

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra ochrany rostlin



**Biologická aktivita nových juvenogenů
testovaných na ruměnici pospolné (*Pyrrhocoris apterus* L.)
a jejich vliv na diverzitu střevní mikroflóry**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Autor: **Ing. Hana Ryšavá**

Školitel: **Prof. Ing. Pavel Ryšánek, CSc.**

Konzultant: **Ing. Milan Pavlík, CSc., ÚEB AV ČR, v.v.i.**

Praha 2012

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškerou literaturu a ostatní prameny, z nichž jsem při přípravě práce čerpala, řádně cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

.....
Datum a podpis

„Moje vědecká činnost není motivována ničím jiným než neodolatelnou touhou proniknout do tajemství přírody. Moje láska k poznávání a touha přispět ke zlepšení životních podmínek člověka jsou tak spjaty s mými vědeckými zájmy.“ [Albert Einstein]

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych chtěla poděkovat mému vedoucímu **prof. Ing. Pavlu Ryšánkovi, CSc.** za podporu a všestrannou pomoc při zpracování této disertační práce. Mé poděkování rovněž patří celému kolektivu Katedry ochrany rostlin za velmi příjemné pracovní prostředí, obzvláště pak **Ing. Miloslavu Zouharovi, Ph.D.** za jeho otevřenost, nadšení a pomoc při zakládání laboratorního chovu a **Ing. Dagmar Pouvové** za její rady a praktické zkušenosti z oblasti mikrobiologie.

Dále bych velice ráda poděkovala **Ing. Milanu Pavlíkovi, CSc.** za jeho odborné vedení, rady, hluboké diskuse, trpělivost a širokou podporu po celou dobu zpracovávání této práce. Stejně tak bych vyjádřila svůj úpřímný dík **prof. Ing. Zdeňku Wimmerovi, CSc.** za jeho všestrannou podporu, otevřenost a pomoc při publikování získaných výsledků.

Za poskytnutí tesovaných látek děkuji **Ing. Haně Svobodové** a **Ing. Ondřejovi Jurčekovi**, za poskytnutí laboratorních chovů děkuji **Ing. Pavlu Jedličkovi, Ph.D.** a **Mgr. Ivě Bártů, Ph.D.**, která mi dala též cenné rady a zkušenosti z oblasti entomologie a fyziologie hmyzu. Své kolegyni **Ing. Tereze Zichové, Ph.D.** velmi děkuji za pomoc při statistickém zpracování dat.

Závěrem děkuji také **prof. Dr. Ing. Martině Mackové**, že mi umožnila připojit se k její pracovní skupině a za odborné vedení. Rovněž děkuji všem pracovníkům a studentům Mikrobiologického ústavu VŠCHT za půjčování laboratorního materiálu a neobvykle přátelské pracovní prostředí. Především pak děkuji **Ing. Veronice Kurzawové, Ing. Petru Štursovi** a **Ing. Ondřejovi Uhlíkovi, Ph.D.** za pomoc při provádění laboratorních technik a jejich praktické zkušenosti z oblastí mikrobiologie a molekulární biologie.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	6
SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK.....	7
1. ÚVOD.....	9
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	10
2.1. JUVENILNÍ HORMONY HMYZU.....	10
2.2. METABOLISMUS JUVENILNÍCH HORMONŮ.....	11
2.2.1. BIOSYNTÉZA A JEJÍ REGULACE.....	11
2.2.2. MECHANISMUS PŮSOBENÍ.....	13
2.2.3. TRANSPORT.....	15
2.2.4. DEGRADACE.....	15
2.3. VÝZNAM A FUNKCE JUVENILNÍCH HORMONŮ HMYZU.....	16
2.3.1. SVLÉKÁNÍ A METAMORFÓZA.....	16
2.3.2. REPRODUKCE A DIAPAUZA.....	17
2.3.3. KASTOVÝ POLYMORFISMUS SOCIÁLNÍHO HMYZU.....	18
2.3.4. FÁZOVÝ DIMORFISMUS SARANČAT A POLYMORFISMUS MŠIC.....	18
2.4. ANALOGY HMYZÍCH JUVENILNÍCH HORMONŮ.....	19
2.4.1. JUVENOIDY.....	19
2.4.1.1. Přírodní juvenoidy.....	20
2.4.1.2. Syntetické juvenoidy.....	20
2.4.2. JUVENOGENY.....	22
2.5. REZISTENCE HMYZU K ANALOGŮM JUVENILNÍCH HORMONŮ.....	23
2.6. BIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ A VYHODNOCENÍ AKTIVITY JHA.....	24
2.6.1. RUMĚNICE POSPOLNÁ.....	25
2.7. STŘEVNÍ SYMBIOTICKÉ MIKROORGANIZMY HMYZU.....	26
2.7.1. VÝSKYT A ZPŮSOBY PŘENOSU STŘEVNÍCH MIKROORGANISMŮ.....	26
2.7.2. VÝZNAM STŘEVNÍ SYMBIOTICKÉ MIKROFLÓRY.....	27
2.7.3. METODY IDENTIFIKACE MIKROORGANISMŮ.....	28
2.7.3.1. Biochemické metody.....	28
2.7.3.2. Imunochemické metody.....	28
2.7.3.3. Analytické metody.....	29
2.7.3.4. Molekulárně biologické metody.....	29
2.7.3.4.1. Analýza sekvence genu pro 16S rRNA.....	30
2.7.3.4.2. Restrikční polymorfismus délky terminálních fragmentů (T-RFLP).....	31
3. CÍL PRÁCE.....	33
4. METODIKA PRÁCE.....	34
4.1. TESTY BIOLOGICKÉ AKTIVITY JHA.....	34
4.1.1. LABORATORNÍ CHOV.....	34
4.1.2. TESTOVANÉ LÁTKY.....	34
4.1.3. APLIKAČNÍ METODY.....	34
4.1.3.1. Topikální aplikace.....	35
4.1.3.2. Perorální aplikace.....	35
4.1.4. VYHODNOCOVÁNÍ BIOLOGICKÉ AKTIVITY.....	35
4.2. MIKROBIOLOGICKÉ METODY.....	36
4.2.1. IZOLACE A KULTIVACE STŘEVNÍCH MIKROORGANISMŮ.....	36
4.2.2. IDENTIFIKACE ZÍSKANÝCH KULTIVOVATELNÝCH MIKROORGANISMŮ.....	36
4.2.2.1. Stanovení složení ribozomálních proteinů metodou hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF.....	36
4.2.2.2. Analýza sekvence genu pro 16S rRNA.....	37
4.2.2.2.1. Izolace mikrobiální DNA.....	37
4.2.2.2.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	37
4.2.2.2.3. Purifikace PCR produktů.....	39
4.2.2.2.4. Elektroforetická frakcionace a vizualizace fragmentů DNA.....	39
4.2.2.2.5. Stanovení koncentrace DNA.....	40
4.2.2.2.6. Stanovení nukleotidové sekvence.....	40
4.2.3. SLEDOVÁNÍ VLIVU TESTOVANÝCH JHA NA STŘEVNÍ MIKROFLÓRU POMOCÍ T-RFLP.....	40

4.2.3.1. Izolace DNA	40
4.2.3.1. Restrikční polymorfismus délky terminálních fragmentů DNA (T-RFLP)	41
5. VÝSLEDKY	45
5.1. BIOLOGICKÁ AKTIVITA TESTOVANÝCH LÁTEK	45
5.1.1. SROVNÁVACÍ TESTY A ÚČINNOST KOMERČNÍCH JUVENOIDŮ	45
5.1.2. ÚČINNOST ESTEROVÝCH JUVENOGENŮ ODVOZENÝCH OD KARBAMÁTU	47
5.1.3. ÚČINNOST ESTEROVÝCH JUVENOGENŮ ODVOZENÝCH OD ALKOHOLU	48
5.1.4. POROVNÁNÍ AKTIVITY TESTOVANÝCH LÁTEK A KOMERČNÍCH JUVENOIDŮ	48
5.1.4. VARIABILITA TESTŮ	49
5.2. IDENTIFIKACE BAKTERIÍ	51
5.2.1. ANALÝZA RIBOZOMÁLNÍCH PROTEINŮ POMOCÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE MALDI TOF	51
5.2.1. IDENTIFIKACE NA ZÁKLADĚ SEKVENCE GENU PRO 16S rRNA	52
5.2.1. VLIV TESTOVANÝCH LÁTEK NA STŘEVNÍ MIKROFLORU	57
6. DISKUZE	59
6.1. ÚČINNOST TESTOVANÝCH JHA	59
6.2. STŘEVNÍ MIKROFLÓRA RUMĚNICE POSPOLNÉ A VLIV TESTOVANÝCH JHA	62
7. ZÁVĚR	65
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	67
9. PŘEHLED VLASTNÍCH PUBLIKACÍ	79
10. PŘÍLOHY	81

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ZKRATKA	ANGLICKÝ/LATINSKÝ NÁZEV	ČESKÝ NÁZEV
bp	pair of bases	páry bází
BSA	bovine serum albumin	hovězí sérový albumin
CA	lat. <i>corpora allata</i>	
CC	lat. <i>corpora cardiaca</i>	
Da	dalton	dalton
dH₂O	distilled water	destilovaná voda
DNA	deoxyribonucleic acid	kyselina deoxyribonukleová
ddNTP	dideoxyribonucleotide triphosphate	dideoxynukleotidtrifosfát
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate	deoxynukleotidtrifosfát
EcR	ecdysone receptor	ekdysonový receptor
EDTA	ethylene diamino tetraacetic acid	kyselina etylendiamintetraoctová
GI	gastrointestinal	gastrointestinální trakt
GST	glutathione S-transferase	glutathion S-transferáza
HCCA	α -cyano-4-hydroxycinnamic acid	α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina
HPLC	high-performance liquid chromatography	vysokoučinná kapalinová chromatografie
IC₅₀	inhibition concentration	inhibiční koncentrace působící 50% potlačení metamorfózy
ID₅₀	inhibition dose	inhibiční dávka působící 50% potlačení metamorfózy
IRAC	insecticide resistance action committee	společnost pro sledování rezistence hmyzu k insekticidům
JH	juvenile hormone	juvenilní hormon
JHA	juvenile hormone analogue	analog juvenilního hormonu
JHBP	juvenile hormone binding protein	protein vázající juvenilní hormony
JHE	juvenile hormone esterase	esteráza juvenilního hormonu
JHEH	juvenile hormone epoxide hydrolase	epoxidová hydroláza juvenilního hormonu
kb	pair of kilobases	tisíc párů bází
K_d	dissociation constant	disociační konstanta
LB	<i>Luria-Bertani</i>	
MALDI TOF	matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight	desorpce/ionizace laserem za přítomnosti matrice- doba letu
Met	methoprene - tolerant gene	gen tolerantní k methoprenu
P450	cytochrome P450 monooxygenase	cytochrom P450 monooxygenáza
Pa	pascal	pascal
PAA	polyacrylamide	polyakrylamid
PCA	plate count agar	mikrobiologické růstové médium
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
RE	restriction endonuclease	restrikční endonukleáza
RDP	Ribosomal Database Project	databáze ribozomálních sekvencí
RNA	ribonucleic acid	kyselina ribonukleová
rpm	revolutions per minute	otáčky za minutu
sp.	<i>species</i>	druh
T-RFLP	terminal restriction fragment length polymorphism	restrikční polymorfismus délky terminálních fragmentů
Taq-polymerase	DNA polymerase from <i>Thermus aquaticus</i>	DNA polymeráza z <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	buffer solution of Tris, boric acid and EDTA	pufrovací směs obsahující Tris, kyselinu boritou a EDTA
Tris	tris-(hydroxymethyl)-aminomethane	tris-(hydroxymethyl)-aminometan
Tween	polyoxyethylene sorbitan monooleate	ester polyoxyethylensorbitolu
USP	ultraspiracle	jaderný receptor pro JH
UV	ultraviolet	ultrafialové záření

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

- Obr. 2.1** Strukturní vzorce přírodních juvenilních hormonů
Obr. 2.2 Endokrinní žlázy hmyzu
Obr. 2.3 Biosyntéza a metabolická cesta JH
Obr. 2.4 Schéma interakce lipofilních steroidních hormonů a juvenilních hormonů s receptory v plazmě cílových buněk a s chromatinovým aparátem uvnitř jádra
Obr. 2.5 Model metabolismu JH
Obr. 2.6 Hormonální regulace metamorfózy hmyzu
Obr. 2.7 Strukturní vzorce přírodních juvenoidů
Obr. 2.8 Strukturní vzorce syntetických alifatických juvenoidů
Obr. 2.9 Strukturní vzorce syntetických aromatických juvenoidů
Obr. 2.10 Schématické znázornění struktury prokaryotního rRNA operonu
Obr. 2.11 Průběh T-RFLP metody
Tab. 4.1 Průběhu PCR programu pro amplifikaci 16S rRNA
Tab. 4.2 PCR program při reamplifikaci PCR-produktů
Tab. 4.3 Přehled látek testovaných při T-RFLP
Tab. 4.4 Průběhu PCR programu pro T-RFLP
Tab. 4.5 Průběhu PCR programu pro reamplifikaci
Obr. 5.1 Strukturní vzorce testovaných juvenoidů
Obr. 5.2 Křivka závislosti aktivity juvenoidu W-328 na koncentraci v perorálním testu
Tab. 5.1 Účinnosti juvenoidů při srovnávacích testech v hodnotách ID₅₀ (μg na jedince)
Tab. 5.2 Porovnání aktivity karbamátových juvenoidů testovaných různými autory na ruměnici pospolné (*Pyrrhocoris apterus*) v hodnotách ID₅₀ (μg na jedince)
Tab. 5.3 Účinnosti komerčních juvenoidů v hodnotách ID₅₀ (μg na jedince)
Tab. 5.4 Účinnost série esterových juvenogenů odvozených od karbamátu v hodnotách ID₅₀ (μg na jedince)
Tab. 5.5 Účinnost alkoholových juvenogenů v hodnotách ID₅₀ (μg na jedince)
Obr. 5.3 Porovnání aktivit komerčních juvenoidů a neúčinnějších testovaných JHA
Obr. 5.4 Porovnání výsledků tří nezávislých opakování perorálních testů juvenogenu JO 11 T III
Obr. 5.5 Porovnání výsledků topikální účinnosti juvenogenu JO 11 T III testovaného na dvou populacích ruměnice pospolné
Tab. 5.6 Porovnání variability aktivity látek mezi dvěma populacemi ruměnice pospolné v hodnotách ID₅₀ (μg na jedince)
Obr. 5.6 Vzájemné porovnání hmotnostních spekter izolátů číslo 25, 21a a 17, identifikovaných jako grampozitivní bakterie *Lactococcus lactis*
Tab. 5.7 Taxonomická příbuznost bakterií trávicího traktu ruměnice pospolné a specifita jejich identifikace podle databáze BioTyper
Obr. 5.7 Kontrola úspěšnosti izolace celkové DNA vzorků 4, 7, 13, 16 a 18 v agarózovém gelu
Obr. 5.8 Přímá amplifikace genu pro 16S rRNA vzorku č. 26 bez předchozí izolace celkové DNA
Obr. 5.9 Ukázky amplifikace genu pro 16S rRNA vzorků 23, 12, 6 a 3
Obr. 5.10 Koncentrace a čistota celkové DNA stanovená spektrometricky pomocí přístroje NanoDrop ND 1000
Obr. 5.11 Reamplifikace PCR-produktů po amplifikaci genu pro 16S rRNA
Obr. 5.12 Ukázka výsledku sekvenace úseku genu pro 16S rRNA
Tab. 5.8 Přehled bakteriálních druhů trávicího traktu ruměnice pospolné (Populace 1) identifikovaných na základě sekvence genu pro 16S rRNA
Tab. 5.9 Přehled bakteriálních druhů trávicího traktu ruměnice pospolné (Populace 2) identifikovaných na základě sekvence genu pro 16S rRNA
Obr. 5.13 Výsledný graf fregmentační analýzy pro methoperen

- Obr. 5.14** Fylogenetický strom založený na analýze sekvence 16S rRNA, znázorňující působení testovaných látek na střevní mikroflóru ruměnice pospolné
- Tab. 6.1** Porovnání výsledků identifikace pomocí metody MALDI-TOF MS a analýzy sekvence genu pro 16S rRNA u Populace 1

1. ÚVOD

Výzkum a vývoj nových prostředků v boji proti škodlivému hmyzu je v současné době velmi perspektivní, neboť klasické insekticidní přípravky rychle zastarávají. Především vznik rezistentních populací škůdců a stále přísnější kritéria hygienické a ekologické bezpečnosti jsou důvodem k vyřazování těchto látek z užívání. Z ekologického hlediska jsou žádoucí selektivní přípravky s vysokou účinností na cílové druhy škůdců a zároveň maximálně šetrné k necílovým organismům, zejména bezpečné pro opylovače a antagonisty škůdců. Kritická situace vedla v mnoha rozvinutých zemích k omezení užívání některých typů klasických insekticidů.

Do popředí by se proto mohly dostat bioracionální insekticidy, které selektivně ovlivňují vývoj a rozmnožování hmyzu, způsobují morfologické změny během jeho vývoje a jsou prakticky netoxické k ostatním živočichům. K této skupině látek patří analogy juvenilních hormonů. Jejich další předností je i schopnost rychlé biodegradace.

Mnohé látky na bázi juvenilních hormonů se již řadu let úspěšně využívají i v praktické ochraně proti hmyzím škůdcům (methopren, hydrogren, fenoxycarb aj.). Současný výzkum se zaměřuje na vývoj juvenogenů, konjugátů juvenoidů s hormonálně neaktivními cukry, mastnými kyselinami a alkoholy. Vzniklé sloučeniny se pak enzymaticky rozkládají až v hmyzím organismu, který je pak následně uvolněným juvenoidem ovlivněn.

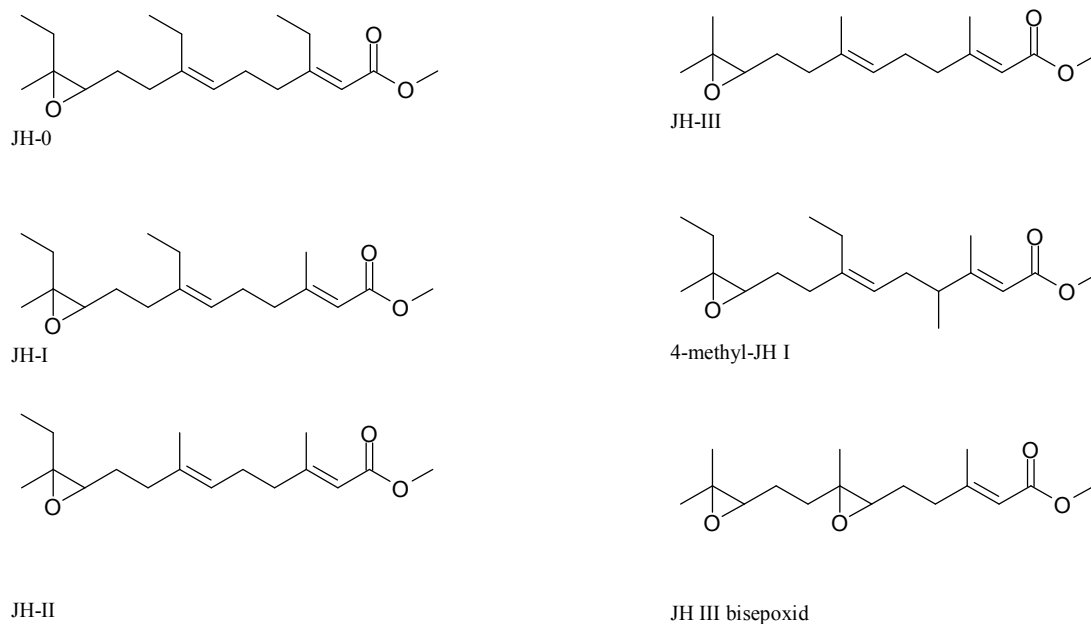
Ruměnice pospolná (*Pyrrhocoris apterus* L.) se již od sedmdesátých let dvacátého století využívá jako modelový druh při výzkumu a vývoji insekticidních látek na bázi analogů juvenilních hormonů. V této práci je na ní ověřována nejen biologická účinnost nově syntetizovaných juvenogenů, ale také je sledován vliv testovaných látek na střevní symbiotickou mikroflóru, která hraje významnou roli při jejich degradaci.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Juvenilní hormony hmyzu

Juvenilní hormony (JH) jsou sesquiterpeny s epoxidovou a methylesterovou skupinou v molekule (Morgan, 2004). Během přibližně padesátiletého výzkumu bylo objeveno šest odlišných typů JH, které se navzájem liší zastoupením radikálů a označují se římskými číslicemi (Obr. 2.1; Riddiford, 1994).

Existence hmyzího JH byla prokázána Wigglesworthem (1936) při experimentech se zákeřnicí (*Rhodnius prolixus* Stal). Teprve v roce 1967 však byla poprvé popsána struktura JH-I u martináče (*Hyalophora cecropia* L.) (Röller a kol., 1967). O rok později byl u stejného druhu hmyzu objeven také JH-II (Meyer a kol., 1968). V roce 1973 byl identifikován JH-III (Judy a kol., 1973), který je nejjednodušším a zároveň nejčastěji se vyskytujícím JH, neboť je obecně rozšířen u většiny řádů hmyzu (Sláma, 1999). Byl prokázán u brouků (*Coleoptera*), blanokřídlých (*Hymenoptera*), polokřídlých (*Hemiptera*), kobylek (*Ensifera*) a sarančat (*Caelifera*). Oproti tomu JH-I a JH-II jsou specifitější hormony, vyskytující se pouze u motýlů (*Lepidoptera*) (Baker, 1990). U vajíček lišaje tabákového (*Manduca sexta* L.) byl nalezen JH-0 a 4-metyl-JH-1 (Bergot a kol., 1981). U dvoukřídlých (*Diptera*) octomilky obecné (*Drosophila melanogaster* Meig.) a bzučivky rudohlavé (*Calliphora vomitoria* L.) byl objeven další z řady juvenilních hormonů hmyzu JH-III bisepoxid (Richard a kol., 1989). V roce 1991 Cusson a kol. získal z embryí švába šedého (*Nauphoeta cinerea* Olivier) malá množství methyl-farnesolátu, který je prohormonem JH. Tato látka se nachází také u korýšů (*Crustacea*), kde hraje pravděpodobně roli při reprodukci samic (Chang a Kaufman, 2005). U řady druhů hmyzu se mohou vyskytovat i složené formy JH, které mají v některých případech specifickou funkci (Gilbert a kol., 2000).

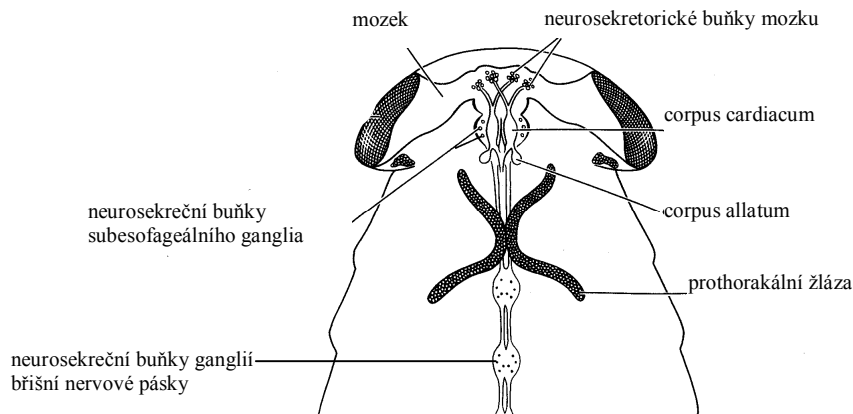


Obr. 2.1: Strukturální vzorce přírodních juvenilních hormonů

2.2. Metabolismus juvenilních hormonů

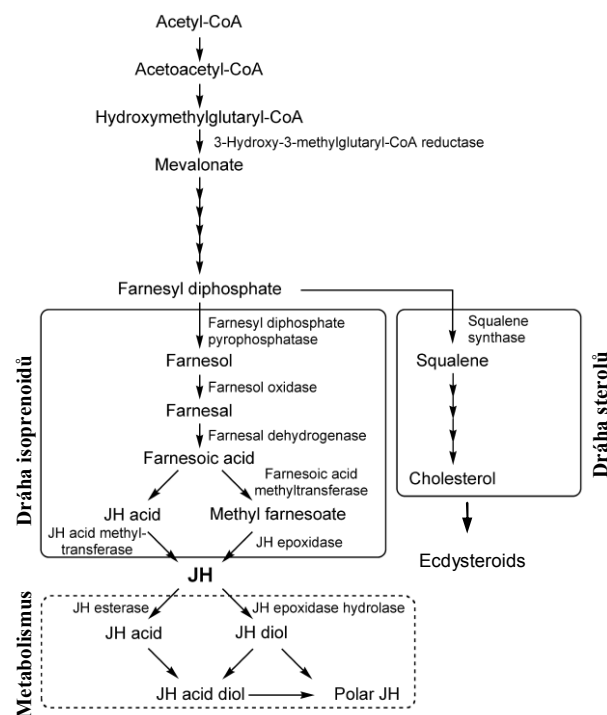
2.2.1. BIOSYNTÉZA A JEJÍ REGULACE

Juvenilní hormony jsou syntetizovány párovými endokrinními žlázami *corpora allata* (CA) (Wigglesworth, 1936), které u dvoukřídlých a polokřídlých splývají v jeden orgán (Burt, 1938). CA jsou ektodermálního původu, mají zpravidla oválný nebo vejčitý tvar a nacházejí se v zadní části hlavy (Obr. 2.2; Ito, 1918; Sláma a kol., 1974; Nation, 2002). U většiny druhů hmyzu obsahují buňky CA hladké endoplazmatické retikulum, což je obecně typické pro buňky produkující cholesterol nebo terpenoidy ve velkém množství (Fukuda a kol., 1966; King a kol., 1966). Nervová soustava propojuje CA s *corpora cardiaca* (CC), mozkem a s neurosekretorickými buňkami mozku. U šupinušek (*Thysanura*), jepic (*Ephemeroptera*), kobytek (*Ensifera*) a sarančat (*Caelifera*) jsou CA nervově spojena také se subesofageálním gangliem a stomatogastrickou soustavou (Nation, 2002).



Obr. 2.2: Endokrinní žlázy hmyzu (Novák, 1975)

Biosyntéza JH probíhá přes metabolickou dráhu mevalonátu (Obr. 2.3; Belles a kol., 2005). Dráha mevalonátu je známá také u savců a rostlin a první kroky syntézy farnesyly z acetyl-CoA jsou společné všem těmto organismům. Důležité je, že hmyz a jiní členovci nemají schopnost syntézy cholesterolu *de novo*, ale musí ho přijímat společně s potravou, neboť u nich chybí geny kódující syntézu squalenu a další následné enzymy biosyntetické dráhy sterolů (Santos a Lehmann, 2004).



Obr. 2.3: Biosyntéza a metabolická cesta JH (Santos a Lehmann, 2004)

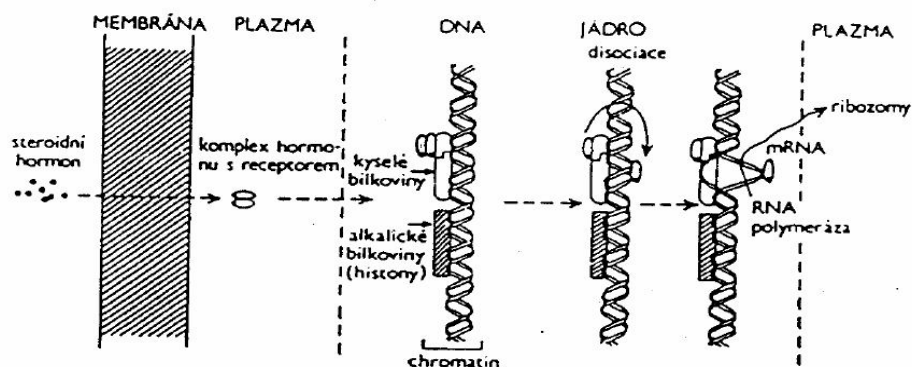
JH je vylučován nepřetržitě po celý průběh larválního stadia, avšak u jednotlivých vývojových stupňů dochází ke specifickému kolísání jeho množství (Tobe a Stay, 1985). Syntéza JH je regulována na několika úrovních, přičemž nejjednodušším mechanismem je regulace na základě titru JH v hemolymfě. Při zvýšeném titru JH v hemolymfě se jeho syntéza snižuje a naopak (Nijhout, 1994). U některých druhů hmyzu bylo prokázáno, že nervové propojení CA s mozkiem přímo ovlivňuje biosyntézu JH a má schopnost ji stimulovat či naopak inhibovat (Tobe a Feyereisen, 1983). U jednotlivých druhů hmyzu se však tento proces liší. Denervace CA u sarančete pustiného (*Schistocerca gregaria* F.) má za následek pokles syntézy JH, zatímco u ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus* L.) je syntéza nervovými vlákny tlumena, takže při denervaci dojde ke stimulaci CA a následné zvýšené syntéze JH (Sláma a kol., 1974). Také páření často stimuluje CA k produkci JH. To bylo prokázáno u panenských samic rusa tečkovaného (*Diploptera punctata* Esch.), u kterých je dozrávání oocytů a ovárií přímo ovlivňováno JH a až do doby páření je jeho tvorba nervovým systémem inhibována (Tobe a Feyereisen, 1983). Stejně tak přítomnost gonád stimuluje syntézu JH, neboť při odstranění ovárií se syntéza JH snižuje (Engelmann, 1970).

Další mechanismus usměřující syntézu JH je prostřednictvím neuropeptidů allatotropinů a allatostatinů. Allatotropiny zvyšují produkci JH, zatímco allatostatiny na syntézu JH působí inhibičně (Stay a kol., 1994). Schopnost regulovat sekreci JH mají i neurotransmitery (dopamin, oktopamin, serotonin) a ekdysteroidy (Woodring a Hoffman, 1994; Granger a kol., 1996; Gilbert a kol., 2000).

2.2.2. MECHANISMUS PŮSOBENÍ

Pro hormony je typické působení na cílovou buňku prostřednictvím specifických receptorů, které se nacházejí buď v membráně nebo přímo v jádře buňky. Mechanismus působení JH není dodnes přesně znám, neboť se zatím nepodařilo spolehlivě identifikovat JH receptory.

Vzhledem ke své lipofilní povaze JH snadno pronikají přes membránu do buňky a nepotřebují tedy specifický membránový receptor. V cytoplazmě pak reagují se specifickými receptory a vzniklý komplex přechází do jádra, kde dochází k disociaci tohoto komplexu na dvě podjednotky. Jedna zůstává navázána na bílkovinu, zatímco druhá reaguje se specifickými sekvencemi DNA (tzv. hormone response elements). Následně dochází k transkripci příslušných genů do mRNA, podle které jsou pak na ribozomech syntetizovány příslušné bílkoviny (Zhang a kol., 1996; Gilbert a kol., 2000).



Obr. 2.4: Schéma interakce lipofilních steroidních hormonů a juvenilních hormonů s receptory v plazmě cílových buněk a s chromatinovým aparátem uvnitř jádra (Jánský, 1981)

Molekulární charakteristika samotných jaderných receptorů JH není stále přesně objasněna. Nicméně Konopová a Jindra (2007) nedávno prokázali na potěmniku hnědém (*Tribolium castaneum* Herbst), že JH blokuje metamorfózu prostřednictvím genu *Methoprene-tolerant* (*Met*), který byl původně objeven jako alela zodpovědná za rezistenci octomilky obecné (*Drosophila melanogaster* Meig.) vůči látce imitující účinky JH methoprenu (Wilson a Ashok, 1998). Potlačení funkce *Met* u tohoto brouka nejen navodí necitlivost k JH, ale na rozdíl od octomilky také předčasný vstup larev do procesu metamorfózy. Experimentálně bylo zjištěno, že *Met* reaguje na přítomnost JH regulací genu zvaného *Broad-complex*. Tím se přímo podílí na regulaci metamorfózy, protože právě tento gen je naprosto nezbytný pro přeměnu hmyzí larvy v kuklu a dospělého (Konopová a Jindra, 2008). Dále bylo prokázáno, že na *Met* protein se váže JH-III s vysokou afinitou ($K_d = 5,3$ nM). To naznačuje, že *Met* může fungovat jako JH-dependentní transkripční faktor (Miura a kol., 2005).

Kromě toho byla studována schopnost JH vázat se na jaderný receptor ultraspiracle (USP), který je součástí heterodimeru ekdysonového receptoru (EcR). Jonesové a Sharpovi (1997) se podařilo prokázat, že rekombinantní USP protein exprimovaný v kvasinkách (*Saccharomyces*) je schopný navazovat JH-III i kyselinu JH-III. Tím, že se na USP váže JH stejně tak jako kyselina JH je pravděpodobné, že existují jeho různé konformační stavy. Dalším studiem monomerního a homo-oligomerního USP u octomilky obecné (dUSP) Jonesová a kol. (2001) prokázali, že JH-III a jeho syntetický agonista methopren se specificky váží na tento receptor a zároveň tak mění jeho konformaci. Navázaný JH-III způsobuje intremolekulární změny v konformaci receptoru a stabilizuje jeho kvartérní strukturu. Následné pokusy

s farnesolem, který s tímto receptorem neinteragoval, vedly k závěru, že na dUSP se váže pouze JH-III a struktury jemu podobné.

Také signální dráha JH zatím nebyla uspokojivě objasněna, ale exprese některých ekdysonem regulovaných časných genů jako *Broad* a *E75* je u octomilky obecné i u lišaje tabákového regulována JH. Funkci těchto genů v signální dráze JH je proto potřeba objasnit dalším studiem (Keshan a kol., 2006).

2.2.3. TRANSPORT

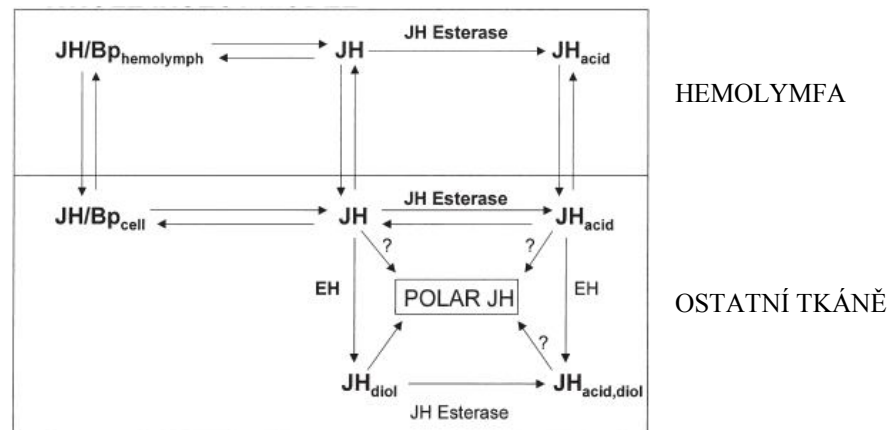
Nově syntetizované JH jsou z CA uvolňovány přímo do hemolymfy, kterou jsou transportovány pomocí speciálních bílkovinných nosičů JHBPs (juvenile hormone binding proteins) (Whitmore a Gilbert, 1972; Riddiford, 1994). Celkem byly v hemolymfě různých druhů hmyzu objeveny tři skupiny JHBPs – nízkomolekulární, vysokomolekulární lipoforiny a vysokomolekulární hexamerické (Goodman, 1990; Gilbert a kol., 2000). Základními nosiči JH u hemimetabolního hmyzu jsou JHBPs ze skupiny lipoforinů (Kanost a kol., 1990), zatímco u holometabolních Lepidopter jsou JH transportovány pomocí nízkomolekulárních JHBPs (Kramer a kol., 1976).

JH se váží na hydrofobní část těchto proteinových nosičů, čímž se sníží jejich aktivní povrch a tak jsou chráněny před účinky degradačních enzymů v hemolymfě (Touhara a Prestwich, 1992). Zároveň se touto vazbou zvyšuje rozpustnost navázaných hormonů a ty tak mohou lépe pronikat k cílovým tkáním. V cílovém místě dochází k jejich disociaci a hormony pak samostatně procházejí přes plazmatickou membránu a váží se na receptory uvnitř buňky (Goodman a kol., 1984).

2.2.4. DEGRADACE

Hlavní proces degradace JH probíhá za působení esteráz (JHEs) a epoxidových hydroláz (JHEHs). Sanburg a kol. (1975) uvádí, že existují dvě třídy esteráz podílejících se na metabolismu JH; tzv. specifické JHEs a nespecifické (α -naftyl-acetát) esterázy. Zatímco úloha specifických JHEs při snižování titru JH v hemolymfě je dobře prostudována (Roe a kol., 1997; Hammock a kol., 1990), význam nespecifických esteráz zatím není přesně znám.

Základní hypotéza metabolismu JH uvádí, že nejdříve specifické JHEs v hemolymfě hydrolyzují esterovou vazbu, čímž vzniká kyselina JH. JHEHs z ní poté ve tkáních vytvářejí diol, který je nakonec přeměněn ve vysoce polární JH a JH metabolity (Obr. 2.5; deKort a Granger, 1996; Gilbert a kol., 2000). Předpokládá se, že existují i další způsoby degradace jako oxidace či konjugace molekul JH, které však zatím nebyly důkladně prostudovány (Nation, 2002).



Obr. 2.5: Model metabolismu JH. Bp = vazebný protein (binding protein)
(Roe M., nepublikováno; zdroj Gilbert a kol., 2000)

2.3. Význam a funkce juvenilních hormonů hmyzu

Juvenilní hormony ovlivňují téměř všechny aspekty hmyzího života, jako je embryogeneze, larvální svlékání, metamorfóza, syntéza vitellogeninu, vývoj ovárií, kastový systém sociálního hmyzu, polymorfismus, larvální a imaginální diapauza, zbarvení ale i metabolismus spojený s těmito funkcemi (Nijhout a Wheeler, 1982; Kumaran, 1990).

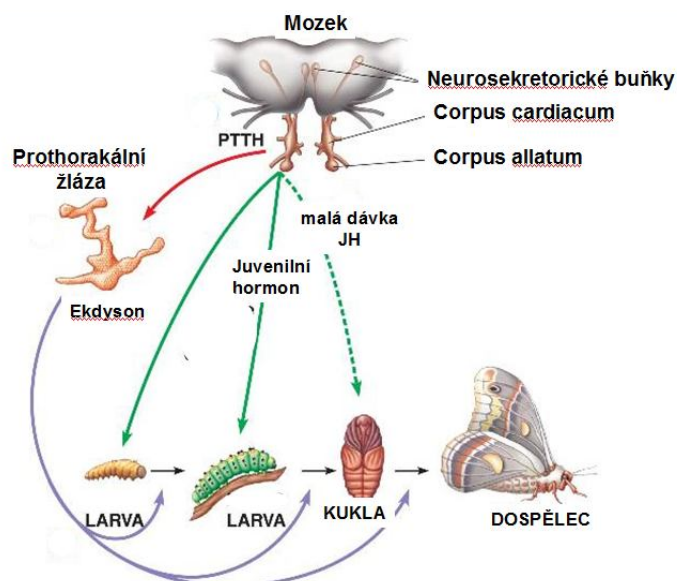
2.3.1. SVLÉKÁNÍ A METAMORFÓZA

Nejvýznamnější a nejvíce prostudovanou funkcí juvenilních hormonů je vliv na vývoj hmyzu. Jejich název pochází ze schopnosti udržovat jedince v larválním (juvenilním) stadiu a bránit přeměně v dospělce (Sláma a kol., 1974).

První teorie předpokládaly, že svlékání a metamorfóza hmyzu jsou řízeny postupným poklesem titru JH za současného nárůstu titru ekdysteroidů. Piepho (1960) navrhl tzv. teorii gradientu, která popisuje postupný pokles titru JH u jednotlivých vývojových stádií: larva (vysoký titr) - kukla (nízký titr) - imago (žádný titr). Dalším výzkumem a kvantifikací titru JH a ekdysteroidů však bylo prokázáno, že celý proces metamorfózy a svlékání hmyzu je daleko komplikovanější. Především pak u hmyzu s proměnou dokonalou (*Holometabola*), který musí prodělat kompletní reorganizaci tělních struktur během pupálního stádia (Hartfelder, 2000). Pečlivou analýzou hormonálních titerů a experimenty s využitím syntetických hormonů bylo zjištěno, že podstatné je působení JH v určitých kritických obdobích, které se později podařilo pro jednotlivé larvální stupně různých druhů hmyzu přesně stanovit (Riddiford, 1994).

Metamorfóza je zahájena v posledním larválním instaru, jakmile larva dosáhne kritické váhy a velikosti těla. Tím dochází ke stimulaci neurosekretorických buněk mozku a ty uvolní prothoracikotropní hormon (PTTH), který dále stimuluje produkci ekdysonu. Souběžně s tvorbou ekdysonu dochází k prudkému poklesu titru JH (Obr. 2.6). Právě toto období absence JH v cílových tkáních je označováno jako tzv. citlivá (senzitivní) perioda, neboť zde dochází k reprogramaci mozku a přepnutí larválního programu na program syntézy imaginálních tkání. Buňky a tkáně, které tento krok provedly, jsou již vůči JH necitlivé (Sláma, 1975; Nijhout a Wheeler, 1982).

U holometabolního hmyzu se setkáváme se dvěma kritickými obdobími citlivosti hmyzu k JH. První je v době, kdy je nepřítomností JH spouštěna larválně-kuklová přeměna. Druhé období nastává v době kuklového stadia, kdy se malým impulsem JH stabilizují imaginální disky, které později dávají vznik křídům, končetinám, genitáliím a dalším imaginálním strukturám (Sláma a kol., 1974; Hartfelder, 2000).



Obr. 2.6: Hormonální regulace metamorfózy hmyzu (Chen, 2009)

2.3.2. REPRODUKCE A DIAPAUZA

Další podstatnou úlohu hraje juvenilní hormon při reprodukci hmyzu. Na rozdíl od období před metamorfózou, kdy JH zabraňuje genové expresi, v dospělosti působí stimulačně na expresi genů a buněčné funkce (Engelmann, 1970). U samic JH ovlivňuje produkci vajíček tím, že reguluje tvorbu vitellogeninů v tukovém tělese a umožňuje jejich transport přes folikulární

epitel do oocytů (Nijhout, 1994; Hoffman, 1995). U samců stimuluje činnost přídatných pohlavních žláz, kde působí na produkci spermatoforu a dalších sekretů, které jsou předávány při kopulaci samici a ovlivňují její reprodukční fyziologii a chování. Pouze u některých druhů hmyzu JH usměrňuje také délku spermatogeneze a mitotický cyklus spermatogonií (Wyatt a Davey, 1996; Hartfelder, 2000).

Za nepříznivých podmínek prostředí může být reprodukce přerušena diapauzou, která je primárně indukovaná krátkou fotoperiodou. Celý průběh diapauzy je řízen hormonálně a JH je jedním z faktorů, který se spolupodílí na jejím ukončení (Sláma a kol., 1974).

Kromě těchto funkcí JH působí také na disperzní a letovou aktivitu, tvorbu feromonů, volací chování, postkopulační změny v chování samic a ovipoziční chování (Hartfelder, 2000; Flatt a kol., 2005).

2.3.3. KASTOVÝ POLYMORFISMUS SOCIÁLNÍHO HMYZU

Společně s neurohormony a ekdysteroidy ovlivňuje JH i tvorbu kast u sociálního hmyzu. Detailní analýzy JH titru u včely medonosné (*Apis mellifera*) během embryogeneze, larválního a pupálního vývoje ukázaly, že vyšší titr JH indukuje vývoj královny, zatímco nízká hladina JH zapříčiňuje vývin jedinců nižších kast. Úroveň syntézy JH pravděpodobně souvisí s kvalitou a kvantitou potravy přijímané během larválního vývoje, což přímo působí na CA, která zajišťuje jeho produkci. Zvýšený titr JH pak působí na prothorakální žlázy a produkci ekdysteroidů, což v prepupálním stadiu pravděpodobně stimuluje transkripci příslušných genů odpovědných za vývoj dominantních jedinců (Hartfelder a Engels, 1998).

Současné studie sociálního hmyzu dokazují, že JH také úzce souvisí s ostatními aspekty sociálního života hmyzu a ovlivňuje nejen vznik rozdílných morf, ale i jejich plasticitu chování (Hartfelder, 2000).

2.3.4. FÁZOVÝ DIMORFISMUS SARANČAT A POLYMORFISMUS MŠIC

Jsou známy také účinky JH při regulaci fázového dimorfismu u sarančat (Staal, 1959) a sezónního polymorfismu mšic (Novák, 1975). Polymorfismus hmyzu je úzce spjat s environmentálními vlivy a JH jsou pouze jedním z faktorů, které se na něm spolupodílí (Hartfelder, 2000).

U mšic JH usměrňují vznik křídelního polymorfismu a partenogenetických samic (*Virginoparae*), u kterých regulují ovariální vývoj (Hardie a kol., 1996). Další forma vývojového polymorfismu související s migrací a reprodukcí je fázový dimorfismus sarančat.

Saranče stěhovavá (*Locusta migratoria*) a saranče pustinná (*Schistocerca gregaria*) se v závislosti na environmentálních vlivech vyskytují ve dvou formách. Tyto morfy se od sebe odlišují zbarvením, morfometrickými znaky, metabolismem, letovou aktivitou, fertilitou i chováním (Pener, 1991). V průběhu gregarijní fáze samičky produkují méně vajíček, jedinci jsou hnědě zbarvení, s velkými křídly a titr JH je nízký. Oproti tomu solitérní sarančata se vyznačují světlým až zeleným zbarvením, krátkými křídly, zvýšeným titrem JH i plodností samic. Experimentálně bylo prokázáno, že deficiencie JH způsobuje změnu světlého zbarvení. Stejně tak typické chování obou morfů může být řízeno hladinou JH. Agresivní chování typické pro solitérní jedince bylo navozeno u jedinců v gregarijní fázi po aplikaci JH. Zároveň bylo silně potlačeno agregační chování, které je pro ně typické (Pener a Yerushalmi, 1998).

2.4. Analogy hmyzích juvenilních hormonů

V roce 1956 objevil Carroll Williams kontaktní působení juvenilního hormonu. Poprvé navrhnul možnost jeho využití v boji proti škodlivému hmyzu a díky jeho působení na fyziologickém principu jej označil za „insekticid třetí generace“ (Williams, 1956). Při aplikaci JH na hmyz ve vysokých dávkách nebo ve fyziologicky neadekvátním vývojovém období totiž dochází k poruchám metamorfózy a životně důležitých funkcí (Hrdý a kol., 1991). Vzhledem k tomu, že juvenilní hormon je v prostředí i v těle hmyzu málo stálý, hledaly se podobné, ale stabilnější a účinnější látky (Sláma a kol., 1974). Zejména s objevem juvabionu pak začal intenzivní výzkum těchto látek (Sláma a Williams, 1965). Od první poloviny šedesátých let 20. století pak bylo nasyntetizováno a otestováno několik tisíc analogů juvenilních hormonů (JHA) (Hrdý, 1997). Jejich výhody ve srovnání s konvenčními insekticidy spočívají především v tom, že jsou vysoce účinné vůči hmyzím škůdcům a relativně netoxické k ostatním živočichům (Minakuchi a Riddiford, 2006; Příloha 7). K dalším přednostem patří schopnost jejich biodegradace půdními bakteriemi (Novák a kol., 2008).

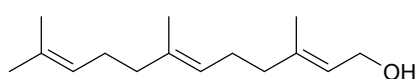
2.4.1. JUVENOIDY

Termín juvenoid označuje látku simulující účinek JH a může se jednat jak o přírodní látku, tak o syntetický preparát (Sláma a kol., 1974). Různých typů juvenoidů je dnes známo několik tisíc a biologická účinnost některých z nich mnohonásobně převyšuje účinnost vlastních JH (Hrdý a kol., 2000).

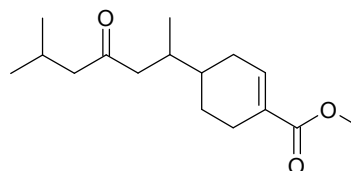
2.4.1.1. Přírodní juvenoidy

První objevenou přírodní látkou vykazující aktivitu JH byl seskviterpenický alkohol farnesol, který byl izolován z exkrementů potemníka moučného (*Tenebrio molitor* L.) a z kvasinek (Schmialek, 1961). V roce 1965 pak Sláma a Williams popsali účinky tzv. „papírového faktoru“ na vývoj ruměnice pospolné žijící v chovech v kontaktu s papírem vyrobeným z kanadských jedlí balzámových (*Abies balsamea* L.). Bowers a kol. (1966) pak o rok později izolovali tuto aktivní sloučeninu a pojmenovali ji juvabion. Ze stejného druhu jedle, avšak slovenského původu byl kromě juvabionu získán i dehydrojuvabion (Černý a kol., 1967). Juvabion byl poté podroben testování na řadě druhů hmyzu a výsledky prokázaly účinnost pouze na zástupce čeledi ruměnicovitých (*Pyrrhocoridae*) (Bowers a kol., 1966). Tato skutečnost podpořila původní Williamsovu myšlenku o vysoké specifčnosti JH minimálně na úrovni čeledi či v rámci určité třídy hmyzu.

Objev juvenilizačních vlastností extraktů z jedlí balzámových inicioval další výzkum vedoucí k nalezení celé řady jiných přírodních látek ovlivňujících vývoj hmyzu. Japonští autoři publikovali roku 1983 objevení dalších analogů juvabionu s JH aktivitou získaných z jedle sachalinské (*Abies sachalinensis* Mast.) (Numata a kol., 1983). Z rostlin bazalky pravé (*Ocimum basilicum* L.) byly izolovány vysoce biologicky aktivní látky- juvocimen I a juvocimen II (Nishida a kol., 1984). V roce 1984 byl získán další aromatický analog juvocimenu ze semen rostliny *Psoralea corylifolia* L., který byl pojmenován bakuchiol (Vig a kol., 1984).



Farnesol



Juvabion

Obr. 2.7: Strukturní vzorce přírodních juvenoidů

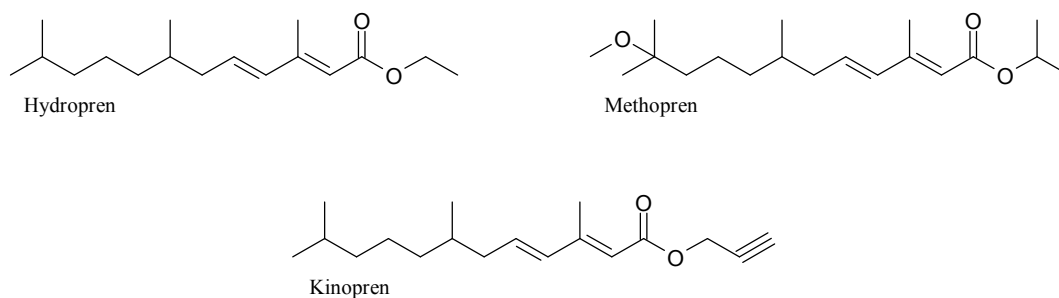
2.4.1.2. Syntetické juvenoidy

Při přípravě prvních syntetických JHA se vycházelo ze znalosti struktury přírodních JH, juvabionu, farnesolu a některých jeho derivátů vykazujících biologickou aktivitu (Rejzek a kol., 1994). V několika světových laboratořích vznikaly látky, které se svou chemickou strukturou původní podobě juvenilního hormonu postupně vzdalovaly. Hledaly se sloučeniny dostatečně stabilní s vysokou biologickou aktivitou (Hrdý a kol., 2000).

V sedmdesátých letech 20. století prokázaly nejvyšší účinnost v laboratorních i polních podmínkách isoprenoidní juvenoidy vyvinuté americkou firmou Zoecon. Prvním zde připraveným juvenoidem byl hydropren, který byl původně vyvíjen jako aficid (Henrick, 1991). Pro svou vysokou těkavost a nízkou stabilitu v prostředí se však v ochraně rostlin neosvědčil. Proto byl registrován až v roce 1984 jako přípravek proti rusům domácím (*Blattella germanica* L.), u kterých způsobuje poruchy metamorfózy a neplodnost (Hrdý a kol., 1991).

Ještě úspěšnějším v praxi využívaným juvenoidem se stal methopren, který tvoří účinnou složku přípravků registrovaným proti komárům (*Diptera; Culicidae*), mouchám (např. *Haematobia irritans* L.), blechám (*Siphonaptera*), mravenci faraonu (*Monomorium pharaonis* L.) a některým jiným škůdcům (Henrick, 1991). Kromě boje proti škůdcům se methopren uplatňuje i v hedvábnictví. Při postřiku housenek bource morušového (*Bombyx mori* L.) po posledním svlečení se prodlouží jejich žír o 1-2 dny. Housenky proto více vyrostou, vypředou větší zámotky a produkce hedvábí se zvýší až o 10 %.

Dalším registrovaným juvenoidem stal kinopren, který se využíval se v kombinaci s pyretroidy proti savému hmyzu ve sklenících. Posléze byla jeho výroba pozastavena, avšak vzhledem k rostoucímu odporu vůči konvenčním insekticidům se uvažuje opět o jeho uvedení na trh (Hrdý a kol., 1991).



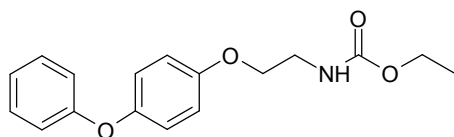
Obr. 2.8: Strukturní vzorce syntetických alifatických juvenoidů

První alifatické juvenoidy však vykazovaly nižší stabilitu, a proto se vývoj dalších látek ubíral směrem k syntéze stabilnějších aromatických sloučenin. Švýcarská firma Dr. R. Maag uvedla na trh několik přípravků na bázi aromatického juvenoidu fenoxycarb (Masner a kol., 1981). Fenoxycarb byl prvním juvenoidem zavedeným do systému ochrany proti polním škůdcům (Miyamoto a kol., 1993) a má široké spektrum účinnosti. V sadech a vinicích se používá ve formě postřiků proti listovým obalečům (*Lepidoptera; Tortricidae*) i řadě červců

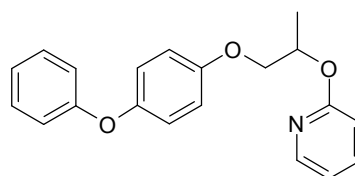
(*Sternorrhyncha; Coccoidea*). V různých formulacích je využíván proti komárům (*Diptera; Culicidae*), mravenci ohňovému (*Solenopsis invicta* Buren) a v domácnostech proti blechám (*Siphonaptera*) a švábům (*Blattodea*). V předběžných testech se osvědčil i proti merám (*Sternorrhyncha; Psylloidea*) a řadě škodlivých housenek jako jsou píďalka podzimní (*Operophtera brumata* L.), bělásek zelný (*Pieris brassicae* L.), předivky (*Yponomeutinae*), včetně druhů minujících v listech (klíněnky aj.) (Hrdý a kol., 1991).

Jiným komerčně úspěšným aromatickým juvenoidem vyvinutým vědci japonské firmy Sumitomo Chemical Company se stal pyriproxifen. Tento juvenoid je registrován proti mouchám, moskytům, mravenci ohňovému, mšici broskvoňové (*Myzus persicae* Sulzer), červci (*Unaspis yanonensis* Kuwana) a molici skleníkové (*Trialeurodes vaporarium* Westw.) (Sullivan a Goh, 2008).

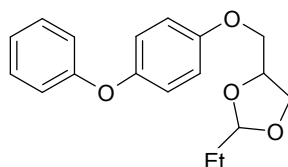
Dalším úspěšným z řady aromatických juvenoidů je diofenolan, který se využívá v sadech proti škodlivým druhům motýlů a červců (Dhadialla a kol., 1998).



Fenoxycarb



Pyriproxifen



Diofenolan

Obr. 2.9: Strukturální vzorce syntetických aromatických juvenoidů

2.4.2. JUVENOGENY

V roce 1976 popsali Sláma a Romaňuk novou skupinu biologicky aktivních látek, které dostaly označení juvenogeny. Při vývoji juvenogenů bylo cílem změnit dočasně fyzikální vlastnosti juvenoidů a tím i jejich způsob aplikace (Wimmer a Romaňuk, 1989). Tyto komplexní sloučeniny působí až poté, co se juvenilní složka uvolní v těle hmyzu jeho enzymatickou činností (Sláma a Romaňuk, 1976). Po chemické stránce jsou vyvíjeny a testovány dva základní typy juvenogenů (Jedlička a kol., 2007).

Prvním typem jsou estery juvenoidů s alkoholovou skupinou a organických kyselin, k jejichž aktivaci dochází působením karboxylesteráz přítomných v hemolymfě a ve tkáních hmyzu (Sláma a kol., 1978a). Postupem času byla testována řada látek, z nichž nejúčinnějším byl ester alkoholu W-330 a kyseliny máselné (Wimmer a kol., 2002). V polních testech se však ukázalo, že tento juvenogen, vzhledem k silným výparům kyseliny máselné, není v praxi použitelný (Hrdý a kol., 2004). Proto je v současné době snaha využívat při syntéze dalších esterových juvenogenů jiné organické kyseliny. Novou sérii juvenogenů tvoří estery nenasycených kyselin a karbamátových juvenoidů W-330 a W-331, jejichž syntéza a první biologické testy byly nedávno publikovány (Wimmer a kol., 2007a).

Druhým typem juvenogenů jsou glykosidy monosacharidů (glukózy nebo galaktózy) a juvenoidů s alkoholovou skupinou. Při jejich syntéze se vycházelo ze znalostí aktivit specifických β -glykosidáz přítomných pouze v zažívacím traktu hmyzu (Sláma, 1981) a tyto sloučeniny byly navrženy jako potenciální systemické pesticidy. Popsané a testované byly poprvé Slámou a kol. (1978b), nicméně přesný popis jejich syntézy a měření čistoty získaných produktů byl publikován teprve nedávno (Wimmer a kol., 2007b).

2.5. Rezistence hmyzu k analogům juvenilních hormonů

Rezistence k insekticidům je dědičně podmíněná schopnost hmyzu odolávat jinak účinným dávkám těchto chemických látek (Onstad, 2008). Mechanizmy rezistence souvisí buď se změnou chování hmyzu (Sparks a kol., 1989) nebo se změnou fyziologických pochodů, při kterých dochází ke zvýšení metabolismu a rychlejšímu odbourávání pesticidů pomocí detoxifikačních enzymů (Karunker a kol., 2008), jejich omezené penetraci přes kutikulu (Vinson a Law, 1971) či ke snížené citlivosti cílového místa pro působení pesticidu vlivem mutace genů (Ishaaya, 2001; Wilson, 2001).

Rezistence se může vyskytovat současně ke dvěma účinnými látkami s různým mechanismem účinku (cross-rezistence) (Ishaaya a kol., 2005) nebo dokonce k několika účinnými látkami najednou (multiple-rezistence) (Onstad, 2008). Příkladem mnohočetné multiple-rezistence je např. rezistence mandelinky bramborové (*Leptinotarsa decemlineata* Say) současně k organofosfátům, pyretroidům a jejich směsným přípravkům, nebo rezistence obaleče jablečného (*Cydia pomonella* L.) k organofosfátům, juvenoidům a inhibitorům tvorby chitinu (Stará a kol., 2009).

Rezistence hmyzu k insekticidům je vážný problém a její výskyt se neustále stupňuje. Poprvé byla rezistence hmyzu zjištěna ve Washingtonu roku 1908 u štítenky zhoubné (*Diaspidiotus*

perniciosus Cumstock) k vápenné síře (Melander, 1914). V současné době je evidováno společností IRAC (Insecticide Resistance Action Committee) více než 550 druhů členovců, rezistentních k jedné či více účinným látkám pesticidů (The Insecticide Resistance Action Committee, 2011).

Když bylo poprvé navrženo využívat látky s hormonální aktivitou jako insekticidy předpokládalo se, že hmyz si k analogům napodobující účinky jejich vlastních hormonů nemůže vyvinout rezistenci. Později se však bohužel ukázalo, že tento předpoklad nebyl správný (Hoffmann a Lorenz, 1998). Rezistence k syntetickým analogům juvenilních hormonů byla poprvé popsána Dyttem již v roce 1972 u potměníka hnědého (*Tribolium castaneum* Herbst). Mechanismus rezistence k methoprenu byl později objasněn Hammockem a kol. (1977) na mouše domácí (*Musca domestica* L.). Prokázal, že radioaktivně značený methopren byl metabolizován daleko rychleji u rezistentních larev než u larev citlivých. Rezistence k methoprenu byla později potvrzena i v polních podmínkách u komárů *Aedes taeniorhynchus* (Wiedemann) na Floridě (Dame a kol., 1998) a *Aedes nigromaculis* (Ludlow) v Kalifornii (Cornel a kol., 2000). Postupem času byla popsána rezistence hmyzu také k hydroprenu, kinoprenu a pyriproxyfenu (Hrdý, 1974; Ishaaya, 1992; Ishaaya a Horowitz 1995; Horowitz a kol., 2003) u nejméně 13 druhů hmyzu z řádů dvoukřídlých (*Diptera*), brouků (*Coleoptera*), stejnokřídlých (*Homoptera*) a motýlů (*Lepidoptera*). Ačkoliv přesný mechanismus vzniku rezistence vůči JHA se stále zkoumá předpokládá se, že je většinou způsobena sníženou schopností penetrace a zvýšeným metabolismem těchto látek, za působení esteráz a cytochrom-P450 monoxygenáz (Hoffmann a Lorenz, 1998).

2.6. Biologické testování a vyhodnocení aktivity JHA

Biologické testy JHA na hmyzu lze rozdělit do dvou základních úrovní. Nejprve se provádí předběžný skrining, při kterém je sledována závislost biologické aktivity na struktuře nově syntetizovaných molekul. Požadavkem na předběžné skriningové testy je především snadná dostupnost testovaného hmyzu, možnost jeho umělého chovu v laboratorních podmínkách a také použití standardní metodiky pro rychlé vyhodnocení a porovnání výsledků. Na základě získaných výsledků jsou pak v dalším kroku vybrané perspektivní sloučeniny testovány na hospodářsky významných druzích hmyzu.

Aby bylo docíleno požadovaného efektu, je důležité při aplikaci testovaných látek zasáhnout cílové vývojové stadium hmyzu. Účinky syntetických JHA jsou zaměřeny především na

inhibici metamorfózy. Při použití JHA na kukly holometabolního hmyzu vznikají formy mezi kuklou a imagem. Vhodnou aplikací na larvy posledního instaru heterometabolního hmyzu vznikají přechodné formy mezi larvou a imagem (Sláma, 1985; Hrdý, 1997). Dochází k závažným malformacím vnějších struktur (např. křídel, nohou) i vnitřních orgánů (např. gonád, svaloviny). Ošetření jedinci nejsou schopni kompletní ekdyze z důvodu narušení důležitých homeostatických mechanismů, diferenciace některých struktur a sledu pohybů nutných pro odvržení staré kutikuly. Následně dochází k postupnému uhynutí. Aplikace testovaných JHA na vajíčka nebo kladoucí samice může způsobit poruchy v embryogenezi (Sláma a kol., 1974; Arias a Mulla, 1975; Hrdý, 1997).

Vyhodnocení aktivity testovaných látek je založeno na kvantifikaci juvenilizačních účinků podle Slámy a kol. (1974). Ty jsou posuzovány podle stupně inhibice metamorfózy určené morfologickými změnami po imaginální ekdysi. Běžné hodnocení juvenilizačních účinků JHA je odstupňovanou škálou přechodných morfologických forem (Sláma a kol., 1974; Staal, 1975; Jedlička a kol., 2007). Výsledná biologická aktivita se uvádí v hodnotách ID_{50} (Inhibition Dose v $\mu\text{g}\cdot\text{ind}^{-1}$) nebo IC_{50} (Inhibition Concentration v $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), vyjadřujících dávku či koncentraci juvenoidu, která způsobí 50 % inhibici metamorfózy (Sláma a kol., 1974; Wimmer a kol., 1997). K vyjádření rozdílu mezi topikální a perorální aktivitou látek se využívá T/O index (Sláma, 1981).

2.6.1. RUMĚNICE POSPOLNÁ

Ruměnice pospolná (*Pyrrhocoris apterus* L.) patří mezi hmyz s proměnou nedokonalou do řádu polokřídělých (*Hemiptera*) podřádu ploštic (*Heteroptera*). Díky své polyfágnosti se tento druh vyskytuje poměrně hojně a byl rozšířen i do Indie a Ameriky. Většinou jsou jeho hlavní složkou potravy lipová semena (*Tilia cordata* Miller; *T. platyphyllos* Scopoli), rostliny z čeledi slézovitých (*Malvaceae*) nebo i jiné rostlinné druhy. Příležitostně může být tento druh i karnivorní nebo dokonce může napadat i oslabené či čerstvě svlečené jedince svého druhu (Socha, 1993).

Již od sedmdesátých let dvacátého století se *P. apterus* využívá jako modelový druh při testování analogů juvenilních hormonů. Výhodou je jeho vysoká citlivost k těmto biologicky aktivním látkám a přesné vymezení senzitivní periody (Sláma, 1985). V závislosti na aktivitě testované látky dostáváme po imaginální ekdyzi řadu přechodných morfologických forem mezi imágem a larvou, tzv. adultoidů a dokonalé nadpočetné instary (Sláma a kol., 1974; Jedlička a kol., 2007; Příloha 1). V současnosti je *P. apterus* používán při sledování závislosti

biologické aktivity na struktuře nových typů juvenogenů a jsou na něm prováděny studie související s degradací a toxicitou těchto biologicky aktivních látek.

2.7. Střevní symbiotické mikroorganismy hmyzu

Trávicí trakt hmyzu představuje přirozené prostředí pro široký okruh mikrobiálních společenstev. Mikroorganismy se zde podílejí na celé řadě interakcí, které jsou důležité jak při fyziologických pochodech hostitského hmyzu, tak pro procesy probíhající v celém ekosystému (Dillon a Dillon, 2004). Se symbiotickými mikroorganismy se setkáváme především u býložravých a všežravých druhů hmyzu, zatímco u masožravých druhů se vyskytují v omezené míře (Buchner, 1965; Kikuchi a kol., 2005).

2.7.1. VÝSKYT A ZPŮSOBY PŘENOSU STŘEVNÍCH MIKROORGANISMŮ

Přirozená střevní mikroflóra je obsažena zejména ve středním a zadním střevě. Zadní střevo hmyzu se obecně vyznačuje především výskytem bakterií rodů *Cytophaga*, *Flexibacter*, *Bacteroides* a různých zástupců ze skupiny *Proteobacteria* a *Spirochaetes*. Mikrobiální společenstvo ve středním střevě je tvořeno téměř výhradně grampozitivními bakteriemi. Mezi bakterie této části střeva patří zejména rody *Actinobacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus* a *Bacillus* (Cazemier a kol., 1997; Moran a Baumann, 2000).

Střevní symbiotické mikroorganismy se mohou vyskytovat buď extracelulárně nebo žijí intracelulárně uvnitř specializovaných tkání. Intracelulární symbionti (endosymbionti) se nacházejí v buňkách střevního epitelu nebo ve speciálních buňkách nazývaných bakteriocyty či mycetocyty. Tyto buňky jsou v tělní dutině nejčastěji spojené s tukovým tělesem nebo gonádami a často se shlukují v útvary zvané bakteriomy či mycetomy (Buchner, 1965; Douglas, 1998). Intracelulární symbionti mají většinou se svým hostitelským hmyzem mutualistický vztah a jsou vertikálně přenášeni z generace na generaci transovariálním přenosem. Jsou to často obligátní symbionti se zjednodušeným genomem, který je přizpůsoben hostitelskému hmyzu pro výměnu a dodávání několika genových produktů s nutriční funkcí (Gil a kol., 2003).

Extracelulární symbionti se nacházejí v lumenu střední a zadní části střeva. Do střev mladých jedinců se dostávají orální cestou při příjmu potravy, kontaminované výkaly ostatních jedinců, v nichž jsou obsaženi. Také mohou být získáváni ze speciálních kapsulí, které jsou součástí

vajíček a slouží jako potrava čerstvě vylíhnutým jedincům (Buchner, 1965). Na rozdíl od intracelulárních druhů není role extracelulárních bakterií při trávení potravy přesně známa a vyžaduje další studium, především u hospodářsky významných druhů hmyzu (Lundgren a kol., 2007).

2.7.2. VÝZNAM STŘEVNÍ SYMBIOTICKÉ MIKROFLÓRY

Význam symbiotických bakterií ve střevech hmyzu je nezastupitelný zejména při trávení potravy, produkci feromonů, syntéze vitaminů, regulaci pH, odolnosti vůči patogenům i při detoxifikaci škodlivých látek (Genta a kol., 2006). Bakterie přítomné v trávicím traktu hmyzu jsou důležité také při rozkladu organické hmoty, mineralizaci a koloběhu řady organických látek v prostředí (Hayashi a kol., 2007).

Mnoho symbiotických bakterií podílejících se na trávení potravy hmyzu patří do čeledi *Enterobacteriaceae* (Douglas, 1998). Bylo prokázáno, že složení střevní mikroflóry je velmi úzce spjata se skladbou přijímané potravy. Například u populace sarančat živící se proteinově bohatou stravou byla zjištěna odlišná mikroflóra od populace živící se nízkoproteinovou potravou (Santo Domingo a kol., 1998). Tyto příklady dokazují, že osídlení trávicího traktu hmyzu symbiotickými bakteriemi je vysoce dynamický proces ovlivněný mnoha různými faktory.

Symbiotické bakterie se podílejí i na produkci živin a enzymů nezbytných pro vývoj a reprodukci hmyzu. Specifické živiny, vyráběné prostřednictvím mikroorganismů zahrnují aminokyseliny, prekurzory či enzymy nezbytné při syntéze vitaminů a mikroprvků. Například u sarančat bylo prokázáno, že metabolity produkované symbiotickými bakteriemi slouží jako prekurzory při syntéze agregačního feromonu (Dillon a kol., 2002). U červotočovitých (*Anobiidae*) se zase podílí na biosyntéze sterolů (Nasir a Noda, 2003) a u kněžic (*Pentatomoidea*) dokonce řídí symbiotické bakterie jejich nymfální vývoj (Fukatsu a Hosokawa, 2002).

Enzymy produkované střevní mikroflórou hrají důležitou roli také při degradaci insekticidů (Dillon a Dillon, 2004). Bylo provedeno mnoho studií, které se zabývaly významem detoxifikačních enzymů při vzniku rezistence hmyzu k insekticidům (Mohan a Gujar, 2003; Beak a kol., 2005; Ma a kol., 2010). Nejčastěji je tato rezistence spojována s enzymy cytochromem P450 monooxygenázou (P450) a glutathion S-transferázou (GST) (Mohan a Gujar, 2003). Nicméně jen málo prací studovalo vztahy mezi enzymy degradujícími insekticidní látky a střevními symbiotickými bakteriemi. Přitom však některé práce poukazují

na rozdílnost střevní mikroflóry populací hmyzu rezistentních a citlivých vůči insekticidům. Indiragandhi a kol. (2007) srovnávali střevní mikroflóru rezistentních a citlivých populací západníka polního (*Plutella xylostella* L.) k prothiofosu a zjistili, že se výrazně liší složením i početností. U rezistentní populace byla prokázána podstatně bohatší střevní mikroflóra. Ke stejným závěrům ve svých pracích dospěli také Mohan a Gujar (2003) a Baek a kol. (2005). K lepšímu pochopení vztahů mezi symbiotickými bakteriemi a jejich hostitelem je nezbytná jejich přesná identifikace.

2.7.3. METODY IDENTIFIKACE MIKROORGANISMŮ

Existuje celá řada metod, kterými je možno stanovit složení mikrobiálních společenstev. Využívají se metody mikroskopické, biochemické, imunochemické, analytické a molekulárně biologické. V základním či aplikovaném výzkumu se při určování mikroorganismů výrazně prosazují především molekulárně biologické postupy.

2.7.3.1. Biochemické metody

Tradiční biochemickou metodou stanovování mikroorganismů je kultivace na plotnách za určitých selekčních podmínek (teplota, světlo, pH, aj.) nebo na selekčních médiích. Tato metoda je jednoduchá, rychlá a poskytuje základní informace o zastoupení jednotlivých mikroorganismů v daném prostředí. Jiné biochemické metody sledují schopnost a rychlost utilizace daného substrátu (Garland a Mills, 1991) nebo jsou založeny na analýze metylesterů mastných kyselin, při které není potřeba bakterie předem kultivovat (Ibekwe a Kennedy, 1998).

2.7.3.2. Imunochemické metody

Imunochemické metody jsou založeny na interakci antigenů s protilátkami. Antigeny jsou makromolekuly přirozeného nebo umělého původu, které navozují specifickou imunitní odpověď a reagují s produkty této odpovědi. Protilátky jsou heterogenní skupinou glykoproteinů živočišného původu, které se označují imunoglobuliny (Ig). Molekula Ig obsahuje nejméně dva identické lehké a dva identické těžké polypeptidové řetězce vzájemně spojené disulfidovými vazbami. Existují dva druhy lehkých řetězců (κ nebo γ), podle kterých se rozlišují různé typy Ig molekul. C-koncové části těžkých řetězců tvoří konstantní oblast, zatímco N-konce jsou variabilní a obsahují vazebné místo (paratop) pro antigen (Hood a kol., 1985; Marchalonis a kol., 1993).

Reakce antigenu s protilátkou je viditelná buď makroskopicky (aglutinace) nebo je detekována dalšími reakcemi, přičemž dnes nejčastěji využívanými jsou imunofluorescence či barevná enzymatická reakce ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) (Carlsson a kol., 1976; Harith a kol., 1988; Björkman a Uggla, 1999). Výhodou imunochemických metod je malá časová náročnost a jejich vysoká senzitivita i specifita (Candlish, 1991).

2.7.3.3. Analytické metody

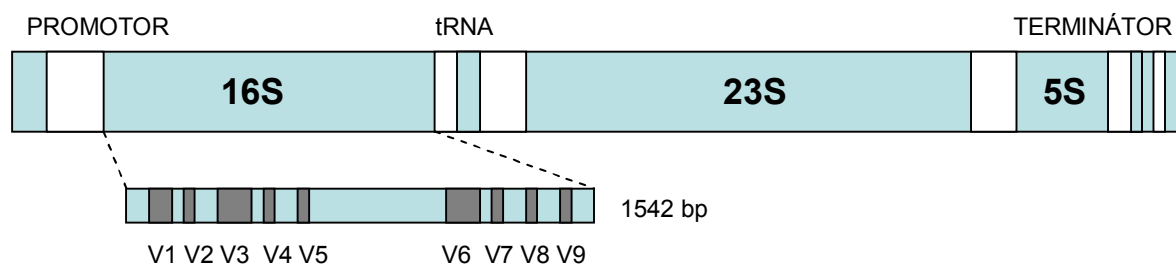
Z analytických metod se v moderní diagnostice bakterií začala využívat metoda hmotnostní spektrometrie MALDI TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight), která je založena na principu rozdílné mobility částic s různou molekulární hmotností v elektromagnetickém poli (Lay 2001; Ruelle a kol., 2004). Tato metoda se používá ke klasifikaci mikroorganismů na základě složení ribozomálních proteinů, neboť bylo prokázáno, že bakterie stejného druhu mají shodné složení ribozomálních proteinů (Sutton a Cundell, 2004). Výsledná spektra jsou porovnána s daty v proteinových databázích dosud identifikovaných mikroorganismů. Na rozdíl od klasických mikrobiologických metod, které mohou trvat až několik dní, je tato metoda velmi rychlá a vysoce citlivá. Další její předností je, že je možné ji provádět, aniž by předem byla udělána předběžná stanovení, jako je tomu u fenotypické charakterizace (barvení dle Grama, test na přítomnost oxidasy) nebo genotypické charakterizace (příprava primerů pro PCR) (Demirev a Fenselau, 2008). V poslední době se již analyzují touto metodou nejen bakterie, ale i houby (Welham a kol. 2000) a viry (Tan a kol., 2000).

2.7.3.4. Molekulárně biologické metody

Molekulární metody patří mezi nejmladší a zároveň nejdynamičtější se rozvíjející metody současné biologie. Automatizace některých technologických postupů, jako jsou syntéza požadovaných fragmentů DNA nebo zjišťování proteinových a nukleotidových sekvencí, umožnila aplikaci molekulárních metod v masovém měřítku. Jiné inovace zase přinesly zjednodušení a zlevnění některých technik a to vedlo k jejich značnému rozšíření. Hlavními výhodami molekulárních metod jsou jednoduchost, vysoká citlivost a rychlost, neboť u mnohých z nich není potřeba mikroorganismy předem kultivovat. Také se díky nim podařilo identifikovat i řadu mikroorganismů, které kultivovat nelze. Dnes se při stanovování mikroorganismů využívá celá řada různých molekulárních metod. Níže jsou stručně popsány pouze metody, které byly využity v této práci při identifikaci střevní mikroflóry ruměnice pospolné.

2.7.3.4.1. Analýza sekvence genu pro 16S rRNA

Jedna z dnes nejčastěji využívaných metod při identifikaci bakterií je založena na principu amplifikace chromozomálního genu kódujícího 16S rRNA metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) a jeho následné sekvenaci (Lane a kol., 1985; Nakatsu a kol., 2000). Gen pro malou ribozomální podjednotku 16S je společně s geny 23S a 5S součástí prokaryotního rRNA operonu. Pro molekulární diagnostiku mikroorganismů byl vybrán právě tento gen z několika důvodů: (i) je přítomen ve všech mikroorganismech a má u nich stejnou funkci, (ii) jeho sekvence je dostatečně konzervativní a přitom obsahuje i variabilní a hypervariabilní úseky, (iii) má přiměřenou velikost (cca 1500 bází), což umožňuje snadné sekvenování a zároveň je tento úsek dostatečně dlouhý na to, aby obsahoval nezbytnou informaci pro přesnou identifikaci a fylogenetickou analýzu (Spratt, 2004). V současné době je analýza genu pro 16S rRNA velmi často využívána také proto, že je k dispozici databáze obsahující velké množství sekvencí, např. RDP (Ribosomal Database Project) (Maidak a kol., 2000; Wang a kol., 2007).



Obr. 2.10: Schématické znázornění struktury prokaryotního rRNA operonu. 16S gen obsahuje evolučně variabilní úseky, které jsou na obrázku označeny šedými obdélníky V1-V9 (Thies, 2007)

Podstatou PCR je enzymatické zmnožení specifického úseku DNA. K vybraným úsekům komplementárních vláken denaturované DNA vzorku při hybridizují krátké syntetické oligonukleotidy (primery), od nichž probíhá syntéza nové DNA zprostředkovaná dependentní DNA polymerázou (Mullis a Faloona, 1987). Pro reakci se využívají termostabilní polymerázy odolávající teplotám, při nichž DNA denaturuje (Saiki a kol., 1988). To umožňuje, aby syntéza DNA probíhala opakovaně formou cyklů, při kterých se v závislosti na teplotě reakční směsi pravidelně střídají tři kroky: denaturace dvouřetězcových molekul DNA, připojení primerů k odděleným DNA-řetězcům (anelace) a polymerizační reakce (prolongace) (Sambrook a Russel, 2001; Barlett a Stirling, 2003). V současnosti

je provádění PCR plně automatické v zařízení nazývaném termocykler, který dokola opakuje stejný teplotní program (94 °C, 40 – 60 °C, 72 °C) (Schwägele, 1999). V průběhu 20 až 30 cyklů dochází ke zdvojnásobení a následně pak exponenciálnímu nárůstu počtu úseků na DNA ohraničených místy, k nimž se připojily primery. Výsledným produktem reakce jsou fragmenty DNA definované délkou (obvykle desítky až tisíce nukleotidů), jejichž přítomnost v reakční směsi se prokazuje elektroforézou v polyakrylamidovém (PAA) nebo agarózovém gelu (Barlett a Stirling, 2003).

Posledním krokem analýzy genu pro 16S rRNA je jeho sekvenace. Metody určené ke stanovení sekvence DNA byly objeveny na konci sedmdesátých let minulého století (Handelsman, 2004). Existují dva odlišné principy sekvenačních metod, přičemž metoda enzymová (Sanger a kol., 1977) v současné době zcela zastínila druhou, chemickou metodu (Maxam a Gilbert, 1977). Během posledních deseti let bylo vyvinuto mnoho modifikací původní Sangerovy metody, které umožnily stanovit sekvence DNA rychleji a jednodušším způsobem (Hall, 2007). Tento vývoj umožnil sledovat zastoupení mikroorganismů také ve vzorcích, kde je přítomno velké množství bakteriálních druhů (Handelsman, 2004).

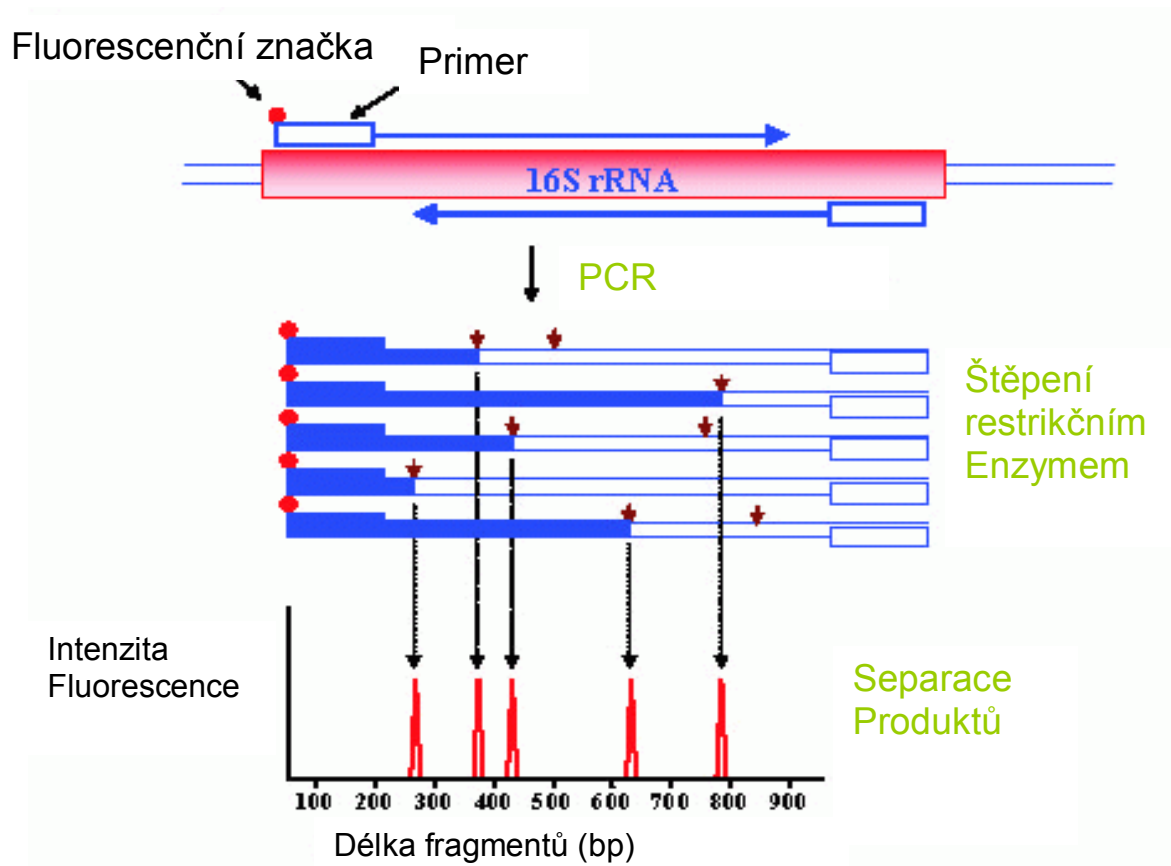
2.7.3.4.2. Restrikční polymorfismus délky terminálních fragmentů (T-RFLP)

Restrikční polymorfismus délky terminálních fragmentů (T-RFLP) je metoda založená na amplifikaci cílového úseku DNA pomocí PCR s primery značenými fluorem na 5' konci, restrikčním štěpením a následné separaci vzniklých různě velkých fragmentů automatickým sekvenačním systémem s vysokým stupněm rozlišení (Pandey a kol., 2007). Metodu T-RFLP tak jak je dnes nejčastěji prováděna popsal Liu a kol. v roce 1997 a v současné době je úspěšně využívána při rozbořech mikrobiálních společenstev ve vodě i v půdě, při určování diverzity mikroorganismů v rostlinných pletivech nebo rhizosféře rostlin a také při identifikaci symbiotických bakterií trávicího traktu hmyzu a savců (Thies, 2007).

Důležitým požadavkem pro T-RFLP analýzu je znalost sekvence cílového genu, aby mohly být navrženy degenerované nebo univerzální PCR primery (Marsh, 1999). Nejčastěji používaný úsek DNA při rozboru mikrobiálních společenstev je stejně jako u předchozí metody sekvence genu 16S rRNA, protože je k dispozici databáze obsahující velké množství sekvencí. Primery vybrané pro T-RFLP jsou schopny amplifikovat téměř celý gen, proto by po amplifikaci v DNA měla být obsažena všechna štěpná místa (Marsh a Nakatsu, 2007). Amplifikace úseků z celé bakteriální komunity je podstatně náročnější než v případě, kdy je jako templát použita DNA izolovaná z čistých kultur. Proto se do reakce přidává hovězí

sérový albumin (BSA), který zabraňuje vedlejším interakcím. Při amplifikaci vysoce konzervativních úseků DNA jsou výsledné PCR produkty podobné délky. K jejich rozdělení je potřeba je rozštěpit pomocí restrikčních endonukleáz (RE). Ještě před restrikčním štěpením se však provádí purifikace PCR produktu, neboť je důležité ze vzorku odstranit zbývající *Taq*-polymerázu a ionty (Thies, 2007).

RE neboli restriktázy jsou enzymy, které štěpí specifické sekvence DNA. Jsou produkovány mnoha druhy bakterií a jejich přirozenou funkcí je odbourávání cizorodé DNA, která se do bakteriálních buněk dostává např. při infekci bakteriofágem. Každá RE rozpoznává jen určitou, pro ni specifickou sekvenci (Rosypal a kol., 2002). Při analýze 16S rDNA je dostupná databáze s velkým počtem sekvencí a není tedy problém najít vhodný enzym. Nejčastěji jsou používány endonukleázy rozpoznávající 4 báze, protože je u nich vyšší pravděpodobnost výskytu cílových míst. Po enzymatickém štěpení lze z výsledných grafů nakonec zjistit, jak velké úseky a v jakém množství vznikají. Velikost terminálních fragmentů a štěpná místa jsou specifická pro jednotlivé druhy bakterií (Thies, 2007).



Obr. 2.11: Průběh T-RFLP metody (Fernández-Guerra, 2009)

3. CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo ověřit biologickou účinnost nově syntetizovaných juvenogenů na ruměnici pospolné (*Pyrrhocoris apterus* L.). Na základě výsledků těchto testů bude vybráno několik perspektivních látek, u kterých bude předpoklad jejich praktického využití. Zároveň byl sledován vliv testovaných látek na střevní symbiotickou mikroflóru *P. apterus*, o které je zatím jen obecně známo, že hraje významnou roli při degradaci insekticidů a vzniku metabolické rezistence hmyzu vůči nim.

V průběhu práce byly postupně řešeny tyto dílčí úkoly:

- Založení laboratorního chovu ruměnice pospolné, zvládnutí metod aplikace JHA, ověření správnosti provádění a vyhodnocování pokusů testováním několika látek se známou aktivitou.
- Určení biologické účinnosti nových typů juvenogenů a porovnání jejich aktivity s aktivitou komerčních juvenoidů již využívaných v praxi.
- Identifikace kultivovatelných střevních bakterií ruměnice pospolné metodou hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF a analýzou sekvence genu pro 16S rRNA.
- Sledování vlivu vybraných látek na množství a diverzitu symbiotické střevní mikroflory ruměnice pospolné pomocí metody T-RFLP.

4. METODIKA PRÁCE

4.1. Testy biologické aktivity JHA

4.1.1. LABORATORNÍ CHOV

Populace ruměnice pospolné byla získána z biologické laboratoře Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v Praze v roce 2008. Zde byl chov založen roku 2004 z několika populací původem ze tří lokalit: Praha, Holoubkov a Hrobce. V zimě roku 2010 byl však tento chov napaden infekcí neznámého původu a proto byl na jaře téhož roku založen nový chov, původem z Entomologického ústavu BC AV ČR v Českých Budějovicích.

Laboratorní chov byl udržován v klimatizovaném boxu a jako potrava mu byla podávána semena lípy malolisté (*Tilia cordata* Miller.) a voda. Konstantní podmínky pro chov a experimenty byly: teplota 27 ± 2 °C, $50 \pm 5\%$ relativní vlhkost a fotoperioda 18 h světlo: 6 h tma.

4.1.2. TESTOVANÉ LÁTKY

Izolace fytoosterolů z rostlinných extraktů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a následná příprava juvenogenů byla realizována na pracovišti Ústavu experimentální botaniky AV ČR v Praze Krči. Podrobný popis jejich syntézy byl publikován v pracích Svobodová a kol. (2010; látky označené HS) a Jurček a kol. (2009; látky označené JO). Strukturální vzorce testovaných látek jsou přiloženy v přílohách (příloha 2, 3).

Pro srovnávací testy byly použity juvenoidy W-328, W-330 a W-331, připravené v Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v Praze (strukturální vzorce uvedeny v kapitole 5.1.1.) a komerčně využívané juvenoidy methopren (Methoprene Pestanal[®], Riedel de-Haën), fenoxycarb (Fenoxycarb Pestanal[®], Riedel de-Haën) a pyriproxyfen (Chemispol Ltd, Kolín, ČR).

4.1.3. APLIKAČNÍ METODY

Schopnost JHA pronikat přes integument hmyzu a jejich rozpustnost v organických rozpouštědlech umožňuje využívat při testování jejich aktivity hned několik aplikačních metod. Metodika biologických testů byla provedena podle Slámy a kol. (1974) a každý JHA byl aplikován topikálně a perorálně. Jednotlivé koncentrace byly testovány vždy na 10 jedincích ve třech opakováních. Vývoj a mortalita ošetřených jedinců byly v průběhu experimentů denně kontrolovány.

4.1.3.1. Topikální aplikace

Při topikální aplikaci byla testovaná látka nejdříve zředěna acetonem ve třech koncentracích (0.05, 0.5, a 5 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$). 1 μl této směsi byl poté aplikován na čerstvě svlečené larvy pátého instaru *P. apterus* pomocí Burkhardova mikroaplikátoru. Kontrola byla ošetřena 1 μL acetonu.

4.1.3.2. Perorální aplikace

Perorální aplikace byla prováděna picím testem, při kterém je každá testovaná látka zředěna zásobním roztokem v koncentracích 0.025, 0.25, 2.5 a 25 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ a podávána v malých vialkách ucpaných buničinou jedincům posledního larválního instaru. Zásobní roztok byl připraven smícháním 5 μl Tweenu-80 (Sigma-Aldrich) se 100 μl acetonu a následným zředěním destilovanou vodou na 50 ml.

Tato metoda je založena na skutečnosti, že spotřeba vody v posledním larválním instaru *P. apterus* je přibližně 55 μl na jedince během prvních tří dnů následujících po ekdysi (Jedlička a kol., 2007), což umožňuje téměř přesný výpočet dávky testované látky. V kontrolních variantách byl používán zásobní roztok.

4.1.4. VYHODNOCOVÁNÍ BIOLOGICKÉ AKTIVITY

Vyhodnocení aktivity jednotlivých juvenogenů bylo provedeno na základě kvantifikace juvenilizačních účinků popsané Jedličkou a kol. (2007). Ty jsou posuzovány podle stupně inhibice metamorfózy určené morfologickými změnami po poslední ekdysi. Hodnotící systém zahrnuje vytvoření dokonalých dospělců (0% inhibice), mírně ovlivněných dospělců, u kterých je sternum s místy červené pokožky larválního typu (20% inhibice), adultoidů se zkrácenými polokrovkami a sternem i tergem s místy larvální pokožky (40% inhibice), adultoidů se zkrácenými a deformovanými polokrovkami; sternem a tergem pokrytým červenou pokožkou larválního typu (60% inhibice), téměř úplné poslední instary larev s výjimkou přítomnosti barevného vzoru pokožky dospělců na polokrovkách (80% inhibice) a nadpočetných superlarev (100% inhibice). Stupnice hodnocení vlivu JHA na *P. apterus* uvedena v příloze 1.

Výsledky biologických testů byly zpracovány probitovou analýzou za pomoci statistického software XLSTAT 2010 (Addinsoft, USA). Konečná biologická aktivita je uvedena v hodnotách ID_{50} s 95% konfidenčními limity, které byly odvozeny z účinnostních křivek získaných testováním látek koncentrační řadou. Pro vyjádření poměru mezi topikální a perorální aktivitou byl spočítán T/O index.

4.2. Mikrobiologické metody

4.2.1. IZOLACE A KULTIVACE STŘEVNÍCH MIKROORGANIZMŮ

Bakterie byly izolovány ze střev dospělců *P. apterus*, předem dezinfikovaných v 5% chlornanu sodném a poté promytých a narkotizovaných ve sterilní destilované vodě. Střeva byla vypreparována za sterilních podmínek pod binokulární lupou v pitvací misce s fyziologickým roztokem a homogenizována ručním drtičem Pellet pestle (Sigma–Aldrich, USA) v mikrozkuhavce v poměru 1:1 s 0,1M pyrofosfátem sodným (pH 7; Sigma-Aldrich, USA). Tato suspenze byla dále ředěna desítkovou řadou a 20 µl suspenze bylo rozetřeno na plotny s tuhým LB a PCA médiem. Složení médií je uvedeno v Příloze 4. Kultivační média byla sterilována v autoklávu PS20A (Chirana, ČR) při tlaku 0,12 MPa a teplotě 121°C po dobu 20 minut.

Plotny byly kultivovány v obrácené poloze (zavěšený agar) za aerobních podmínek při 30°C. Po nárůstu byly vybrány jednotlivé kolonie, které se lišily velikostí, barvou a morfologií. Ty byly sterilní kličkou nanášeny na nové plotny s tuhým LB médiem a kultivovány na zavěšeném agaru při 28 °C. 24 hodin staré kultury byly podrobeny Gramovu barvení a KOH testu, pro rozlišení grampozitivních a gramnegativních bakterií.

4.2.2. IDENTIFIKACE ZÍSKANÝCH KULTIVOVATELNÝCH MIKROORGANIZMŮ

Identifikace získaných kultivovatelných bakterií byla provedena pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF a molekulární analýzou chromozomálního genu pro 16S rRNA. Tato část práce byla realizována na Ústavu biochemie a mikrobiologie VŠCHT v Praze ve spolupráci s Ing. Petrem Štursou (MALDI-TOF) a Ing. Ondřejem Uhlíkem, Ph.D. (analýza sekvence genu pro 16S rRNA).

4.2.2.1. Stanovení složení ribozomálních proteinů metodou hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

Pro stanovení složení ribozomálních proteinů jednotlivých izolátů byla použita 24 hodin stará bakteriální kultura získaná po kultivaci na tuhém LB médiu při 28 °C. Sterilní špičkou bylo z jednotlivých kultur odebíráno několik buněk a nanášeno na MALDI podložní desku. Takto připravené vzorky byly převrstveny 1,2 µl matrice Matrix solution HCCA (Bruker Daltonics, Německo) a vloženy do hmotnostního spektrometru Biflex IV (Bruker Daltonics, Německo). Přístroj byl kalibrován standardem dodávaným firmou Bruker Daltonics. Měření probíhalo v lineárním režimu za konstantního potenciálu 18,9 kV, tlaku nižšího než $9 \cdot 10^{-5}$ Pa a rozsahu

2000-20000 Da. Výsledná spektra byla porovnána s daty v proteinové databázi BioTyper (Bruker Daltonics, Německo).

4.2.2.2. Analýza sekvence genu pro 16S rRNA

4.2.2.2.1. Izolace mikrobiální DNA

Pro izolaci totální DNA byla použita 24 hodin stará bakteriální kultura narostlá v tekutém LB médiu. Vzorky byly kultivovány v jednorázových zkumavkách (15 ml) na třepačce IKA-Vibrax-VXR (Thermo Fisher Scientific, USA) při 130 rpm a 28 °C. Izolace DNA z čistých bakteriálních kultur byla provedena pomocí komerční soupravy QIAamp DNA Mini Kit od firmy Qiagen (Německo). Uvedený postup, chemická činidla a speciální mikrozkušavky s kolonkami jsou součástí kitu. Složení pufrů výrobce neuvádí. Veškeré centrifugace probíhaly v miniodstředivce Centrifuge 5415C (Eppendorf, Německo) při 4 °C.

Z každého vzorku bylo nejprve do sterilních mikrozkušavek (1,5 ml) odebráno 1 000 µl kultivačního média s bakteriálními buňkami a ty byly odstředěny při 7 500 rpm po dobu 5 min. Po slití supernatantu byl získaný sediment buněk resuspendován v 180 µl ATL pufru. Společně s 20 µl proteinkinázy K byly vzorky promíchány na vortexu a inkubovány 3 h při 56 °C. V průběhu inkubace vzorky ještě třikrát promíchány. Po krátkém odstředění bylo ke vzorkům přidáno 200 µl AL pufru a vše bylo znovu promícháno a inkubováno ještě 10 min při 70 °C. Po krátkém odstředění a přidání 200 µl ethanolu (96-100%) byly vzorky promíchány a převedeny do mikrozkušavek se speciální aktivovanou kolonkou (QIAamp Mini spin column, 2 ml). Ty byly nejprve centrifugovány 1 min při 8 000 rpm a poté dvakrát promyty 500 µl pufru AW1 a AW2. Po každém nanesení promývacího pufru na kolonku následovalo odstředění při 8 000 rpm po dobu 1 min a slití vodné fáze. Na závěr byla izolovaná DNA centrifugována „na sucho“ 3 min. při 14 000 rpm a eluována do 200 µl AE pufru. Takto připravené vzorky byly uloženy do mrazícího boxu do -20 °C. Kvalita izolované DNA byla vždy před provedením PCR prověřena elektroforeticky (viz. kapitola 4.2.2.2.4.).

4.2.2.2.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Extrahovaná DNA vzorků byla použita k amplifikaci chromozomálního genu kódujícího 16S rRNA pomocí primerů 8f (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') a 926r (5'- CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT-3') (Shyu a kol., 2007). Používané primery byly dodány firmou Generi Biotech (ČR).

PCR byla provedena v reakční směsi o objemu 23 μl a tomto složení:

redestilovaná voda	19,4 μl
reakční pufr pro DNA polymerázu (Finnzymes)	2,5 μl
dNTPs (10 mM; Promega)	0,5 μl
primery (100 pmol/ μl ; Biotech)	2 x 0,05 μl
BSA (10 mg/ ml; Promega).....	0,25 μl
DNA polymeráza (DyNAzyme TM II DNA 2.0 U/ μl ; Finnzymes)....	0,25 μl

Reakční směs byla rozdělena do PCR mikrozkušavek a k ní byly přidány 2 μl templátové DNA (~30 ng/ μl). Pro PCR byl použit termocycler T Gradient (Whatman Biometra, Německo) a průběh reakce je znázorněn v Tab. 1.

Tab. 4.1: Průběhu PCR programu pro amplifikaci 16S rRNA

Kroky PCR	Teplota	Čas	Cykly
počáteční denaturace	95 °C	5 min	1x
denaturace	95 °C	45 s	25x
anelace	59 °C	45 s	
polymerace	72 °C	1 min 40 s	
konečná polymerace	72 °C	10 min	1x
chlazení	4 °C	∞	

Pro přípravu vzorků k analýze nukleotidové sekvence DNA byla dále provedena reamplifikace PCR produktů (Thompson a kol., 2002) se stejnými primery 8f a 926r jako v předchozí reakci. Tento krok byl prováděn vždy ve třech paralelách a byla použita tato reakční směs:

redestilovaná voda	37,8 μl
reakční pufr pro DNA polymerázu (Finnzymes)	5 μl
dNTPs (10 mM; Promega)	1 μl
primery (100 pmol/ μl ; Biotech)	2 x 0,01 μl
BSA (10 mg/ ml; Promega).....	0,5 μl
DNA polymeráza (DyNAzyme TM II DNA 2.0 U/ μl ; Finnzymes).....	0,5 μl

Ke 45 μl této reakční směsi bylo přidáno 5 μl templátové DNA z předchozí reakce a zvolen tento program:

Tab. 4.2: PCR program při reamplifikaci PCR-produktů

Kroky PCR	Teplota	Čas	Cykly
počáteční denaturace	95 °C	5 min	1x
denaturace	95 °C	45 s	6x
anelace	59 °C	45 s	
polymerace	72 °C	1 min	
konečná polymerace	72 °C	10 min	1x
chlazení	4 °C	∞	

4.2.2.2.3. Purifikace PCR produktů

Purifikace amplifikovaných fragmentů DNA byla prováděna pomocí komerční soupravy QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Německo) podle protokolu výrobce. Speciální mikrozkušavky s kolonkami a promývací pufr jsou součástí kitu. Složení roztoků výrobce neuvádí.

Ve zkumavce byl smíchán pH indikátor s PB pufrům v poměru 1:250. Tento roztok byl rezipetován po 750 μl do sterilních mikrozkušavek (1,5 ml) a k němu bylo přidáno 150 μl produktu PCR. Pokud se tato směs zbarvila do oranžova či fialova, bylo nutné před purifikací upravit pH přidáním 10 μl 3M octanu sodného. V případě žlutého zbarvení byl roztok rovnou nanášen na kolonky a odstředěn 1 min při 13 000 rpm. Po odstranění vodné fáze byly kolonky promyty PE pufrům a znovu centrifugovány 30 s při 13 000 rpm. Dále bylo provedeno odstředění „na sucho“ při 13 000 rpm po dobu 1 min, kolonky byly vloženy do nových mikrozkušavek a eluovány 5 min při pokojové teplotě 50 μl redestilované vody. Po závěrečné centrifugaci 1 min při 13 000 rpm byly vzorky uloženy do -20 °C. Kvalita amplifikované purifikované DNA byla prověřena elektroforeticky.

4.2.2.2.4. Elektroforetická frakcionace a vizualizace fragmentů DNA

K ověření úspěšnosti izolace DNA a produktů PCR byla využita souprava pro horizontální elektroforézu (BioRad, USA). Vzorky byly nanášeny na 1% agarózový gel, připravený rozvařením agarózy v 1 x TBE pufru (Eppendorf, Německo). K vizualizaci DNA fragmentů byl použit ethidium bromid (Fluka, Německo) v množství 1 μl na 30 ml gelu. Do tuhého gelu

byly nanášeny vzorky DNA spolu s detekční barvou 6x loading dye solution (Fermentas, USA) v poměru 5:1,5. Pro porovnání velikostí získaných fragmentů byl nanesen molekulový marker 1 kb DNA ladder (Promega, USA). Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 110 V. Přibližně po 45 min byla pozorována přítomnost DNA fragmentů v gelu na UV transiluminátoru při vlnové délce 310 nm a výsledky elektroforetické separace byly dokumentovány pomocí fotoaparátu CCD Las 1000 (Fujifilm, Japonsko).

4.2.2.2.5. Stanovení koncentrace DNA

Množství a kvalita amplifikované DNA byla stanovena spektrofotometricky pomocí přístroje NanoDrop ND 1000 (Thermo Scientific, USA), kde na čidlo byly nanášeny 2 μ l vzorku DNA.

4.2.2.2.6. Stanovení nukleotidové sekvence

Amplifikované a purifikované vzorky DNA byly převedeny na koncentraci 90-180 ng/ μ l a zaslány k sekvenaci firmě Geneart AG (Německo). Pro sekvenování byly využity stejné primery 8f a 926r jako pro předchozí PCR amplifikaci. Získané sekvence byly upraveny pomocí programu Chromas Lite 2.33 (Technelysium, Austrálie) a identifikovány porovnáním s databází Ribosomal Database Project (RDP) (Wang a kol., 2007), kde byl podle sekvencí určen rod a z od něj pak dohledán nejbližší kultivovatelný zástupce.

4.2.3. SLEDOVÁNÍ VLIVU TESTOVANÝCH JHA NA STŘEVNÍ MIKROFLÓRU POMOCÍ T-RFLP

Pro sledování vlivu testovaných látek na střevní mikroflóru ruměnice pospolné byla použita metoda restričního polymorfismu délky terminálních fragmentů DNA (T-RFLP). Ta umožňuje sledovat změny v celkovém složení mikrobiálních populací, tedy kultivovatelné i nekultivovatelné bakterie. Z každé série juvenogenů bylo vybráno několik modelových látek, které byly testovány perorálně podle metodiky uvedené v kapitole 4.1.3.2. Pro srovnání byly testovány také komerční juvenoidy (methopren, fenoxycarb, pyriproxifen), 20-hydroxyekdyson (poskytnutý Dr. Milanem Pavlíkem, ÚEB AVČR) a insekticid ze skupiny organofosfátů Reldan 40 EC (Dow AgroSciences, USA).

4.2.3.1. Izolace DNA

Z ošetřených jedinců byla za sterilních podmínek vypreparována střeva (viz kapitola 4.2.1.). Seznam testovaných látek a koncentrací je uveden v Tab. 4.3. V kontrolní variantě 1 byla střeva vypreparována ze samců, kterým byla v průběhu pokusu podávána kontrolní emulze (KE) obsahující aceton. KE byla ve všech dalších variantách využívána k rozpouštění

testovaných látek (viz kapitola 4.1.3.2.). K experimentu byla použita střeva samců a každá varianta obsahovala vždy střeva čtyř jedinců, která byla nejprve homogenizována ručním drtičem Pellet pestle (Sigma–Aldrich, USA) v 180 µl PBS pufru (1,18 g Na₂HPO₄, 0,223 g NaH₂PO₄·H₂O a 8,5 g NaCl na litr; pH 7,5) v mikrozkuhavce (1,5 ml). Izolace DNA byla provedena pomocí komerční soupravy QIAamp DNA Mini Kit od firmy Qiagen (Německo) za stejného postupu jako v kapitole 4.2.2.2.1. Kvalita izolované DNA byla vždy opět prověřena elektroforeticky a získané vzorky DNA byly uloženy do mrazícího boxu do -20 °C.

Tab. 4.3: Přehled látek testovaných při T-RFLP

Vzorek	Varianta	Testovaná koncentrace
1	KE s acetonem	-
2	JO 15 C II	25 µg
3	JO 27 2C	25 µg
4	JO 11 C1 IV	25 µg
5	HS 22-3	25 µg
6	HS 24	25 µg
7	Fenoxycarb	25 µg
8	Methopren	25 µg
9	Pyriproxifen	25 µg
10	20-OH ekdyson	25 µg
11	Reldan 40 EC	0,125 %

4.2.3.1. Restrikční polymorfismus délky terminálních fragmentů DNA (T-RFLP)

Při této metodě bylo postupováno podle protokolu Leigh a Uhlík (nepublikováno) a celkově se skládá ze čtyř kroků:

1. Amplifikace genu pro 16S rRNA

Extrahovaná DNA vzorků byla použita k amplifikaci chromozomálního genu kódujícího 16S rRNA pomocí primerů 8f-FAM (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') a 926r (5'-CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT-3') (Shyu a kol., 2007). Primer 8f-FAM obsahuje na 5'-konci fluorescenční značku 6-karboxyfluorescein, proto bylo nutné pracovat v laminárním boxu bez světla. Používané primery byly dodány firmou Generi Biotech (ČR). Jako pozitivní kontrola byla v této metodě použita DNA čisté kultury *Pseudomonas stutzeri* JM 300, poskytnutá Ing. Ondřejem Uhlíkem, PhD z Ústavu biochemie a mikrobiologie VŠCHT v Praze.

PCR byla provedena v reakční směsi o objemu 12 μl a tomto složení:

redestilovaná voda	10,2 μl
reakční pufr pro DNA polymerázu (Finnzymes)	1,25 μl
dNTPs (10 mM; Promega)	0,25 μl
primery (100 pmol/ μl ; Biotech)	2 x 0,025 μl
BSA (10 mg/ ml; Promega).....	0,125 μl
DNA polymeráza (DyNAzyme TM II DNA 2.0 U/ μl ; Finnzymes)....	0,125 μl

K této reakční směsi bylo přidáno 0,5 μl templátové DNA (~30 ng/ μl) a teplotní profil reakce je uveden v tabulce 4.4.

Tab. 4.4: Průběhu PCR programu pro T-RFLP

Kroky PCR	Teplota	Čas	Cykly
počáteční denaturace	95 °C	5 min	1x
denaturace	95 °C	45 s	30x
anelace	56 °C	45 s	
polymerace	72 °C	1 min 30 s	
konečná polymerace	72 °C	10 min	1x
chlazení	6 °C	∞	

Výsledky PCR byly ověřeny pomocí horizontální elektroforézy (kapitola 4.2.2.2.4.) na 1 % agarózovém gelu a poté byla provedena reamplifikace PCR produktů se stejnými primery 8f-FAM a 926r jako v předchozí reakci.

Reamplifikace byla provedena v reakční směsi o objemu 45 μl a tomto složení:

redestilovaná voda	37,8 μl
reakční pufr pro DNA polymerázu (Finnzymes)	5 μl
dNTPs (10 mM; Promega)	1 μl
primery (100 pmol/ μl ; Biotech)	2 x 0,1 μl
BSA (10 mg/ ml; Promega).....	0,5 μl
DNA polymeráza (DyNAzyme TM II DNA 2.0 U/ μl ; Finnzymes)....	0,5 μl

K reakční směsi bylo přidáno 5 μl amplifikované DNA z předchozí reakce a byl použit teplotní program uveden v tabulce 4.5.

Tab. 4.5: Průběhu PCR programu pro reamplifikaci

Kroky PCR	Teplota	Čas	Cykly
počáteční denaturace	95 °C	5 min	1x
denaturace	95 °C	45 s	6x
anelace	56 °C	45 s	
polymerace	72 °C	1 min 30 s	
konečná polymerace	72 °C	10 min	1x
chlazení	6 °C	∞	

Následovala purifikace pomocí komerčního kitu (viz. kapitola 4.2.2.2.3.) a byly změřeny jednotlivé koncentrace DNA pomocí spektrofotometrie (viz kapitola 4.2.2.2.5.).

2. Enzymatické štěpení

V dalším kroku bylo prováděno restriční štěpení pomocí endonukleázy *HhaI*. Pro tuto reakci byla připravena směs o tomto složení:

10 \times reakční pufr 4 (NEB) (Promega, USA)	1,5 μl
100 \times BSA (10 mg/ ml; Promega, USA).....	0,5 μl
DNA.....	*35 ng
redestilovaná voda.....	* μl
<i>HhaI</i> (NEB, 20 000 U/ml; Promega, USA).....	1 μl

*celkový objem DNA a vody byl 13 μl . Takto připravené vzorky byly inkubovány 4 h ve tmě při 37 °C.

3. Precipitace

Po ukončení enzymatického štěpení byly všechny vzorky, pozitivní kontrola a negativní kontrola (nenaštěpená JM 300) precipitovány ve směsi:

acetát sodný (0,75M).....	1,5 μl
glykogen.....	1 μl
100% ethanol.....	47 μl

Precipitace probíhala přes noc ve tmě při pokojové teplotě. Následující den byla směs odstředěna při 13000 x g po dobu 35 minut. Vzniklý supernatant byl odstraněn a přidán 70% vychlazený ethanol. Tento roztok byl ponechán 5 minut při pokojové teplotě. Poté byly vzorky odstředěny 20 minut při 13000 x g a po odstranění supernatantu byly ponechány v laminárním boxu až do úplného vysušení.

4. Fragmentační analýza

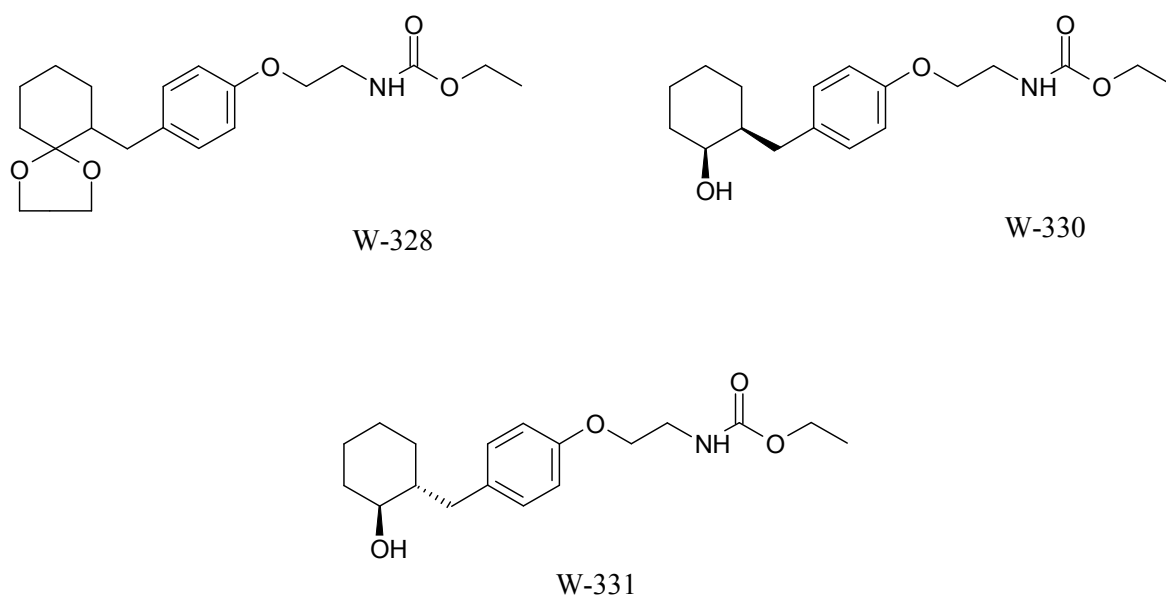
Vysušené pelety byly odeslány k fragmentační analýze do firmy Genomac International, s.r.o. (ČR), využívající MegaBACE 1000 DNA Analysis System (Amersham Biosciences). Získané elektroforeogramy byly upraveny v programu Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, USA) a fylogenetická analýza byla provedena pomocí programu PAST 2.10 (Hammer & Harper, Norsko).

5. VÝSLEDKY

5.1. Biologická aktivita testovaných látek

5.1.1. SROVNÁVACÍ TESTY A ÚČINNOST KOMERČNÍCH JUVENOIDŮ

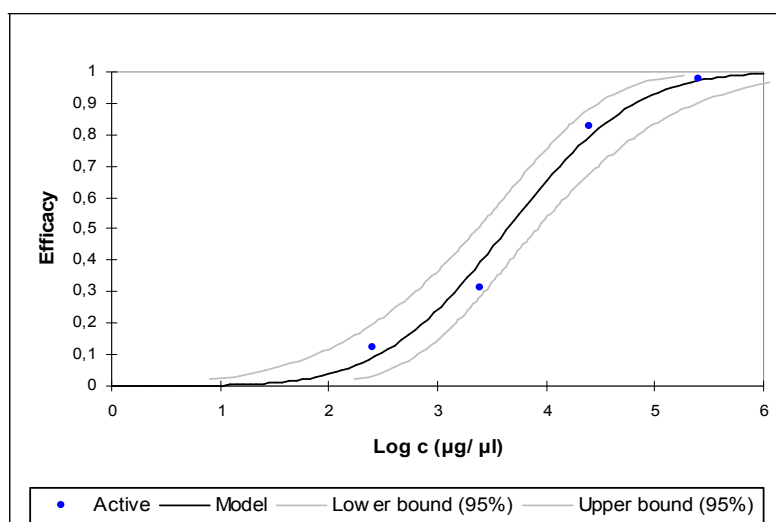
Po založení laboratorního chovu *P. apterus* byly nejprve provedeny srovnávací testy již dříve testovaných juvenoidů W-328, W-330 a W-331 (Obr. 5.1). Cílem těchto předběžných testů bylo ověření správnosti provádění pokusů a jejich vyhodnocování.



Obr. 5.1: Strukturální vzorce testovaných juvenoidů

Po aplikaci juvenoidů na nymfy posledního instaru *P. apterus* v době senzitivní periody docházelo k inhibici metamorfózy, která se projevovala zachováváním pokožky larválního typu doprovázeným deformacemi křídel, nohou, i vnitřních orgánů. Z důvodu narušení diferenciacce některých struktur pak jedinci nebyli schopni kompletní ekdyze a docházelo k mortalitě v průběhu svlékání nebo postupnému uhynutí testovaného hmyzu v důsledku porušení životně důležitých homeostatických mechanismů.

Každá látka byla testována dvěma odlišnými aplikačními metodami ve třech nezávislých opakováních. Výsledky biologických testů byly zpracovány programem XLSTAT 2010 (Obr. 5.2) a konečná biologická aktivita je uvedena v Tab. 5.1. Nejvyšší účinnost a to jak při topikálním testování tak v perorálních testech vykazoval juvenoid W-330. Nejméně účinným byl v obou typech testů juvenoid W-328. T/O index s hodnotami od 0,408 do 0,753 vyjadřuje, že jednotlivé látky byly podobně aktivní v obou typech testů.



Obr. 5.2: Křivka závislosti aktivity juvenoidu W-328 na koncentraci v perorálním testu. Body představují účinnost juvenoidu v jednotlivých koncentracích. Model a konfidenční limity jsou výsledkem tří nezávislých opakování biologického testu.

Tab. 5.1: Účinnosti juvenoidů při srovnávacích testech v hodnotách ID_{50} (μg na jedince)

Látka	Topikální test		Perorální test		T/O index
	ID_{50} (95% CI) ^a	Slope (\pm SE) ^b	ID_{50} (95% CI) ^a	Slope (\pm SE) ^b	
W328	0,163 (0,067 - 0,395)	1,182 (0,256)	0,4 (0,186 - 0,870)	0,744 (0,102)	0,408
W330	0,002 (0,001 - 0,006)	0,893 (0,211)	0,003 (0,001 - 0,006)	0,89 (0,193)	0,667
W331	0,143 (0,062 - 0,326)	1,335 (0,290)	0,19 (0,099 - 0,392)	0,972 (0,140)	0,753

^a 95% intervaly spolehlivosti

^b směrnice přímky se směrodatnou odchylkou

Získané hodnoty byly porovnávány s biologickou aktivitou těchto látek uváděnou již dříve jinými autory (Tab. 5.2). Těmito předběžnými testy byly získány hodnoty biologických aktivit řádově srovnatelné s dříve publikovanými výsledky, čímž byl potvrzen správný postup aplikace testovaných látek i vyhodnocování výsledků.

Tab. 5.2: Porovnání aktivity karbamátových juvenoidů testovaných různými autory na ruměnici pospolné (*Pyrrhocoris apterus*) v hodnotách ID_{50} (μg na jedince)

Látka	Rejzek (1993)	Jedlička (2007)	
	Topikální test	Topikální test	Perorální test
W 328	0,1	0,7	2
W 330	0,0001	0,0043	0,005
W 331	1	0,46	0,14

Dále byly testovány komerční juveniody methopren, fenoxycarb a pyriproxifen (strukturní vzorce uvedeny v kapitole 2.4.1.2.). Nejméně účinným komerčním juvenoidem v obou testech byl pyriproxifen. Nejlepší topikální účinnost vykazoval methopren, naopak perorálně nejúčinnější byl fenoxycarb (Tab. 5.3). Nízké hodnoty jejich T/O indexu poukazují na jejich vyšší topikální účinnost.

Tab. 5.3: Účinnosti komerčních juvenoidů v hodnotách ID₅₀ (μg na jedince)

Látka	Topikální test		Perorální test		T/O index
	ID ₅₀ (95% CI) ^a	Slope (± SE) ^b	ID ₅₀ (95% CI) ^a	Slope (± SE) ^b	
Methopren	0,056 (0,026 - 0,126)	1,511 (0,334)	0,571 (0,379 - 0,894)	2,472 (0,423)	0,098
Fenoxycarb	0,140 (0,072 - 0,274)	2,185 (0,538)	0,282 (0,169 - 0,457)	1,721 (0,284)	0,496
Pyriproxifen	1,185 (0,689 - 2,365)	3,07 (0,784)	18,2 (17,604 - 21,505)	0,812 (0,175)	0,065

^a 95% intervaly spolehlivosti

^b směrnice přímky se směrodatnou odchylkou

5.1.2. ÚČINNOST ESTEROVÝCH JUVENOGENŮ ODVOZENÝCH OD KARBAMÁTU

Následně byly testovány esterové juvenogeny odvozené od látek W-330 a W-331. Jejich strukturní vzorce jsou uvedeny v *Příloze 2*. Výsledné hodnoty biologických aktivit těchto juvenogenů po perorální a topikální aplikaci jsou uvedeny v Tab. 5.4.

Tab. 5.4: Účinnost série esterových juvenogenů odvozených od karbamátu v hodnotách ID₅₀ (μg na jedince)

Látka	Topikální test		Perorální test		T/O index
	ID ₅₀ (95% CI) ^a	Slope (± SE) ^b	ID ₅₀ (95% CI) ^a	Slope (± SE) ^b	
HS 18	> 5	SNE	> 25	SNE	
HS 24	0,015 (0,06 - 0,036)	1,215 (0,262)	2,781 (1,466 - 5,702)	1,921 (0,337)	0,005
HS 2A-1	1,158 (0,492 - 3,141)	1,312 (0,343)	2,827 (1,744 - 4,488)	1,021 (0,163)	0,41
HS 22-3	0,039 (0,029 - 0,051)	3,072 (0,774)	0,124 (0,075 - 0,203)	1,677 (0,267)	0,315
HS 8-3	> 5	SNE	> 25	SNE	
HS 14-2	0,064 (0,023 - 0,139)	1,275 (0,277)	0,438 (0,2311 - 0,817)	1,083 (0,160)	0,146

^a 95% intervaly spolehlivosti

^b směrnice přímky se směrodatnou odchylkou

Po topikální a perorální aplikaci byly opět pozorovány typické projevy spojené s inhibicí metamorfózy popsané výše. Nejúčinnějšími látkami z této série juvenogenů byly HS 22-3 v perorálních testech a HS 24 při topikální aplikaci. Juvenogeny HS 18 a HS 8-3 neprokázaly žádnou biologickou účinnost v obou typech testů ani v nejvyšších koncentracích. Všechny karbamátové juvenogeny vykazovaly vyšší topikální účinnost, což vyjadřují nízké hodnoty T/O indexů.

5.1.3. ÚČINNOST ESTEROVÝCH JUVENOGENŮ ODVOZENÝCH OD ALKOHOLU

Dále byla testována série juvenogenů odvozených od alkoholu a kyseliny hexadekanové, 3-methylbut-2-enové kyseliny a otestován byl také dimer alkoholového juvenoidu s oxalovou kyselinou. Strukturální vzorce těchto látek jsou uvedeny v Příloze 3.

Získané hodnoty účinností jsou uvedeny v Tab. 5.5. Z látek odvozených od kyseliny hexadekanové byl v obou typech testů celkově nejúčinnějším juvenogenem JO 11 C1 IV. Z juvenogenů odvozených od 3-methylbut-2-enové kyseliny byl topikálně i perorálně nejvíce účinný JO 15 CII a ze skupiny esterových juvenogenů připravených z dimeru alkoholového juvenoidu s oxalovou kyselinou prokázal nejlepší biologickou aktivitu při topikálním testování juvenogen JO 25 II ET a juvenogen JO 27 EC v perorálním testu.

Tab. 5.5: Účinnost série esterových juvenogenů odvozených od alkoholu v hodnotách ID₅₀ (μg na jedince)

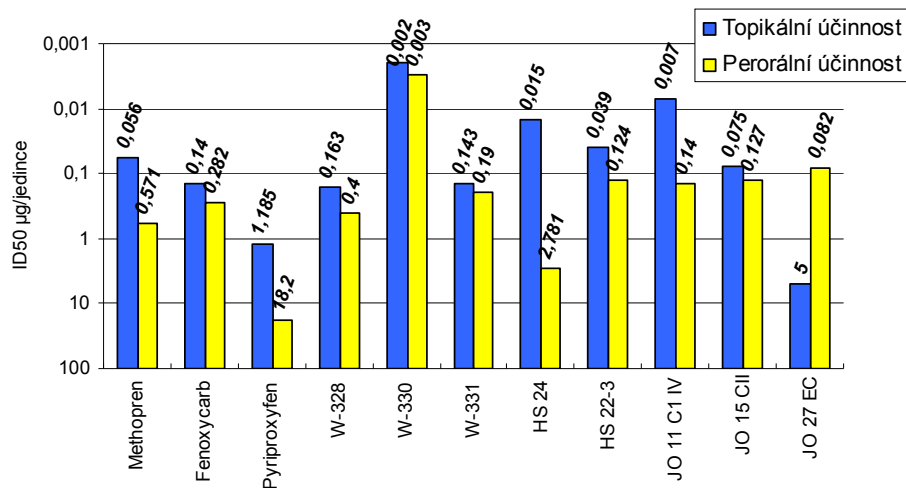
Látka	Topikální test		Perorální test		T/O index
	ID ₅₀ (95% CI) ^a	Slope (± SE) ^b	ID ₅₀ (95% CI) ^a	Slope (± SE) ^b	
JO 11 T III	0,075 (0,033 - 0,159)	1,501 (0,326)	3,518 (1,826 - 7,490)	0,991 (0,163)	0,021
JO 11 C1 IV	0,007 (0,003 - 0,16)	1,486 (0,332)	0,140 (0,078 - 0,250)	1,203 (0,169)	0,05
JO 14 T I	> 5	SNE	> 25	SNE	
JO 14 C II	0,599 (0,286 - 1,305)	1,658 (0,382)	19,720 (18,469 - 21,810)	1,037 (0,232)	0,03
JO 17 TII+III	> 5	SNE	> 25	SNE	
JO 17 C II	4,414 (1,669 - 6,796)	1,115 (0,381)	12,443 (11,159 - 17,801)	1,007 (0,226)	0,355
JO 15 T I	1,516 (0,655 - 4,488)	1,325 (0,358)	19,79 (18,239 - 23,102)	1,909 (0,441)	0,077
JO 15 CII	0,075 (0,038 - 0,148)	2,267 (0,618)	0,127 (0,077 - 0,214)	1,552 (0,243)	0,591
JO 27 EC	> 5	SNE	0,082 (0,031 - 0,192)	1,165 (0,245)	
JO 25 II ET	0,496 (0,234 - 1,009)	1,828 (0,440)	2,184 (1,323 - 3,534)	1,754 (0,287)	0,227
JO 27 ZC	> 5	SNE	2,923 (1,789 - 4,847)	1,705 (0,280)	
JO 27 ZT	> 5	SNE	> 25	SNE	

^a 95% intervaly spolehlivosti

^b směrnice přímky se směrodatnou odchylkou

5.1.4. POROVNÁNÍ AKTIVITY TESTOVANÝCH LÁTEK A KOMERČNÍCH JUVENOIDŮ

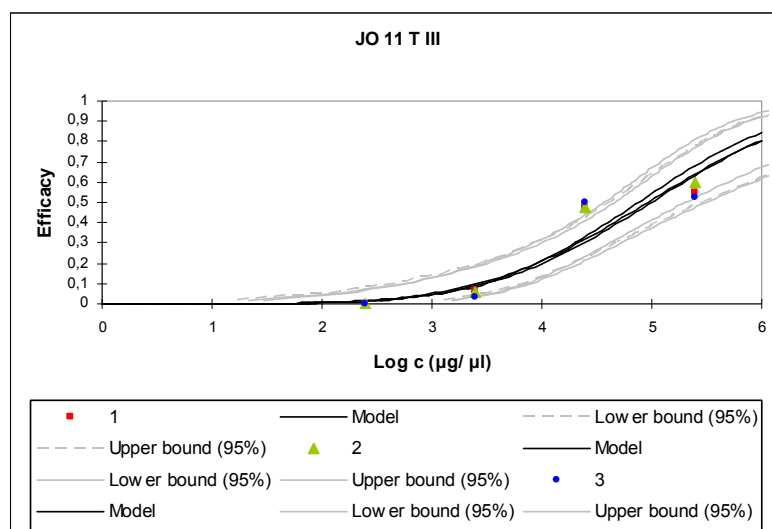
Pro přehlednost je v grafu na Obr. 5.3 porovnávána aktivita juvenoidů používaných v praxi (methopren, fenoxycarb, pyriproxyfen) s nejúčinnějšími testovanými látkami. Z grafu vyplývá, že řada testovaných látek prokázala biologickou aktivitu srovnatelnou s komerčně vyráběnými juvenoidy, některé z nich vykazovaly dokonce aktivitu vyšší.



Obr. 5.3: Porovnání aktivit komerčních juvenoidů a nejučinnějších testovaných JHA

5.1.4. VARIABILITA TESTŮ

Biologické testy byly prováděny u jednotlivých koncentrací vždy ve třech nezávislých opakováních, ze kterých pak byly pomocí probitové analýzy stanoveny střední inhibiční dávky (ID₅₀) s 95 % konfidenčními intervaly (XLSTAT, 2010). Variabilita mezi jednotlivými variantami byla vyhodnocena porovnáním jejich 95% konfidenčních intervalů. Rozdíly získaných výsledků byly považovány za statisticky významné v případě, že se jejich 95% konfidenční intervaly nepřekrývaly (Tabashnik a kol., 1987).

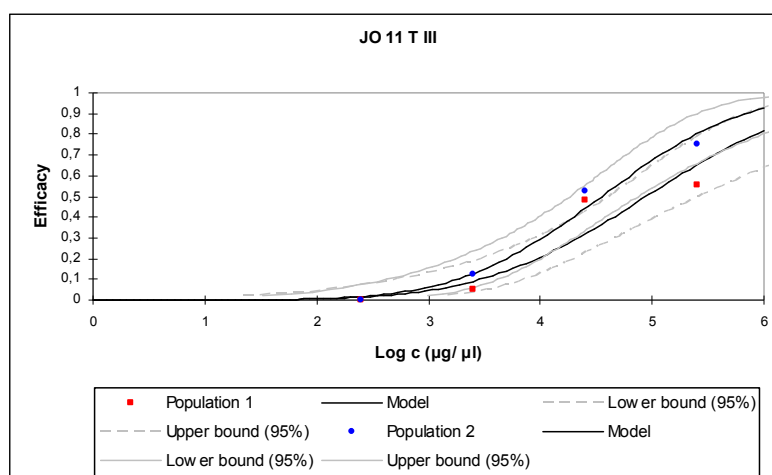


Obr. 5.4: Porovnání výsledků tří nezávislých opakování perorálních testů juvenogenu JO 11 T III. Body 1, 2 a 3 představují účinnost juvenogenu v testovaných koncentracích při jednotlivých opakováních.

Z grafu na Obr. 5.4 vyplývá, že rozdíly mezi jednotlivými variantami opakování nejsou statisticky významné, neboť se jejich konfidenční intervaly překrývají. U žádné z testovaných látek nebyl mezi výsledky jednotlivých opakování zjištěn statisticky významný rozdíl.

Dále byla porovnána variabilita biologické účinnosti látek mezi dvěma populacemi ruměnice pospolné (Obr. 5.5). První testovaná populace (Population 1) byla získána z biologické laboratoře Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v Praze, druhá (Population 2) z Entomologického ústavu BC AV ČR v Českých Budějovicích.

Na těchto dvou populacích byly testovány celkem tři látky: juvenogeny JO 11 T III, JO 11 C1 IV a komerční juvenoid methopren (Tab. 5.6). Ačkoliv byla variabilita výsledků mezi populacemi vyšší než variabilita mezi jednotlivými opakováními, u žádné z testovaných látek nebyl mezi dvěma testovanými populacemi prokázán statisticky významný rozdíl, protože se jejich konfidenční intervaly opět překrývaly.



Obr. 5.5: Porovnání výsledků topikální účinnosti juvenogenu JO 11 T III testovaného na dvou populacích ruměnice pospolné

Tab. 5.6: Porovnání variability aktivity látek mezi dvěma populacemi ruměnice pospolné v hodnotách ID₅₀ (µg na jedince)

Látka	Topikální test ID ₅₀ (95% CI) ^a		Perorální test ID ₅₀ (95% CI) ^a	
	Population 1	Population 2	Population 1	Population 2
Methopren	0,066 (0,031 - 0,137)	0,045 (0,020 - 0,096)	0,89 (0,60 - 1,41)	0,24 (0,14 - 0,38)
JO 11 T III	0,092 (0,041 - 0,176)	0,058 (0,271 - 0,119)	5,806 (2,874 - 9,71)	1,23 (0,692 - 2,49)
JO 11 C1 IV	0,009 (0,004 - 0,019)	0,005 (0,002 - 0,011)	0,24 (0,126 - 0,45)	0,04 (0,029 - 0,074)

^a 95% intervaly spolehlivosti

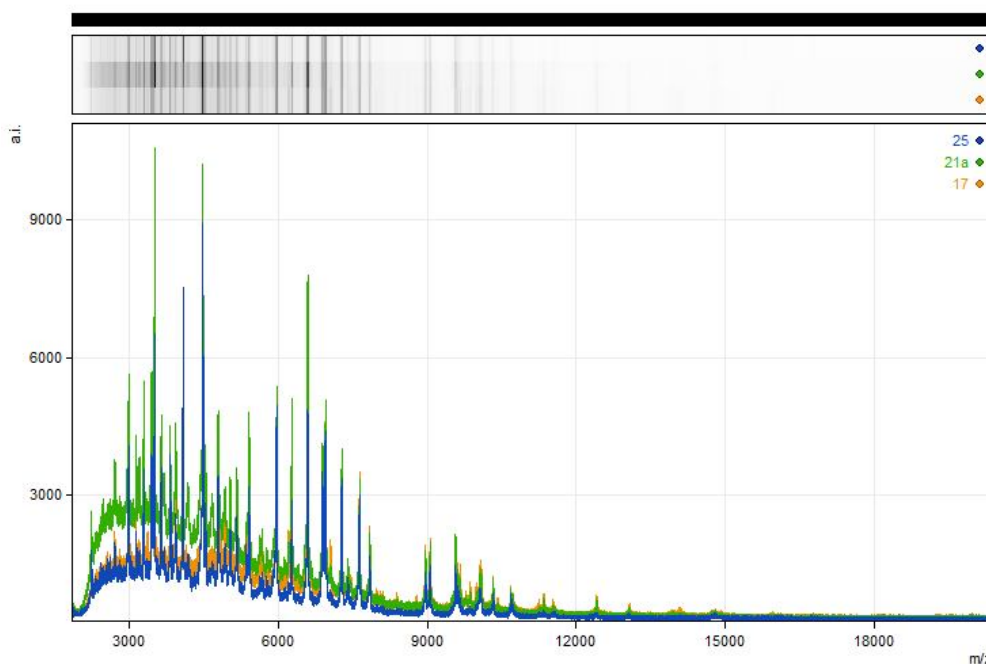
Pozn.: V tabulkách účinností těchto látek (kapitoly 5.1.1 a 5.1.3) je uveden aritmetický průměr hodnot získaných testováním na obou populacích.

5.2. Identifikace bakterií

5.2.1. ANALÝZA RIBOZOMÁLNÍCH PROTEINŮ POMOCÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE MALDI TOF

Po izolaci bakterií ze střev ruměnice pospolné bylo získáno celkem 28 čistých izolátů z chovu z biologické laboratoře Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v Praze (Populace 1) a 33 z chovu z Entomologického ústavu BC AV ČR v Českých Budějovicích (Populace 2). Ukázky čistých izolátů jsou začleněny v *Příloze 5*. Izoláty byly kultivovány při 28 °C na tuhém LB mediu a po 24 hodinách bylo provedeno Gramovo barvení a KOH test, kterými byly rozlišeny gramnegativní a grampozitivní bakteriální druhy.

Následně byla provedena analýza ribozomálních proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Výstupem této metody byla hmotnostní spektra, kdy každý vrchol odpovídal poměru hmotnosti a náboje proteinu. Získaná spektra byla porovnána s daty v proteinové databázi BioTyper (Bruker Daltonics, Německo) a zároveň byla srovnávána mezi sebou, aby byly vyloučeny shodné izoláty (Obr. 5.6). Na základě shodného složení ribozomálních proteinů byl vybrán vždy jen jeden izolát, který byl dále molekulárně charakterizován.



Obr. 5.6: Vzájemné porovnání hmotnostních spekter izolátů číslo 25, 21a a 17, identifikovaných jako grampozitivní bakterie *Lactococcus lactis*

Pomocí této metody bylo ve vzorcích Populace 1 prokázáno 12 různých druhů bakterií. Většina identifikovaných izolátů patřila mezi gramnegativní bakterie třídy γ -*Proteobacteria*.

Jiné rozpoznané gramnegativní bakterie patřily do tříd α -Proteobacteria, β -Proteobacteria a Sphingobacteria. U této populace byly identifikovány také dvě grampozitivní bakterie třídy Bacilli a celkem 4 hmotnostní spektra nebyla podle databáze identifikována vůbec.

U Populace 2 bylo získáno celkem 17 rozdílných hmotnostních spekter, z nichž se 4 podle databáze identifikovat nepodařilo. Získané grampozitivní bakterie patřily do tříd Bacilli a Actinobacteria, gramnegativní bakterie příslušely do tříd γ -Proteobacteria, β -Proteobacteria a Sphingobacteria (Tab. 5.7).

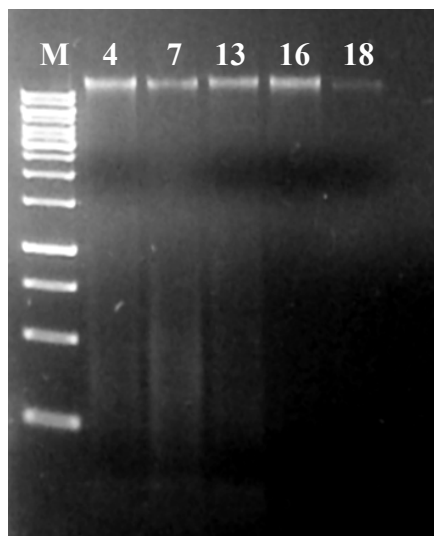
Tab. 5.7: Taxonomická příbuznost bakterií trávicího traktu ruměnice pospolné a specifita jejich identifikace podle databáze BioTyper

Populace 1			Populace 2		
Třída	Nejbližší příbuzný podle databáze Biotyper	Skóre Log ^a	Třída	Nejbližší příbuzný podle databáze Biotyper	Skóre Log ^a
	neidentifikováno		Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i> sp.	1.993
Bacilli	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1.809	Bacilli	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.344
Bacilli	<i>Lactobacillus lactis</i>	2.539	Bacilli	<i>Lactobacillus lactis</i>	2.464
	neidentifikováno		Bacilli	<i>Paenibacillus</i> sp.	1.809
Sphingobacteria	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	2.115	Sphingobacteria	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	2.147
α -Proteobacteria	<i>Ochrobactrum</i> sp.	1.851		neidentifikováno	
	neidentifikováno		β -Proteobacteria	<i>Achromobacter spanius</i>	1.947
β -Proteobacteria	<i>Delftia acidovorans</i>	2.347	β -Proteobacteria	<i>Delftia acidovorans</i>	2.156
γ -Proteobacteria	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2.450	γ -Proteobacteria	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2.286
γ -Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i> sp.	1.853	γ -Proteobacteria	<i>Pseudomonas veronii</i>	2.287
γ -Proteobacteria	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.591		neidentifikováno	
	neidentifikováno			neidentifikováno	
			γ -Proteobacteria	<i>Yokenella regensburgei</i>	2.218
			γ -Proteobacteria	<i>Hafnia alvei</i>	2.184
			γ -Proteobacteria	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	1.939
				neidentifikováno	
			γ -Proteobacteria	<i>Enterobacter</i> sp.	1.835

Skóre Log^a: hodnoty ≥ 2.0 jsou nezbytné pro identifikaci na úrovni druhu (*lat. species*); hodnoty ≥ 1.7 jsou nezbytné pro identifikaci na úrovni rodu (*lat. genus*); hodnoty menší než 1.7 nebyly podle databáze identifikovány

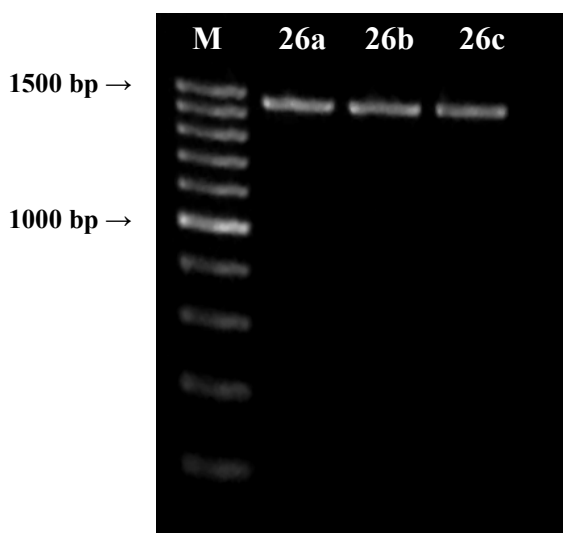
5.2.1. IDENTIFIKACE NA ZÁKLADĚ SEKVENCE GENU PRO 16S rRNA

Z čistých bakteriálních kultur kultivovaných 24 hodin v tekutém LB médiu byla pomocí komerčního kitu izolována celková DNA. Úspěšnost izolace celkové DNA byla ověřena elektroforézou v jednoprocenním agarózovém gelu (Obr. 5.7). Elektroforéza probíhala při napětí 110 V a na gel bylo nanášeno 5 μ l DNA spolu s 1,5 μ l detekčního barviva 6x loading dye solution (Fermentas, USA).

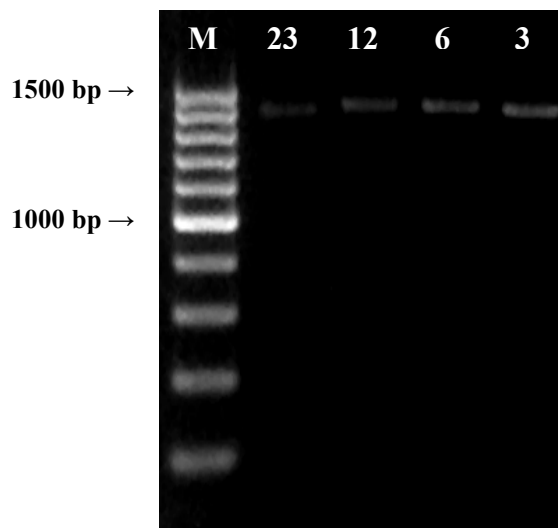


Obr. 5.7: Kontrola úspěšnosti izolace celkové DNA vzorků 4, 7, 13, 16 a 18 v agarózovém gelu; M- marker 1 kb DNA ladder (Promega, USA)

U vzorku č. 26 se z důvodu špatného růstu v tekutém LB médiu izolace DNA nedařila. Proto u něj byla provedena přímá amplifikace požadovaného úseku, bez předchozí izolace DNA. Sterilní špičkou bylo odebráno několik buněk z čistých kolonií kultivovaných na pevném LB médiu, smícháno s reakční směsí a amplifikováno. Úspěšnost amplifikace byla opět ověřena agarózovou elektroforézou při napětí 110 V (Obr. 5.8).



Obr. 5.8: Přímá amplifikace genu pro 16S rRNA vzorku č. 26 bez předchozí izolace celkové DNA; M- marker 1 kb DNA ladder (Promega)



Obr. 5.9: Ukázky amplifikace genu pro 16S rRNA vzorků 23, 12, 6 a 3; M- marker 1 kb DNA ladder (Promega)

Koncentrace a čistota izolované DNA byla dále stanovena spektrofotometricky přístrojem NanoDrop ND 1000 (Obr. 5.10). Po optimalizaci PCR reakce bylo zjištěno, že nejvhodnější koncentrace templátové DNA pro amplifikaci je ~ 30 ng/ μ l.

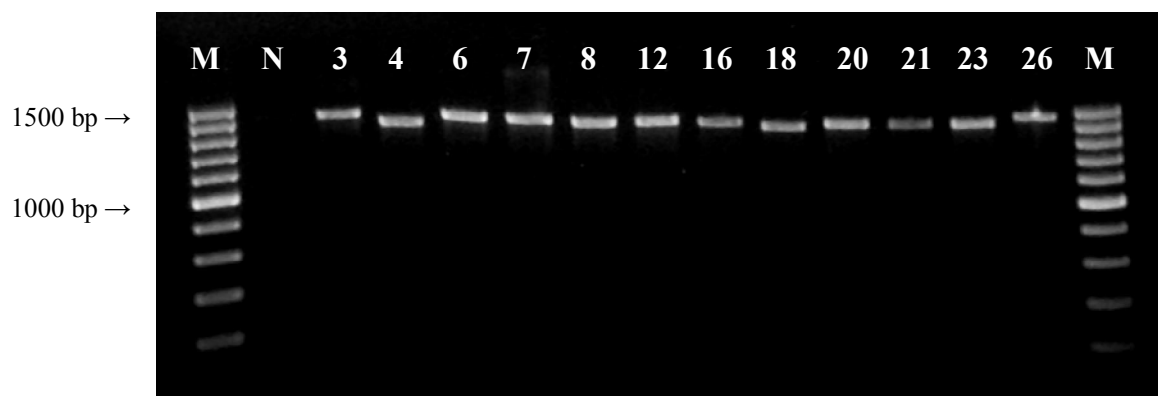
The screenshot shows the NanoDrop ND 1000 software interface. At the top, there are tabs for 'Plots' and 'Report'. The 'Test type' is set to 'Nucleic Acid', and the date and time are '16.3.2011 9:40'. Below this, there are fields for 'Report Name', 'Max Buffer Size' (set to 200), and 'Buffer Mode' (set to 'Save Report & Clear'). The main part of the interface is a table with the following columns: Sample ID, User ID, Date, Time, ng/ul, A260, A280, 260/280, 260/230, Constant, Cursor Pos., Cursor abs., and 340 rew. The table contains 17 rows of data, all with 'Default' as the user ID and '16.3.2011' as the date. The 'ng/ul' column shows values ranging from approximately 64.37 to 201.50. The 'A260' column shows values ranging from approximately 1.287 to 3.092. The 'A280' column shows values ranging from approximately 0.625 to 1.681. The '260/280' column shows values ranging from approximately 1.75 to 2.373. The '260/230' column shows values ranging from approximately 1.02 to 1.70. The 'Constant' column is set to 50.00 for all rows. The 'Cursor Pos.' column is set to 230 for all rows. The 'Cursor abs.' column shows values ranging from approximately 0.949 to 2.005. The '340 rew' column shows values ranging from approximately 0.125 to 0.512.

Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor abs.	340 rew
	Default	16.3.2011	9:29	139.49	2.790	1.430	1.95	1.39	50.00	230	2.005	0.512
	Default	16.3.2011	9:30	74.34	1.487	0.744	2.00	1.32	50.00	230	1.128	0.260
	Default	16.3.2011	9:30	105.97	2.119	1.209	1.75	1.02	50.00	230	2.087	0.783
	Default	16.3.2011	9:31	74.53	1.491	0.738	2.02	1.54	50.00	230	0.968	0.248
	Default	16.3.2011	9:32	166.39	3.328	1.740	1.91	2.17	50.00	230	1.535	0.274
	Default	16.3.2011	9:33	90.91	1.818	0.847	2.15	1.92	50.00	230	0.949	0.125
	Default	16.3.2011	9:33	64.37	1.287	0.625	2.06	1.37	50.00	230	0.940	0.178
	Default	16.3.2011	9:34	90.21	1.804	0.871	2.07	1.61	50.00	230	1.120	0.287
	Default	16.3.2011	9:35	143.64	2.873	1.395	2.06	1.74	50.00	230	1.651	0.265
	Default	16.3.2011	9:36	201.50	4.030	2.041	1.97	1.65	50.00	230	2.444	0.636
	Default	16.3.2011	9:36	147.15	2.943	1.445	2.04	1.77	50.00	230	1.663	0.381
	Default	16.3.2011	9:37	174.31	3.486	1.681	2.07	1.90	50.00	230	1.831	0.275
	Default	16.3.2011	9:38	133.87	2.677	1.303	2.05	1.72	50.00	230	1.555	0.274
	Default	16.3.2011	9:38	118.67	2.373	1.142	2.08	1.70	50.00	230	1.392	-0.387
	Default	16.3.2011	9:39	154.61	3.092	1.549	2.00	1.56	50.00	230	1.983	0.453
	Default	16.3.2011	9:39	112.85	2.257	1.097	2.06	1.71	50.00	230	1.319	0.219
	Default	16.3.2011	9:40	149.89	2.998	1.456	2.06	1.62	50.00	230	1.854	0.417

Obr. 5.10: Koncentrace a čistota celkové DNA stanovená spektrometricky pomocí přístroje NanoDrop ND 1000

Po zředění templátové DNA na příslušnou koncentraci byl amplifikován úsek genu pro 16S rRNA o velikosti ~ 1500 bp pomocí primerů 8f (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') a 926r (5'- CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT-3') (Shyu a kol., 2007). Jako negativní kontrola byla použita reakční směs, ve které byla templátová DNA nahrazena redestilovanou vodou. Pro ověření amplifikace požadovaného úseku byla provedena elektroforéza. Na agarózový gel bylo nanášeno 5 μ l DNA a separace probíhala při napětí 110 V (Obr. 5.9).

U takto amplifikovaných úseků byla dále provedena reamplifikace PCR-produktů se stejnými primery. Jako negativní kontrola byla opět použita beztemplátová reakční směs. Následně byla provedena purifikace PCR-produktů pomocí komerčního kitu, při které dochází k odstranění zbylých složek reakční PCR směsi. Při elektroforetickém ověření amplifikace a purifikace PCR produktů bylo nanášeno na gel 1,5 μ l DNA (Obr. 5.11).

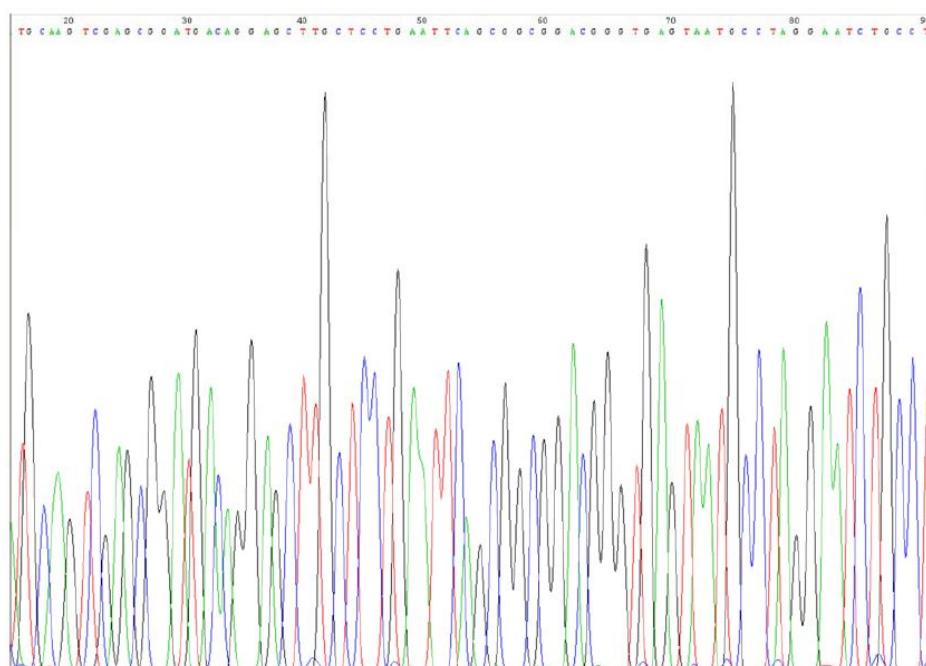


Obr. 5.11: Reamplifikace PCR-produktů po amplifikaci genu pro 16S rRNA

M- marker 1 kb DNA ladder (Promega)

N- negativní kontrola

Purifikované PCR-produkty jednotlivých izolátů byly převedeny na koncentraci 90-180 ng/ μ l a zaslány k sekvenaci firmě Geneart AG (Germany). Příklad získaných spekter nukleotidů je uveden na Obr. 5.12. K úpravě výsledných sekvencí byl použit software Chromas Lite 2.33 a identifikace byla provedena pomocí programu Ribosomal Database Project Classifier.



Obr. 5.12: Ukázka výsledku sekvenace úseku genu pro 16S rRNA

Tab. 5.8: Přehled bakteriálních druhů trávicího traktu ruměnice pospolné (Populace 1) identifikovaných na základě analýzy sekvence genu 16S rRNA

	Taxonomická příslušnost	Nejbližší typový zástupce [Přístupové číslo v databázi GenBank]	Podobnost (%)
Populace 1	Bacilli (Lactobacillales)	<i>Lactobacillus plantarum</i> [AJ965482]	100
	Bacilli (Lactobacillales)	<i>Lactococcus lactis</i> [AB100803]	100
	Bacilli (Bacillales)	<i>Bacillus nealsonii</i> [EU656111]	100
	Sphingobacteria (Sphingobacteriales)	<i>Sphingobacterium multivorum</i> [AB100738]	99.9
	γ-Proteobacteria (Enterobacteriales)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> [Y17657]	99.9
	γ-Proteobacteria (Pseudomonadales)	<i>Pseudomonas japonica</i> [AB126621]	99.7
	β-Proteobacteria (Burkholderiales)	<i>Delftia acidovorans</i> [AB021417]	99.6
	γ-Proteobacteria (Xanthomonadales)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> [AB294553]	99.4
	Bacilli (Bacillales)	<i>Paenibacillus kobensis</i> [AB073363]	99.3
	Actinobacteria (Actinobacteridae)	<i>Microbacterium resistens</i> [Y14699]	99.1
	Flavobacteria (Flavobacteriales)	<i>Chryseobacterium scophthalmum</i> [AJ271009]	99.0
	α-Proteobacteria (Rhizobiales)	<i>Ochrobactrum rhizosphaerae</i> [AM490632]	98.1

Tab. 5.9: Přehled bakteriálních druhů trávicího traktu ruměnice pospolné (Populace 2) identifikovaných na základě sekvence genu pro 16S rRNA

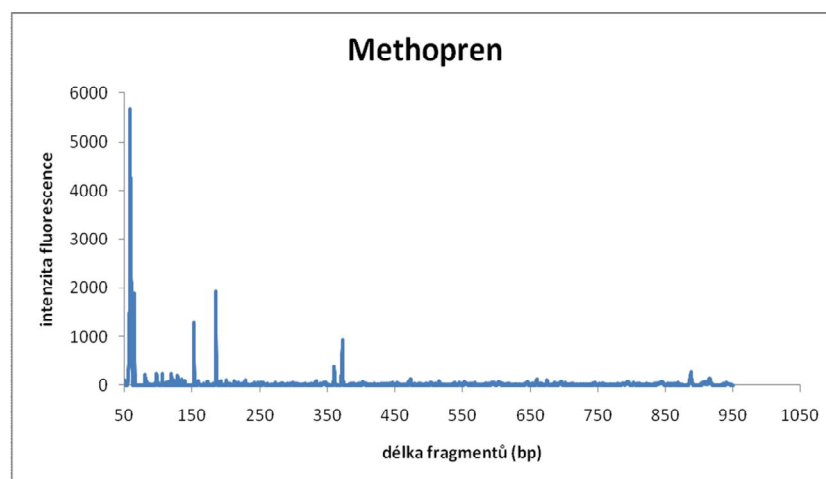
	Taxonomická příslušnost	Nejbližší typový zástupce [Přístupové číslo v databázi GenBank]	Podobnost (%)
Populace 2	Bacilli (Lactobacillales)	<i>Lactobacillus plantarum</i> [AJ965482]	100
	Bacilli (Lactobacillales)	<i>Lactococcus lactis</i> [AB100803]	100
	Bacilli (Bacillales)	<i>Bacillus nealsonii</i> [EU656111]	100
	Sphingobacteria (Sphingobacteriales)	<i>Sphingobacterium multivorum</i> [AB100738]	99.9
	γ-Proteobacteria (Enterobacteriales)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> [Y17657]	99.9
	γ-Proteobacteria (Pseudomonadales)	<i>Pseudomonas japonica</i> [AB126621]	99.7
	β-Proteobacteria (Burkholderiales)	<i>Delftia acidovorans</i> [AB021417]	99.6
	Bacilli (Bacillales)	<i>Staphylococcus kloosii</i> [AB009940]	99.6
	γ-Proteobacteria (Xanthomonadales)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> [AB294553]	99.4
	Bacilli (Bacillales)	<i>Paenibacillus kobensis</i> [AB073363]	99.3
	Actinobacteria (Actinobacteridae)	<i>Microbacterium resistens</i> [Y14699]	99.1
	Flavobacteria (Flavobacteriales)	<i>Chryseobacterium scophthalmum</i> [AJ271009]	99.0
	Flavobacteria (Flavobacteriales)	<i>Chryseobacterium jejuense</i> [EF591303]	99.0
	Actinobacteria (Actinobacteridae)	<i>Corynebacterium variabile</i> [AJ222815]	98.8
	Actinobacteria (Actinobacteridae)	<i>Corynebacterium variabile</i> [AJ222815]	98.6
	Actinobacteria (Actinobacteridae)	<i>Leucobacter chironomi</i> [EU346911]	98.3
	α-Proteobacteria (Rhizobiales)	<i>Ochrobactrum rhizosphaerae</i> [AM490632]	98.1

Přehled identifikovaných kultivovatelných střevních bakterií ruměnice pospolné metodou sekvenace úseku 16S rRNA je uveden v Tab. 5.8 (Populace 1) a v Tab. 5.9 (Populace 2). Výsledky byly vyhodnoceny pomocí databáze RDP, na základě které byl určen rod a z něj pak nejbližší kultivovatelný zástupce. Hledané sekvence vykazovaly vysokou úroveň podobnosti pohybující se v rozmezí 98,1 - 100 %, přičemž podobnost vyšší než 80 % je považována za spolehlivou. Celkově bylo u obou testovaných populací určeno 17 bakteriálních druhů, patřících do sedmi taxonomických tříd: *Bacilli*, *Sphingobacteria*, γ -*Proteobacteria*, β -*Proteobacteria*, *Flavobacteria*, *Actinobacteria* a α -*Proteobacteria*. Vyšší variabilita střevní mikroflóry byla zjištěna u Populace 2.

5.2.1. VLIV TESTOVANÝCH LÁTEK NA STŘEVNÍ MIKROFLORU

U deseti vybraných látek byl sledován jejich vliv na střevní mikroflóru pomocí metody T-RFLP. Předností T-RFLP metody je, že umožňuje sledovat změny v celkovém složení mikrobiálních populací, tedy kultivovatelných i nekultivovatelných bakterií.

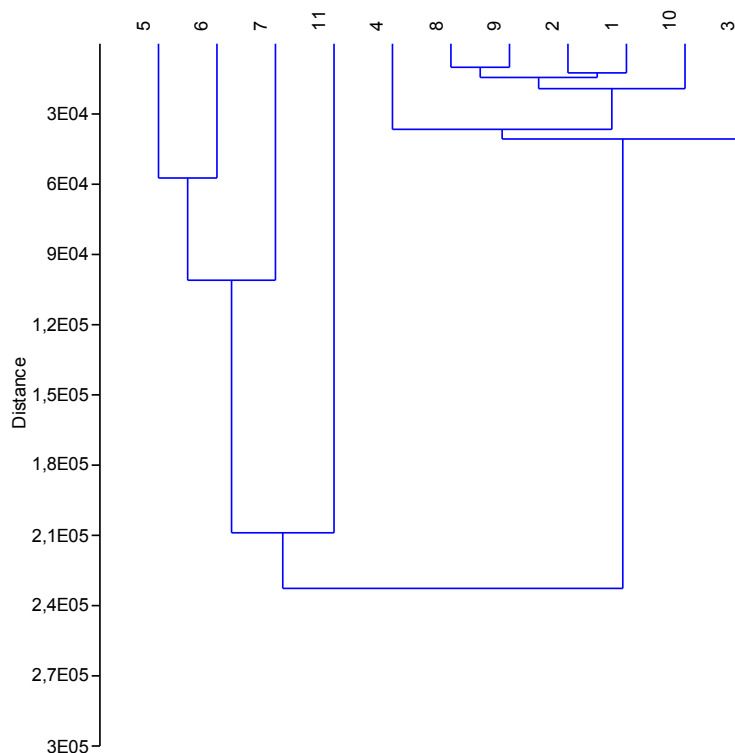
Na obrázku 5.13 je znázorněn výsledek této metody pro juvenoid methopren, kde podle intenzity a diverzity píků lze odvozovat míru toxicity testované látky vůči střevní mikroflóře. Výsledné grafy fragmentační analýzy pro všechny testované látky jsou připojeny v Příloze 8.



Obr. 5.13 Výsledný graf fregmentační analýzy pro methoperen

Pro porovnání dosažených výsledků byla provedena fylogenetická analýza pomocí programu PAST 2.10 (Hammer & Harper, Norsko) Neighbor-joinig metdou. Získaný fylogenetický strom je porovnáním jednotlivých variant mezi sebou.

Z fylogenetického stromu je patrné, že látky blížíci se svými účinky kontrole (vzorek č. 1), mají na složení střevní mikroflóry nejpříznivější efekt. Jedná se o látky JO 15 C II, pyriproxifen, methopren, 20-OH ekdyson, JO 11 C1 IV a JO 27 2 C. Naproti tomu látky blížíci se svými účinky vzorku číslo 11 (Reldan), mají na složení střevní mikroflóry negativní efekt. Účinky podobné organofosfátu Reldanu vykazovaly juvenogeny odvozené od karbamátu HS 22-3, HS 24 a juvenoid fenoxycarb.



Obr. 5.14: Fylogenetický strom založený na analýze sekvence 16S rRNA, znázorňující působení testovaných látek na střevní mikroflóru ruměnice pospolné;
1-KE s acetonem; **2**-JO 15 C II; **3**-JO 27 2 C; **4**-JO 11 C1 IV; **5**-HS 22-3
6-HS 24; **7**-Fenoxycarb; **8**-Methopren; **9**-Pyriproxifen; **10**-20-OH ekdyson
11-Reldan 40 EC (0,125%)

6. DISKUZE

6.1. Účinnost testovaných JHA

První juvenogeny byly vyvinuty již v sedmdesátých letech dvacátého století. Bylo připraveno několik typů juvenogenů testovaných na mnoha druzích hmyzu (Sláma a kol., 1977; Sláma a kol., 1978; Wimmer a kol., 1997; Jedlička a kol., 2007). Jako vůbec první byly vyvinuty estery juvenoidů s alkoholovou skupinou a organických kyselin (Sláma a Romaňuk, 1976), v roce 1978 byly připraveny systemické glykosidické juvenogeny (Sláma a kol., 1978), o něco později byly testovány sloučeniny vybraných juvenoidů a žlučových kyselin (Jurček a kol., 2009).

Cílem při vývoji juvenogenů bylo změnit dočasně fyzikální vlastnosti juvenoidů a tím i způsob jejich aplikace. Výhody juvenogenů spočívají v jejich prologančním účinku, kdy je biologicky aktivní látka uvolňována postupně během delší časové periody v nižší koncentraci oproti aplikaci samostatného juvenoidu. Jejich působení je tedy efektivnější a více cílené, proto představují typ formulace juvenoidů pro využití v praxi.

Předběžnými testy látek W-328, W-330 a W-331 byly získány hodnoty biologických aktivit řádově srovnatelné s již dříve publikovanými výsledky (Rejzek, 1993; Jedlička a kol., 2007). Tím byla potvrzena nejen správná metodika při provádění testů, ale také jejich dobrá reprodukovatelnost. Některé odchylky výsledků jsou pravděpodobně způsobeny variabilitou testovaných populací, laboratorními podmínkami chovu či přístupem, zvoleným pro vyhodnocení výsledků. V případě Rejzka (1993) byly výsledné hodnoty získány vynášením na logaritmický papír, Jedlička (Jedlička a kol., 2007) použil pro vyhodnocení výsledků software S-PLUS[®] verzi 6.0 (Microsoft Windows, USA), zatímco v této práci byly výsledné hodnoty vypočítány pomocí programu XLSTAT 2010 (Addinsoft, USA). Nejvyšší biologickou aktivitu vykazoval v obou typech testů juvenoid W-330, což se shoduje s výsledky publikovanými dříve (Rejzek, 1993; Jedlička a kol., 2007).

Z komerčních juvenoidů vykazoval nejvyšší topikální účinnost methopren ($ID_{50} = 0,056 \mu\text{g}$ na jedince), v perorálních testech byl neúčinnější fenoxycarb ($ID_{50} = 0,282 \mu\text{g}$ na jedince). Methopren je společně s hydroprenem nejstarším registrovaným juvenoidem, který je úspěšně využíván v boji proti komárům, mravencům a mouchám (Henrick, 1982). Biologická aktivita neúčinnějších izoprenoidních juvenoidů včetně methoprenu uváděná Slámou (1999) se pohybuje v rozmezí koncentrací mezi 10^{-6} M až 10^{-9} M (vztaženo k živé tělesné váze). Jsou efektivní již v koncentracích 5×10^{-9} při topikální (Sláma, 1971) nebo $2,5 \times 10^{-10}$ při perorální

aplikaci (Sláma, 1981). Tak výjimečně vysoké hodnoty biologických aktivit byly pozorovány pouze u peptidických hormonů (Poduška a kol., 1973). Na rozdíl od nich však juvenoidy izoprenoidního typu působí na široké spektrum hmyzích druhů. Methopren se stal úspěšným především díky snaze orientovat se na ekologicky šetrné přípravky, které působí selektivně a jsou snadno biodegradabilní. Bohužel nevýhodou methoprenu a jiných bioracionálních juvenoidů oproti konvenčním insekticidům je jejich pomalá účinnost.

Fenoxycarb byl jedním z prvních aromatických juvenoidů registrovaných pro využití v praxi. Tato látka však potlačila ideu vývoje bezpečných „pesticidů třetí generace“ na bázi juvenoidů, neboť molekula fenoxycarbu je složena ze dvou velmi toxických molekul, a to karbamátu na jedné straně a pyretroidu na straně druhé. Biologická aktivita fenoxycarbu je opravdu vysoká, dávky ID_{50} dosahují hodnot pohybujících se v pikogramech na jedince, což jsou opět hodnoty podobné aktivitám peptidických hormonů. Narozdíl od nich je však fenoxycarb účinný na mnoho nepříbuzných druhů hmyzu, zahrnující také ekonomicky významné škůdce jako komáry a motýly z čeledi obalečovitých (Masner a kol., 1987). Komerční přípravky na bázi fenoxycarbu jsou již mnoho let úspěšně využívány proti mnoha druhům škodlivého hmyzu pod názvy Insegar (proti škůdcům v sadech), Logic (proti synantropním mravencům), Torus (proti blehám a svábům), Pictyl (proti larvám a kuklám komárů) a Varikill (proti skladištním škůdcům) (Sláma, 1999).

Posledním testovaným komerčním juvenoidem v této práci byl pyriproxifen. Ten ovšem ve srovnání s methoprenem a fenoxycarbem vykazoval nejnižší aktivitu v obou typech testů, což se shoduje s výsledky publikovanými Jedličkou a kol. (2007), kteří také testovali tyto tři látky na ruměnici pospolné. Navzdory tomu však pyriproxifen patří k dnes nejčastěji využívaným juvenoidům v praxi a je prodáván pod komerčními názvy Knack, Amiral nebo Sumilarv. Miyamoto a kol. (1993) uvádějí, že v některých případech byla jeho biologická aktivita vyšší než u fenoxycarbu, v některých nižší, v závislosti na testovaném druhu hmyzu, jeho vývojovém stupni a zvolené aplikační metodě.

První skupina testovaných juvenogenů byla připravena syntézou karbamátových juvenoidů a steroidních sloučenin (derivátů kyseliny cholové a stigmasterolu). Kyselina cholová je typický živočišný steroid, stigmasterol patří mezi fytoekdysteriody a tyto látky byly pro syntézu nových typů molekul vybrány právě pro svůj přírodní původ. Navíc byly při použití steroidních sloučenin jako jednotek pro supramolekulární juvenogeny očekávány i další účinky na hmyz, jako např. poruchy svlékání v procesu morfologického vývoje hmyzu. Tento předpoklad se však nepotvrdil, neboť žádný z juvenogenů nevykazoval vyšší biologickou aktivitu než jeho parentální juvenoid.

Nejvyšší topikální účinnost vykazoval juvenogen HS 24 ($ID_{50} = 0,015 \mu\text{g}$ na jedince). V perorálních testech ovšem nebyl dostatečně aktivní, což souvisí s jeho nízkou polaritou (vypočtená rozpustnost v H_2O je pouze $5,1683 \times 10^{-9} \text{ mg mL}^{-1}$). Naproti tomu nejúčinnější juvenogen v perorálních testech byl HS 22-3, s účinností $ID_{50} = 0,124 \mu\text{g}$ na jedince.

Ze série esterových juvenogenů odvozených od alkoholu a kyseliny hexadekanové byl nejvíce účinným juvenogen v obou typech testů JO 11 C1 IV. Ten vykazoval v perorálních testech aktivitu $ID_{50} = 0,140 \mu\text{g}$ na jedince, která je řádově srovnatelná s perorální aktivitou methoprenu a fenoxycarbu i s perorální aktivitou nejúčinnějších alkoholových juvenogenů odvozených od karbamátu HS 22-3 a HS 14-2. V topikálním testu dosáhl aktivity $ID_{50} = 0,007 \mu\text{g}$ na jedince, což je nejvyšší účinnost ze všech testovaných látek vůbec.

Z esterových juvenogenů odvozených od kyseliny 3-methylbut-2-enové byl v obou typech testů nejvíce účinný juvenogen JO 15 CII. Jeho hodnota $ID_{50} = 0,075 \mu\text{g}$ na jedince v topikálním testu je srovnatelná s aktivitou methoprenu a o řád vyšší než aktivita fenoxycarbu ve stejném typu testu. Při perorálním testování byla získána hodnota $ID_{50} = 0,127 \mu\text{g}$ na jedince, což je opět perorální aktivita řádově srovnatelná s aktivitou methoprenu, fenoxycarbu i perorálně nejúčinnějších karbamátových juvenogenů HS 22-3 a HS 14-2.

Ze skupiny esterových juvenogenů připravených z dimeru alkoholového juvenoidu s oxalovou kyselinou byl v perorálních testech nejúčinnější JO 27 EC s aktivitou $ID_{50} = 0,082 \mu\text{g}$ na jedince, což je o řád lepší účinnost než při perorálním testování methoprenu i fenoxycarbu. V topikálním testu byl nejúspěšnější juvenogen JO 25 II ET s hodnotou $ID_{50} = 0,496 \mu\text{g}$ na jedince, což je srovnatelné s topikální aktivitou methoprenu i fenoxycarbu. Ostatní dimery alkoholového juvenoidu s oxalovou kyselinou byly v topikálních testech neúčinné. Důvodem špatné topikální účinnosti je velikost molekuly a její prostorové uspořádání, které brání dobrému prostupu přes kutikulu. Nicméně hypotéza, že tyto komplexní sloučeniny jsou vzhledem ke své struktuře molekul neaktivní při topikální aplikaci, nebyla potvrzena. Pouze u dimerů alkoholového juvenoidu s kyselinou oxalovou byla pozorována špatná topikální účinnost.

Všechny testované látky patří do skupiny esterů, k jejichž aktivaci dochází činností karboxylesteráz. Ty jsou obsaženy především v hemolymfě a některých tkáních jako v tukovém tělese, Malpighických trubicích, buňkách perikardu nebo ve střevě.

Naproti tomu dříve testované glykosidické juvenogeny, jsou aktivovány pouze činností glykosidáz ve střevech. Z toho důvodu jsou glykosidické juvenogeny při topikální aplikaci či přímé injektáži do hemolymfy naprosto neaktivní (Sláma a kol., 1978).

U všech testovaných sérií juvenogenů byla pozorována rozdílná účinnost *cis*- a *trans*-izomerů, což se shoduje s již dříve publikovanými výsledky (Jedlička a kol., 2007; Wimmer a kol., 1997). Odlišná aktivita optických izomerů byla pozorována také při testování JHA na dalších nepříbuzných hmyzích druzích hmyzu (Rejzek a kol., 1994). Optická izomerie JHA hraje roli při interakci JHA s receptorovým místem a pravděpodobně také při jejich různé metabolizaci pomocí hmyzích enzymů. V mnohých případech však i méně aktivní optický izomer vykazuje značnou biologickou aktivitu. Ta však může souviset také s faktem, že se většinou nepracuje se zcela čistými optickými izomery a příměs opačného izomeru může být odpovědná za značnou část této biologické aktivity.

V rámci této práce byla porovnána také variabilita biologické účinnosti látek na dvou různých laboratorních chovech ruměnice pospolné. První chov byl získán z Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v Praze (Populace 1); druhý z Entomologického ústavu BC AV ČR v Českých Budějovicích (Populace 2). Na nich byly postupně otestovány juvenogeny JO 11 T III, JO 11 C1 IV a komerční juvenoid methopren.

Mezi těmito dvěma populacemi byla pozorována vyšší variabilita výsledných aktivit, v porovnání s variabilitou hodnot mezi jednotlivými opakováními v rámci jedné populace. Také byla zjištěna vyšší variabilita hodnot u perorálních testů, kdy se u juvenogenu JO 11 C1 IV jeho perorální účinnost v rámci dvou testovaných populací lišila dokonce na úrovni řádu. Z výsledků těchto testů je také patrné, že účinnost testovaných JHA byla vyšší u Populace 1, což může mít přímou souvislost s rozmanitostí střevní mikroflóry těchto dvou populací (viz dále kapitola 6.2). U žádné z testovaných látek však nebyl mezi účinností na jednotlivých populacích prokázán statisticky významný rozdíl.

6.2. Střevní mikroflóra ruměnice pospolné a vliv testovaných JHA

Pro identifikaci kultivovatelných střevních bakterií ruměnice pospolné byla provedena hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF a analýza sekvence genu pro 16S rRNA. Ačkoliv mnozí autoři ve svých pracích zmiňují, že hmotnostní spektra získaná pomocí metody MALDI-TOF MS mohou být ovlivněna řadou faktorů a proto výsledky bývají nejednotné (Lay, 2000; Williams a kol., 2003), všechny výsledky získané v této práci pomocí hmotnostní spektrometrie se shodovaly s výsledky molekulární analýzy. Mellmann a kol. také publikovali roku 2008 práci, kde při identifikaci nefermentujících bakterií došli k závěru, že výsledky hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF se na úrovni druhu shodují s výsledky sekvenace genu pro 16S rRNA. Při porovnání obou metod u Populace 1 se výsledky taktéž shodovaly

(Tab 6.1). Z toho důvodu byla v této práci u Populace 2 provedena molekulární analýza pouze u vzorků, které se nepodařilo identifikovat pomocí hmotnostní spektrometrie.

Tab. 6.1: Porovnání výsledků identifikace pomocí metody MALDI-TOF MS a analýzy sekvence genu pro 16S rRNA u Populace 1

Izolát	Identifikace metodou MALDI-TOF/MS	Identifikace analýzou úseku 16S rRNA
1	neidentifikováno	<i>Microbacterium</i> sp.
2	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	<i>Sphingobacterium</i> sp.
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
4	<i>Ochrobactrum</i> sp.	<i>Ochrobactrum</i> sp.
5	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
6	<i>Delftia acidovorans</i>	<i>Delftia acidovorans</i>
7	neidentifikováno	<i>Paenibacillus</i> sp.
8	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
9	neidentifikováno	<i>Bacillus</i> sp.
10	neidentifikováno	<i>Chryseobacterium piscium</i>
11	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.
12	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>

Některé izoláty se hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF nepodařilo identifikovat z důvodu neúplnosti dostupné databáze. Předností této metody na rozdíl od analýzy sekvence 16S rRNA je však její časové nenáročnost a jednoduchost provedení. Také se díky porovnávání získaných spekter mezi sebou podařilo snížit počet vzorků pro následnou molekulární analýzu.

U Populace 1 tak bylo prokázáno celkem 12 různých bakteriálních druhů, ze kterých se pomocí hmotnostní spektrometrie podařilo identifikovat 8; u Populace 2 bylo získáno 17 rozdílných hmotnostních spekter, z nichž bylo identifikováno 13. Při následné molekulární analýze genu pro 16S rRNA se podařilo identifikovat pomocí databáze Ribosomal Database Project Classifier identifikovat všechny získané izoláty. Výsledky této metody považujeme za vysoce spolehlivé, protože podobnost s databází dosahovala u všech vzorků více než 90%.

Vyšší variabilita střevní mikroflóry byla zjištěna u Populace 2, což je zajímavé především při porovnání aktivity testovaných látek mezi dvěma testovanými populacemi, kdy účinnost všech testovaných JHA byla vyšší u Populace 1. Z toho plyne, že střevní mikroflóra se může skutečně podílet na degradaci a odbourávání těchto látek.

Mnohé z identifikovaných bakteriálních druhů jsou typičtí zástupci gastrointestinálního traktu hmyzu a byli již dříve publikováni v literatuře. Druhy rodu *Lactobacillus*, *Lactococcus* a *Bacillus* jsou běžně se vyskytující symbiotické mikroorganismy ve středním střevě hmyzu (Mrázek a kol., 2008). Také bakterie rodu *Klebsiella* byly již dříve izolovány ze střev *P. apterus* (Haas a Konig, 1987) i sarančete *Locusta migratoria*, kde se pravděpodobně podílí na syntéze feromonů (Dillon a kol., 2002). Bakterie rodu *Stenotrophomonas* a *Pseudomonas* byly také izolovány ze střev různých druhů hmyzu a jsou známy pro svou schopnost degradovat pesticidy (Indiragandhi a kol., 2007; Mrázek a kol., 2008).

V dalším kroku byl sledován vliv testovaných látek na střevní mikroflóru ruměnice pospolné pomocí metody T-RFLP. Z výsledků jasně vyplývá, že nově připravené esterové juvenogeny alkoholového typu vykazují mnohem nižší toxicitu vůči střevní mikroflóře než juvenogeny karbamátového typu. Jako referenční vzorky byly v tomto pokusu využity látky, o kterých je obecně známo, že mají nízkou úroveň toxicity (juvenoidy methopen a pyriproxifen); na druhé straně byly testovány látky, které vykazují toxicitu vyšší (juvenoid fenoxycarb, organofosfát Reldan). Vzhledem ke své vysoké biologické účinnosti a nízké toxicitě by tedy mohly být esterové juvenogeny alkoholového typu zajímavé pro komerční využití.

7. ZÁVĚR

Analogy juvenilních hormonů se odlišují od konvenčních insekticidů tím, že jsou specifické pro cílové druhy škůdců a nemají přímý toxický vliv, ale působí jako regulátory vývoje hmyzu. V předložené práci byla ověřena aktivita nově syntetizovaných juvenogenů na modelovém druhu ruměnici pospolné (*Pyrrhocoris apterus* L.). Současně byl sledován vliv nových typů juvenogenů na střevní symbiotickou mikroflóru ruměnice pospolné, která se stejně jako půdní mikroorganismy podílí na degradaci těchto látek. Níže je uveden souhrn získaných poznatků.

- Při srovnávacím testování účinnosti látek se známou aktivitou byly získány hodnoty biologických aktivit řádově srovnatelné s již dříve publikovanými výsledky. Tím byla potvrzena nejen správná metodika při provádění testů, ale také jejich dobrá reprodukovatelnost.
- Ze série esterových juvenogenů odvozených od karbamátu vykazoval nejvyšší topikální účinnost juvenogen HS 24 ($ID_{50} = 0,015 \mu\text{g}$ na jedince), nejúčinnějším juvenogenem v perorálních testech byl HS ($ID_{50} = 0,124 \mu\text{g}$ na jedince).
- Ze série esterových juvenogenů odvozených od alkoholu byl celkově nejúčinnější v topikálních testech juvenogen odvozený od kyseliny hexadekanové JO 11 C1 IV s aktivitou $ID_{50} = 0,007 \mu\text{g}$ na jedince, v perorálních testech se ukázal nejvíce účinný dimer alkoholového juvenoidu s oxalovou kyselinou JO 27 EC s aktivitou $ID_{50} = 0,082 \mu\text{g}$ na jedince.
- U všech testovaných látek byla pozorována rozdílná účinnost cis- a trans- izomerů, přičemž aktivita cis-izomerů byla vždy vyšší.
- V rámci této práce byla porovnána také variabilita biologické účinnosti látek na dvou různých laboratorních populacích ruměnice pospolné. Účinnost testovaných JHA byla vyšší u Populace 1, získané z Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v Praze. U žádné z testovaných látek však nebyl mezi účinností na jednotlivých populacích prokázán statisticky významný rozdíl.

-
- Identifikace kultivovatelných střevních bakterií ruměnice pospolné byla provedena pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF a analýzy sekvence genu pro 16S rRNA. Všechny výsledky získané hmotnostní spektrometrií se shodovaly s výsledky molekulární analýzy. Celkem bylo u Populace 1 těmito metodami identifikováno 12 různých bakteriálních druhů; u Populace 2 se podařilo identifikovat celkem 17 druhů střevních bakterií. Vyšší variabilita střevní mikroflóry byla tedy zjištěna u Populace 2, což může mít přímou souvislost s aktivitou testovaných JHA.

 - Byl sledován také vliv testovaných látek na střevní mikroflóru ruměnice pospolné metodou T-RFLP. Z výsledků vyplývá, že nově připravené esterové juvenogeny alkoholového typu vykazují mnohem nižší toxicitu vůči střevní mikroflóře než juvenogeny karbamátového typu. Vzhledem ke své vysoké biologické účinnosti a nízké toxicitě by tedy mohly být esterové juvenogeny alkoholového typu velmi zajímavé pro komerční využití.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Arias, J. R., Mulla, M. S., 1975. Morphogenetic aberrations induced by a juvenile hormone analogue in the mosquito *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 12, 309-316.

Baker, F. C., 1990. Morphogenetic hormones in arthropods. Rutgers university press, New Brunswick, 398-453.

Barlett, J. M. S., Stirling, D., 2003. *Methods in molecular Biology* 226, PCR Protocols. Second Edition, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 519 p.

Beak, J. H., Kim, J. I., Lee, D. W., Chung, B. K., Miyata, T., Lee, S. H., 2005. Identification and characterization of acetyl-type acetylcholinesterase likely associated with organophosphate resistance in *Plutella xylostella*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 81, 164-175.

Belles, X., Martin, D., Piulachs, M. D., 2005. The mevalonate pathway and the synthesis of juvenile hormone in insects. *Annual Review of Entomology* 50, 181-199.

Bergot, B. J., Ratcliff, M., Schooley, D. A., 1981. Method for quantitative determination of the four known juvenile hormones in insect tissue gas chromatography-mass spectroscopy. *Journal of Chromatography* 204, 231-244.

Björkman, C., Ugglå, A., 1999. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *International Journal for Parasitology* 29, 1497-1507.

Bowers, W. S., Fales, H. M., Thompson, M. J., Uebel, E., 1966. Juvenile hormone: identification of an active compound from Balsam fir. *Science* 154, 1020-1021.

Buchner, P. 1965. *Endosymbiosis of animals with plant microorganisms*. Interscience, New York, N.Y.

Burt, E. T., 1938. On the corpora allata of dipterous insects II. *Proceedings of the Royal Society B* 126, 210-223.

Candlish, A. A. G., 1991. Immunological methods in food microbiology. *Food Microbiology* 8, 1-14.

Carlsson, H. E., Hurvell, B., Lindberg, A. A., 1976. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for titration of antibodies against *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica*. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica section C- Immunology* 84, 168-176.

Cazemier, A. E., Hackstein, J. H. P., Op den Camp, H. J. M., Rosenberg, J., van der Drift, C., 1997. Bacteria in the intestinal tract of different species of arthropods. *Microbial Ecology* 33, 189-197.

Cornel, A. J., Stanich, M. A., Farley, D., Mulligan, F. S., Byde, G., 2000. Methoprene tolerance in *Aedes nigromaculis* in Fresno County, California. *Journal of the American Mosquito Control Association* 16, 223-228.

Cusson, M., Yagi, K. J., Ding, Q., Duve, H., Thorpe, A., Mcneil, J. N., Tobe, S. S., 1991. Biosynthesis and release of juvenile-hormone and its precursors in insect and crustaceans – the search for a unifying arthropod endocrinology. *Insect Biochemistry* 21, 1-6.

Černý, V., Dolejš, L., Lábler, L., Šorm, F., Sláma, K., 1967. Dehydrojuvabione – a novel compound with juvenile hormone activity from balsam fir. *Tetrahedron Letters* 12, 1053-1057.

- Dame, D. A., Wichterman, G. J., Hornby, J. A., 1998. Mosquito (*Aedes taeniorhynchus*) resistance to methoprene in an isolated habitat. *Journal of the American Mosquito Control Association* 14, 200-203.
- deKort, C. A. D., Granger, N. A., 1996. Regulation of JH titers: The relevance of degradative enzymes and binding proteins. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 33, 1-26.
- Demirev, P. A., Fenselau, C., 2008. Mass spectrometry for rapid characterization of microorganisms. *Annual Review of Analytical Chemistry* 1, 71-93.
- Dhadialla, T. S., Carlson, G. R., Le, D. P., 1998. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annual Review of Entomology* 43, 545-569.
- Dillon, R. J., Dillon, V. M., 2004. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interactions. *Annual Review of Entomology* 49, 71-79.
- Dillon, R. J., Vennard, C. T., Charnley, A. K., 2002. Gut bacteria produce components of a locust cohesion pheromone. *Journal of Applied Microbiology* 92, 759-763.
- Douglas, A. E., 1998. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses. *Annual Reviews of Entomology* 43, 17-37.
- Dyte, C. E., 1972. Resistance to synthetic juvenile hormone in a strain of flour beetle *Tribolium castaneum*. *Nature* 238, 48.
- Engelmann, F., 1970. The physiology of insect reproduction, Pergamon Press Inc., pp. 307.
- Flatt, T., Tu, M.-P., Tatar, M., 2005. Hormonal pleiotropy and the juvenile hormone regulation of *Drosophila* development and life history. *BioEssays* 27, 999-1010.
- Fukatsu, T., Hosokawa, T., 2002. Capsule-transmitted gut symbiotic bacterium of the Japanese common plataspid stinkbug, *Megacopta punctatissima*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 389-396.
- Fukuda, S., Eguchi G., Takeuchi, S., 1966. Histological and electron microscopical studies on sexual differences in structure of the corpora allata of the moth of the silkworm, *Bombyx mori*. *Embryologia* 9, 123-158.
- Garland, J. L., Mills, A. L., 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level-sole-carbon-source utilization. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 2351-2359.
- Genta, F. A., Dillon, R. J., Terra, W. R., Ferreira, C., 2006. Potential role for gut microbiota in cell wall digestion and detoxification in *Tenebrio molitor* larvae. *Journal of Insect Physiology* 52, 593-601.
- Gil, R., Silva, F. J., Zientz, E., Delmotte, F., Gonzalez-Candelas, F., Latorre, A., Rausell, C., Kamerbeek, J., Gadau, J., Holldobler, B., van Ham, R. CH. J., Gross, R., Moya, A., 2003. The genome sequence of *Blochmannia floridanus*: Comparative analysis of reduced genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 9388-9393.
- Gilbert, L. I., Granger, N. A., Roe, R. M., 2000. The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, 617-644.
- Goodman, W. G., Trost, J. T., Reiter, C. T., Bean, D. W., Carlson, R. O., 1984. Hemolymph transport of juvenile hormones. 426-437. In: Hoffmann, J., Porchet, M. Biosynthesis, metabolism and mode of action invertebrate hormones, Springer-Verlag, Berlin.

- Goodman, W. G., 1990. Biosynthesis, titer regulation and transport of juvenile hormones. 83-124. In: Gupta, A. P. Morphogenetic hormones of Arthropods, Rutgers University Press, New Brunswick.
- Granger, N. A., Sturgis, S. L., Ebersohl, R., Geng, C., Sparks, T. C., 1996. Dopaminergic control of corpora allata activity in the larval tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 32, 449-466.
- Haas, F., König, H., 1987. Characterisation of an anaerobic symbiont and the associated aerobic bacterial flora of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Pyrrhocoridae). Microbiology Ecology 45, 99-106.
- Hall, N., 2007. Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. The Journal of Experimental Biology 209, 1518-1525.
- Hammock, B. D., Bonning, B. C., Possee, R. D., Hanzlik, T. N., Maeda, S., 1990. Expression and effects of the juvenile hormone esterase in baculovirus vector. Nature 344, 458-461.
- Hammock, B. D., Mumby, S. M., Lee, P. W., 1977. Mechanisms of resistance to juvenoid methoprene in house fly *Musca domestica* L. Pesticide Biochemistry and Physiology 7, 261-272.
- Handelsman, J., 2004. Metagenomics: Application of genomics to Uncultured Microorganisms. Microbiology and Molecular Biology Reviews 68, 669-685.
- Hardie, J., Gao, N., Timar, T., Sebok, P., Honda, K. I., 1996. Precocene derivatives and aphid morphogenesis. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 32, 493-501.
- Harith, A. E., Kolk, A. H., Leeuwenburg, J., Muigai, R., Huigen, E., Jelsma, T., Kager, P. A., 1988. Improvement of a direct agglutination test for field studies of visceral leishmaniasis. Journal of Clinical Microbiology 26, 1321-1325.
- Hartfelder, K., 2000. Insect juvenile hormone: from "status quo" to high society. Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research 33, 157-177.
- Hartfelder, K., Engels, W., 1998. Social insect polymorphism: Hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. Current Topics in Developmental Biology 40, 45-77.
- Hayashi, A., Aoyagi, H., Yoshimura, T., Tanaka, H., 2007. Development of novel method for screening microorganisms using symbiotic association between insect (*Coptotermes formosanus* Shiraki) and intestinal microorganisms. Journal of Bioscience and Bioengineering 103, 358-367.
- Henrick, C. A., 1982. Juvenile hormone analogs: Structure-activity relationships. In: Coast, J. R., (Ed.), Insecticide Mode of Action. Academic Press, New York, London, pp. 315-402.
- Henrick, C. A., 1991. Juvenoids and anti-juvenile hormone agents: Past and present. In: Hrdý, I. (Ed.), Insect Chemical Ecology, Academia Publisher, Tábor, Czech Republic, 429-452.
- Hoffmann, K. H., 1995. Oogenesis and the female reproductive tract. In: Leather, S. R., Hardy, J., Insect Reproduction. CRC Press, New York, 1-32.
- Hoffman, K. H., Lorenz, M. W., 1998. Recent advantages in hormones in insect pest control. Phytoparasitica 26, 323-330.
- Hood, L., Kronenberg, M., Hunkapiller, T., 1985. T-cell antigen receptors and the immunoglobulin supergene family. Cell 40, 225-229.

- Horowitz, A. R., Gorman, K., Ross, G., Denholm, I., 2003. Inheritance of pyriproxyfen resistance in the whitefly, *Bemisia tabaci* (Q biotype). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 54, 177-186.
- Hrdý, I., 1974. Effects of juvenoids on insecticide susceptible and resistant aphids (*Myzus persicae*, *Aphis fabae* and *Therioaphis maculata*; Homoptera, Aphididae). *Acta Entomologica Bohemoslovaca* 71, 367-381.
- Hrdý, I., 1997. Juvenoidy a feromony v „ekologicky zdravé“ ochraně před škodlivým hmyzem. Sborník Astra 2000, s. 73-86. [on-line]. [cit. 2010-04-01]. Dostupné z <http://teacher.vscht.cz/dokumenty/download/sbornik1997.pdf>
- Hrdý, I., Sehnal, F., Vrkoč, J. 1991. Biopesticidy v zemědělství. Ministerstvo zemědělství ČR, Praha, 107 s.
- Hrdý, I., Kuldová, J., Wimmer, Z., 2000. Juvenoidy proti termitům. *Vesmír* 11, 636-641.
- Hrdý, I., Kuldová, J., Wimmer, Z., Lenz, M., Gleeson, P. V., 2004. Laboratory and field trials with juvenogens as potential termite control agents, XXII International Congress of Entomology, Abstracts on CD-ROM. Brisbane, Australia.
- Chang, E. S., Kaufman, W. R., 2005. *Comprehensive molecular insect science*. Vol. 3, ed. by Gilbert, L. I., Iatrou K., Gill, S. S., Elsevier, Oxford, 805-842.
- Ibekwe, A. M., Kennedy, A. C., 1998. Phospholipid fatty acid profiles and carbon utilization patterns for analysis of microbial community structure under field and greenhouse conditions. *FEMS Microbiology Ecology* 26, 151-163.
- Indiragandhi, P., Aanadham, R., Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Kim, G. H., Saravanan, V. S., Tongmin, S., 2007. Cultivable bacteria associated with larval gut of prothiofos-resistant, prothiofos-susceptible and field-caught populations of diamondback moth, *Plutella xylostella* and their potential for, antagonism towards entomopathogenic fungi and host insect nutrition. *Journal of Applied Microbiology* 103, 2664-2675.
- Ishaaya, I., 1992. Insect resistance to benzoylphenylureas and other insect growth-regulators-mechanisms and countermeasures. *ACS Symposium Series* 505, 231-246.
- Ishaaya, I., 2001. *Biochemical sites of insecticide action and resistance*. Springer-Verlag, Berlin, 360 p.
- Ishaaya, I., Horowitz, A.R., 1995. Pyriproxyfen, a novel insect growth-regulator for controlling whiteflies – mechanisms and resistance management. *Pesticide Science* 43, 227-232.
- Ishaaya, I., Konedalov, S., Horowitz, A.R., 2005. Biorational insecticides: Mechanism and cross-resistance. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 58, 192-199.
- Ito, H., 1918. On the glandular nature of the corpora allata of the Lepidoptera. *Bulletin of the Imperial Tokyo Sericultural College* 1, 63–103.
- Jánský, L., 1981. Fyziologie živočichů a člověka. In Kodrík, D., 2004. Fyziologie hmyzu. Učební texty. Entomologický ústav AVČR a Biologická fakulta JČU v Českých Budějovicích, 219 s.
- Jedlička, P., 2008. Juvenoidy a juvenogeny – možnosti jejich využití v ochraně rostlin. Kandidátská disertační práce, Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Praha, 27 s.

- Jedlička, P., Hrdý, I., Kuldová, J., Wimmer, Z., 2007. The systemic effects of juvenoids on the red firebug *Pyrrhocoris apterus* and on the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* with data on life table response. *Pest Management Science* 63, 1026-1035.
- Jones, G., Sharp, P. A., 1997. Ultraspiracle: A invertebrate nuclear receptor for juvenile hormones. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America* 94, 13499-13503.
- Jones, G., Wozniak, M., Chu, Y. X., Dhar, S., Jones, D., 2001. Juvenile hormone III-dependent conformational changes of the nuclear receptor ultraspiracle. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32, 33-49.
- Judy, K. J., Schooley, D. A., Dunham, L. L., Hall, M. S., Bergot, B. J., Siddall J. B., 1973. Isolation, structure, and absolute configuration of a new natural insect juvenile hormone from *Manduca sexta*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70, 1509-1513.
- Jurček, O., Wimmer, Z., Bennettová, B., Moravcová, J., Drašar, P., Šaman, D., 2009. Novel juvenogens (insect hormonogenic agents): Preparation and biological tests on *Neobellieria bullata*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 57, 10852-10858.
- Kanost, M. R., Kawooya, J. K., Law, J. H., Ryan, R. O., Van Heusden, M. C., Ziegler, R., 1990. Insect haemolymph proteins. *Advances in Insect Physiology* 22, 299-396.
- Karunker, I., Benting, J., Lueke, B., Ponge, T., Nauen, R., Roditakis, E., Vontas, J., Gorman, K., Denholm, I., Morin, S., 2008. Over-expression of cytochrome P450 CYP6CM1 is associated with high resistance to imidacloprid in the B and Q biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera : Aleyrodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38, 634-644.
- Keshan, B., Hiruma, K., Riddiford, L. A., 2006. Developmental expression and hormonal regulation of different isoforms of the transcription factor E75 in the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Developmental Biology* 295, 623-632.
- Kikuchi, Y., Meng, X. Y., Fukatsu, T., 2005. Gut symbiotic bacteria of the genus *Burkholderia* in the broad-headed bugs *Riptortus clavatus* and *Leptocoris chinensis* (Heteroptera: Alydidae). *Applied and Environmental Microbiology* 71, 4035-4043.
- King, R. C., Aggarwal, S. K., Bodenstern, D., 1966. The comparative submicroscopic cytology of the corpus allatum-corporum cardiacum complex of the wild type and *ves* adult female *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Zoology* 161, 151-176.
- Konopova, B., Jindra, M., 2007. Juvenile hormone resistance gene *Methoprene-tolerant* controls entry into metamorphosis in the beetle *Tribolium castaneum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 10488-10493.
- Konopova, B., Jindra, M., 2008. Broad-Complex acts downstream of *Met* in juvenile hormone signaling to coordinate primitive holometabolism metamorphosis. *Development* 135, 559-568
- Kramer, K. J., Dunn, P. E., Peterson, R. C., Seballos, H. L., Sanburg, L. L., Law, J. H., 1976. Purification and characterization of the carrier protein for juvenile hormone from the haemolymph of the tobacco hornworm *Manduca sexta* Johannson. *Journal of Biological Chemistry* 251, 4979-4985.
- Kumaran, A. K., 1990. Modes of action of juvenile hormones at cellular and molecular levels. In *Morphogenetic Hormones of Arthropods*. Edited by Gupta, A. P., Rutgers University Press, New Brunswick.

- Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., Pace, N. R., 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 6955-6959.
- Lay, J. O. Jr., 2000. MALDI-TOF mass spectrometry and bacterial taxonomy. *Trends in Analytical Chemistry* 19, 507-516.
- Lay, J. O., 2001. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectrometry Reviews* 20, 172-194.
- Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H., Forney, L. J., 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rDNA. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 4516-4522.
- Lundgren, J. G., Lehman, R. M., Chee-Sanford, J., 2007. Bacterial communities within digestive tracts of ground beetles (*Coleoptera: Carabidae*). *Annals of the Entomological Society of America* 100, 275-282.
- Ma, W., Li, X., Dennehy, T. J., Lei, C., Wang, M., Degain, B. A., Nichols, R. L., 2010. Pyriproxyfen resistance of *Bemisia tabaci* (*Homoptera: Aleyrodidae*) biotype B: Metabolic mechanism. *Journal of Economic Entomology* 103, 158-165.
- Maidak, B. L., Cole, J. R., Lilburn, T. G., Parker, T. Ch. Jr., Saxman, P. R., Farris, R. J., Garrity, G. M., Olsen, G. J., Schmidt, T. M., Tiedje, J. M., 2000. The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Research* 29, 173-174.
- Marchalonis, J. J., Hohman, V. S., Kaymaz, H., Schluter, S. F., 1993. Shared antigenic determinants of immunoglobulins in phylogeny and in comparison with T-cell receptors. *Comparative Biochemistry and Physiology B – Biochemistry & Molecular biology* 105, 423-441.
- Marsh, T. L., 1999. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): An emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Current Opinion in Microbiology* 2, 323-327.
- Marsh, T. L., Nakatsu, C. H., 2007. Analysis of microbial communities with denaturing gradient gel electrophoresis and terminal restriction fragment length polymorphism. In: Reddy, C. A., Beveridge, T. J., Breznak, J. A., Marzluf, G., Schmidt, T. M., Snyder, L. R., editors. *Methods for General and Molecular Microbiology*. ASM Press, Washington, DC, 909-924.
- Masner, P., Dorn, S., Vogel, W., Kälin, M., Graf, O., Günthart, E., 1981. Types of response of insects to a new IGR and to proven standards. In: Sehnal, F., Zabza, A., Menn, J. J., Cymbrowski, B. (Eds.), *Regulation of Insect Development and Behaviour*. Wrocław, Poland, 809-811.
- Masner, P., Angst, M., Dorn, S., 1987. Fenoxycarb, an insect growth regulator with juvenile hormone activity: A candidate for *Heliothis virescens* (F.) control on cotton. *Pesticide Science* 18, 89-94.
- Maxam, A. M., Gilbert, W., 1977. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 560-564.
- Melander, A. L., 1914. Can insects become resistant to sprays? *Journal of Economic Entomology* 7, 167-173.
- Mellmann, A., Cloud, J., Maier, T., Keckevoet, U., Ramminger, P., Iwen, P., Dunn, J., Hall, G., Wilson, D., LaSala, P., Kostrzewa, M., Harmsen, D., 2008. Evaluation of Matrix-Assisted

Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry in Comparison to 16S rRNA Gene Sequencing for Species Identification of Nonfermenting Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 1946-1954.

Meyer, A. S., Schneiderman, H. A., Hanzmann, E., Ko, J. H., 1968. The Two Juvenile Hormones from the Cecropia Silk Moth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 60, 853-860

Miller, T. L. The EXtension TOXicology NETwork [on-line]. [cit. 2010-03-20]. Dostupné z <http://extoxnet.orst.edu>

Minakuchi, Ch., Riddiford, L., 2006. Insect juvenile hormone action as a potential target of pest management. *Pest Management Science* 31, 77-84.

Miura, K., Oda, M., Makita, S., Chinzei, Y., 2005. Characterization of the *Drosophila* Methoprene-tolerant gene product- Juvenile hormone binding and ligand-dependent gene regulation. *FEBS Journal* 272, 1169-1178.

Miyamoto, J., Hirano, M., Takimoto, Y., Hatakoshi, M., 1993. Insect growth regulators for pest control, with emphasis on juvenile hormone analogs: present and future prospects. In: Duke, O. S., Menn, J. J., Plimmer, J. R. (Eds), *Pest Control with Enhanced Environmental Safety*, Washington D.C., ACS Symp Ser 524, 144-168.

Mohan, M., Gujar, G. T., 2003. Local variation in susceptibility of diamondback, *Plutella xylostella* (Linnaeus) to insecticides and role of detoxification enzymes. *Crop Protection* 22, 495-504.

Moran, N. A., Baumann, P., 2000. Bacterial endosymbionts in animals. *Current Opinion In Microbiology* 3, 270-275.

Morgan, E. D., 2004. *Biosynthesis in insects*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 101-102.

Mrázek, J., Štrosová, L., Fliegerová, K., Kott, T., Kopečný, J., 2008. Diversity of insect intestinal microflora. *Folia Microbiologica* 55, 229-233.

Mullis, K., Faloona, F., 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155, 335-350.

Nakatsu, C. H., Torsvik, H., Øvreås, L., 2000. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. *Soil Science Society of America Journal* 64, 1382-1388.

Nasir, H., Noda, H., 2003. Yeast-like symbiotes as a sterol source in anobiid beetles (*Coleoptera, Anobiidae*): Possible metabolic pathways from fungal sterols to 7-dehydrocholesterol. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 52, 175-182.

Nation, J. L., 2002. *Insect physiology and biochemistry*. CRC press LLC, Florida, 485 p.

Němec, V., 1993. Juvenoids: from the research to practical use. A short review. *Bollettino dell'Istituto di Entomologia "G. Grandi" Università Bologna* 48, 67-74.

Nijhout, H. F., 1994. *Insect hormones*. Princeton university press, Princeton, New Jersey, 267 p.

Nijhout, H. F., Wheeler, D. E., 1982. Juvenile hormone and the physiological basis of insect polymorphisms. *Quarterly Review of Biology* 57, 109-133.

- Nishida, R., Bowers, W. S., Evans, P. H., 1984. Synthesis of highly-active juvenile hormone analogs, juvocimene-I and juvocimene-II, from the oil of sweet basil, *Ocimum basilicum* L. *Journal of Chemical Ecology* 10, 1435-1451.
- Novák, V. J. A., 1975. *Insect hormones*. London, Methuen & Co.Ltd., 600 p.
- Novák, J., Tykva, R., Wimmer, Z., Pavlík, M., Prouza, M., Hlavsová, K., Zarevúcká, M., 2008. Enantiomeric purity of biodegradation products of juvenogens by newly isolated soil bacteria. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 56, 6604-6608.
- Numata, A., Hokimoto, K., Takemura, T., Matsunaga, S., Morita, R., 1983. Plant constituents biologically-active to insects. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 31, 436-442.
- Onstad, D. W., 2008. *Insect resistance management: biology, economics and prediction*. Elsevier Ltd., USA, 305 s.
- Pandey, J., Sood, S. S., Jain, R. K., 2007. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis: Characterizing the unseen. *Indian Journal of Microbiology* 47, 90-91.
- Pener, M. P., 1991. Locust phase polymorphism and its endocrine relations. *Advances in Insect Physiology* 23, 1-79.
- Pener, M. P., Yerushalmi, Y., 1998. The physiology of locust phase polymorphism: An update. *Journal of Insect Physiology* 44, 365-377.
- Piepho, H., 1960. Hormonal control of molting behavior and scale development in insect. *Annaly of The New York Academy of Sciences* 89, 564-571.
- Poduška, K., Hlaváček, J., Šorm, F., Sláma, K., 1973. Simple peptide derivatives with insect hormone activity. In: Nesvadba, H., (Ed.), *Peptides*. North Holland Publishing Company, Amsterdam, 286-289.
- Rejzek, M., 1993. Příprava juvenoidů odvozených od 2-(4-hydroxybenzyl)-1-cykloalkanonů a sledování strukturně-aktivitních závislostí na vybraných druzích hmyzu. Kandidátská disertační práce, Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Praha, 185 s.
- Rejzek, M., Wimmer, Z., Saman, D., Ricankova, M., Nemeč, V., 1994. Synthesis and structure-activity relationships of juvenoids derived from 2-(4-hydroxybenzyl)cycloalkan-1-ones. *Helvetica Chemica Acta* 77, 1241-1255.
- Riddiford, L. M., 1994. Cellular and molecular actions of juvenile hormone. I. General considerations and premetamorphic actions. *Advances in Insect Physiology* 24, 213-274.
- Richard, D. S., Applebaum, S. W., Sliter, T. J., Baker, F. C., Schooley, D. A., Reuter, C. C., Henrich, V. C., Gilbert, L. I., 1989. Juvenile-hormone bisepoxide biosynthesis invitro by the ring gland of *Drosophila melanogaster* – A putative juvenile-hormone in the higher Diptera. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America* 86, 1421-1425.
- Roe, R. M., Anspaugh, D. D., Venkatesh, K., Linderman, R. J., Graves, D. M., 1997. A novel germinal diol as a highly specific and stable in vivo inhibitor of insect juvenile hormone esterase. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 36, 165-179.
- Rosypal, S., Doškar, J., Petrzik, K., Růžičková, V., 2002. Úvod do molekulární biologie. Díl čtvrtý; molekulární biologie rostlinných virů, priony, molekulární evoluce, vznik života, metody molekulární biologie, genové inženýrství. Třetí inovované vydání, Brno, 901-1200.

- Röller, H., Dahm, K. H., Sweely, C. C., Trost, B. M., 1967. Structure of juvenile hormone. *Angewandte chemie-International edition* 6, 179-180.
- Ruelle, V., El Moulaj, B., Zorzi, W., 2004. Rapid identification of environmental bacterial strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 18, 2013-2019.
- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, 1988. Primerdirected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sambrook, J., Russel, D. W., 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanburg, L. L., Kramer, K. J., Kezdy, F. J., Law, J. H., 1975. Juvenile hormone-specific esterases in the hemolymph of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Journal of Insect Physiology* 21, 873-887.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 5463-5467.
- Santo Domingo, J. W., Kaufman, M. G., Klug, M. J., Holben, W. E., Harris, D., Tiedje J.M., 1998. Influence of diet on the structure and function of the bacterial hindgut community of crickets. *Molecular Ecology* 7, 761-767.
- Santos, A. C., Lehmann, R., 2004. Isoprenoids control germ cell migration downstream of HMGCoA reductase. *Developmental Cell* 6, 283-293.
- Shyu, C., Soule, T., Bent, S. J., Foster, J. A., Forney, L. J., 2007. MiCA: a web-based tool for the analysis of microbial communities based on terminal-restriction fragment length polymorphisms of 16S and 18S rRNA genes. *Microbial Ecology* 53, 562-570.
- Schmialek, P., 1961. Die Identifizierung zweier in Tenebriokot und in Hefe vorkommender Substanzen mit Juvenilhormonwirkung. *Zeitschrift für Naturforschung* 18b, 513-515.
- Schwägele, F., 1999. Polymerase Chain Reaction – PCR. Possibilities and limitations of application in food analysis. *Fleischwirtschaft* 79, 121-123.
- Sláma, K., 1971. Insect juvenile hormone analogues. *Annual Review of Biochemistry* 40, 1079-1102.
- Sláma, K., 1975. Some old concepts and new findings on hormonal control of insect morphogenesis. *Journal Insect Physiology* 21, 921-995.
- Sláma, K., 1981. Juvenoids in retrospect and juvenogens in prospect. In: Sehnal, F., Zabza, A., Menn, J. J., Cymbrowski, B. (Eds.), *Regulation of Insect Development and Behaviour*. Wroclaw, Poland, 853-868.
- Sláma, K., 1985. Pharmacology of insect juvenile hormones. In: Kerkut, G. A., Gilbert, L. I., (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology* 11, 357-394.
- Sláma, K., 1999. The history and current status of juvenoids. *Proceedings of the 3rd International Conference on Urban Pests*, 9-25.
- Sláma, K., Williams, C. M., 1965. Juvenile hormone activity for the bug *Pyrrhocoris apterus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 54, 411-414.

- Sláma, K., Romaňuk, M., Šorm, F., 1974. Insect hormones and bioanalogues, Springer-Verlag, New York Wien, p.477.
- Sláma, K., Romaňuk, M., 1976. Juvenogens, biochemically activated juvenoid complexes. Insect Biochemistry 6, 579-586.
- Sláma, K., Kahovcová, J., Romaňuk, M., 1978a. Action of some aromatic juvenogen esters on insects. Pesticide Biochemistry and Physiology 9, 313-321.
- Sláma, K., Wimmer, Z., Romaňuk, M., 1978b. Juvenile hormone activity of some glycosidic juvenogens. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie 359, 1407-1412.
- Socha, R., 1993. *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera) – an experimental model species: A review. European Journal of Entomology 90, 241-286.
- Sparks, T. C., Lockwood, J. A., Byford, R. L., Graves, J. B., Leonard, B. R., 1989. The role of behaviour in insecticide resistance. Pesticide Science 26, 383-399.
- Spratt, D. A., 2004. Significance of bacterial identification by molecular biology methods. Endodontic topics 9, 5-14.
- Staal, G. B., 1959. Endocrine effects in phase development in locust. Acta Symposium of the Evolution of Insects. Praha, 142-146.
- Staal, G.B., 1975. Insect growth regulators with juvenile hormone activity. Annual Review of Entomology 20, 417-460.
- Stará, J., Falta, V., Kocourek, F., 2009. Metodika hodnocení rezistence blýskáčka řepkového k insekticidům. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha 6 Ruzyně, 16 s.
- Stay, B., Tobe, S. S., Bendena, W. G., 1994. Allatostatins: Identification, primary structures, functions and distribution. Advances in Insect Physiology 25, 267-337.
- Sullivan, J., Goh, K. S., 2008. Environmental fate and properties of pyriproxyfen. Journal of Pesticide Science 33, 339-350.
- Sutton, S. V. W., Cundell A. M., 2004. Microbial identification in the pharmaceutical industry. Pharmacopeial Forum 30, 1884-1894.
- Svobodová, H., Ryšavá, H., Pavlík, M., Šaman, D., Drašar, P., Wimmer, Z., 2010. Steroid conjugates: Synthesis and preliminary biological testing of pro-juvenoids. Bioorganic and Medicinal Chemistry 18, 8194-8203.
- Tabashnik, B. E., Cushing, N. L., Johnson, M. W., 1987. Diamondback moth (*Lepidoptera: Plutellidae*) resistance to insecticides in Hawaii: intra-island variation and cross-resistance. Journal of Economic Entomology 80, 1091-1099.
- Tan, S. W. L. , Wong, S. M., Kini, R. M., 2000. Rapid simultaneous detection of two orchid viruses using LC- and/or MALDI-mass spectrometry. Journal of Virological Methods 85, 93-99.
- Thies, J. E., 2007. Soil microbial community analysis using terminal restriction fragment length polymorphisms. Soil Science Society of America Journal 71, 579-591.

- Thompson, J. R., Marcelino, L. A., Polz, M. F., 2002. Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by 'reconditioning PCR'. *Nucleic Acids Research* 30, 2083-2088.
- Tobe, S. S., Feyereisen, R., 1983. Juvenile hormone biosynthesis: Regulation and assay, pp. 161-178. In Downer, R. G. H., Laufer (Eds.), *Endocrinology of Insects*, Alan R. Liss, New York, 701 p.
- Tobe, S. S., Stay B., 1985. Structure and regulation of the corpus allatum. *Advances in Insect Physiology* 18, 305-432.
- Touhara, K., Prestwich, G. D., 1992. Binding-site mapping of a photoaffinity-labeled juvenile-hormone binding-protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 182, 466-473.
- Vig, B., Kanwar, R., Arora, D. R., 1984. Biological active agents – synthesis of bakuchiol analogs. *Journal of The Indian Chemical Society* 61, 893-894.
- Vinson, S. B., Law, P. K., 1971. Cuticular composition and DDT resistance in the tobacco budworm. *Journal of Economic Entomology* 64, 1387.
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., Cole, J. R., 2007. Naïve Bayesian Classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied Environmental Microbiology* 73, 5261-5267.
- Welham, K. J., Domin, M. A., Johnson, K., Jones, L., Ashton, D. S., 2000. Characterization of fungal spores by laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 14, 307-310.
- Whitmore, E., Gilbert, L. I., 1972. Haemolymph lipoprotein transport of juvenile hormone. *Journal of Insect Physiology* 18, 1153-1167.
- Wigglesworth, V. B., 1936. The function of the corpus allatum in the growth and reproduction of *Rhodnius prolixus*. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 79, 91-119.
- Williams, C. M., 1956. The juvenile hormone of insects. *Nature* 178, 212-213.
- Williams, T.L., Andrzejewski, D., Lay, J.O. Jr., Musser, S.M., 2003. Experimental factors affecting the quality and reproducibility of MALDI-TOF mass spectra obtained from whole bacteria cells. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 14, 342-351.
- Wilson, T. G., 2001. Resistance of *Drosophila* to toxins. *Annual Review of Entomology* 46, 545-571.
- Wilson, T. G., Ashok, M., 1998. Insecticide resistance resulting from an absence of target-site gene product. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America* 95, 14040-14044.
- Wimmer, Z., Romaňuk, M., 1989. Insect juvenile hormones and their bioanalogues. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* 54, 2302-2329.
- Wimmer, Z., Rejzek, M., Zarevúcka, M., Kuldová, J., Hrdý, I., Němec, V., Romaňuk, M., 1997. A series of bicyclic insect juvenile hormone analogs of Czech origin: Twenty years of development. *Journal of Chemical Ecology* 23, 605-628.
- Wimmer, Z., Kuldová, J., Hrdý, I., Bennettová, B., 2006. Can juvenogens, biochemically target hormon compounds, assist in environmentally safe insect pest management? *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36, 42-453.

Wimmer, Z., Jurček, O., Jedlička, P., Hanus, R., Kuldová, J., Hrdý, I., Bennettová, B., Šaman, D., 2007a. Insect Pest Management Agents: Hormonogen Esters (Juvenogens). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 7387-7393.

Wimmer, Z., Pechová, L., Sile, L., Šaman, D., Jedlička, P., Wimmerová, M., Kolehmainen, E., 2007b. Glycosidic juvenogens: Derivatives bearing α,β -unsaturated ester functionalities. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 15, 7126-7137.

Wimmer, Z., Šaman, D., Kuldová, J., Hrdý, I., a Bennettová, B., 2002. Fatty acid esters of juvenoid alcohols as insect hormonogen agents (juvenogens). *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 10, 1305-1312.

Woodring, J, Hoffman, K. H, 1994. The effect of octopamine, dopamine and serotonin on juvenile hormone synthesis, *in vitro*, in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Journal of Insect Physiology* 40, 797-802.

Wyatt, G. R., Davey, K. G., 1996. Cellular and molecular actions of juvenile hormone. 2. Roles of juvenile hormone in adult insects. *Advances in Insect Physiology* 26, 1-155.

Zhang, J., Saleh, D. S., Wyatt, G. R., 1996. Juvenile hormone regulation of an insect gene: a specific transcription factor and a DNA response element. *Molecular and Cellular Endocrinology* 122, 15–20.

INTERNETOVÉ ZDROJE

Chen, P., 2009. Principles of biological science. [online]. [cit. 2011-04-10]. Dostupné z <<http://www.nicerweb.com/bio1152/Locked/media/ch45/metamorphosis.html>>.

The Insecticide Resistance Action Committee. Arthropod pesticide resistance database. [online]. [cit. 2011-04-20]. Dostupné z <<http://www.irc-online.org/teams/resistance-database/>>.

Fernández-Guerra, A., 2009. T-RFPred. A Terminal-Restriction Fragment Prediction Tool. [online]. [cit. 2011-08-10]. Dostupné z <<http://nodens.ceab.csic.es/t-rfpred/method>>.

9. PŘEHLED VLASTNÍCH PUBLIKACÍ

Impaktovaná publikace

Svobodová, H., **Ryšavá, H.**, Pavlík, M., Šaman, D., Drašar, P., Wimmer, Z., 2010. Steroid conjugates: Synthesis and preliminary biological testing of pro-juvenoids. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 18, 8194-8203.

Pavlík, M., **Ryšavá, H.**, Wimmer, Z., 2010. Metabolismus hmyzích ekdysteroidů a význam střevní mikroflóry hmyzu. *Chemické listy* 104, 831-837.

Vědecká publikace v recenzovaném časopise

Ryšavá, H., Svobodová, H., Jurček, O., Pavlík, M., Wimmer, Z., Ryšánek, P., 2010. Vývoj nových typů bioracionálních insekticidů. In: Badalíkova B. [ed.], *Vědecká příloha časopisu Úroda – „Aktuální poznatky v pěstování, šlechtění, ochraně rostlin a zpracování produktů“*, Výzkumný ústav pčnicinářský, spol. s r.o. Troubsko, 347-350.

Ryšavá, H., Pavlík, M., Wimmer, Z., Jurček, O., Svobodová, H., Ryšánek, P., 2009. Biologická účinnost nových typů analogů juvenilních hormonů testovaných na ruměnici pospolné (*Pyrrhocoris apterus*). In: Badalíkova B. [ed.], *Vědecká příloha časopisu Úroda – „Aktuální poznatky v pěstování, šlechtění, ochraně rostlin a zpracování produktů“*, Výzkumný ústav pčnicinářský, spol. s r.o. Troubsko, 209-212.

Patentová přihláška

Wimmer Z., Svobodová H., **Ryšavá H.**, Pavlík M.: Konjugáty fytosterolů, rostlinných steroidů, s juvenoidními alkoholy a způsob jejich výroby a použití. Patentová přihláška ČR, PV-2010-623 (18.8.2010).

Příspěvek ve sborníku z vědecké konference (úplná struktura vědeckého článku)

Ryšavá, H., Jurček, O., Svobodová, H., Pavlík, M., Wimmer, Z., Ryšánek, P., 2010. Insect juvenile hormone analogues as environmentally safe pest management agents. *UCOLIS 2010- University Conference in Life Sciences – Proceedings.*, Prague, 143-147.

Ryšavá, H., Štursa, P., Kurzawová, V., Pavlík, M., Wimmer, Z., Macková, M., Ryšánek, P., 2010. Identifikace kultivovatelných střevních bakterií ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus*). Sborník recenzovaných příspěvků. Studentská vědecká konference 2010. *Věda má budoucnost. Přírodovědecká fakulta Ostravské univerzity v Ostravě*, 62-65.

Ryšavá, H., Pavlík, M., Wimmer, Z., Ryšánek, P., 2008. Testování biologické účinnosti juvenogenů na modelovém organismu ruměnici pospolné (*Pyrrhocoris apterus*). Sborník konference doktorandů oboru ochrana rostlin 2008, ČZU Praha, 60-66.

Abstrakt ve sborníku z mezinárodní vědecké konference

Ryšavá, H., Štursa, P., Kurzawová, V., Pavlík, M., Wimmer, Z., Macková, M., Ryšánek, P., 2010. Role and identification of gut symbiotic bacteria of the red firebug *Pyrrhocoris apterus*. Programme and Book of Abstracts. IXth European Congress of Entomology. Budapest, Hungary, 201.

Ryšavá, H., Jurček, O., Svobodová, H., Pavlík, M., Wimmer, Z., Ryšánek, P., 2010. Efficacy of the novel juvenogen esters on the red firebug (*Pyrrhocoris apterus*). Programme and Book of Abstracts. IXth European Congress of Entomology. Budapest, Hungary, 134.

Ryšavá, H., Pavlík, M., Wimmer, Z., Ryšánek, P., 2009. Bioassays of juvenile hormone analogs on the red firebug *Pyrrhocoris apterus*. Abstract. VI-th International Conference on Arthropods: Chemical, Physiological, Biotechnological and Environmental Aspects. Ochotnica Dolna, Poland. Book of Abstracts, 73.

Ryšavá, H., Pavlík, M., Wimmer, Z., Ryšánek, P., 2009. Action of selected juvenoids and juvenogens on the red firebug *Pyrrhocoris apterus*. XVIII. Česká a slovenská konference o ochraně rostlin, MZLU v Brně. Sborník abstraktů, 170.

Přehled udělených grantů

Ryšavá, H., 2010. Identifikace kultivovatelných střevních bakterií ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus*). SGS FAPPZ 21180/1312/3132.

Ryšavá, H., 2009. Biologická účinnost nových esterových juvenogenů. SGS FAPPZ 21180/1312/3129.

Ryšavá, H., 2008. Testování juvenogenů na modelovém organismu ruměnici pospolné (*Pyrrhocoris apterus*). SGS FAPPZ 21180/1312/3132.

Další publikační činnost

Ryšavá, H., Mazáková, J., 2007. Využití molekulárně – biologických metod při determinaci pohlavních typů patogena *Phytophthora infestans*. Sborník konference doktorandů oboru ochrana rostlin 2007, ČZU Praha, 105-110.

Ryšavá, H., 2008. Nové poznatky v epidemiologii plísně bramboru. Reporter Agropolchem 4, 1-2.

PŘÍLOHY

10. SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Stupnice hodnocení vlivu analogů JH na metamorfózu *P. apterus*

Příloha 2: Strukturní vzorce karbamátových juvenogenů

Příloha 3: Strukturní vzorce alkoholových juvenogenů

Příloha 4: Složení kultivačních médií

Příloha 5: Ukázky kultivace bakterií na pevných médiích

Příloha 6: Přehled komerčních přípravků na bázi JHA

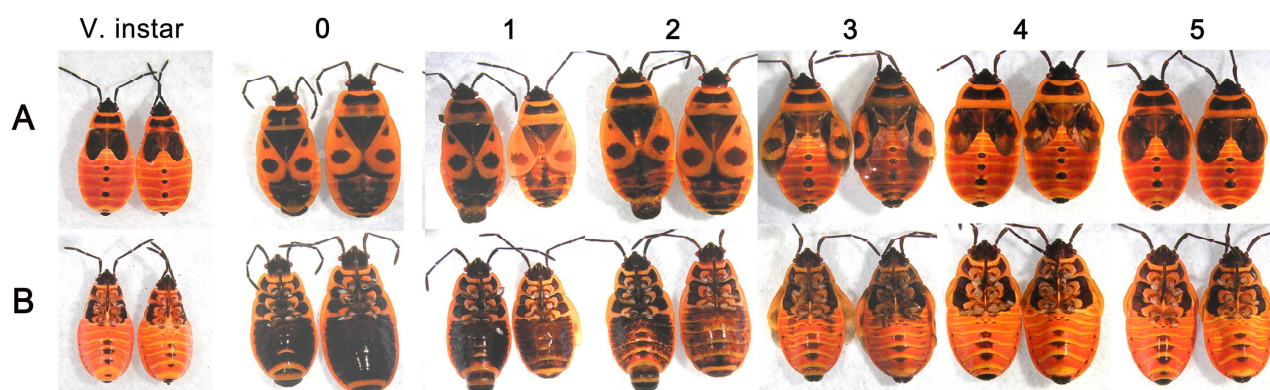
Příloha 7: Porovnání toxicity komerčních insekticidů

Příloha 8: Výsledky frangmentační analýzy

Příloha 1: Stupnice hodnocení vlivu analogů JH na metamorfózu P. apterus

A – dorsum, B – ventrum. Samci umístěni vlevo a samice vpravo v každém páru. 0 - normální dospělec, 1 - 4 adultoidi a 5 – supernymfy (dokonalé nadpočetné instary).

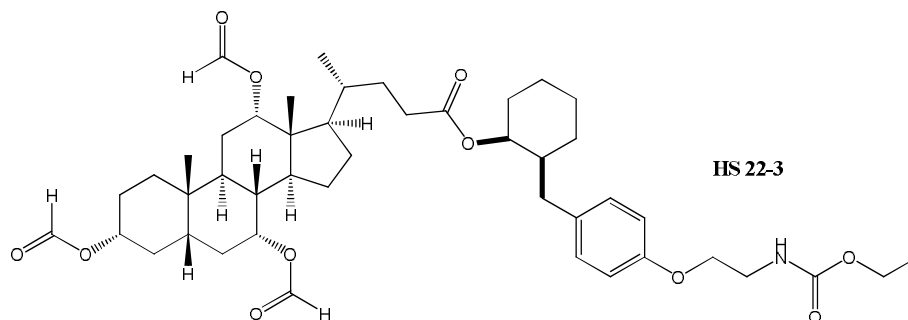
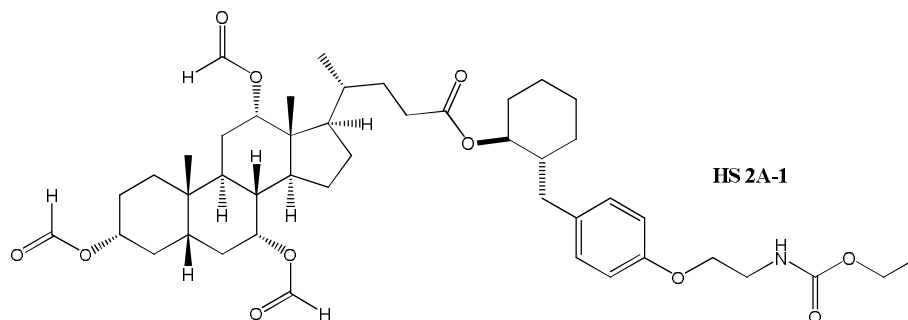
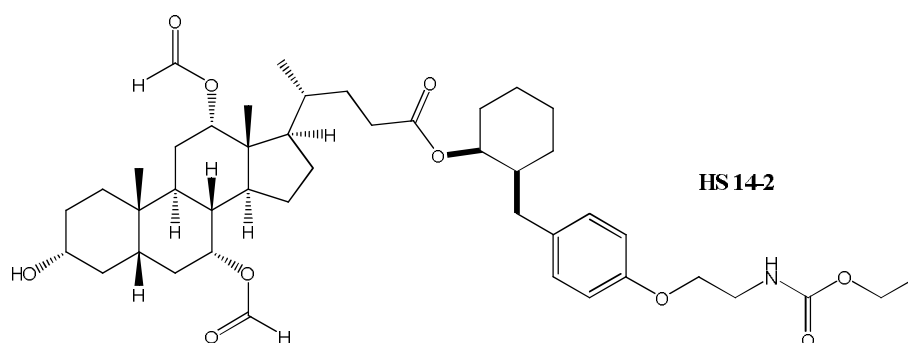
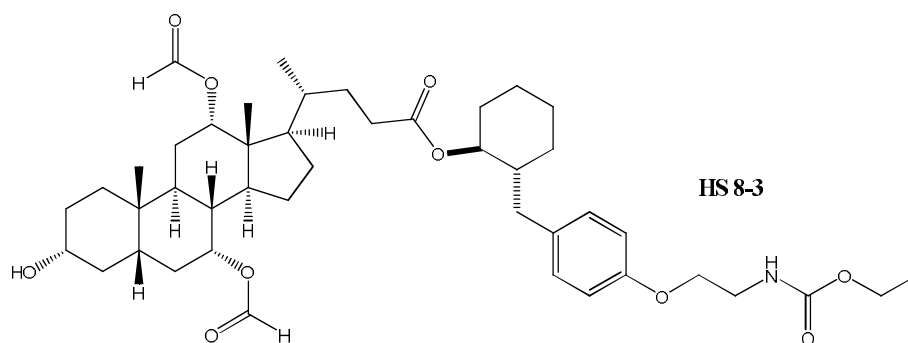
Pro srovnání jsou zařazeni i jedinci V. instaru.

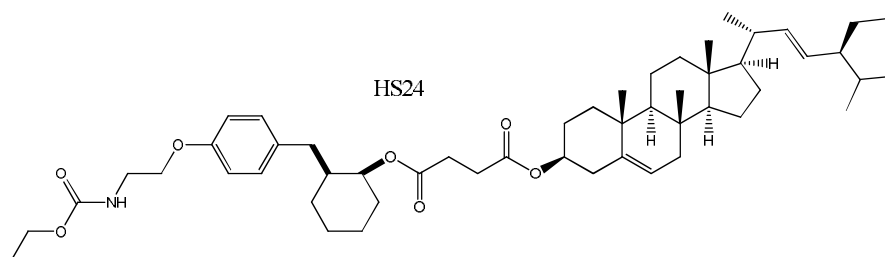
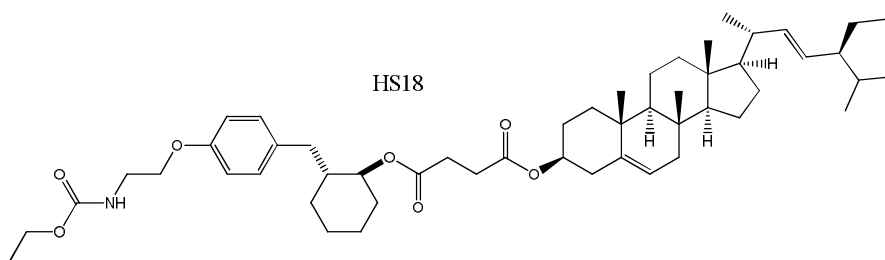


Jedlička, P., 2008. Juvenoidy a juvenogeny – možnosti jejich využití v ochraně rostlin.

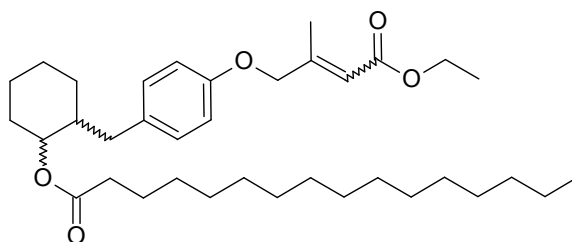
Kandidátská disertační práce, Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Praha, s. 17.

Příloha 2: Strukturní vzorce karbamátových juvenogenů

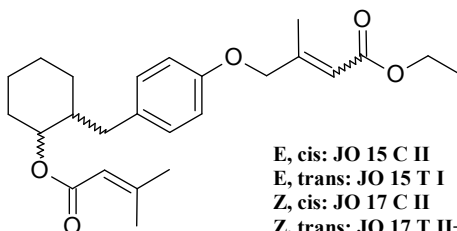




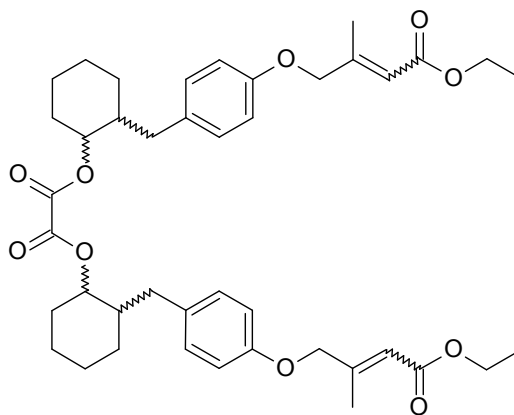
Příloha 3: Strukturní vzorce alkoholových juvenogenů



E, cis: JO 11 C1 IV
 E, trans: JO 11 T III
 Z, cis: JO 14 C II
 Z, trans: JO 14 T I



E, cis: JO 15 C II
 E, trans: JO 15 T I
 Z, cis: JO 17 C II
 Z, trans: JO 17 T II+ III



E, cis: JO 27 Ec
 E, trans: JO 25 II Et
 Z, cis: JO 27 Zc
 Z, trans: JO27 Zt

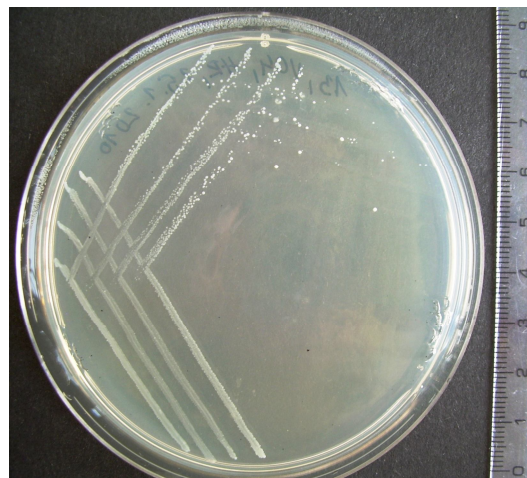
Příloha 4: Složení kultivačních médií

Médium	Výrobce	Složení, příprava
Luria-Bertani (LB) médium	Oxoid, UK	10 g Trypton 5 g Yeast extract 10 g NaCl Rozpustit 25 g agaru v 1000 ml destilované vody. Sterilace při tlaku 0,12 MPa a teplotě 121°C po dobu 20 minut.
Luria-Bertani (LB) agar	Oxoid, UK	10 g Trypton 5 g Yeast extract 10 g NaCl 22 g Agar Rozpustit 35 g agaru v 1000 ml destilované vody. Sterilace při tlaku 0,12 MPa a teplotě 121°C po dobu 20 minut.
Plate Count Agar (PCA)	HiMedia, India	5 g Casein enzymatic hydrolysate 2,5 g Yeast extract 1 g glukosa 15 g Agar Rozpustit 23,5 g agaru v 1000 ml destilované vody. Sterilace při tlaku 0,12 MPa a teplotě 121°C po dobu 20 minut.

Příloha 5: Ukázky kultivace bakterií na pevných médiích



Pseudomonas sp.



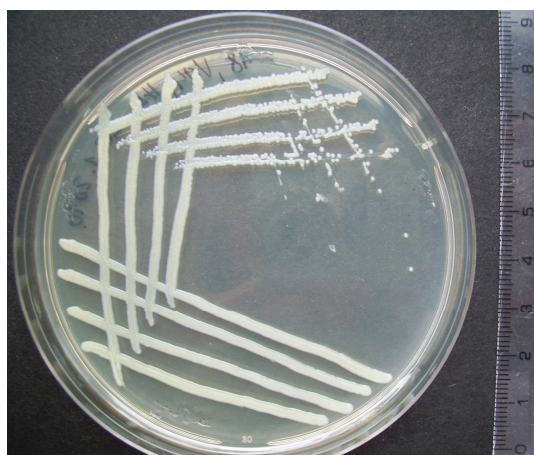
Lactococcus lactis



Chryseobacterium piscium



Delftia acidovorans



Stenotrophomonas maltophilia



Klebsiella pneumoniae

Příloha 6: Přehled komerčních přípravků na bázi JHA

Přípravek	Účinná látka	Cílový škůdce	Dávkování
Enstar	Kinopren	Stejnokřídlí na okrasných rostlinách ve sklenicích	Postřik 0,1 g/m ²
Altosid	Methopren	Larvy a kukly komárů	280 g/ha a více
		Mouchy a ovádi na pastvinách a ve stájích	0,2 % v blocích soli pro liz
Apex Lacorex	Methopren	Larvy dvoukřídlých v žampionárnách	1 g/m ²
Kabat	Methopren	Škůdci ve skladech tabáku	Postřik (10 ppm)
Dianex Diacon	Methopren	Škůdci ve skladech arašídů	Aerosol (21 mg/m ³)
			Postřik (1,12 g/100 kg)
Pharorid Lafarex	Methopren	Synantropní mravenci	0,5 % v nástraze
Manta	Methopren	Zvýšení produkce hedvábí	Postřik (2,5 ppm)
Precor	Methopren	Blechy	Postřik koberců
Raid Flea Killer II Plus	Methopren + Pyrethroid	Blechy	Postřik koberců
Gencor	Hydropren	Synantropní švábi	Postřik nebo aerosol (0,03 g/m ²)
Gencor Plus	Hydropren 0,6% + Permetrin 0,25%		
Logic	Fenoxycarb	Synantropní mravenci	1 % v nástraze (5-10 mg a.i./kolonii)
Insegar	Fenoxycarb	Obaleči a červci v sadech	2 x 600 g/ha, 2-3 kg/ha
Pioctyl	Fenoxycarb	Larvy a kukly komárů	50 g/ha a více
Varikill	Fenoxycarb	Skladištní škůdci	Postřik
Duowin contact	Pyriproxifen + Permethrin	Blechy	0,5 ml/kg ž.hm.

Němec, V., 1993. Juvenoids: from the research to practical use. A short review. Bollettino dell'Istituto di Entomologia "G. Grandi" Università Bologna 48, 67-74.

Příloha 7: Porovnání toxicity komerčních insekticidů

Insekticid	Skupina	LD50 mg/kg *
Carbofuran	Karbamáty	8
Parathion	Organofosfáty	2 - 30
Phosalone	Organofosfáty	120 - 180
Pirimicarb	Karbamáty	150
DDT	Chlor.uhlovodíky	150 - 300
Dimethoate	Organofosfáty	500-600
Lambda cyhalothrin	Pyretroidy	400
Fenitrothion	Organofosfáty	800
Malathion	Organofosfáty	1 400-1 900
Deltamethrin	Pyretroidy	4 000
Fenoxycarb	JHA	10 000
Methoprene	JHA	34 600

*Střední letální dávka pro krys v mg na kg tělesné hmotnosti

Miller, T. L. The EXtension TOXicology NETwork [on-line]. [cit. 2010-03-20].

Dostupné z <http://extoxnet.orst.edu>

Příloha 8: Výsledky frangmentační analýzy

