýku obsaženo velké procento celulózy, se zde nachází jen malé množství škrobu, které se navíc sezónně mění (Krekling et al., 2000).

U stromů napadených lýkožroutem dochází ke změnám metabolismu. V jejich důsledku klesá nutriční hodnota lýka, což závisí na intenzitě a trvání náletu lýkožroutů na lesní porosty. Jestliže strom musí čelit silnému napadení lýkožroutem, obsah proteinů mírně stoupne, sacharidy jsou sníženy o více než 75% v závislosti na stupni napadení (Rohde a kol., 1996). Dochází také ke změnám v metabolismu fenolů (Faccoli a kol., 2007). V experimentu však zvýšená koncentrace fenolů neměla žádný vliv na proteolytickou aktivitu. Zdá se tedy, že fenoly neslouží jako inhibitory proteáz, avšak jejich zvýšená koncentrace má u lýkožrouta smrkového za následek pokles příjmu potravy (Faccoli, 2007). Podobný vliv má zvýšená koncentrace fenolů například i na hálkotvorný hmyz (Pascual-Alvarado a kol., 2008).

### 5.3 Vývoj lýkožrouta smrkového v nízkých teplotách

Na pokusu s výřezy obsahujícími lýkožrouty, které byly vystaveny různé teplotě po dobu 2, 6 a 12 týdnů, je patrné, že rychlost vývoje stoupá s teplotou. K obdobným výsledkům dospěli i Wermelinger a Seifert (1998). Nejrychleji vývoj probíhal v 10°C a na slunci, kde za 12 týdnů lýkožrout dokončil pre-imaginální vývoj a pod kůrou byli nalezeni pouze dospělí brouci. Vývoj nedospělých stádií tedy pokračuje i v nízké teplotě až do přelomu prosince a ledna, kdy jej vysoké procento populace dokončí, a v nadcházející sezóně vylétují již zcela pohlavně dospělí jedinci po ukončeném úživném žíru. Zjištěné údaje o vývojovém prahu lýkožrouta smrkového korespondují s daty Annily (1969), který stanovil tuto hodnotu jako 5°C. V porovnání s dalšími články uvedenými v kapitole 1.3. jsme pozorovali nižší teplotu pro vývojový práh. Může to být způsobeno i tím, že Wermelinger a Seifert (1999) používali pro pokusy metodu sandwichového chovu (Wermelinger a Seifert, 1998), která je vhodná na sledování průběhu vývoje a reprodukce, ale věrohodně nenapodobí přírodní podmínky. Autoři navíc používali dospělce z laboratorního chovu v podmínkách dlouhého dne. Naproti tomu v práci Annily (1969) i našich experimentech byli využiti chladově adaptovaní lýkožrouti, odebraní z přírody během podzimu, jejichž vývojový práh je bezesporu nižší.

## 6 Závěr

Lýkožrout smrkový je jedním z nejzávažnějších lesních škůdců smrkových porostů. I přesto, že je studován již po staletí a na snížení jím způsobených škod je každoročně vynakládáno značné úsilí, mnoho informací o životním cyklu, vývoji a rozmnožování stále chybí. Výsledky, popsané v této práci představují výchozí informace pro navazující studie zaměřené na změny způsobu využití potravy během různých fází životního cyklu, se všemi důsledky pro úspěšnost přečkávání zimního období a disperzní a reprodukční potenciál na počátku jara. Znalosti, týkající se vývojového prahu chladově aklimovaných a neaklimovaných jedinců lýkožrouta smrkového, mohou rovněž přispět k objasnění některých otázek kolem přezimování tohoto druhu. Dosud např. nebylo zcela vyjasněno, jak je možné, že v některých letech se lze ještě na počátku jara setkat s larvami posledního instaru a kuklami, které úspěšně přezimovaly, ačkoli relevantní informace by měly rozsáhlý význam pro lesnickou praxi.

## 7 Seznam literatury

- AGUIRRE C., CASTRO-GUILÉN J. L., CONTRERAS L., MENDIOLA-OLAYA E., GONZÁLEZ DE LA VARA L., BLANCO-LABRA A., 2009: Partial characterization of a chymotrypsin – like protease in the larger grain borer (*Prostephanus truncatus* (Horn)) in relation to activity of *Hyptis suaveolens* (L.) trypsin inhibitor. *J. Stored Prod. Res.* 45: 133 – 138
- ANDERBRANT O. & LÖFQVIST J., 1998: Relation between first and second brood production in the bark beetle *Ips typographus* (Scolytidae). *Oikos* 53: 357 – 365
- ANNILA E., 1969: Influence of temperature upon development and voltinism of *Ips typographus* L. (Coleoptera, Scolytidae). *Ann. Zool. Fennici* 6: 161 – 20
- APPLEBAUM S. W., 1985: Biochemistry of digestion. *Comprehen. Insect Physiol. Biochem. Pharm.* 4: 279 – 312
- BARRETT A. J., 1986: The Classes of proteolytic enzymes, M.J. Dalling (ed). *Plant Proteolytic enzymes*, CRC Press, Boca Raton
- BARTOŠOVÁ E., 2010: Vliv energetických rezerv na úspěšnost přezimování a reprodukční potenciál lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*). Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta: pp 38
- DOLEŽAL P., SEHNAL F., 2007: Effects of photoperiod and temperature on the development and diapause of the bark beetle *Ips typographus*. *J. Appl. Entomol.* 131(3): 165 – 173.
- ESCHERICH K., 1923: *Die Forstinsekten Mitteleuropas II.* – 663 pp. Berlin
- FACCOLI M., SCHLYTER F., 2007: Conifer phenolic resistance markers are bark beetle antifeedant semiochemicals. *Agricul. Forest Entom.* 9: 237 – 245
- FLEISCHER A., 1875: Lýkožrouti čili korovci (*Bostrychus typographus* L.) v Šumavě a jejich nepřátelé. *Vesmír* 4: 97 – 99, 111 – 114, 128 – 129
- GOODENOUGH S., GOODENOUGH S., 1993: Who needs cellulase? *J. Biol. Educ.* 27: 97 – 102
- HAHN D. A., DENLINGER D. L., 2007: Meeting the energetic demands of insect diapause: Nutrient storage and utilization. *J. Ins. Phys.* 53: 760 – 773
- HENNINGH C., 1907: Experimentell-biologische Studien an Borkenkäfern I – II. *Naturwiss.Zeitschr. Land u. Forstwiss.* 5: 66 – 75, 97 – 125
- CHARARAS C., 1962: *Étude biologique des scolytides des coniferes.* Paris: Le Chevalier, 556 pp.
- CHARARAS C., 1979: *Ecophysiologie des Insectes Parasites des Forest.* Published by the author, Paris.

- CHARNEY J., TOMARELLI R. M., 1947: A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *J. Biol. Chem.* 171: 501 – 505
- KALANDRA A., PFEFFER A., 1946: Směrnice ochrany proti lýkožroutu smrkovému *Ips Typographus* L. Ministerstvo zemědělství v Praze
- KLEPZIG K. D., ADAMS A. S., HANDELSMAN J., RAFFA K. F., 2009: Symbioses: A key driver of insect physiological processes, ecological interactions, evolutionary diversification, and impacts on human. *Environ. Entomol.* 38: 67 – 77
- KODRÍK D., 2000: Fyziologie hmyzu. Učební texty. Entomologický ústav AV ČR a Biologická fakulta, JČU v Českých Budějovicích, 217p.
- KREKLING T., FRANCESCHI V. R., BERRYNAME A., CHRISTIANSEN E., 2000: The structure and development of polyphenolic parenchyma cells in Norway spruce (*Picea abies*) bark. *Flora* 195 (4): 354 - 369
- KŘÍSTEK J., URBAN J., 2004: Lesnická entomologie. Academia, Praha
- KUDELA M., 1970: Atlas leního hmyzu: Škůdci na jehličnanech. Státní zemědělské nakladatelství, Praha
- KÜSTER-THIEL, 1988: Chemické analytické výpočetní tabulky. Academia Praha, 336
- LACTIN D. J., HOLLIDAY N. J., JOHNSON D. L., CAIGEN R., 1995: Improved rate model of temperature – dependent development by arthropods. *Env. Entomol.* 24: 68 – 75
- LIEUTIER F., BRIGNOLAS F., SAUVARD D., YART A., GALET CH., BRUNET M., SYPE H., 2001: Intra- and inter-provenance variability in phloem phenols of *Picea abies* and relationship to a bark beetle-associated fungus. *Tree Physiol.* 23: 247 – 256
- LINDELÖW M.A. & WESLIEN J., 1986: Sex – specific emergence of *Ips typographus* L. (Coleoptera: Scolytidae) and flight behaviour in response to pheromone sources following hibernation. *Can. Ent.* 118: 59 – 67
- LOGAN J. A., WOLLKIND D. J., HOYT S. C., TANIGOSHI L. K., 1965: An analytic model for description of temperature dependent rate phenomena in arthropods. *Env. Entomol.* 5: 1133 – 110
- MARTIN M. M., 1983: Minireview: Cellulose digestion in insects. *Comp. Biochem. Physiol.* 75A: 313 – 324
- MARTIN M. M., JONES C. G., BERNAYS E. A., 1991: The evolution of cellulose digestion in insects. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 333: 281- 288
- MERKER E., 1957: Die ökologischen Ursachen der Massenvermehrung des grossen Fichtenborkenkäfers in Südwestdeutschland während der Jahre 1941 bis 1951. 140 pp. Freiburg



MERKER E., WILD M., 1954: Das Reifen der Geschlechtsdrüsen bei dem grossen Fichtenborkenkäfer und sein Einfluss auf das Verhalten der Tiere. Beitr. Entomologie 4: 451 – 468

MURDOCK L. L., BROOKHART G., DUNN P. E., FOARD D. E., KELLEY S., KITCH L., SHADE R. E., SHUKLE R. H., WOLFSON J. L., 1987: Cysteine digestive proteinases in coleoptera. J. Biochem. Physiol. 87B: 783 – 787

NORTH M. J., 1982: Comparative biochemistry of the proteinases of eucaryotic microorganism. Microbiol. Rev. 46: 308 – 340

PASCUAL-ALVARADO E., CUEVAS-REYES P., QUESADA S., OYAMA K., 2008: Interaction between galling insect and leaf-feeding insect: the role of plant phenolic compounds and their possible interference with herbivores. J. Trop. Ecol. 24: 329 - 336

PFEFFER A., 1952: Kůrovec lýkožrout smrkový a boj proti němu. Praha: Nakladatelství Brázda, 45 pp

PFEFFER A., 1954: Lýkožrout smrkový a boj proti němu. Státní zemědělské nakladatelství, Praha

PURCELL J. P., GREENPLATE J. T., SAMMONS R. D., 1992: Examination of midgut luminal proteinase activities in six economically important insects. Insect Biochem. Molec. Biol. 22: 41 – 47

ROHDE M., WALDMANN R., LUNDERSTÄDT J., 1996: Induced defence reaction in the phloem of spruce (*Picea abies*) and larch (*Larix decidua*) after attack by *Ips typographus* and *Ips cembrae*. Forest Ecol. Managm. 86: 51 - 59

SEITNER M., 1923: Beobachtungen und Erfahrungen aus dem Auftreten des achtzähligen Fichtenborkenkäfers *Ips typographus* L. in Oberösterreich und Steiermark in den Jahren 1921 und 1922. Centralbl. Ges. Forstwesen 49: 1 - 11, 149 – 162, 270 – 277

SEITNER M., 1924: Beobachtungen und Erfahrungen aus dem Auftreten des achtzähligen Fichtenborkenkäfers *Ips typographus* L. in Oberösterreich und Steiermark in den Jahren 1921 bis einschl. 1923. Centralbl. Ges. Forstwesen 50: 2 – 23

SCHIMITSCHEK E., 1931: Forstentomologische Untersuchungen aus dem Gebiete von Lunz I. Standortsklima und Kleinklima in ihren Beziehungen zum Entwicklungsablauf und zur Mortalität von Insekten. Zeitschr. Angew. Entomol. 18: 460 - 491

SIMPSON E. R., WILLIAMS – SMITH D. L., 1975: Effect of calcium(ion) uptake by rat adrenal mitochondrial on pregnenolone formation and spectral properties of cytochrome *P*-450. Biochemica and Biophysica Acta 404 (2): 309 – 320

SIMSEK Z., FÜHRER E., 1993: Künstliches Nähr- und Brutmedium für *Ips typographus* L. (Col., Scolytidae). J. Appl. Ent. 116: 432 - 439

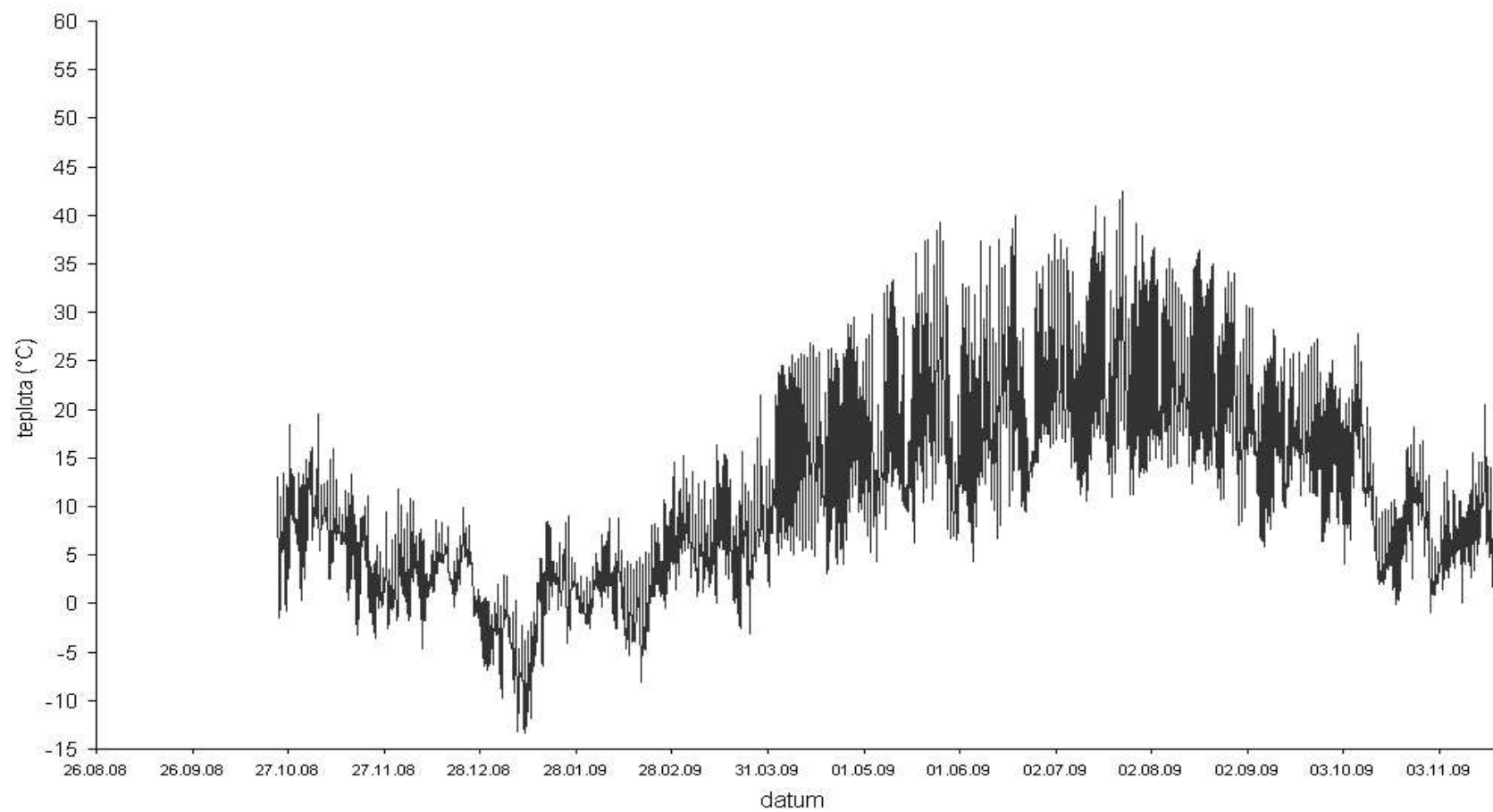
SKUHRAVÝ V., 2002: Lýkožrout smrkový a jeho kalamity. Agrospoj, Praha

- SMITH J. A., SCHARF M. E., PEREIRA R. M., KOEHLER P. G., 2009: pH Optimization of Gut Cellulase and Xylanase Activities from the Eastern Subterranean Termite, *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Sociobiology* 54: 199 – 210
- STOSCHECK C., 1990: Quantification of Protein. *Methods in Enzymology*, 182:50-68
- TERRA W. R., CRISTOFOLETTI P. T., 1996: Midgut proteinases in three divergent species of coleoptera. *Comp. Biochem. Physiol.* 113B: 725 – 730
- TERRA W.R., FERREIRA C., 1994: Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* 1: 1 – 62
- VITÉ J.P., 1952: Temperaturversuche an *Ips typographus* L. *Zool. Anz.* 149: 195 – 206
- WERMELINGER B. & SEIFERT M., 1998: Analysis of the temperature dependent development of the spruce bark beetle *Ips typographus* (L.) (Col., Scolytidae) *J. Appl. Ent.* 122: 185 - 191
- WERMELINGER B. & SEIFERT M., 1999: Temperature – dependent reproduction of the spruce bark beetle *Ips typographus*, and analysis of the potential population growth. *Ecol. Ent.* 24: 103 – 110
- WERMELINGER B., 2004: Ecology and management of the spruce bark beetle *Ips typographus* – a review of recent research. *Forest Ecol. Manag.* 202: 67 – 82
- WIGGLESWORTH V. B., 1965: *The principles of insect physiology*. 6th edn., Methuen, London, 166
- WIGGLESWORTH V. B., 1974: *Insect physiology*. 7th edn., Chapman and Hall, London, 741
- WOLFSON J. L., MURDOCK L. L., 1989: Diversity in digestive proteinase activity among insect. *J. Chem. Ecol.* 16: 1089 – 1102
- XUE X. M., ANDERSON A. J., RICHARDSON N. A., ANDERSON A. J., XUE G. P., MATHER P. B., 1999: Characterisation of cellulase activity in the digestive system of the redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Aquaculture* 180: 373 – 386

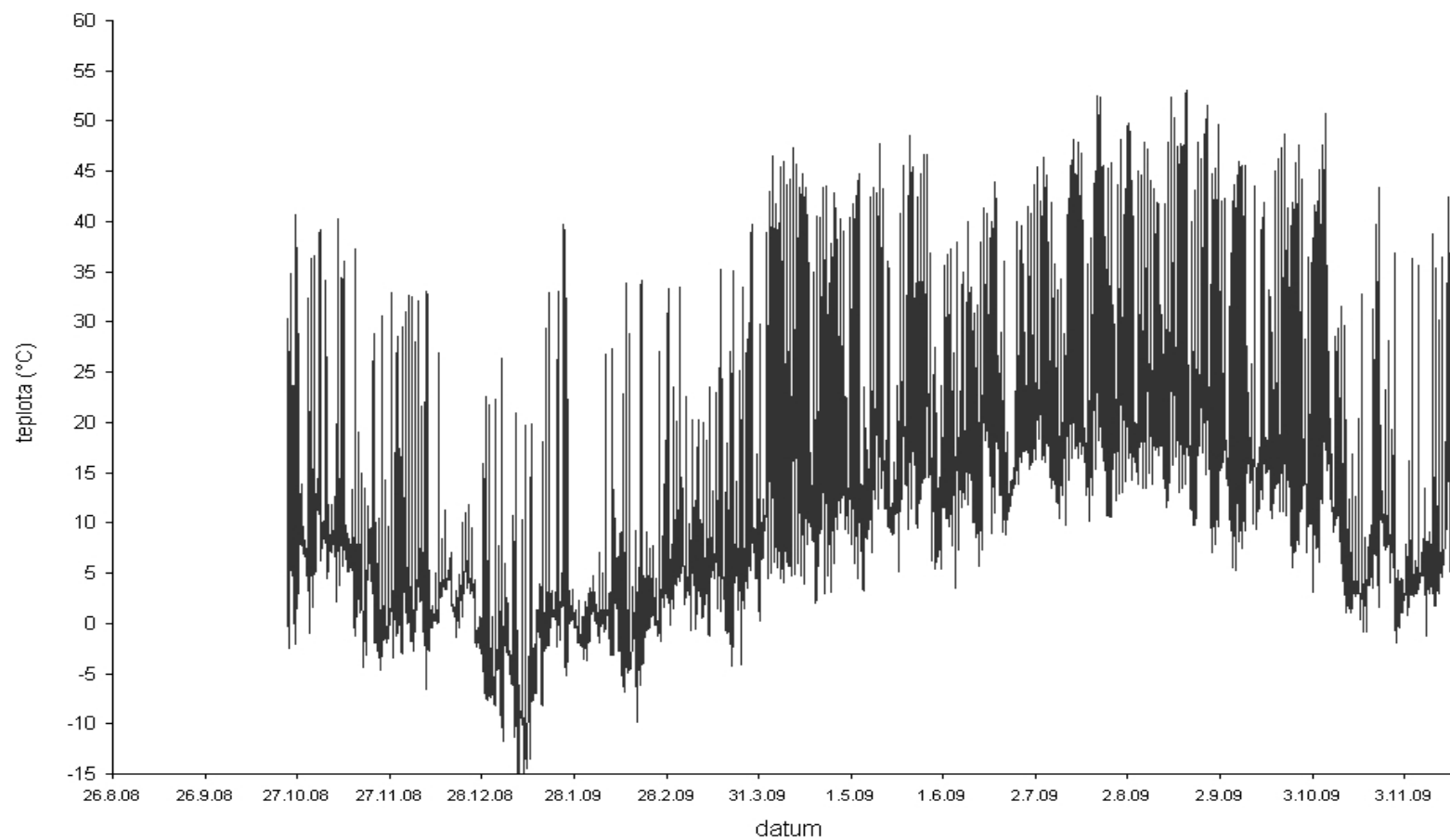
## 8 Přílohy

Obr. 7 Průběh teplot vzduchu na stinném místě před Entomologickým ústavem

Obr. 8 Průběh teplot vzduchu na slunném místě před Entomologickým ústavem



**Obr. 7** Průběh teplot vzduchu na stinném místě před Entomologickým ústavem



**Obr. 8** Průběh teplot vzduchu na slunném místě před Entomologickým ústavem



