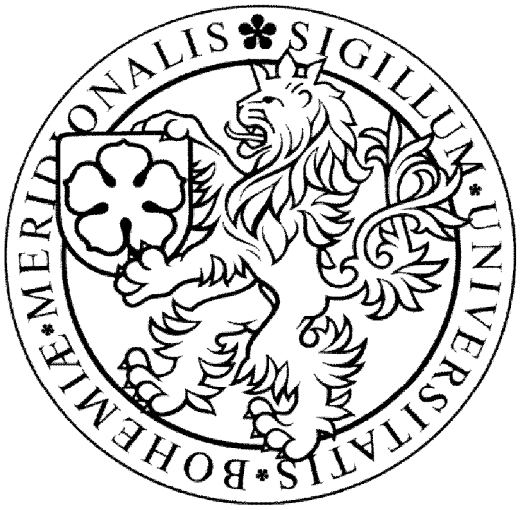
JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Přírodovědecká fakulta

Katedra medicínské biologie



Faktory zprostředkující vliv páření na délku života samic *Pyrrhocoris apterus*

Magisterská práce

Bc. Hana Blažková

Vedoucí práce: doc. RNDr. Magdalena Hodková, CSc.

2010

MAGISTERSKÁ PRÁCE

Blažková H., 2010: Faktory zprostředkující vliv páření na délku života samic *Pyrrhocoris apterus* [Factors mediating effect of mating on lifespan of females *Pyrrhocoris apterus.* Master Thesis, in Czech] – 59 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

ANOTACE

Data from the literature suggest that the male accessory gland proteins (Acps) are responsible for the cost of mating in insect females. Consistent with this idea, females of *Pyrrhocoris apterus* continuously exposed to males deprived of juvenile hormone (JH) by ablation of the corpus allatum (CA), and consequently with reduced Acps, lived slightly longer than did females exposed to intact males. On the other hand, the widely held view that the cost of mating is mediated via enhanced levels of JH and fecundity was challenged: (a) mating reduced life span in both CA-ablated and intact females, (b) the intensity of egg production and protein content in eggs did not differ between virgin and mating females. CA-ablation dramatically reduced activity of phenoloxidase (PO) (a component of immune system) in non-diapause females, but neither mating (short life) nor diapause (long life, CA is inactive) reduced PO activity, suggesting that PO plays no important role in the regulation of lifespan.

FINANČNÍ PODPORA:

Tato práce je součástí projektu č. P502/10/1612 financovaného Grantovou agenturou České republiky.

Prohlašuji, že jsem tuto magisterskou práci 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 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.

V Českých Budějovicích dne 30. 4. 2010

……

Blažková Hana

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat své školitelce doc. RNDr. M. Hodkové., CSc. za cenné rady a pomoc při zpracování mé magisterské práce. Můj druhý dík patří Bc. Hance Vaněčkové za její velkou ochotu a navození příjemného pracovního prostředí. Paní J. Mikešové děkuji za pomoc s chovy (stejně tak i Hance). Příteli děkuji za velkou oporu a trpělivost s vysvětlováním.

OBSAH

1. Úvod..... 1

1.1 Délka života..... 1

1.2 Stárnutí 1

1.3 Faktory ovlivňující délku života hmyzu 1

1.4 Vztah mezi reprodukcí a délkou života 2

1.4.1 Proximální mechanismy reprodukčních nákladů 3

1.5 Endokrinní signály 5

1.5.1 Juvenilní hormon (JH) 6

1.6. Vliv proteinů z přídatných žláz samců (Acps) na délku života samic 8

1.7 Imunita bezobratlých 11

1.7.1 Fenoloxidázová kaskáda..... 11

1.7.2 Vztah mezi pářením a imunitní funkcí 12

1.7.3 Vliv JH na imunitní systém 13

1.7.4 Vztah mezi imunitou a délkou života..... 13

2. Cíle práce 15

3. Materiál a metody 16

3.1 Pokusná zvířata 16

3.2 Vliv proteinů z přídatných žláz (AGs) samců na délku života samic 16

3.2.1 Vliv allatektomie na frekvenci páření 16

3.2.2 Vliv samců bez CA na délku života samic..... 17

3.2.3 SDS-PAGE elektroforéza..... 17

3.2.4 Detekce proteinů (z přídatných žláz) pomocí metody Western blot 18

3.2.5 Stanovení koncentrace proteinů z AGs pomocí BCA (=bicinchoninové) metody 19

3.3 Stanovení koncentrace proteinů ve vajíčkách pomocí BCA metody 21

3.4 Stanovení fenoloxidázy (PO)..... 21

3.5 Grafické a statistické zpracování dat..... 23

4. Výsledky..... 24

4.1 Proteiny z přídatných žláz (AGs) samců 24

4.1.1 Kvantifikace proteinů z AGs pomocí BCA metody..... 24

4.1.2 Elektroforéza proteinů z přídatných žláz samců 25

4.1.3 Detekce proteinu z přídatných žláz samců pomocí metody Western blot 26

4.1.4 Vliv allatektomovaných samců na délku života samic (vliv proteinů z AGs) 27

4.2 Vliv páření na délku života allatektomovaných samic (vliv JH) 29

4.3 Vliv allatektomie na sexuální aktivitu samic a samců 30

4.4 Intenzita produkce vajíček..... 32

4.5 Kvalita vajíček panenských a kopulujících samic 32

4. 6 Vliv různých faktorů na aktivitu fenoloxidázy (PO)..... 34

4.6.1 Vliv páření na aktivitu fenoloxidázy samic..... 34

4.6.2 Vliv corpora allata a pars intercerebralis na aktivitu fenoloxidázy LD samic 35

4.6.3 Vliv corpora allata a pars intercerebralis na aktivitu fenoloxidázy SD samic 37

4.6.4 Porovnání LD a SD intaktních samic – 1 a 2 týdny starých 38

4.6.5 Porovnání allatektomovaných LD a SD samic – 1 a 2 týdny starých 39

4.6.6 Porovnání LD a SD samic bez pars intercerebralis (a CA) – 1 a 2 týdny starých 40

4.6.7 Variabilita mezi jedinci v jednotlivých skupinách 41

5. Diskuze 43

5.1 Vliv proteinů z přídatných žláz samců na délku života samic 43

5.2 Vztah mezi produkcí a kvalitou vajíček a délkou života 44

5.3 Vliv páření na délku života allatektomovaných samic (bez JH) 44

5.4 Vliv páření na imunitní systém samiček Pyrrhocoris apterus 46

5.5 Vliv JH na aktivitu fenoloxidázy u LD a SD samic 47

5.6 Vliv pars intercerebralis na aktivitu PO u LD a SD samic 48

5.7 Vliv fenoloxidázy na délku života 48

5.8 Variabilita fenoloxidázy 48

6. Závěr 50

7. Literatura 51

1. ÚVOD

1.1 Délka života

Délka života je mezi žijícími organismy značně variabilní. Například ptáci mají delší život než srovnatelně velcí savci a i mezi savci jsou rozdíly. Velryby dokážou žít o 2 řády déle než rejsci s potvrzenou délkou života 211 let. Přežívání je většinou delší v zajetí než ve volné přírodě, jelikož ho neohrožují externí rizika (např. predace), avšak vzor rozdílů mezi druhy zůstává stejný. Zde délku života určují vnitřní limity a stárnutí je proces, který tento limit udává (Partridge & Germs 2002).

1.2 Stárnutí

Stárnutí neboli senescence je postupný pokles fyziologické funkce, jejímž výsledkem je s přibývajícím věkem snížená rychlost přežívání a reprodukce a nakonec smrt (Rose 1991; Flatt & Schmidt 2009).

Existuje mnoho teorií popisujících příčiny stárnutí (Weinert & Timiras 2003), které mohou být rozděleny do dvou rozsáhlých skupin (Troen 2003): stochastických a genetických teorií. Základní myšlenkou stochastické teorie je hromadění defektů na různých úrovních organismu. Dochází k poškozování tkání a buněčných organel vlivem volných kyslíkových radikálů, k poškozování DNA a jejích reparačních mechanismů. Genetické teorie považují stárnutí za součást geneticky programovaného a kontrolovaného řízení délky života, které zahrnuje vývoj, dospívání, stárnutí a smrt.

1.3 Faktory ovlivňující délku života hmyzu

Jak dlouho jedinec bude žít, je dáno především geneticky, ale i další faktory mohou ovlivňovat jeho délku života. U hmyzu mezi tyto faktory patří např. teplota a světlo. U mnoha studií hmyzí délka života byla delší při nižší teplotě, což je připisováno odlišné metabolické rychlosti, která při vyšší teplotě stoupá (Collatz 2003), a změně fyzické aktivity (Helfand & Rogina). Pokud byla moucha domácí chována v podmínkách, ve kterých nebyla schopná létat, délka života se prodloužila na stejnou úroveň jako při snížené okolní teplotě (Sohal & Buchan 1981).

Za nepříznivých přírodních podmínek upadá hmyz do diapauzy, programovaného zastavení vývoje, které je doprovázeno fyziologickými změnami zajišťujícími přežití. Diapauza se může vyskytovat ve všech stádiích vývoje: nalezneme ji u vajíček, larev, kukel a dospělců (Collatz 2003). U dospělců – při tzv. reprodukční diapauze se u samic zastavuje oogeneze a vitellogeneze, u samců aktivita přídatných žláz, a k páření nedochází (Tatar et al. 2001). Reprodukční diapauza umožňuje až dvojnásobné prodloužení života jedince.

Reprodukce patří mezi další faktory mající na přežívání hmyzu vliv. Především samičky se značně liší ve svých délkách života, pokud se páří či nikoliv. Že jim reprodukce zkracuje život bylo prokázáno u mnoha studií na *Drosophila melanogaster* (Fowler & Partridge 1989; Chapman et al. 1995), *Callosobruchus chinensis* (Yanagi & Miyatake 2003; Rönn et al. 2005), *Ceratitis capitata* (Chapman et al. 1998), *Musca domestica* (Ragland & Sohal 1973), *Colias eurytheme* (Kemp & Rutowski 2004), *Belostoma flumineum* (Gilg & Kruse 2002) či *Pyrrhocoris apterus* (Blažková 2008).

1.4 Vztah mezi reprodukcí a délkou života

U mnoha organismů existuje trade-off mezi reprodukcí a přežíváním (Williams 1966; Roff 1992). Takovýto trade-off může být zaznamenaný na fyziologické úrovni (jedinci, kteří se rozmnožují více, žijí kratší dobu) a úrovni evoluční (genetické) (evoluce vyšší reprodukční snahy je spojena se snížením délky života jako korelační odezva; Reznick 1985; Bell & Koufopanou 1986; Stearns 1992).

Reprodukční náklady zkracující život samičkám se mohou skládat z několika faktorů: ze samčích námluv, páření, z produkce vajíček a z péče o potomstvo (Kotiaho & Simmons 2003). Existuje jen omezený počet důkazů, že samčí námluvy mohou být pro samičky nákladné. Samičky *Drosophila melanogaster* a *Glossina morsitans* vykazovaly sníženou délkou života následkem samčích námluv, i když k samotnému páření nedocházelo (Partridge & Fowler 1990; Clutton-Brock & Langley 1997). Naproti tomu reprodukční náklady způsobené kopulací jsou zdokumentovány u mnoha druhů. U samiček *Callosobruchus maculatus*, *Cimex lectularius* a *Sepsis cynipsea* dochází k rychlejšímu stárnutí fyzickým zraněním, které je způsobené samčím pohlavním orgánem během páření (Crudgington & Siva-Jothy 2000; Blanckenhorn et al. 2002). U samiček *D. melanogaster* jsou za pářící náklady zodpovědné proteiny samčích přídatných žláz (Fowler & Partridge 1989; Chapman et al.

1995; Wigby & Chapman 2005). Avšak existují studie, kde nebyla zvýšená mortalita samiček následkem páření vůbec zaznamenána (tab. 1 Chapman et al. 1998; Kotiaho et al. 2003).

Nezávisle na dalších nákladech zkracuje produkce vajíček život samičkám *Callosobruchus chinensis* (Yanagi & Miyatake 2003), *Ceratitis capitata* (Chapman et al. 1998), *Onthophagus binodis* (Kotiaho & Simmons 2003) či *Saltella sphondylli* (Martin & Hosken 2003). Příkladem jsou single gene mutace (mutace v insulinové signální dráze) nebo střídmé stravování, které prodlouží život, ale mohou snížit plodnost či způsobit sterilitu jak u *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, potkana a myši (Kenyon et al. 1993; Chapman & Partridge 1996; Gems et al. 1998; Chandrashekar & Bartke 2003; Giannakou et al. 2004). Podobně ozáření a ovo^{D} mutace eliminují kladení samičkám *D. melanogaster* a zvýší jejich délku života (Sgró & Partridge 1999). Pokud se vyskytuje péče o potomstvo, může přivodit samičkám další náklady (Clutton-Brock 1991; Hunt et al. 2002).

Časté výskyty reprodukčních nákladů naznačují, že jejich mechanizmy by mohly být evolučně konzervované (Partridge et al. 2005).

1.4.1 Proximální mechanismy reprodukčních nákladů

Málo se ví o proximálních mechanismech, které tvoří základ trade-off mezi reprodukcí a délkou života (Leroi 2001; Barnes & Partridge 2003; Harshmann & Zera 2007). Tradičním pohledem je omezenost vnitřních energetických rezerv, která má za následek vytvoření trade-off. Nákladné procesy v organismu (reprodukce, somatická údržba a oprava, růst, imunitní funkce) soupeří o stejné zdroje, které jsou limitovány, a tudíž nemohu být maximalizovány do všech funkcí (Kirkwood 1977; Law 1979; van Noordwijk & de Jong 1986; Stearns 1992; Kirkwood & Rose 1991). Zdroje, které jsou odkloněny do reprodukce, nemohou být rovněž využity na somatické opravy, a reprodukce bude z tohoto důvodu zkracovat život (Partridge et al. 2005).

Avšak přibývá studií, které tuto teorii zpochybňují. U dospělců *Caenorhabditis elegans* mutace ve specifických *age-1* (kóduje PI3 – kinázovou podjednotku; Johnson et al. 1993) a *daf-2* (kóduje insulinový receptor; Kenyon et al. 1993; Gems et al. 1998) alelách prodlouží život beze změny v reprodukční schopnosti. U jiných zásahů – např. odstraněním ovarií *Pyrrhocoris apterus* (Hodková 2008) či gonád v *C. elegans* (Kenyon et al. 1993) se délka života nezvýšila, i když reprodukční náklady, v tomto případě plodnost, jsou odstraněny.

V poslední době se vyvinula alternativní myšlenka - příčiny nákladu jsou způsobené pleiotropním efektem molekulárních signálů (Leroi 2001). Především hormony jsou považovány za klíčové zprostředkovatele reprodukčních nákladů a „life-history" trade-off (Zera & Harshman 2001; Flatt & Kawecki 2004; Harshman & Zera 2007). K této alternativní teorii přispěly převážně studie na háďátku *Caenorhabditis elegans*, u kterého signály z gonád ovlivňují IIS (insulin-like signální) dráhu a tedy i stárnutí. Odstranění zárodečných buněk značně prodlouží jeho život, příčinou je aktivace transkripčního faktoru DAF-16 (ortolog dFOXO u *D. melanogaster*; zpomaluje stárnutí). Naproti tomu odoperování celých gonád délku života neovlivní. Signály z gonád ovlivňují tento aspekt i u myší (Cargill et al. 2003). U *Drosophila melanogaster* odstranění zárodečné linie mutací na začátku vývoje stárnutí nezpomalí (Barnes et al. 2006), avšak eliminace těchto buněk v pozdějším stádiu má opačný efekt a je spojená s modifikací insulinové dráhy (Flatt et al. 2008).

I když negativní pleiotropní efekt hormonů vs. omezené vnitřní zdroje jsou často navrhovány jako alternativní vysvětlení trade-off (Leroi 2001), studie na *Gryllus firmus* ukazuje, že změny v endokrinní kontrole reagující s metabolismem zprostředkují rozdílnou alokaci zdrojů. JH analog aplikovaný LW (flight-capable) samicím způsobil expresi biochemických (redukce syntézy triglyceridů) a reprodukčních (zvýšení syntézy fosfolipidů→zvýšení produkce vajíček) znaků, které jsou typické pro SW (flightless) samice (Zhao & Zera 2002; Zera 2005). Systémový regulátor metabolismu, např. insulinová signální dráha, by mohl řídit alokaci energie do somatických nebo reprodukčních funkcí. Signální body ze vstupu (příjem potravy) a výstupu (hladina reprodukce, somatické funkce) pravděpodobně upravují insulinovou dráhu, která následovně modifikuje dráhu alokace. Cena za reprodukci by mohla být dána souhrou hormonální regulace a metabolismu (Harshman & Zera 2007).

Jak již bylo zmíněno v kap. 1.4, existují reprodukční náklady, které urychlují stárnutí samic. Největší podíl je připisován páření. Teorií, proč je kopulací snižována délka života, může být několik:

1. Délka života samic by mohla být zkrácena produkty samčích akcesorických (přídatných) žláz.

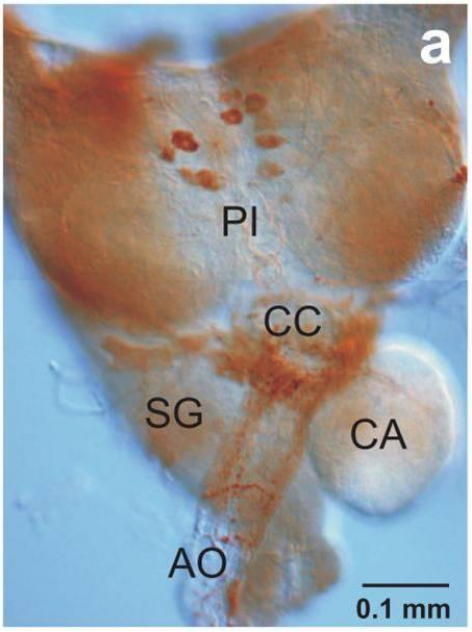
2. Páření by mohlo mít vliv na imunitní systém → pozměněné imunitní funkce na přežívání.

3. Páření by mohlo zvyšovat produkci vajíček, či mít vliv na jejich kvalitu (energeticky náročné) → zkrácení života.

Ústřední roli v popsaných faktorech by mohl hrát juvenilní hormon (JH), který je v mnoha studiích navrhován jako klíčový zprostředkovatel trade-off mezi reprodukcí a délkou života (Flatt & Kawecki 2007).

1.5 Endokrinní signály

U mnoha mnohobuněčných organismů je komunikace mezi orgány zajišťována prostřednictvím poslů – hormonů, které jsou produkovány endokrinními tkáněmi či specializovanými buňkami těla. Sekretované hormony jsou uvolňovány do oběhu a spouští intracelulární děje v cílových tkáních (Toivonen & Partridge 2009). Hormony ovlivňují prakticky všechny pochody v organismu (Kodrík 2000), modifikují i délku života a reprodukci (Tatar et al. 2003; Rusell & Kahn 2007). Hmyz má stejně jako savci samostatné endokrinní orgány a buňky (Toivonen & Partridge 2009): protorakální žlázy a kardiální tělíska (corpora cardiaca; CC), která jsou propojená párem nervů s tělísky přilehlými (corpora allata; CA). Insulinu podobné peptidy (DILPs) jsou produkovány ve specializovaných neuronech centrálního nervového systému – DILP produkující mediální neurosekretorické buňky (MNCs) (Cao & Brown 2001; Ikeya et al. 2002), které se nacházejí v pars intercerebralis.



Obr.1 Neuroendokrinní komplex *Pyrrhocoris apterus* (převzato z Hodková 2008)
PI = pars intercerebralis (zdroj insulinových peptidů); CC = corpora cardiaca; CA = corpora allata; SG = subesofageální ganglium; AO = aorta

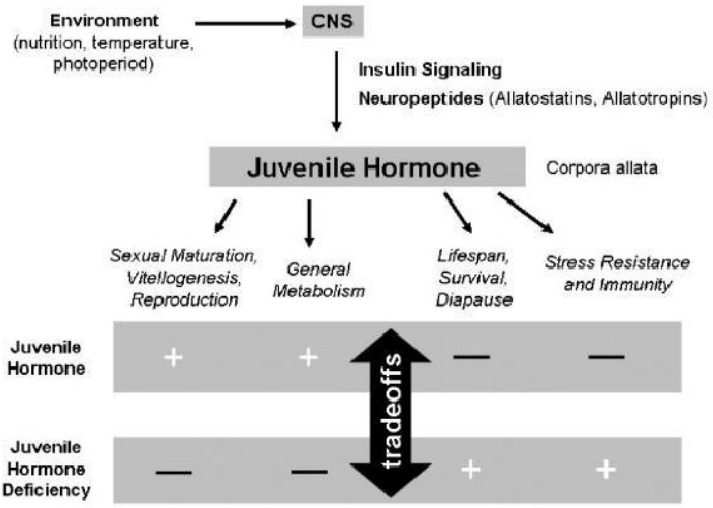
1.5.1 Juvenilní hormon (JH)

Juvenilní hormony, produkované corpora allata (CA) – endokrinní žlázou situovanou v blízkosti hltanu, jsou látky terpenoidní povahy (sesquiterpeny), které ovlivňují téměř všechny aspekty hmyzího života (Kodrík 2000). JH se v prvé řadě pravděpodobně vyvinul jako reprodukční hormon, ale je znám zejména svými účinky na larvální vývoj a metamorfózu (Gade et al. 1997; Hartfelder 2000). Koncentrace JH rozhodne, zda se vytvoří další larvální instar, kukla či dospělec. JH ovlivňuje všechny důležité aspekty hmyzí reprodukce (Bownes 1982). U samic reguluje zrání oocytů a reprodukční aktivitu (Wilson et al. 1983). JH se na vitellonegenzi (proces, kdy se do vajíčka dostávají energetické a výživné zásoby ve formě žloutku; Kodrík 2000) podílí tím, že ovlivňuje syntézu a sekreci vitellogeninů (Vg) v tukovém tělese a absorpci těchto proteinů vyvíjejícími se oocyty. Speciální faktor produkovaný terminálním oocytem u většiny druhů hmyzu navíc zajišťuje, že pouze terminální oocyt akumuluje Vg, zatímco mladší oocyty jsou inhibovány (Kodrík 2000). U samců JH podporuje syntézu proteinů přídatných žláz (AGs) (Gillot 2003; Wilson et al. 2003) a tvorbu feromonů. Že JH ovlivňuje tvorbu proteinů v AGs samců, bylo potvrzeno v práci Socha et al. (2004) na samcích *Pyrrhocoris apterus*. Allatektomovaní samci vykazovali sníženou hladinu celkových proteinů v AGs, která se obnovila po aplikaci analogu JH (methoprene).

Vliv JH na délku života

Mnohé studie považují JH za hormon podporující stárnutí (Flatt et al. 2005; Tatar et al. 2001), který zkracuje délku života stimulací reprodukce (Flatt et al. 2005; Tu et al. 2006). Pokud se odstraní zdroj juvenilního hormonu – tedy corpora allata, uměle se navodí reprodukční diapauza a délka života se prodlouží o více než 100 % u kobylek (Pener 1972), motýlů (Herman & Tatar 2001; Tatar & Yin 2001) či *Pyrrhocoris apterus* (Hodková 2008). Analog JH aplikovaný allatektomovaným dospělcům obnoví reprodukci a zkrátí život (Herman & Tatar 2001). Pokud je larva *Drosophily* během svého vývoje vystavena JH analogu (JHa), dospělá samička zvyšuje produkci vajíček, ale stárnutí se značně urychlí (Flatt & Kawecki 2007). Dalším důkazem jsou zásahy do IIS dráhy (insulin signální dráhy), které u *D. melanogaster* mohou zastavit produkci uvedeného hormonu. K poklesu JH dojde při mutaci v insulinovém receptoru dINR. Samičky s mutací v dINR jsou dlouhověké a sterilní, produkce vajíček lze obnovit dávkami methoprenu (analog JH), který kromě fertility zkrátí jejich přežívání na úroveň kontrol (Tatar et al. 2001b). V práci Tatar et al. (2001b) se domnívají, že

výsledkem defektní insulinové dráhy je snížení JH syntézy a následně JH titru, který potlačuje produkci vajíček a zvyšuje délku života.



Obr. 2 Vliv JH na délku života (převzato z Flatt et al. 2005)

Avšak existují studie, které hypotézu, že JH snižuje délku života prostřednictvím reprodukce, zpochybňují. Jinak řečeno JH by mohl kontrolovat jak fertilitu, tak délku života a tyto dva faktory můžou být na sobě nezávislé (Tatar et al. 2001b). S touto hypotézou se shodují výsledky pokusu, který byl proveden na samičkách *P. apterus*. I když byly samičky sterilní následkem vyjmutí ovarií, délka života nebyla prodloužena (Hodková 2008), dokud se neodstranil zdroj JH (CA). Pokud se samičkám *P. apterus* vyjmuly pars intercerebralis (PI; produkují insulinu podobné peptidy), délka života se prodloužila o 32%, avšak vyjmutím CA o 60%. Odstraněním PI+CA se zvýšilo přežívání samic o 96%. I když se v mnoha studiích uvádí „nadřazenost" IIS dráhy, zde jsou pravděpodobně PI (IIS dráha) a CA v aditivním vztahu. Mimoto v případě vyjmutí PI+CA nelze vliv PI na prodloužení délky života připsat snížené plodnosti, která je již redukována následkem allatektomie (Hodková 2008).

U jiných studií nebyla absence JH dostačující k oddálení stárnutí. Sterilní homozygotní dINR mutanti (*D. melanogaster*) sice měli sníženou syntézu JH, ale délka života zůstala nezměněna (Tatar et al. 2001b).

Vliv páření na produkci JH

U mnoha druhů hmyzu kopulace zvyšuje produkci vajíček a snižuje ochotu samičky k opětovnému páření (Wolfner 1997, 2002; Chapman 2001; Gillott 2003; Kubli 2003). Tyto změny by mohly být způsobeny vyšší hladinou JH (Rankin et al. 1997; Strambi et al. 1997). Hemolymfa pářících se samiček obaleče *Choristoneura fumiferana* a *C. rosaceana* obsahovala vyšší titr JH oproti samičkám bez partnera (Cusson et al. 1999). Zvýšení JH bylo zaznamenáno i u pářících se samiček *Heliothis virescens* (Zeng et al. 1997; Ramaswamy et al. 2000), *Lacanobia oleracea* (Edwards et al. 1995), *Danaus plexippus* (Lessman et al. 1989) či *Cydia pomonella* (Webb et al. 1999).

Vyšší hladina JH stimulovaná kopulací by mohla být zodpovědná za kratší délku života, ale tato teorie zatím nebyla testována (např. pářením samic bez CA se samci).

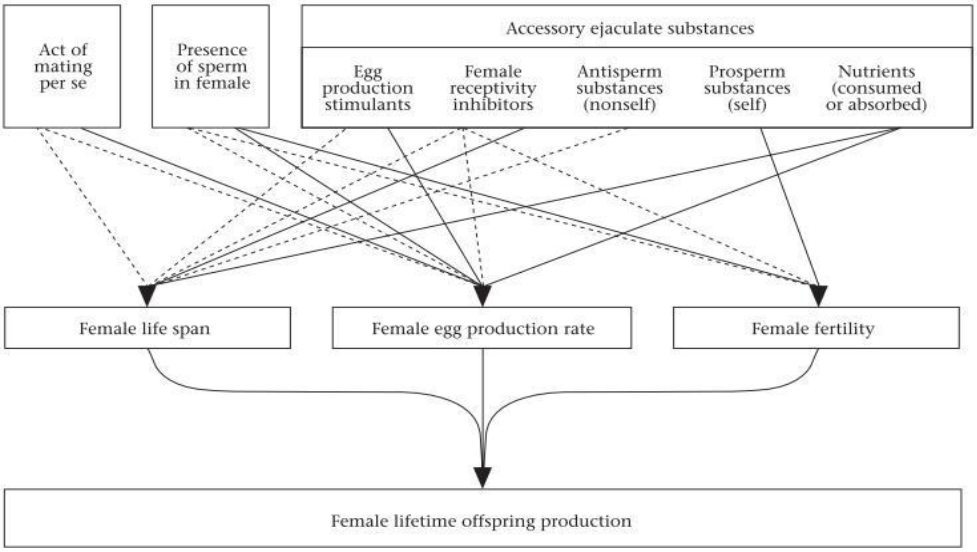
Změny v titru JH u kopulujících samic mohou vznikat z několika příčin: 1.) JH se může během páření transportovat do těla samiček, jak bylo zjištěno pro některé druhy můr (Park et al. 1998). Avšak u jiných druhů např. *Choristoneura fumiferana* či *C. rosaceana* nebyl přenos JH zaznamenán (Cusson et al. 1999). 2.) Dochází k inhibici degradace JH u kopulujících samic. Páření redukuje JH-esterázovou aktivitu (JHE) o více než 95% u můry *Trichoplusia ni* (Venkatesh et al. 1988). Snížená JHE aktivita byla také zjištěna v práci Ramaswamy et al. (2000) na *Heliothis virescens*. Hladina JH esterázy mezi pářícími a izolovanými samičkami se nelišila u zavíječe *Cydia pomonella* ve studii Cole et al. (2002), kteří se domnívají, že role JHE v reprodukci není podstatná. S tímto závěrem se shodují studie provedené na dalších zavíječích (Cusson et al. 1999). 3.) Za zvýšený titr JH jsou odpovědné proteiny ze samčích přídatných žláz (Moshitzky et al. 1996; Wolfner et al. 1997; Fan et al. 1999; Kubli 2003).

1.6. Vliv proteinů z přídatných žláz samců (Acps) na délku života samic

U různých hmyzích taxonů samčí proteiny předávané samicím během kopulace negativně ovlivňují jejich fitness a vytvářejí reprodukční náklady (Wolfner 1997, 2002; Chapman 2001; Gillott 2003; Kubli 2003; Wigby & Chapman 2005). Mechanizmy, které tyto náklady způsobují, jsou nejlépe prostudovány u *Drosophila melanogaster.* Některé z těchto proteinů by mohly ovlivňovat délku života samičky nezávisle na jejím metabolismu.

Během kopulace se přibližně 80 Acps dostává do těla samičky, ve kterém uplatňují řadu fyziologických a behaviorálních změn (Wolfner 1997). Zvyšují produkci vajíček, urychlují

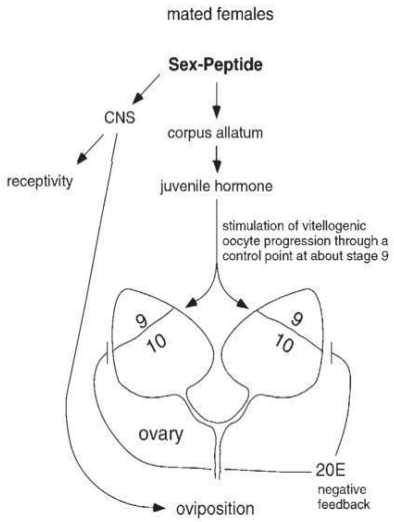
ovulaci, snižují ochotu samičky k páření, podílí se na uskladnění spermií, jsou nezbytné pro úspěch v kompetici spermií a zkracují délku života pářících se samic (Wolfner 2002; Gillot 2003; Ravi Ram & Ramesh 2003; Chapman & Davies 2004). Zjištění, že se tyto proteiny podílejí na reprodukčních nákladech, pocházejí např. ze studií Chapman et al. (1995) či Wigby & Chapman (2005). Spermie pravděpodobně nemají na životnost samiček vliv (Chapman et al. 1993), alespoň u *D. melanogaster*.



Obr. 3 Shrnutí účinků páření na samičí fitness u hmyzu (převzato z Arnqvist & Nilsson 2000)
Samotné páření, přítomnost spermií a přenos proteinů z AGs mají řadu (často antagonistických) účinků na různé složky samičí fitness. Přerušované čáry zobrazují negativní vlivy, plné vlivy pozitivní.

Pářící náklady způsobují především proteiny vstupující ze samičího reprodukčního traktu do hemolymfy. Jedním z nich je protein Acp62F-proteázový inhibitor s toxickým efektem (inhibuje základní proteolytické události v hemolymfě), který pravděpodobně zvyšuje mortalitu samic nezávisle na metabolismu (Harsman & Zera 2007).

Největší podíl na pářících nákladech je v mnoha studiích připisován sex peptidu (SP; Acp70A). Tento protein stimuluje produkci vajíček a snižuje ochotu samičky ke znovuspáření (Ottiger et al. 2000; Kubli 2003; Soller et al. 2006). Injikovaný syntetický SP vyvolal u samiček zmíněné post-pářící faktory (Aigaki et al. 1991; Soller et al. 1999), a jak bylo prokázáno v práci Wigby & Chapman (2005), postačuje ke zkrácení délky života samic.



Zatím se ví málo o mechanismech, kterými SP řídí různé post-páření odpovědi (Barnes et al. 2008). V pracích Moshitzky et al. (1996) a Fan et al. (1999) se domnívají, že cílovým orgánem SP by mohly být corpora allata. Sex peptid stimuloval syntézu JH v CA *in vitro* u samiček *D. melanogaster* a *Helicoverpa armiger*. Protože analog JHa aplikovaný panenským samičkám nevyvolal snížení receptivity ani zvýšení kladení, SP musí mít další cílové tkáně, kterými tyto faktory ovlivňuje – pravděpodobně nervový systém (Soller et al. 1999).

Obr. 4 Změny vyvolané SP u kopulující samičky.
(převzato ze Soller et al. 1999)

I když pářením stimulované kladení by mohlo být příčinou kratší délky života (Rose 1991), mnohé studie názor vyvracejí (Ueyama & Fuyama 2003; Wigby & Chapman 2005; Partridge et al. 1986). V práci Chapman et al. (1998) provedené na středozemní mušce *Ceratitis capitata* nebyl vliv kopulace na produkci vajíček vůbec zaznamenán a celková produkce vajíček byla vyšší u izolovaných samiček. Podobný výsledek byl zjištěn i u ruměnice pospolné *Pyrrhocoris apterus* (Blažková 2008). Vliv páření na plodnost byl nepatrný, proto nelze delší život panenských samiček připsat vyšší intenzitě kladení párících se samic. Je možné, že se vajíčka párících a izolovaných samic kvalitativně odlišují (Partridge et al. 1986). Avšak i tuto možnost lze pravděpodobně vyloučit, protože se zdá, že produkce vajíček není nákladná. Jak již bylo zmiňováno, vyjmutí ovarií panenským samičkám *P. apterus* život neprodlouží (Hodková 2008) podobně jako vyjmutí gonád *C. elegans*.

Další z možností, proč kopulace zkracuje délku života samic, je ovlivněním imunitního systému, a vyšší titr JH stimulovaný pářením by mohl být zodpovědný za změněné imunitní funkce.

1.7 Imunita bezobratlých

Imunitní systém hmyzu je značně vyvinutý a obsahuje humorální a buněčnou složku (Gillespie et al. 1997). Buněčná imunitní odpověď se vztahuje k procesům, které jsou zprostředkované hemocyty, buněčnými složkami hemolymfy, jako např. fagocytóza, nodulace a enkapsulace. (Schmidt et al. 2001). Nodulace se uplatňuje při masivnější invazi spór nebo bakterií. Tvorba nodulů je zahájena mikroagregací hemocytů, které zachytí velké množství mikroorganismů (Franssens et al. 2006). Enkapsulace se rozvíji při invazi velkých objektů např. parazitoidů nebo larev nematodů (Kodrík 2000), které nejsou tvorbou nodulů zachyceny. V konečných fázích nodulace a enkapsulace se také uplatňuje humorální složka – fenoloxidáza (PO), která způsobuje melanizaci.

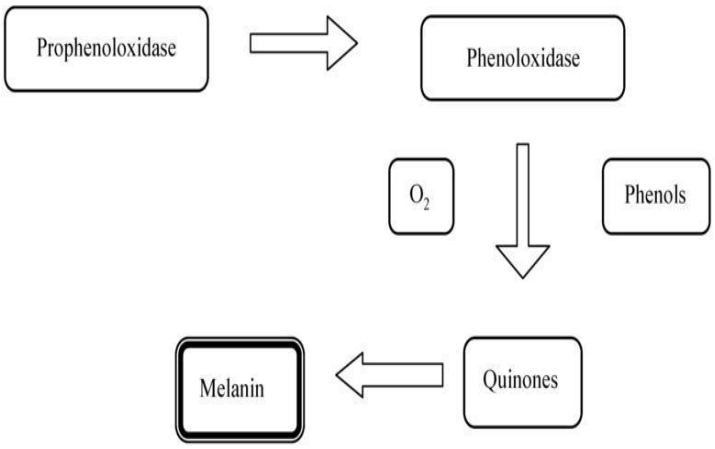
Humorální (látková) odpověď zahrnuje syntézu širokého spektra antimikrobiálních peptidů, jakož i fenoloxidázovou kaskádu (Cerenius & Söderhäll 2004).

1.7.1 Fenoloxidázová kaskáda

První studie hmyzí fenoloxidázy se soustředily na její předpokládanou roli v pigmentaci a sklerotizaci kutikuly. Později pozorování melaninu podobných kapsulí, které se formovaly během mnoha imunitních odpovědí, přivedlo Taylora (1969) k myšlence, že PO pravděpodobně funguje v imunitě bezobratlých. Názor, že je PO zahrnutá v utváření melaninové kapsule, byl potvrzen experimenty, ve kterých redukce její aktivity vedla ke snížení metanizace (Nappi 1974; Shiao et al. 2001).

Hlavní funkce fenoloxidázy (PO) je účast na tvorbě melaninu. PO se v hemolymfě hmyzu nachází ve formě zymogenu - profenoloxidázy (proPO). K její aktivaci, která je součástí vrozené imunitní odpovědi, dochází následkem zranění nebo infekce. ProPO je primárně syntetizována hemocyty a uvolňována do hemolymfy lýzou buňky. Aktivace probíhá proteolytickým štěpením na specifickém místě přes serinové proteásy, které byly samy aktivovány proteásovou kaskádou stimulovanou rozpoznáním mikrobiální infekce.

PO ve své molekule obsahuje dva atomy mědi vytvářející vazebné místo pro molekulární kyslík a katalyzuje dva typy reakcí, které molekulární kyslík vyžadují (Kanost & Gorman 2008). Katalyzuje přeměnu tyrosinu na dihydroxyfenylalanin (DOPA) a následně oxiduje DOPA na dopachinon, který prodělá další reakce vedoucí k tvorbě melaninu (již bez účasti PO).



Obr. 5 Fenoloxidázová kaskáda. (převzato z Cerenius & Söderhäll 2004)

Při nodulaci a enkapsulaci je patogen obalen vrstvami hemocytů a následnou vrstvou melaninu. Výsledkem melanizace je zhoršení propustnosti kapsule, což má za následek odříznutí patogena od živin a jeho následné udušení (Chen & Chen 1995). Během tvorby melaninu vznikají cytotoxické meziprodukty – reaktivní chinony, volné kyslíkové radikály a peroxidy (Nappi & Christensen 2005), které nejsou jen toxické pro invadující mikroorganismy, ale mohou poškozovat i samotného hostitele (Söderhäll & Cerenius 1998).

1.7.2 Vztah mezi pářením a imunitní funkcí

Páření a imunita úzce souvisejí s fitness jedince. Nedávné studie na obratlovcích a bezobratlých zkoumající trade-off mezi reprodukcí a imunitou a vztahy mezi post-pářícími procesy a imunitními funkcemi odhalily, že páření a imunita jsou vzájemně propojeny i mezi sebou (Lawniczak et al. 2007). Několik studií potvrdilo, že vyšší frekvence páření je spojená buď se zvýšenou náchylností k parasitům a k nemocím, nebo se sníženou funkcí imunitního systému (Zera & Harshman 2001). Kompetice mezi reprodukcí a imunitou o omezené vnitřní energetické zdroje či negativní pleiotropní dopad reprodukčních hormonů na imunitní funkce jsou navrhovány jako proximální příčiny pářících nákladů (Harshman & Zera 2007).

Nicméně v současné době chybí obecný vzor účinků páření na imunitu hmyzu (Lawniczak et al. 2007), jelikož u jiných druhů páření imunitní systém zvyšovalo. Možným důvodem by mohla být škála různých technik použitých k měření aspektů imunity: některé měří imunitní funkce jen přibližně, další zahrnují přímé měření patogenní resistence (Wigby et al. 2008). Pravděpodobně záleží i na druhu a pohlaví, protože imunitní funkce jsou často mezi samci a samičkami rozdílné (Kurtz & Sauer 1999). U samiček cvrčka *Gryllus texensis* páření patogenní resistenci zvýšilo (Shoemaker et al. 2006) a u samiček *D. melanogaster* jsou některé imunitní geny (konkrétně antimikrobiální peptidy; AMPs) upregulovány několik

hodin po páření (Lawniczak & Begun 2004; Domanitskaya et al. 2007). Za upregulaci AMPs jsou zodpovědné proteiny přídatných žláz samců, konkrétně sex peptid, který upreguluje několik AMPs (Domanitskaya et al. 2007).

McKean a Nunney (2005) zjistili, že samičky *D.melanogaster*, ať už se pářily se samci nebo byly od nich chovány odděleně, nevykazovaly žádný rozdíl ve schopnosti odstranit injikované nepatogenní bakterie, a tak funkce krátkodobé AMP exprese je u tohoto druhu nejasná (Lawniczak et al. 2007).

1.7.3 Vliv JH na imunitní systém

Jak již bylo zmiňováno, páření může mít negativní dopad na imunitu hmyzu, a tak potenciálně snižuje rezistenci proti patogenům. Pokles v imunitních funkcích pocházející z reprodukční aktivity byl zaznamenán u samic motýlice *Matrona basilaris japonica* (Siva-Jothy et al. 1998), samic mšice *Acyrthosiphon pisum* (Gwynn et al. 2005), u samic mravence *Atta colombica* (Baer et al. 2006), u samců *Drosophila melanogaster* (McKean & Nunney 2001) a u obou pohlaví cvrčka *Allonemobius socius* (Fedorka et al. 2004).

Se stoupajícími důkazy je JH navrhován jako hlavní „potlačovatel“ imunitních funkcí (Flatt et al. 2005, Tu et al. 2006). Studie na moučném červu *Tenebrio molitor* zjistily, že páření snižuje hlavní humorální efektorový systém (fenoloxidázu) u obou pohlaví, teoreticky tedy zvyšuje náchylnost jedinců k infekcím, a že toto snížení je zprostředkováno právě JH. Aplikací JH inhibitoru (fluvastatinu) dojde k nárůstu imunitní funkce (Rolff & Siva-Jothy 2002). U tohoto druhu příčinou JH vzniká i trade-off mezi hladinou PO a produkcí feromonů (aplikace JH-vyšší hladina feromonů-nižší PO + enkapsulace) (Rantala et al. 2003).

1.7.4 Vztah mezi imunitou a délkou života

Zatím existuje jen málo studií, které by potlačení či zvýšení imunity následkem páření spojily přímo s poklesem přežívání (Fedorka et al. 2004). Pářením potlačená imunita snižovala život samcům *D. melanogaster* (McKean et al. 2001) a oběma pohlavím cvrčka *Allonemobius socius* (Fedorka et al. 2004). Kopulací zvýšená imunita měla negativní vliv na přežívání samic *D. melanogaster* (Kubli 2003; Wigby & Chapman 2005). Uměle navozená aktivace imunitního systému zkracovala život samcům cvrčka *Gryllus campestris* (Jacot et al. 2004), čmeláka *Bombus terrestris* (Moret & Schmid-Hempel 2000) a včelám *Apis mellifera* (Amdam et al. 2005).

Ruměnice pospolná (*Pyrrhocoris apterus*) patří mezi vhodný modelový organismus ke studiu trade-off mezi reprodukcí a délkou života. Oproti *D. melanogaster* lze na *P. apterus* provádět mikrochirurgické zásahy do endokrinního systému bez ovlivnění genotypu a larválního vývoje (Hodková 2008).

2. CÍLE PRÁCE

Zkoumat faktory, které zprostředkují vliv páření na délku života samic *Pyrrhocoris apterus*.

Vliv proteinů z přídatných žláz samců

- Zda délku života samic ovlivňují proteiny z přídatných žláz samců (allatektomií samců se sníží obsah proteinů v přídatných žlázách).
- Porovnat, zda jsou rozdíly v produkci vajíček mezi samičkami v páru s intaktním/allatektomovaným samcem (náklady na produkci vajíček).

Vliv páření na kvalitu vajíček

- Zjistit, zda je produkce vajíček pro samičky energeticky náročná z pohledu kvality.

Vliv juvenilního hormonu

- Zda páření zkracuje život samic stimulací CA, které produkují JH.

Vliv různých faktorů na imunitní systém samic (fenoloxidázu)

- Zda páření ovlivňuje aktivitu fenoloxidázy (PO) – humorální složky imunitního systému bezobratlých.
- Zda aktivitu PO nediapauzních a diapauzních samic ovlivňují CA (tedy JH).
- Zda na aktivitu PO nediapauzních a diapauzních samic mají vliv neurosekreční buňky pars intercerebralis.

3. MATERIÁL A METODY

3.1 Pokusná zvířata

V experimentech se jako modelový organismus používali samci a samice *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera). Ploštice byly udržovány v termostatech se stálou teplotou 26 ± 1°C a v režimu dlouhého dne (LD = long day) 18 h světla : 6 h tmy (LD podmínky zabrání diapauze a jedinci zůstávají reprodukčně aktivní) a krátkého dne (SD = short day) 12 h světla : 12 h tmy (pro-diapauzní fotoperioda). Ve všech vývojových stádiích (od vajíček do 5. instaru; larvální vývoj trvá cca 34-35 dní) byly ploštice chovány hromadně v 0,5 litrových sklenicích překrytých silonovou síťkou. Krmeny byly lipovými semeny a vodou. Po proděláni posledního instaru se čerstvě vylíhlá imaga podle pohlaví izolovala. Ploštice byly následně chovány v Petriho miskách individuálně a v párech za stálého dostatku vody a lipových semínek, které jim byly pravidelně měněny. Zkoumaní jedinci byli udržováni pod stejnou teplotou a fotoperiodou jako při vývoji.

3.2 Vliv proteinů z přídatných žláz (AGs) samců na délku života samic

Samci bez corpora allata (CA) mají sníženou produkci proteinů v přídatných žlázách (Socha et al. 2004). Allatektomie se provádí na čerstvě vylíhlých imagách, která jsou 12 hodin po ekdysi připravena o potravu a za dva dny operována v Ringerově roztoku. CA se odstraní nastřiženou krční membránou. Potrava je přidělena ihned po operaci. Allatektomie byla provedena doc. RNDr. M. Hodkovou., CSc.

3.2.1 Vliv allatektomie na frekvenci páření

Jelikož jsem sledovala páry, kde samci měli vyjmuté CA (v jiných pokusech i samice), bylo nutné zjistit, zda allatektomie (-CA) nesnižuje frekvenci páření (jak často se páří). Celkově byly provedeny dva pokusy se třemi skupinami párů (intaktní a allatektomované páry: F+M, F+M-CA, F-CA+M). V prvním experimentu se v průběhu 32 h každých 15 minut zaznamenal do protokolů počet pářících se párů, v druhém každých 30 minut v průběhu 27 h. Skupiny byly staré cca 14 dní.

3.2.2 Vliv samců bez CA na délku života samic

V celkově dvou pokusech se operovaní samci nechávali pářit se samicemi (F+M-CA), u kterých se obden do protokolů zaznamenával počet vykladených vajíček a mortalita. Pro srovnání jsem měla vždy dvě kontroly: pářící se samice s normálními samci (F+M) a samice izolované, bez partnera (F).

Různými metodami jsem následně potvrzovala, že allatektomovaní samci tvoří proteinů méně (SDS-PAGE, Western blot, BCA metoda).

3.2.3 SDS-PAGE elektroforéza

Polyakrylamidová gelová elektroforéza byla použita pro separaci proteinů z přídatných žláz samců podle jejich molekulové hmotnosti. Přídatné žlázy pocházely z diapauzních (SD), nediapauzních (LD) a allatektomovaných (-CA) samců.

Příprava vzorků

- vzorkový pufr s redukujícím účinkem (25 ml; 12,5 ml pufru„B“ [0,125 M/l Tris-HCl pH 6,8; 0,1% SDS]; 2,5 ml glycerolu 10%; 5 ml 10% SDS; 0,75 mg bromfenolové modři; 3,75 ml ddH_2O; 1,25 ml ß-merkaptoetanolu)
- fyziologický Ringerův roztok (7,5 g NaCl; 0,1 g KCl; 0,2 g $NaHCO_3$; 0,2 g $CaCl_2$ do 1l ddH_2O)

Samčí přídatné žlázy byly vypitvány v Ringerově roztoku, poté promyty v redukujícím vzorkovém pufru (= Vz.Red.Pufr naředěný 1:1 ddH_20) a následně přemístěny do eppendorfky se 100 µl Vz.Red.Pufru na led. Pro každou skupinu samců (LD, SD, -CA) jsem měla 2 eppendorfky s koncentrací žláz 4 a 6 (4 žlázy = 2 ‖ , 6 žláz = 3 ‖). Samci byli staří 12 dní (chováni izolovaně od samiček). Po přendání do mikrozkumavky byly žlázy rozdrceny ultrazvukovým sonikátorem (1-2 x 12 sec), poté povařeny (100°C/10 min) a stočeny (20°C, 10 000 g, 10 min). Supernatant byl přenesen do nové mikrozkumavky.

SDS-PAGE Elektroforéza

- 10% gel
- proteinový standard (Kaleidoscope Prestained Standards; BIO-RAD)
- elektrodový pufr (0,025 M Tris pH 8,3; 0,192 M glycin; 0,1% SDS)
- barvící roztok (0,25% Coomassie brilliant blue R-250; 46% ethanol; 9,2% kyselina octová)
- odbarvovací roztok (ethanol – kyselina octová – ddH2O v poměru 25:10:65)

Vzorky (+ marker) se nanášely na gel (10 µl vzorku/jamku, což odpovídalo koncentraci žláz 0,4/0,6), elektroforéza probíhala při konstantním napětí 100 V přibližně 2 hodiny. Po ukončení elektroforézy byl gel ponořen do barvící lázně (Coomassie briliant blue R-250), nechal se několik hodinu na třepačce, a poté se přendal do odbarvovacího roztoku, ve kterém byl ponechán přes noc. Na gelu pak zůstala jen barva navázaná na fixovaný protein.

3.2.4 Detekce proteinů (z přídatných žláz) pomocí metody Western blot

Jedná se o metodu s vysokou citlivostí, která slouží k identifikaci specifického proteinu ve směsi proteinů. Používala jsem monoklonální protilátku PL – 15.2, původně vytvořenou proti 80 - 90 kDa proteinu z AGs samců *Tenebrio molitor* (Grimnes et al. 1986), která pozitivně reaguje s antigenem i u samců *Pyrrhocoris apterus* (Socha et al. 2001). Zjišťovala jsem, jaká bude odezva na protilátku (jak výrazný bude band) u diapauzních (SD), nediapauzních (LD) a allatektomovaných (-CA; LD) samců 12 dní starých.

Příprava vzorků

Příprava vzorků byla stejná jako u SDS-PAGE elektroforézy (viz kap. 3.2.3). Pokud se se vzorky ihned nepracovalo, skladovaly se v mrazáku (-80°C).

Tab. 1 Množství vzorků použitých na Western blot

Vypitváno	Počet žláz/100 µl Vz.Red.Pufru	c žláz/jamku (10 µl)
2 ǁ	4 žlázy	c = 0,4
3 ǁ	6 žláz	c = 0,6

SDS-PAGE elektroforéza + blotování

- gradientový gel 4-20% (Tris-HCl gel; BIO-RAD)
- proteinový standard (Kaleidoscope Prestained Standards; BIO-RAD)
- elektrodový pufr (0,025 M Tris pH 8,3; 0,192 M glycin; 0,1% SDS)
- nitrocelulózová membrána (0,2 µm, BIO-RAD)
- Whatman 3 MM blotovací papír
- katodový pufr (25 mM Tris Cl pH 9,4; 40 mM glycin; 20% methanol)
- anodový pufr I (0,3 M Tris.Cl pH 10,4; 20% methanol)
- anodový pufr II (25 mM Tris.Cl pH 10,4; 20% methanol)

Vzorky rozdělené SDS-PAGE elektroforézou byly z gelu elektroforeticky přeneseny na nitrocelulózovou membránu, která je na sebe navázala. Blotování trvalo při konstantním nastavení proudu (mA = 2,5xcm^2 gelu) 30 min.

Další postup

- sušené odtučněné mléko
- primární protilátka – monoklonální myší PL (15.2) proti 80 - 90 kDa proteinu z Ags; 1:100 → 1:50 000 (*University of Vermont*)
- sekundární protilátka s navázanou křenovou peroxidázou (G-anti-M IgG HRP 1:20 000) (Pierce)
- PBS-Tween (0,3% Tween 20 v PBS)
- peroxidový a luminolový roztok (Pierce)

Membrána byla následně ponořena do 5% roztoku sušeného odtučněného mléka (2,5 g/50 ml PBS-Tween) a ponechána 1 hodinu na třepačce při pokojové teplotě (odtučněné mléko blokuje nespecifická vazebná místa). Poté byla membrána inkubována s primární protilátkou (1:50 000 v PBS-Tween) (na třepačce a v chladu-cca 4 °C). Následující den byla membrána promývána v PBS-Tween (6x, 10 min) a inkubována se sekundární protilátkou (1:20 000 v PBS-Tween), která se specificky váže na primární PL. Po inkubaci, která trvala 1 hodinu, byla membrána znovu promývána v PBS-Tween (6x, 10 min). Barevné reakce, při které došlo k vizualizaci specifického proteinu, bylo dosaženo luminiscenčním roztokem (peroxidový a luminolový roztok v poměru 1:1; 0, 125 ml/cm^2 membrány), ve kterém byla membrána ponechána 5 minut (enzym navázaný na sek. PL reaguje se substrátem a v místě, kde se nachází protein, se objeví barevný band). Reakce probíhala za pokojové teploty. Detekční zařízení (CCD kamera a počítač - použit program Las 3000) následně vyhodnotilo množství emitovaného záření.

3.2.5 Stanovení koncentrace proteinů z AGs pomocí BCA (=bicinchoninové) metody

BCA metoda byla použita pro kvantifikaci proteinů z přídatných žláz LD samců (M; LD), samců bez CA (M-CA; LD) a samců SD (M; SD). Pro jejich stanovení byl použit BCA Protein Kit (Pierce).

Princip metody

Metoda je založená na interakci s peptidovou vazbou, s kterou v alkalickém prostředí reaguje Cu^{2+} za vzniku Cu^{+}. Redukovaný měďný iont je následně chelatován kyselinou bicinchoninovou (BCA) (navázání dvou molekul BCA na jeden měďný iont) za vzniku modrofialového zbarvení s absorpčním maximem při 562 nm. Intenzita zabarvení, která se měří spektrofotometricky, je přímo úměrná koncentraci proteinů ve vzorku.

Příprava vzorků + další postup

- fosfátový pufr (50 mM KPO_4)
- streptomycin (10%...0,01 g/100 µl KPO_4 pufru)

Přídatné žlázy, které pocházely ze 13 dní starých samců (samci chováni odděleně od samiček), byly vypitvány v Ringerově roztoku a poté přendány do mikrozkumavek s 50 µl fosfátového pufru (KPO_4). Pro každou skupinu jsem měla jednu eppendorfku s koncentrací 8 žláz/50 µl (8 žláz = 4 ǁ). Žlázy byly zhomogenizovány pístem a zvortexovány. Následně se do každé zkumavky přidal 10% streptomycin (k vysrážení nukleových kyselin). Vzorky byly znovu zvortexovány, inkubovány 15 minut při pokojové teplotě a stočeny (4°C, 3000 g, 10 minut).

Abych zjistila danou koncentraci proteinů ve vzorku, je nejprve nutné vytvoření kalibrační křivky (na základě řady známých koncentrací standardu a příslušných absorbancí). Použitým standardem byl hovězí sérový albumin (BSA) o koncentraci 2 mg /ml. Kalibrační roztoky BSA vznikaly jeho ředěním s fosfátovým pufrem (KPO_4).

Další postup je stejný jak pro standardy, tak pro vzorky

- BCA reagent A (1000 ml obsahuje: BCA; uhličitan sodný; hydrogenuhličitan sodný a vinan sodný v 0,1 M NaOH)
- BCA reagent B (25 ml obsahuje: 4% pentahydrát síranu měďnatého)

Do každé jamky mikrotitrační destičky se napipetovalo 200 µl reagentu BCA (Pierce), který byl připraven smísením reagentu A s reagentem B v poměru 50:1). Do těchto jamek bylo přidáno 10 µl vzorku (či standardu) a to vždy ve třech opakováních (poměr vzorků či standardu : BCA reagentu **1:20**). Mikrotitrační destička se poté ponechala 30 minut ve tmě při pokojové teplotě. Absorbance vzorků byla měřena při vlnové délce 560 nm pomocí

spektrofotometru pro mikrodestičky SpectraMax 384 (Molecular Devices). Koncentrace proteinů byla zjištěna výpočtem z rovnice kalibrační křivky.

3.3 Stanovení koncentrace proteinů ve vajíčkách pomocí BCA metody

BCA metodou jsem měla určit, zda je významný rozdíl v množství proteinů ve vajíčkách izolovaných a pářících se samic (sbírány snůšky). Při každém vykladení byla vajíčka přendávána do mikrozkumavek a skladována v mrazáku (-80°C). Z každé skupiny jsem měla 20 vzorků (1 vzorek = 1 snůška). Před metodou byly jednotlivé snůšky váženy.

Příprava vzorků

- fosfátový pufr (50 mM KPO_4)
- streptomycin (10%...0,01 g/100 µl KPO_4 pufru)

Do mikrozkumavek s vajíčky bylo napipetováno 200 µl fosfátového pufru (nejprve 100 µl – homogenizace pístem + 100 µl). Po zvortexování se do každé eppendorfky přidalo 20 µl 10% streptomycinu. Vzorky byly zvortexovány, inkubovány 15 minut při pokojové teplotě a stočeny (4°C, 3000 g, 10 minut).

Následující postup byl stejný jako v předchozím případě. Lišil se pouze poměrem standardu/vzorku: BCA reagentu = **1:8**. Do jamek mikrotirační destičky bylo dáváno 25 µl vzorku (či standardu) a 200 µl BCA reagentu. Absorbance vzorků byla měřena při 560 nm.

3.4 Stanovení fenoloxidázy (PO)

Stanovením PO aktivity jsem měla zjistit, zda jsou rozdíly v imunitních funkcích: pářících se (F+M; LD) a izolovaných samic LD (F; LD), samic bez CA (F-CA; LD), samic bez CA a pars intercerebralis (F - CA+PI; LD); izolovaných samic SD (F; SD), SD samic bez CA (F-CA; SD) a SD samic bez CA a pars intercerebralis (F-CA+PI; SD). Aktivita PO se měřila z 1 a 2 týdnů starých samic. 3 dny stará imaga se přendávala jednotlivě do Petriho misek (v párech byly pouze pářící se samice).

Princip metody

Aktivita fenoloxidázy byla měřena spektrofotometricky upravenou metodou podle Barnes & Siva-Jothy (2000); Rolff & Siva-Jothy (2002) či Rantala et al. (2003). Používaným substrátem byla L-DOPA, která je enzymaticky přeměňována aktivní fenoloxidázou

obsaženou ve vzorku hemolymfy na dopachinon, který prodělá další reakce za vzniku melaninu. Výsledkem této reakce je postupný vznik tmavě hnědého roztoku z původně bezbarvého (Dobeš 2009).

Aktivní PO katalyzuje produkci mnoha cytotoxických produktů (Söderhäll & Cerenius 1998). Aby nedošlo k poškození hostitele, PO se většinou v hemolymfě hmyzu (či v cirkulujících hemocytech) nachází jako neaktivní proenzym profenoloxidáza (proPO), která se rychle aktivuje vlivem infekce/zranění, ale i různými látkami, teplem či vlivem kyslíku (Gupta 2001). Tyto aktivátory (zvlášť působení kyslíku a tepla) mohou být problémem při stanovení PO aktivity, protože vzorek může zčernat dřív, než je změřen.

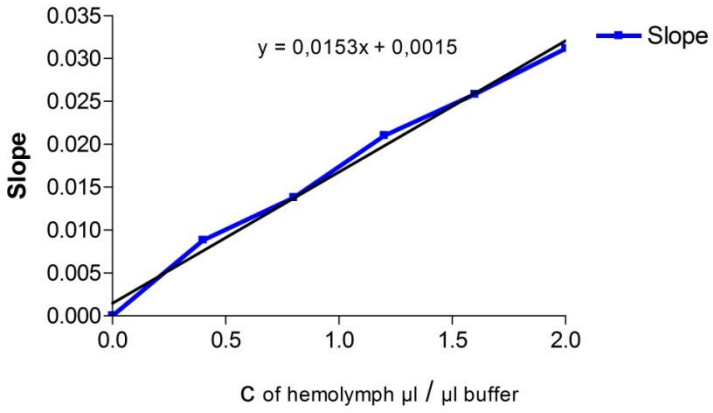
Příprava vzorků + další postup

- kakodylátový pufr (0,01 M Na-coc; 0,005 M $CaCl_2$)
- L-DOPA (2,5 mM; 0,05 g/100 ml pufru); jelikož se L-DOPA všeobecně špatně rozpouští, před smícháním s kakodylátovým pufrem byla rozpuštěna ve 2 ml 50 mM HCl (je lépe rozpustná v kyselém prostředí)
- 50 mM HCl

5 µl hemolymfy bylo odebíráno skleněnou mikrokapilárou (5 µl; BIO-RAD) z nastřiženého tykadla 1 a 2 týdnů starých samic. Hemolymfa se přendávala do eppendorfky na suchý led, aby se zabránilo spontánní aktivaci proPO. Vzorky byly následně zmraženy na –80°C, aby došlo k rozrušení hemocytových membrán (vyplavení dodatečné proPO). Poté se k hemolymfě přidalo 330 µl chlazeného kakodylátového pufru (upraveno pH na 6,8 50 mM HCl), který obsahoval 2,5 mM L-DOPA (pracovalo se na ledu). Vzorky byly zvortexovány a stočeny (4°C, 2800g, 7 min). 250 µl supernatantu bylo napipetováno do jamky mikrotitrační destičky a následně měřena absorbance při 490 nm v minutových intervalech po dobu 30 minut a při 30°C na spektrofotometru SpectraMax 384. Z naměřených hodnot byl vytvořen graf závislosti absorbance na čase. Aktivita enzymu byla zjištěna ze sklonu křivky v místě její lineární fáze.

Aby zjištěný sklon křivky odrážel relativní koncentraci ve vzorku, musela se udělat kalibrační křivka. Řada naředěné hemolymfy (o známé koncentraci) byla spektrofotometricky změřena a hodnoty byly vyneseny do grafu závislosti absorbance na čase. Zjistil se sklon křivek v místě, kde byly lineární, a vytvořil se graf, kde osa *y* zobrazovala sklony jednotlivých křivek (Slope), kterým odpovídaly známé koncentrace naředěné hemolymfy (osa *x*). Jelikož

závislost sklonů na koncentraci byla lineární, můžeme zjištěné hodnoty sklonů vzorků brát i jako relativní koncentraci PO.



Obr. 6 Graf závislosti sklonu křivky na koncentraci hemolymfy

3.5 Grafické a statistické zpracování dat

Grafy byly vytvořené v programu GraphPad Prism 4. Na statistické vyhodnocení přežívání (porovnání délek života jednotlivých skupin) byl použit Logrank test. Rozdíly mezi průměry byly porovnávány t-testem, jednocestnou ANOVOU a Tukey post testem. Intenzita kladení byla vyhodnocena dvoucestnou ANOVOU a Bonferroni post-testem. Ke kvantifikaci množství proteinů u elektroforézy a western blotu byl použit program Quantity One verze 4. 6. 7. (BIO-RAD), který změřil sílu bandu.

4. VÝSLEDKY

4.1 Proteiny z přídatných žláz (AGs) samců

Jako jeden z možných důvodů kratší délky života pářících se samic je uváděn negativní efekt proteinů z přídatných žláz samců. Protože jsem tuto hypotézu ověřovala na samičkách kopulujících s allatektomovanými samci, bylo nutné potvrdit, že samci bez CA mají opravdu potlačenou produkci těchto proteinů (JH stimuluje jejich syntézu). V následujících pokusech jsem zjišťovala, jaké jsou rozdíly v množství proteinů obsažených v přídatných žlázách intaktních a allatektomovaných samců chovaných v LD podmínkách a diapauzních samců v podmínkách SD, kteří mají corpora allata inhibované a JH netvoří. Pokusy zahrnovaly jednak kvantifikaci proteinů pomocí BCA metody a elektroforézy a imunologickou metodu western blot zaměřenou na specifický protein z přídatných žláz.

4.1.1 Kvantifikace proteinů z AGs pomocí BCA metody

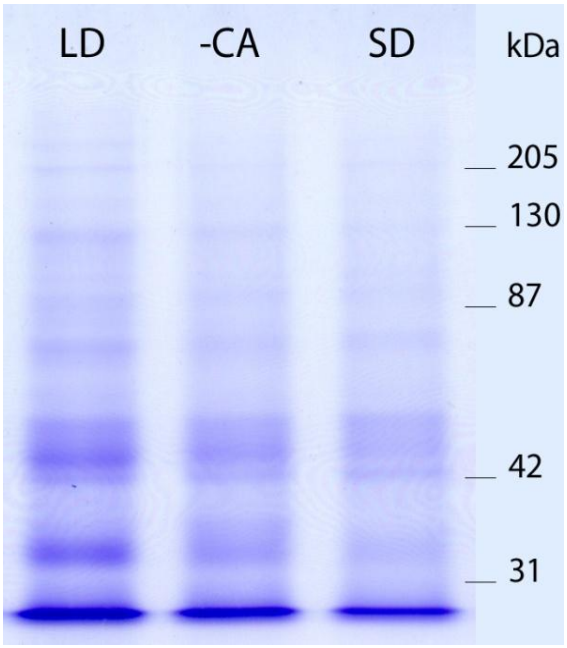
Tab. 2 Koncentrace (c) proteinů v µg obsažených v jedné žláze

	LD samci	**LD samci bez CA**	**SD samci**
c proteinů (µg/1 žlázu)	6,3388[1)]	3,1944	3,175

1) každý vzorek obsahoval 8 žláz (tj. ze 4 ♂♂)

Tabulka 2 udává množství proteinů (v µg) obsažených v jedné přídatné žláze samce (přídatná žláza je párový orgán, zde je 1 žlázou myšlena 1 část z páru). Z tabulky je patrné, že LD samci mají cca 2 x vyšší obsah proteinů v žláze než ostatní dvě skupiny, které se od sebe výrazně neliší (SD samci nepatrně méně). Juvenilní hormon má na kvantifikaci těchto proteinů značný vliv a bez jeho přítomnosti je obsah proteinů v žláze velmi snížen.

4.1.2 Elektroforéza proteinů z přídatných žláz samců



LD = nediapauzní samci
- CA = allatektomovaní LD samci
SD = diapauzní samci

Koncentrace žláz 0,6 (6 žláz = 3 ll /100 µl; 10 µl/jamku)

Obr. 7 Elektroforéza proteinů z přídatných žláz

Z elektroforeticky rozdělených proteinů je patrné, že samci s vyjmutými corpora allata mají na rozdíl od LD samců obsah proteinů značně snížen. Velmi malé množství vykazují i diapauzní samci (viz Tab. 3).

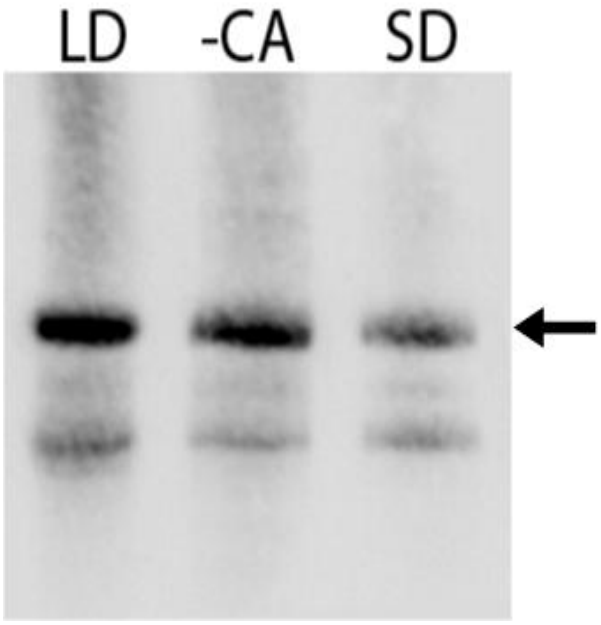
Tab. 3 Rozdíly v množství proteinů mezi skupinami[1)]

	LD ll	**-CA ll**	**SD ll**
Intenzita INT/mm^2	28060,82	23907,42	21240,81

1) Vyhodnocovala se intenzita (síla) bandů mezi skupinami (přes program Quantity One 4.6.7.).

4.1.3 Detekce proteinu z přídatných žláz samců pomocí metody Western blot

Specifický protein byl detekován pomocí monoklonální protilátky PL - 15.2 původně vytvořené proti 80 - 90 kDa antigenu z AGs samců *Tenebrio molitor*. Protilátka pozitivně reagovala i s proteinem obsaženým v přídatných žlázách samců *Pyrrhocoris apterus* 12 dní starých (Obr. 8).



LD = samci v podmínkách dlouhého dne
CA = samci s vyoperovanými corpora allata v LD podmínkách
SD = samci v podmínkách krátkého dne
Koncentrace žláz = 0,4 (na 100 µl: 4 žlázy = 2 samci, na jamku bylo dáváno 10 µl)

označený band odpovídá proteinu o velikosti 80 kDa

Obr. 8 Detekce proteinů z přídatných žláz samců

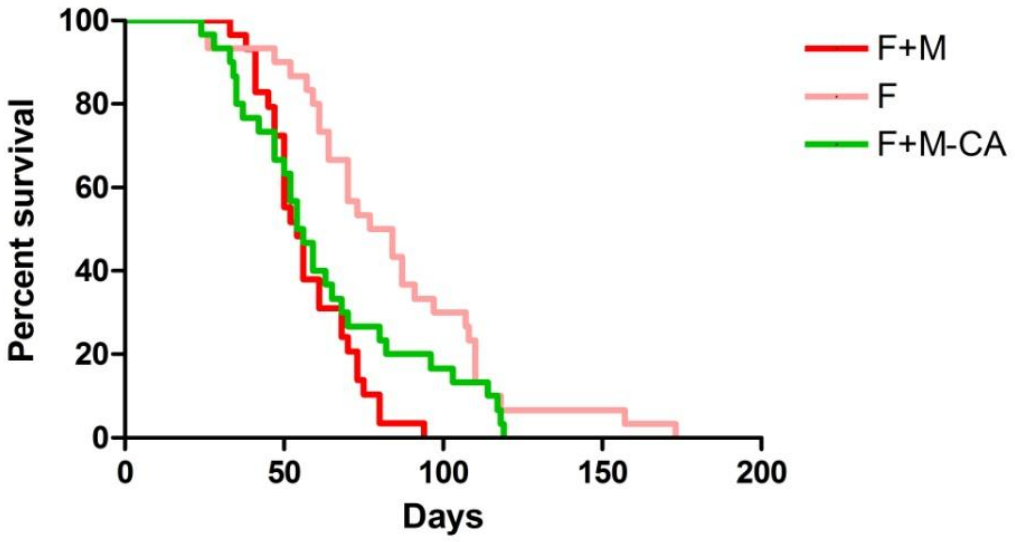
Protilátka reagovala u všech skupin samců (nediapauzních, allatektomovaných a diapauzních) s proteinem pocházejícím z AGs o molekulové hmotnosti 80 kDa. Nejvíce proteinu bylo zjištěno u LD samců (nejsilnější proužek), slabší band u allatektomovaných samců ukazuje na sníženou produkci tohoto proteinu v žlázách. U jedinců v diapauze (SD) je množství nejnižší (viz Tab. 4).

Tab. 4 Síla bandu mezi skupinami[1)]

	LD II	**-CA II**	**SD II**
Intenzita INT/mm^2	1575,56	1375,32	950,55

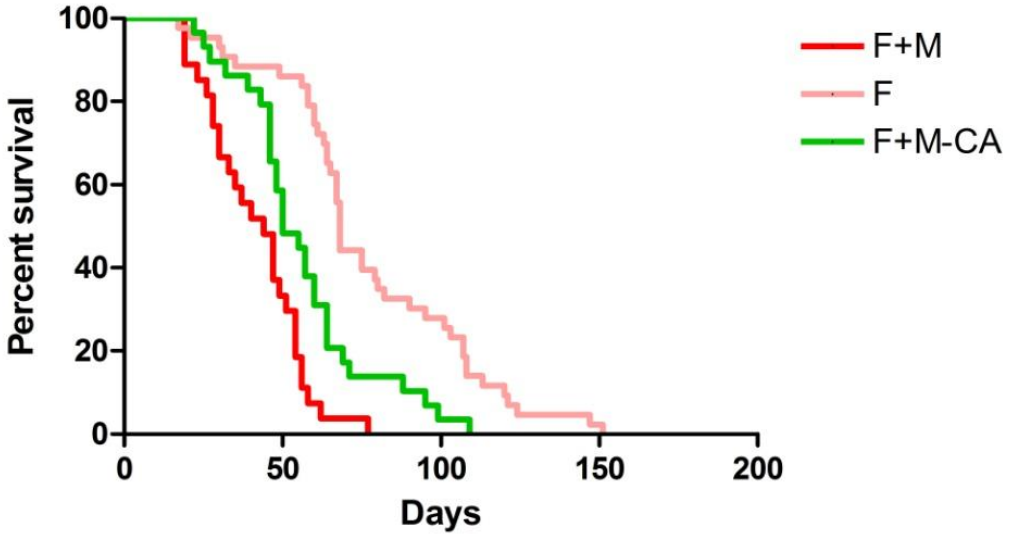
1) Síla bandu mezi jednotlivými skupinami samců byla vyhodnocena pomocí počítačového programu Quantity One 4.6.7.

4.1.4 Vliv allatektomovaných samců na délku života samic (vliv proteinů z AGs)



Obr. 9: Vliv allatektomovaných samců na délku života samic (Experiment 1)
F+M = samice v páru se samcem (N = 29), Medián = 54; **F** = samice panenské (N = 30), Medián = 80,5; **F+M-CA** = samice v páru s allatektomovaným samcem (N = 30), Medián = 55.
Logrank test: **F+M vs F**: P < 0,0001; **F+M vs F+M-CA**: P = 0,1837 (ns); **F vs F+M-CA**: P = 0,0332

Na rozdíl od panenských samiček (F) byl život kopulujících samic s intaktním samcem (F+M) (bez operativního zásahu do těla) zkrácen o 32,9%. Logrank test ukázal vysoce signifikantní rozdíl v jejich délkách života (P < 0,0001). Snížené přežívání o 31,7% vykazovaly i samice pářící se s allatektomovanými samci (F+M-CA), jejichž produkce proteinů v přídatných žlázách byla omezena. Mezi oběma skupinami pářících se samic nebyl signifikantní rozdíl v délkách života. I přesto, že byl život F+M-CA značně snížen (oproti panenským samičkám), zdá se, že allatektomie samců na přežívání samiček vliv má, ale tento vliv se začíná projevovat až později (Obr. 9).



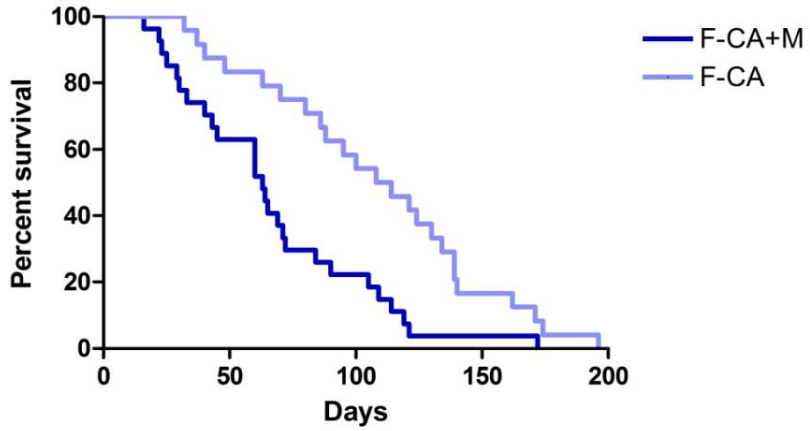
Obr. 10: Vliv allatektomovaných samců na délku života samic (Experiment 2)
F+M: (N = 27), Medián = 44; **F**: (N = 43), Medián = 68; **F+M-CA**: (N = 29), Medián = 50.
Logrank test: **F+M vs F**: $P < 0{,}0001$; **F+M vs F+M-CA**: P = 0,0038; **F vs F+M-CA**: P = 0,0003

V druhém provedeném experimentu (Obr. 10) se výrazněji projevuje efekt snížené produkce samčích AGs proteinů na přežívání samic. Oproti panenským samičkám se život F+M-CA zkracuje o 26,47%, kdežto délka života F+M je snížena mnohem radikálněji (o 35,3%).

I když je vliv proteinů patrný, pozitivní efekt allatektomie samců na délku života samiček nestačí na dosáhnutí úrovně přežívání samiček panenských.

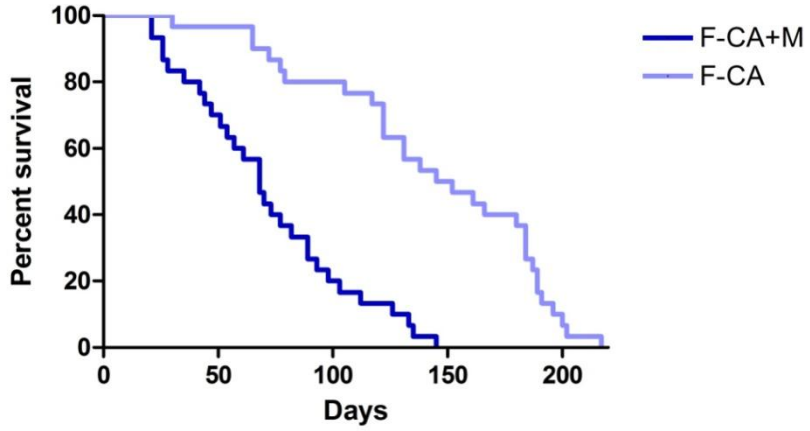
4.2 Vliv páření na délku života allatektomovaných samic (vliv JH)

Další z možností, proč kopulace zkracuje délku života samic, je přes stimulaci corpora allata (tedy ovlivněním syntézy JH). Hypotézu jsem ověřovala na allatektomovaných samicích, které se pářily s intaktními samci.



Obr. 11: Vliv páření na délku života allatektomovaných samic (Experiment 1)
F-CA+M = samice bez corpora allata (CA) v páru se samcem (N = 27), Medián = 63; **F-CA** = samice bez CA (N = 24), Medián = 111
Logrank test: **F-CA+M** vs **F-CA**: P = 0,0012.

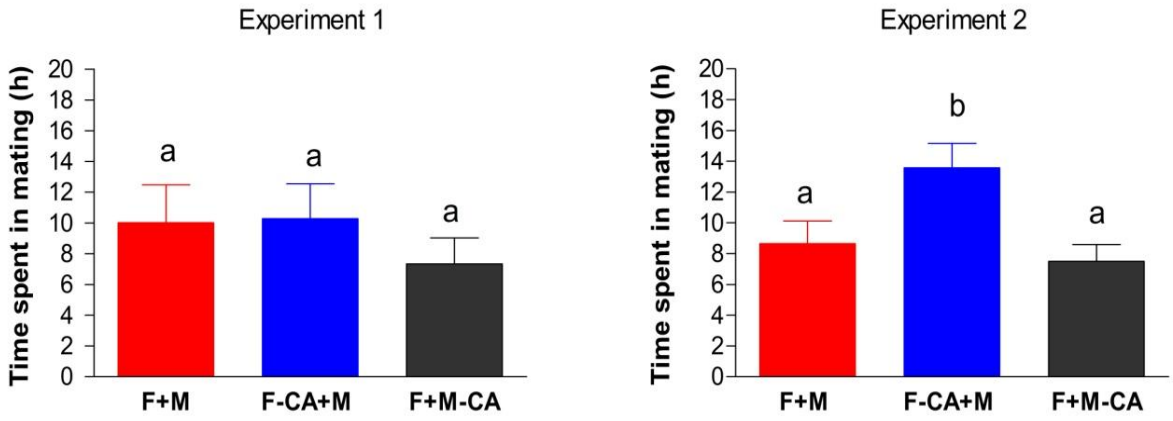
Délka života samic bez corpora allata postrádajících JH je velmi vysoká a dosahuje průměrně 108 dní. Avšak vliv páření se i u allatektomovaných samic negativně projevuje (P = 0,0012) a jejich přežívání se oproti F-CA snižuje o 43,2 % (Obr. 11).



Obr. 12: Vliv páření na délku života allatektomovaných samic (Experiment 2)
F-CA+M: (N = 30), Medián = 68; **F-CA**: (N = 30), Medián = 148,5
Logrank test: **F-CA+M vs F-CA**: P < 0,0001

V druhém experimentu (Obr. 12) je vliv páření na přežívání operovaných samic ještě markantnější. Jejich délka života se následkem kopulace snižuje o 54,2 % a rozdíl v průměrných délkách života obou skupin je vysoce signifikantní (P<0,0001). Pokud páření ovlivňuje délku života samic stimulací juvenilního hormonu, dalo by se očekávat, že přežívání F-CA+M nebude oproti izolovaným F-CA samičkám výrazně odlišné. Z výsledků obou provedených pokusů lze tuto hypotézu pravděpodobně vyloučit.

4.3 Vliv allatektomie na sexuální aktivitu samic a samců



Obr. 13 Vliv allatektomie na celkovou dobu skupin strávenou pářením
F+M = intaktní samice s intaktním samcem; **F-CA+M** = allatektomovaná samice s intaktním samcem; **F+M-CA** = intaktní samice s allatektomovaným samcem
Graf zobrazuje průměrnou dobu ± SEM strávenou pářením.
Výsledky byly vyhodnocené pomocí jednocestné ANOVY a následně Tukey post-testem. Odlišná písmena nad sloupci znamenají, že rozdíly mezi skupinami byly signifikantní (ostatní údaje viz Tab. 5)

Aby se zjistila možná odlišnost v páření samic a samců s vyjmutými corpora allata, byly tři uvedené skupiny sledovány kontinuálně přes 24 hodin (exp. 1 = 32 h, exp. 2 = 27 h) a každých 15. min (Obr. 13, experiment 1) či každých 30. minut (Obr. 13, experiment 2) se zaznamenal počet kopulujících párů. Oba grafy znázorňují průměrnou dobu ± SEM jednotlivých skupin strávenou pářením. V experimentu 1 statistická analýza pomocí jednocestné ANOVY neukázala signifikantní rozdíly mezi skupinami, jejichž doba strávená pářením byla podobná. V 2. experimentu dokonce skupina F-CA+M ostatní pozorované páry signifikantně převyšovala. Toto zjištění však neznamená, že se F-CA+M pářily častěji, pouze v jedné kopulaci vydržely delší dobu.

Tab. 5 Vliv allatektomie na páření jednotlivých skupin (experiment 1 a experiment 2)

Skupiny	**Počet párů**	**% pářících se párů**	**prům. doba strávená pářením (h)**	**Počet kopulací[1)]**
Experiment 1				
F+M	10	100 %	10 ± 2,470	3,125±0,4407
F-CA+M	9	100 %	10,28 ± 2,265	2,889±0,5122
F+M-CA	10	60 %	7,33 ± 1,703	1,667±0,3333
Experiment 2				
F+M	28	71 %	8,65±6,641	3,050±0,3439
F-CA+M	28	68 %	13,58±6,925	2,895±0,3049
F+M-CA	27	70 %	7,5±4,830	2,722±0,3214

Kombinace	**P (Tukey test)[2)]**
F+M vs F-CA+M	P < 0,05
F+M vs F+M-CA	P > 0,05
F-CA+M vs F+M-CA	P < 0,05

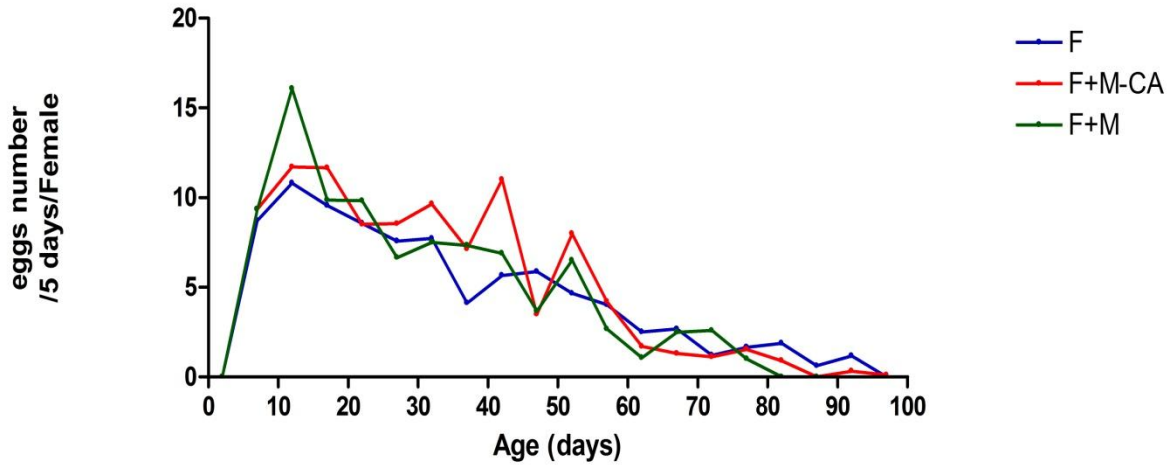
1) Anova neukázala signifikantní rozdíly mezi skupinami v počtu kopulací.

2) Tukey test porovnával rozdíly mezi průměrnou dobou strávenou pářením jednotlivých skupin (experiment 2)

V Tab. 5 jsou obsaženy údaje o celkovém počtu párů, které byly zkoumány v jednotlivých experimentech (počet párů), kolik % párů se za celou dobu sledování pářilo alespoň jednou (% pářících se párů), dále průměrná doba v h, která byla strávena kopulací (prům. doba páření) a poslední údaj udává, jaký byl průměrný počet kopulací na jeden pár v jednotlivých skupinách (počet kopulací).

4.4 Intenzita produkce vajíček

Zjišťovala se intenzita produkce vajíček mezi panenskými samicemi a samicemi v páru s intaktním či allatektomovaným samcem (vyšší produkce vajíček by mohla zkracovat samičkám život) (Obr. 14).



Obr. 14 Intenzita produkce mezi jednotlivými skupinami samic
F = samice panenské; **F+M-CA** = samice v páru s allatektomovaným samcem; **F+M** = samice v páru s intaktním samcem
Graf zobrazuje průměrný počet vajíček vykladený jednou samicí za 5 dní v průběhu jejího života.

Intenzita kladení se v průběhu stárnutí samiček snižuje, avšak rozdíly v intenzitě produkce vajíček mezi skupinami (vyhodnocené pomocí dvoucestné ANOVY a Bonferroni post-testem) nejsou signifikantní.

4.5 Kvalita vajíček panenských a kopulujících samic

Cílem těchto experimentů bylo zjistit, zda se vyskytují rozdíly v kvalitě vajíček mezi panenskými a pářícími se samičkami. Odlišnost v kvalitě by se mohla odrážet i v jejich přežívání. Kromě stanovení obsahu proteinů ve vajíčkách pomocí BCA metody se zjišťovala i váha jednotlivých vajec. Výsledky byly vyhodnocené pomocí t-testu.

Tab. 6 Váha jednoho vajíčka a množství proteinů v něm obsažených

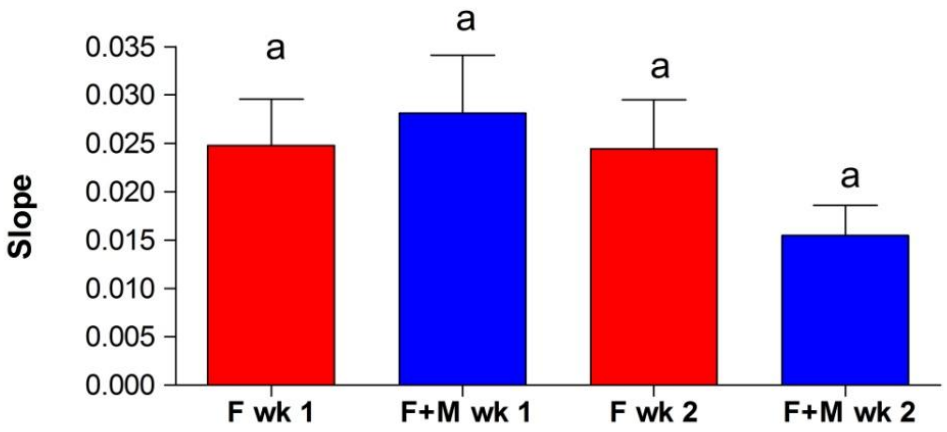
	N = počet jedinců	**Váha/1 vajíčko (µg)**	**Proteiny µg/mg živé váhy**
Panenské samice	27	301,4 ± 9,507	20,24 ± 1,369
Kopulující samice	21	318,3 ± 8,330	23,96 ± 2,002
T-test		P = 0,1863 (**ns**)	P = 0,1551 (**ns**)

T-testem byly porovnávány váhy jednotlivých vajíček mezi pářícími a panenskými samičkami a množství proteinů ve vajíčkách obsažených. V obou případech nebyly rozdíly signifikantní. Z výsledků tedy vyplývá, že kvalita vajíček pravděpodobně nemá vliv na přežívání kopulujících samiček, protože se tímto faktorem obě skupiny od sebe neliší.

4. 6 Vliv různých faktorů na aktivitu fenoloxidázy (PO)

V následujících pokusech jsem zjišťovala, zda páření a produkce juvenilního hormonu ovlivňuje imunitní systém samic – konkrétně aktivitu enzymu fenoloxidázy (PO) přítomného v jejich hemolymfě a zda je aktivita fenoloxidázy rozdílná mezi jedinci v LD a SD podmínkách.

4.6.1 Vliv páření na aktivitu fenoloxidázy samic



Obr. 15: Vliv páření na aktivitu fenoloxidázy samic

Slope znázorňuje sklon regresní přímky a je v přímém vztahu s relativní aktivitou/koncentrací fenoloxidázy obsaženou v hemolymfě; jednotlivé sloupce zobrazují průměrné hodnoty sklonu ± SEM. **wk 1** = 1 týden staré samice; **wk 2** = 2 týdny staré samice; **F** = samice panenské; **F+M** = samice v páru se samcem

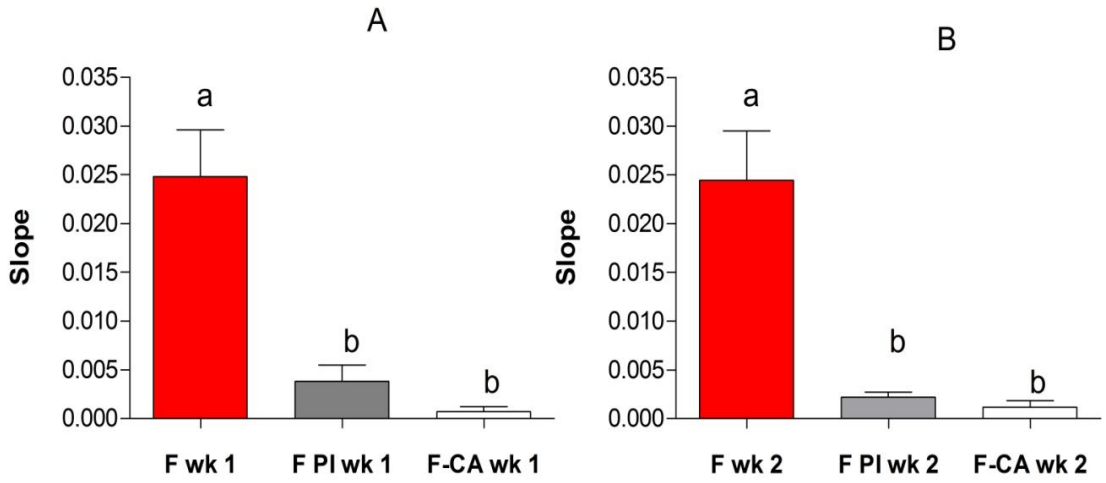
Rozdíly mezi průměry byly provedeny jednocestnou ANOVOU. Stejná písmena nad sloupci znázorňují nesignifikantní rozdíly mezi skupinami (P > 0,05).

Tab. 7 Vliv páření na aktivitu fenoloxidázy samic

	N = počet jedinců	Medián
F wk 1	14	0,02257
F+M wk 1	9	0,02414
F wk 2	13	0,01699
F+M wk 2	9	0,01815

Graf zobrazuje průměrnou aktivitu fenoloxidázy ± SEM samiček panenských a pářících 1/2 týdny starých. Statistická analýza provedená jednocestnou ANOVOU neprokázala mezi oběma skupinami signifikantní rozdíly (P > 0,05). Páření pravděpodobně aktivitu fenoloxidázy výrazně neovlivňuje.

4.6.2 Vliv corpora allata a pars intercerebralis na aktivitu fenoloxidázy LD samic



Obr. 16 Vliv corpora allata (CA) a pars intercerebralis (PI) na aktivitu fenoloxidázy LD samic
Graf A – 1 týden staré samice (wk 1); **Graf B** – 2 týdny staré samice (wk 2); **F** = samice intaktní (bez operativního zásahu do těla); **F PI** = samice bez corpora allata a pars intercerebralis; **F-CA** = samice bez corpora allata
Jednotlivé sloupce v grafech zobrazují průměrnou aktivitu PO ± SEM.
Statistická analýza: použita jednocestná ANOVA a následně Tukeyho post-test. Odlišná písmena nad sloupci ukazují na signifikantní rozdíly mezi skupinami.

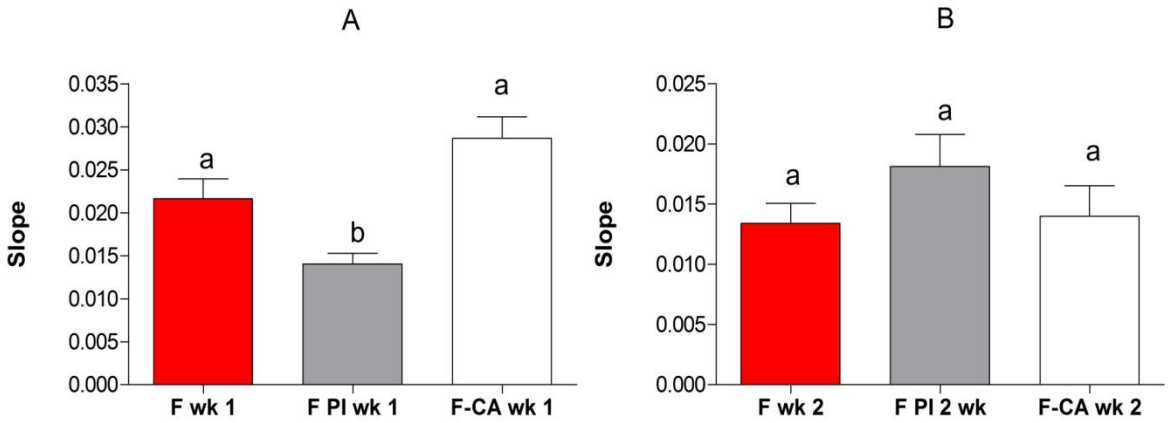
Tab. 8 Vliv PI a CA na aktivitu fenoloxidázy LD samic

	N	Medián
F wk 1	14	0,02257
F PI wk 1	13	0,001535
F-CA wk 1	13	0
F wk 2	13	0,01699
F PI wk 2	11	0,001363
F-CA wk 2	11	0

Oproti očekávanému zvýšení aktivity fenoloxidázy následkem vyjmutí zdroje juvenilního hormonu (CA) byl zjištěn pravý opak. Většina allatektomovaných samic měla nulovou hladinu PO a jak je z Obr. 16 patrné a potvrzené jednocestnou ANOVOU a Tukeyho post-testem, rozdíly oproti intaktním samicím byly vysoce signifikantní v 1. i 2. týdnu ($P < 0,001$).

Samicím byly proto odstraněny pars intercerebralis (PI) společně s corpora allata k ověření hypotézy (na základě rozdílů v aktivitě PO u SD samic, viz kap. 4.6.3), zda PI nemají inhibiční efekt na aktivitu PO, který je kompenzován stimulačním vlivem CA. Odebráním pars intercerebralis se hladina PO u několika samic jen velmi málo zvýšila a rozdíly mezi samičkami F PI a F-CA nebyly signifikantní v 1. ani v 2. týdnu ($P > 0,05$). Jak je zřetelné z Obr. 16, samičky intaktní a samičky bez PI se v aktivitě PO mezi sebou významně lišily v obou zkoumaných týdnech ($P < 0,001$).

4.6.3 Vliv corpora allata a pars intercerebralis na aktivitu fenoloxidázy SD samic



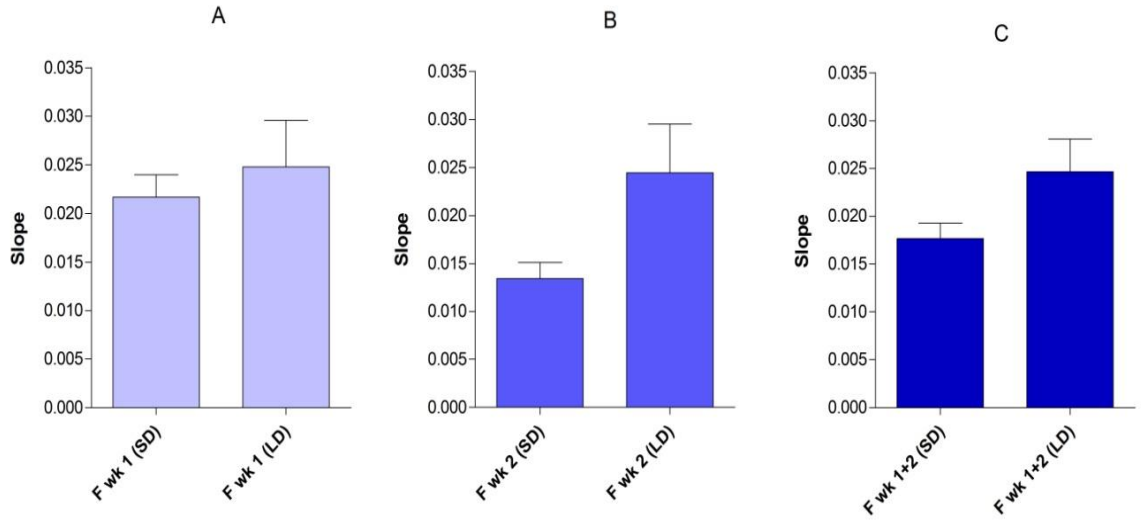
Obr. 17 Vliv corpora allata a pars intercerebralis na aktivitu PO SD samic
Graf A – 1 týden staré samice (wk 1); **Graf B** – 2 týdny staré samice (wk 2); **F** = samice intaktní; **F PI** = samice bez corpora allata a pars intercerebralis; **F-CA** = samice bez corpora allata
Jednotlivé sloupce v grafech zobrazují průměrnou aktivitu PO ± SEM.
Statistická analýza: provedena jednocestná ANOVA a Tukey post-test. Pokud jsou písmena nad sloupci různá, značí signifikantní rozdíly mezi skupinami.

Tab. 9 Vliv CA a PI na aktivitu fenoloxidázy SD samic

	N	Medián
F wk 1	16	0,02326
F PI wk 1	13	0,01407
F-CA wk 1	14	0,02814
F wk 2	15	0,01214
F PI wk 2	9	0,01666
F-CA wk 2	14	0,01093

Tukey post-test ukázal signifikantní rozdíly v aktivitě PO u samic starých 1 týden (Obr. 17., Graf A). Odchylky byly významné mezi skupinami F vs F PI ($P < 0,05$) a F PI vs F-CA ($P < 0,001$), avšak v týdnu následujícím (Obr. 17, Graf B) se žádné rozdíly mezi skupinami nevyskytovaly ($P > 0,05$). Je možné, že rozdíly u jednoho týdne starých samic jsou způsobené značnou variabilitou aktivní PO, která byla zjištěna mezi jedinci jednotlivých skupin (viz kap. 4.6.7). I přesto je z grafů patrné, že na rozdíl od operovaných LD samic, byla aktivita PO poměrně vysoká u všech skupin samic v diapauzních podmínkách, i když juvenilní hormon netvoří.

4.6.4 Porovnání LD a SD intaktních samic – 1 a 2 týdny starých



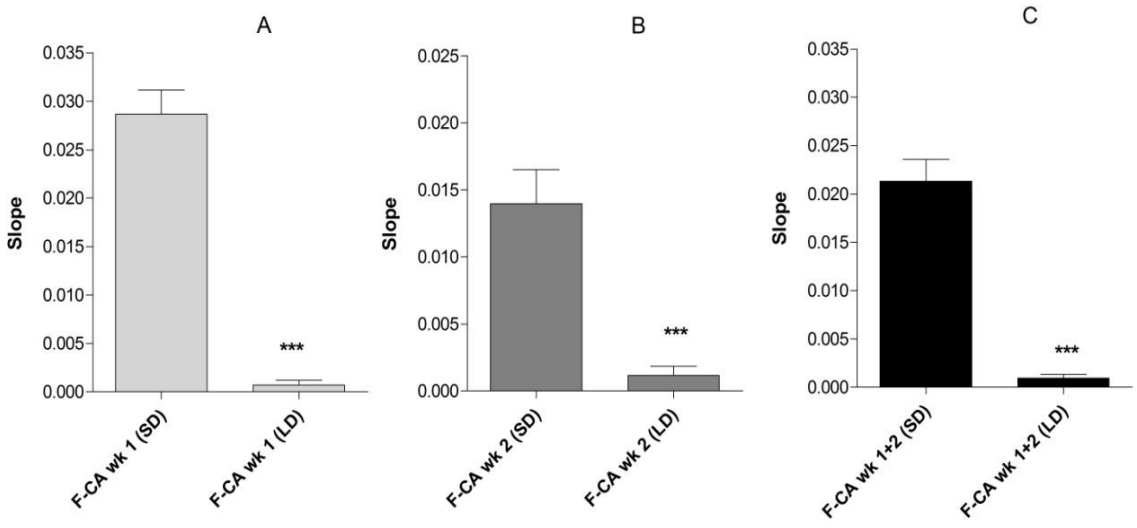
Obr. 18 Porovnání intaktních LD a SD samic (F) – 1 a 2 týdny starých
F = samice intaktní; (SD) = diapauzní samice; (LD) = nediapauzní samice
Graf A – 1 týden staré samice SD a LD (wk 1); **Graf B** – 2 týdny staré samice SD a LD (wk 2); **Graf C** – SD a LD samice wk 1+2
Grafy znázorňují průměrnou aktivitu PO ± SEM. Výsledky byly vyhodnocené pomocí t-testu (Tab. 10).

Tab. 10 Porovnání intaktních LD a SD samic – 1 a 2 týdny starých

	F wk 1 (SD)	F wk 1 (LD)	F wk 2 (SD)	F wk 2 (LD)	F wk 1+2 (SD)	F wk 1+2 (LD)
N	16	13	15	14	31	27
Medián	0,02326	0,02257	0,01214	0,01699	0,01845	0,02248
t-test	P = 0,4323 (ns)		P = 0,0503 (ns)		P = 0,0594 (ns)	

Intaktní LD a SD (diapauzní) samice se mezi sebou v aktivitě fenoloxidázy signifikantně nelišily (Obr. 18, Graf A a B). Graf C slučuje výsledky z obou týdnů (wk 1+ 2).

4.6.5 Porovnání allatektomovaných LD a SD samic – 1 a 2 týdny starých



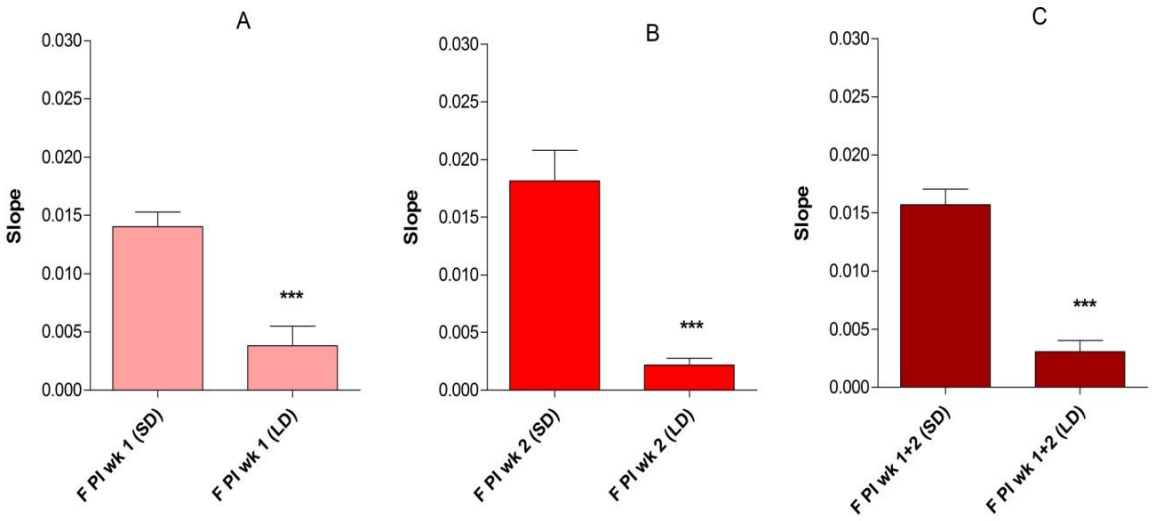
Obr. 19 Porovnání allatektomovaných LD a SD samic - 1 a 2 týdny starých
F-CA = allatektomované samice; (SD) = diapauzní samice; (LD) = nediapauzní samice
Graf A – 1 týden staré samice SD a LD (wk 1); **Graf B** – 2 týdny staré samice SD a LD (wk 2); **Graf C** – SD a LD samice wk 1+2
Sloupce v grafech zobrazují průměrnou aktivitu PO ± SEM.
Výsledky byly vyhodnocené t-testem (Tab. 11). Jak moc jsou rozdíly mezi skupinami signifikantní, znázorňují znaky (hvězdičky) nad sloupci (*** = největší míra významnosti).

Tab. 11 Porovnání LD a SD samic bez CA - 1 a 2 týdny starých

	F-CA wk 1 (SD)	**F-CA wk 1 (LD)**	**F-CA wk 2 (SD)**	**F-CA wk 2 (LD)**	**F-CA wk 1+2 (SD)**	**F-CA wk 1+2 (LD)**
N	14	13	14	11	28	24
Medián	0,02814	0	0,01093	0	0,01958	0
t-test	P < 0,0001		P = 0,0002		P < 0,0001	

Na rozdíl od allatektomovaných LD samic, které vykazují téměř nulovou hladinu sledovaného enzymu, diapauzní samice bez CA mají aktivitu PO signifikantně vyšší v 1. i 2. týdnu stáří (Obr. 19, Graf A a B), i když obě skupiny juvenilní hormon netvoří (u SD samic je navíc absence JH normálním fyziologickým stavem).

4.6.6 Porovnání LD a SD samic bez pars intercerebralis (a CA) – 1 a 2 týdny starých



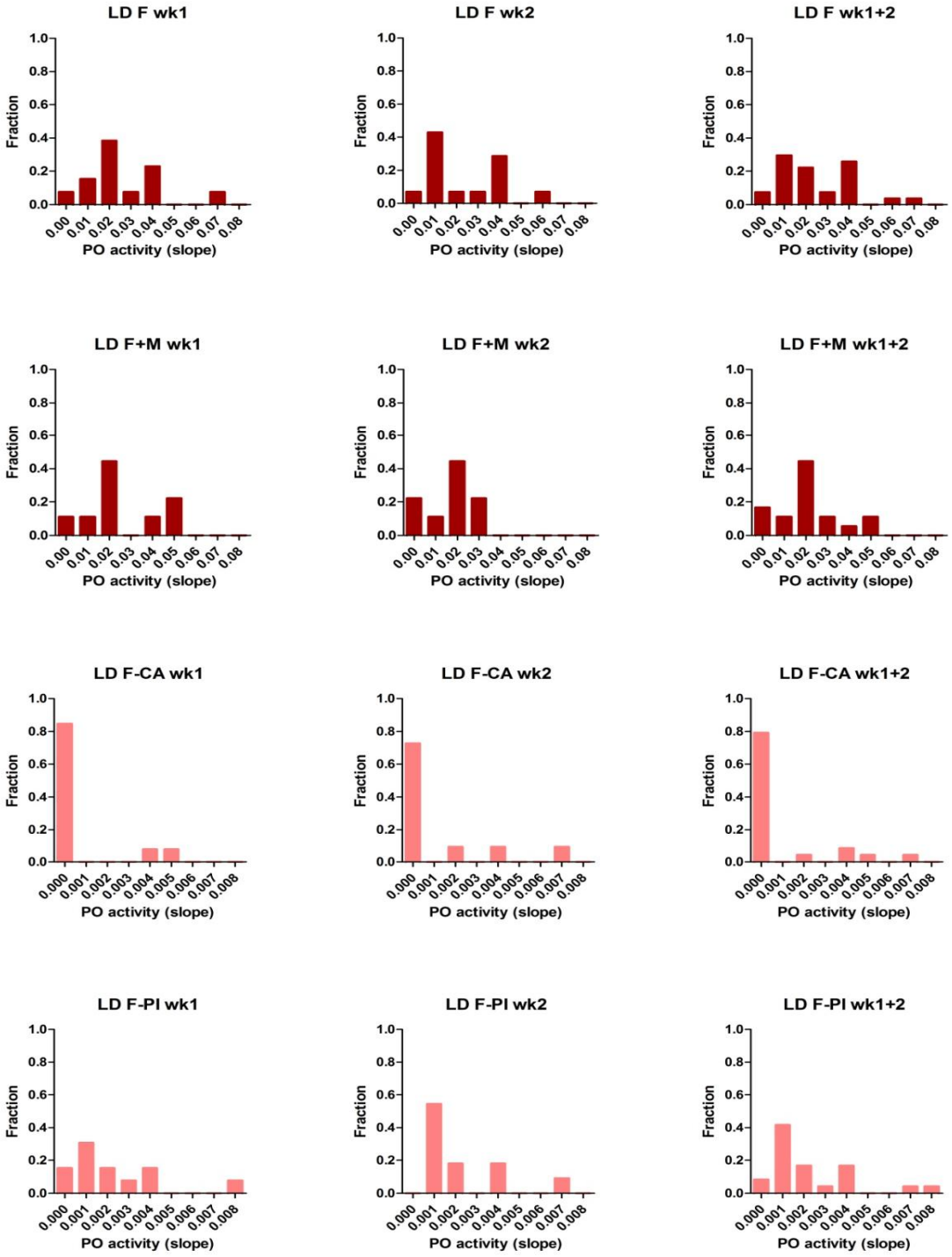
Obr. 20 Porovnání LD a SD samic bez pars intercerebralis (a CA) – 1 a 2 týdny starých
F-PI = samice bez pars intercerebralis (PI) a corpora allata (CA); (SD) = diapauzní samice; (LD) = nediapauzní samice
Graf A – 1 týden staré samice SD a LD (wk 1); **Graf B** – 2 týdny staré samice SD a LD (wk 2); **Graf C** – SD a LD samice wk 1+2
Sloupce zobrazují průměrnou aktivitu PO ± SEM.
Na zhodnocení výsledků byl použit t-test (Tab. 12). Znaky nad sloupci zobrazují míru významnosti.

Tab. 12 Porovnání LD a SD samic bez PI a CA - 1 a 2 týdny starých

	F PI wk 1 (SD)	**F PI wk 1 (LD)**	**F PI wk 2 (SD)**	**F PI wk 2 (LD)**	**F PI wk 1+2 (SD)**	**F PI wk 1+2 (LD)**
N	13	13	9	11	22	24
Medián	0,01407	0,001535	0,01666	0,001363	0,01521	0,001451
t-test	P < 0,0001		P < 0,0001		P < 0,0001	

Jako v předešlém případě (kap. 4.6.5) se operované SD samice (bez PI+CA) významně lišily v aktivitě stanovovaného enzymu oproti LD samicím (P < 0,0001), u kterých byla hladina PO velmi nízká. Protože v reprodukční diapauze dochází k fyziologickým změnám, je pravděpodobné, že je u SD jedinců hladina PO řízena jinými mechanismy než u jedinců chovaných v protidiapauzní fotoperiodě. Odebrání PI/CA jim aktivitu fenoloxidázy neovlivní, kdežto LD samice vykazují značný pokles.

4.6.7 Variabilita mezi jedinci v jednotlivých skupinách

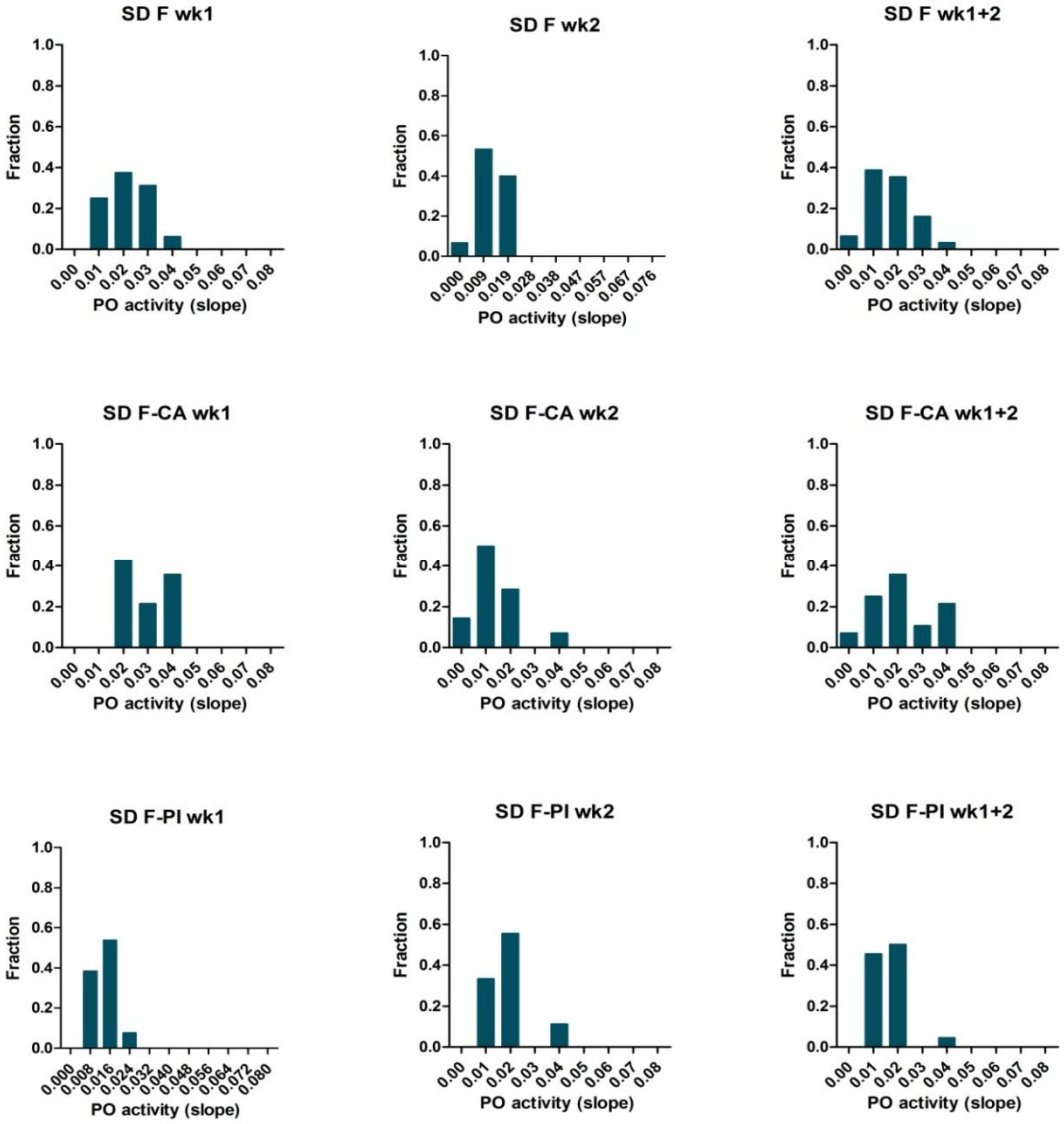


Obr. 21 Variabilita mezi jedinci v LD skupinách

F = samice panenské; **F+M** = samice páření; **F-CA** = samice bez CA; **F-PI** = samice bez PI+CA

wk 1= 1 týden staré samice; **wk 2** = 2 týdny staré samice; **wk 1+2** = samice spojené

V jednotlivých grafech je na ose *x* zobrazena relativní aktivita PO v intervalech 0,01 (pro F a F+M samice) či 0,001 (pro samice operované). Osa *y* udává podíl = kolik jedinců ze skupiny spadá do konkrétních hodnot (má stejnou aktivitu fenoloxidázy).



Obr. 22 Variabilita mezi jedinci v SD skupinách
F = samice panenské; **F-CA** = samice bez CA; **F-PI** = samice bez PI+CA
wk 1= 1 týden staré samice; **wk 2** = 2 týdny staré samice; **wk 1+ 2** = samice spojené
osa *x* – aktivita PO v intervalech 0,01; osa *y* – podíl jedinců u jednotlivých hodnot

Během mnoha měření bylo zjištěno, že se i jedinci ve stejné skupině mohou mezi sebou lišit v aktivitě fenoloxidázy. U grafů s různými skupinami LD samic (Obr. 21) vidíme, že je poměrně vysoká variabilita ve skupinách F a F+M, zatímco většinu allatektomovaných samic (F-CA) nalezneme v nulových hodnotách. Oproti F-CA se samice bez PI+CA (F-PI) zdají být více variabilní (ale v řádově velmi nízkých hodnotách, které se blíží nule). Variabilita mezi jedinci ve skupině byla zpozorována i u samic SD, ale oproti LD samicím nebyla tak výrazná (Obr. 22).

5. DISKUZE

5.1 Vliv proteinů z přídatných žláz samců na délku života samic

Jedním z cílů mé magisterské práce bylo zjistit, zda jsou samčí proteiny z přídatných žláz zodpovědné za kratší délku života kopulujících samiček *Pyrrhocoris apterus*. Dřívější práce ukázaly, že allatektomovaní samci *P. apterus* mají menší AGs (Sláma 1964), které produkují menší množství celkových proteinů (Socha et al. 2004). Vliv absence JH na celkový obsah proteinů (a 80 - 90 kDa AGs proteinu) jsem potvrdila, i když absolutní hodnoty byly nižší (viz kap. 4.1.1, Tab. 2) než v práci Socha et al. (2004). Samičkám, které kopulovaly se samci bez CA, se život významně prodloužil (oproti samicím s intaktním samcem) sice až v druhém provedeném pokusu (viz kap. 4.1.4, obr. 10), ale i přesto je patrné, že proteiny z AGs na přežívání samic vliv mají. Jejich negativní efekt je zdokumentován převážně u samiček *D. melanogaster* (Fowler & Partridge 1989; Chapman 1992; Chapman et al. 1993, 1995; Wigby & Chapman 2005), kde kromě vlivu na délku života samiček, ovlivňují i jejich chování (receptivitu = ochotu znovu se pářit) a zvyšují produkci vajíček (Wolfner 1997, 2002; Chapman 2001; Gillott, 2003; Liu & Kubli 2003).

I když byl samičkám *Pyrrhocoris apterus* život vlivem allatektomie samců (F+M-CA) prodloužen (v 2. pokuse), jejich délka života se nemohla vyrovnat přežívání samic panenských. Je možné, že corpora allata nejsou pro syntézu AGs proteinů nezbytná, jen řídí jejich množství (Socha et al. 2004), a tedy i snížený obsah proteinů v žlázách by mohl ke kratšímu přežívání samiček stačit.

Můžou zde hrát roli i jiné faktory, které se nezkoumaly. Samci stále produkovali spermie, které by mohly k pářícím nákladům přispívat, jak bylo zjištěno u čmeláka *Bombus terrestris* (Greeff & Schmid-Hempel 2008). Avšak u *D. melanogaster* efekt spermií na délku života samic nebyl zpozorován (Chapman et al. 1993). Je možné, že samotným aktem páření jsou samičky fyzicky zraňovány (Crudgington & Siva-Jothy 2000; Blanckenhorn 2002) či dochází k přenosu patogenů (Webberley et al. 2004; Abbot & Dill 2001).

Během pokusů se zkoumala i frekvence páření mezi skupinami (F+M, F+M-CA,F-CA+M), která by rovněž mohla mít vliv na přežívání samic. Počet kopulací byl mezi skupinami podobný, avšak lišily se v průměrné době, kterou pářením strávily (viz kap. 4.3, Obr. 13). I když rozdíly mezi F+M a F+M-CA nebyly signifikantní, samice v páru s allatektomovaným

samcem strávily kopulací méně času než ostatní dvě skupiny (subjektivní dojem). Pokud je jedním z charakteristických znaků proteinů z AGs snížení receptivity samičky (Chapman et al. 2003; Liu & Kubli 2003), její ochota k páření by měla být vlivem allatektomie samců vyšší, což potvrzeno nebylo. Je možné, že samci s absencí JH jsou pro samičku méně atraktivní, jak bylo zjištěné v práci Rantala et al. (2003) na moučném červu *Tenebrio molitor* (aplikovaný JH zvýšil produkci feromonů). Tedy o něco menší (i když nesignifikantní) doba strávená pářením by mohla přispívat k prodloužení života samice v páru s allatektomovaným samcem ve srovnání s intaktními páry.

5.2 Vztah mezi produkcí a kvalitou vajíček a délkou života

Vlivem páření se může zvýšit produkce vajíček, která je u mnoha studií připisována proteinům z přídatných žláz samců (Chen et al. 1998; Wolfner 1997; Chapman 2001; Chapman et al. 2003; Liu & Kubli 2003; Gillot 2003). U samiček *P. apterus* byla intenzita kladení podobná u všech zkoumaných skupin samic (F, F+M,F+M-CA, viz kap. 4.4, Obr. 14) a přítomnost/snížená syntéza proteinů neměla na intenzitu vliv. Kratší či delší život těchto samiček tedy nelze připsat rozdílům v produkci vajíček, což je v souladu se studií na *Ceratitis capitata* (Chapman et al. 1998). I když by se samičky mohly mezi sebou odlišovat v kvalitě vajíček, která by pro ně mohla být energeticky náročná, kopulující a panenské samice se obsahem proteinů (ani váhou) vyprodukovaných vajíček vzájemně nelišily (viz kap. 4.5., Tab. 6).

5.3 Vliv páření na délku života allatektomovaných samic (bez JH)

Izolované allatektomované samice se vyznačují poměrně dlouhým životem v porovnání s intaktními panenskými, ale pokud se začnou pářit se samci, délka života se jim radikálně sníží (o 40-50%) (viz kap. 4.2). Zjištění je v rozporu s hypotézou, že je kratší život kopulujících samic vyvolán stimulací corpora allata (Moshitzky 1996; Fann et al. 1999). Protože se život pářících F-CA+M značně zkrátil, i když JH netvořily, kopulace musí ovlivňovat jejich délku života jiným způsobem. Samci, s kterými se zkoumané samičky pářily, byli intaktní, a tedy tvořili proteiny v AGs i spermie. Oba produkty by mohly mít na přežívání samic vliv. Navíc některé AGs proteiny mohou být pro samičky toxické nezávisle na jejím metabolismu (Mueller et al. 2007) a o funkcích mnohých se zatím ví velmi málo.

Když se zkoumala a porovnávala frekvence páření F-CA+M s ostatními skupinami (F+M, F+M-CA), allatektomované samičky (v 2. pokusu) vydržely v kopulaci mnohem déle než ostatní skupiny (viz kap. 4.3, obr. 13), z čehož vyplývá, že byly mnohem ochotnější k páření (zvýšila se receptivita). Jelikož postrádaly CA, je možné, že JH receptivitu snižuje (Manning 1966; Ringo et al. 1991). Zjištění je v souladu se studií Rafaeli & Bober (2005) na můře *Helicoverpa armigera*. Aplikace analogu JH (fenoxycarb) snížila receptivitu samic. Delší doba samiček *P. apterus* (bez CA) strávená páření by mohla přispívat k jejich kratšímu životu.

5.4 Vliv páření na imunitní systém samiček *Pyrrhocoris apterus*

Oxidoreduktáza fenoloxidáza (PO) patří mezi klíčovou složku humorální imunity hmyzu a úzce souvisí i s buněčnou účastí na enkapsulaci a nodulaci. Jsou důkazy, že páření snižuje aktivitu zmiňovaného enzymu, a tak potenciálně zvyšuje náchylnost jedinců k parazitům (Nigam et al. 1997; Shiao et al. 2001). Nižší aktivita fenoloxidázy byla zjištěna u obou pohlaví moučného červa *Tenebrio molitor* (Rolff & Siva-Jothy 2002), avšak u samiček *Pyrrhocoris apterus* nebyl vliv kopulace na aktivitu PO zaznamenán (aktivita PO se mezi pářícími a panenskými samičkami výrazně nelišila, (viz kap. 4.6.1, Obr. 15). Mé výsledky se shodují s prací Schwarzenbach et al. (2005), která byla provedená na mouše *Scathophaga stercoraria*. Ani zde páření neovlivnilo aktivitu zkoumaného enzymu. U samiček cvrčka *Allonemobius socius* se dokonce aktivita PO častým pářením zvyšovala (Fedorka et al. 2004).

Pokud je udržení určité hladiny PO pro samičky energeticky náročné, energie vložená do imunitních funkcí je pravděpodobně stejná pro obě skupiny (panenské a kopulující samice), alespoň tedy pro enzym fenoloxidázu. Fenoloxidázová kaskáda totiž zahrnuje mnoho cytotoxických vedlejších produktů, které napadají patogen, ale mohou poškozovat i samotného hostitele (Söderhäll & Cerenius 1998). Je možné, že hmyz přepíná mezi velmi na energii nákladnou cytotoxickou obranou a méně náročnou, avšak relativně specifickou obranou (antimikrobiální a fungicidní peptidy) v závislosti na zamoření patogenem (Rolff & Siva-Jothy 2003). V podmínkách hladovění vysoká hladina PO zkracuje život oběma pohlavím *Scathophaga stercoraria*, kdežto nízká přežívání prodlužuje (Schwarzenbach & Ward 2006). I když je funkce fenoloxidázy v celé hmyzí říši vysoce konzervovaná, trade-off mezi imunitou a pářením tak konzervované být nemusí, alespoň to výsledky na *Pyrrhocoris apterus* nepotvrzují. Je možné, že pouze měření aktivity fenoloxidázy nemusí být dostačující k odhalení vztahu mezi kopulací a imunitou (Schwarzenbach et al. 2005).

Během páření by tedy mohlo docházet ke změnám v jiných složkách imunitního systému, které se nezkoumaly, např. kopulace snižuje imunitní odpověď – enkapsulaci oběma pohlavím motýlice *Matrona basilaris japonica* (Siva-Jothy et al. 1998) či lytickou aktivitu, počet hemocytů a enkapsulaci samcům i samicím *Allonemobius socius* (Fedorka et al. 2004). U samiček *Drosophila melanogaster* jsou některé antimikrobiální peptidy (AMPs) následkem proteinů z přídatných žláz samců upregulovány několik hodin po páření. Kopulace

by je mohla fyzicky zraňovat, a tak zvyšovat riziko přenosu patogenů samci, jak bylo zjištěno u brouka *Labidomera clivicollis* (Abbot & Dill 2001). Pro samičky *D. melanogaster* může být stimulace AMPs, i když je energeticky náročná, preventivním krokem proti možnému napadení patogeny. Zda takové změny probíhají i v těle samičky *P. apterus,* potřebuje další zkoumání.

5.5 Vliv JH na aktivitu fenoloxidázy u LD a SD samic

Když se LD (nediapauzním) samičkám *P. apterus* operativně odstranily corpora allata, a tedy i zdroj juvenilního hormonu, aktivita fenoloxidázy nebyla naměřena téměř u žádné ploštice (pokud byla, hodnoty se i tak blížily nule). Výsledky jsou překvapivé a v rozporu s prací provedenou na *T. molitor* (Rolff & Siva-Jothy 2002). Rolff & Siva-Jothy (2002) považují za příčinu snížené hladiny PO vyvolané následkem páření juvenilní hormon, aplikací fluvastatinu (JH inhibitor) k supresi enzymu nedojde. U jiné studie byl samcům *T. molitor* injikován JH (typ III), který fenoloxidázovou aktivitu potlačil, ale zároveň zvýšil produkci samčích feromonů, a tudíž i jejich atraktivnost pro opačné pohlaví (Rantala et al. 2003). Výsledky na *P. apterus* spíše ukazují na pravý opak a to takový, že juvenilní hormon hladinu fenoloxidázy stimuluje, kdežto jeho nedostatek způsobí i absenci PO.

Je možné, že odstraněním CA se samičkám změnilo (snížilo) množství hemocytů v hemolymfě, které syntetizují fenoloxidázu v neaktivní formě (ve formě profenoloxidázy). Hypotéza pochází ze studie Pathak (1983) na brouku *Halys dentata,* na kterém se zkoumala změna v množství hemocytů po odstranění corpora allata a corpora cardiaca (jednotlivě či dohromady).

Co se týká SD (diapauzních) samiček, u allatektomovaných (ani intaktních) samic nebyla zaznamenána změna v aktivitě PO (aktivita nebyla potlačena). Výsledky nejsou až tak překvapující, jelikož v diapauzních podmínkách dochází u jedince k významným fyziologickým přechodům, především k inhibici corpora allata neurosekrečními buňkami PI (Hodková 1976). Samice jsou na tento stav připravené, a tudíž nejsou citlivé ke změnám v aktivitě CA oproti jedincům v proti-diapauzní fotoperiodě.

Optimální aktivita PO pro udržení obranyschopnosti je tak zajištěna jak u reprodukčně aktivních jedinců (v přítomnosti JH), tak u diapauzních jedinců (v nepřítomnosti JH).

5.6 Vliv pars intercerebralis na aktivitu PO u LD a SD samic

Poznatkem, že absence JH má tak rozdílný vliv na aktivitu PO u samic v LD a SD podmínkách, vznikla další hypotéza, která se týkala pars intercerebralis (PI) produkujících neurosekreční buňky. V práci Hodková (2008) bylo zjištěno, že PI zkracují/prodlužují délku života samic *P. apterus* v závislosti na LD/SD podmínkách. Analogicky by mohly mít signály z PI inhibiční/stimulační vliv na aktivitu fenoloxidázy. Pokud JH tedy produkci PO zvyšuje, přítomnost neurosekrečních buněk pars intercerebralis ji může potlačovat. Aby se zjistil jejich potenciální efekt na aktivitu enzymu, musely se odstranit pars intercerebralis společně s corpora allata. U samic v LD podmínkách se sice hladina PO o něco zvýšila oproti allatektomovaným samicím, avšak rozdíly mezi nimi nebyly výrazné. Pars intercerebralis pravděpodobně velký vliv na aktivitu PO nemají.

U diapauzních samic se ani po odstranění PI hladina fenoloxidázy nezměnila. Protože diapauzou jedinec přečkává nepříznivé podmínky, dochází ke zvyšování odolnosti proti stresu, jak bylo zjištěno u *D. melanogaster* (Tatar et. al 2001c). Je možné, že se diapauzní samičky snaží analogicky udržovat určitou hladinu fenoloxidázy, a tak se preventivně chránit. Není však jasné, zda je výskyt PO u SD samiček způsoben jejím „nahromaděním“ v průběhu larválního vývoje, zda jsou za udržení určité hladiny zodpovědné jiné neuroendokrinní tkáně (např. corpora cardiaca) či zda jde o přímý vliv fotoperiody na periferní tkáně.

5.7 Vliv fenoloxidázy na délku života

Co se týká vlivu fenoloxidázy na délku života testovaných SD a LD samic, PO pravděpodobně přežívání neovlivňuje. I když by za delší život allatektomovaných LD samic (či samic bez PI) mohla být zodpovědná nulová/velmi nízká aktivita PO, intaktní i operované SD samice žijí mnohem déle (Hodková 2008), i když aktivita PO zůstává nezměněna.

5.8 Variabilita fenoloxidázy

Aktivita fenoloxidázy může být mezi jedinci stejných skupin značně variabilní, jak bylo zjištěno během měření vzorků. Rozdíly v aktivitě PO (mezi jednotlivci ve skupinách) byly zpozorovány i u jiných druhů hmyzu, např. u *Anopheles gambiae* (Paskewitz et al. 1989), *Spodoptera exigua* (Hung & Boucias 1996), *Lymantria dispar* (Bidochka & Hajek 1998) či *Spodoptera littoralis* (Cotter & Wilson 2002). U samiček *Pyrrhocoris apterus* se větší

variabilita v aktivitě enzymu nacházela spíše v podmínkách protidiapauzních (hlavně u samiček pářících a panenských) než diapauzních. Jedním z vysvětlení variability můžou být právě podmínky, ve kterých se jedinci vyskytují. Např. intaktní LD samice jsou reprodukčně aktivní, nemají potlačenou oogenezi a vitellogenezi = produkují vajíčka a je možné, že samotné kladení, doba před či po kladení by mohla tuto variabilitu způsobovat (i jiné faktory). Naproti tomu se všechny SD samice nacházejí ve stejných podmínkách (v diapauze), což by se mohlo odrážet i v poměrně stálejší aktivitě PO.

6. ZÁVĚR

- Snížené množství proteinů v přídatných žlázách samců prodlužuje pářícím se samičkám život, ale ne až na úroveň samiček panenských (množství obsažené v žlázách může být i tak dostačující k vyvolání negativního efektu/zde hrají roli i jiné faktory).
- Intenzita produkce vajíček je podobná u všech skupin zkoumaných samic (panenských, v párech s intaktním či allatektomovaným samcem).
- Váha vajíček a množství proteinů v nich obsažených se u panenských a kopulujících samic výrazně neliší.
- Intenzita produkce vajíček, jejich váha ani kvalita pravděpodobně délku života pářících se samic neovlivňují.
- Allatektomie samic nezabrání výraznému zkrácení jejich života pářením; stimulace CA pravděpodobně není zodpovědná za kratší život kopulujících samic.
- Páření neovlivňuje aktivitu fenoloxidázy.
- Allatektomie LD samic výrazně snižuje aktivitu PO; JH má na hladinu PO pravděpodobně stimulační vliv.
- Aktivita PO je u diapauzních samic (bez ohledu na přítomnost CA, které je neaktivní) stejně vysoká jako u LD intaktních.
- Aktivita PO je zcela závislá na přítomnosti JH u reprodukčních samic, ale u diapauzních je na JH nezávislá. Tento rozdíl naznačuje další faktory řídící aktivitu PO: stimulační (u diapauzních samic) či inhibiční (u nediapauzních allatektomovaných samic).
- Odstraněním PI allatektomovaným LD samicím se aktivita PO nezvýší (stále se blíží k nulovým hodnotám), u SD samic zůstává hladina stejná. Neurosekreční buňky PI (zdroj insulinových peptidů) pravděpodobně nemají významnou úlohu v řízení aktivity PO.
- Aktivita PO pravděpodobně s délkou života nesouvisí.

7. LITERATURA

Abbot P. & Dill. L. M. 2001. Sexually transmitted parasites and sexual selection in the milkweed leaf beetle, *Labidomera clivicollis*. *Oikos* 92: 91–100.

Aigaki T., Fleischmann I., Chen P. S., Kubli E. 1991. Ectopic expression of sex peptide alters reproductive behavior of female *Drosophila melanogaster*. *Neuron* 7: 557–563.

Amdam G., Aase A. L. T. O., Seehuus S. - C., Fondrk M. K., Norberg K., Hartfelder K. 2005. Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. *Exp. Gerontol*. 40: 939–947.

Arnqvist G. & Nilsson T. 2000. The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. *Anim. Beh*. 60: 145-164.

Baer B., Armitage S. A. O., Boomsma J. J. 2006. Sperm storage induces an immunity cost in ants. *Nature* 441: 872-875.

Barnes A. I. & Siva-Jothy M. T. 2000. Density-dependent prophylaxis in the mealworm beetle *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae): cuticular melanization is an indicator of investment in immunity. *Proc. R. Soc. Lond. B* 267: 177-182.

Barnes A. I. & Partridge L. 2003. Costing reproduction. *Anim. Beh.* 66: 199-204.

Barnes A. I., Boone J. M., Jacobson J., Partridge L., Chapman T. 2006. No extension of lifespan by ablation of germ line in *Drosophila*. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 273: 939-947.

Barnes A., Wigby S., Boone J. M., Partridge L., Chapman T. 2008. Feeding, fecundity and lifespan in female *Drosophila melanogaster*. *Proc. R. Soc.* 275: 1675–1683.

Bell G. & Koufopanou V. 1986. The cost of reproduction. Pp. 83–131 in Dawkins R. and Ridley M.,eds. Oxford Surv. Evol. Biol. Vol. 3. Oxford Univ. Press, Oxford, U. K.

Bidochka M. J. & Hajek A. E. 1998. A nonpermissive entomophthoralean fungal infection increases activation of insect prophenoloxidase. *J. Invertebr. Pathol.* 72: 231–238.

Blanckenhorn W. U., Hosken D. J., Martin O. Y., Reim C., Teuschl Y., Ward P. I. 2002. The costs of copulating in the dung fly *Sepsis cynipsea*. *Behav. Ecol.* 13: 353–358.

Blažková H. 2008. Vliv sexuální aktivity na délku života u hmyzího modelu. Bakalářská práce. Faculty of Science, The University of South Bohemia, Czech republic.

Bownes M. 1982. Hormonal and genetic regulation of vitellogenesis in *Drosophila*. *Quart. Rev. Biol.* 57:247–274.

Cao C. & Brown M. R. 2001. Localization of an insulin-like peptide in brains of two flies. *Cell Tissue Res*. 304: 317–321.

Cargill S. L., Carey J. R., Müller H - G., Anderson G. 2003. Age of ovary determines remaining life expectancy in old ovariectomized mice. *Aging Cell* 2: 185-190.

Cerenius L. & Söderhäll K. 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol. Rev.* 198: 116–26.

Chandrashekar V. & Bartke A. 2003. The role of insulin-like growth factor-I in neuroendocrine function and the consequent effects on sexual maturation: inferences from animal models. *Reprod. Biol*. 3: 7-28.

Chapman T. 1992. A cost of mating with males that do not transfer sperm in female *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol*. 38: 223-227.

Chapman T., Hutchings J., Partridge L. 1993. No reduction in the cost of mating for *Drosophila melanogaster* females mating with spermless males. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 253: 211-217.

Chapman T., Liddle L. F., Kalb J. M., Wolfner M. F., Patridge L. 1995. Cost of mating in *Drosophila melanogaster* females is mediated by male accessory gland products. *Nature* 373: 241-244.

Chapman T. & Partridge L. 1996. Female fitness in *Drosophila melanogaster*. An interaction between the effect of nutrition and of encounter rate with males. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 263: 755–759.

Chapman T., Miyatake T., Smith H. K., Partridge L. 1998. Interactions of mating, egg production and death rates in females of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 265: 1879-1894.

Chapman T. 2001. Seminal fluid-mediated fitness traits in Drosophila. *Heredity* 87: 511–521.

Chapman T., Bangam J., Vinti G., Seifried B., Lung O., Wolfner M. F., Smith H. K., Partridge L. 2003. The sex peptide of *Drosophila melanogaster*: Female post-mating responses analyzed by using RNA interference. *Genetics* 100: 9923-9928.

Chapman T. & Davies S. J. 2004. Functions and analysis of the seminal fluid proteins of male *Drosophila melanogaster* fruit flies. *Peptides* 25: 1477–90.

Chen P. S., Stumm - Zollinger E., Aigaki T., Balmer J., Bienz M., Bohlen P. 1988. A male accessory gland peptide that regulates reproductive behaviour of female *D. melanogaster*. *Cell* 54: 291–298.

Chen C. C. & Chen C. S. 1995. *Brugia pahangi*: Effects of melanization on the uptake of nutrients by microfilariae *in vitro*. *Exp. Parasitol.* 81: 72-78.

Clutton-Brock T. H. 1991. The Evolution of Parental Care. Princeton University Press, Princeton.

Clutton-Brock T. & Langley P. 1997. Persistent courtship reduces male and female longevity in captive tsetse flies *Glossina morsitans morsitans* Westwood (Diptera: Glossinidae). *Behav. Ecol.* 8: 392–395.

Cole T. J., Ramaswamy S. B., Srinivasan A., Dorn S. 2002. Juvenile hormone catabolism and oviposition in the codling moth, *Cydia pomonella*, as functions of age, mating status, and hormone treatment. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 49: 10–21.

Collatz K. - G. 2003. Aging and environmental conditions in insects. Pp. 99-123. in Osiewacz, H. D., ed. Aging of Organisms. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Cotter S. C. & Wilson K. 2002. Heritability of immune function in the caterpillar *Spodoptera littoralis*. *Heredity* 88: 229–234.

Crudgington H. S. & Siva-Jothy M. T. 2000. Genital damage, kicking and early death. *Nature* 407: 855–856.

Cusson M., Delisle J., Miller D. 1999. Juvenile hormone titers in virgin and mated *Choristoneura fumiferana* and *C. rosaceana* females: Assessment of the capacity of males to produce and transfer JH to the female during copulation. *J. Insect Physiol.* 45: 637–646.

Dobeš P. 2009. Fenoloxidázová kaskáda u hmyzu. Diplomová práce. Masarykova univerzita.

Domanitskaya E. V., Liu H., Chen S., Kubli E. 2007. The hydroxyproline motif of male sex peptide elicits the innate immune response in *Drosophila* females. *FEBS Journal* 274: 5659-5668.

Edwards J. P., Corbitt T. S., McArdle H. F., Short J. E., Weaver R. J. 1995. Endogenous levels of insect juvenile hormones in larval, pupal and adult stages of the tomato moth, *Lacanobia oleracea*. *J. Insect Physiol.* 41: 641–651.

Fan Y., Rafaeli A., Gileadi C., Kubli E., Applebaum S. W. 1999. *Drosophila melanogaster* sex peptide stimulates juvenile hormone synthesis and depresses sex pheromone production in *Helicoverpa armigera*. *J. Insect Physiol.* 45: 127–133.

Fedorka K. M., Zuk M., Mousseau T. A. 2004. Immune suppression and the cost of reproduction in the ground cricket *Allonemobius socius*. *Evolution* 58: 2478-2485.

Flatt T. & Kawecki T. J. 2004. Pleiotropic effects of *methoprene-tolerant* (Met), a gene involved in juvenile hormone metabolism, on life history traits in *Drosophila melanogaster*. *Genetica* 122: 141–160.

Flatt T., Tu M - P., Tatar M. 2005. Hormonal pleiotropy and the juvenile hormone regulation of *Drosophila* development and life history. *BioEssays* 27: 987-1010.

Flatt T. & Kawecki T. J. 2007. Juvenile hormone as a regulator of the trade-off between reproduction and life span in *Drosophila melnogaster*. *Evolution* 61: 1980–1991.

Flatt T., Min K. J., D'Alterio C., Villa - Cuesta E., Cumbers. J., Lehmann R., Jones D. L., Tatar M. 2008. *Drosophila* germ-line modulation of insulin signaling and lifespan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 6368–6373.

Flatt T. & Schmidt P. S. 2009. Integrating evolutionary and molecular genetics of aging. *Biochim. Biophys. Acta* 1790: 951–962.

Fowler K. & Partridge L. 1989. A cost of mating in female fruitflies. *Nature* 338: 760-761.

Franssens V., Smagghe G., Simonet G., Claeys I., Breugelmans B., De Loof A., Broeck J. V. 2006. 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone regulate the laminarin-induced nodulation reaction in larvae of the flesh fly, *Neobellieria bullata*. *Dev. Comp. Immunol.* 30: 735-740.

Gade G., Hoffmann K. H., Spring J. H. 1997. Hormonal regulation in insects: facts, gaps, and future directions. *Physiol Rev*. 77: 963–1032.

Gems D., Sutton A. J., Sundermeyer M. L., Albert P. S., King K. V., Edgley M. L., Larsen P. L., Riddle D. L. 1998. Two pleiotropic classes of *daf-2* mutation affect larval arrest, adult behavior, reproduction and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 150: 129-155.

Giannakou M. E., Goss M., Junger M. A., Hafen E., Leevers S. J., Partridge L. 2004. Long-lived *Drosophila* with overexpressed dFOXO in adult fat body. *Science* 305: 361.

Gilg M. R. & Kruse K. C. 2002. Reproduction decreases life span in the giant waterbug (*Belostoma flumineum*). *Am. Midl. Nat.* 149: 306-319.

Gillespie J. P., Kanost M. R., Trenczek T. 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annu Rev Entomol*. 42: 611–43.

Gillott C. 2003. Male accessory gland secretions: modulators of female reproductive physiology and behavior. *Ann. Rev. Entomol.* 48: 163–184.

Greeff M. & Schmid-Hempel P. 2008. Sperm reduces female longevity and increases melanization of the spermatheca in the bumblebee *Bombus terrestris* L. *Insect. Soc.* 55: 313-319.

Grimnes K. A., Bricker C. S., Happ G. M. 1986. A monoclonal antibody against an epitope in both the spermatophore and cuticle of *Tenebrio molitor. J. Cell Biochem*. 10C: 78 pp.

Gupta A. P. 2001. Immunology of invertebrates: Humoral. Encyclopedia of life sciences, John Wiley and Sons. Ltd., New York

Gwynn D. M., Callaghan A., Gorham J., Walters K. F. A., Fellowes M. D. E. 2005. Resistance is costly: trade-offs between immunity, fecundity and survival in the pea aphid. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 272: 1803-1808.

Harshman L. G. & Zera A. J. 2007. The cost of reproduction: the devil in the details. *Trends Ecol. Evol*. 22: 80–86.

Hartfelder K. 2000. Insect juvenile hormone: from ‘‘status quo’’ to high society. *Bra. J Med. Biol. Res.* 33: 157–177.

Helfand S. L. & Rogina. B. 2003. From genes to aging in Drosophila. *Adv. Genet.* 49: 67-109.

Herman W. S. & Tatar M. 2001. Juvenile hormone regulation of aging in the migratory monarch butterfly. *Proc. R. Soc. Lond. B* 268: 2509–2514.

Hodková M. 1976. Nervous inhibition of corpora allata by photoperioid in *Pyrrhocoris apterus*. *Nature* 263: 521-523.

Hodková M. 2008. Tissue signaling pathways in the regulation of life-span and reproduction in females of the linden bug, *Pyrrhocoris aperus*. *J. Insect Physiol.* 54: 508-517.

Hung S. Y. & Boucias D. G. 1996. Phenoloxidase activity in hemolymph of naive and *Beauveria bassiana*-infected *Spodoptera exigua* larvae. *J. Invertebr. Pathol*.67: 35–40.

Hunt J., Simmons L. W., Kotiaho J. S. 2002. A cost of maternal care in the dung beetle *Onthophagus taurus*? *J. Evol. Biol*. 15: 57–64.

Ikeya T., Galic M.,Belawat P., Nairz K., Hafen E. 2002. Nutrient-dependent expression of insulin-like peptides from neuroendocrine cells in the CNS contributes to growth regulation in *Drosophila. Curr. Biol.* 12: 1293–1300.

Jacot A., Schuber H., Brinkof M. W. G. 2004. Costs of an induced immune response on sexual display and longevity in the field crickets. *Evolution* 58: 2280-2286.

Johnson T. E., Tedesco P. M., Lithgow G. J. 1993. Comparing mutants, selective breeding, and trasgenics in the dissection of aging processes of *Caenorhabditis elegans*. *Genetica* 91: 65-77.

Kanost M. R. & Gorman M. J. 2008. Phenoloxidase in insect immunity. Pp. 69–96 in Beckage N. E., ed. Insect Immunology, Academic Press (Elsevier), San Diego, USA.

Kemp D. J. & Rutowski R. L. 2004. A survival cost to mating in a polyandrous butterfly, *Colias eurytheme*. *Oikos* 105: 65-70.

Kenyon C., Chang J., Gensch E., Rudner A., Tabtiang R. 1993. A *C. elegans* mutant lives twice as long as wild type. *Nature* 366: 461-464.

Kirkwood T. B. L. 1977. Evolution of ageing. *Nature* 270: 301-304.

Kirkwood T. B. & Rose M. R. 1991. Evolution of senescence: late survival sacrificed for reproduction. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 332: 15–24.

Kodrík D. 2000. Fyziologie hmyzu – učební texty. Biologická fakulta, Jihočeská univerzita v Českých budějovicích.

Kotiaho J. S. & Simmons L. W. 2003. Longevity cost of reproduction for males but no longevity cost of mating or courtship for females in the male-dimorphic dung beetle *Onthophagus binodis*. *J. Insect Physiol.* 49: 817–822.

Kubli E. 2003. Sex peptides: seminal peptides of the *Drosophila* male. *Cell. Mol. Life Sci.* 60: 1689–1704.

Kurtz J. & Sauer K. P. 1999. The immunocompetence handicap hypothesis: testing the genetic predictions. *Proc. R. Soc. Lon. B* 266: 2515–2522.

Law R. 1979. Optimal life histories under age-specific predation. *Am. Nat.* 113: 3-16.

Lawniczak M. K., Begun D. J. 2004. A genome-wide analysis of courting and mating responses in *Drosophila melanogaster* females. *Genome* 47: 900-910.

Lawniczak M. K. N., Barnes A. I., Linklater J. R., Boone J. M., Wigby S., Chapman T. 2007. Mating and immunity in invertebrates. *Trends Ecol. Evol.* 22: 48-55.

Leroi A. 2001. Molecular signals versus the Loi de Balancement.*Trends Ecol. Evol.* 16: 24–29.

Lessman C. A., Herman W. S., Schooley D. A., Tsai L. W., Bergot B. J., Baker F. C. 1989. Detection of juvenile hormone I, II, and III in adult monarch butterflies (*Danaus plexippus*). *Insect Biochem*. 19: 431–433.

Liu H. & Kubli E. 2003. Sex peptide is the molecular basis of the sperm effect *in Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 9929–9933.

Manning A. 1966. Corpus allatum and sexual receptivity in female *Drosophila melanogaster*. *Nature (Lond.)* 211: 1321-1322.

Martin O. Y. & Hosken D. J. 2003. Copulation reduces male but not female longevity in *Saltella sphondylli* (Diptera: Sepsidae). *J. Evol. Biol.* 17: 357-362.

McKean K. A & Nunney L. 2001. Increased sexual activity reduces male immune function in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 7904-7909.

McKean K. A & Nunney L. 2005. Bateman´s principle and immunity: phenotypically plastic reproductive strategies predict changes in immunological sex differences. *Evolution* 59: 1510-1517.

Moret Y. & Schmid - Hempel P. 2000. Survival for immunity: the price of immune system activation for bumblebee workers. *Science* 290: 1166–1168.

Moshitzky P., Fleischmann I., Chaimov N., Saudan P., Klauser S., Kubli E., Applebaum S. W. 1996. Sex - peptide activates juvenile hormone biosynthesis in the *Drosophila melanogaster* corpus allatum. *Arch. Insect. Biochem. Physiol*. 32: 363–374.

Mueller J. L., Page J. L., Wolfner M. F. 2007. An ectopic expression screen reveals *Drosophila* seminal fluid proteins´ protective and toxic effects. *Genetics* 175: 777-83**.**

Nappi A. J. 1974. The role of melanization in the immune reaction of larvae of *Drosophila algonquin* against *Pseudeucoila bochei*. *Parasitology* 66: 23-32.

Nappi A. J. & Christenses B. M. 2005. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: Applications to insect innate immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35: 443-459.

Nigam Y., Maudlin I., Welburn S., Ratcliffe N. A. 1997. Detection of phenoloxidase activity in the hemolymph of tsetse flies, refractory and susceptible to infection with *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *J. Invertebr. Pathol.* 69: 279–281.

Ottiger M., Soller M., Stocker R. F., Kubli E. 2000. Binding sites of *Drosophila melanogaster* sex peptide pheromones. *J. Neurobiol.* 44: 57–71.

Pathak J. P. N. 1983. Effect of endocrine glands on the unfixed total haemocyte counts of the bug *Halys dentata*. *J. Insect Physiol.* 29: 91- 94.

Park Y. I., Shu S., Ramaswamy S. B., Srinivasan A. 1998. Mating in *Heliothis virescens*: transfer of juvenile hormone during copulation by male to female and stimulation of biosynthesis of endogenous juvenile hormone. *Arch. Insect. Biochem. Physiol*. 38: 100–107.

Partridge L., Fowler K., Trevitt S., Sharp W. 1986. An examination of the effects of males on the survival and egg production rates of female *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 32: 925–929.

Partridge L. & Fowler K. 1990. Non-mating costs of exposure to males in female *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol* 36: 419–425.

Partridge L**.** & Gems D. 2001. The evolution of longevity. *Curr. Biol.* 12: 544-546.

Partridge L., Gems D., Withers D. J. 2005. Sex and death: What is the connection? *Cell* 120: 461-472.

Paskewitz S. M., Brown M. R., Collins F. H., Lea A. O. 1989. Ultrastructural-localization of phenoloxidase in the midgut of refractory *Anopheles gambiae* and association of the enzyme with encapsulated *Plasmodium cynomolgi*. *J. Parasitol.*75: 594–600.

Pener M. P. 1972. The corpus allatum in adult acridids: the inter-relation of its functions and possible correlations with the life cycle. Pp. 135– 147 in Hemming C. F. and Taylor T. H. C., eds. Proc. Int. Study Conf. Curr. Fut. Prob. Acridol. Centre for Overseas Pest Research, London, U. K.

Rafaeli A. & Bober R. 2005. The effect of the juvenile hormone analog, fenoxycarb on the PBAN-receptor and pheromone production in adults of the moth *Helicoverpa armigera*: an „aging" hormone in adult females? *J. Insect Physiol*. 51: 401-410.

Ragland S. S. & Sohal R. S. 1973. Mating behavior, physical activity, and aging in the housefly, *Musca domestica*. *Exp. Geront*. 8: 135–145.

Ramaswamy S. B., Shu S., Mbata G. N., Rachinsky A., Park Y. I., Crigler L., Donald S., Srinivasan A. 2000. Role of juvenile hormone-esterase in mating-stimulated egg development in the moth *Heliothis virescens*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30: 785–791.

Rankin S. M., Chamber J., Edwards J. P. 1997. Juvenile hormone in earwigs: roles in oogenesis, mating and maternal behaviors. *Arch.Insect Biochem. Physiol*. 35: 427–442.

Rantala M. J., Vainikka A., Kortet R. 2003. The role of juvenile hormone in immune function and pheromone production trade-offs: a test of the immunocompetence handicap principle. *Proc. R. Soc. Lond. B, Biol. Sci.* 270: 2257-2261.

Ravi Ram K. & Ramesh S. R. 2003. Male accessory gland proteins in *Drosophila*: a multifaceted field. *Indian. J. Exp. Biol.* 41: 1372–83.

Reznick D. 1985. Costs of reproduction — an evaluation of the empirical evidence. *Oikos* 44: 257–267.

Ringo J., Werczberger R., Altaratz M., Segal D. 1991. Female sexual receptivity is defective in juvenile-hormone deficient mutants of the *apterous* gene of *Drosophila melanogaster*. *Behav. Genet.* 21: 453-469.

Rose M. R. 1991. Evolutionary Biology of Aging, Oxford University Press, New York.

Roff D. A. 1992. The evolution of life histories: Theory and analysis. Chapman& Hall. New York.

Rolff J. & Siva-Jothy M. T. 2002. Copulation corrupts immunity: A mechanism for a cost of mating in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 9916-1999.

Rolff J. & Siva-Jothy M. T. 2003. Invertebrate ecological immunology. *Science* 301: 472-475.

Rönn J., Katvala M., Arnqvist G. 2005. The costs of mating and egg production in *Callosobruchus* seed beatles. *Anim. Beh.* 72: 335-342.

Russell S. J. & Kahn C. R. 2007. Endocrine regulation of aging. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 681–691.

Schmidt O.,Theopold U., Strand M. 2001. Innate immunity and its evasion and suppression by *hymenopteran* endoparasitoids. *BioEssays* 23: 344–51.

Schwarzenbach G. A., Hosken D. J., Ward P. I. 2005. Sex and immunity in the yellow dung fly *Scathophaga stercoraria*. *J. Evol. Biol.* 18: 455–463.

Schwarzenbach G. A. & Ward P. I. 2006. Responses to selection on phenoloxidase activity in yellow dung flies. *Evolution* 60: 1612–1621.

Sgró C. M. & Partridge L. 1999. A delayed wave of death from reproduction in *Drosophila*. *Science* 286: 2521-2524.

Shiao S. H., Higgs S., Adelman Z., Christensens B. M., Liu S. H., Chen C. C. 2001. Effect of prophenoloxidase expression knockout on the melanization of microfilariae in the mosquito *Armigeres subalbatus*. *Insect Mol. Biol.* 10: 315-321.

Shoemaker K. L., Parsons N. M., Adamo S. A. 2006. Mating enhances parasite resistance in the cricket *Gryllus texensis*. *Anim. Beh.* 71: 371-380.

Siva-Jothy M. T., Tsubaki Y., Hooper R. E. 1998. Decreased immune response as a proximate cost of copulation and oviposition in a damselfly. *Physiol. Entomol.* 23: 274-277.

Sláma K. 1964. Hormonal control of respiratory metabolism during growth, reproduction, and diapause in male adults *Pyrrhocoris apterus* L (Hemiptera). *Biol. Bull.* 127: 499-510.

Socha R., Šula J., Kodrík D. 2001. Sexual activity in macropterous and brachypterous males of a flightless bug, *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera). *Eur. J. Entomol.* 98: 19-24.

Socha R., Šula J., Kodrík D. 2004. Wing morph-related differences in developmental pattern of accessory gland proteins in adult male of *Pyrrhocoris apterus* (L.) and their endocrine control. *J. Insect Physiol.* 50: 893-901.

Sohal R. S. & Buchan P. B. 1981. Relationship between physical activity nad lifespan in the adult housefly, *Musca domestica. Exp. Gerontol*. 16: 157-162.

Soller M., Bownes M., Kubli E. 1999. Control of oocyte maturation in sexually mature *Drosophila* female*s*. *Dev. Biol.* 208: 337–51.

Soller M., Haussmann I. U., Hollmann M., Choffat Y., White K., Kubli E., Schäfer M. A. 2006. Sex-peptide regulated female sexual behavior requires a subset of ascending ventral nerve cord neurons. *Curr. Biol.* 16: 1771–1782.

Söderhäll K. & Cerenius L. 1998. Role of prophenoloxidase activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol*. 10: 23–28.

Stearns, S. C. 1992. The evolution of life histories. Oxford Univ. Press, Oxford, U. K.

Strambi A., Strambi C., Cayre M. 1997. Hormonal control of reproduction and reproductive behaviour in crickets. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 35: 393–404.

Tatar M. & C. - M. Yin. 2001. Slow aging during insect reproductive diapause: why butterflies, grasshoppers and flies are like worms. *Exp. Geront.* 36: 723–738.

Tatar M., Kopelman A., Epstein D., Tu M - P., Yin C - M., Garofalo R. S. 2001b. A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extendsl ifespan and impairs neuroendocrine function. *Science* 292: 107–110.

Tatar M., Chien S. A., Kiefer Priest N. 2001c. Negligible senescence during reproductive dormancy in *Drosophila melanogaster*. *Am. Nat.* 158: 248–258.

Tatar M., Bartke A., Antebi A. 2003. The endocrine regulation of aging by insulin like signals. *Science* 299: 1346–1351.

Taylor R. L. 1969. A suggested role for the polyphenol – phenoloxidase system in invertebrate immunity. *J. Invertebr. Pathol.* 14: 427-428.

Toivonen J. M. & Partridge. 2009. Endocrine regulation of aging and reproduction in *Drosophila*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 299: 39-50.

Troen B. R. 2003. The biology of aging. *Mt. Sinai J. Med.* 70: 3–22.

Tu M. - P., Flatt T., Tatar M. 2006. Juvenile and steroid hormones in *Drosophila melanogaster* longevity. Pp. 415–448 in Masoro E. J. and Austad S. N.,eds. Handbook of the biology of aging,6th ed. Academic Press (Elsevier), San Diego, CA.

Ueyama M. & Fuyama Y. 2003. Enhanced cost of mating in female sterile mutants of *Drosophila melanogaster*. *Genes Genet. Syst.* 78: 29–36.

van Noordwijk A. J. & de Jong G. 1986. Acquisition and allocation of resources: their influence on variation in life history tactics. *Am. Nat.* 128: 137–142.

Venkatesh K., Crawford C. L., Roe R. M. 1988. Characterization and the developmental role of plasma juvenile hormone esterase in the adult cabbage looper *Trichoplusia ni*. *Insect Biochem*. 18: 53–61.

Webb T. J., Shu S., Ramaswamy S. B., Dorn S. 1999. The influence of juvenile hormone and mating on oogenesis and oviposition in *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae). *Arch. Insect. Biochem. Physiol*. 41: 186–200.

Webberley K. M., Hurst G. D. D., Husband R. W., Schulenburg J. H. G. V. D., Sloggett J. J., Isham V., Buszko J., Majerus M. E. N. 2004. Host reproduction and a sexually transmitted disease: causes and consequences of *Coccipolipus hippodamiae* distribution on coccinellid beatles. *J. Anim. Ecol.* 73: 1-10.

Weinert B. T. & Timiras P. S. 2003. Invited review: theories of aging. *J. Appl. Physiol.* 95: 1706-1716.

Wigby S. & Chapman T. 2005. Sex peptide causes mating costs in female *Drosophila melanogaster*. *Curr. Biol.* 15: 316-321.

Wigby S., Domanitskaya E. V., Choffat Y., Kubli E., Chapman T. 2008. The effect of mating on immunity can be masked by experimental peircing in female *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 54: 414-420.

Williams G. C. 1966. Natural selection, the costs of reproduction, and a refinement of Lack's principle. *Am. Nat.* 100:687–690.

Wilson T. G., Landers M. H., Happ G. M. 1983. Precocene I and II inhibition of vitellogenic oocyte development in *Drosophila melanogaster*. *J.Insect. Physiol* . 29: 249–254.

Wilson T. G., DeMoor S., Lei S. 2003. Juvenile hormone involvement in *Drosophila melanogaster* male reproduction as suggested by the Methoprene-tolerant 27 phenotype. *Insect Biochem. Mol. Biol*. 33: 1167– 1175.

Wolfner M. F. 1997. Tokens of love: functions and regulation of *Drosophila* male accessory gland products. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27: 179–192.

Wolfner M. F. 2002. The gifts that keep on giving: physiological functions and evolutionary dynamics of male seminal proteins in *Drosophila*. *Heredity* 88: 85–93.

Yanagi S. & Miyatake T. 2003. Costs of matig and egg production in female *Callosobruchus chinesis*. *J. Insect Physiol.* 49: 823-827.

Zeng F., Shu S., Park Y. I., Ramaswamy S. B. 1997. Vitellogenin and egg production in the moth, *Heliothis virescens*. *Arch. Insect. Biochem. Physiol*. 34: 287–300.

Zera A. J. & Harshman L. G. 2001. Physiology of life history trade-offs in animals. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 32: 95–126.

Zera A. J. 2005. Intermediary metabolism and life history trade-offs: Lipid metabolism in lines of the wing-polymorphic cricket, *Gryllus firmus*, selected for flight capability vs. early age reproduction. *Integr. Comp. Biol.* 45: 511–524.

Zhao Z. & Zera A. J. 2002. Differential lipid biosynthesis underlies a trade-off between reproduction and flight capability in a wing-polymorphic cricket. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 16829–16834.