

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
České Budějovice 2010



FYZIOLOGICKÉ MECHANIZMY STÁRNUTÍ U SAMCŮ  
MODELOVÉHO HMYZU

Magisterská diplomová práce

Autor: Bc. Jan Provazník  
Vedoucí práce: doc. RNDr. Magdalena Hodková CSc.

Rok vypracování 2010

Provazník J., 2010 Fyziologické mechanismy stárnutí samců modelového hmyzu [Physiological mechanisms of aging in males of model insect species. Master Thesis, in Czech] - 38 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation: Trade-off between reproduction and longevity is a widely accepted fact, yet proximate mechanisms are scarcely understood. In this work I tested differences in lifespan between diapause and non-diapause males of a model insect, the linden bug *Pyrrhocoris apterus*. Also the role of juvenile hormone in regulation of longevity and immunity (measured by relative phenoloxidase activity) was assessed. In addition to that, I examined if juvenile hormone is the mediator of reduction in longevity induced by mating.

**FINANČNÍ PODPORA:**

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

**PROHLÁŠENÍ:**

Prohlašuji, že svoji magisterskou diplomovou práci jsem vypracoval 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 diplomové 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. dubna 2010

.....  
Jan Provazník

Poděkování: Chtěl bych poděkovat své školitelce doc. RNDr. Magdaleně Hodkové CSc. za podporu, vedení a cenné rady. Bc. Hance Vaněčkové za asistenci a přátelské prostředí. Paní Janě Mikešové za udržování chovů naživu. Panu RNDr. Ivovi Hodkovi CSc. za nezapomenutelné historky a příhody. Svě přítelkyni za lásku a porozumění a přátelům za rozveselení. Svým rodičům a dědovi za neutuchající podporu. Tuto práci bych chtěl věnovat Zdeňce Provazníkové.

# Obsah

1. Úvod .....	1
1.1. Stárnutí .....	1
1.1.1. Evoluční teorie stárnutí.....	1
1.2. Přežívání a reprodukce .....	2
1.2.1. Disposable soma teorie a cena za reprodukci .....	2
1.2.2. Cena za reprodukci u samců hmyzu .....	2
1.3. Hormonální řízení .....	3
1.3.1. Mozek .....	4
1.3.2. Juvenilní hormon .....	4
1.3.3. Juvenilní hormon a reprodukce .....	5
1.4. Diapauza .....	5
1.5. Imunita.....	6
1.5.1. Fenoloxidáza .....	6
2. Cíle práce .....	7
3. Metody a materiál .....	8
3.1. Pyrrhocoris apterus .....	8
3.2. Allatektomie .....	8
3.3. Zjišťování longevity.....	8
3.3.1. Porovnání diapauzních, allatektomovaných a nediapauzních samců .....	8
3.3.2. Porovnávání pářících se samců.....	9
3.4. Stanovení relativní aktivity fenoloxidázy (PO).....	9
3.4.1. Princip metody.....	9
3.4.2. Vzorky stanovení.....	10
3.5. Detekce vitellogeninu pomocí metody Western blot .....	12
3.5.1. SDS-PAGE .....	12
3.5.2. Western blot .....	12
4. Výsledky.....	14
4.1. Přežívání .....	14
4.1.1. Vliv diapauzy na longevitu samců.....	14
4.1.2. Vliv allatektomie na longevitu samců ve srovnání s diapauzou .....	15
4.1.3. Vliv intaktní vs. allatektomované samice na přežívání intaktních samců.....	16
4.1.4. Vliv intaktní samice na přežívání allatektomovaných samců .....	18
4.2. Porovnání aktivity fenoloxidázy.....	19

4.2.1 Vliv diapauzy a allatektomie .....	19
4.3. Variabilita aktivity PO .....	22
4.4. Prokazování vitellogeninu v proteinech hemolymfy .....	24
4.5. Vliv allatektomie na sexuální aktivitu .....	25
5. Diskuze.....	26
5.1. Vliv allatektomie na přežívání nediapauzních samců <i>P. apterus</i> .....	26
5.1.1. Hypotetické mechanismy zkracující život nediapauzních samců .....	26
5.2. Porovnání vlivu allatektomie a diapauzy na přežívání samců <i>P. apterus</i> .....	27
5.3. Vliv páření na longevitu .....	28
5.3.1. Vliv intaktní samice na přežívání allatektomovaného samce .....	28
5.3.2. Vliv intaktní vs. allatektomované samice na přežívání intaktních samců.....	29
5.4. Vliv diapauzy a páření na aktivitu fenoloxidázy.....	30
6. Závěry .....	31
7. Literatura .....	32

Abstract:

It has been generally accepted that the reproductive insect hormone - juvenile hormone (JH) is a key mediator in the trade-off between adult life span and reproduction. However, this view is mostly based on correlations between JH titres and longevity, which do not reveal causal relationships. In the present study, effects of JH on longevity of males of the linden bug *Pyrrhocoris apterus* were studied directly, by removing its source, the corpus allatum (CA). Several hypothesis were tested. (1) Life span extension by adult diapause is mediated by the absence of JH. (2) Life span reduction caused by mating is mediated by enhanced activity of the CA. (3) Down-regulation of phenoloxidase (PO) activity (a component of immune system) by enhanced JH is responsible for the mating cost. The results confirmed that the absence of JH prolongs life span, but also revealed that the lack of JH is not solely responsible for differential longevity of diapausing and reproducing males. Mating reduced life span of both intact and CA-ablated males, suggesting that JH does not mediate the effect of mating on life span. Mating, diapause or CA-ablation had only minor or non-significant effects on PO activity. Thus the results do not support hypotheses (2) and (3). The most striking and unexpected effect in this study was that males continuously exposed to CA-ablated females lived significantly longer than did males with intact females, although mating activity was even higher in the former. This is the first evidence for a role of female hormonal status on male life span in animals.

# 1. Úvod

## 1.1. Stárnutí

Stárnutí je fenomén univerzální napříč širokým spektrem živých organismů. Jednou z mnoha definic tohoto jevu je: „Úbytek fyziologické funkce, projevující se jako snížená schopnost přežívání a plodnosti se zvyšujícím se věkem“ (Flatt and Schmidt 2009). Jak je možné, že fenotyp jdoucí viditelně proti darwinovskému fitness je tak široce rozšířen u naprosté většiny organismů? Jedním z pokusů jak odpovědět na tuto otázku se stala postupně vytvářená evoluční teorie stárnutí.

### 1.1.1 Evoluční teorie stárnutí

Za jejím vznikem stojí J. B. S. Haldane, P. B. Medawar a G. C. Williams, kteří definovali tři základní prvky této teorie. Prvním z nich je fakt, že v prostředí plném predátorů, infekcí a nehod se „stáří“ dožije jen malá část jedinců. Druhým je poznání, že síla selekce se s věkem snižuje, neboť riziko smrti se nasčítává a šance na reprodukci v pozdním věku je tedy menší. Třetí prvek neoddělitelně souvisí s předchozím. Jestliže je selekce oslabena s postupujícím věkem, pak se kumulují škodlivě působící mutace, které se projeví až na sklonku života - většinou tedy již po reprodukci – a nic nebrání jejich šíření do další generace. Tento třetí bod je v literatuře mnohdy uváděn jako samostatná tzv. „mutace akumulující“ teorie (Medawar 1952; shrnuto ve Flatt and Schmidt 2009). Na tyto základy se postupně staví další upřesnění a nové poznatky. Williams roku 1957 rozšířil mutace akumulující teorii o myšlenku antagonistické pleiotropie - možné pozitivní selekce pleiotropních genů, tedy takových vloh, které v mládí jedince zvyšují fitness, avšak v pozdním věku fitness snižují. Pokud by výhody v raném věku převážily úbytek zdatnosti ve stáří, pak by se tyto mutace snadno v populaci udržely a měly by za následek vznik stárnutí (Williams 1957).

Pokud by byl druhý ze základních kamenů ET (tedy slabší selekce ve stáří) správný, pak by se měl prodloužit život, pokud umožníme kopulaci jen starším jedincům (tedy zesílíme selekci pro schopnost reprodukce ve stáří). Tento předpoklad byl několikrát nezávisle experimentálně potvrzen u *Drosophila melanogaster* již v osmdesátých letech (Rose 1984; Luckinbill et al. 1984). Pravdou však zůstává, že výsledky pozorované v kontrolovaných pokusech často nemusí odpovídat reálným populacím. Bohužel studií, které by popisovaly stárnutí přírodních populací, není mnoho. Reznick provedl pozorování *Poecillia reticulata*

(Živorodka duhová - Teleostei) a naznačuje, že vztahy mezi mortalitou způsobenou z vnějšku (predace, infekce aj.) a stárnutím jsou ve volné přírodě mnohem komplexnější než v umělém a často skoro ideálním prostředí laboratoře (Reznick et al. 2004).

Základní ET byla roku 1977 obohacena o nový úhel pohledu. Kirkwood navrhl hypotézu, která stárnutí vysvětluje pomocí trade-off vzniklého díky omezenosti zdrojů. Jedinec se tak musí „rozhodnout“ zdali investuje například do prodloužení života nebo raději do rozmnožování (Kirkwood 1977).

## **1.2. Přežívání a reprodukce**

### **1.2.1. Disposable soma teorie a cena za reprodukci**

Dle Kirkwooda odvádí investice do rozmnožování omezené zdroje z jiných částí metabolismu, kupříkladu ze somatické údržby (potažmo prodloužení života). Tato teorie se nazývá *disposable soma* podle toho, že somatické buňky jsou vnímány pouze jako dočasná schránka, sloužící k přenosu gamet do další generace (Kirkwood 1977). To, že má reprodukce vliv na longevitu jak samců, tak samic bylo u hmyzu mnohokrát prokázáno (Malick and Kidwell. 1966; Partridge and Farquhar 1981; Partridge et al. 1985; Partridge et al. 1986; Fowler and Partridge 1989; Chapman et al. 1995; Blažková 2008). Způsobů, kterými může páření ovlivňovat přežívání, je však jistě více. V tomto ohledu jsou mnohem prozkoumanější samice modelových organismů. Jednou z často zkoumaných cest kudy páření může zkracovat život je energeticky nákladná tvorba vajec. Pokusy na *Callosobruchus chinensis* (Zrnokazu čínském - Coleoptera) dokazují, že samice panenské žily déle než samice produkující vajíčka (Yanagi and Miyatake 2003). Jako další možné důvody snížení longevity samic se uvádí obtěžování samcem, samotná kopulace (fyzické zranění samčím penisem např. u *Sepsis cynipsea* – Diptera – Blanckenhorn et al. 2002), negativní vlivy spermatu samců potažmo proteinů přídatných žláz, ochrana potomků nebo kombinace všech těchto vlivů (Fowler & Partridge 1989; Roff 1992; Chapman et al. 1995; Kotiaho and Simmons 2003; Crudgington and Siva-Jothy 2000).

### **1.2.2. Cena za reprodukci u samců hmyzu**

Co se týče ceny za reprodukci u samců, tak toto pole zůstávalo dlouho dobu neprobádaným, neboť se tradičně věřilo, že samci do reprodukce dávají jen levné sperma (Simmons 2001). Tento pohled se však mění. Samci mnoha druhů poskytují samicím nutričně bohaté ejakuláty, u motýlů pak samice mohou takového ejakulátu využít na pokrytí

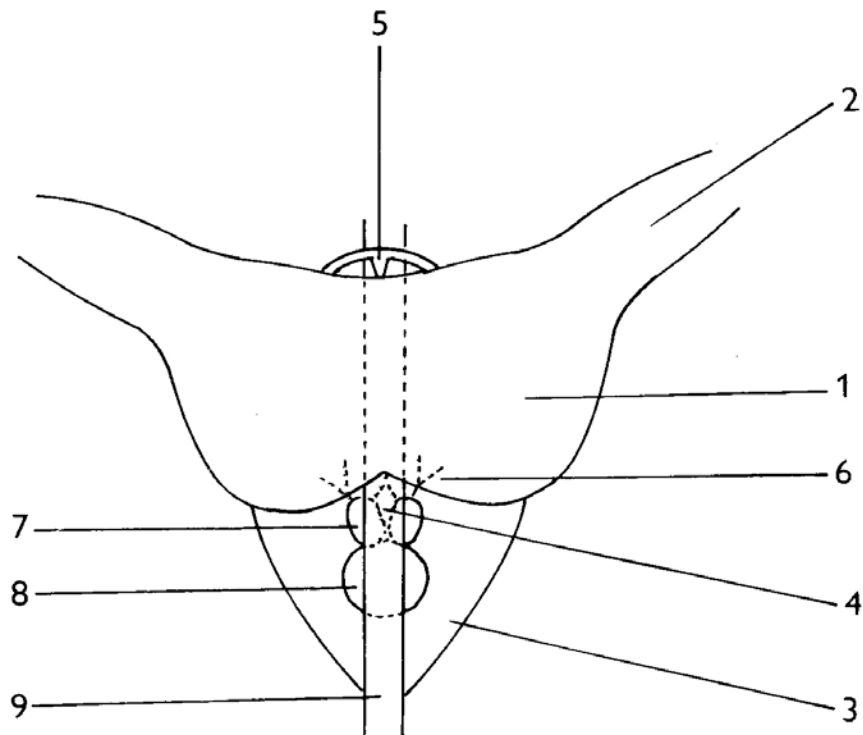


reprodukčních nebo somatických požadavků (Vahed 1998; Wedell and Cook 1999). I samotná tvorba spermatu zkracuje život *Caenorhabditis elegans* (Van Voorheis 1992). Potenciální složkou cen za reprodukci u samců jsou také náklady na prekopulační kompetici, otcovská péče a námluvní chování (Gems and Riddle 1996; Kotiaho and Simmons 2003; Pauku and Kotiaho 2005, Wagner et al. 2005). Dalšími diskutovanými kanály zkrácení života, souvisejícími s reprodukcí, by mohly být: samotná tvorba spermatu (Pauku et al. 2005) nebo pokles imunitní funkce (Rolff and Siva-Jothy 2002). U motýlů *Bicyclus anynana* a *Pieris napi* byl pokles longevity přímo úměrný velikosti spermatoforů. Omezení potravy vyvolalo úbytek suché hmoty ve spermatoforech a nárůst obsahu vody, což potvrzuje energetickou náročnost jejich tvorby (Ferkau and Fischer 2006). Rolff a Siva-Jothy ve své práci zkoumali vliv páření na imunitu u *Tenebrio molitor* a zjistili, že aktivita enzymu fenoloxidázy (PO) se při páření snižuje (více o PO a imunitě dále v podkapitole 1.5. Imunita), jedinec by tak mohl být náchylnější k infekci. Zároveň stejný tým popsal jako možný zprostředkující mechanismus snížení imunity účinky juvenilního hormonu (JH), který také indukuje zvýšenou sexuální aktivitu a aktivitu přídatných žláz (accessory glands – AGs) (Parthasarathy et al. 2009). Jedinec by tedy při doplňování proteinů v AGs (stimulovaným JH) zároveň snižoval schopnost své imunitní odpovědi. Pokud by tomu tak skutečně bylo, šlo by spíše o pleiotropní působení JH než o trade-off vzniklé omezeností energie nebo by JH působil jako proximální mechanismus případného trade-off (Rolff and Siva-Jothy 2002; Flatt et al. 2005; Tu et al. 2006).

### **1.3. Hormonální řízení**

Nyní je na místě zmínit alespoň ty základy hormonálního řízení u hmyzu, které se bezprostředně týkají této práce.

### 1.3.1. Mozek



**Obrázek 1** Schematický diagram neuroendokrinního komplexu *P. apterus*.  
1-protocerebrum; 2 -optické laloky; 3 -subesofageální ganglium; 4-hypocerebrální ganglium; 5- frontální ganglium; 6- nervi corporis cardiaci; 7- corpora cardiaca; 8 – corpus allatum; 9 – aorta. Převzato ze Socha & Hodková (1989)

Ústřední roli v hormonální soustavě hmyzu hraje mozek. Jeho součástí je tzv. retrocerebrální komplex zahrnující neurosekretorické buňky – monopolární neurony, které přímo produkují hormony ovlivňující efektorové tkáně nebo hormony ovlivňující jiné endokrinní žlázy. Dále pak zahrnuje corpora cardiaca – neurohemální orgán zajišťující distribuci neurohormonů do oběhu, který je nervy propojen s corpora allata (CA). CA jsou párovou endokrinní žlázou (u *P. apterus* srůstají do jedné žlázy), produkující skupinu sesquiterpenoidních hormonů zvaných juvenilní hormony (JH) (Kodrík 2000).

### 1.3.2. Juvenilní hormon

Juvenilní hormony jsou pravděpodobně hormony s největším spektrem funkcí ve hmyzí říši. Objeveny byly roku 1936 Wigglesworthem. Je známo nejméně 8 variant JH (0, I, II, III, JH3 bisepoxide[JHB3], 4-Methyl-JH, 8'-OH-JH III, 12'-OH-JH III), nejčastější je pak JHIII. Ovlivňují vývoj jedince, vývoj oocytů, metamorfózu, ekdyzi, syntézu vitellogenu, zbarvení, receptivitu samic, sexuální aktivitu a jak již bylo zmíněno, také proteiny přídatných žláz, imunitu a dozajista ještě mnoho jiných aspektů hmyzího života.(Wigglesworth 1936; Riddiford 1985; Ringo 1996; Kodrík 2000; Flatt 2005b; Flatt 2007).

V rámci zaměření mé práce je vhodné zdůraznit centrální úlohu JH v regulaci reprodukce diapauzy, a imunitního systému.

### **1.3.3. Juvenilní hormon a reprodukce**

Juvenilní hormon zasahuje do všech koutů reprodukce hmyzu (Bownes 1989; Nijhout 1994). U samic stimuluje vývoj oocytů a produkci vitellogeninu (Handler and Postlethwait 1977; Jowett and Postlethwait 1980). U obou pohlaví pak produkci přídatných žláz, které jsou pro samce velmi důležitým sekrečním orgánem. Jejich produkty jsou nutné k uchování spermatu a část jich přechází při kopulaci do samice, kde ovlivňují její chování (Whalen and Wilson 1986; Monsma et al. 1990; Bertram et al. 1996; Lung and Wolfner 1999; Kodrík 2000). JH se také účastní regulace feromonů (Kou et al. 2008; Picimbon 1995). Páření stimuluje produkci JH (Teal 2000; Rolff and Siva-Jothy 2002; což vedlo k hypotéze, že páření zkracuje život prostřednictvím JH. (Wigby and Chapman 2005)

## **1.4. Diapauza**

Diapauza je programované zastavení ontogeneze, spojené s fyziologickými změnami zajišťujícími přežití během nepříznivých podmínek. (Tatar 2001). U hmyzu jsou zaznamenány výskyty diapauzy ve všech vývojových stádiích. Diapauza dospělců je spojena s pozastavením reprodukčního snažení a s několikanásobným prodloužením života (Comfort 1956; Stoffolano 1976). Juvenilní hormon je jedním z regulátorů diapauzy, jeho snížený titr indukuje vstup do diapauzy (Saunders et al. 1990; Kodrík 2000). Během diapauzy je inhibována aktivita CA. U ♂ *P. apterus* bylo zjištěno, že za inhibici CA jsou během diapauzy zodpovědné neurosekreční buňky pars intercerebralis (Hodková 1976). U samic *P. apterus* se zjistilo, že samotná nepřítomnost JH nestačí na prodloužení života do stejné míry jako diapauza (Hodková 2008).

## 1.5. Imunita

U hmyzu rozlišujeme v zásadě dva hlavní typy imunitní odpovědi. Humorální, tedy látková imunita se sestává z látek přímo působících proti patogenu, tedy kupříkladu aglutininy, antimikrobiální peptidy, fenoloxidázová kaskáda, lysiny aj. Buněčná imunita je zprostředkována imunitními buňkami. Mezi reakce patřící do buněčné imunity patří fagocytóza, enkapsulace aj. (Turner 1994). Hranice mezi oběma typy imunity je velmi neostrá, neboť bývají často propojeny mezi sebou a látky hrající úlohu v buněčné imunitě mohou být samostatně považovány za součást humorální imunity. Jednou z takových látek je například fenoloxidáza (Kodrík 2000; Dobeš 2009)

### 1.5.1. Fenoloxidáza

Fenoloxidáza (PO) je enzym, který je součástí fenoloxidázové kaskády, ta je jednou z integrálních součástí imunity hmyzu. Jde o soustavu procesů, které konvertují tyrosinové prekurzory na chinony a dále pak na melanin. Role enzymu hrajícího roli v imunitě je jí připisována od roku 1969 (Taylor 1969). Jelikož při svém působení vytváří látky pro organismus škodlivé (stejně tak ale pro patogen) tak se PO v hemolymfě hmyzu vyskytuje ve formě profenoloxidázy. ProPO se aktivuje cizorodou částicí, v laboratorních experimentech se aktivuje na vzduchu nebo použitím methanolu. Tak je zaručeno, že nepoškozuje organismus hostitele v takové míře. Hlavním imunitním procesem, kterého se PO účastní je melanizace, která pomáhá odstavit patogen od přísunu živin (tedy ve výsledku „udušení“) po jeho enkapsulaci hemocyty (Taylor 1969) V poslední době se objevily práce, zkoumající regulaci aktivity PO pomocí juvenilního hormonu (Rolff and Siva-Jothy 2002; Rantala et al. 2003). Vzhledem k tomu, že JH ovlivňuje i sexuální aktivitu, tak by regulace imunity mohla spolu s reprodukcí tvořit fundamentální prvek trade-off mezi reprodukcí a longevitou. PO se zkoumá i kvůli svému vlivu na tvorbu pigmentů v kutikule hmyzu. Například u *Manduca sexta* (Lepidoptera) je melanizace kutikuly regulována taktéž juvenilním hormonem (Hiruma and Riddiford 1988; Wittkopp 2009). Pokud je mi známo, vliv diapauzy na aktivitu PO a ani na imunitu se nezkoumal.

## 2. Cíle práce

Z literatury vyplývají následující hypotézy:

Juvenilní hormon (JH) zprostředkuje trade-off mezi sexuální aktivitou a délkou života.

1. Nepřítomnost JH je příčinou prodloužení života diapauzních jedinců (Herman and Tatar 2001)
2. Zvýšená produkce JH je příčinou zkrácení života pářících se jedinců (Tu et al. 2006)
3. Páření a JH snižují imunitní funkce (Rolff and Siva-Jothy 2002)

Snížení imunitní funkce je jedním z proximálních mechanismů, kterým páření a JH zkracují život.

Experimentální důkazy pro tyto hypotézy jsou velmi omezené a jsou založeny buď na vlivu analogů JH (především insekticidu methoprenu; Flatt 2007) a nemusí odrážet fyziologické účinky JH, nebo na korelacích studovaného jevu s titry JH a biosyntetickou aktivitou corpus allatum (CA) in vitro, které neobjasňují příčinnou souvislost (Rankin et al. 1997; Strambi 1997).

V této práci jsem studoval vliv JH na délku života samců přímo, odstraněním zdroje JH, endokrinní žlázy CA. Měřítkem imunity pak byla jedna z nejdůležitějších složek imunitního systému hmyzu, aktivita fenoloxidázy (PO). Pokusy byly prováděny na samcích plošnice *Pyrrhocoris apterus* a byly řešeny následující otázky:

- Vliv diapauzy na délku života.
- Vliv odstranění CA (allatektomie) na délku života diapauzních a nediapauzních panenských samců. (Je prodloužení života diapauzních samců důsledkem nepřítomnosti JH?)
- Vliv páření na délku života allatektomovaných a intaktních samců. (Je kratší život pářících se samců důsledkem zvýšené aktivity CA?)
- Vliv páření na aktivitu PO. (Snižuje páření aktivitu PO?)
- Vliv diapauzy (nepřítomnosti JH) a allatektomie na aktivitu fenoloxidázy. (Snižuje JH aktivitu PO?)

## 3. Metody a materiál

### 3.1. *Pyrrhocoris apterus*

Jako modelový organismus byla použita *Pyrrhocoris apterus* (Ruměnice pospolná – Heteroptera) chovaná na Entomologickém ústavu AVČR. Samci ploštic byli udržováni ve dvou termostatech ( $26 \pm 1$  °C) s rozdílnou délkou dne a noci. Kategorie LD byla chována v 18 hodinách světla a 6 hodinách tmy. Kategorie SD pak ve 12 hodinách světla a 12 hodinách tmy – tato fotoperioda indukuje u *P. apterus* diapauzu (Hodek 1968, 1971, Hodek and Ipert 1983). Zásobní chovy probíhají v 0,5 l sklenicích překrytých sítkou, uvnitř je zásoba lipových semínek a zkumavka s vodou, překrytá buničitou vatou, spolu s poskládaným filtračním papírem pro zvětšení povrchu. Jedinci byli podle experimentu rozděleni do jednotlivých petriho misek ve kterých měli potravu (také lipová semínka), vodu ve skleněné zkumavce překryté buničitou vatou a složeným filtračním papírkem. Každých 14 dní byli jedinci přeneseni do nové misky s novou dávkou potravy, zásoba vody se měnila průběžně.

### 3.2. Allatektomie

Allatektomie, tedy excize žlázy corpus alatum, se prováděla po vodní narkóze, v Ringerově roztoku (7,5g NaCl; 0,1g KCl; 0,2g NaHCO<sub>3</sub>; 0,2g CaCl<sub>2</sub> do 1l ddH<sub>2</sub>O). CA byla odstraněna skrz incizi krční membrány. Operativní zákrok podstoupila čerstvě vylíhlá imaga, která byla 12 hodin po ekdysi odstavena od potravy a po dvou dnech operována. Allatektomi prováděla z důvodu větší zkušenosti a úspěšnosti doc. RNDr. Magdalena Hodková CSc. Moratlita po operaci byla menší než 10%. Souběžně s allatektomií byla prováděna falešná operace (Sham), kdy byli jedinci podrobeni stejné proceduře předcházející operaci, ale místo excize CA byli jen zraněni na krční membráně, takto připravení jedinci sloužili jako kontrolní skupina pro účinky zranění.

### 3.3. Zjišťování longevity

#### 3.3.1. Porovnání diapauzních, allatektomovaných a nediapauzních samců

Tento experiment byl postaven tak, abychom mohli zároveň porovnat vlivy diapauzy a allatektomie. Samci byli po jednom rozděleni do petriho misek a to v následujících skupinách:

- LD – nediapauzní kontrolní samci (intaktní) – N=29

- LD – Sham – nediapauzní falešně operovaná kontrola – N=32
- LD – CA - nediapauzní allatektomovaní samci - N=31
- SD – diapauzní kontrolní samci – N=30
- SD – Sham – diapauzní falešně operovaná kontrola – N=31
- SD – CA – diapauzní allatektomovaní samci – N=33

Jednotlivé petriho misky byly, podle skupin ve větších průhledných plastových miskách bez víka, uloženy do dvou termostatů ( $26 \pm 1$  °C). Jeden termostat udržoval diapauzní a druhý nediapauzní fotoperiodu (viz podkapitola 3.1.). Samci byli kontrolováni obden a byla zapisována data úmrtí. Vzniklý soubor dat byl analyzován programem GraphPad Prism 4, za použití statistické metody Logrank test (někdy též známý jako Mantel-Cox test; Mantel 1966).

### 3.3.2. Porovnávání pářících se samců

V tomto pokusu jsme srovnávali účinky páření a vlivu allatektomie na longevitu samců. Všechny páry byly chovány v nediapauzní fotoperiodě. Měli jsme následující skupiny:

- M+F – pár intaktní samec a intaktní samice
- M-CA+F – pár allatektomovaným samec a intaktní samice
- M+F-CA – pár intaktní samec a allatektomovaná samice

Jednotlivé petriho misky byly, podle skupin ve větších průhledných plastových miskách bez víka, uloženy do termostatu s nediapauzní fotoperiodou (LD) ( $26 \pm 1$  °C). Samci byli kontrolováni obden a byla zapisována data úmrtí. Pokud samice zemřela (málo časté, neboť samice žily déle v drtivé většině případů) byla nahrazena zásobní. Vzniklý soubor dat byl analyzován programem GraphPad Prism 4, za použití statistické metody Logrank test (Mantel 1966). Pokus S pářením M+F vs. M-CA+F se opakoval dvakrát. Pokus M+ F-CA vs. M+F vs. M se opakoval třikrát. Celkové počty viz podkapitola Výsledky 4.1.3. a 4.1.4.

## 3.4. Stanovení relativní aktivity fenoloxidázy (PO)

### 3.4.1. Princip metody

Na měření relativní aktivity fenoloxidázy jsem použil upravenou metodu podle článků Barnes & Siva-Jothy 2000; Rolff & Siva-Jothy 2002. Základem je katalytická funkce fenoloxidázy, která umožňuje zpracování substrátu L-DOPA (L-3,4-dihydroxyfenylalanin) až na melanin. Celá reakce je doprovázena postupným černáním vzorku, které se měřilo

spektrofotometrem (Molecular Devices SpectraMax 340) metoda je dobře popsána v Dobeš 2009.

### 3.4.2. Vzorky stanovení

kakodylátový pufr (0,01M Na-coc; 0,005 M CaCl<sub>2</sub>)

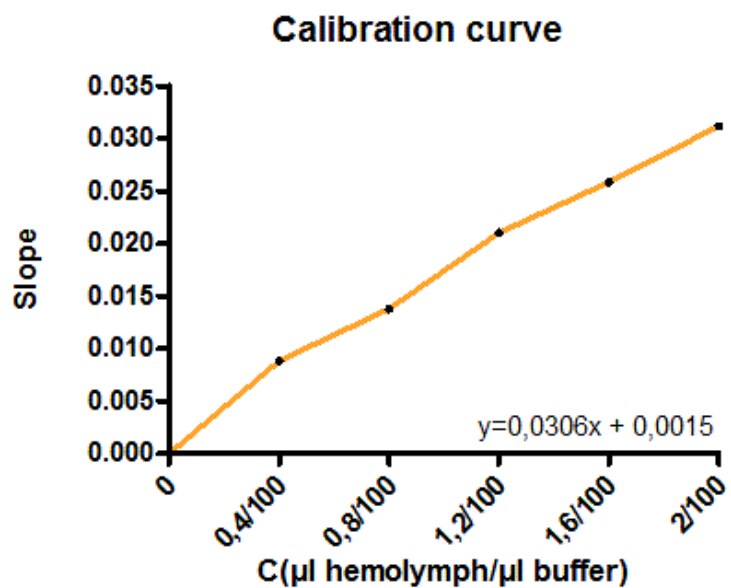
- L-Dopa (2,5 mM; 0,05 g/100 ml pufru); L-Dopa se předrozpuštěla ve 2 ml 50 mM HCl
- 5 µl hemolymfy

Odebíráno bylo 5 µl hemolymfy (skleněnou mikrokapilárou 5 µl; BIO-RAD) z následujících zvířat:

- LD samci věku 1 týden
- LD samci věku 2 týdny
- LD allatektomovaní samci věku 1 týden
- LD allatektomovaní samci věku 2 týdny
- SD samci věku 1 týden
- SD samci věku 2 týdny
- SD allatektomovaní samci věku 1 týden
- SD allatektomovaní samci věku 2 týdny
- LD samci, kteří byli v páru se samicí věku 1 týden
- LD samci, kteří byli v páru se samicí věku 2 týdny

Odebraná hemolymfa se v mikrozkuhavce ihned zmrazila pomocí suchého ledu, resp. předmražené hliníkové vložky z blokového termostatu (aby se zabránilo spontánnímu černání vzorku). Vzorky byly následně zmrazeny na -80 °C, aby došlo k rozpadu hemocytů a uvolnění zbytkové proPO. Ke vzorku se přidalo 330 µl chlazeného kakodylátového pufru (pH 6,8), který obsahoval 2,5 mM L-DOPA (pracovalo se na ledu). Vzorky byly promíchány (vortex) a centrifugovány (4 °C, 2800 G, 7 min). 250 µl supernatantu bylo nepipetováno na mikrotitrační destičku a následně byla měřena absorbance při 490 nm (při 30 °C) v minutových intervalech po dobu 30 minut. Z naměřených hodnot byl vytvořen graf závislosti absorbance na čase. Z tohoto grafu se pro další použití vybral interval hodnot, které lineárně stoupaly a byl vypočten sklon regresní přímky. Hodnota sklonu byla brána jako relativní hodnota aktivity PO díky kalibrační křivce (**Obr. 2**), která prokázala lineární závislost sklonu reg. přímky na koncentraci hemolymfy jednoho vzorku (tím tedy i na koncentraci PO ve vzorku).





**Obrázek 2** Graf závislosti sklonu regresní přímky na koncentraci hemolymfy (potažmo PO).  
Rovnice regresní přímky je zobrazena uvnitř grafu.

Sklony reg. přímek pro danou skupinu vzorků byly statisticky zpracovány v programu GraphPad Prism 4, metodou t-test (v případě srovnávání dvou skupin), jednocestnou analýzou variance (v případě srovnání více skupin) a Tukeyho post testem pokud ANOVA vycházela statisticky průkazná. U všech statistických metod byl použit konfidenční interval 95%.

### 3.5. Detekce vitellogeninu pomocí metody Western blot

Metoda Western blot, je založena na detekci proteinů, imobilizovaných na nitrocelulózové membráně, pomocí specifické protilátky. Této detekci předchází gelová elektroforéza (v mém případě SDS-PAGE), která separuje proteiny podle molekulové hmotnosti. Jako vzorek posloužila hemolymfa (2  $\mu$ l) odebraná z tykadla pomocí skleněné mikrokapiláry na jedno použití (5  $\mu$ l –BIO-RAD).

#### 3.5.1. SDS-PAGE

SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza byla použita na separaci hemolymfových proteinů podle molekulové hmotnosti.

- 25ml vzorkového redukujícího pufru (12,5 ml [0,125M/l TRIS-HCl pH6.8 + 0,1% SDS]+ 2,5 ml 10% glycerolu +5 ml 10% SDS+0,75 mg bromfenolové modři +3,75 ml ddH<sub>2</sub>O + 1,25 ml  $\beta$ -merkaptoetanolu)
- Ringerův roztok
- 2 $\mu$ l hemolymfy
- 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)

2  $\mu$ l hemolymfy bylo přidáno do 25  $\mu$ l vzorkového pufru, vzorky byly povařeny (100 °C / 10 min) a centrifugovány (20 °C; 10 000 G; 10 min) následně pak bylo na gel nanášeno 10  $\mu$ l supernatantu. Elektroforéza probíhala za konstantního napětí 100 V cca. 2 hodiny (kompletní aparatura vertikální elektroforézy od firmy BIO-RAD).

#### 3.5.2. Western blot

- nitrocelulózová membrána (0,2  $\mu$ m, BIO-RAD)
- Whatman 3MM 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)
- 2,5 g sušeného odtučněného mléka
- Primární protilátka proti nativnímu vitellogeninu *P. apterus* (Socha 1991)
- Sekundární protilátka G-anti-Rb HRP
- PBS-Tween (0,3% Tween 20 v PBS)
- Peroxidový a luminalový roztok (fa. Pierce)

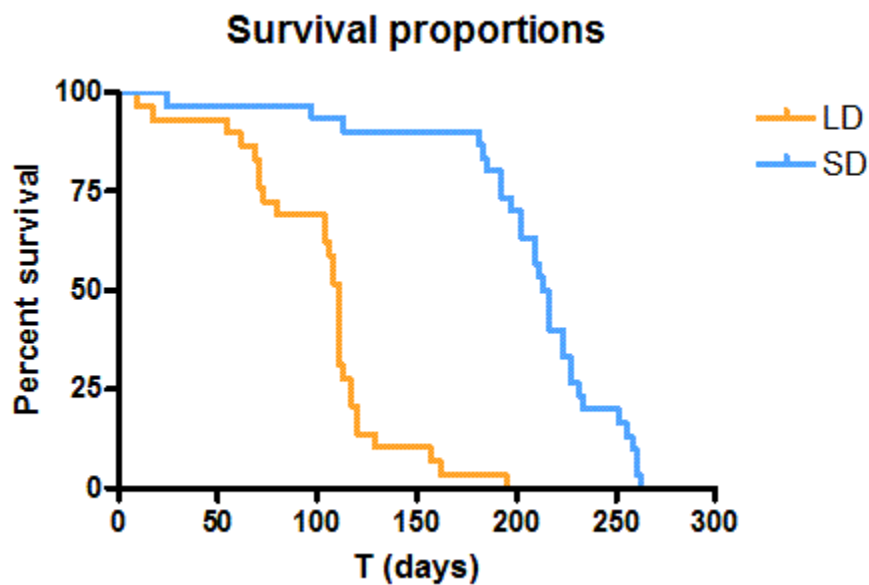
Vzorky rozdělené SDS-PAGE elektroforézou byly z gelu elektroforeticky přeneseny na nitrocelulózovou membránu, která je na sebe navázala. Přenos trval při konstantním nastavení proudu ( $\text{mA} = 2,5 \times \text{cm}^2$  gelu) 30 min. Membrána byla před vlastní sondou předpůsobena kompetitorem na nescifické vazby (5% roztok sušeného mléka- 2,5 g/50 ml PBS-Tween) 1h na třepačce za pokojové teploty. Následně proběhla inkubace s primární protilátkou (1:50 000 v PBS-Tween; přes noc na třepačce ve 4 °C). Druhý den byla membrána 6 krát 10 minut promývána v PBS-Tween a inkubována se sekundární protilátkou (1:20 000 v PBS-Tween; 1 h), znovu omývána 6 krát 10 minut v PBS-Tween a pak obarvena (5 minut / pokojová teplota) peroxidovým a luminolovým roztokem (poměr 1:1; 0,125 ml/cm<sup>2</sup> plochy membrány). Vzniklé bandy byly foceny CCD kamerou a softwarem Las 3000.

## 4. Výsledky

Pro usnadnění orientace v grafech jsem se, tam kde to bylo možné, snažil dodržet ucelené barevné schéma, kde modrá barva náleží samcům diapauzním (SD) a oranžová barva samcům nediapauzním (LD), v případě párů byla použita barva červená.

### 4.1. Přežívání

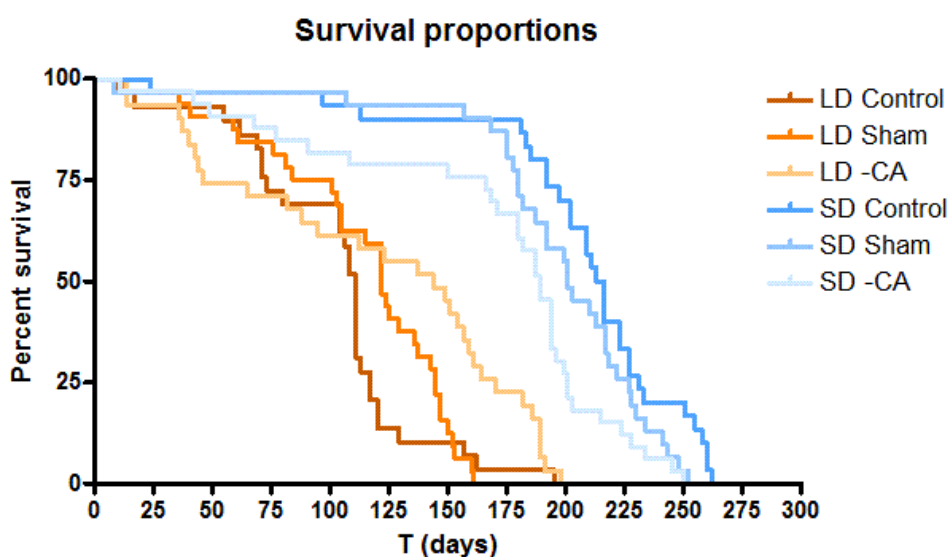
#### 4.1.1. Vliv diapauzy na longevitu samců



Obr. 3 Porovnání longevity samců nediapauzních (LD; N = 29; medián = 111,0) a samců v diapauze (SD; N= 30; medián = 214,5). Logrank test:  $P < 0,0001$

Diapauza má na přežívání samců nesporně obrovský vliv (nárůst mediánu přežívání o 93,2%). Tento výsledek nebyl až tak překvapivý neboť podobná situace je i u samic *P. apterus* (Hodková 1976).

#### 4.1.2. Vliv allatektomie na longevitu samců ve srovnání s diapauzou



**Obrázek 4 - Porovnání longevity samců.**

Porovnání longevity samců nediapauzních (LD) kontrolních (*LD Control* N=29; medián = 111); zraněné kontroly (*LD Sham* N= 32; medián = 122); a allatektomovaných (*LD -CA* N=31; medián = 144) se samci diapauzními (SD) kontrolními (*SD Control* N=30; medián = 214,5 ); zraněnou SD kontrolou (*SD Sham* N = 21; medián = 201) a allatektomovanými (*SD -CA* N = 33; medián = 189). Výsledky Logrank testu viz **Tabulka 1**

**Tabulka 1 - Výsledky Logrank testu mezi jednotlivými skupinami samců.**

Hodnota P Logrank testu. Hvězdičky znázorňují míru signifikance.

	<i>LD C</i>	<i>LD Sham</i>	<i>LD -CA</i>	<i>SD C</i>	<i>SD Sham</i>	<i>SD -CA</i>
<i>LD C</i>	x	0,231	0,0262 *	<0,0001 ***	<0,0001 ***	<0,0001 ***
<i>LD Sham</i>	0,231	x	0,0089 **	<0,0001 ***	<0,0001 ***	<0,0001 ***
<i>LD -CA</i>	0,0262 *	0,0089 **	x	<0,0001 ***	<0,0001 ***	<0,0001 ***
<i>SD C</i>	<0,0001 ***	<0,0001 ***	<0,0001 ***	x	0,0775	0,0008 ***
<i>SD Sham</i>	<0,0001 ***	<0,0001 ***	<0,0001 ***	0,0775	x	0,0866
<i>SD -CA</i>	<0,0001 ***	<0,0001 ***	<0,0001 ***	0,0008 ***	0,0866	x

*LD C* = nediapauzní samec (kontrola)

*LD Sham* = falešně operovaný nediapauzní samec

*LD -CA* = allatektomovaný nediapauzní samec

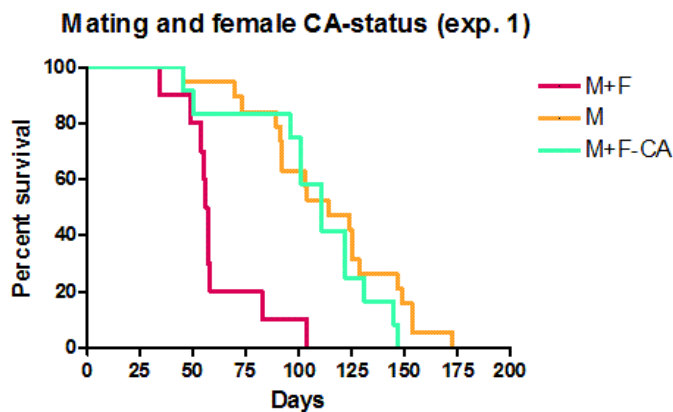
*SD C* = diapauzní samec (kontrola)

*SD Sham* = falešně operovaný diapauzní samec

*SD -CA* = allatektomovaný diapauzní samec

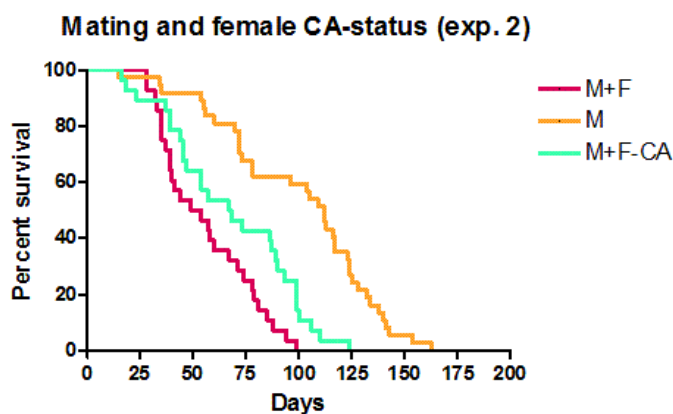
Z grafu na **Obr. 3** lze vyčíst, že allatektomie prodlužuje život samce (nárůst mediánu přežívání o 29,7%), sama operace však nestačí k prodloužení srovnatelnému s diapauzou. Falešná operace (kontrola k operovaným nediapauzním samcům, *LD Sham*) nezpůsobila statisticky signifikantní nárůst přežívání ( $P = 0,231$ ; dále viz **Tab 1.**). U diapauzních samců měla allatektomie opačný vliv a snížila longevitu (úbytek mediánu přežívání o 11,8%). Falešně operovaná kontrola (*SD Sham*) nevykazovala signifikantní změny od nedotčené kontrolní skupiny (*SD C*). V rámci celého pokusu je tedy vidět postupný gradient přežívání ve směru: (*LD C + LD Sham*) < *LD-CA* < *SD-CA* < *SD Sham + SD C*.

#### 4.1.3. Vliv intaktní vs. allatektomované samice na přežívání intaktních samců



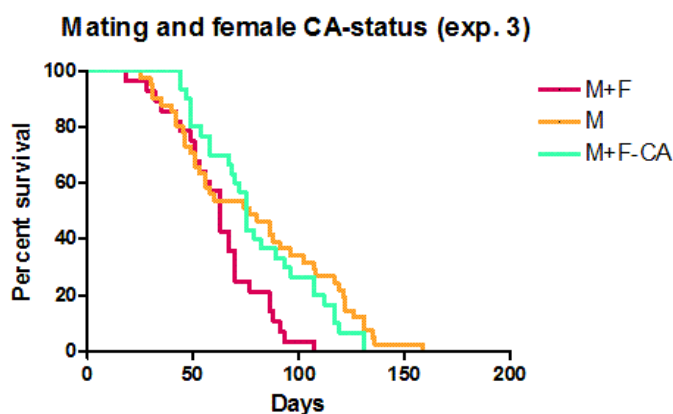
**Obrázek 5 - Přežívání samců v párech se samicemi; pokus první.**

M+F – kontrolní pár (N=10párů; medián= 56,5)  
M – izolovaní samci (N= 19; medián = 114)  
M+F-CA – pár samec a samice bez CA (N = 12; medián 111)  
P Longrank testu viz Tab. 2



**Obrázek 6 - Přežívání samců v párech se samicemi; pokus druhý.**

M+F – kontrolní pár (N=28 párů; medián= 51,5)  
M – izolovaní samci (N= 37; medián = 112)  
M+F-CA – pár samec a samice bez CA (N = 28; medián 67,5)  
P Longrank testu viz Tab. 2



**Obrázek 7 - Přežívání samců v párech se samicemi; pokus třetí.**

M+F – kontrolní pár (N=28párů; medián= 63)  
M – izolovaní samci (N= 41; medián = 77)  
M+F-CA – pár samec a samice bez CA (N = 30; medián 75)  
P Longrank testu viz Tab. 2

**Tabulka 2 – Výsledky Logrank testu přežívání samců se samicemi.**

Tabulka obsahuje výsledky Logrank testu pro všechna tři opakování pokusu s pářením samců a samic bez CA.

Kombinace skupin	P Logrank testu
<b>Pokus první (Obr. 3)</b>	
M+F vs. M+F-CA	0,0009 ***
M+F vs. M	<0,0001 ***
M vs. M+F-CA	0,3118 (ns)
<b>Pokus druhý (Obr. 4)</b>	
M+F vs. M+F-CA	0,0147 *
M+F vs. M	<0,0001 ***
M vs. M+F-CA	<0,0001 ***
<b>Pokus třetí (Obr. 5)</b>	
M+F vs. M+F-CA	0,0039 **
M+F vs. M	0,0082 **
M vs. M+F-CA	0,4833 (ns)

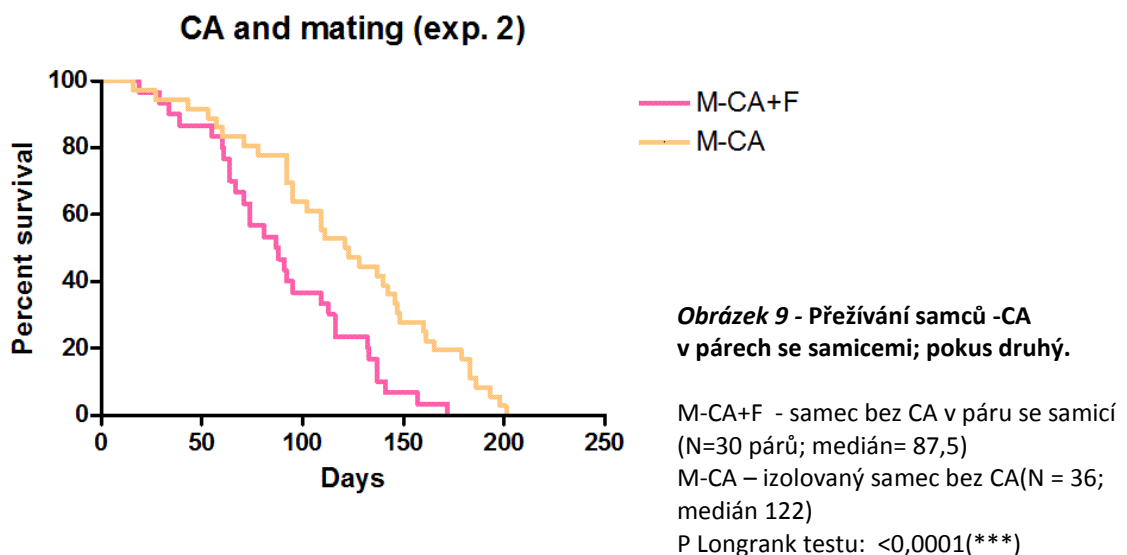
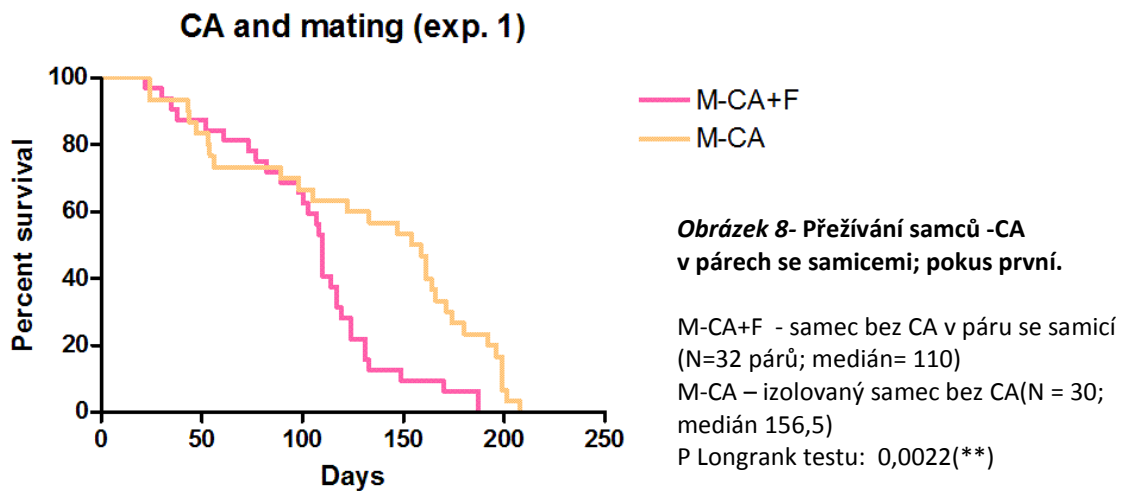
*M* = Izolovaný samec

*M+F* = Samec v páru se samicí

*M+F-CA* = Samec v páru s allatektomovanou samicí

Páření s neoperovanou samicí zkracuje život samců (**Obr. 5**, **Obr. 6** a **Obr. 7**) oproti izolovaným o 50,4%, respektive o 54% v druhém pokusu a o 18% v pokusu číslo tři (počítáno z mediánu). Při páření s allatektomovanou samicí však ke statisticky signifikantnímu zkrácení (oproti izolovaným samcům) nedojde, ve dvou ze tří pokusů (první a třetí pokus, viz **Tab. 2**). Při porovnání párů pak pozorujeme nárůst přežívání u párů M+F-CA oproti intaktním párům (M+F) o 94%, 31% a 19% (první respektive druhý a třetí pokus, počítáno z mediánu).

#### 4.1.4. Vliv intaktní samice na přežívání allatektomovaných samců

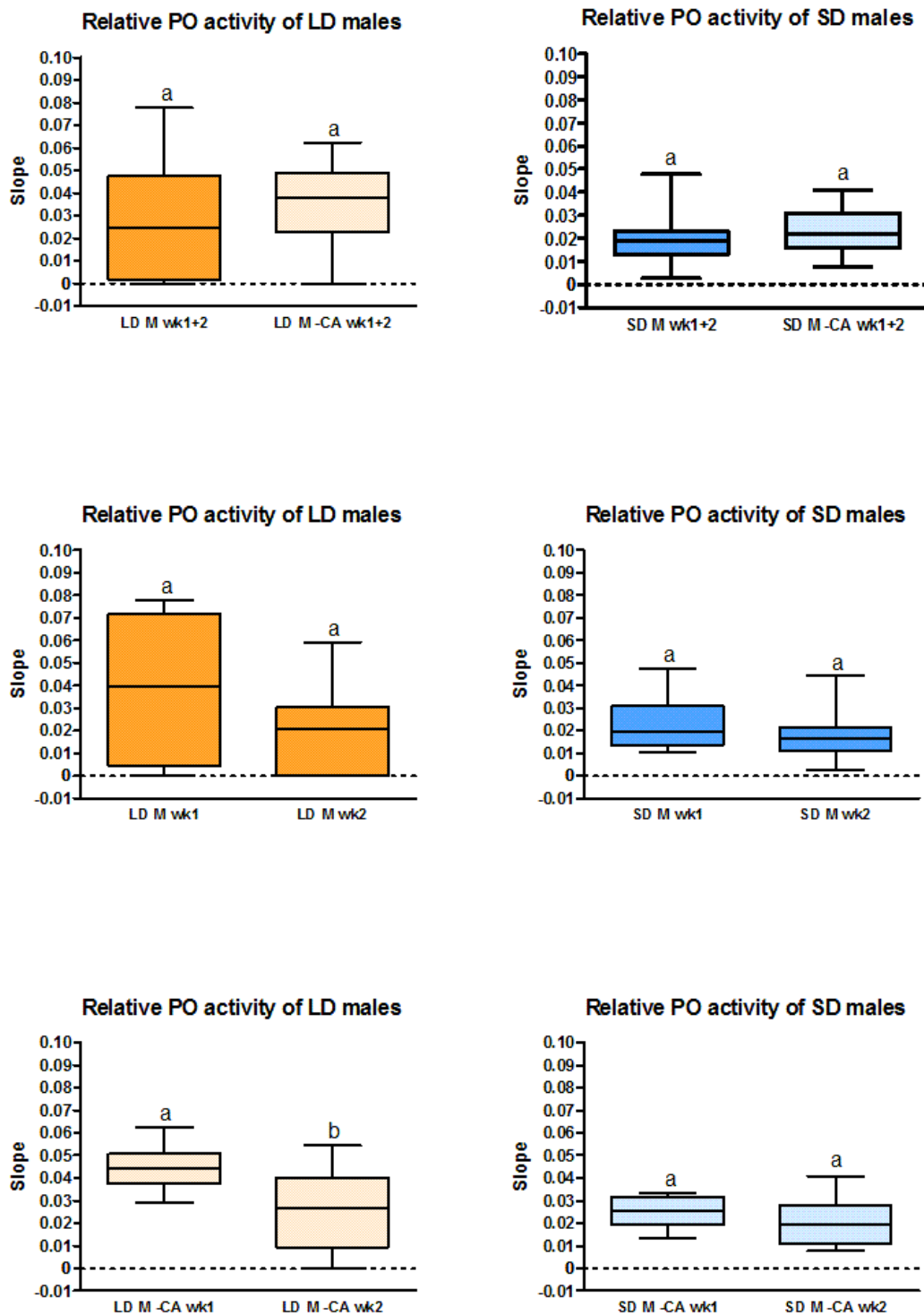


Pokusy s pářením allatektomovaných samců a intaktních samic poukazují na signifikantní rozdíl v přežívání, který nemůže být zprostředkován juvenilním hormonem. V pokusu jedna došlo o snížení délky přežívání o 29,7% a v pokusu dva o 28,2% (vypočteno z mediánu).



## 4.2. Porovnání aktivity fenoloxidázy

### 4.2.1 Vliv diapauzy a allatektomie



**Obrázek 10.** - Porovnání relativní aktivity PO u LD a SD samců.

Na ose y jsou vyneseny hodnoty regresního sklonu (tedy relativní aktivity PO). Krabička je dána 75. percentilem a 25. percentilem. Předěl znázorňuje medián, antény jsou rovny maximální, resp. minimální dosažené hodnotě. Písmena „a“ a „b“ jsou pak zobrazením signifikance T-testu pro daný pár porovnávaných dat. Hodnoty P T-testu viz **Tab. 3**  
*LD M* = Nediapauzní samec; *LD M -CA* = Nediapauzní allatektomovaný samec; *SD M* = Diapauzní samec; *SD M -CA* Diapauzní allatektomovaný samec; *wk1* = 1 týden staří samci; *wk2* = 2 týdny staří samci; *wk1+2* = data spojená z obou stáří

Porovnávání aktivity fenoloxidázy (PO) nepotvrdilo signifikantní rozdíly mezi diapauzními (*SD M*) a nediapauzním (*LD M*) samci (T-test spojených dat z jedno- a dvoutýdenních samců:  $P = 0,1516$ ). Pro značnou variabilitu vzorků (graficky znázorněno na **Obr. 13** a **Obr. 14**) nebyly signifikantní rozdíly mezi jednotýdenními a dvoutýdenními samci žádné z testovaných skupin s výjimkou allatektomovaných nediapauzních samců (*LD M-CA wk1 vs. wk2*;  $P = 0,0036$  – viz **Tab. 3**; graf viz **Obr. 9**).

**Tabulka 3 – Výsledky T-testu porovnávání rel. aktivity PO u LD a SD samců.**

LD M wk1+2 vs. LD M –CA wk1+2	0,2754 (ns)	SD M wk1+2 vs. SD M –CA wk1+2	0,3955 (ns)
LD M wk1 vs. wk2	0,0795 (ns)	SD M wk1 vs. wk2	0,1587 (ns)
LD M –CA wk1 vs. wk2	0,0036 **	SD M –CA wk1 vs. wk2	0,1862 (ns)

LD M = Nediapauzní samec

LD M –CA = Nediapauzní allatektomovaný samec

SD M = Diapauzní samec

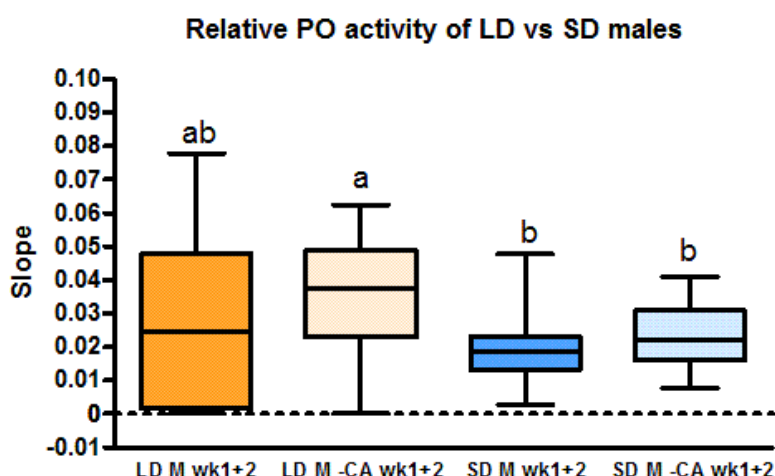
SD M –CA Diapauzní allatektomovaný samec

wk1 = 1 týden staří samci

wk2 = 2 týdny staří samci

wk1+2 = data spojena z obou stáří

Testování intaktní nediapauzní samci (*LD M*, **Obr. 10**; **Obr. 11**) byli značně variabilní (průměr  $0,02788 \pm 0,02677$  SD;  $N = 26$ ) a skupina LD M tedy nebyla statisticky významně odlišná od žádné jiné testované skupiny. Signifikantní rozdíl v aktivitě PO existuje mezi samci nediapauzním allatektomovanými (*LD M-CA*) a diapauzními intaktními (*SD M*) (Tukey:  $p < 0,01$ ) i mezi LD M –CA a SD M –CA (Tukey:  $p < 0,05$ ). viz **Obr. 11**.

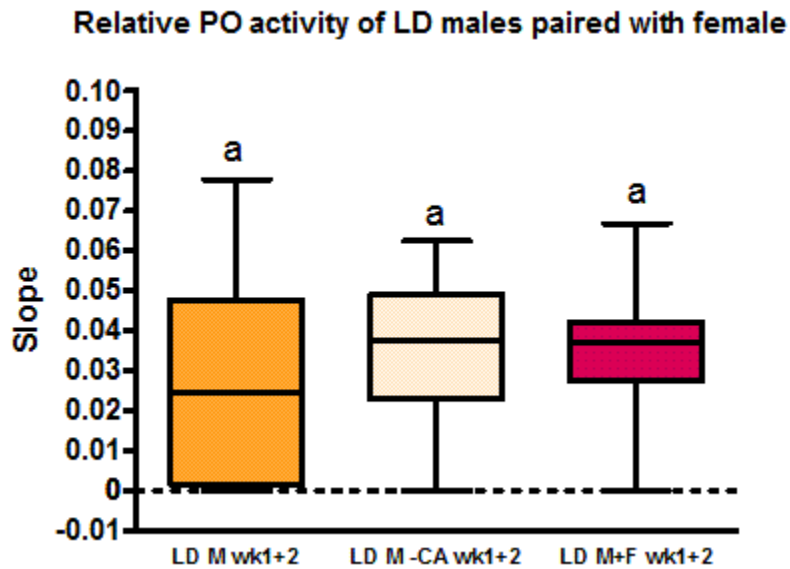


**Obrázek 11 - Porovnání relativní aktivity PO u LD M; LD-CA; SD; SD - CA samců.**

Na ose y jsou vyneseny hodnoty regresního sklonu (shodné s relativní aktivitou PO). Krabička je dána 75. percentilem a 25. percentilem. Předěl znázorňuje medián, antény jsou rovny maximální, resp. minimální dosažené hodnotě. Písmena „a“ a „b“ značí, že mezi skupinami byl signifikantní rozdíl:  $P = 0,0095$  (ANOVA). *LD M* = Nediapauzní intaktní samec; *LD M –CA* = Nediapauzní allatektomovaný samec; *SD M* = Diapauzní samec; *SD M –CA* = allatektomovaný diapauzní samec; data spojena ze samců starých jeden a dva týdny

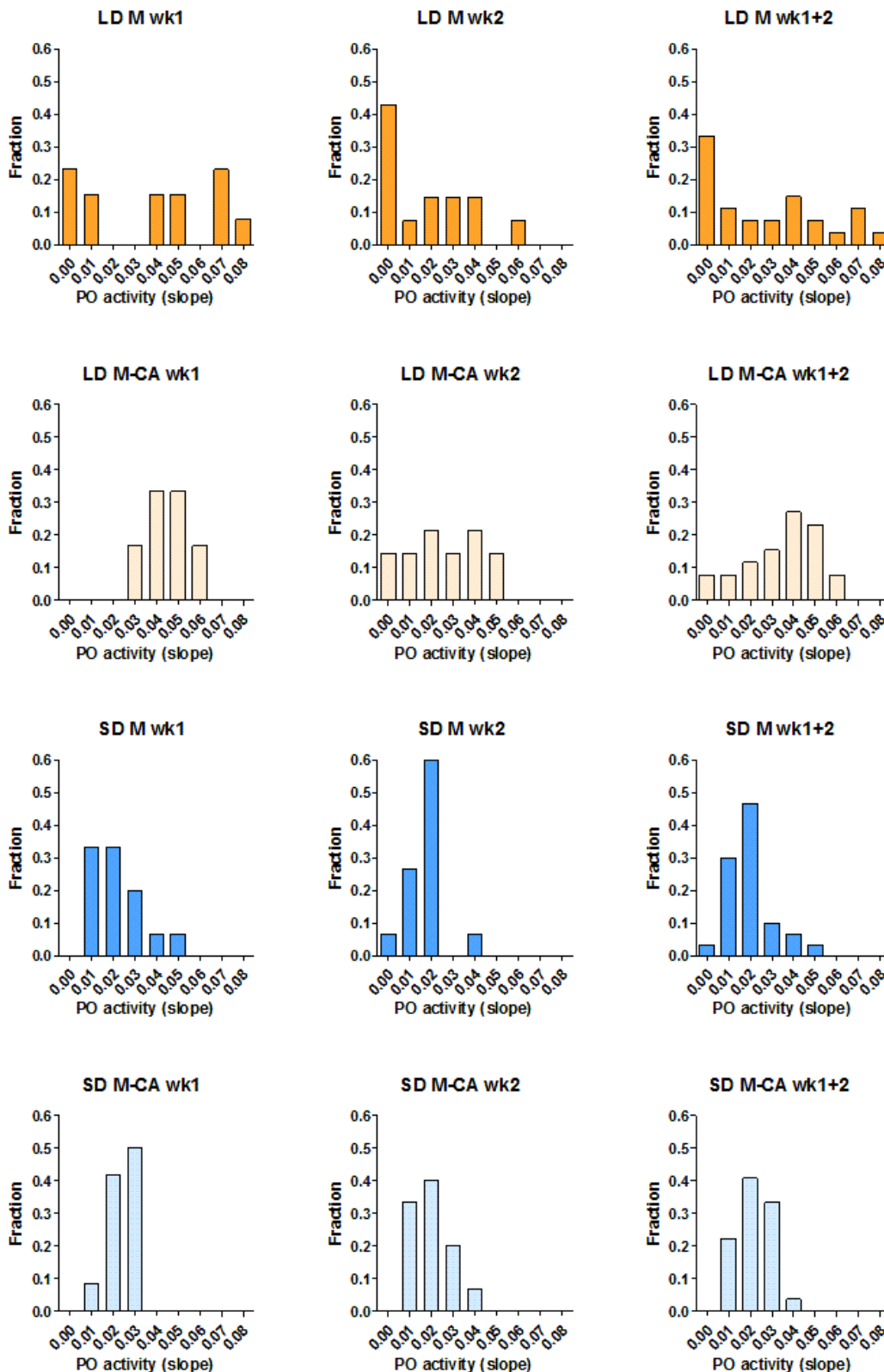
#### 4.2.2. Vliv páření na aktivitu PO

Srovnáním samců v páru se samicí (M+F), intaktních nediapauzních samců (LD M) a allatektomovaných nediapauzních samců (LD M –CA) nebyl prokázán signifikantní vliv páření na aktivitu PO (ANOVA= 0,3789 **Obr. 12**). Posun variability (směrem k vyšším hodnotám aktivity PO) je však u LD M –CA a M+F podobný (**Obr. 14**)



**Obr 12.** Porovnání relativní aktivity PO u LD samců, allatektomovaných LD samců a samců, kteří byli v páru se samičkou. Na ose y jsou vyneseny hodnoty regresního sklonu (shodné s relativní aktivitou PO). Krabička je dána 75. percentilem a 25. percentilem. Předěl znázorňuje medián, antény jsou rovny maximální, resp. minimální dosažené hodnotě. Písmeno „a“ značí, že mezi vzorky nebyl signifikantní rozdíl. ANOVA P = 0,3789; LD M+F = nediapauzním samec v páru se samicí (testování jen samci); LD M nediapauzním intaktní samci; LD M –CA = Nediapauzní allatektomovaný samec.

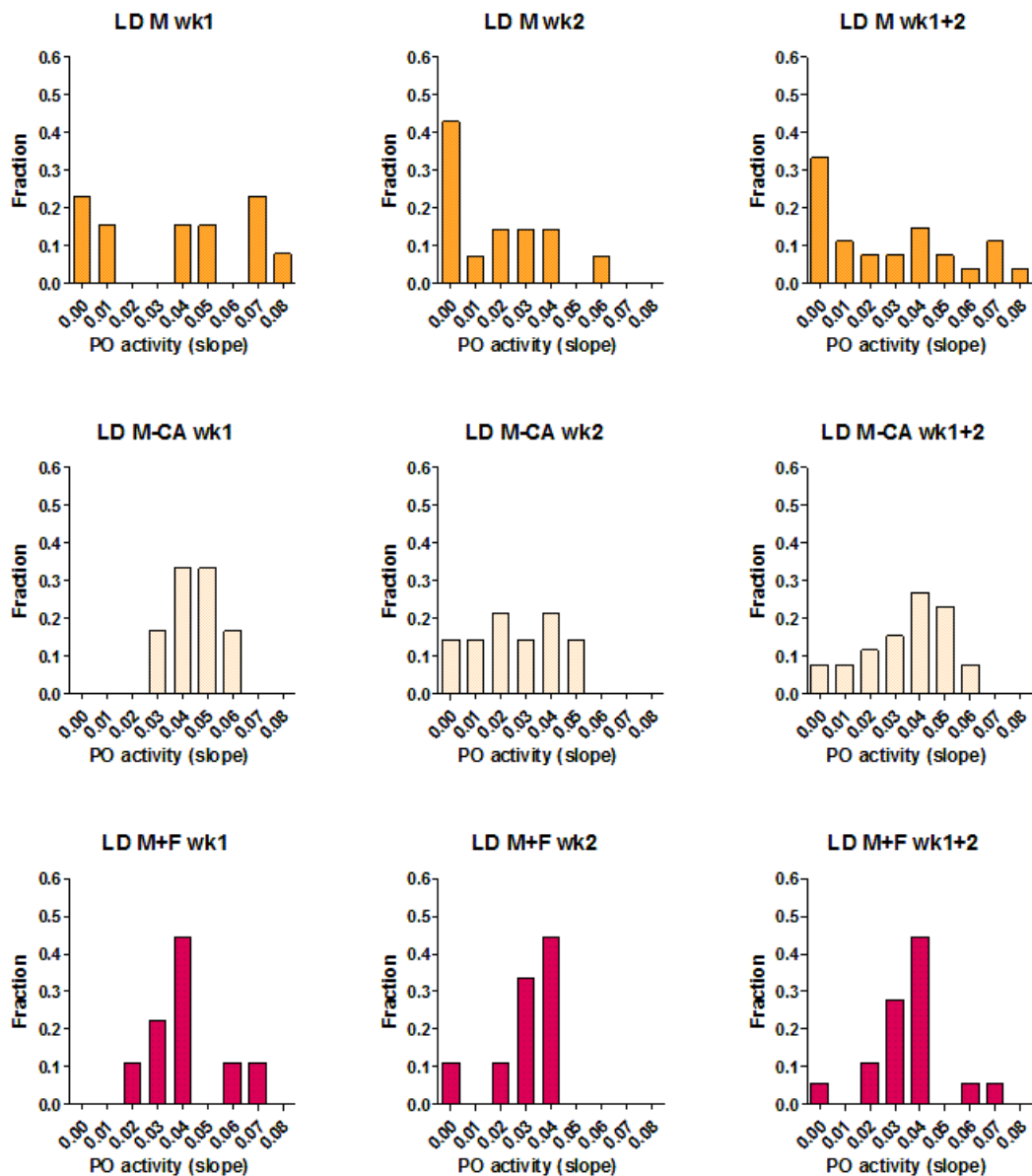
### 4.3. Variabilita aktivity PO



**Obrázek 13 - Histogramy distribuce strmosti regresních křivek PO u samců.**

Histogramy znázorňují podíl jedinců s hodnotou strmosti regrese spadající do dané kategorie. Kategorie jsou na ose x s krokem 0,01.

LD M = Nediapaunzní samec; LD -CA = Nediapaunzní allatektomovaný samec; SD M = Diapaunzní samec; SD M -CA = Diapaunzní allatektomovaný samec; wk1 = 1 týden staří samci; wk2 = 2 týdny staří samci; wk1+2 = data spojena z obou stáří



**Obrázek 14 - Histogramy distribuce strmosti regresních křivek PO u samců.**

Histogramy znázorňují podíl jedinců s hodnotou strmosti regrese spadající do dané kategorie.

Kategorie jsou na ose x s krokem 0,01.

LD M = Nediapauzní samec

LD M-CA = Nediapauzní allatektomovaný samec

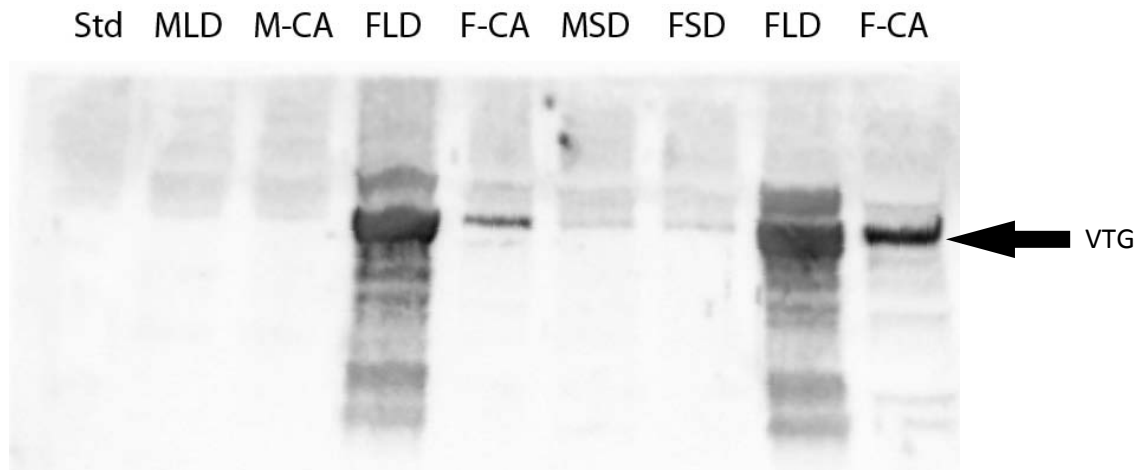
LD M+F = Diapauzní samec v páru se samicí (testován jen samec)

wk1 = 1 týden staří samci

wk2 = 2 týdny staří samci

wk1+2 = data spojena z obou stáří

#### 4.4. Prokazování vitellogeninu v proteinech hemolymfy



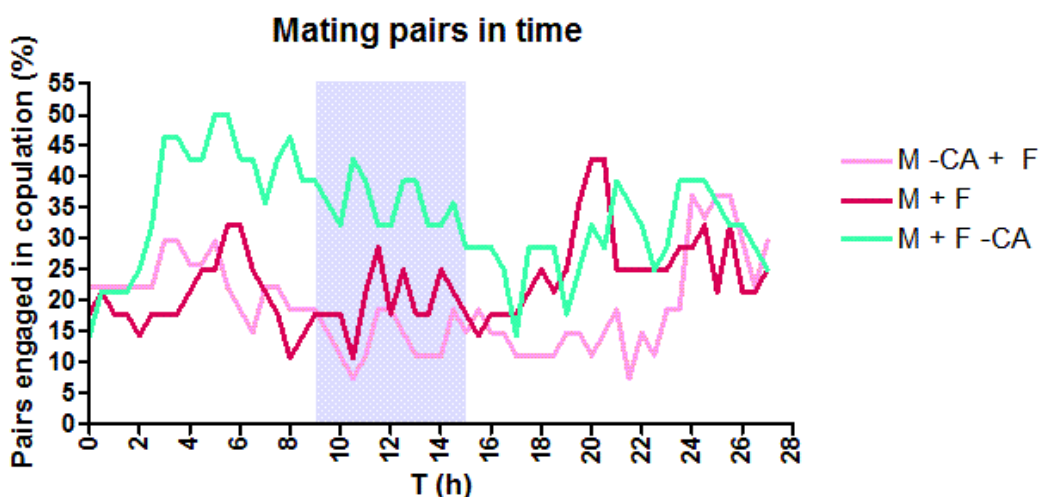
**Obrázek. 15** Western blot s protilátkou na vitellogenin.

Označení vzorků: Std = standard; MLD = nediapauzním samec; M-CA = allatektomovaný samec; FLD = nediapauzí samice; F-CA = allatektomovaná samice; MSD = diapauzní samec; FSD = diapauzní samice.

Šipka označuje band o velikosti cca. 150 kDa - vitellogenin

Western blot (**Obr. 15**) prokázal přítomnost vitellogeninu pouze u samic LD a ve velmi snížené míře i u samic allatektomovaných. U samců vitellogenin nebyl prokázán v žádné z testovaných skupin.

## 4.5. Vliv allatektomie na sexuální aktivitu



**Obrázek 16-** Graf procent pářících se párů v závislosti na čase.

M –CA +F = pár allatektomovaný samec a samice intaktní (N=19)

M + F = pár intaktní samec a intaktní samice (kontrola; N=20)

M + F -CA = pár intaktní samec a allatektomovaná samice (N=19)

Šedá část zobrazuje dobu, kdy se páry nacházely ve tmě.

**Tabulka 4 – Souhrn pozorování sexuální aktivity**

Skupina	Celkový počet párů	Počet kopulujících párů	Průměrný čas strávený kopulací (h ± SD)	Počet kopulací <sup>1)</sup>
M-CA + F <sup>2)</sup>	27	19	7,50 ± 4,830	49
M + F <sup>3)</sup>	28	20	8,65 ± 6,641	61
M + F-CA <sup>4)</sup>	28	19	13,58 ± 6,925	55

1) Počet pozorovaných kopulací na celou skupinu.

2) M –CA +F = pár allatektomovaný samec a samice intaktní

3) M + F = pár intaktní samec a intaktní samice

4) M + F -CA = pár intaktní samec a allatektomovaná samice

Porovnávání sexuální aktivity odhalilo, že páry intaktní samec a samice bez CA (M+F-CA) strávily signifikantně delší dobu pářením než páry samec a intaktní samice (M+F), T-test = 0,0292. Signifikantní rozdíl je taktéž mezi páry M+F-CA a páry allatektomovaný samec s intaktní samicí (M-CA+F), T-test = 0,0034. Rozdíl v párech M-CA+F a M+F není signifikantní (T-test = 0,5419) Rozdílnost křivky pro M+F-CA na grafu (**Obr. 16**) je dán delší dobou jednotlivých kopulací než větším počtem kopulujících párů.

## 5. Diskuze

### 5.1. Vliv allatektomie na přežívání nediapauzních samců *P. apterus*

#### Zjištění: Nepřítomnost JH prodlužuje život nediapauzním samcům

Odebráním CA se samcům chovaným v nediapauzní fotoperiodě (long-day) signifikantně prodloužil život (**Obr. 4**) stejně jako tomu bylo v dříve provedeném experimentu u samic *P. apterus* (Hodková 2008). Bezprostřední příčina zkrácení života působením JH však zůstává nejasná.

#### 5.1.1. Hypotetické mechanismy zkracující život nediapauzních samců

Uvádím několik možností z dostupné literatury, kterými by mohlo docházet ke krácení longevity nediapauzních samců s normální aktivitou JH. Tyto navržené možnosti pak hodnotím v rámci mého pozorování:

##### 5.1.1.1. Intenzita metabolismu / oxidační stres

Jedním z diskutovaných mechanismů by mohlo být ovlivnění metabolismu nebo resistance vůči oxidačnímu stresu. Spotřeba kyslíku (dobrý ukazatel intenzity metabolismu) však není u intaktních a allatektomovaných samců rozdílná (Sláma 1964). Mohlo by snad jít o vliv JH na resistenci vůči oxidačnímu stresu (její downregulace juvenilním hormonem), podobný tomu jaký byl naznačen v práci Tatar et al. 2001, kde reprodukčně dormantní *D. melanogaster* se sníženým titrem JH vykazovaly větší resistenci proti oxidačnímu stresu indukovanému herbicidem paraquat. (Tatar et al. 2001b; Flatt et al. 2005; Tu et al. 2005). Zatím neexistuje jasný důkaz, že oxidační poškození je hlavní příčinou stárnutí (Sohal 2002)

##### 5.1.1.2. Produkce proteinů přídatných žláz

Dalším mechanismem, který by mohl být potenciální faktor zkracující život skrze působení JH je produkce proteinů přídatných žláz (Acps). Stimulace přídatných žláz přes JH byla prokázána (Socha 2004; Socha 2006). Energetická náročnost produkce Acps, však pravděpodobně není vysoká, neboť nezvyšuje spotřebu kyslíku (viz. předchozí odstavec). Bylo by s podivem, kdyby produkce Acps byla energeticky náročnější než tvorba vajíček u samic, která vliv na délku života samic neměla. (Hodková 2008). Bez zajímavosti není ani to, že u *Caenorhabditis elegans* má málo náročná tvorba spermií na longevitu větší dopad než



tvorba vajíček (Van Voorheis 1992). U *P. apterus* je však tvorba spermatu nezávislá na JH – spermie se uvolňují i u diapauzních samců (Žďárek 1970), což vylučuje spermatogenezi jako zprostředkovatele vlivu juvenilního hormonu na longevitu.

### **5.1.1.3. Vliv tukového tělesa**

Zvýšená exprese transkripčního faktoru dFOXO v tukovém tělese prodlužuje život *D. melanogaster* (Giannakou and Partridge 2004; Hwangbo et al. 2004). Tento faktor je potlačen v přítomnosti insulinových peptidů (Barthel et al. 2005), které pravděpodobně stimulují produkci JH (Tatar et al. 2001, Tu et al. 2005). RNAi-*foxo* (umlčení exprese genu vlivem interferingRNA molekuly) má za následek potlačení reprodukce u komára *Culex pipiens* a tento efekt může být zvrácen aplikací JH (Sim a Denlinger 2008). Není vyloučeno, že JH zkracuje život tím, že potlačuje expresi FOXO v tukovém tělese, ale pro tuto hypotézu nejsou zatím žádné přímé důkazy. Je zajímavé, že DAF-16 u *C. elegans* (homolog dFOXO) potlačuje expresi genu pro vitellogenin a prodlužuje život. U *P. apterus*, podobně jako u mnoha jiných druhů, JH stimuluje syntézu vitellogeninu v tukovém tělese (Socha et al. 1991). Absence vitellogeninů však nemůže vysvětlit prodloužení života allatektomií u ♂ *P. apterus*, protože samci tento protein neprodukují, jak jsem potvrdil (**Obr. 15**), (Socha et al. 1991).

**Shrnutí: Zkrácení života LD samců allatektomií pravděpodobně není způsobeno: tvorbou spermatu, tvorbou proteinů přídatných žláz, jinou intenzitou metabolismu, ani tvorbou vitellogeninu.**

**Může být způsobeno sníženou odolností vůči oxidativnímu stresu nebo potlačením exprese FOXO.**

## **5.2. Porovnání vlivu allatektomie a diapauzy na přežívání samců *P. apterus***

**Zjištění: Diapauza prodlužuje život víc než nepřítomnost JH**

Pozorování potvrdila významný rozdíl v longevitě samců diapauzních (SD) a nediapauzních (LD) viz **Obr. 3**. Diapauzní jedinci žijí mnohem déle i u jiného druhu hmyzu, namátkou motýli, kobylky i *D. melanogaster* (Tatar 2001). Potlačení biosyntetické aktivity CA (a tím produkce JH) hraje klíčovou roli při indukci reprodukční diapauzy (Tobin et al. 2002). Z toho vychází předpoklad že JH je proximální příčinou dlouhého života diapauzních jedinců (Tatar et al. 2001, Flatt et al. 2005). Nebylo tedy velkým překvapením, když odstranění inaktivního CA u diapauzních samců nemělo téměř žádný vliv na délku života

**(Obr. 4)** Při porovnání délky života allatektomovaných samců v LD a SD zjistíme, že SD –CA samci žijí déle než LD –CA **(Obr. 4)**. Z tohoto zjištění můžeme vyvodit, že život LD samců zkracují i jiné faktory než jen samotná přítomnost juvenilního hormonu. Jaké faktory by to mohly být? Dřívější práce ukázaly, že diapauza potlačuje sexuální aktivitu samců, allatektomie však nikoliv (Žďárek 1968, Žďárek 1970) Stejný výsledek přinesl i pokus s pozorováním sex. aktivity allatektomovaných samců. Tito nevykazovali žádný signifikantní rozdíl od párů intaktních (viz. podkapitola 4.5.; **Obr. 16**). Za rozdíl sexuální aktivity mezi diapauzními a allatektomovanými samci jsou zodpovědné neurosekreční buňky mozku v oblasti pars intercerebralis (PI) (Hodková 1994). U samic *P. apterus* bylo zjištěno že přítomnost PI zkracuje život mimo diapauzu ale v diapauze život prodlužuje (Hodková 2008), je tedy možné aby podobný princip fungoval i u samců a faktory z PI přispívají k prodloužení života ♂ SD.

**Shrnutí: Prodloužení života diapauzních samců není dáno jen absencí JH. Úlohu mohou hrát faktory z pars intercerebralis mozku. Allatektomií není ovlivněna sexuální aktivita.**

## **5.3. Vliv páření na longevitu**

### **5.3.1. Vliv intaktní samice na přežívání allatektomovaného samce**

**Zjištění: páření zkracuje samcům život nezávisle na přítomnosti CA potažmo JH**

V literatuře se často objevuje hypotéza tvrdící, že páření zkracuje život prostřednictvím biosyntetické aktivity CA. Bohužel je založena pouze na nepřímých důkazech: např. zvýšení aktivity CA/hladiny JH po kopulaci některých druhů hmyzu (Teal et al. 2000; Rolff and Siva-Jothy 2002). Tuto hypotézu jsem testoval přímo a to studiem vlivu páření na délku života samců bez CA. Páření allatektomovaného samce s intaktní samicí zkracuje samci život **(Obr. 8 a 9)**. Z toho je zřejmé, že zkrácení života samců pářením není zprostředkováno juvenilním hormonem. Výsledky u *P. apterus* tedy nepodporují výše zmíněnou hypotézu.

**Shrnutí: Zkrácení longevity pářením není zprostředkováno juvenilním hormonem.**

### 5.3.2. Vliv intaktní vs. allatektomované samice na přežívání intaktních samců

**Zjištění: Páření zkracuje život. Páření s allatektomovanou samicí život zkracuje podstatně méně nebo vůbec.**

Páření intaktního samce s intaktní samicí zkracuje život oproti izolovanému samci. Co je však velice překvapivé, je fakt, že samec v páru s allatektomovanou samicí žije mnohem déle než samec v páru s intaktní samicí. Je tedy patrné, že absence JH u samice má vliv na longevitu samce. Jakým mechanismem by k tomu mohlo dojít? Jednou z možností by byla snížená sexuální aktivita a s ní spojené náklady na páření. JH je diskutován jako jeden s faktorů ovlivňující receptivitu samic, jeho absence u ♀ by tedy mohl vést k menšímu počtu kopulací (nebo jejich zkrácení) (Ringo 1996). Frekvence páření zaznamenané při našem pokusu (**Obr. 16**) však nenasvědčují snížené receptivitě samic, spíše naopak, průměrná délka kopulace v párech intaktní samec a allatektomovaná samice byla signifikantně větší než u ostatních zkoumaných skupin. Tyto závěry vyvrací možnost prodloužení života samců kratší dobou kopulace a tedy menšími energetickými nároky. Je možné spekulovat o tom, že samice tvoří kupříkladu feromony, které by indukovaly změnu longevity samců a byly by závislé na přítomnosti JH. Pokusy na *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera – Noctuidae) nasvědčují tomu, že tvorba některých sex feromonů je opravdu regulována pomocí JH (Picimbon et al. 1995). Vliv JH na aktivitu feromonů byl popsán i u jiného hmyzu (Smith a Schal 1990; Tralalon et al. 1990; Sreng 1990; Rafaeli and Bober 2005). Ovlivnění délky života důsledkem působení feromonů bylo popsáno jen u *C. elegans*, kde feromonový extrakt prodlužuje život dospělců (Kawano et al. 2005). Pozdější studie ukázaly, že akarosidy (feromony) v malých koncentracích působí jako sexuální atraktant, ve vyšších koncentracích vyvolávají zastavení larválního vývoje (dauer) *C. elegans* (Srinivastan et al. 2008). U *P. apterus* bylo identifikováno velké množství uhlovodíků s funkcí feromonů (Farine et al. 1992), jejich vliv na longevitu ani hormonální regulace zatím nejsou známy. Je však velmi pravděpodobné že vliv samičího JH (nebo jeho absence) je zprostředkován feromony.

**Shrnutí: Nezkrácení longevity samce v páru s allatektomovanou samicí není způsobeno menší sexuální aktivitou. Možným mediátorem hormonálního nastavení samice by mohly být feromony.**

## 5.4. Vliv diapauzy a páření na aktivitu fenoloxidázy

**Zjištění:** Diapauza ani allatektomie statisticky signifikantně neovlivňují relativní aktivitu fenoloxidázy.

**Páření** statisticky signifikantně neovlivňuje relativní aktivitu fenoloxidázy.

Podle článku Rolff and Siva-Jothy 2002 snižuje u *T. molitor* juvenilní hormon hladiny fenoloxidázy a tím snižuje imunitní odpověď. Regulace imunitní odpovědi přes JH, by mohlo být jedním z mechanismů trade-off mezi reprodukcí a imunitou (s pravděpodobným dopadem na longevitu). Použil jsem stanovení fenoloxidázy jako ukazatel části imunitní odpovědi jedince. Značně variabilní výsledky, neukázaly signifikantní statistický rozdíl mezi intaktními diapauzními (SD M) a intaktními nediapauzními (LD M) samci. Histogramy variability (**Obr. 13**) však indikují, že u diapauzních jedinců je variabilita celkově menší a nevyskytuje se tolik nulových hodnot aktivity PO. Nediapauzní allatektomovaní (LD M –CA) samci nejsou signifikantně odlišní od LD M samců, avšak liší se od SD M i diapauzních allatektomovaných (SD M –CA), viz **Obr. 11**. Samci, kteří byli v páru se samicí taktéž nevykazovali statisticky signifikantní odlišnosti od LD M ani od LD M –CA (**Obr. 12**).

I přes statistickou nevýznamnost rozdílů LD M –CA a LD M napovídá rozložení variability o inklinaci allatektomovaných samců k vyšší aktivitě PO (**Obr. 13**). Do jisté míry podobnou situaci nalézáme i u allatektomovaných diapauzních samců, i když v menším měřítku. Stejný trend ve variabilitě můžeme sledovat i u samců, kteří žili v páru se samicí (**Obr. 14**). Zvýšení aktivity PO po allatektomii by mohlo být vysvětleno Inhibičním vlivem CA (potažmo JH) na aktivitu PO, což by bylo ve shodě s prací Rolff a Siva-Jothy 2002. Šlo by ovšem o naprosto opačnou situaci než u samic *P. apterus*, kde podle výsledků paralelního výzkumu laboratoře doc. Hodkové, je JH stimulantem imunity u LD samic (osobní komunikace s H. Blažkovou; v době psaní této práce ještě neobhájená dipl. práce výše zmíněné).

**Shrnutí:** Ani páření ani diapauza ani ablace CA nemají statisticky průkazný vliv na zkoumanou složku imunity. Rozložení variability vzorků indikuje inhibiční vliv JH na imunitu. Vzhledem k charakteru použité metody (velká variabilita vzorků) je však nutné toto tvrzení podpořit silnějšími experimentálními důkazy.

## 6. Závěry

- 1) Diapauzní samci v krátkém dni žijí podstatně déle než reprodukčně aktivní samci v dlouhém dnu.
- 2) Allatektomovaní nediapauzní samci žijí delší dobu než intaktní nebo zranění nediapauzní samci, ale kratší dobu než diapauzní samci. Nepřítomnost JH je tedy jen částečně zodpovědná za dlouhý život diapauzních samců.
- 3) Páření zkracuje život jak intaktním tak allatektomovaným samcům. Výsledky tedy nepotvrdily hypotézu, že zvýšená produkce JH zprostředkuje vliv páření na délku života.
- 4) Samci žijí signifikantně déle v páru s allatektomovanou než s intaktní samicí. Jde o prvé zjištění vlivu hormonálních podmínek samic na život samců u živočichů.
- 5) Frekvence páření nebyla allatektomie samic ovlivněna a doba kopulace byla dokonce delší. Prodloužení života samců (bod 4) tedy není důsledkem nižší sexuální aktivity.
- 6) Z bodů 4 a 5 vyplývá, že energie vložená do samotného aktu páření nevysvětluje, proč samice zkracují život samců. Výsledky tedy nepotvrdily obecnou teorii, že alokace energetických zdrojů mezi reprodukce a údržbou organismu je příčinou stárnutí.
- 7) Diapauza a páření nemají vliv na aktivitu PO.
- 8) Allatektomovaní nediapauzní samci mají nepatrně (ale signifikantně) vyšší aktivitu PO, než diapauzní samci. Nelze tedy vyloučit slabý inhibiční vliv JH na aktivitu PO.
- 9) Celkově výsledky neprokázaly významný vztah mezi aktivitou PO a přežíváním.

## 7. Literatura

- Barthel, A.;** Schmoll, D.; Utermann, T. G. (2005) FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism* 16: 183-189.
- Bertram, M. J.;** Neubaum, D. M.; Wolfner, M. F. (1996) Localization of the *Drosophila male* accessory gland protein Acp36DE in the mated female suggests a role in sperm storage. *Insect. Biochem and Mol. B.* 26: 971-980.
- Blanckenhorn, W. U.;** Hosken, D. J.; Martin, O. Y.; Reim, C.; Teuschl Y.; Ward, P. I. (2002) The cost 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. Bachelors thesis (in Czech). Faculty of Science, The university of South Bohemia, České Budějovice Czech republic.
- Bownes, M. (1989)** The roles of juvenile hormone, ecdysone and the ovary in the control of *Drosophila* oogenesis. *J. Insect Physiol.* 35: 409-413.
- Comfort, A. (1956)** *The Biology of Senescence*. Rinehart, New York.
- Crudginton, H.S.;** Siva-Jothy, M.T., (2000) Genital damage, kicking and early death. *Nature* 407, 855–856.
- Chapman, T.;** Liddle, L. F.; Kalb, J. M.; Wolfner, M. F. (1995) Cost of mating in *Drosophila melanogaster* is mediated by male accessory gland products. *Nature* 373: 241-244
- Dobeš, P. (2009)** Fenoloxidázová kaskáda u hmyzu. Master thesis (in Czech). Masarykova univerzita. Brno, Czech republic.
- Farine, J. P.;** Bonnard, O.; Brossut, R.; Le Quere, J.L. (1992) Chemistry of defensive secretions in nymphs and adults of fire bug, *Pyrrhocoris apterus* L. (Heteroptera, Pyrrhocoridae) *J. Chem. Ecol.* 18: 1673-1682.
- Ferkau, C.;** Fischer, K. (2006) Cost of reproduction in male *Bicyclus anynana* and *Pieris napi* butterflies: Effect of mating history and food limitation. *Ethology* 112: 1117-1127.
- Flatt, T.;** Tu, M. –P.; Tatar, M (2005) Hormonal pleiotropy and the juvenile hormone regulation of *Drosophila melanogaster*. *Genetica* 122: 141-160.
- Flatt, T.;** Tu, M. –P.; Tatar, M (2005b) 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 melanogaster*. *Evolution* 61-8: 1980-1991.”
- Flatt, T.;** Schmidt, P. S. (2009) Integrating the evolutionary and molecular genetics of aging. *Biochim. Biophys. Acta* 1790: 951-962.

- Fowler, K.;** Partridge, L. (1989) A cost of mating in female fruit flies. *Nature* 338: 760-761.
- Gems, D.;** Riddle, D. L. (1996) Longevity in *Caenorhabditis elegans* reduced by mating but not gamete production. *Nature* 379: 723-725
- Giannakou, M. E.;** Partridge, L. (2004) The interaction between FOXO and SIRT1: tipping the balance towards survival. *Trends in cell biology* 14: 408-412.
- Handler, A. M.** and Postlethwait, J. H. (1977) Endocrine control of vitellogenesis in *Drosophila melanogaster*: effects of the brain and corpus allatum. *J. Exp. Zool.* 202: 389-402.
- Herman, W. S.;** Tatar, M. (2001) Juvenile hormone regulation of longevity in the migratory monarch butterfly. *Proc. R. Soc. Lond B* 268, 2509-2514.
- Hiruma, K.;** Riddiford, L. M. (1988) Granular phenoloxidase involved in cuticular melanization in the tobacco hornworm: Regulation of its synthesis in the epidermis by juvenile hormone. *Dev. Biol.* 130: 87-97.
- Hodek, I.;** (1968) Diapause in females of *Pyrrhocoris apterus* L. (Heteroptera) Acta. Entomol. Bohemoslovaca 65: 422-&.
- Hodek, I.;** (1971) Sensitivity of larvae to photoperiods controlling adult diapause of 2 insects. *J. Insect. Physiol.* 17: 205-&.
- Hodek, I.;** Iperiti, G. (1983) Sensitivity to photoperiod in relation to diapause in *Semidalia undecimnotata* females. *Entomologia Experimentalis et applicata* 34: 9-12.
- Hodková, M. (1994)** Photoperiodic regulation of mating behaviour in the linden bug, *Pyrrhocoris apterus*, is mediated by a brain inhibitory factor. *Experientia* 50: 742-744.
- Hodková, M. (2008).** Tissue signaling pathways in the regulation of life-span and reproduction in females of the linden bug, *Pyrrhocoris apterus*. *J. Insect Physiol.* 54: 508-517.
- Hwangbo, D. S.;** Gershman, B.; Tu, M. P.; Palmer, M.; Tatar, M. (2004) *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature* 429: 562-566.
- Jowett, T** and Postlethwait, J. H. (1980) The regulation of yolk peptide synthesis in *Drosophila* ovaries and fat body by 20-hydroxyecdysone and a juvenile hormone analog. *Dev. Biol.* 80: 225-234.

- Kawano, T.;** Kataoka, N.; Abe, S.; Ohtani, M.; Honda, Y.; Honda, S.; Kimura, Y. (2005) Lifespan extending activity of substances secreted by the nematode *Caenorhabditis elegans* that include the Dauer-inducing pheromone. *Bioscience Biotechnology and biochemistry* 69: 2479-2481.
- Kirkwood, T. B. L. (1977)** Evolution of ageing. *Nature* 270: 301-304.
- 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.
- Kou, R.;** Chang, H. W.; Huang, Z. Y.; Yang, R. L. (2008) Pheromone, juvenile hormone and social status in the male lobster cockroach *Nauphoeta cinerea*. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 68: 114-155
- Luckinbill, L.S.;** Arking, R.; Clare, M. J.; Cirocco, W. C.; Buck, S. A. (1984) Selection for delayed senescence in *Drosophila melanogaster* 38: 996-1003
- Lung, O.;** Wolfner, M. F. (1999) *Drosophila* seminal fluid proteins enter the circulatory system of the mated female fly by crossing the posterior vaginal wall. *Insect. Bichem. And Mol. B.* 29: 1043-1052
- Malick, L. E. and Kidwell, J. F. (1966)** The effect of mating status, sex and genotype on longevity in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 54: 203-209.
- Mantel, N. (1966)** Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother Rep.* 50: 163-70.
- Medawar, P. B. (1952)**, *An Unsolved Problem of Biology*, H. K. Lewis, London, UK.
- Monsma, S. A.;** Harada, H. A.; Wolfner, M. F. (1990) Synthesis of 2 *Drosophila* male accessory gland proteins and their fate after transfer to the female during mating. *Dev. Bio.* 142: 465-475
- Nijhout, H. F. (1994)** *Insect hormones*. Princenton University Press, Princeton.
- Pauku, S.;** Kotaiho, J.S. (2005) Cost of reproduction in *Callosobruchus maculatus*: effects of mating on male longevity and the effect of male mating status on female longevity. *J. Insect Physiol.* 51:1220-1226
- Parthasarathy, R.;** Tan, A.; Sun, Z.; Chen, Z.; Rankin, M.; Palli, S. R. (2009) Juvenile hormone regulation of male accessory gland activity in red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Mechanisms of development* 126: 563-579.



- Partridge, L.**; Farquhar, M. (1981) Sexual activity reduces lifespan of male fruitflies. *Nature* 294: 580-582.
- Partridge, L.**; Harvey, P.H. (1985) Evolutionary biology –cost of reproduction. *Nature* 316: 20-20.
- 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.
- Paukku, S.**; Kotiaho, J. S. (2005) Cost of reproduction in *Callosobruchus maculatus*: effects of mating on male longevity and the effect of male status on female longevity. *J. Insect. Biol.* 51: 1220-1226.
- Picimbon, J. -F.**; Becard, J. -M.; Sreng, L.; Clement, J. -L.; Gadenne, C. (1995) Juvenile hormone stimulates pheromoneotropic brain factor release in the female black cutworm, *Agrotis ipsilon*, *Journal of Insect Physiology* 41: 377-382.
- Rafaelli, A.**; Bober, R. (2005) The effect of the juvenile hormone analog, fenoxycarb on the PBAN-receptor and feromone production in adults of the moth *Helicoverpa armigera*: an „aging“ hormone in adult females? *J. Insect. Physiol.* 51: 401-410.
- 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 feromone production trade-offs: a test of the immunocompetence handicap principle. *Proc. Royal Soc. London Series B-Biological Sciences* 270: 2257-2261.
- Reznick, D. N.**; Bryant, M. J.; Roff, D.; Ghalambor, C. K.; Ghalambor, D. E. (2004) Effect of extrinsic mortality on the evolution of senescence in guppies. *Nature* 431: 1095-1099.
- Riddiford, L. M.** (1985) Hormone action at the cellular level. *Comprehensive Insect Biochemistry, Physiology, and Pharmacology* vol. 8: 37–84, Pergamon, New York.
- Ringo, J** (1996) Sexual receptivity in insects. *Annu. Rev. Entomol* 41: 473-494.
- Roff, D. A.** (1992). *The evolution of life histories: Theory and analysis*. Chapman & Hall. New York.
- Rose, M. R.** (1984) Laboratory evolution of postponed senescence in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 38: 1004-1010

- Saunders, D.S.;** Richard, D.S.; Applebaum, S.W.; Ma, M.; Gilbert, L. I. (1990) Photoperiodic diapause in *Drosophila melanogaster* involves a block to the juvenile hormone regulation of ovarian maturation. *Gen. and Compar. Endocrin.* 79: 174-184
- Sim, C.; Denlinger, D. L. (2008)** Insulin signaling and FOXO regulate the overwintering diapause of mosquito *Culex pipiens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 6777-6781.
- Simmons, L. W. (2001):** The evolution of polyandry: an examination of the genetic incompatibility and goodsperm hypothesis. *J. Evol. Biol.* 14: 585—594.
- Sláma, K. (1964)** Hormonal control of respiratory metabolism during growth, reproduction, and diapause in male adults *Pyrrhocoris apterus* L (Hemiptera). *Biological Bulletin* 127: 499-510.
- Smith, A. F.;** Schal, C. (1990) Corpus allatum control of sex-pheromone production and calling in the female brown-banded cockroach, *Supella longipalpa* (F) (Dictyoptera, Blattellidae). *J. Insect. Physiol.* 36: 251-257.
- Sohal, R. (2002)** Oxidative stress hypothesis of aging. *Free radical biology and medicine* 33: 573-574.
- Socha, R.;** Šula, J.; Kodrík, D.; Gelbič, I. (1991) Hormonal control of the vitellogenin synthesis in *Pyrrhocoris apterus* L. (Heteroptera) *J. Insect Physiol.* 37: 805-816.
- Socha, R. (2004):** Decreased mating propensity of macropterous morph in a flightless wing-polymorphic insect, *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Heteroptera). *Eur. J. Entomol.* 101: 539–545.
- Socha, R. (2006):** Endocrine control of wing morph-related difference in mating success and accessory gland size in male firebugs. *Anim. Behav.* 71: 1273–1281.
- Sreng, L. (1990)** Seducin, male sex-pheromone of the cockroach *Nauphoeta cinerea* – isolation identification and bioassay. *J. Chem. Eco.* 16: 2899-2912.
- Stoffolano, J.G. (1976)** Insects as a model systems for aging studies. In: Elias, M. F.; Eleftheriou, B. E.; Elias, P. K. (eds.). *Special Review Experimental Aging Research.* EAR, Bar Harbor, pp. 408-427.
- 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.;** Yin C.-M. (2001) Slow aging during insect reproductive diapause: why butterflies, grasshoppers and flies are like worms. *Experimental Gerontology* 36: 723-738.
- Tatar, M.;** Chien, S.A.; Kiefer Priest, N. (2001b) Negligible senescence during reproductive dormancy in *Drosophila melanogaster*. *Am. Nat.* 158: 248-258.

- Taylor, R. L. (1969).** A suggested role for the polyphenol – phenoloxidase system in invertebrate immunity. *J. Invertebr. Pathol.* 14: 427-428.
- Teal, P. E. A.; Gomez-Simuta, Y.; Proveaux, A.T.; (2000)** Mating experience and juvenile hormone enhance sexual signaling and mating in male Caribbean fruit flies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 3708-3712
- Tobin, P. C.; Nagarkatti, S.; Saunders, M.C. (2002)** Diapause maintenance and termination in grape berry moth (Lepidoptera: Tortricidae). *Env. Entomology* 31: 708-713.
- Trabalon, M.; Campan, M.; Porcheron, P.; Clement, J. L.; Baehr, J. C.; Moriniere, M.; Joulie, C. (1990)** Relationships among hormonal changes, cuticular hydrocarbons, and attractiveness during the 1st gonadotropin cycle of the female *Calliphora vomitoria* (Diptera). *Gen. And comp. Endocrin.* 80: 216-222-
- 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.
- Tu, M. –P.; Flatt, T.; Tatar, M. (2005)** Mutations in insulin signaling pathway alter juvenile hormone biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. *Gen. Comp. Endocr.* 142: 347-356.
- Turner, R. J. (1994)** *Immunology - A Comparative Approach.* John Wiley and Sons, New York.
- Vahed, K. (1998):** The function of nuptial feeding in insects: a review of empirical studies. *Biol. Rev.* 73: 43—78.
- Van Voorhies, W. A. (1992)** Production of sperm reduces nematode lifespan. *Nature* 360: 456–458 .
- Whalen, M.; Wilson, T. G. (1986)** Variation and genomic localization of genes encoding *Drosophila melanogaster* male accessory gland proteins separated by SDS-PAGE. *Genetics* 114: 77-92.
- Wagner, W. E.; Murray, A. M.; Cade, W. H. (1995)** Phenotypic Variation in the mating preferences of female field crickets *Gryllus integer*. *Animal Behaviour* 5: 1269
- Wedell, N. & Cook, P. A. (1999)** Butterflies tailor their ejaculate in response to sperm competition risk and intensity. *Proc. R. Soc. London B* 266: 1033—1039.
- Wigby, S.; Chapman, T. (2005)** Sex peptide causes mating costs in female *Drosophila melanogaster*. *Current Biology* 15: 316-321.
- Wigglesworth, V. B. (1936)** The function of the corpus allatum in the growth and reproduction of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *Quart. J. Microsc. Sci.* 79: 91-121.

- Williams, G. C. (1957)** Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence, *Evolution* 11:398–411.
- Wittkopp, P. J.; Beldade, P. (2008)** Development and evolution of insect pigmentation: Genetic mechanisms and the potential consequences of pleiotropy. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 20: 65-71.
- Yanagi S.; Miyatake T. (2003)** Costs of mating and egg production in female *Callosobruchus chinensis*, *J. Insect Physiol.*49: 823-827.
- Žďárek, J. (1968)** Le comportement d'accouplement à la fin de la diapause imaginaire et son contrôle hormonal dans le cas de la punaise *Pyrrhocoris apterus* L. (Pyrrhocoridae, Heteroptera). *Annales d'Endocrinologie* 29: 703-707.
- Žďárek, J. (1970)** Mating behaviour in the bug, *Pyrrhocoris apterus* L. (Heteroptera): Ontogeny and its environmental control. *Behaviour* 37: 253-268.