

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Indukce autogenie biologicky aktivními látkami u druhu
Culex quinquefasciatus Say

Bakalářská práce

David Šefčík

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

České Budějovice 2016

Šefčík D., 2016: Indukce autogenie biologicky aktivními látkami u druhu *Culex quinquefasciatus* Say. [Induction of autogeny by biologically active substances in the species *Culex quinquefasciatus* Say. Bc. Thesis, in Czech.] – 36 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

The main aim of this study was determinate which factors could induce autogeny and compare differences between autogenous and anautogenous populations of mosquitoes. All experiments were done with *Culex quinquefasciatus* Say. Effects on temperature and food on the inductuion of autogeny were studied. Autogenous females usually don't have to receive a blood during the first ovarian cycle. Our results confirmed that autogeny can be induced by temperature and different food high nutritive level.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou 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 bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích 22.04.2016

Podpis studenta:

Poděkování

Srdečně bych chtěl poděkovat mému školiteli Doc. RNDr. Ivanu Gelbičovi CSc. za jeho snahu, trpělivost, odborné vedení, zapůjčení odborné literatury a za poskytnutí cenných rad. Díky této pomoci mohla daná práce vzniknout. Nadále bych chtěl poděkovat paní Barboře Kozelkové pracující v laboratoři na Entomologickém ústavu AV ČR v Českých Budějovicích za poskytnutí rad ze své praxe a také za pomoc se seznámením s chovem komárů v laboratorních podmínkách.

Obsah

| | |
|--|-----------|
| 1. Úvod..... | 1 |
| 2. Literární přehled..... | 2 |
| 2.1. Charakteristika komárů..... | 2 |
| 2.1.1. Vajíčko..... | 3 |
| 2.1.2. Larva..... | 4 |
| 2.1.3. Kukla..... | 5 |
| 2.1.4. Imago..... | 6 |
| 2.2. Anatomie..... | 7 |
| 2.3. Sání krve u samic komárů..... | 8 |
| 2.4. Reprodukční systém komárů..... | 9 |
| 2.4.1. Samičí pohlavní systém..... | 9 |
| 2.4.2. Struktura a funkce ovaria, ovariol a ovarialních folikulů..... | 9 |
| 2.4.3. Vitellogeneze..... | 10 |
| 2.4.4. Gonotrofický cyklus u samic komárů..... | 12 |
| 2.4.5. Samčí pohlavní systém..... | 13 |
| 2.5. <i>Culex quinquefasciatus</i> Say..... | 13 |
| 2.5.1. Rozšíření..... | 13 |
| 2.5.2. Potrava..... | 13 |
| 2.5.3. Nemoci přenášené komárem <i>Culex quinquefasciatus</i> Say..... | 14 |
| 2.6. Autogenie a Anautogenie..... | 14 |
| 3. Cíl práce..... | 18 |
| 4. Materiál a metodika..... | 19 |
| 4.1. Metodika chovu..... | 19 |
| 4.2. Metodika rozlišení pohlaví..... | 20 |
| 4.3. Pokusný materiál..... | 21 |
| 4.3.1. Krmiva pro larvy komárů..... | 21 |
| 5. Výsledky..... | 22 |
| 5.1. Vliv teploty na vývoj komárů..... | 22 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 5.2. | Vliv potravy na vývoj komárů | 23 |
| 5.3. | Indukce autogenie teplotou a potravou | 24 |
| 5.3.1. | Indukce autogenie teplotou..... | 24 |
| 5.3.2. | Indukce autogenie potravou..... | 25 |
| 5.4. | Porovnání autogenních x anautogenních populací | 26 |
| 6. | Diskuse | 28 |
| 7. | Závěr..... | 32 |
| 8. | Použitá literatura | 33 |

1. Úvod

Hmyz je součástí našeho každodenního života. Mohli bychom tento jev nazvat jako symbióza, která má za následek vedle pozitivních faktorů (opylovači, produkce medu, hedvábí apod.) i mnoho negativních jevů, jako je např. přenos čtených patogenních organismů vyvolávajících onemocnění u člověka i domácích zvířat. Hmyz je druhově nejpočetnější skupinou živočichů. Pro představu na území České republiky a Slovenska žije přes 30 000 druhů hmyzu a odhady odborníků o celkovém počtu hmyzích druhů na Zemi se pohybují v rozmezích od dvou do třiceti milionů (Riehmová, 1997).

Se zvyšující se teplotou a s měnícími se podmínkami prostředí dochází k výrazným změnám v biodiverzitě hmyzu. To má za následek nejen přemnožení určitých druhů, ale i výskyt nových druhů, které se na daném území nikdy nevyskytovaly. Tyto změny jsou doprovázeny řadou problémů, jako jsou přenosy chorob, škody na kulturních plodinách atd. Mezi jedny z nejzávažnějších krev sajících přenašečů patří čeleď komárovitých. Jsou hlavními přenašeči malárie, filariózy, žluté zimnice a mnoha dalších. Díky těmto negativním vlivům jsem se rozhodl studovat vliv biotických a abiotických faktorů na reprodukci neboli rozmnožování komárů. Možnost indukce autogenie – kladení vajíček bez předchozího sání krve by výrazně snížilo riziko přenosu patogenních organismů na člověka a domácí zvířata.

Autogenie je jev, kdy samičky komárů nepotřebují sát krev během prvního ovariačního cyklu. Pro vývoj vajíček kladených v následných snůškách se musí samice většinou nasát krve, která doplní chybějící živiny. Práce je zaměřena na faktory ovlivňující tento pozoruhodný jev. Mezi zkoumané faktory ovlivňující autogenii patří teplota a výživa během larválního vývoje. Vliv těchto faktorů byl testován na anautogenním druhu *Culex quinquefasciatus* Say.

2. Literární přehled

2.1. Charakteristika komárů

Komárovití (Culicidae) patří s řadou dalších čeledí k řádu hmyzu dvoukřídlého (Diptera), charakterizovaného jedním párem křídel a druhým změněným v kyvadélka (haltery). Jejich tykadla jsou složena z většího počtu článků, což určuje jejich zařazení do skupiny Nematocera. Zástupci čeledi Culicidae mají ústní ústrojí prodloužené, přizpůsobené k bodání a sání krve. Křídla, tělo i nohy mají pokryty šupinkami a chloupky (Kramář, 1958).

Délka těla se pohybuje okolo 0,5 cm. V klidovém postoji směřuje zadeček komárů rodu *Culex* šikmo dolů k podložce, při bodnutí je téměř vodorovný, přičemž předníma nohama komár ohmatává své okolí. Samice mají dlouhý bodavý sosák, kterým většina druhů sají krev obratlovců (Riehmová, 1997). Některé druhy sají i na bezobratlých.

Larvy i kukly se zdržují těsně pod hladinou (Riehmová, 1997). Larvy se živí drobným organickým detritem a drobnými organismy, které jsou součástí planktonu. Dospělci se živí nektarem různých květů a samice navíc potřebují pro vývoj vajíček sát krev. Krev získávají pomocí svého bodavě savého ústního ústrojí ze savců, obojživelníků, plazů a u některých druhů bylo zpozorováno sání hemolymfy i z jedinců vlastního druhu. Samičky rodu *Culex* a *Culiseta* kladou vajíčka přímo do vody. Naopak kalamitní druhy rodu *Aedes* kladou vajíčka na vlhká místa, kde se vytváří periodické tůně a tam čekají na vodu (z tajícího sněhu, přívalových dešťů nebo při vybřežení vodních toků). Počet vajíček v jednotlivých snůškách je u autogenních druhů nižší – kolem 50/snůšku a u anautogenních je v první snůšce více jak 150 vajíček (Sota a Mogi, 1994). V následujících snůškách jejich počet klesá. První snůška je většinou vykladena kolem 7. dne po imaginální ekdysi. Další snůšky jsou kladeny ve dvou až čtyřdenních intervalech (Becker a Petrić, 2003).

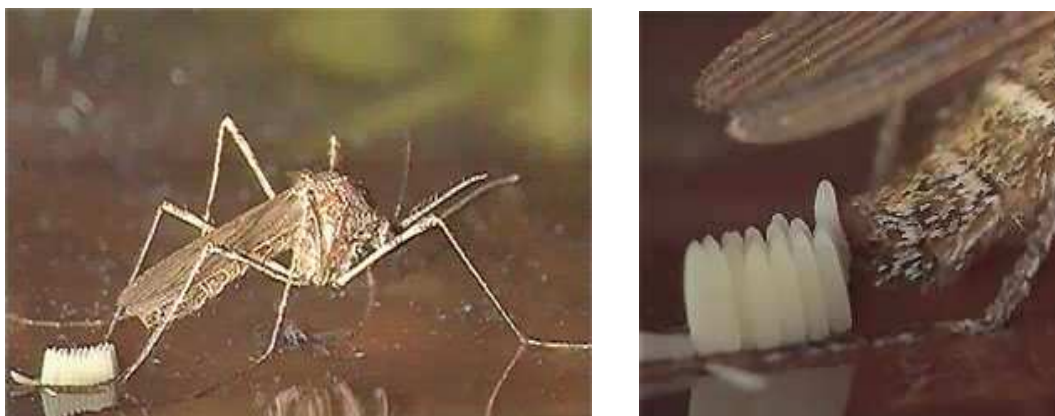
Komáři jsou rozšířeni po celém světě. Vyskytují se zejména okolo vodních nádrží, rašelinišť, v humidních oblastech, ale také i v lidských sídlech. Jejich početnost kolísá s ročním obdobím a je závislá na klimatických podmínkách. V České republice je nejvyšší výskyt komárů především na jižní Moravě.

Nejběžnějšími druhy komárů jsou u nás *Culex pipiens*, *Aedes sticticus* a *Aedes vexans*, kteří jsou hlavními kalamitními druhy. Komáry zařazujeme do skupiny hmyzu s proměnou dokonalou. Celkově lze vývoj komára rozdělit na 4 stádia – vajíčko - larva - kukla - dospělec.

2.1.1. Vajíčko

Vajíčka komárů rodu *Culex* jsou protáhle kuželovitá se špičatým koncem nahoře. Při kladení se slepují bočními stěnami k sobě, takže vznikají charakteristické člunkovité shluky vajíček plovoucí na hladině. Navíc mají k základu přitmelený miskovitý útvar tzv. corolla. Vajíčka u rodu *Anopheles* připomínají svým tvarem lodičku a mají vzdušné komůrky, které jsou příčně rozděleny (Becker a Petric, 2003).

Množství kladených vajíček ovlivňuje mnoho faktorů. Jednak je tomu množství živin, teplota a stanovištní podmínky, ale také zda se samice napila krve. Samice, které se nenasály krve, zpravidla produkují menší množství vajíček.



Obr.1, 2: Kladení vajíček samicí komára na povrch hladiny.



Obr. 3: Snůška vajíček plovoucí na hladině.

(Obrázky převzaty z internetového zdroje: <http://www.catfish.cz/ruzne/komar/komar.htm>)

2.1.2. Larva

Tělo larvy komára se skládá z hlavy, hrudi a zadečku. Na povrchu všech těchto částí nalezneme chlupovité útvary, a to osténky, chlupy, chloupky a zuby. Hlava je tvořena třemi sklerotizovanými destičkami. Po obou stranách hlavy jsou na lícních destičkách vyvinuty oči. Tykadla se připojují vpředu po stranách hlavy k lícním destičkám. Součástí hlavy larvy je také ústní ústrojí, kusadla, čelisti a pysky. Hrud' vzniká splynutím tří hrudních článků, na které navazuje zadeček (abdomen) tvořený devíti články. Larva dokáže přijímat potravu třemi základními způsoby, a to filtrováním, seškrabáváním a také dravým způsobem (Mončadskij, 1951).

Larvy komárů dělíme na makrofágy a mikrofágy, a to podle druhu potravy. Mikrofágové se živí filtrováním drobných ústrojných částíček a planktonu z vody a makrofágové se živí většími kusy potravy, mezi které patří i larvy jiných komárů (Macek, 2001).

Larvální vývoj komárů je rozdělen do čtyř larválních instarů. Jednotlivá stádia se od sebe liší velikostí. Ke svlékání dochází díky kutikule, která už neumožňuje další růst, a proto se musí zbavit staré kutikuly. Nová se následně zvětší a vytvoří prostor pro ukládání dalších rezerv. Nejdůležitější činností larválního stádia je příjem potravy a růst. Poté, co larva doroste do konečné velikosti po několika svlékáních, promění se v kuklu (Riehmová, 1997).



Obr.4.: Larva komára *Culex quinquefasciatus* Say.

/Obrázek použit z webové stránky: <http://www.cabi.org/isc/datasheet/86848/>

2.1.3. Kukla

Kukla komárů se skládá z hlavohruďi a zadečku. Hlavohruď (cephalothorax) vzniká splynutím hrudních článků a hlavy a nese anterolaterálně respirační nálevky. Ty obsahují hydrofobní ráfky, které vyčnívají z povrchu hladiny a slouží k dýchání (Becker a Petric, 2003). Hlavohruď obsahuje po obou stranách velké imaginární oči a také malá larvální očka. Zadeček je složen celkem z devíti článků, které mají na povrchu chlupy. Mladé kukly jsou světlé a starší naopak silně pigmentované.

Kuklové stádium trvá 48 hodin. Může být však delší nebo i kratší v závislosti na teplotě prostředí. Během vývoje je důležité tukové tělísko, které se přenáší z larválního stádia až do dospělosti. V tukovém tělese se vytváří vitellogeniny, které jsou transportovány do vyvíjejících se oocytů a tam se transformují na vitellin neboli žloutek. U druhů přezimujících ve stádiu dospělého slouží jako rezerva energie. Kukly komárů jsou dost mobilní. Na rozdíl od larev, které mohou plavat aktivně, plavou kukly pasivně zpátky k povrchu hladiny po potopení (Becker a Petric, 2003).

Během kuklového stádia dochází k transformaci kuklových struktur na struktury imaginární a celkový vývoj se uzavírá líhnutím dospělého označovaného jako imago (Riehmová, 1997).



Obr.5.: Kukla komára *Culex quinquefasciatus* Say.

/Obrázek použit z webové stránky: <http://www.cabi.org/isc/datasheet/86848/>

2.1.4. Imago

Dospělec (imago) se skládá z tří hlavních částí - hlavy, hrudi a zadečku. Původně hlavu tvořilo 6 článků, které v průběhu fylogeneze srostly v jednodlný celek. Součástí hlavy je ústní ústrojí, tykadla a velké složené oči, které tvoří velký počet jednotlivých šestiúhelníkovitých čoček sloužících k registraci pohybu. Ty mají možnost rozlišovat rychlé pohyby. Mezi složenými očima se vyskytují ještě malá jednoduchá očka, které slouží k registraci světelných podmínek. Tykadla slouží jako orgán pro čich a hmat (Riehmová, 1997).

Ústní ústrojí je bodavého typu, jehož součástí je svrchní a dolní pysk. Kusadla jsou změněna ve dvě dlouhé trojúhelníkovitě změněné štětiny. Čelisti jsou změněné ve dva štětinkovité útvary opatřené na konci zoubky. Z přívěšků ústního ústrojí jsou vyvinuta makadla. Ústní ústrojí se u samců a samic komára výrazně liší. Samice na rozdíl od samců mohou sát krev. K tomu slouží bodavé skelety. Pokud jsou v klidu, tak jsou uloženy ve žlábkovitém dolním pysku. U krev sajících samic jsou delší a ostré a díky tomu mohou nabodnout kůži a sát krev. Samci mají naopak krátké bodce, kterými sají květní nektar (Macek, 2001).

Hrud' se skládá ze tří článků - předohrudí, středohrudí a zadohrudí (Riehmová, 1997). Všechny tyto tři části jsou pokryty charakteristickými šupinkami. Předohrud' je velmi redukována. Středohrud' je naopak nejvíce vyvinuta z celé hrudi a zadohrud' je dosti potlačena. Po stranách hrudi jsou umístěny dýchací otvory (přední a zadní). Dále jsou k hrudi připojeny tři páry nohou, kyvadélka a křídla. Ke každému hrudnímu článku kyčlí je připojena jedna noha. Ta je složena z příkyčlí, stehna, holeně a pětičlenného chodidla. Mají jeden pár křídel s charakteristickou žilnatinou, které jsou připojeny ke středohrudí. Druhý pár křídel je zakrnělý a vytváří tzv. haltery - kyvadélka, která jsou součástí zadohrudí (Kramář, 1958).

Poslední částí komárů je zadeček. Ten je tvořen deseti články. Na konci zadečku se nacházejí vnější genitálie.



Obr.6.: Imago komára *Culex quinquefasciatus* Say.

/Obrázek použit z webové stránky: <http://www.cabi.org/isc/datasheet/86848/>

2.2. Anatomie

Trávicí, vylučovací, nervová, cévní, dýchací soustava a pohlavní ústrojí jsou nezbytně nutné soustavy pro možnost existence organismů. Příčně pruhované svalstvo umožňuje veškerý pohyb, trávení, sání a možnost pohybu křídel. Nutno je také zmínit vnější kostru komárů tzv. kutikulu, která je nepropustná pro vodu, chrání tělo komára, znemožňuje smáčení a také odpařování vody z nitra těla komára (Kramář, 1957).

Trávicí soustavu tvoří hltan, jícen, vole, žláznatý a svalnatý žaludek a střevo (Macek, 2001). Zásobní žaludek je naplněn vodnatou tekutinou, jejíž součástí jsou cukry a kvasinky či bublinky plynu a slouží jako zásobárna vody (Kramář, 1957). Cévní soustava je otevřená. Velká hřbetní céva plní funkci srdce a pumpuje hemolymfu k mozkovým gangliím, odkud se následně dostává do celého těla komára. Hemolymfa přenáší živiny. Zpětná cirkulace je zajištěna pomocí otvorů po stranách hřbetní cévy (Riehmová, 1997). Nervovou soustavu tvoří jedna nebo dvě nápadné uzliny, mozková ganglia a modifikovaná břišní nervová páska. K vyměšování slouží malpighické trubice ústící do dutiny střeva (Riehmová, 1997). Součástí dýchacího ústrojí jsou tracheje vyplněné vzduchem a s vnějším prostředím jsou spojena párem spirakul umístěných po stranách hrudi (Kramář, 1957). Uvnitř zadečku nalezneme pohlavní ústrojí, které u samic reprezentují velké tubicovité vaječníky a u samců protáhlá varlata. Pohlavní ústrojí vyúsťuje ve složité kopulační orgány (Riehmová, 1997).

2.3. Sání krve u samic komárů

K sání krve dochází nabodnutím kůže pomocí dlouhých a ostrých bodců. Samice využívají krev pro mnoho životních funkcí, a to především pro pohyb, vývoj, kladení vajíček a mnoho dalších. K naklazení první snůšky vajíček potřebují samice komárů opakovaný příjem krve a některé samice sají krev ještě před kopulací (Gillies et DeMeillon, 1968). Krev sají samice všech druhů komárů. Ty se většinou vyskytují jako anautogenní. Jsou však výjimky označované jako autogenní samice, které nemusí během prvního ovariačního cyklu sát krev. Pro vývoj vajíček prvního gonotrofického cyklu postačují rezervy tukového tělesa. V krvi je obsaženo mnoho potřebných látek. Obsahuje také i esenciální aminokyseliny, které jsou u samic komárů důležitým faktorem pro tzv. vitellogenezi (Harrington et al., 2001).

Obecně sání krve trvá velmi krátkou dobu, a to většinou 1 - 3 minuty. Samičky hledají vhodná místa k nabodnutí kůže. Následně po úspěšném vyhledání vhodného místa pro sání dojde k vrazení štětinovitě tenké části ústního ústrojí přizpůsobené k bodání. Současně při bodnutí dochází k vyměšování slinných žláz do rány, které napomáhají pronikání stiletů do kůže. Krev je následně nasávána kanálkem hypofaryngu a je využita pro vitellogenezi a životní funkce. Nasáté samičky se poté ukrývají a přečkávají dobu klidu ke zrání vajíček v ovariích (Kramář, 1958).

Rozeznáváme dva typy sání krve u hmyzu. V prvním případě se jedná o solenofágní, který zahrnuje jedince sající krev přímo z cévy. Jedinci sají krev rychleji, než stačí vytékat z poškozené cévy. Tento způsob sání reprezentují zejména komáři, ploštice a další (Jeřábková, 2010). V druhém případě se jedná o thelmofágní sání, který využívají hlavně flebotomové. Sají krev pomaleji a pomocí agresivních enzymů obsažených ve slinách narušují tkáň organismu (Volf a kol., 2007). Samice sají krev hlavně z teplo-krevních obratlovců a některé samice dokonce vyhledávají hostitele pomocí čichu (Hůrka a Čepická, 1980). Samice cítí oxid uhličitý v dechu či mastné kyseliny v potu. Také pomocí termoreceptorů dokážou vnímat infračervené záření z těla hostitele. Existuje mnoho faktorů, které lákají samice k hostiteli. Zejména pot, teplota těla, povrch a také barva tkaniny (Browne, 1951).

Po nasátí krve dochází u samice k následnému trávení krve a to tak, že je krev nejprve zbavena přebytečné vody. Poté dochází v trávicí soustavě k hemolýze a následně je krev trávena hydrolytickými enzymy proteáz, jako je například chymotrypsin (Volf a kol., 2007).

Zvýšené sání krve u samic komárů může být také způsobeno různými patogeny, které zvyšují a někdy naopak snižují příjem krve. Patogen může snížit apyrázovou aktivitu ve slinách vektorů a to nutí vektora sát opakovaně a zvyšuje šanci patogenu na přenos (Scott et al., 2000).

2.4. Reprodukční systém komárů

2.4.1. Samičí pohlavní systém

Samičí pohlavní systém hmyzu zahrnuje několik procesů. Nejdůležitější funkcí je produkce vajíček a tvorba jejich ochranných struktur do té doby, dokud nejsou vajíčka připravena k oplodnění. Pohybová aktivita spermií zajišťuje jejich transport do místa jejich uložení a také jejich následné uvolňování. K tomu také přispívá svalová kontrakce reprodukčního traktu samic (Kodrík, 2004).

Pohlavní systém samic je tvořen párovitým vaječníkem, který se skládá z jednotlivých ovariol. Každá ovariola je tvořena terminálním filamentem, germaniem a vitelláriem, kde probíhá tvorba žloutku. Jednotlivé oocyty spolu s nutritivními buňkami jsou obaleny folikulárním epitelem a tvoří tzv. folikullus. Ovarioly se spojují v místě zvaném calyx, které ústí do laterálního oviduktu. Laterální ovidukty ústí do společného oviduktu a ten ústí do genitální komory, která ústí ven vulvou. Mezi vulvou a komorou se nalézá vagina, kam ústí dvě ektodermální žlázy zvané spermatheca a akcesorická žláza (Kodrík, 2004).

2.4.2. Struktura a funkce ovaria, ovariol a ovarialních folikulů

Vaječníky (ovaria) jsou jedním z nejdůležitějších orgánů samic zajišťujících potomstvo. Počet jednotlivých ovariol, které jsou součástí pohlavního systému, je velmi proměnlivý a nepřevyšuje hodnotu 500. Ovariola se skládá ze dvou částí – germania a vitellária. V germaniu dochází ke zmnožování oocytů a ve vitelláriu probíhá vlastní vitellogeneze. Každý oocyt je obalen vrstvou folikulárních buněk. Je tvořen vyvíjejícím se oocytem a nutritivními buňkami, které slouží k vyživování oocytu. Tato jednotka vytváří jednotlivé folikuly (někdy také označované jako vaječné komůrky). Folikuly jsou dvojího typu, a to preprimární a primární. Preprimární jsou označovány jako folikuly mladší a za primární se označují jako folikuly nejvyvinutější (Clements, 1992).

Díky správným funkcím zmíněných částí pohlavního ústrojí samic komárů dochází k produkci vajíčka. Tento ovariální cyklus je proces cyklický. Sady sesterských folikulů se postupně separují z germania z několika ovariol. Folikuly z každé sady se vyvíjí synchronně, dokud nejsou plně vyvinuty. Stádia ovariálního vývoje jsou celkem čtyři, o kterých je nadále psáno ve vitellogenezi (Clements, 1992).

Aby došlo ke správnému vývoji ovaríí, musí samice přijímat určité látky, které nejen slouží ke zmíněnému vývoji, ale také i k udržení důležitých funkcí a ovlivnění hormonálních pochodů. Najdeme několik rozdílů ve vývoji autogenních a anautogenních ovariol u samic. Ke správnému vývoji ovariol potřebují samice k tomuto ději potravu, která obsahuje dané množství biogenního prvku - dusíku. Potřebné látky pro správný vývoj ovaríí získávají samice z krve, kde nalezneme velké množství proteinů. Součástí těchto krevních proteinů je potřebný dusík. Pokud se dostane do střeva samice určité množství krve, tak dojde k roztažení střeva a následně k trávení krve. Po roztažení střeva krví dochází k uvolnění hormonů. Proces uvolňování hormonů je nutný pro vývoj ovaríí. Jedná se o 2 důležité hormony. Prvním je tzv. juvenilní hormon, druhým je tzv. ekdyteroidní hormon. Jestliže není uvolněno dostatečné množství ekdyteroidního hormonu, tak dochází k ukončení vývoje tvorby ovaríí u samic. U samic nepřijímajících krev dochází ke vzniku menšího počtu oocytů (Williams a kol., 1979; Browne, 2001).

U autogenních samic hrají ve vývoji ovariol důležitou roli larvální zásoby. Autogenní samice nepotřebují přijímat krev během prvního gonotrofického cyklu, a tudíž mají výrazně menší množství aminokyselin a bílkovin ve svých vaječnicích. Hlavním zdrojem pro imaga autogenních samic jsou zejména tukové zásoby, ale i zásoby bílkovin a glykogenu. Tyto zásoby se vytvářejí během larválního vývoje a přetrvávají až do dospělosti. Díky těmto larválním zásobám jsou larvy autogenních samic o něco těžší než anautogenní. Dospělý jedinec je tak schopný přežít a další reprodukce (Gulivard a kol., 1984; Sawabe a Moribayashi, 2000).

2.4.3. Vitellogeneze

Vitellogeneze je složitý proces, jehož výsledkem je tvorba zralého vajíčka. Tento proces je řízen několika způsoby. Jedná se o hormonálně-nervové řízení. U komárů se na procesu podílí zejména ekdyson, což je steroidní prohormon hmyzu mající důležitou roli. Produkují ho folikulární buňky ovariol a tato produkce je spuštěna tzv. gonadotropním

neurohormonem, který stimuluje ekdyson. Uvolňování gonádotropního hormonu je stimulováno množstvím krve ve střevě. Hlavní funkcí je utváření tzv. vitellogeninů, což jsou fosfolipoglykoproteiny, které jsou při vitellogenním procesu transportovány do oocytů a jsou tvořeny v ovariích samic komárů (Clements, 1992; Kodrík, 2004).

Složitý proces vitellogeneze probíhá ve třech fázích. Jedná se o previtellogenní, vitellogenní a postvitellogenní fázi. V první tzv. previtellogenní fázi dojde ke zvětšení folikulů a následně tyto folikuly vstoupí do stádia označovaného jako previtellogenní klidové stádium. Obecně previtellogenní fáze probíhá u samic před příjmem krve. Dokud nedojde k příjmu krve, tak vývoj folikulů není zpozorován (Clements, 1992; Fuchs, 1981). Gelbič a Rozsypalová (2012) však pozorovali u anautogenního druhu *Culex quinquefasciatus* vývoj oocytů i bez předchozího sání krve. U tohoto druhu komára došlo k vývoji autogenních vajíček. Tyto vajíčka byla vykladena samicemi několik hodin po nasátí krve.

Cytoplazma každého trophocytu je bohatá na rezervní látky, jako jsou lipidické (tukové) kapénky, glykogen a tři typy proteinových granulí. Jádro je relativně malé a obsahuje fibrilární centrum obklopené hustou granulární částí. Při vývoji se jádro výrazně zvětšuje. V další fázi, a to ve vitellogenní dochází k hlavnímu zahájení vývoje oocytu tím, že dojde k naplnění střeva krví. Při tomto ději navíc dochází k uvolňování různých hormonů, které následně spolu s dalšími hormony (ekdyson) umožňují tvorbu vitellogeninu (Fuchs, 1981; Clements, 1992). Při této fázi dochází k ultrastrukturálním změnám, které jsou detekovány již 3 hodiny po nasátí krve samicí. Dochází k proliferaci ribozomů a endoplazmatické retikulum podstupuje reorganizaci. Vitellogenin je detekován imunofluorescenčně již po hodině příjmu krve, ale jeho nejvyšší hodnota je detekována přibližně 40 hodin od příjmu krve samicí. Cytoplazma vaječné buňky (ooplazma) ve vitellogenní fázi obsahuje lipidické kapky žlutku, ribozómy a také vitellinové krystalky (Clements, 1992). Poslední fází je tzv. postvitellogenní fáze, ve které dojde k dozrání oocytů, tvorbě vaječných obalů a utvoření jejich konečné podoby v charakteristickém tvaru a velikosti. Oplodnění a kladení vajíček samicemi na vhodná místa je provedeno právě v této postvitellogenní fázi. Navíc je zralý oocyt obklopen neztuženým chorionem. Zralá vajíčka jsou následně samicemi vykladena na hladinu stojatých vod nebo na vlhká místa. Jejich počet se velmi liší. Jednak u druhů a jednak v závislosti na okolních podmínkách a také, zda je nebo není daný druh autogenní (Clements, 1992).

Tukové těleso u vitellogenních samic druhu *Aedes aegypti* syntetizuje také zcela odlišný protein. Tento protein se imunologicky liší od vitellogeninu, který je sekretován do hemolymfy a je akumulován vyvíjejícími se oocyty. Tento odlišný protein se dříve nazýval 53KP a později mu byl přidělen název jako vitellogenická karboxylpeptidáza. Protein je velmi specifický. Je syntetizován v tukovém tělese a jeho detekce je možná po čtyřech hodinách od sání krve samicí (Clements, 1992; Kodrčík, 2004). Konečnou fází vitellogeneze je produkce zralého vajíčka.

2.4.4. Gonotrofický cyklus u samic komárů

Gonotrofický cyklus je období od nasátí krve až po kladení vajíček (Kramář, 1958). Toto období zahrnuje několik procesů. Prvním procesem, a to nezbytně nutným, je vyhledávání hostitele, ze kterého samičky sají a poté tráví krev. Následně dochází k vývoji vajíček a vyhledávání místa k ovipozici a celý gonotrofický cyklus se uzavírá vykladením oplozených vajíček. *Culex quinquefasciatus* Say klade vajíčka pouze na hladinu stojatých vod. To znamená, že lokalizace kladení vajíček nezávisí pouze na okolních podmínkách, ale závisí zejména také na druhu komára a také na genetickém podkladu komára. Některé druhy komárů se mohou lišit v množství gonotrofických cyklů. Příkladem toho jsou některé přezimující samičky, které prodělaly pouze jeden cyklus a na druhé straně samičky druhu *Anopheles atroparvus* pěstované v laboratoři, které dosáhly až 18 gonotrofických cyklů (Kramář, 1958). Gonotrofický cyklus je periodou mezi úspěšnými ovipozicemi u hmyzu, kde snůšky obsahující daný počet vajíček jsou vykladeny zhruba ve stejných intervalech a folikuly se vyvíjejí synchronně v různých ovariolách (Tyndale-Biscoe, 1984).

V první gonotrofické fázi označované N, objevující se u čerstvě vylíhlých samic, dochází k vytvoření folikulárního epitelu. Kulovitým tvarem jsou reprezentovány nově vytvořené folikuly. Následuje fáze označovaná jako I, ve které dochází k diferenciaci sesterských buněk, trombocytů a oocytů. Následně v další fázi dochází k vývoji oocytu, jehož objem zabírá polovinu prostoru folikulárního a akumuluje se žloutek. Toto vše se děje v tzv. klidové fázi. V další fázi III. oocyt roste a také množství žloutku nabývá a ve fázi IV. oocyt zabírá již tři čtvrtiny folikulu. Krev je lokalizovaná ve střevě a mění svoje zbarvení v důsledku jejího trávení. V poslední fázi, a to páté, je strávená krev výrazně tmavá a zralá vajíčka zde opouštějí vaječný folikul (Christopher, 1911; Jupp et Collins, 1979; Ryšavý et al., 1989; Gryaznov, 1995; Mahmood et Crans, 1998).

Trávení krve je důležitou součástí vývoje jednotlivých vajíček. Doba trávení a vývoje vajíček závisí především na teplotě, vlhkosti a dalších vnějších faktorech.

2.4.5. Samčí pohlavní systém

Produkovat a uchovávat spermie a následně zajistit jejich transport v životaschopném stavu do samičích pohlavních orgánů je hlavní funkcí samčích pohlavních ústrojí. Pohlavní systém samce je tvořen varlaty (testes) ústícími do rozšířených chámovodů. Do chámovodů ústí také tzv. přídatné žlázy produkující sekret usnadňující páření, který navíc ovlivňuje chování samic. Chámovody ústí do chámometu - trubice transportující semeno přes penis a jeho distální část (Kodrík, 2004).

2.5. Culex quinquefasciatus Say

Rod *Culex* je velmi rozmanitý. Je tvořen řadou příbuzných druhů, a proto se většinou mluví o komplexu komárů *Culex pipiens*. Do tohoto komplexu patří také *Culex quinquefasciatus* Say používaný jako studijní materiál této práce.

Cx. quinquefasciatus je tropický druh komára. Samice tohoto druhu nesají krev pouze ze člověka, ale bodají také ptáky, koně, dobytek, psy, ovce a dokonce také i obojživelníky (Holder et. al., 1999; Lee et. al., 1989).

2.5.1. Rozšíření

Tohoto komára bychom mohli lokalizovat zejména v tropických a subtropických oblastech. Často doprovází lidská sídla. Jedná se také o významného přenašeče závažných onemocnění. Samice druhu *Culex quinquefasciatus* Say nejčastěji kladou vajíčka na povrchy stojatých vod. Nejhojnější výskyt tohoto druhu je zejména v Indii, Africe, jižní Americe, východní Asii a dalších tropických či subtropických oblastech. V Evropě je výskyt potvrzený ve Španělsku, Itálii a UK. V roce 1950 byl *Cx. quinquefasciatus* popsán v Austrálii a na Fidži (Laird, 1996).

2.5.2. Potrava

V přírodě zpravidla sají krev samice, která je důležitá pro jejich životní funkce a hlavně pro vývoj vajíčka, ale také se mohou v přírodě živit nektarem. Samečci nesají krev a živí se právě nejčastěji zmíněným nektarem získaným z květů rostlin (Hůrka a Čepická,

1980). Hlavním zdrojem pro energii komárů jsou rostlinné šťávy, rostlinný cukr, medovice a také ovoce, z jejichž poškozených částí získávají živiny (Becker a Petrić, 2003).

2.5.3. Nemoci přenášené komárem *Culex quinquefasciatus* Say

Díky závažným nemocem, které zmíněný druh komára může přenášet, je kladena velká pozornost k tomuto druhu. Nejčastěji se jedná o arbovirové infekce, které jsou způsobeny RNA viry, které se dostávají z infikovaných komárů do krve hostitele pomocí bodnutí. Tyto viry se v kapilárním endotelu množí zpravidla několik málo dnů. První příznaky se objevují do deseti dnů, někdy i dříve a nemoci lze přenášet mezi člověkem pouze kontaktem s infikovanou krví (Lobovská, 2001).

Cx. quinquefasciatus Say je v některých oblastech světa monitorován. Závažné komplikace způsobuje nejen v Indii, kde přenáší často filariózu a západonilskou horečku, ale i v jižní Americe a v Africe. Závažným onemocněním je horečka Dengue, která je přenášená tímto druhem i na člověka (Maheswaran et al., 2008).

2.6. Autogenie a Anautogenie

Autogenie je velmi pozoruhodný jev, který byl zpozorován u několika druhů komárů. Autogenní proces byl poprvé definován Raubaudem v roce 1929 jako produkce vajíček bez příjmu krve u dospělců komára (Attardo *et al.*, 2005). Obecně je autogenie dějem, kdy samice nepotřebují přijímat krev během jejich prvního ovariačního cyklu.

Za anautogenní samici považujeme takovou samici, která pro svůj první ovariační cyklus zpravidla potřebuje zdroj krve. Anautogenní samice sají krev obsahující proteiny, které jsou nutné k vývoji vajíček. Nejvyšší koncentrace aminokyselin v hemolymfě je dosažena až po 18-ti hodinách od nasání krve (Uchida et al., 1990). Potrava - krev, která obsahuje proteiny, slouží jako žloutkový prekurzor a stimulant pro hormonální regulaci k dozrávání vajíčka (Telang, 2005).

Autogenní bychom mohli rozlišit na dva typy. Prvním typem autogenie je tzv. fakultativní autogenie. To znamená, že samice komárů vyprodukovaly první snůšku vajíček autogenně bez příjmu krve, ale pro další nové snůšky již byla potřeba krev, která je hlavním zdrojem pro jejich tvorbu. První snůška vždy obsahuje menší počet vajíček, protože je autogenní a následující nově vzniklé anautogenní snůšky již mají větší množství vajíček. Druhým typem autogenie je obligátní. Ta se rozděluje na dva podtypy. V prvním

podtypu obligátní autogenie samice nesají krev po celou dobu své existence (O'Meara a Evans, 1973; Clements, 1992). Obligátní autogenie je typická u amerických populací komárů u druhu *Wyomyia smithii* a *Aedes churchillensis* (Gelbič a Rozsypalová, 2012). V druhém případě se jedná o obligátní autogenii, kde samice nesají krev v prvním ovariálním cyklu i v přítomnosti hostitele a mají své zásoby z larválního stádia (van Handel, 1985). Také je nutno zmínit tzv. stupeň autogenie, což je určité procentické zastoupení samic, jejichž ovariální folikuly jsou ve III. a dalším stádiu bez příjmu krve. Pokud by tyto samice přijímaly krev, potom popisovaný stupeň není stupněm autogenie (Kassem et al., 2003).

Rozdíl mezi autogenní a anautogenní populací je velmi značný. Anautogenní samice produkují větší množství vajíček, které se pohybuje často nad hodnotu 100-150. Naopak u autogenních je hodnota přibližně poloviční a někdy bývá počet vajíček zanedbatelný. Odlišnosti bychom mohli sledovat i v délce larválního vývoje, která je navíc ovlivněna vnějšími faktory, kde hraje velkou roli teplota prostředí. Výsledný počet vajíček je dán zmíněným množstvím živin v larválním stádiu. Významnou roli hrají zásoby glykogenu, bílkovin, tuků a genetické faktory. Vliv na autogenii má i příjem cukrů v dospělosti (Telang, 2005). Larvy autogenních samic jsou těžší díky těmto zásobám. Zásoby přetrvávají až do dospělosti a díky tomu je jedinec schopný další reprodukce a životaschopnosti (Gulivard a kol., 1984; Sawabe a Moribayashi, 2000).

Autogenie byla poprvé zpozorována v severní části Palaearktické oblasti u druhu *Cx. pipiens*. Jednalo se o malou izolovanou autogenní populaci, která se velmi vzácně křížila s anautogenními populacemi. Tato původní autogenní populace se rozmnožovala pod zemským povrchem. Jednalo se zejména o septické nádrže a zaplavené sklepní prostory, kde byla výrazná známka přítomnosti různých kontaminací organickými odpady. Autogenní formy nejsou schopné zimní diapauzy. Na rozdíl tomu k vývoji anautogenních forem dochází nad zemským povrchem v neznečištěných vodních plochách. Autogenní formy bychom mohli nazvat jako stenogamní, protože mají velmi malý prostor k rozmnožování a anautogenní formy nazýváme jako eurygamní, což znamená, že dochází k rozmnožování a páření v mnohem větším prostoru. Tyto formy sají krev nejčastěji z ptáků a mají zimní diapauzu (Clements, 1992).

U většiny samic jev autogenie není velmi častým. Pokud k tomuto ději dojde, tak u samic je většinou první ovariální cyklus dokončen autogenním způsobem a následující

cyklus je již dokončen anautogenním způsobem (Clements, 1992; Olejníček, 1995). *Cx. quinquefasciatus* a *Cx. mollestus* vykazují hojně autogenní. Z laboratorních chovů je nutno zdůraznit chov populace *Culex quinquefasciatus* Say pocházející z oblasti Hyderabadu v Indii v laboratořích Entomologického ústavu Biologického centra Akademie věd České republiky v Českých Budějovicích, kde byla tato populace udržena autogenně neuvěřitelných 20 let bez příjmu krve.

Významnou roli hraje genetická výbava jedince neboli genotyp. Becker a kol. (1999) uvádějí, že autogenie je regulována alelou v lokusu ležícím na třetím chromozómu. Navíc množství autogenních populací *Culex pipiens* je závislé na prostředí, ve kterém se vyvíjí. Dále uvádějí, že nejvíce autogenních komárů se vyskytuje ve spojitosti s podzemní eutrofickou vodou, kde mají larvy komárů dostatek živin. Na druhé straně nejméně autogenních populací se vyskytuje v nadzemních vodních plochách, jako jsou sudy, vědra či zahradní jezírka. Díky tomuto výzkumu došli k závěru, že autogenní populace se převážně rozmnožují v septických nádržích a žumpách ve spojitosti s lidskými sídly.

Ashraf a Ahmed (2012) zjistili, že někteří komáři nepřežívají ve sladké vodě, nýbrž pouze ve slané. Příkladem toho je druh *Ae. caspius*. Jedná se o anautogenní populaci, která byla nalezena v Saúdské Arábii. Je však zajímavé, že v laboratorních podmínkách se zmíněný druh vyvíjel i ve sladké vodě. Robertson a MacLeod (1993) uvádějí, že pomocí nefunkčních pseudogenů obsahujících stop signály dojde k odstranění čtecího rámce či k chybným mutacím, které buď naruší otevřený čtecí rámec nebo produkují neaktivní transponázy. To znamená, že komár druhu *Ae. caspius* má schopnost zapnutí a vypnutí genu na základě podmínek vnějšího prostředí, což vysvětluje možnost se vyvíjet ve sladké či slané vodě.

Autogenní forma byla také prokázána a studována v arktických oblastech Kanady (Corbet, 1964). Ten uvádí, že ovaria většiny samic se vyvíjí pouze do druhého stádia. Autogenie zde byla pozorována u druhu *Aedes communis*. Je zajímavé, že i přes tyto drsné klimatické podmínky dochází k zachování autogenních populací. Laboratorní kolonie komárů druhu *Aedes aegypti* jsou většinou anautogenní formy, zato z devatenácti afrických populací bylo popsáno až 14 autogenních forem tohoto druhu (Trpis, 1977).

Velké procento různých druhů komárů se vyvíjí ve slané vodě. Jedná se také o autogenní formy. Příkladem je *Aedes atropalpus* či *Anopheles hilli*. Takové komáry nalezneme v přímořských oblastech vyskytujících se v blízkosti bažin, mangrovových porostů či různých podzemních jezírek se slanou vodou. Výskyt autogenních forem různých druhů komárů je vázán také na geografické oblasti. *Cx. pipiens* a *Ae. atropalpus* se vyskytují více v severních šířkách a na druhé straně *Cx. quinquefasciatus* a *Ae. epactius* se vyskytují v jižních šířkách. Skoro celá populace druhu *Ae. taeniorynchus* v oblastech severní Ameriky je autogenní. Např. 75-94% samic tohoto druhu v oblasti jižní Floridy je autogenní. Faktory genetické a faktory vnějšího prostředí ovlivňují autogenii velmi výrazně. Nutriční hodnota ve vývoji autogenních populací hraje výraznou roli. Pokud v larválním stádium není dostatek živin, tak se značně redukuje populace a dochází ke zhoršení jejich vývoje. Výrazný podíl zde hraje typ potravy. Vliv cukru má jednu z nejvýznamnějších rolí ve vývinu autogenních populací. Corbet (1964) uvádí, že u druhu *Ae. impiger* a *Ae. nigripes* nedojde k zahájení procesu vitellogeneze do té doby, dokud tyto druhy samic nepřijmou ve své potravě cukr zejména z nektaru.

Dalším důležitým faktorem je fotoperioda, vlhkost a hlavně teplota. Z hlediska fotoperiody bylo zpozorováno vyšší procento autogenie u kratších dní, což dokládá, že v jarním a podzimním období je autogenie nejvyšší. To nesouvisí jen s délkou dne, ale také i s teplotou. Středně vysoké teploty dávají ideální podmínky pro vývoj autogenních populací. Naopak za příliš vysokých teplot, zejména v létě, je autogenie výrazně nižší (Service, 1985; Clements, 1992; Sota a Mogi, 1994).

3. Cíl práce

Cílem mé bakalářské práce je zjištění faktorů, které by mohly indukovat autogenii u anautogenního druhu *Culex quinquefasciatus* Say. Indukování autogenie a její následné přenesení do terénu by výrazně přispělo ke snížení rizika přenosu patogenních organismů na člověka i domácí zvířata. Studovaný druh komára pochází z oblasti Pondicherry v Indii, odkud byl přivezen do tehdejšího Československa pro výzkumné účely prof. Vávrou. V laboratorních podmínkách Entomologického ústavu BC AV ČR je chován od roku 1985.

4. Materiál a metodika

4.1. Metodika chovu

Studie a pokusy probíhaly u druhu - *Culex quinquefasciatus* Say patřícího do komplexu *Culex pipiens*. Zmíněný druh pochází z laboratoří Hygienického ústavu v Pondicherry, Indie. Do tehdejšího Československa byl dovezen prof. Vávrou. Ve speciální chovné laboratoři Entomologického ústavu Biologického centra Akademie věd České republiky v Českých Budějovicích se chová tento druh od roku 1985. Chovy probíhají v teplotě $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperiodě 16:8 a relativní vlhkosti $75\pm 5\%$. Dospělci jsou chováni ve speciálních chovných plexi-boxech (Olejníček, 1993). Jako potrava jim slouží kostka cukru a odstátá sladkovodní voda. Jednou až dvakrát týdně je podávána laboratorní myš. Součástí boxů je plastová miska s vodou, kam samice kladou vajíčka. Po vykladení jsou plastové krabice vyměněny za nové. Líhnoucím larvičkám je podáván pangamin (sušené pivovarské kvasnice) ad libidum. V těchto krabicích probíhá celý vývoj. Vylíhlá imaga jsou vypouštěna do chovných boxů. Ze základních chovů byla odebírána vajíčka pro studijní účely.

Snůšky pro studijní účely obsahovaly v průměru 114 vajíček. Po vylíhnutí (embryonální vývoj trvá 48 hod.) byly odebírány larvičky 1. instaru v množství pohybujícího se okolo 100 - 150 do speciálních plexi-krabiček se 100 ml odstáté sladkovodní vody. Ty byly vloženy do malých plexi boxů o rozměrech 30 x 20 x 15 cm. Poté byly umístěny jednak do laboratorní teploty a jednak do termostatů o teplotě $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperiodě 16:8 a relativní vlhkosti opět $75\pm 5\%$. Vedle vlivu teploty na indukci autogenie probíhala i studie vlivu potravy na tento proces. Ve všech třech případech se larvy krmily buď pangaminem nebo potravou pro živorodé rybičky - Tropical fish flakes.

Sledovala se rychlost vývoje v larválním a kuklovém stádiu, počet vykladených vajíček a jejich líhnivost a především sledování přetrvávání autogenie v dalších generacích. Dospělci byli chováni v množství 20 samců a 20 samic a také 30 samců a 30 samic ve zmíněných plexi-boxech. Samice kladly autogenní vajíčka na hladinu pravidelně dodávané vody v kalíšku. Nová autogenní vajíčka byla pomocí plastové pipety odebrána a spočítána. Spočítaná vajíčka byla umístěna do chovných boxů, kde probíhal celý vývoj. Sledovala se mortalita larev, počet kukel a počet vylíhlých dospělců.

Tyto pokusy se opakovaly celkem 5 x s počtem 500 - 600 larviček, aby bylo docíleno co největšího množství autogenních vajíček a následně jsem mohl usuzovat, která teplota a která potrava výrazně indukuje autogenii.



Obr.7.: Speciální velké plexi-klece sloužící pro chov tropických komárů (foto: D. Šefčík 2016).



Obr.8.: Malá plexi-klec sloužící k vlastním laboratorním chovům komárů druhu *Culex quinquefasciatus* Say (foto: D. Šefčík 2016).

4.2. Metodika rozlišení pohlaví

Pohlaví bylo rozlišeno nejčastěji pouhým okem dle tykadel. Samečci mají velká četně větvená tykadla, ale samice naproti tomu mají ochlupení tykadel řídké a velmi krátké (viz Obr. 9, 10). Tykadla mají svou vlastní funkci, pomocí které samci v roji rozpoznávají samice. Také jsou velmi citlivá na zvuk. Dalším znakem pro rozlišení pohlaví je přítomnost bodavě sacího sosáku, který mají pouze samice (Hůrka a Čepická, 1980).



Obr.9.: Makrofotografie tykadel samečka komára druhu *Culex quinquefasciatus* Say.



Obr.10.: Makrofotografie tykadel samice komára druhu *Culex quinquefasciatus* Say.

/Obr.9., 10. byly použity z webové stránky: <http://www.catfish.cz/ruzne/komar/komar.htm/>

4.3. Pokusný materiál

4.3.1. Krmiva pro larvy komárů

Pangamin neboli lyofilizované pivovarské kvasnice jsou standardní potravou pro larvy laboratorních chovů. Rozdrcené tablety pangaminu byly podávány larvám ad libitum. Larvy se tak mohou vyvíjet a plnit veškeré životní funkce. Pangamin obsahuje jednak komplexní spektrum B vitamínů, ale i spoustu bílkovin a minerálních látek. Zdroj bílkovin hraje klíčovou roli ve vývinu larev komárů. Z vitamínů obsahují zejména B1, B2, B3, B6, B9, B12 a vzácně B15. Z minerálních látek obsahují především selen, fosfor, chrom, draslík, železo, vápník, zinek, měď a mangan.

Tropical fish flakes je o univerzální krmění pro živoroďé rybičky, které bylo použito jako krmný zdroj pro larvy komárů *Culex quinquefasciatus* Say. Tato směs byla rozmělněna na prášek, kterým byly larvy krmeny. Použitě krmivo je plnohodnotnou a vyváženou potravou pro akvarijní ryby, ale i pro jiné vodní organismy. Larvy komárů ve vodním prostředí získávají mnoho živin z tohoto produktu. Jedná se zejména o bílkoviny a tuky. Jejich hlavním zdrojem jsou obiloviny, rybí moučka, řasy, kvasnice a produkty z ryb. Kromě toho navíc obsahují vitamín A, C, a E.

5. Výsledky

5.1. Vliv teploty na vývoj komárů

Larvy, kukly a dospělci komárů *Culex quinquefasciatus* Say byly vystaveny třem rozdílným teplotám a byly pozorovány jejich odlišnosti v rychlosti vývoje, v množství nově vykladených vajíček a jejich líhivosti. Ukázalo se, že teplota má opravdu výrazný vliv jednak na rychlost larválního vývoje a také na množství samiček kladoucích autogenní snůšky. Zpravidla se líhnou první samci a poté samice. Získané výsledky ukazuje graf č.1.

Vývoj komárů v laboratorní teplotě

Pokusní jedinci komára *Culex quinquefasciatus* Say chovaní v laboratorní teplotě (kolem 22°C) se vyvíjeli nejpomaleji. Délka larválního vývoje byla $11,00 \pm 2,16$ dnů. Došlo také k prodloužení kuklového stádia v průměru o 24-30 hod. Nižší bylo množství získaných dospělců, které činilo v průměru $32,00 \pm 12,02$. Celkový vývoj komárů v laboratorní teplotě trval od vylíhnutí z vajíčka po výlet dospělého průměrně 14 dní. Mortalita byla velmi vysoká.

Vývoj komárů chovaných při teplotě 25 ± 1 °C

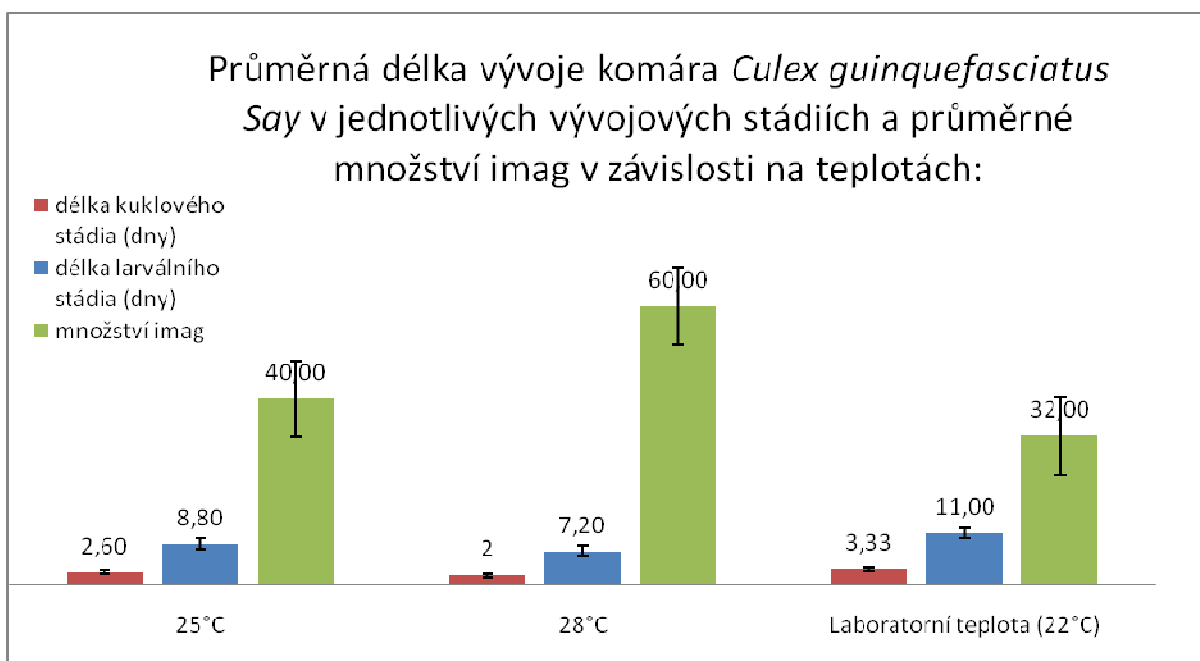
Délka larválního vývoje byla velmi krátká a pohybovala se průměrně okolo 8 - 9 dnů. Kuklové stádium trvalo průměrně 2-3 dny. V této teplotě byl počet dospělců větší. Jejich množství se pohybovalo v průměru $40,00 \pm 30,19$. Celkový vývoj od vylíhnutí z vajíčka po výlet dospělého komára trval v průměru 10-11 dní.

Vývoj komárů ve 28 ± 1 °C

Délka larválního stádia činila v průměru $7,20 \pm 0,40$ dnů a kuklové stádium trvalo pouze 48 hodin. Celkově vývoj komára od vylíhnutí z vajíčka až po výlet dospělého trval 9 dnů, což je velmi krátký interval na rozdíl od nižších teplot. Počet dospělců činil v průměru $60,00 \pm 33,94$ a jejich mortalita nebyla tak výrazná.

Tab.I: Průměrná délka vývoje komára *Culex quinquefasciatus* Say v jednotlivých vývojových stádiích a průměrné množství imag v závislosti na teplotách:

| Teplota | 25°C | 28°C | Laboratorní teplota (22°C) |
|-------------------------------|-------------|-------------|----------------------------|
| Délka larválního stádia (dny) | 8,80±1,94 | 7,20±0,40 | 11,00±2,16 |
| Délka kuklového stádia(dny) | 2,60±0,48 | 2±0 | 3,33±0,47 |
| Množství imag | 40,00±30,19 | 60,00±33,94 | 32,00±12,02 |



Graf č.1.: Průměrná délka vývoje komára *Cx. quinquefasciatus* Say v jednotlivých vývojových stádiích a průměrné množství imag v závislosti na teplotách.

5.2. Vliv potravy na vývoj komárů

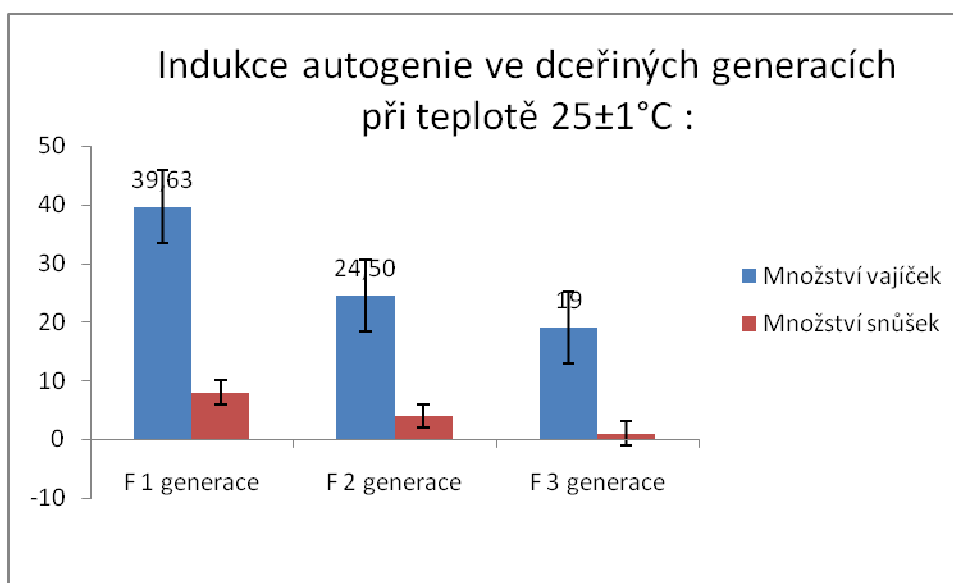
U pokusných jedinců krmených v larválním stádiu potravou pro živorodé rybičky - Tropical fish flakes byl vývoj od vylíhnutí z vajíčka po výlet dospělé rychlejší než u larev krmených Pangaminem. V průměru se lišil pouze v řadách desítek hodin až po max. 1-2 dny. Většina larev krmených touto potravou byla větší na rozdíl od skupiny krmené lyofilizovanými pivovarskými kvasnicemi. Tyto rozdíly jsou dány zejména složením a rozdílnou nutriční hodnotou v potravě.

5.3. Indukce autogenie teplotou a potravou

5.3.1. Indukce autogenie teplotou

Získané výsledky ukázaly, že teplota má velký vliv na indukci autogenie. U pokusných jedinců chovaných v laboratorní teplotě $22\pm 1^\circ\text{C}$ byla indukce autogenie velmi nízká. Ze všech opakování byla zaznamenána pouze jedna autogenní snůška s malým počtem vajíček. Z 21 autogenních vajíček se vylíhlo 13 larviček. Z toho se zakuklilo pouze 6 jedinců. Dospělců se vylíhlo 6, z čehož byli 4 samci a pouze 2 samice. V následné generaci nebyla produkce autogenních vajíček pozorována.

Indukce autogenie u pokusných jedinců chovaných v teplotě $25\pm 1^\circ\text{C}$ byla daleko vyšší. V první generaci dohromady 8 samic vykladlo autogenní snůšky, ve kterých bylo v průměru $39,63\pm 10,42$ vajíček. Autogenie se udržela i následujících dceřiných generacích. Počty samic kladoucích autogenní snůšky však klesal. Klesal i počet vajíček v jednotlivých snůškách. Výsledky jsou shrnuty do grafu č. 2.

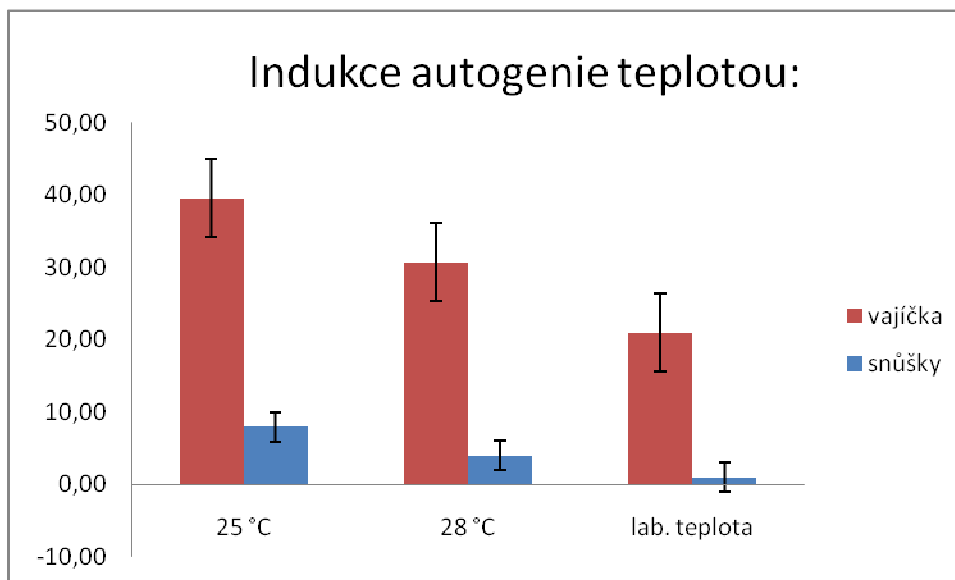


Graf č.2.: Indukce autogenie v následujících generacích u komára *Culex quinquefasciatus* Say při teplotě $25\pm 1^\circ\text{C}$.

Indukce autogenie u pokusných jedinců chovaných v teplotě $28\pm 1^\circ\text{C}$ byla nižší. V první generaci autogenní snůšky vykladly 4 samice. Autogenní snůšky obsahovaly průměrně $30,75\pm 12,79$ vajíček. Autogenie se udržela také v následující generaci, avšak počet

samic kladoucích autogenní snůšky opět výrazně klesal spolu s množstvím jednotlivých vajíček.

Výsledky vlivu teploty na průměrné množství vykladených autogenních vajíček jsou shrnuty v grafu č. 3, ze kterého vyplývá, že k nejčastější indukci autogenie došlo při teplotě 25 °C.

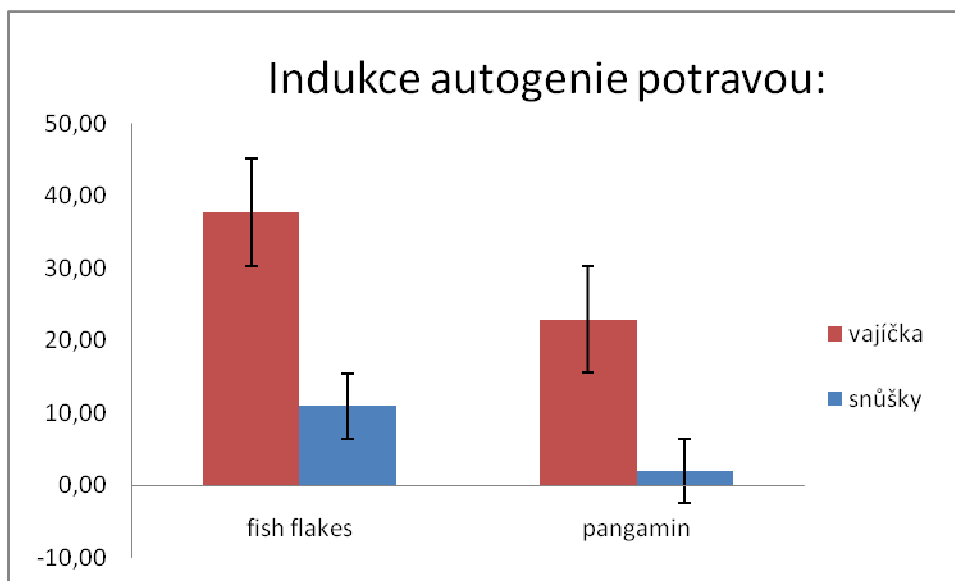


Graf č.3.: Celkové množství autogenních snůšek a průměrné množství vajíček u komára *Culex quinquefasciatus* Say v závislosti na teplotách.

5.3.2. Indukce autogenie potravou

Pouze 2 samice kladly autogenní snůšky, které byly v larválním stádiu krmeny lyofilizovanými pivovarskými kvasnicemi. Snůšky obsahovaly v průměru 23 ± 2 vajíček. Následující generace se během všech opakování dále neobjevovala.

Nejvyšší množství autogenních snůšek bylo zaznamenáno u komárů krmených v larválním stádiu potravou pro živorodé rybičky. V první generaci 11 samic vykladlo autogenní snůšky, ve kterých bylo v průměru $37,73 \pm 6,20$ vajíček. Klazení autogenních snůšek bylo pozorováno i v následných F2 a F3 generacích. Počet autogenních snůšek byl však ve srovnání s F1 generací nižší. Nižší bylo i množství vajíček v jednotlivých snůškách. Vliv potravy na produkci autogenních snůšek a průměrném množství vajíček je ukázán v grafu č. 4.



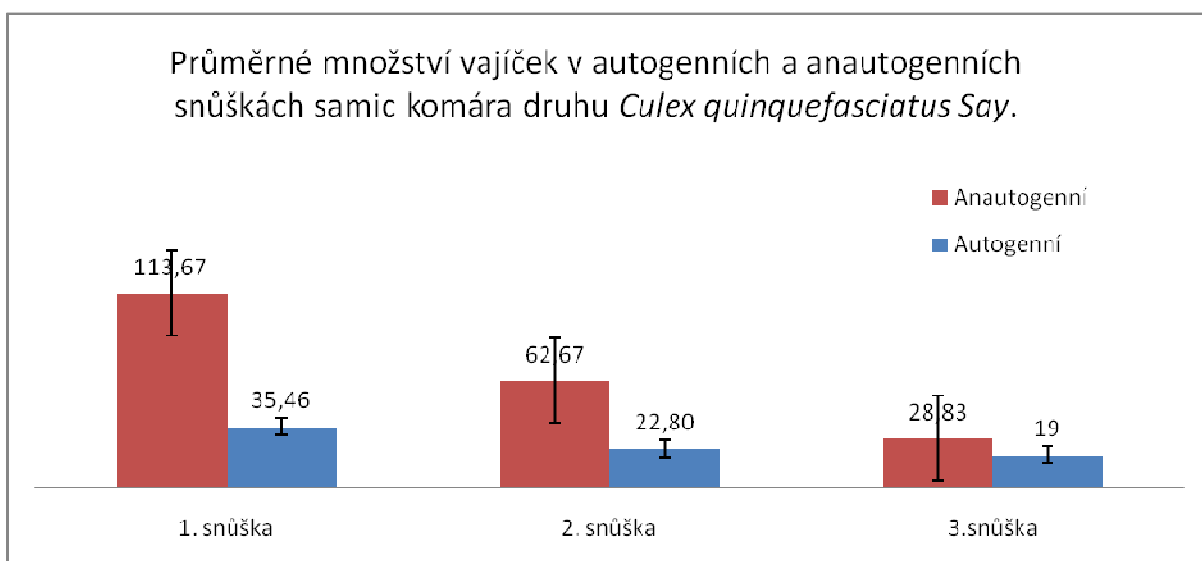
Graf č.4.: Průměrné množství autogenních vajíček a celkové množství snůšek u komára *Culex quinquefasciatus* Say v závislosti na potravě.

5.4. Porovnání autogenních x anautogenních populací

Výsledky ukázaly výrazné rozdíly mezi autogenními a anautogenními populacemi komárů druhu *Cx. quinquefasciatus* Say. V autogenní populaci komárů bylo celkem 13 samic, které vykladly autogenní snůšky obsahujících v průměru $35,46 \pm 12,28$ vajíček. U samic, které vykladly anautogenní snůšky, bylo průměrné množství vajíček $113,67 \pm 16,94$. V následujících dceřiných generacích množství vajíček výrazně klesalo. Tyto výsledky jsou shrnuty v grafu č. 5.

Tab.II.: Průměrné množství autogenních a anautogenních vajíček ve snůškách komára *Cx. quinquefasciatus* Say.

| Populace | Průměrné množství vajíček | | |
|--------------------|---------------------------|-------------------|------------------|
| | 1. snůška | 2. snůška | 3. snůška |
| Autogenní | $35,46 \pm 12,28$ | $22,80 \pm 10,83$ | 19 ± 0 |
| Anautogenní | $113,67 \pm 16,94$ | $62,67 \pm 16,91$ | $28,83 \pm 7,98$ |



Graf č.5.: Průměrné množství vajíček v autogenních a anautogenních snůškách samic komára druhu *Culex quinquefasciatus* Say.

6. Diskuse

Získané výsledky ukazují, že je možné pomocí studovaných faktorů indukovat produkci autogenních vajíček u tohoto anautogenního druhu, který se řadí mezi významné vektory řady onemocnění.

Vývoj komárů v odlišných teplotách byl sledován Meolou a Tvetenem (1988). Z jejich výzkumu vyplynulo, že při teplotě 27 °C trval larvální vývoj okolo 6 dnů, zato při nižších teplotách okolo 15-18 °C vývoj trval v průměru 15-22 dní. Dle z jejich výzkumu lze říci, že čím je vyšší teplota, tím je kratší doba vývoje komárů. Toto bylo potvrzeno i v našem pokusu, kde v teplotě 22±1 °C trval larvální vývoj v průměru 11,00±2,16 dní a ve vyšší teplotě 28±1 °C trval vývoj v průměru pouze 7,20±0,40 dní (viz graf č.1).

Teplota je faktor, mající výrazný vliv na autogenii a také na celkovou rychlost vývoje komárů. Vlivem teploty na autogenii se zabýval Tveten a Meola (1988). V jejich pokusech byly laboratorní chovy komárů nejprve ve 27 °C, 14:10 (L:D) a 21 °C, 10:14 (L:D) v Texasu a následně na Floridě, kde byly chovy v nižších teplotách, a to v 18 °C a 15 °C. Výsledky ukázaly, že procento autogenie velmi kolísalo s měnícími se teplotami. V teplotě 27 °C bylo procento autogenie rovno 39%. V 18°C bylo menší a činilo jen 19% a v nejnižší teplotě byla hodnota rovna pouze 7%. S klesající teplotou také výrazně klesal počet kladených autogenních vajíček samicemi. V nejvyšší teplotě 27°C bylo v průměru 20,9±2,6 vajíček. V nižších teplotách v 18°C bylo v průměru 16,5±3,7 vajíček a v 15 °C jen 13,2±2,1 vajíček. Získané hodnoty u druhu *Culex quinquefasciatus* byly rozdílné. Množství autogenních vajíček vykladených tímto druhem chovaným v teplotě 28±1°C byl nižší. Naproti tomu byl vyšší počet autogenních vajíček zpozorovaný v teplotě 25±1°C (viz graf č. 3). Získané výsledky potvrzují, že je možné optimální teplotou indukovat produkci autogenních vajíček.

Řada autorů také sledovala vliv teploty na autogenii v terénu během roku u druhu *Cx. tartalis*. (Moore, 1963; Sota a Mogi, 1994). Tito autoři uvádějí, že výskyt autogenie je nejvyšší během jarních a podzimních měsíců a naopak během letních měsíců se vyskytuje jen zřídka. Dále Moore (1963) sledoval množství autogenních vajíček v jarním, letním a podzimním období během 2 let. V březnu, kdy teploty nedosahují vysokých hodnot, bylo v autogenních snůškách v průměru až 116 vajíček a v červnu v průměru 100 vajíček. Na druhé straně v letních měsících při vysokých teplotách, v červenci a srpnu, byl počet silně redukován a v průměru bylo během července 56 vajíček/snůšku a během srpna jen

54 vajíček/snůšku. V našich laboratorních chovech ve 25 ± 1 °C byla průměrná hodnota v množství autogenních vajíček v první generaci rovna $39,63\pm 10,42$. Z toho největší množství vajíček bylo právě v této první generaci. Průměrná hodnota 25 ± 1 °C je většinou charakteristická v období jaro/léto. Moore (1963) dále zmiňuje procentické zastoupení autogenních samic v závislosti na ročním období. Z tohoto monitorování zjistil, že v červnu byla hodnota autogenních samic velmi vysoká a pohybovala se okolo 92 %, zato v červenci tato hodnota klesla na pouhých 35 %. V našem výzkumu bylo při průměrné teplotě 25 ± 1 °C charakterizující průměrnou teplotu pro červen zjištěno nejvyšší množství samic, které vykladly autogenní snůšky. Jejich počet v první generaci byl roven 8. Z výsledků těchto autorů vychází, že autogenie je nejvyšší za středně vysokých teplot a kratších dní, což má spojitost i s fotoperiodou. To bylo potvrzeno i v mém výzkumu. V našich laboratorních chovech byla autogenie nejvyšší ve 25 ± 1 °C, kdy byly detekovány dohromady až 3 generace autogenních komárů. Zmínění autoři dále podotkli, že s přibývajícím generací ubývá množství vajíček ve snůškách. To bylo zpozorováno i u nás, kde v první generaci bylo detekováno v průměru $35,46\pm 12,28$ vajíček, ve druhé generaci $22,80\pm 10,83$ a ve třetí již jen jedna snůška s 19 vajíčky. Tyto hodnoty mají návaznost na výsledky zmíněných autorů, kdy autogenie není tak častá za vysokých teplot. Pouze byl zrychlený larvální vývoj v jednotlivých stádiích. V laboratorní teplotě činící v průměru 22 ± 1 °C byla autogenie minimální.

Dle našeho výzkumu a popisů zmíněných autorů lze říci, že k nejvyšší indukci autogenie dochází při teplotě 25 ± 1 °C, která je charakteristická pro červnové období. Extrémně nízké a extrémně vysoké teploty nemají vliv na autogenii. Aby došlo k vývoji početnější populace autogenních komárů, musí být larvy komárů vystaveny vysoké nutritivní hodnotě během vývoje.

Tento předpoklad potvrzuje studie od Service (1985) provedená s druhy *Aedes caspius* a *Cx. quinquefasciatus* Say. Ukázalo se, že skupina komárů, která byla krmena potravou s vysokou nutriční hodnotou, produkovala mnohem více autogenních snůšek, než skupina krmena potravou s nízkou nutritivní hodnotou. Množství vajíček u komárů, které byli vystaveny bohaté larvální výživě, se pohybovalo kolem 100, zatímco ve druhé skupině o polovinu méně. Tyto výsledky můžeme porovnat s našimi pokusnými výsledky v laboratoři. Samice druhu *Cx. quinquefasciatus* Say, které kladly autogenní snůšky a byly krmeny bohatou potravou pro živorodé rybičky, obsahovaly výrazně více vajíček v jednotlivých

snůškách. Frekvence snášení autogenních snůšek těmito samičkami byla častější, než u skupiny s chudou nutritivní hodnotou. Navíc vývoj larev komárů krmené potravou pro živorodé rybičky byl rychlejší, než u skupiny krmené pangaminem (viz graf č.4).

Nutritivní hodnotou během larválních stádií se také zabývali Lea (1964) a Corbet (1964). Tito dva autoři uvádějí, že nutritivní hodnota a zdroj cukru výrazně ovlivňuje procento autogenie. Lea (1964) zmiňuje, že u komárů s malou nutritivní hodnotou a bez zdroje cukru došlo k vývinu pouze dvou procent autogenních samic, zato ve skupině s bohatou potravou a se zdrojem cukru došlo k navýšení procenta autogenie na 14 %. To dokládá, že nejen potrava, ale také i zdroj cukru (nektar) má vliv na indukci autogenie.

Becker (1999) uvádí, že v septických nádržích či žumpách dochází k nejvýraznějšímu autogennímu rozmnožování komářích populací. To je díky velkému množství živin. Ty jsou využity do larválních zásob komárů. To bylo zpozorováno i u našich autogenních larev, které byly o něco větší, než larvy anautogenních komárů. Důsledkem je ukládání zásob většinou ve formě tuků a glykogenu. Díky těmto zásobám dochází ke vzniku dalších autogenních populací. Tyto předpoklady zmiňují i autoři Telang et al., (2005) u autogenních larev komárů u druhu *Oc. atropalpus*. Larvy, které byly vysoce ovlivněny larvální výživou, byly podstatně těžší a bohatší na tuky a glykogenové zásoby, než larvy s malým množstvím živin. Zajímavé však bylo, že larvy s malým množstvím živin obsahovaly více proteinů. Navíc vysoká nutriční hodnota v larválním vývoji měla vliv na velikost těla komárů, na délku jejich křídel a na množství zralých vajíček.

Telang (2005) se dále zabývá množstvím autogenních vajíček u samic druhu *Oc. atropalpus*, které byly ve svém larválním vývoji vystaveny vysokému množství živin. Výsledky ukázaly, že z nutričně bohaté skupiny tohoto druhu bylo ve snůšce celkem 162 vajíček, zatímco u nutričně chudé skupiny bylo vajíček zřetelně méně, a to 70. V našich výzkumech nebylo množství autogenních vajíček tak vysoké. Tyto lišící se hodnoty mohou být způsobeny jednak genetickou výbavou komára, ale také i vlhkostí a fotoperiodou a lišícím se druhem dospělce.

Tveten a Meola (1988) se dále zabývali vlivem nutričních hodnot během larválního stádia komárů. Skupina larev komárů, které bylo dohromady poskytnuto 900 mg potravy, vykazovala nejnižší autogenii. Množství autogenních vajíček bylo v průměru $23,2 \pm 2,0$ a zato u skupiny, které bylo poskytnuto až 1980 mg potravy, bylo detekováno v průměru

159±1,0 autogenních vajíček. Náš pokus ukázal velmi podobné výsledky. Z těchto výzkumů lze říci, že čím je větší množství potravy, tak tím je procento autogenie a množství autogenních vajíček vyšší.

Fox (1994) se zabývá rozdílem mezi množstvím autogenních a anautogenních vajíček ve snůškách komárů druhu *Culiseta inornata*. Jeho výsledky ukazují, že množství vajíček u anautogenní snůšky výrazně převyšuje. Průměrné množství vajíček v těchto snůškách bylo 166,7±9,1. U samic kladoucích autogenní snůšky bylo v průměru v první generaci 27,4±1,2 vajíček. To se shoduje i s naším výzkumem, kde množství anautogenních vajíček výrazně převyšovalo nad autogenními (viz graf č.5).

Studia teploty a potravy na indukci autogenie u zmíněných autorů se většinou shoduje s mými pokusy. Každá malá změna teploty a potravy vede k narušení vývoje komárů všech druhů.

7. Závěr

Cílem předložené studie bylo zjištění, zda-li může být rozdílnými teplotami či potravou navozena u anautogenního druhu *Culex quinquefasciatus* Say produkce autogenních vajíček bez předchozího sání krve. Ze studií vyplývá, že k nejvyšší produkci autogenních snůšek dochází v populaci komárů chovaných v teplotě $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ a krmených potravou pro živorodé rybičky. Cílem studie bylo nadále zjistit zásadní rozdíly mezi autogenními a anautogenními samicemi, zejména v množství kladených snůšek a vajíček a také zjistit odlišnosti v délce vývoje komárů od vylíhnutí z vajíčka až po dospělce. Studované rozdíly byly značné. U samic kladoucích autogenní snůšky se detekovalo průměrně $35,46\pm 12,28$ vajíček a u anautogenně kladených snůšek mnohem více, a to až $113,67\pm 16,94$ vajíček. Se zvyšující teplotou se velmi snižovala doba vývoje komárů. Zásadně s přibývajícím generací ubývá množství vajíček ve snůškách. Souhrnně lze potvrdit, že teplotou i potravou bohatou na živiny je možné u anautogenního druhu *Culex quinquefasciatus* Say indukovat autogenii.

8. Použitá literatura

APARNA TELANG, YIPING LI, FERNANDO G. NORIEGA AND MARK R. BROWN (2005). Effects of larval nutrition on the endocrinology of mosquito egg development. *The Journal of Experimental Biology* 209, p. 645-655.

ASHRAF, M. AHMED, (2012). Mosquito autogeny in *Aedes caspius* (Diptera: Culicidae): Alterations of larval nourishments reservation upon bacterial infection. Zoology Department, College of Science, King Saud University, Saud Arabia, p. 1-20.

ATTARDO, G.M., HANSEN, I.A. AND RAIKHE, A.S. (2005). Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: Implications for anaotogeny. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35, p. 661–675.

BECKER, N., JOST, A., STORCH, V., WEITZEL, T. (1999). Exploiting the biology of urban mosquitoes for their control. International conference on Urban Pests, Germany. p. 425–429.

BECKER, N., et al. (2003). *Mosquitoes and their control*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, ISBN 0-306-47360-7. 498 pp.

BROWN, A. W. A., (1951). Studies of the Responses of the Female Aedes Mosquitoes. Part IV. *Bull. Ent. Res.*, London, 42 (3) : p. 575-582.

BROWNE, L.B. (2001). Quantitative aspects of the regulation of ovarian development in selected anaotogenous Diptera: integration of endocrinology and nutrition. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 100: p. 137–149.

BUCHAR, J., DUCHÁČ, V., HŮRKA, K., LELLÁK, J. (1995). Klíč k určování bezobratlých, Scientia, Praha, 285 pp.

CLEMENTS, A. N. (1992). Mosquitoes: The Biology of Mosquitoes, Development, Nutrition and Reproduction, Volume 1. London : Chapman and Hall, ISBN 0-412-40180-0. 509 pp.

DOBROTWORSKÝ, N.V. (1965). The Mosquitoes of Victoria. Melbourne University Press, London and New York, Cambridge University Press., 237 pp.

FOX, A. S. (1994). Autogenous-anaotogenous oviposition in *Culiseta inornata* from Manitoba, Canada. Department of Entomology, University of Manitoba, Canada. Vol.10, p. 125-126.

FUCHS, M. S., et al. (1981). Endocrine control of ovarian development in an autogenous mosquito. *Regulation of Insect Development and Behaviour International Conference*, p. 569-590.

GELBIČ, I. AND ROZSYPALOVÁ, P. (2012). Autogeny induced by a nonsteroidal ecdysone agonist tebufenozide in mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Biology Ventre*, Academ of Science, Institute of Entomology, České Budějovice, Czech republic. p. 119 - 126.

GILLIES, M. T., DEMEILLON, B. (1968). The Anophelinae South of the Sahara (Ethiopian Zoological Region). Second edition. South African Institute for Medical Research. 54:1-343

GÖPFERTO VÁ, D., PAZDIORA, P., DÁŇOVÁ, J. (2002). Epidemiologie infekčních nemocí. 1.vydání. Praha:Karolinum. 230s. ISBN 80-246-0452-3.

GRYAZNOV, A. I. (1993). Use of Sokolova, M. I. combinative method of estimating physiological age in blood-sucking black flies (Diptera: Simuliidae). Zoologicheskii zhurnal. 72: 51-58

GUILVARD, E., DE REGGI, M., RIOUX J.A. (1984). Changes in ecdysteroid and juvenile hormone titres correlated to the initiation of vitellogenesis in two *Aedes* species (Diptera,Culicidae). General and Comparative Endocrinology. 53: 218-223.

HAHN, CS., FRENCH, OG., FOLEY, P., MARTIN EN. AND TAYLOR RP. (2001). Bispecific monoclonal antibodies mediate binding of dengue virus to erythrocytes in a monkey model of passive viremia. J. Immunol., 66 (2): 1057–1065.

HARRINGTON, L. C., EDMAN, J. D., SCOTT, T. W. (2001). Why female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood. Journal of Medical Entomology. 38: 411-422.

HELGARD REICHHOLF - RIEHMOVÁ (1997). Hmyz a pavoukovci, IKAR- Praha, 287 s., 10-19.

HOLDER, P., G. BROWNE AND M. BULLIANS, (1999). The Mosquitoes of New Zealand and their animal disease significance. *Surveillance* 26 (4). 12-15.

HŮRKA, K., ČEPICKÁ, A. (1980). Rozmnožování a vývoj hmyzu.1.vydání, Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 223s.

CHRISTOPHERS, S. R. (1911): The development of the egg follicle in anophelines. *Paludism.* 2: 73-88.

JEŘÁBKOVÁ, K., (2010). Funkce receptorů u krevsajících členovců ve vztahu k vyhledávání hostitele. Bakalářská práce, školitel RNDr. Helena Nejezchlebová, Ph.D. Brno: Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, 47s.

JUPP, E. W., COLLINS, R. C. (1979). The gonotrophic cycle in *Simulium ochraceum*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 28: 422-426.

KASSEM, H. A., HASSAN, N. (2003). Ovarian development and blood-feeding activity in *Phlebotomus bergeroti* Parrot (Diptera: Phlebotomidae) from Egypt. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology.* 97: 521-526.

KRAMÁŘ, J. (1958). Fauna ČSR. Svazek 13.Komáři bodaví: Culicinae (Řád: Dvoukřídli – Diptera). Praha: Nakladatelství ČSAV, 284s

KODRÍK, D. (2004). Fyziologie hmyzu - učební texty, Entomologický ústav Akademie věd České republiky - Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity. 1-242.

- LAIRD, M. (1996).** New Zealand's Mosquitoes Fauna in 1995. History and Status. University of Auckland. January pp. 1-25.
- LEA, A. O. (1964).** Studies on the dietary and endocrine regulation of autogenous reproduction in *Aedes taeniorhynchus* (Wied.). *J. Med. Entomol.*, 40-44.
- LEE, D. J. HICKS, M.M., DEBENHAM, M.L. DRIFFITHS, M. MARKS, E.N. BRYAN, J.H. AND RUSSEL, R.C. (1989).** The Culicidae of Australasian region . volume 7. Canberra, Australia: Australian Government Publishing Service 281 pp.
- LOBOVSKÁ, A. (2001).** Infekční nemoci. Praha: Karolinum, 263s. ISBN 80-246-0116-8.
- MACEK, J. (2001).** *Svět zvířat XI. Bezobratlí (2)*. 1. vydání. Praha: Albatros, 170s. ISBN 80-00-00918-8
- MAHMOOD, F., CRANS, W. J. (1998):** Ovarian development and parity determination in *culiseta melanura* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*. 35: 980-988 *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 28: 422-426
- MAHESWARAN, R., KINGSLEY, S. AND IGNACIMUTHU, S. (2008).** Larvicidal and Repellent activity of *Clerodendron phlomides* against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera : Culicidae). In: *Proceedings of Recent Trends in Insect Pest Management*, Elite publications. Pp. 240 – 243
- MONČADSKIJ, A. S. (1951).** Ličinki krovososušičich komarov SSSR i sopredelnych stran (podsem. Culicinae). Izd. AN SSSR, Moskva - Leningrad, 288 pp.
- MOORE, C.G. (1963).** Seasonal variation in Autogeny in *Culex Tartalis* COQ. in Northern California. University of California, Davis. Vol. 23 (3): p. 238-241.
- OLEJNÍČEK, J. (1995).** Influence of males on the blood-feeding behaviour of female *Culex pipiens* Complex mosquitoes during the first gonotrophic cycle. *Journal of Vector Ecology*. Vol. 20, No. 2, p. 147-152.
- O'MEARA, G.F., EVANS, D.G. (1973).** Blood-feeding requirements of the mosquito: Geographical variation in *Aedes taeniorhynchus*. *Science*. 180 : 1291-1293.
- PHILIPS, S. CORBET, (1964).** Autogeny and Oviposition in Arctian Mosquitoes. Entomology Research Institut, Canada Department of Agriculture. Ottawa, Ontario. 669 pp.
- RAVI KIRAN, S. AND SITA DEVI, P. (2007).** Evolution of mosquitocidal activity of essential oil and sesquiterpenes from leaves of *Chloroxylon swietenia* DC. *Parasitol Research*, 101: 413-418.
- ROBERTSON, H. MAND MAC LEOD, EG. (1993).** Five major subfamilies of mariner transposable elements in insects, including the Mediterranean fruit fly and related arthropods. *Insect Molecular Biology*, 2, 125-139.
- RYŠAVÝ, B, ČERNÁ, Ž., CHALUPSKÝ, J., ORSZÁGH, I., VOJTEK, J. (1986).** *Základy parazitologie*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 216 s. ISBN 80-04-20864-9

SAWABE, K., MORIBAYASHI, A. (2000). Lipid Utilization for Ovarian Development in an Autogenous Mosquito, *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 37: 726-731.

SCOTT, T. W., AMERASINGHE, P. H., MORRISON, A. C., LORENZ, L. H., CLARK, G. G., STRICKMAN, D., KITTAYAPONG, P., EDMAN, J. D. (2000). Longitudinal Studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand and Puerto Rico: Blood Feeding Frequency. *Journal of Medical Entomology*. Volume 37, Issue 1, pp. 89–101.

SERVICE, M. W. (1985). The biologie of *Aedes caspius* (Pallas) and *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) in Dubai. *Insect Sci. Applic.* Vol. 7, No. 1, p. 11-18.

SOTA, T.; MOGI, M. (1994). Seasonal life cycle and autogeny in the mosquito *Aedes togoi* in northern Kyushu, Japan, with experimental analysis of the effects of temperature, photoperiod and food on life-history traits. *Res. Popul. Ecol.* Vol. 36, p. 104-114.

TRPIS, M. (1977). Autogeny in diverse populations of *Aedes aegypti* from East Africa. *Tropenmed. Parasit.* Vol. 28, p. 77-82.

TVETEN, M. S.; MEOLA, R.W. (1988). Autogeny in *Culex Salinarius* from Texas, Florida and New Jersey. Department of Entomology, Texas A,M University, College Station, Vol 4, 436-441 pp.

TYNDALE-BISCOE, M. (1984). Age-grading methods in adult insects: a review. *Bulletin of Entomological Research*. 74: 341-377

UCHIDA, K., OHMORI, D., YAMAKURA, F. AND SUZUKI, K. (1990). Changes in free amino acid concentration in the hemolymph of the female *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae), after a blood meal. *J. Med. Entomol.* 27, 302-308.

VAN HANDEL, E. (1985). Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 1, 299-301.

VOLF, P., HORAK, P, ČEPIČKA, I., FLEGR, J., LUKEŠ, J., MIKEŠ, L., SVOBODOVA, M., VAVRA, J., VOTYPKA, J. (2007). Paraziti a jejich biologie. (1.Vydání). Praha. Triton. p1-312.

WENSTEIN, P., LAIRN, M. AND BROWNE, G. (1997). Exotic and Endemic mosquitoes in New Zealand as potential arbovirus vectors. Wellington, Ministry of Health. 433 - 444.

WILLIAMS, K.L., BROWNE, L.B., GERWEN, A.C.M. (1979). Quantitative relationships between the ingestion of proteinrich material and ovarian development in the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina* (Wied.). *International Journal of Invertebrate Reproduction*. 1: 75–88.

Internetové stránky:

<http://www.zdravizdravymrozumem.cz/superpotraviny/1-pivovarske-krasnice.html> [online]
[cit.2016-05-04]. < <http://www.zdravizdravymrozumem.cz/1-pivovarske-krasnice.html> >