

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
MAGISTERSKÁ DIPLOMOVÁ PRÁCE



Adipokinetické hormony a energetický metabolismus lýkožrouta
smrkového (*Ips typographus* L.)

Bc. MARTINA MORAVCOVÁ
ČESKÉ BUDĚJOVICE
2012

VEDOUCÍ PRÁCE:
RNDr. Petr Doležal PhD.

Magisterská diplomová práce

Moravcová M., (2012): Adipokinetické hormony a energetický metabolismus lýkožrouta smrkového (*Ips typographus* L.) [Adipokinetic hormones and the energetic metabolism in the spruce bark beetle (*Ips typographus* L.) Master thesis, in czech] - 46 p., Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace: The aim of the thesis was to elucidate the occurrence of adipokinetic hormones in the spruce bark beetle (*Ips typographus*) by competitive ELISA and LC/MS analysis. Total lipid and carbohydrate content as well as levels of glucose, trehalose and glycogen were measured to characterize physiological changes during particular phases of the life cycle.

Tato práce je součástí řešení projektu financovaného grantem GAČR 522/08/P600, smlouva 08/2008 Grantové služby státního podniku Lesy ČR, s.p. a GAJU 04-062/20110P.

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Ráda bych na tomto místě upřímně poděkovala svému školiteli Petru Doležalovi za ochotu, odborné vedení práce, nespočet cenných připomínek a hlavně trpělivost. Dále patří můj dík všem z laboratoře, kteří mi jakkoliv pomohli během práce, konkrétně Honzíkovi, Boříkovi a Maky. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodině za podporu během celého studia.

1 Úvod.....	1
1.1 Lýkožrout smrkový.....	1
1.1.1 Životní cyklus.....	2
1.1.2 Přezimování a diapauza.....	4
1.2 Endokrinní soustava hmyzu.....	6
1.2.1 Adipokinetické hormony.....	6
1.2.2 AKH a mobilizace energetických zásob.....	7
1.2.2.1 Mobilizace lipidů (Obr. 1).....	8
1.2.2.2 Mobilizace glycidů (Obr. 2).....	8
1.2.2.3 Mobilizace prolinu (Obr. 3).....	9
1.3 Energetické zásoby.....	10
2 Cíle práce.....	13
3 Materiály a metody.....	13
3.1 Popis lokality a odběr vzorků.....	13
3.2 Stanovení adipokinetických hormonů.....	14
3.2.1 Kvantitativní stanovení AKH.....	14
3.2.1.1 Získání neurosekretorického komplexu.....	14
3.2.1.2 Příprava mozkových extraktů.....	14
3.2.1.3 Izolace adipokinetického hormonu z připraveného extraktu CNS.....	14
3.2.1.4 ELISA – kvantitativní stanovení AKH.....	15
3.2.2 Adipokinetická odpověď na extrakt z mozků <i>Ips typographus</i> u <i>Pyrrhocoris apterus</i> měřená sulfo-fosfovanilinovým testem.....	17
3.2.3 Strukturní a hmotnostní stanovení AKH.....	18
3.3 Celkový obsah lipidů.....	18
3.4 Celkový obsah glycidů.....	19
3.5 Stanovení jednotlivých cukerných zásob.....	19
3.5.1 Stanovení glukózy pomocí Glucose (GO) Assay Kit (SIGMA).....	20
3.5.2 Stanovení trehalózy pomocí trehalázy a Glucose (GO) Assay Kit (SIGMA).....	21
3.5.3 Stanovení glykogenu pomocí amyloglukosidázy a Glucose (GO) Assay Kit (SIGMA).....	21
3.6 Statistické zpracování výsledků.....	22
4 Výsledky.....	23
4.1 Stanovení adipokinetických hormonů.....	23
4.2 Celkový obsah lipidů.....	25
4.3 Celkový obsah glycidů.....	26
4.4 Celkový obsah vody.....	27
4.5 Hlavní cukerné zásoby.....	28
4.5.1 Celkové množství glukózy.....	28
4.5.2 Celkové množství trehalózy.....	29
4.5.3 Celkové množství glykogenu.....	30
5 Diskuze.....	32
5.1 Adipokinetické hormony.....	32
5.2 Celkové energetické zásoby.....	33
6 Závěr.....	37
7 Použitá literatura.....	38
8 Přílohy.....	42

1 Úvod

1.1 Lýkožrout smrkový

Lýkožrout smrkový se řadí mezi nejzávažnější škůdce smrkových porostů ve střední Evropě. Následky jeho přemnožení v hospodářských smrčinách i lesích národních parků a přirozená úloha v lesním ekosystému patří mezi mediálně často diskutovaná témata, zejména v kontextu ekonomických škod a estetického vnímání krajinného rázu.

Taxonomicky je lýkožrout smrkový (*Ips typographus*) zařazen do řádu brouci (*Coleoptera*), čeledi nosatcovitých (*Curculionidae*), podčeledi kůrovcovitých (*Scolytinae*). Dospělci lýkožrouta smrkového jsou hnědočerně zbarvení, matně lesklí s délkou těla přibližně 4,2 – 5,5 mm a šířce 1,9 mm. Povrch celého těla je pokryt jemnými žlutými chloupky, což spolu s ozubením oploštělého konce krovek patří k hlavním morfologickým znakům, které jej odlišují od dalších zástupců rodu *Ips* (Skuhravý, 2002). U těchto brouků není zřetelný pohlavní dimorfismus na vnějších morfologických znacích.

Ve střední Evropě je hlavní hostitelskou dřevinou lýkožrouta smrkového (dále jen lýkožrout) smrk ztepilý (*Picea abies*), avšak na severu Evropy byl pozorován i na borovici lesní (*Pinus silvestris*), na Balkánském poloostrově jiných druhů smrku (*Picea omorica*, *Picea obovata*) a vzácně byl žír zaznamenán i na limbě (*Pinus sibirica*) a jedli (*Abies sibirica*). Smrk jako hostitelská dřevina skýtá pro lýkožrouta optimální podmínky pro vývoj od stáří 60 až 100 let. Jeho lýko je dostatečně silné (4 – 10 mm) a poskytuje vhodné prostředí pro založení nové generace. Brouci si přednostně vybírají stromy poškozené či oslabené, ať již biotickými (jiné druhy škůdců, lidská činnost) či abiotickými faktory (Zumr, 1995). Nejčastější příčinou přemnožení v hospodářských lesích je zpravidla zanedbání ochranných opatření proti kůrovcům na smrku, případně pozdní zpracování již napadeného materiálu či pozdní odvoz atraktivního a pro vývoj vhodného (např. polomového) dřeva z porostu. V posledních třiceti letech mají na populační dynamiku lýkožrouta nezanedbatelný vliv i globální změny klimatu, zejména s ohledem na četnost výskytu extrémních meteorologických událostí, jako jsou vichřice či sucho (IPCC, 2007), které oslabují vitalitu stromů. Nárůst průměrných ročních teplot navíc vede i k časnějšímu rojení na jaře a rychlejšímu vývoji dceřiných generací (Faccoli, 2009). Strom, který je poškozen či trpí nedostatkem vody, se nedokáže napadení lýkožroutem účinně bránit. Jeho obrana spočívá ve vylévání pryskyřice, přičemž závisí na její viskozitě, která klesá s nedostatkem vody. Na rozdíl od většiny druhů jehličnanů je pro smrk ztepilý

typické, že v první fázi náletu vylévá pouze málo pryskyřice a s dalšími útoky se její množství rapidně snižuje (Christiansen a kol., 1987).

1.1.1 Životní cyklus

Životní cyklus lýkožrouta je do značné míry ovlivněn teplotou a délkou dne. Teplotně podmíněné je rozmnožování, počet založených generací, letová aktivita i mortalita během zimního období. Délka dne naopak ovlivňuje přechod od aktivního vývoje k diapauznímu (viz níže). Nejkratší doba vývoje nové generace se udává jako 6 týdnů při optimální teplotě 29°C, nejdelší je pak 10 týdnů při spodním teplotním prahu aktivního pohybu jedinců, který činí 14°C (Zumr, 1995).

V podmínkách střední Evropy lýkožrouti založí zpravidla dvě dceřiné generace do roka v nižších a středních polohách, v horských oblastech pak jednu úplnou a dle počasí v daném roce jednu neúplnou generaci, která přechází do diapauzy a přezimuje, aniž by došlo k rojení. V severní Evropě vlivem nižších teplot, kratší vegetační sezóny a lokálně i tzv. obligatorní diapauzy dokončí vývoj pouze jedna generace, zatímco pro středomoří jsou obvyklé generace až tři.

Jarní rojení je hromadné a začíná obvykle koncem dubna či začátkem května. V posledních letech se setkáváme s jarním rojením již začátkem dubna, díky mírnějším zimám a nadprůměrným jarním teplotám (Faccoli, 2009). První brouci, kteří vylétávají ze svého zimoviště, jsou nejčastěji samci a jsou označováni jako pionýrští brouci. Pro směřování náletu jsou klíčová tzv. primární atraktanta vylučovaná samotným smrkem. Jde především o monoterpeny (α -pinen, myrcen, β -pinen) a etanol, který je produkován mikroorganismy v rozkládajícím se dřevě či samotným stromem při stresu. Mimo funkce primárních atraktant ovlivňují tyto sloučeniny i odpověď brouků na agregační feromony (Byers, 1995), které jsou vylučovány po proniknutí pod kůru stromu. Agregační feromony jsou metabolizovány *de novo* z hostitelských monoterpenů, případně produkovány mikroorganismy asociovanými s brouky, či kombinací obou variant (Erbilgin a kol., 2007). Mezi hlavní nástroje feromonové komunikace lýkožroutů patří látky jako *cis*-verbenol, *trans*-verbenol, ipsenol, ipsdienol, 2-methyl-3-buten-2-ol a další, kterými ovlivňují ostatní jedince svého duhu (ne všechny jsou považovány za agregační, některé slouží i jako odpudivé). Komunikace je založena na různém poměru vylučovaných složek. Například výrazný rozdíl byl zaznamenán mezi samci, kteří vyhloubili snubní komůrku a samci kteří se již spářili. Laboratorním pokusem bylo prokázáno, že vylučování agregačních feromonů samcem začíná velmi brzy po napadení stromu a maximální aktivita nastává po 4-6

hodinách, jejich následný prudký pokles je zapříčiněn přiletem samičky (Schlyter a kol., 1987).

Ne všichni brouci jsou po přezimování připraveni k páření a musí prodělat tzv. úživný žír, při němž dochází ke zrání pohlavních orgánů a rozvoji létací svaloviny. Pokud není v místě zimoviště dostatečné množství vhodné potravy, brouci přeletují na nejbližší stromy. Pokud jsou již pohlavně dozralí (samci dozrávají dříve než samice), vyhledají vhodné stanoviště pro založení nové generace (Zumr, 1995). Samec se obvykle páří se dvěma až třemi samičkami (při vyšší populační hustotě až pěti). Samice po oplodnění začnou vykusovat vertikální matečné chodby a do jamek po obou stranách kladou vajíčka. Velikost snůšky v prvním ovariálním cyklu je cca 60-80 vajíček, z nichž se za 6-18 dní začínají líhnout larvy, které vykusují chodby kolmo na chodbu matečnou. Na konci larválního vývoje, který trvá 11-30 dní, vykouše larva posledního třetího instaru na konci chodby komůrku, ve které se kuklí. Z kukly se po 6-17 dnech vylíhne mladý brouk, jehož kutikula je zpočátku měkká a nevybarvená. Čerstvě svlečená imága nejsou okamžitě schopna rozmnožování. Po částečném vytvrnutí a zabarvení kutikuly musí lýkožrouti prodělat zralostní žír, během kterého jim dozrává letová svalovina a pohlavní orgány. Období pohlavního dospívání trvá dva až tři týdny, během kterých brouci vyhledávají nepravidelně se vinoucí chodbu (Zumr, 1985, Zumr, 1995). Samicím musí během zralostního žíru dozrát ovária, zatímco samci mají zralé pohlavní orgány již po imaginální ecdysi a zralostní žír slouží především k rozvoji létacích svalů před rojením. Samci díky časně zralosti pohlavních orgánů dokončí žír dříve, což vysvětluje jejich převahu na počátku rojení (Doležal, 2002).

Letní rojení bývá oproti jarnímu více rozptýlené a můžeme ho pozorovat od poloviny června do konce července v závislosti na počasí a stanovišti, kde se brouci vyvíjí. Uplatňují se zde vlivy jako nadmořská výška či mikroklima daného stanoviště (Zumr, 1995). Po každém z hlavních rojení (jarní, letní) nastává tzv. sesterské přerojení, ke kterému dochází zpravidla po 2-3 týdnech. Samice před ním prodělávají tzv. regenerační žír a poté bez další kopulace pokračují v kladení v novém požerku, který v závislosti na lokálních podmínkách mohou založit na stejném stromě nebo v případě silného narušení lýka po přeletu na jiný strom. Takový požerek je typický absencí snubní komůrky. Byl však pozorován i jiný typ sesterského přerojení, během něhož k páření dochází. Požerek je pak standardní se snubní komůrkou a mateřskou chodbou, zpravidla však dochází k páření pouze s jednou samicí (Zahradník & Geráková, 2010). Sesterské přerojení je vysvětlováno několika hypotézami (Kirkendall, 1983).

1. *'Bankruptcy'* hypotéza – úspěšné přerojení zajistí dostatek živin pro samici i její potomstvo. Ačkoli pravděpodobnost úmrtí samice je při něm velmi vysoká, vynakládá část své energie na vyhledání nového vhodného stanoviště pro obnovení energetických rezerv v tukovém tělese. S tímto jevem se setkáváme u druhů, které nežijí v čerstvém nebo žijícím hostiteli, a preferují odumřelý materiál.
2. *'Greener pastures'* hypotéza – samice vyhledává nové vhodné místo pro snůšku, aby zajistila dostatečnou nutriční zásobu pro své potomky. Tato hypotéza platí pro druhy, které prodělávají vývoj v čerstvém materiálu, a snížení jeho kvality má drastické následky na vývoj potomstva. Změna hostitele s sebou nese i další výhody, například nižší riziko napadení patogenem či predátorem.
3. *'Overcrowding'* hypotéza – k přerojení dochází následkem vysoké populační hustoty. Vysoký počet larev z první fáze náletu může ohrozit larvy ze setreského přerojení. Dochází totiž k rychlejšímu vyčerpání potravního zdroje a později i ke vzájemnému kanibalismu.

1.1.2 Přezimování a diapauza

Dospělci a v ojedinělých případech i larvy a kukly překonávají nepříznivé zimní období pod kůrou stromů. Je-li však předchozím žírem lýko příliš narušeno, přeletují lýkožrouti ještě koncem vegetační sezóny na jiný strom, případně zalézají do hrabanky v bezprostředním okolí původního stromu. Vhodné místo pro přezimování znamená nejen snížení rizika úhynu vlivem nadměrné vlhkosti a houbových patogenů, ale v případě přezimování pod kůrou může představovat i dostatek vhodné potravy pro průběžné doplňování energetických zásob během přezimování a jarní regenerační žíry. Přesto je mortalita během zimního období poměrně vysoká a zimu nepřežije až 49 % dospělců, 91 % larev a 86 % kukel (Faccoli, 2002).

Dospělí lýkožrouti přezimují ve stavu tzv. imaginální diapauzy. Jedná se o alternativní vývojovou cestu, která hmyzu umožňuje překonat nepříznivé zimní období a zahrnuje změny na všech úrovních, od změn genové exprese až behaviorální. Primárním stimulem pro vstup do diapauzy je u lýkožroutů délka dne. V laboratorních podmínkách bylo prokázáno, že kritická délka světelné části dne, při níž diapauzní vývoj nastoupí nadpoloviční část populace, je přibližně 14,7 hodin (Doležal & Sehnal, 2007a). Tato délka

dne u nás odpovídá zhruba polovině srpna. Od této doby se v přírodě brouci postupně přestávají rozmnožovat, snižují letovou aktivitu a intenzivním žírem spojeným s ukládáním energetických zásob se připravují na přezimování. Dochází k atrofii létacích svalů a pohlavních orgánů, a k rozvoji tukového tělesa (Doležal, 2002; Doležal & Sehnal, 2007b). Diapauza bývá ukončena v polovině prosince. Brouci přechází do stádia tzv. post-diapauzní kviescence, přičemž přesný mechanismus je neznámý. Lýkožrouti začínají být opět aktivní, přijímají potravu, ale do nástupu teplých jarních dní se nerozmnožují a čekají na vhodné podmínky pro zahájení jarního rojení a následného založení nové generace.

Diapauzu můžeme dělit do tří fází – pre-diapauza, diapauza a post-diapauza. Během pre-diapauzy zprvu zdánlivě normálně pokračuje vývoj, ale díky zvyšujícímu se počtu podnětů z okolí (např. fotoperioda, teplota, vyčerpání zdroje živin, kvalita potravy, atd.), které jsou hmyzem citlivě vnímány a upozorňují na blížící se nepříznivé období, přechází jedinci postupně do diapauzy. Vzhledem k tomu, že během diapauzy jedinci nepřijímají potravu, a pokud ano, pak jen ve velmi malém množství (Hahn & Denlinger, 2007), dochází během pre-diapauzy k ukládání většiny energetických zásob potřebných na překonání nepříznivého období. Ačkoliv většina hmyzu prodávajícího diapauzu využívá stejnou potravu během celého roku, forma energetických zásob u diapauzních a nediapauzních jedinců se výrazně liší. U diapauzních jedinců se vyskytuje mnohem více nenasycených mastných kyselin než u jedinců nediapauzních. Nenasycené mastné kyseliny jsou lépe zužitkovány během nízkých teplot a jsou spojovány s lepší adaptací na chladné období. Další zásobní látkou je glykogen, který má významnou funkci během diapauzy. Je přeměňován na glukózu a trehalózu, které jsou transportovány z tukového tělesa k aktivním tkáním, kde slouží k produkci energie nebo jsou metabolizovány na četné kryoprotektivní látky (Hahn & Denlinger, 2011). Období vlastní diapauzy je spojeno se změnami genové exprese, utlumením metabolismu, přerušením vývoje, absencí reprodukce a zpomalením fyziologických procesů. Po určité době dochází neznámým mechanismem k ukončení diapauzy, i když vnější podmínky nejsou ještě ani zdaleka vhodné pro obnovení normálního vývoje, a hmyz se nadále nachází ve stavu tzv. post-diapauzní kviescence. V této fázi se hmyz stává opět více aktivním, začíná přijímat potravu a dochází k opětovnému obnovení některých fyziologických funkcí. Během post-diapauzní kviescence je často hormonálně inhibován normální vývoj, což brání například předčasnému pokračování vývoje při krátkodobě zvýšených jarních teplotách (Košťál, 2006).

1.2 Endokrinní soustava hmyzu

Endokrinní soustava hmyzu je komplexní systém, který řídí celou řadu fyziologických a biochemických procesů, a je těsně spjat se soustavou nervovou. Oproti ní jsou však účinky endokrinní soustavy pomalejší a výrazně dlouhodobější. Hlavní úlohou těchto spolupracujících systémů je udržet stálé vnitřní prostředí.

Endokrinní soustava se vyvíjela v těsné součinnosti s nervovou, a proto nacházíme u hmyzu nejdokonalejší endokrinní systém ze všech bezobratlých. Mezi hlavní orgány s vnitřní sekrecí patří retrocerebrální komplex, který zahrnuje neurosekretorické buňky mozku, corpora cardiaca (CC), která slouží jako neurohemální orgán a jsou zde produkovány adipokinetické hormony a některé další neuropeptidy, a corpora allata (CA), ve kterých se syntetizuje juvenilní hormon. Prothorakální žlázy jsou dalším významným orgánem, v němž se produkují svlékací hormony – ekdysteroidy. V hmyzím těle se nachází mnoho dalších buněk s endokrinní funkcí, mezi které patří například endokrinní buňky střeva (funkce hormonů není zcela jasná, pravděpodobně se podílí na trávicích procesech), epitracheální buňky (produkují ETH – ecdysis triggering hormone - účastní se řízení svlékání) a neurosekretorické buňky ostatních ganglií (ganglia břišní nervové pásky, která vylučují řadu dalších neurohormonů s různou funkcí).

1.2.1 Adipokinetické hormony

Úroveň metabolismu je u hmyzu řízena endokrinní soustavou, přičemž hlavní vliv na energetickou část metabolismu mají tzv. adipokinetické hormony (AKH). Jedná se o jednu z nejlépe prozkoumaných hmyzích neuropeptidů, které patří do tzv. RPCH/AKH (red pigment concentrating hormone/adipokinetic hormone) rodiny. Dnes známe kolem 50 zástupců této rodiny u hmyzu a dva u korýšů (Gäde, 2009). Obecně se jedná o typicky stresové hormony, které stimulují katabolické reakce (mobilizace lipidů, cukrů či aminokyselin) a inhibují reakce syntetické. Mobilizují energetické rezervy pro okamžité řešení stresové situace a potlačují v daný okamžik méně důležité procesy. Jedná se však o hormony s tzv. pleiotropním účinkem, což znamená, že zasahují zároveň i do celé řady biochemických (aktivace lipázy, adenylátcyklázy, fosfolipázy C) a fyziologických procesů (stimulace srdečního rytmu, zvýšení svalového napětí, zvýšení imunitní odpovědi a další) (Kodrík, 2008).

Adipokinetické hormony jsou syntetizovány, skladovány a uvolňovány z corpora cardiaca. Jedná se o neurohemální orgán spojený s mozkem (viz výše). AKH se zpravidla

skládají z 8-10 aminokyselin, jsou na obou koncích blokovány (N-konec pyroglutamátem a C konec je amidován), na pozici 8 a 9 (je-li přítomna) se vyskytuje tryptofan a glycin, jsou často bez náboje a obsahují nejméně dvě aromatické aminokyseliny (ve většině případů fenylnalanin, ale někteří zástupci mají na pozici 4 tyrosin a tryptofan na pozici 8) (Gäde a kol., 1997).

1.2.2 AKH a mobilizace energetických zásob

Cílovou tkání pro adipokinetické hormony je tukové těleso. Zde působí na přeměnu zásobních látek, jako jsou glykogen a triglyceridy, na jejich transportní formy trehalózu a diglyceridy, které jsou uvolňovány do hemolymfy. U některých druhů hmyzu, převážně u brouků, stimulují syntézu prolinu (Gäde & Auerswald, 2002).

Regulace vylévání AKH z CC do hemolymfy během letu není zcela známá. Předpokládá se, že neurony ovlivňující sekreci AKH, jsou spojené v CNS s neurony řídicími let (Bloemen & Beenackers, 1985). Podle jiné teorie je uvolňování AKH z CC ovlivněno podněty z tarsálních senzil podrážděných při vzletu (Goldsworthy, 1983). Některé studie uvádějí, že by se mohlo jednat o vliv octopaminu (biogenní monoamin strukturně podobný noradrenalinu, slouží jako neurohormon, neuromodulátor a neurotransmiter u bezobratlých, účastní se téměř všech fyziologických procesů (Rozeder, 2001)), který je uvolňován v prvních minutách letu. U *Locusta migratoria* bylo pozorováno, že octopamin je uvolňován během prvních 10 minut letu a následně se jeho titer v hemolymfě snižuje. Díky jeho vlivu pozorujeme nárůst lipidů v hemolymfě, které jsou uvolňovány z tukového tělesa. Poté dochází ke zvyšování koncentrace adipokinetických hormonů, které způsobují druhý mohutnější nárůst lipidů v hemolymfě (Orchard a kol., 1993). Inkubace corpora cardiaca s octopaminem však nezpůsobila sekreci AKH. Je možné, že octopamin v hemolymfě, který omývá CC, má pozitivní modulační vliv na iniciaci uvolnění AKH (Passier a kol., 1995). Další vliv na uvolnění AKH z CC by mohla mít snížená hladina trehalózy či glukózy v hemolymfě, která se projeví během letu. Vzhledem k tomu, že cukry poskytují většinu energie pro létací svalovinu v počáteční fázi letu, kdy se jejich množství rapidně snižuje, a až následně dochází ke zvyšování hladiny lipidů v hemolymfě (Van der Horst a kol., 2001), má koncentrace cukrů vliv na uvolňování AKH. Je známo, že vysoká hladina trehalózy a/či glukózy inhibuje uvolňování lipidů z tukového tělesa, tato inhibice může být přerušena injekcí AKH. Z toho vyplývá, že inhibiční efekt trehalózy se dá vysvětlit jako inhibice uvolňování AKH. Vliv trehalózy a/či

glukózy je pravděpodobně dosažen přímo na úrovni corpora cardiaca (Vullings a kol., 1999).

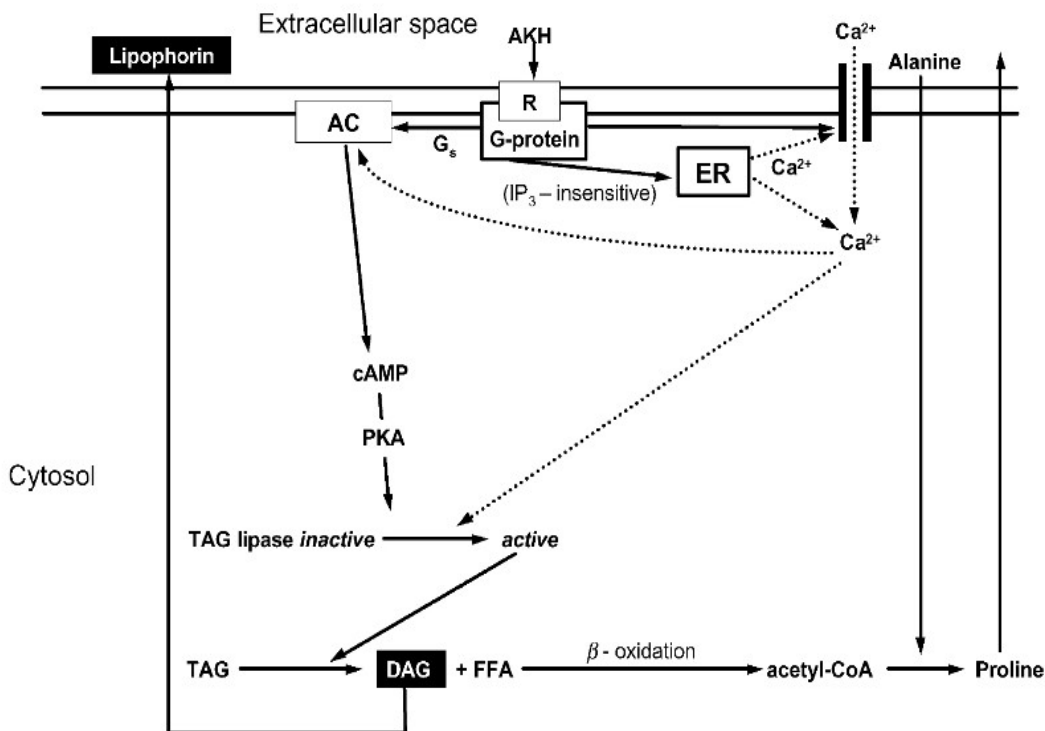
Mechanismus působení AKH na buněčné úrovni je substrátově specifický. AKH neprochází cytoplazmatickou membránou, využívají proto membránové receptory pro přenos signálu do buňky. Receptor interaguje s G-proteinem, což vede k převodu signálu na enzym, který produkuje sekundárního posla do cytoplazmy. (Gäde & Auerswald, 2003).

1.2.2.1 Mobilizace lipidů (Obr. 1)

Po navázání AKH na specifický receptor spojený s G-proteinem dojde ke konformační aktivaci adenylátcyklázy, přičemž dochází k produkci druhého posla (cAMP) závislého na extracelulárních Ca^{2+} iontech. cAMP spouští proteinkinázovou kaskádu, která ve finálním kroku katalyzuje fosforylaci cílové lipázy. Lipáza štěpí triacylglycerol na diacylglycerol (DAG), který je u hmyzu hlavní transportní formou tuků. DAG je po průchodu cytoplazmatickou membránou do hemolymfy vázán na prázdný lipoforinový nosič HDLp (high-density lipophorin), jenž se skládá z apolipoproteinu I a apolipoproteinu II. U některých druhů hmyzu je kapacita transportní jednotky zvýšena přítomností apolipoproteinu III. Vzniklá částice se nazývá LDLp (low-density lipophorin). LDLp přenáší DAG k cílovým buňkám (nejčastěji létacím svalům), kde se rozštěpí na glycerol a mastné kyseliny, které jsou po β -oxidaci hlavním zdrojem energie. Lipoforinový přenašeč se následně uvolní a je připraven pro další přenos molekuly DAG (Van der Horst a kol., 2001).

1.2.2.2 Mobilizace glycidů (Obr. 2)

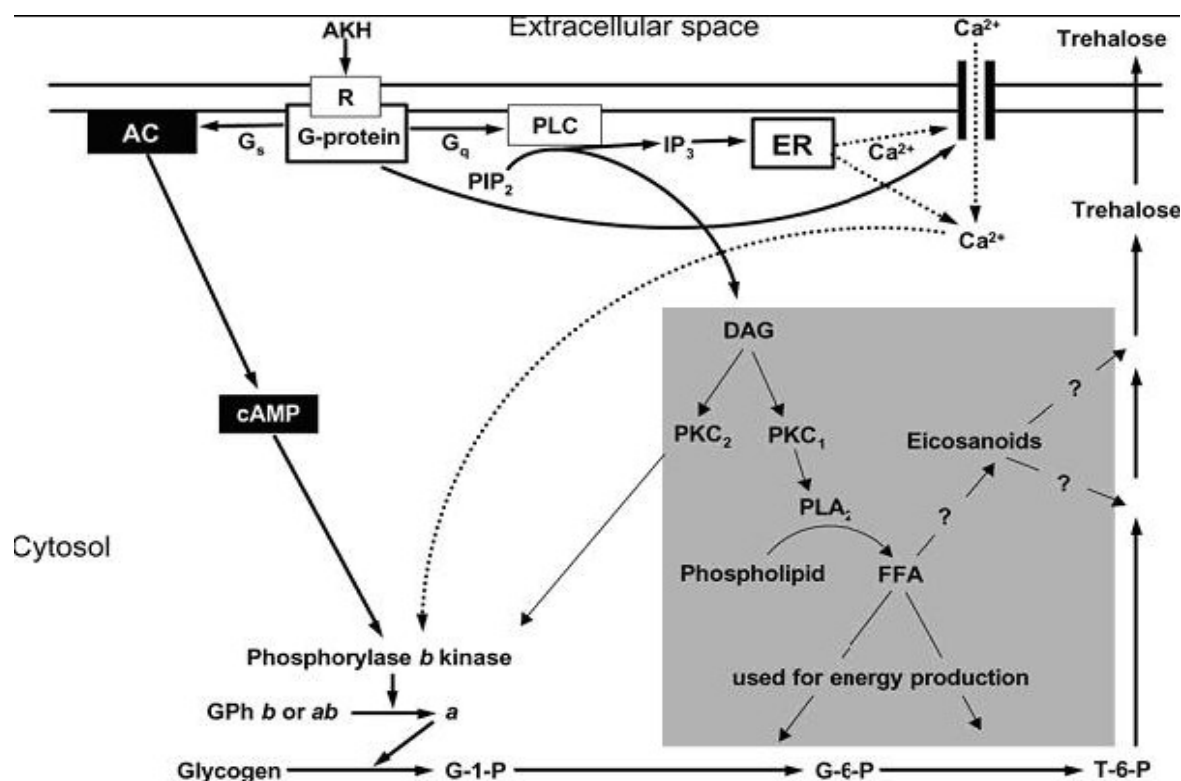
U některých hmyzích zástupců (např. švábi a brouci) funguje odlišný mechanismus, který vede k mobilizaci glycidů. Po aktivaci G-proteinu dojde ke stimulaci fosfolipázy C, která štěpí inositolový fosfolipid na inositoltrifosfát (IP_3) a DAG. IP_3 napomáhá uvolňování Ca^{2+} iontů z endoplazmatického retikula, které spolu s DAG spouští proteinkinázovou kaskádu. Jejím hlavním úkolem je aktivovat glykogen fosforylázu, která štěpí glykogen na glukózu. Ta se přeměňuje na trehalózu (D-glukopyranosyl-D-glukopyranosid), která prochází přes membránové kanály a k přepravě k cílovým buňkám nevyužívá žádné přenašeče. Ve svalových buňkách se přeměňuje opět na glukózu, která je dále štěpena za vzniku potřebné energie.



Obr. 1 Mobilizace lipidů zprostředkovaná působením AKH. Zkratky: AC, adenylát cykláza; cAMP, cyklický adenosinmonofosfát; CoA, koenzym A; DAG, diacylglycerol; ER, endoplasmatické retikulum; FFA, volné mastné kyseliny; IP₃, inositoltrifosfát; PAK, protein kináza A; R, receptor; TAG, triacylglycerol. (Gäde & Auerswald, 2003)

1.2.2.3 Mobilizace prolinu (Obr. 3)

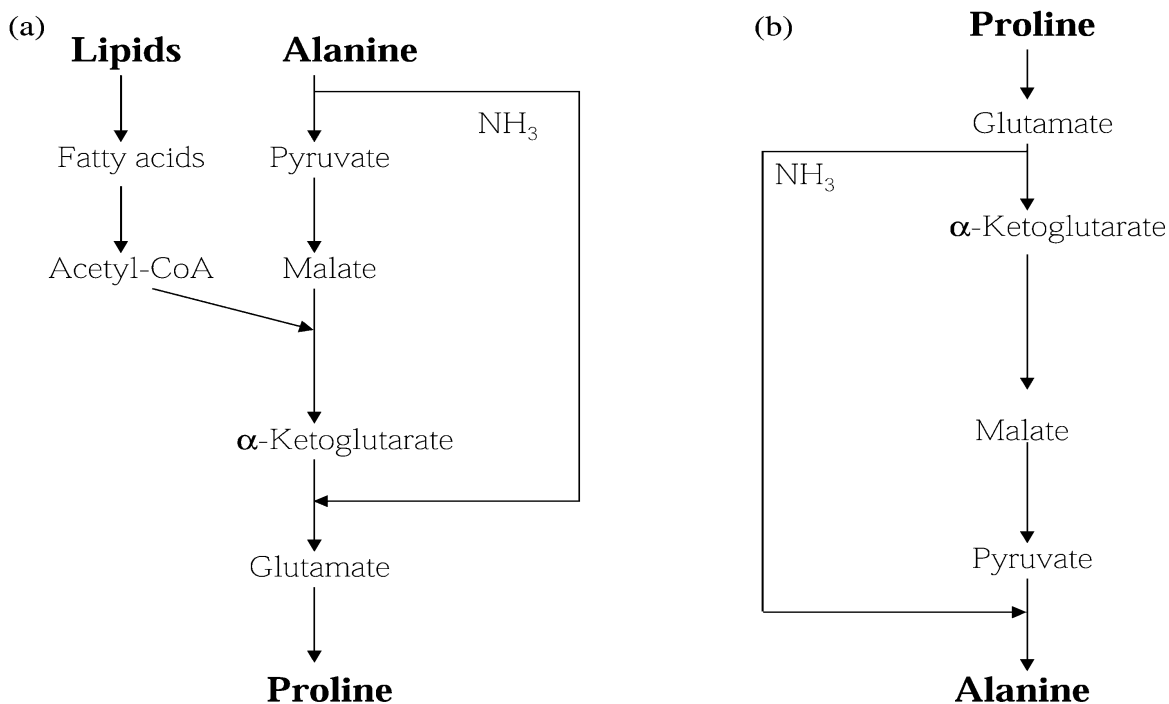
Jak bylo zmíněno výše, některé druhy brouků využívají jako energetický zdroj pro svůj let aminokyselinu prolin. Jak můžeme vidět na Obr. 1 produkce prolinu představuje boční větev lipidového metabolismu. AKH spouští kaskádu reakcí, jež vedou k aktivaci TAG lipázy a následnému zvýšení prolinu v hemolymfě. Prolin slouží k přenosu acetylové skupiny, která pochází z acetyl-CoA z tukového tělesa, k létacím svalům. Acetyl-CoA, který může pocházet z mastných kyselin, glukózy nebo aminokyselin, je nejdřív přeměňován na α -ketoglutarát, který je přeměněn v tukovém tělese na prolin. Následně je transportován k létacím svalům, kde je opět konvertován na α -ketoglutarát a vstupuje do citrátového cyklu, aby byl oxidován a produkoval ATP. Poté je přeměňován na alanin, jenž je přenášen zpět do tukového tělesa, kde je použit pro resyntézu prolinu (Scaraffia & Wells, 2003).



Obr. 2 Mobilizace glycidů zprostředkovaná působením AKH. Zkratky: AC, adenylát cykláza; cAMP, cyklický adenosinmonofosfát; DAG, diacylglycerol; ER, endoplasmatické retikulum; FFA, volné mastné kyseliny; G-1-P, glukóza-1-fosfát; G-6-P, glukóza-6-fosfát; GPh glykogen fosforyláza; IP₃, inositoltrifosfát; PIP₂, fosfatidylinositol bisfosfát; PAK, protein kináza A; PKC, protein kináza C; PLC, fosfolipáza C; R, receptor; T-6-P, trehalóza-6-fosfát. Bílým písmem v černém rámečku je naznačena cesta, která je platná pro saranče. (Gäde & Auerswald, 2003)

1.3 Energetické zásoby

Hmyz skladuje energetické zásoby v tukovém tělese. Tento orgán se svou funkcí v intermediárním metabolismu dá přirovnat k játrům. Jedná se o dynamickou tkáň účastnící se mnoha metabolických dějů a má mnoho funkcí. Hlavní z těchto funkcí je ukládání a distribuce živin v závislosti na energetických potřebách jedince. V tukovém tělese se také syntetizuje většina metabolitů a bílkovin cirkulujících v hemolymfě. Velké množství bílkovin, jako jsou zásobní proteiny, slouží jako rezervoár pro morfogenezi, tvorbu lipoforinových přenašečů nebo vitelogeninu (Arrese & Soulages, 2010)



Obr. 3 Metabolická cesta resyntézy prolinu z alaninu v tukovém tělese (a) a oxidace prolinu v létacím svalu (b). (Gäde & Auerswald, 2002)

Glukóza je skladována v tukovém tělese v podobě glykogenu. Jedná se o polymerní složku, jenž se skládá až z několika set molekul glukózy. Štěpení glykogenu je řízeno hormonálně (viz výše) a dochází k němu během hladovění či letu. Mnoho druhů hmyzu přeměňuje zásoby glykogenu na kryoprotektanty (např. glycerol), jako přímou odpověď na nízké teploty. Kryoprotektanty se sacharidovým základem mohou být metabolicky recyklovány na zásobní látky či katabolizovány, aby uspokojily vyšší energetickou náročnost (Hahn & Denlinger, 2007). Při zvýšené poptávce organismu po energii je glykogen metabolizován na trehalózu. Trehalóza je disacharid složený ze dvou molekul glukózy a jedná se o hlavní transportní formu glukózy v hemolymfě hmyzu. Trehalóza má několik funkcí: (1) energetická zásoba, (2) kryoprotektant, (3) stabilizátor proteinů při osmotickém či tepelném zatížení, (4) složka zpětnovazebného mechanismu řízení příjmu potravy (Thompson, 2003). Trehalóza se v hemolymfě neváže na přenašeče, nedokáže však volně procházet buněčnou membránou a využívá k tomu membránové transportéry. Nedávno byl popsán první trehalózový transportér u hmyzu (Kikawada a kol., 2007).

Mastné kyseliny jsou ukládány v tukovém tělese v podobě trygliceridů a jsou mobilizovány pro řadu účelů, mezi něž patří již zmíněná pozdní fáze letu, ukládání do vaječníků, udržení celkové metabolické aktivity ostatních tkání včetně tukového tělesa samotného, imunitní odpověď. Lipidy jsou hlavní složkou tukového tělesa, více než 90%

lipidů tvoří triglyceridy. Prvním krokem v mobilizaci mastných kyselin je působení lipáz na triglyceridy a jejich následné štěpení na diglyceridy, jenž jsou transportní složkou v hemolymfě. Ke svému transportu k cílové tkáni využívají lipoforinové přenašeče (Arrese & Soulages, 2010). Během diapauzy jsou lipidy hlavní energetickou zásobou pro hmyz. Tento fakt byl potvrzen měřením respiračního kvocientu (poměr mezi objemem vydýchaného CO₂ a přijatého O₂) u diapauzních jedinců mnoha druhů hmyzu. Naměřené hodnoty vycházely vždy velmi blízko poměru 0,7 (Hahn & Denlinger, 2007), který je typický pro spalování lipidů.

Bílkoviny jsou v tukovém tělese buď ukládány nebo nově syntetizovány. K hromadění zásobních bílkovin dochází ještě před nástupem diapauzy. Aminokyseliny, které jsou základní složkou bílkovin, mohou sloužit k zásobování intermediárního a respiračního udržovacího metabolismu během diapauzy, i post diapauzních funkcí jako je například obnovení vývoje (Hahn & Denlinger, 2007). Volné aminokyseliny mají u hmyzu různé funkce (1) prolin jako zdroj energie pro létací svalovinu (viz výše), (2) regulátory osmotického tlaku (Edwards, 1982), (3) kryoprotektivní účinky (Košťál a kol., 2011) a další.

2 Cíle práce

- Kvantitativně a kvalitativně stanovit přítomnost adipokinetických hormonů u lýkožrouta smrkového
- Sledovat změny energetických zásob během roku
- Zaměřit se na změny hlavních cukerných složek (glukóza, trehalóza a glykogen)

3 Materiály a metody

3.1 Popis lokality a odběr vzorků

Pro měření množství energetických zásob byli dospělci lýkožrouta smrkového bez rozdílu pohlaví (náhodný výběr) odebráni v měsíčních intervalech z lokality Hradiště u Vlachova Březí, která se nachází v nadmořské výšce 600 m. Průměrné stáří porostu na lokalitě je 80 let, stupeň zakmenění 8, převažující sklon svahu je jižní. Populace lýkožrouta se nachází ve stavu retrogradace. Na lokalitě jsou během vegetační sezóny rozmístěny feromonové lapače i lapáky, z nichž byli odebráni brouci pro laboratorní analýzy. V polovině srpna byly napadené stromové lapáky rozřezány na metrové výřezy a ponechány na lokalitě tak, aby je bylo možno odvážet i během zimního období. Během jarních a letních měsíců byli brouci odebráni přímo na lokalitě a převáženi v uzavíratelné nádobě na ledu do Českých Budějovic. V zimním období byly výřezy převáženy celé a následně odkorněny a lýkožrouti vybráni. Vzorky byly sbírány v měsíčních intervalech během roku 2011. Vzorky pro celkové stanovení lipidů a glycidů byly zváženy a zpracovány. Vzorky pro stanovení glukózy a trehalózy glykogenu byly zality 75 % etanolem a uskladněny v chladničce v 5 °C.

Pokusní jedinci pro stanovení AKH a bioassay byli odchytáváni během letních měsíců z feromonových lapačů.

Lapák - jedná se o pokácený strom, jemuž se ponechá kůra; neměl by ležet přímo na zemi, aby byla volná plocha pro nálet lýkožrouta

Feromonový lapač - jsou to lapací zařízení, v kterých je umístěno médium, na které se nanáší sekundární atraktanta (feromony), která se pozvolna odpařují a lákají lýkožrouta smrkového

3.2 Stanovení adipokinetických hormonů

3.2.1 Kvantitativní stanovení AKH

3.2.1.1 Získání neurosekretorického komplexu

Pro stanovení adipokinetických hormonů byly získávány ze vzorků celé mozky s neurosekretorickými buňkami, corpora cardiaca a corpora allata. Práce byla prováděna pod binokulárním mikroskopem při největším zvětšení (64x). Brouk byl připevněn na pitvací misce entomologickým špendlíkem za hrud' a zalit Ringerovým fyziologickým roztokem (0.13 M NaCl, 1.3 mM KCl, 6.8 mM CaCl₂ · 2H₂O, 2 mM MgCl₂ · 6H₂O, 2 mM NaHCO₃) tak, aby byl zcela ponořen. Mikropinzetami byla odstraněna kutikula z hlavové části a pomocí stříčky byl odplaven přebytečný materiál. Vzhledem k tomu, že corpora cardiaca nejsou příliš pevně spojena s mozem, bylo vhodné kontrolovat každý mozek zvlášť v kapce Ringerova fyziologického roztoku na podložním skle. Mozky byly ukládány do mikrozkušavek a uchovávány při -20 °C.

3.2.1.2 Příprava mozkových extraktů

Pro další pokusy bylo třeba připravit mozkový extrakt z napitvaných vzorků. Ke vzorku byl přidán 80 % metanol, vzorek byl sonikován jehlovým sonikátorem Ultrasonic homogenizer 4710 (Cole Parmer Instrument Co.) po dobu 15 vteřin. Poté byl vzorek centrifugován (EBA 12R, Hettich Zentrifugen) při teplotě 4 °C po dobu 5 minut při 15000 otáčkách. Supernatant byl odpipetován do další mikrozkušavky a sediment byl ještě dvakrát podle stejného postupu extrahován. Extrakty byly spojeny a následně vysušeny ve vakuové centrifuze RC 10.22. (Jouan). Poté byly vzorky opět skladovány při -20 °C.

3.2.1.3 Izolace adipokinetického hormonu z připraveného extraktu CNS

Roztoky:

- roztok A – 0,11 % kyselina trifluoroctová (TFA) v H₂O
- roztok B – 60 % acetonitril v 0,1 % kyselině trifluoroctové v H₂O

Extrakt CNS byl purifikován pomocí RP HPLC (Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography), na zařízení Waters ovládaném pomocí programu Clarity (Data

Apex, Praha) na koloně Chromolith Performance RP–18e (Merck). Vysušený extrakt CNS z 30 mozků byl rozpuštěn ve 200 μ l rozpouštědla (35 % roztok B a 65 % roztok A). Vzorek byl sonikován a následně centrifugován 5 minut při 5000 otáčkách. Takto připravený vzorek byl injikován do systému a dělen pomocí gradientu acetonitril - voda za následujících podmínek: 0-8 min 35 % roztok B, 8-20 min 35-80 % roztok B, průtok – 1ml/min, fluorometrická detekce – λ_{ex} = 280 nm, λ_{em} = 348 nm. Pro zjištění oblasti eluce hormonů z kolony byly použity retenční časy syntetických hormonů Peram-CAH-I (RT= 4,58 min) a Peram-CAH-II (RT= 10,56 min), které byly nanесeny na kolonu za stejných podmínek. Vzorky byly sbírané po celou dobu eluce, ve zhruba 1,5 min intervalech. Vzorky byly opět vysušeny a kvantifikace AKH provedena pomocí ELISA testu.

3.2.1.4 ELISA – kvantitativní stanovení AKH

Enzyme – linked immunosorbent assay je imunochemická metoda, která existuje v mnoha variantách (přímá, nepřímá, sendvičová a kompetitivní). Tato metoda se používá poměrně často díky jednoduché aplikaci antigenu či protilátky na mikrodestičky. Výsledkem reakce je zbarvení jednoduše změřitelné spektrofotometrem (Crowther, 1995). Při kvantitativním stanovení hladiny AKH byla použita kompetitivní ELISA, kde značený AKH o známém množství soupeří o vazbu na limitovaném množství protilátky se stanovovaným AKH. Pro práci byla použita králičí protilátka proti Pyrap-AKH z *Pyrrhocoris apterus*, která je schopna rozeznat i Peram-CAH-I a Peram-CAH-II (Goldsworthy a kol., 2002)

Roztoky:

- aplikační pufr: pH = 9,6, 0,1 M bikarbonátový pufr (uhličitan sodný Na_2CO_3 , hydrogenuhličitan sodný NaHCO_3)
- promývací pufr: pH = 7,5, 10 nM PBS pufr (hydrogenfosforečnan sodný $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, dihydrogenfosforečnan sodný $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, chlorid sodný NaCl), 0,1% Tween 20 (polyoxyethylensorbitanmonopalmitát)
- blokovací pufr: 5% roztok sušeného mléka, 0,1% Tween-20 v promývacím pufru
- OPD substrát: 12,15 ml kys. citrónové + 12,85 ml Na_2HPO_4 + 4,25 mg OPD (ortofenylendiamin) + 1,25 μ l 30% H_2O_2 (peroxid vodíku)

Postup:

1. Navázání protilátky na mikrodestičku Costar 3590 (Corning Incorporated) při 4°C přes noc. Králičí protilátka (IgG) proti Pyrap–AKH byla naředěna v poměru 1:5000 v aplikačním pufru. V množství 100 µl byla protilátka nanášena do jamek mikrodestičky.

2. Trojnásobné promývání destičky promývacím pufrům s Tween 20 o koncentraci 0,1%. Na promývání se používal objem 200 µl na jamku.

3. Nanesení blokovacího pufru o objemu 200 µl na jamku. Inkubace 2 hodiny při 37°C za stálého třepání na třepačce Titramax 1000 (Heidolph) v inkubátoru Inkubator 1000 (Heidolph).

4. Opakování bodu 2.

5. Nanesení vzorků (jednotlivé frakce z RP HPLC) rozpuštěných v 50 µl promývacího pufru bez Tween-20 a 50 µl (100 fmol) roztoku Pyrap–AKH značeného biotinem (BLAM-Pyrap-AKH, Biotin Long Arm Malaimide) na jamku. Do dalších sloupců destičky byly místo vzorků z CNS aplikovány jako standardy syntetické hormony Peram-CAH-I a Peram-CAH-II. Hormony byly rozředěny dvojkovou řadou (vždy po 50 µl) od 10 pmol v první jamce. Jako negativní kontrola sloužily jamky se 100 µl promývacího pufru bez Tween-20. Jako pozitivní kontrola sloužily jamky s 50 µl promývacího pufru bez Tween-20 a 50 µl BLAM. Tím začala kompetice o vazbu na protilátku., která probíhala 1 hodinu při 37 °C opět za stálého třepání.

6. Opakování bodu 2.

7. Aplikace HRPS (horsradish peroxidase streptavidin). HRPS byl ředěn v poměru 1:500 v promývacím pufru a nanášen v množství 100 µl na jamku. Inkubace probíhala 1 hodinu při 37°C.

8. Šestinásobné promývání pufrům – viz bod 2..

9. Aplikace 100 µl OPD substrátu do každé jamky v přítomnosti peroxidu vodíku, který se přidal do substrátu těsně před nanesením na destičku. Během inkubace, která trvala 40 minut při 37 °C, ve tmě (zabalení destičky do hlinkové fólie), peroxidáza štěpí peroxid vodíku a vzniklý kyslík reaguje s OPD za vzniku barevného roztoku žluto-oranžového roztoku.

10. Zastavení reakce přidáním 50 µl 0,5 M kyseliny sírové do každé jamky.

Poté byla spektrofotometricky (Spectra MAX 340_{PC}, Molekular Devices) změřena absorbance při vlnové délce 492nm a hodnoty byly přepočítány na % kompetice dle rovnice:

$$100 - ((\text{Abs vzorku} - \text{pozadí}) / (\text{max Abs} - \text{min Abs})) \cdot 100$$

pozadí = průměr hodnot naměřených pro negativní kontrolu

min, max Abs = nejnižší a nejvyšší naměřená absorbance na destičce

Množství hormonu v každé jamce bylo odečteno ze sestrojených kalibračních křivek ze syntetických hormonů Peram-CAH-I a Peram-CAH-II.

3.2.2 Adipokinetická odpověď na extrakt z mozku *Ips typographus* u *Pyrrhocoris apterus* měřená sulfofosfovanilinovým testem

Stanovení adipokinetické odpovědi byla prováděna sulfo-fosfovanilinovým testem (Zöller a Kirch, 1962, modifikace podle Holwerda a kol., 1977 a Van Marrewijka a kol., 1984).

Princip: Sloučeniny lipidické povahy odštěpují v prostředí silných kyselin mastné kyseliny. Dvojně vazby nenasyčených mastných kyselin reagují s vanilinem za vzniku barevných sloučenin. Reakce není specifická jen pro dvojně vazby obsažené v lipidech, ale pro všechny látky s dvojnou vazbou obecně. Mastné kyseliny hmyzu jsou ve velké míře nenasyčené, proto je tato metoda pro použití u hmyzu velmi citlivá.

Vanilinové činidlo: 1,98 g vanilinu (4-hydroxy-3-methoxy-benzaldehyd) rozpuštěn v 668 ml kyseliny fosforečné, zahřáto na 60 °C, zchlezeno a doplněno do 1l destilovanou vodou.

Vzhledem k tělesným rozměrům lýkožrouta byl proveden heterologní test s použitím plošnice ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus*) jako recipienta testovaného extraktu z mozku lýkožrouta smrkového. Příprava extraktů je popsána v bodě 3.2.1.2. Vysušený extrakt byl rozpuštěn ve 20 % metanolu v Ringově roztoku, o gradientu 4 mozky lýkožrouta smrkového na jedince *P. apterus*. Extrakt byl injikován Hamiltonovou injekční stříkačkou o objemu 2 µl skrz metathorakálně abdominální intersegmentální membránu. Stejně tak byl injikován do kontrolních zvířat kontrolní roztok (20 % metanolu v Ringově roztoku) a do dalších pro porovnání aktivity syntetický Pyrap-AKH o koncentraci 10 pmol na plošnici.

Pro pokus byly použity 10 denní brachypterní samice *P. apterus*. Pokusná zvířata pocházela z chovů Entomologického ústavu. Zvířata byla chována při teplotě 26 °C a fotoperiodě 18L:6D hodin.

Na začátku pokusu byly odebrány vzorky hemolymfy ze všech pokusných jedinců. Po odstřížení tykadla plošnice, byla hemolymfa zachycena na parafilm a následně odebráno 0,5 µl hemolymfy do skleněných zkumavek se 100 µl 96 % H₂SO₄. Poté byl skupině zvířat injikován extrakt z kůrovce, další skupině kontrolní roztok a poslední skupině syntetický Pyrap-AKH o koncentraci 10 pmol. Hemolymfa byla odebírána po 90 min stejným způsobem, jako na začátku pokusu.

Skleněné zkumavky s odebranou hemolymfou byly vařeny po dobu 10 minut ve vodní lázni, zchlazeny a následně přidán 1ml vanilínového činidla. Reakce probíhala 30 minut. Na spektrofotometru (Thermospectronic, Helios) bylo měřeno barevné zbarvení vzorků při 546 nm proti slepému vzorku (100 µl 96 % H₂SO₄ a 1 ml vanilínového činidla).

Množství lipidů v hemolymfě bylo odečteno z kalibrační křivky pro kyselinu olejovou (Mr = 282,5, µg kys. olejové 5,65; 14,126; 28,25; 56,5; 113). Naměřené hodnoty před a po podání extraktu z kůrovců, kontrolního roztoku a syntetického Pyrap-AKH byly od sebe odečteny a tím určena změna množství lipidů v hemolymfě plošnice.

3.2.3 Strukturní a hmotnostní stanovení AKH

Vzorky AKH pro hmotnostní a strukturní analýzu byly připraveny stejně jako v bodě 3.2.1.2. Pro stanovení byly připraveny 4 vzorky po 20 mozcích z lýkožroutů smrkových. Dva vzorky byly připraveny pouze jako metanolový extrakt a další dva byly děleny pomocí RP HPLC (viz bod 3.2.1.3) a pro analýzu byly použity pouze frakce odpovídající retenčním časům syntetických standardů pro Peram-CAH-I a Peram-CAH-II. Strukturní stanovení AKH bylo prováděno pomocí LC/+ESI MS v laboratoři analytické biochemie, která je součástí Biologického centra Akademie věd.

3.3 Celkový obsah lipidů

Stanovení celkového obsahu lipidů byla prováděna pomocí sulfo-fosfovanilínového testu (viz výše).

Celí brouci byli zváženi za čerstva a znovu po 20 hod sušení v lyofilizátoru (Chaosy, ALPH 1-2 LDPlus), aby byla známa i jejich suchá hmotnost. Vzorky byly homogenizovány pomocí skleněného ručního homogenizátoru ve skleněné zkumavce ve 2 ml 96 % H₂SO₄. Zkumavky byly vařeny po dobu 10 min ve vodní lázni a zchlazeny.

Dvacetpět μl vzorku bylo přepipetováno do nové skleněné zkumavky a přidán 1 ml vanilínového činidla a promícháno na vortexu. Reakce probíhala po dobu 30 min. Na spektrofotometru (Thermospectronic, Helios) bylo měřeno barevné zbarvení vzorků při 546 nm proti slepému vzorku (100 μl 96 % H_2SO_4 a 1 ml vanilínového činidla). Množství lipidů bylo odečteno z kalibrační křivky pro kyselinu olejovou (viz výše).

Vzorky byly váženy před a po sušení v lyofylizátoru. Tyto získané hodnoty byly využity pro stanovení celkového obsahu vody v pokusných zvířatech.

3.4 Celkový obsah glycidů

Stanovení celkového obsahu glycidů byla prováděna pomocí fenolového testu (Dubios a kol, 1956)

Princip: Fenol reaguje s redukujícími cukry za vzniku žlutohnědého barevného komplexu. Kyselina sírová způsobí konverzi neredukujících cukrů na redukující. Tato metoda stanovuje celkové množství glycidů ve vzorku.

Celí jedinci byli zváženi a homogenizováni pomocí plastového homogenizátoru ve 100 μl 5 % trichloroctové kyseliny v plastových mikrozkuvkách. Poté byly vzorky centrifugovány po dobu 2 min při 10000 ot/s při 4 °C. Dvacet μl vzorku bylo přepipetováno do skleněných zkumavek a doplněno do 100 μl 5 % trichloroctovou kyselinou. Ke vzorku bylo přidáno 100 μl 5 % fenolu, prudce vstříknuto 0,5 ml koncentrované H_2SO_4 a vše řádně promícháno na vortexu. Reakce probíhala po dobu 30 min. Na spektrofotometru (Thermospectronic, Helios) bylo měřeno barevné zbarvení vzorků při 490 nm proti slepému vzorku (100 μl 5 % trifluoroctová kyselina, 100 μl 5 % fenolu a 0,5 ml koncentrované H_2SO_4). Množství glycidů bylo odečteno z kalibrační křivky pro glukózu (0-80 μg).

3.5 Stanovení jednotlivých cukerných zásob

Pro stanovení hlavních cukerných složek energetických zásob byly vorky sbírány po celý rok a uschovány v 75 % etanolu při 5 °C. Na stanovení byly vybrány vzorky, které odpovídají významným fázím životního cyklu lýkožrouta smrkového.

3.5.1 Stanovení glukózy pomocí Glucose (GO) Assay Kit (SIGMA)

Pro stanovení glukózy byl použit komerčně vyráběný kit na stanovení glukózy Glucose (GO) Assay kit (SIGMA, o.č. GAGO20-1KT). Objemy reagensů byly upraveny pro použití na 96 jamkové mikrotitrační destičce.

Princip:

Glukóza je oxidována na glukonovou kyselinu a peroxid vodíku díky enzymu glukózo-oxidáze. Peroxid vodíku reaguje s o-dianisidinem za přítomnosti peroxidázy a utváří barevný produkt. Oxidovaný o-dianisidin po přidání kyseliny sírové utváří stabilnější růžový produkt. Intenzita růžového zbarvení je úměrná koncentraci glukózy.

Zvážení dospělci byli homogenizováni plastovým homogenizátorem v mikrozkuhavce ve 200 μ l fosfátového pufru (PBS) (zásobní roztok 45g NaCl, 6g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 1g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, doplnit vodou do 500 ml, pro samotný pokus 10krát ředit) na ledu a stočeny při 10000 ot/s 4 °C po dobu 7 min. Vzorky byly po stočení zahřáty na 70 °C po dobu 7 min, aby došlo k denaturaci enzymů.

Vzorky byly nanášeny na 96 jamkovou destičku. Pro samotný test bylo použito 5 μ l vzorku, které byly doplněny do 30 μ l PBS. Poté bylo přidáno 98 μ l glukóza-oxidázy/peroxidázy a 2 μ l o-dianosidinu. Reakce probíhala 30 min při 37 °C. Pro ustálení reakce bylo přidáno 100 μ l 6M H_2SO_4 . Absorbance byla měřena (Spectra MAX 340_{PC}, Molekular Devices) při 540 nm. Množství glukózy ve vzorcích bylo odečteno z kalibrační křivky pro glukózu. Kalibrační křivka byla připravena z komerčně prodáváného standardního roztoku pro glukózu 1mg/ml (SIGMA o.č. G 3285) o koncentraci 0-0,16 μ g (viz Tab.1)

Tab. 1 Objemy roztoků pro přípravu kalibrační křivky pro glukózu.

Reálná koncentrace glukózy μ g/ μ l	0	0,01	0,02	0,04	0,08	0,16
μ l zásobí glukózy	0	0,3	0,6	1,2	2,4	4,8
μ l PBS	30	29,7	29,4	28,8	27,6	25,2

3.5.2 Stanovení trehalózy pomocí trehalázy a Glucose (GO) Assay Kit (SIGMA)

Pro stanovení trehalózy byla použita komerčně dodávaná trehaláza (SIGMA o.č. T8778) a komerčně vyráběný kit na stanovení glukózy Glucose (GO) Assay kit (SIGMA, o.č. GAGO20-1KT). Objemy byly upraveny pro použití na 96 jamkové destičce.

Pro stanovení trehalózy byly použity vzorky připravené dle bodu 3.5.1. Pro samotný test byly použity 2 μ l supernatantu. Pro test bylo potřeba naředit trehalázu v trehalózovém pufru (5 mM Tris pH 6,6, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, připraveno na ledu) o objemu 0,9 μ l trehalózy na 300 μ l trehalózového pufru. Do každé jamky bylo napipetováno 20 μ l roztoku trehalázy, 2 μ l vzorku a doplněno do 30 μ l trehalózovým pufrům. Destička byla překryta parafilmem a víčkem na destičky, aby nedošlo k odpaření vzorků. Enzym působil 24 hodin při 37°C.

Poté bylo přidáno 98 μ l glukózo-oxidázy/peroxidázy a 2 μ l o-dianosidinu. Reakce probíhala 30 min při 37 °C. Pro ustálení reakce bylo přidáno 100 μ l 6M H₂SO₄. Míra zabarvení byla měřena při 540 nm. Množství trehalózy ve vzorcích bylo odečteno z kalibrační křivky pro trehalózu po odečtení množství glukózy. Kalibrační křivka byla připravena ze standardního roztoku pro trehalózu 1mg/ml (SIGMA o.č. T9531) o koncentraci 0-0,16 μ g.

3.5.3 Stanovení glykogenu pomocí amyloglukosidázy a Glucose (GO) Assay Kit (SIGMA)

Pro stanovení glykogenu byla použita komerčně dodávaná amyloglukosidáza (SIGMA o.č. 10115) a komerčně vyráběný kit na stanovení glukózy Glucose (GO) Assay kit (SIGMA, o.č. GAGO20-1KT). Objemy byly upraveny pro použití na 96 jamkové destičce.

Pro samotný test bylo použito 2 μ l vzorku připraveného dle bodu 3.5.1.. Byl připraven roztok amyloglukosidázy přidáním neionizované vody aby výsledná koncentrace byla 100U/ml. Do každé jamky bylo napipetováno 5 μ l roztoku amyloglukosidázy, 2 μ l vzorku a bylo doplněno do 30 μ l PBS. Poté bylo přidáno 98 μ l glukózo-oxidázy/peroxidázy a 2 μ l o-dianosidinu. Reakce probíhala 30 min při 37 °C. Pro ustálení reakce bylo přidáno 100 μ l 6M H₂SO₄. Míra zabarvení byla měřena při 540 nm. Množství glykogenu ve vzorcích bylo odečteno z kalibrační křivky pro glykogen po odečtení

množství glukózy. Kalibrační křivka byla připravena z komerčně prodáváného standardního roztoku pro glykogen 1mg/ml (SIGMA o.č. G 0885) o koncentraci 0-15 μ g.

3.6 Statistické zpracování výsledků

Pro statistické hodnocení průkaznosti výsledků byl použit program STATISTICA verze 7.2 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Hodnoty byly testovány na ověření normality dat, následně byla použita jednocestná ANOVA a Post Hoc Tukey-test. Oba testy byly hodnoceny na 5% hladině významnosti. Pro tvorbu grafů byl použit program Prism (GraphPad Software, version 4, CA, USA). V grafech jsou uvedeny průměry naměřených hodnot \pm SD.

4 Výsledky

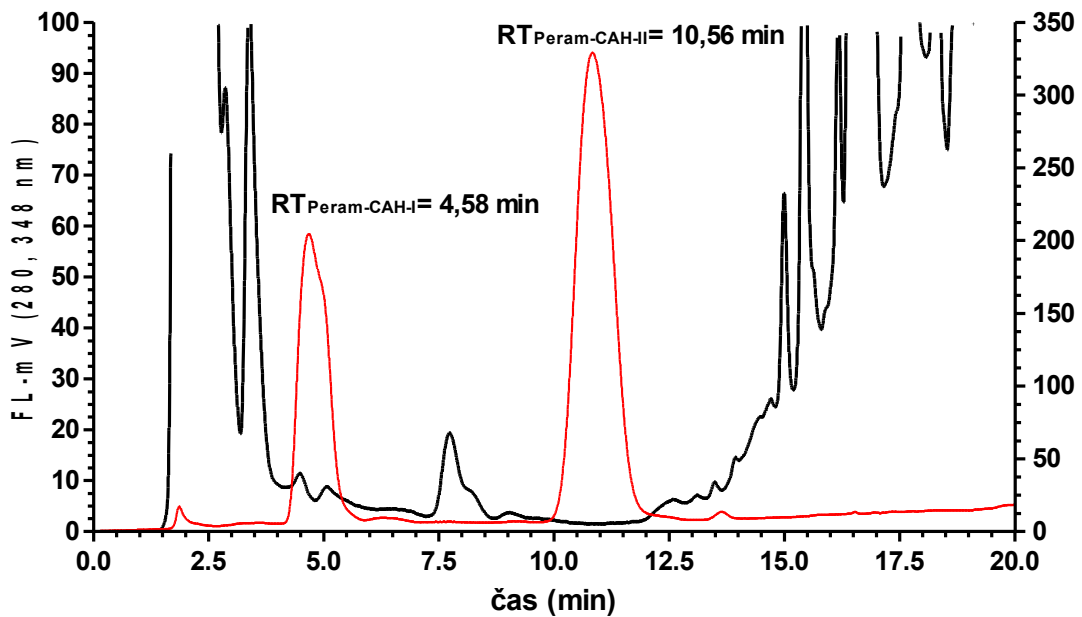
4.1 Stanovení adipokinetických hormonů

Předchozí pokusy naznačovaly, že u lýkožrouta smrkového se mohou vyskytovat dva zástupci z RPCH/AKH rodiny, a to konkrétně Peram-CAH-I a Peram-CAH-II (Moravcová, 2010). Pro pokus byly zvoleny kvantitativní a kvalitativní metody, které měly dokázat, že se jedná o výše zmíněné kandidáty.

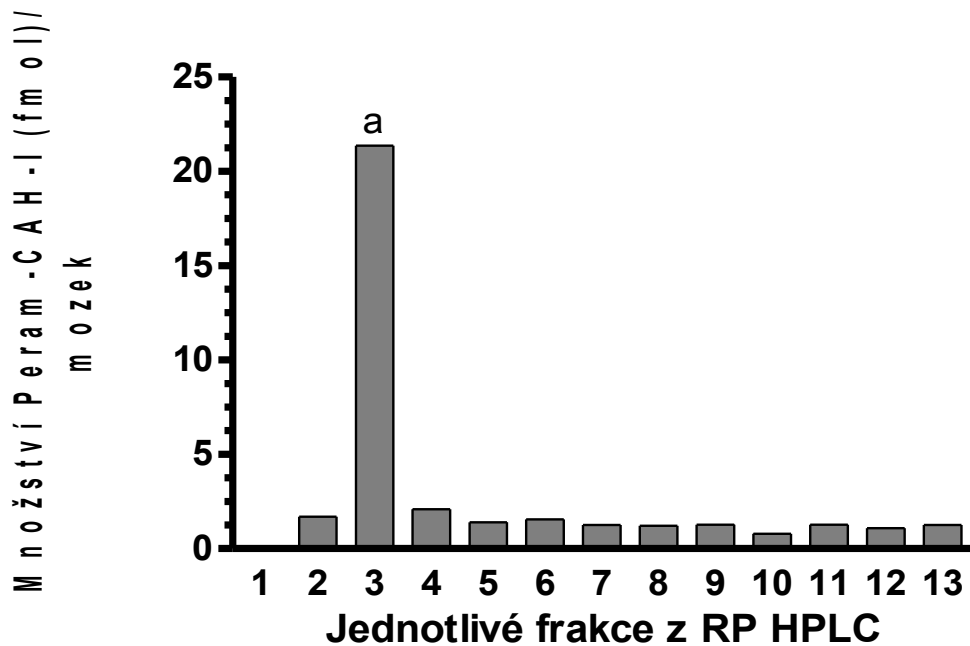
Pro stanovení kvantity hormonu ve vzorku bylo nutné rozdělit extrakt z mozků pomocí RP HPLC, pro odhad retenčních časů těchto hormonů byly využity syntetické hormony Peram-CAH-I (RT=4,58 min) a Peram-CAH-II (RT=10,56 min). Již touto metodou se ukázalo, že se z extraktu mozků neeluuje žádná látka v oblasti retenčního času pro Peram-CAH-II (Obr. 4). Během purifikace byly sbírány všechny frakce, se kterými byla provedena kompetitivní ELISA (Obr. 5). Vzhledem k tomu, že se neprojevila žádná aktivita ve frakci č. 7, která odpovídá retenčnímu času pro Peram-CAH-II, není zde výsledek prezentován. Po odečtení hodnot z kalibrační křivky pro Peram-CAH-I výsledek ukázal, že nejvyšší aktivitu má frakce č. 3., která odpovídá retenčnímu času pro Peram-CAH-I. Teoretické množství hormonu odpovídá 2,1 fmol na jeden mozek lýkožrouta smrkového. Hodnota naměřená ve frakci č.3 se statisticky výrazně liší od ostatních naměřených hodnot ($t = 56,85$, $df = 10$) Frakce č.1 není úmyslně zobrazována. Má velmi vysokou aktivitu, k níž dochází díky „cross” reakci s jinými látkami.

Heterologní adipokinetická odpověď na extrakt z mozků lýkožrouta smrkového měřená na ruměnici pospolné (*Pyrrhocoris apterus*) (Obr.6) naznačila, že se v extraktu mohou vyskytovat hormony z AKH/RPCH rodiny. Po aplikaci extraktu z mozků, došlo k navýšení množství lipidů v hemolymfě o 4.81 μg , ke kterému dochází i po aplikaci syntetického Pyrap-AKH (5,68 μg). Po aplikaci kontrolního roztoku došlo pouze k mírnému nárůstu o 1,14 μg , ke kterému dochází díky vyvolanému stresu při injikaci. Naměřené rozdíly se statisticky významně liší ($p_{\text{Pyrap-AKH/extrakt}}=0,013$, $p_{\text{Pyrap-AKH/kontrola}}<10^{-4}$, $p_{\text{extrakt/kontrola}}=0,037$, $F=12,609$, $df=2$).

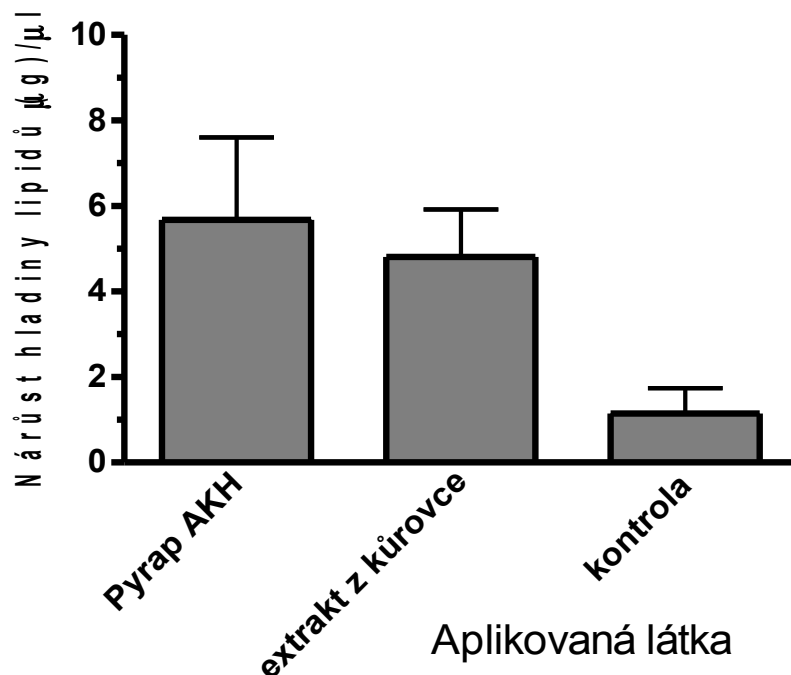
Výsledky z LC/MS analýzy překvapivě nepotvrdily přítomnost, adipokinetických hormonů u lýkožrouta smrkového, proto zde nejsou prezentovány. Ačkoliv byla frakce bohatá na větší peptidy, jejichž retenční čas odpovídal retenčnímu času hormonů z AKH/RPCH rodiny, nepodařilo se žádný adipokinetický hormon detekovat. Molekulové hmotnosti neodpovídaly hmotnostem pro okta-deka peptidy.



Obr. 4 Příklad RP HPLC metanolového extraktu z 30 mozků lýkožrouta smrkového (černá křivka) a syntetických standardů Peram-CAH-I a Peram-CAH-II (červená křivka) dělených za stejných podmínek (viz kap. 3.2.1.3).



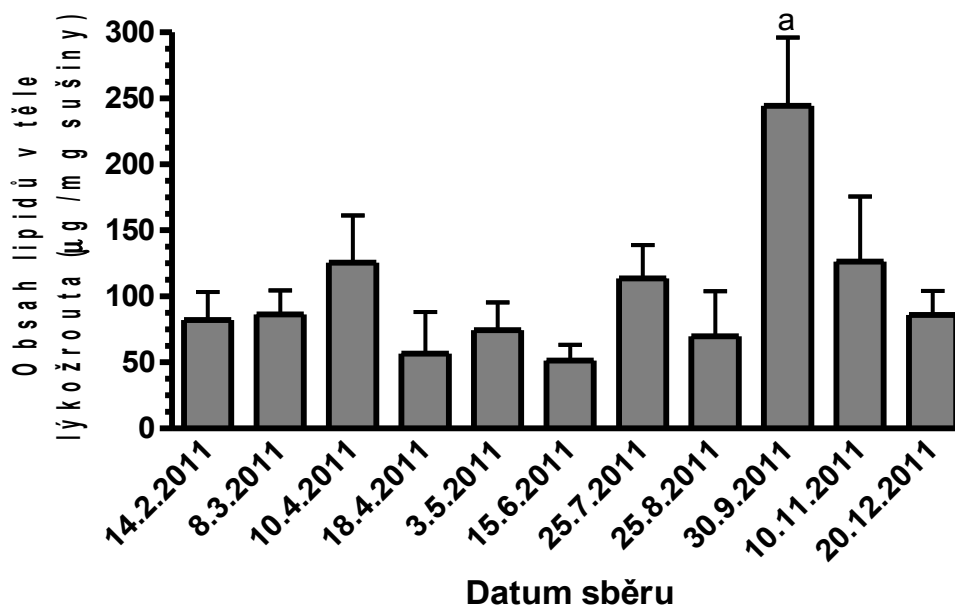
Obr. 5 Teoretické množství Peram-CAH-I přítomné v mozku lýkožrouta smrkového v jednotlivých frakcích z RP HPLC (Obr. 4) měřené ELISA testem. Množství hormonu bylo přepočteno z kalibrační křivky syntetického Peram-CAH-I. Odebírání frakcí proběhlo v následujících časech: **1.** 1,50 - 2,52; **2.** 2,52 - 3,90; **3.** 3,90 - 5,21; **4.** 5,21 - 6,6; **5.** 6,6 - 8,15; **6.** 8,15 - 9,60; **7.** 9,6 - 11; **8.** 11 - 12,5; **9.** 12,5 - 14; **10.** 14 - 15,5; **11.** 15,5 - 17; **12.** 17 - 18,5; **13.** 18,5-20. Frakce č. 1 na obrázku chybí.



Obr. 6 Nárůst lipidů v hemolymfě *P. apterus* po aplikaci syntetického Pyrap-AKH, extraktu z mozků lýkožrouta smrkového a 20% metanolu v Ringerově roztoku. Všechny hodnoty se od sebe statisticky významně liší (Post Hoc Tukey-test $p_{\text{Pyrap-AKH/extrakt}}=0,013$, $p_{\text{Pyrap-AKH/kontrola}}<10^{-4}$, $p_{\text{extrakt/kontrola}}=0,037$, $F=12,609$, $df=2$). Sloupce uvádějí průměr ($n = 10-15$) a úsečky směrodatnou odchylku.

4.2 Celkový obsah lipidů

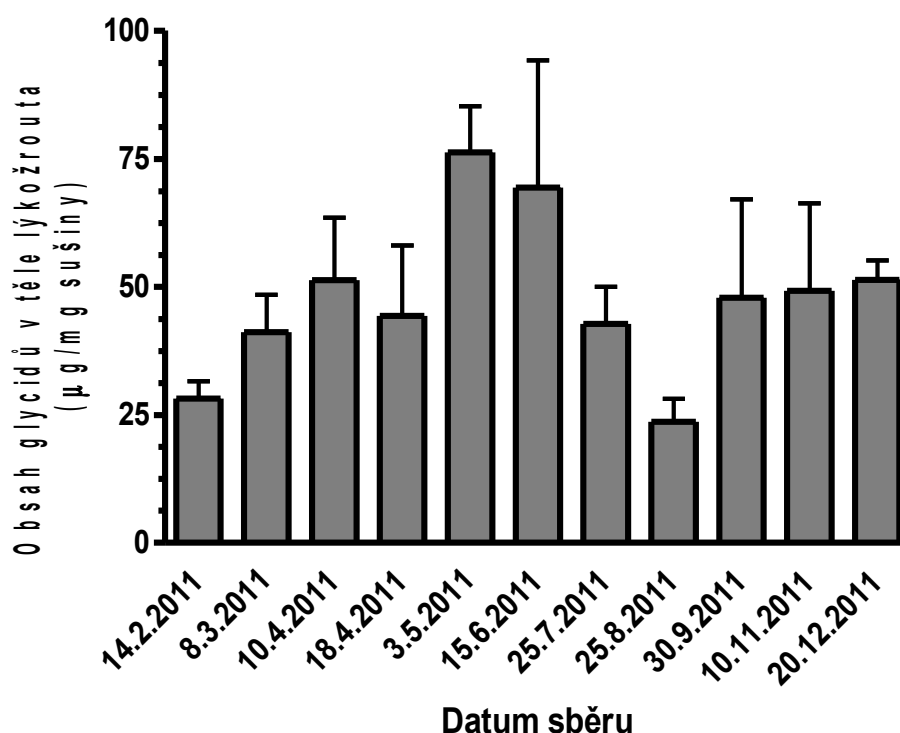
Měření hladiny obsahu lipidů v celých tělech lýkožroutů ukázalo rozdíly mezi různými daty odběru (Obr. 7). Nejvyšší hladina byla zaznamenána 30.9.2011 ($244,27 \pm 21,22$ µg/mg sušiny). Tato hodnota se na 5% hladině významnosti statisticky významně liší od ostatních naměřených hodnot, kromě sběru z 10.4.2011 ($p = 0,054$). Do konce prosince následoval pokles obsahu lipidů až na $85,94 \pm 18,17$ µg/mg sušiny. Od začátku roku docházelo k postupnému nárůstu lipidů. Hodnota naměřená 10.4.2011 $125,56 \pm 35,77$ µg/mg sušiny byla nejvyšší hodnota zaznamenaná u aktivních jedinců. Změny hladiny lipidů během letních měsíců odpovídají, životnímu cyklu lýkožrouta smrkového (viz následující kapitola). Data byla před statistickým hodnocením zlogaritmována přirozeným logaritmem, jelikož neměla normální rozdělení a hodnocena jednocestnou ANOVOU ($F(10, 75)=10,169$, $p<10^{-4}$) a následně Post Hoc Tukey testem.



Obr. 7 Celkový obsah lipidů v miligramu sušiny u lýkožrouta smrkového měřen v měsíčních intervalech. Statisticky významný rozdíl od ostatních hodnot na 5% hladině významnosti je označen **a** (hodnota naměřena 10.4. p = 0,054) (Post Hoc Tukey-test). Sloupce uvádí průměr (n = 8) a úsečky směrodatnou odchylku.

4.3 Celkový obsah glycidů

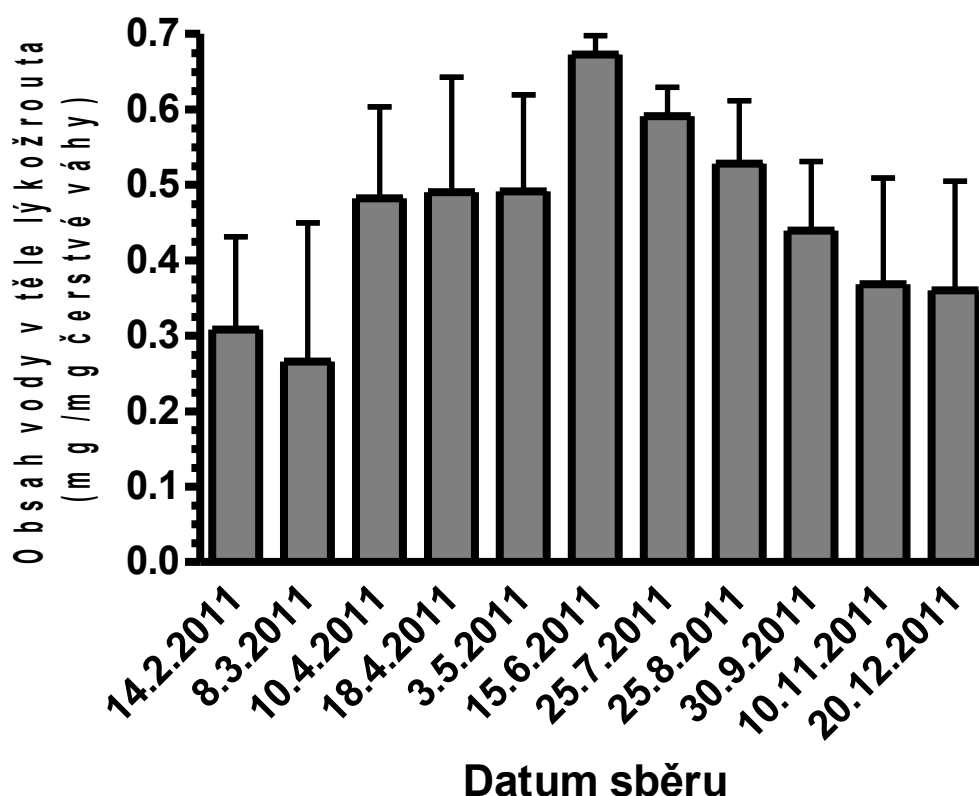
Celkový obsah glycidů vykazuje fluktuaci během roku (Obr. 8). Nejvyšší naměřené hodnoty odpovídají jarním a letním měsícům, přičemž nejvyšší množství bylo zaznamenáno v květnu ($76,24613 \pm 9,02 \mu\text{g}/\text{mg}$ sušiny). Poté docházelo ke snížení hladiny. Během září došlo k navýšení celkových glycidů na $47,84 \pm 19,18 \mu\text{g}/\text{mg}$ sušiny a toto množství zůstalo téměř konstantní až do konce prosince. Z počátku roku docházelo k navyšování glycidů až do počátku dubna ($51,27 \pm 12,21 \mu\text{g}/\text{mg}$ sušiny). Následný pokles je spojován s úbytkem celkových energetických zásob. Podobný jev je zaznamenán i pro lipidy. Statisticky významný rozdíl na 5% hladině významnosti byl zaznamenán u hodnoty z 25.8.2011 ($23,6 \pm 4,55 \mu\text{g}/\text{mg}$ sušiny), avšak tato hodnota se významně neliší od množství naměřeného 14.2.2011 ($28,19 \pm 3,33 \mu\text{g}/\text{mg}$ sušiny, $p=0,931036$). Data byla před statistickým hodnocením zlogaritmována přirozeným logaritmem vzhledem k tomu, že neměla normální rozdělení. Vyhodnocení proběhlo jednocestnou ANOVOU ($F(10, 76)=13,001, p<10^{-4}$) a následně Post Hoc Tukey testem.



Obr. 8 Celkový obsah glycidů v miligramu sušiny u lýkožrouta smrkového měřen v měsíčních intervalech. Nejvyšší naměřená hodnota byla 3.5.2011 ($76,24613 \pm 9,02$ µg/mg sušiny) a nejnižší 25.8.2011 ($23,6 \pm 4,55$ µg/mg sušiny) Sloupce uvádí průměr ($n = 8$) a úsečky směrodatnou odchylku.

4.4 Celkový obsah vody

Data o hmotnosti získaná při měření celkových lipidů byla využita pro stanovení celkového obsahu vody v těle lýkožrouta smrkového (Obr. 9). V průběhu roku se obsah vody v těle lýkožrouta výrazně liší. Během letních měsíců je její množství nejvyšší (15.6.2011 $0,67 \pm 0,025$ mg/mg čerstvé váhy). Poté dochází k poklesu na množství $0,45 \pm 0,22$ mg/mg čerstvé váhy (22.12.2011). Na počátku roku obsah vody stále klesá. Během jarních měsíců dochází k navýšení a od dubna do května je obsah vody téměř konstantní. Data nebyla statisticky hodnocena.

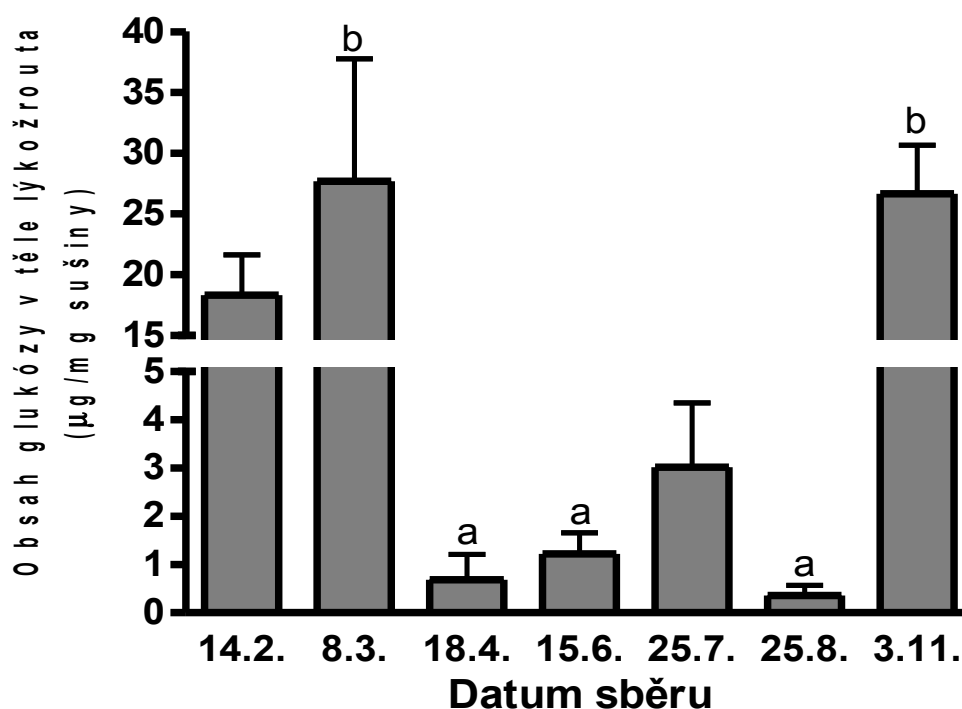


Obr. 9 Množství vody v těle lýkožrouta smrkového měřené v měsíčních intervalech. Nejvyšší hodnota byla naměřena dne 15.6.2011 $0,67 \pm 0,025$ mg/mg čerstvé váhy a nejnižší dne 8.3.2011 $0,27 \pm 0,18$ mg/mg čerstvé váhy. Sloupce uvádí průměr ($n = 8$) a úsečky směrodatnou odchylku.

4.5 Hlavní cukerné zásoby

4.5.1 Celkové množství glukózy

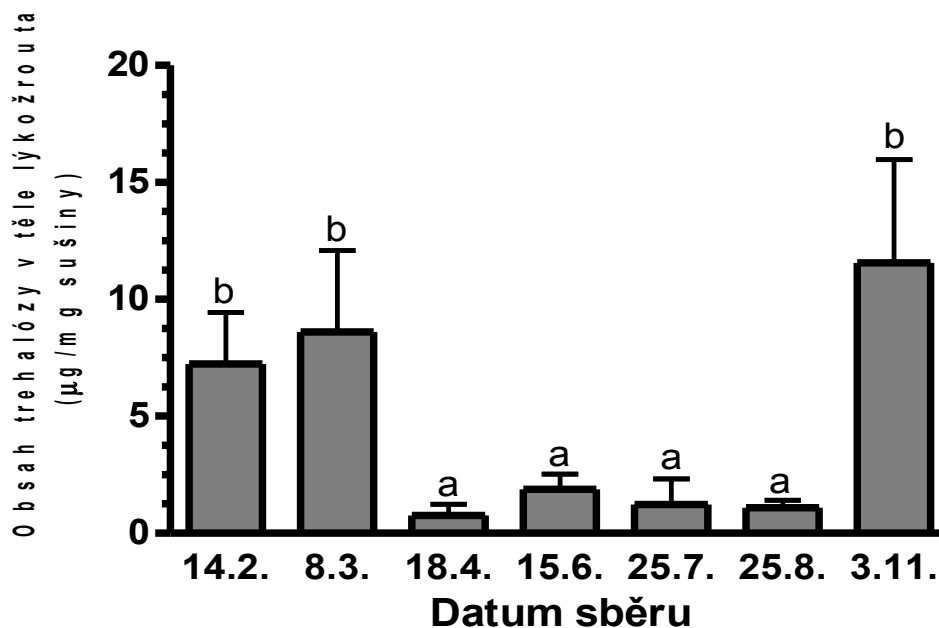
Hladina glukózy je velmi nízká během aktivní fáze životního cyklu. Nejnižší množství bylo naměřeno 25.8.2011, kdy hladina glukózy dosahovala pouze $0,36 \pm 0,21$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ sušiny. Na podzim dochází k nárůstu a to až na $26,66 \pm 4$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ sušiny (3.11.2011). Během jarního rojení dochází k prudkému poklesu hladiny glukózy (18.4.2011 $0,69 \pm 0,52$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ sušiny). Statisticky významný rozdíl byl detekován mezi hodnotami naměřenými 18.4.2011, 15.6.2011 a 25.8.2011 a ostatními, během těchto měsíců bylo množství glukózy velmi nízké. Nejvyšší naměřené hodnoty z 3.11.2011 a 8.3.2011 se rovněž průkazně lišily od ostatních (obr.10). Data byla před statistickým hodnocením zlogaritmována přirozeným logaritmem, jelikož neměla normální rozdělení a hodnocena testem jednocestná ANOVA ($F(6, 28)=21,575, p<10^{-5}$) následně Post Hoc Tukey testem.



Obr. 10 Celkové množství glukózy obsažené v těle lýkožrouta smrkového měřené během významných fází životního cyklu. Nejvyšší naměřené množství odpovídá $27,6 \pm 10,1$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ sušiny (8.3.2011) a nejnižší $0,36 \pm 0,21$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ sušiny (25.8.2011). Na 5% hladině významnosti se od sebe statisticky významně liší hodnoty označené a, b od ostatních množství (Post Hoc Tukey test). Sloupce uvádí průměr ($n = 5$) a úsečky směrodatnou odchylku.

4.5.2 Celkové množství trehalózy

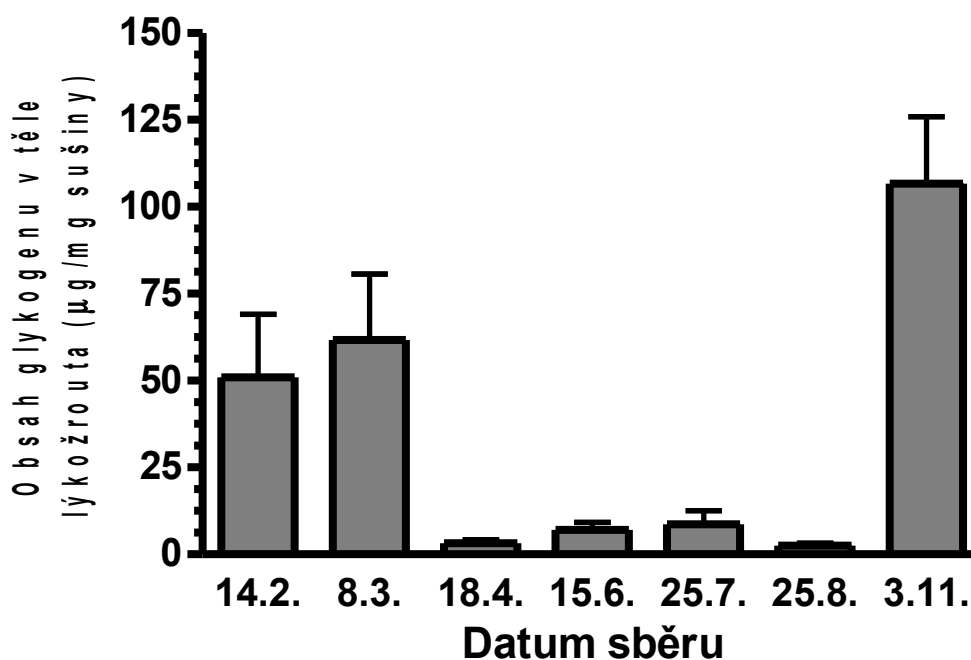
Celkové množství trehalózy (Obr. 11) vykazuje velmi podobný vzor jako množství glukózy (Obr. 10). Během jarních a letních měsíců jsou hodnoty velmi nízké a naopak během podzimu narůstají a v zimě se udržují na vysoké hodnotě. Nejnižší naměřené množství v letních měsících bylo $0,77 \pm 0,48$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ sušiny (18.4.2011) a nejvyšší $1,87 \pm 0,66$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ sušiny (15.6.2011). Během přezimování byla zaznamenána nejvyšší hodnota během diapauzy ($11,56 \pm 4,42$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ sušiny, 3.11.2011) a nejnižší během postdiapauzní kviescence ($7,25 \pm 2,2$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ sušiny, 14.2.2011). Na pětiprocentní hladině významnosti jsou od sebe statisticky významně odlišné obsahy trehalózy naměřené během letních a zimních měsíců (obr. 11). Data byla před statistickým hodnocením zlogaritmována přirozeným logaritmem, protože neměla normální rozdělení a hodnocena testem jednocestná ANOVA ($F(6, 26)=71,293$, $p<10^{-5}$) a následně Post Hoc Tukey testem.



Obr. 11 Celkové množství trehalózy obsažené v těle lýkožrouta smrkového během významných fází životního cyklu. Nejvyšší naměřené množství odpovídá $11,56 \pm 4,42$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ sušiny (3.11.2011) a nejnižší $0,77 \pm 0,48$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ sušiny (18.4.2011). Na 5% hladině významnosti se od sebe statisticky významně liší hodnoty označené a, b od ostatních množství (Post Hoc Tukey test). Sloupce uvádí průměr ($n = 5$) a úsečky směrodatnou odchylku.

4.5.3 Celkové množství glykogenu

Hodnoty celkového množství glykogenu v těle jsou během roku značně proměnlivé (Obr. 12). Jeho hladiny vykazují stejný vzor jako u celkového množství glukózy (Obr. 10) a trehalózy (Obr. 11). Nízké hladiny byly zaznamenány během letních měsíců (nejnižší hodnota $2,61 \pm 0,6$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ sušiny, 25.8.2011). Během přezimování došlo k prudkému nárůstu až na hodnotu $106,6465 \pm 19,29$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ sušiny (3.11.2011). Začátkem roku se množství razantně snížilo na $50,88 \pm 18,19$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ sušiny (14.2.2011). Během následujícího měsíce došlo k mírnému nárůstu. Se začátkem aktivní fáze životního cyklu dochází k prudkému poklesu hladiny na $3,17 \pm 1,03$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ sušiny (18.4.2011). Na 5% hladině významnosti se průkazně lišily hodnoty naměřené během jarních a letních měsíců (18.4.; 15.6.; 25.7. a 25.8.2011) od hodnot získaných během podzimu a zimy (3.11.; 14.2. a 8.3.2011). Data byla před statistickým hodnocením zlogaritmována přirozeným logaritmem, protože neměla normální rozdělení a hodnocena testem jednocestná ANOVA ($F(6, 26)=71,293$, $p<10^{-5}$) a následně Post Hoc Tukey testem.



Obr. 12 Celkové množství glykogenu obsažené v těle lýkožrouta smrkového měřené během významných fází životního cyklu. Nejvyšší naměřené množství odpovídá $106,6465 \pm 19,29$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ sušiny (3.11.2011) a nejnižší $2,61 \pm 0,6$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ sušiny (25.8.2011). Na 5% hladině významnosti se od sebe statisticky významně liší hodnoty naměřené 18.4.; 15.6.; 25.7. a 25.8.2011 od hodnot 3.11.; 14.2. a 8.3.2011. (Post Hoc Tukey test). Sloupce uvádí průměr ($n = 5$) a úsečky směrodatnou odchylku.

5 Diskuze

5.1 Adipokinetické hormony

Adipokinetické hormony Peram-CAH-I a Peram-CAH-II (Tab.2), jejichž přítomnost se u lýkožrouta smrkového předpokládala (Moravcová 2010), velmi dobře reagují s protilátkou proti Pyrap-AKH; touto protilátkou jsou rozpoznávány i další zástupci z AKH/RPCH rodiny (Goldsworthy a kol, 2002). ELISA test prokázal pravděpodobný výskyt pouze jednoho z kandidátů (Peram-CAH-I), a to ve frakci získané pomocí RP HPLC, která odpovídala retenčnímu času pro syntetický standard Peram-CAH-I. V ostatních frakcích z extraktu mozků nebyla naměřena žádná aktivita. Proto jsem usuzovala, že u lýkožrouta smrkového je syntetizován pouze jeden adipokinetický hormon. Touto metodou však nelze zcela jasně určit, o který z hormonů by se mohlo jednat. Proto byla provedena LC/MS analýza daného vzorku. Její výsledek však překvapivě přítomnost žádného adipokinetického hormonu neprokázal, což nebylo popsáno u žádného druhu hmyzu. Identifikace zástupců AKH/RPCH u lýkožrouta proto zůstává stále otevřená. Přítomnost Peram-CAH-I však nelze zcela vyloučit. Tento fakt je podpořen přítomností tohoto hormonu u dalších zástupců z řádu Coleoptera, jako je mandelinka bramborová *Leptinotarsa decemlinata* (Chrysomelidae) nebo některé druhy tesaříků *Phrynetia spinator* (Cerambycidae) a *Ceroplesis thunbergi* (Gäde, 2009).

Heterologní adipokinetická odpověď u ruměnice pospolné na extrakt z mozků kůrovce přinesla velmi zajímavé výsledky. U tohoto zástupce se vyskytují dva hormony z AKH/RPCH rodiny. Prvním objeveným je Pyrap-AKH, který při uvolnění z CC aktivuje tukové těleso a následně dochází ke zvýšení koncentrace lipidů v hemolymfě (Kodrík a kol., 2000). Dalším zástupcem je Peram-CAH-II, který plní u ploštice velmi podobnou funkci jako Pyrap-AKH (Kodrík a kol., 2002). Extrakt z mozků kůrovce způsobil u ploštice prokazatelný nárůst lipidů, což potvrzuje domněnku o přítomnosti některého z hormonů z AKH/RPCH rodiny u lýkožrouta smrkového.

Tab. 2 Primární struktura neurohormonů z RPCH/AKH rodiny.

Název	Primární struktura
Peram-CAH-I	pGlu – Val – Asn – Phe – Ser – Pro – Asn – Trp amid (Scarborough a kol., 1984)
Peram-CAH-II	pGlu – Leu – Thr – Phe – Thr – Pro – Asn – Trp amid (Scarborough a kol., 1984)
Pyrap-AKH	pGlu – Leu – Asn – Phe – Thr – Pro – Asn – Trp amid (Kodrík a kol, 2000)

5.2 Celkové energetické zásoby

Celková množství lipidů a glycidů měřená během roku u lýkožrouta smrkového korespondují s jednotlivými fázemi jeho životního cyklu. Pro celková stanovení energetických zásob byly vzorky sbírány během celého roku v měsíčních intervalech. Data pro stanovení jednotlivých cukerných složek byla vybrána tak, aby odpovídala významným životním fázím (Tab. 3).

Tab. 3 Životní fáze odpovídající konkrétním datům.

Datum sběru	Významná fáze
14.2.2011	post-diapauzní kviescence
8.3.2011	post-diapauzní kviescence
18.4.2011	jarní rojení
15.6. 2011	sesterské přerojení
25.7. 2011	F1 generace
25.8. 2011	středně tmaví brouci vyvinuti ze sesterského přerojení (15.6.)
3.11. 2011	diapauza

Z výsledků je zřejmé, že hlavní energetickou rezervou pro přečkání nepříznivého zimního období jsou lipidy. Lýkožrout smrkový během diapauzy téměř nepřijímá potravu, a proto si před nástupem do diapauzy vytváří lipidické zásoby ve formě triacylglycerolů, které ukládá do tukového tělesa. Obdobně je tomu i u většiny diapauzního hmyzu, kde právě triacylglyceroly představují nejdůležitější energetickou rezervu (Hahn & Denlinder, 2011). V průběhu zimy lýkožrout smrkový ztrácí téměř 70 % svých lipidických zásob. Botterweg (1982) uvádí, že během přezimování ztrácí lýkožrout 40-50 % celkových lipidů: rozdíl mezi těmito daty a mnou získanými, může být spojen s rozdílnými teplotami

během sledovaných období. Jarní nárůst teplot umožňuje obnovování energetických zásob, které jsou následně využity pro jarní rojení, kdy brouci vyhledávají nové prostředí pro založení nové generace. Hlavním zdrojem energie pro let a snůšku jsou lipidy. Aktivní část životního cyklu je spjata s nízkou hladinou celkových lipidů. Brouci nemusí ukládat taková množství zásobních látek, jelikož nejsou konfrontováni s kritickým nedostatkem potravy. Koncem července docházelo k mírnému nárůstu celkových lipidů i ostatních sledovaných látek. V tomto období teplota klesla na průměrných 12,9°C (Příloha 1). Lze usuzovat, že inaktivita způsobená podprahovou teplotou (podle Wermelinger (2004) je minimální teplota pro let 16,5°C a pro kladení vajíček 11,4°C) vede k hromadění zásobních látek. Pokles celkových lipidů zaznamenaný během srpna je s velkou pravděpodobností opět ovlivněn teplotou. Testovaní jedinci byli mladí brouci, kteří se vyvíjeli ze snůšky ze sesterského přerobení (jedinci sbíraní 15. 6. 2011). Nižší hladina lipidů byla ovlivněna buď stářím brouků, kteří si teprve začali vytvářet zásoby nebo teplotně velmi příznivým koncem léta, který poskytl lýkožroutům možnost vyhledat nová vhodnější zimoviště. Právě s přeletem před přezimováním může být spojený úbytek energetických rezerv.

Množství glycidů se během roku nemění tak razantně jako obsah lipidů. Je patrné, že glycidy nejsou významnou zásobní látkou během zimního období. Jejich úloha bude v této části roku pravděpodobně spíše kryoprotektivní. U mnoha druhů hmyzu závisí přežití při teplotách pod bodem mrazu na chladové odolnosti. Jednou z nejdůležitějších biochemických adaptací podporujících toleranci vůči mrazu je využití organických látek s nízkou molekulární hmotností. U hmyzu se jedná převážně o sacharidy (glycerol, sorbitol, ribitol, trehalóza, glukóza a další), které bývají syntetizovány ze zásob glykogenu nahromaděných v tukovém tělese (Storey, 1997). U lýkožrouta smrkového bylo v měsíčních intervalech měřeno spektrum látek s kryoprotektivními účinky během zimního období u dvou populací (Šumava, České Budějovice). V tomto spektru jsou nejvíce zastoupeny glycerol, sacharóza, glukóza, trehalóza, sorbitol a manitol (Košťál a kol., 2007). Na přelomu zimy a jara měl obsah glycidů velmi podobný trend jako u celkových lipidů. Se zvyšujícími se teplotami dochází k nárůstu hladiny celkových glycidů, které jsou také poté využity jako zdroj energie při jarním rojení. Během letních měsíců jsou hladiny vyšší. To může být vysvětleno, tím že lýkožrout má v tomto období dostatek čerstvé potravy a využívá jako zdroj energie právě sacharidy, které získává přímo štěpením lýka.

Průměrné množství vody v tělech bezobratlých se pohybuje kolem 70% živé váhy, avšak obsah vody se liší u různých druhů u různých životních stádií, a to v rozmezí pouhých 17% až více jak 90% (Danks, 1999). U lýkožrouta smrkového je možné

pozorovat výrazné změny v obsahu vody během roku. V letních měsících se průměrné množství vody pohybuje kolem 60% živé váhy. S nástupem zimního období dochází k poklesu téměř až na 25% živé váhy. Vzhledem k tomu, že lýkožrout musí odolávat během zimy vlivům nízkých teplot, lze usuzovat, že dehydratace je jednou ze strategií chladové odolnosti. Na druhou stranu ztráta vody může být spojena s osmotickým stresem, který narušuje integritu buněčné membrány. Ochranný vliv na buněčnou membránu během zimního období mají právě nahromaděné kryoprotektivní látky. Protektivní vliv trehalózy a dalších cukrů na buněčnou stěnu je popsán v práci Crowe a kol. (1987).

Lýkožrout smrkový má poměrně vysokou hladinu všech jednotlivě sledovaných cukerných složek během přezimování oproti aktivní fázi životního cyklu. Z výsledků je zřejmé, že další významnou látkou zajišťující energetické zásoby během zimního období je glykogen. Ten slouží u mnoha druhů hmyzu pro syntézu kryoprotektantů. Konverze glykogenu na kryoprotektanty a přeměna kryoprotektantů zpět na glykogen je dynamický proces, který se může objevit vícekrát během diapauzy. Kryoprotektivní látky s cukernou povahou mohou být metabolicky recyklovány na zásobní látky nebo být využity pro okamžitou energetickou potřebu (Hahn & Denlinger, 2007). Během chladného období dochází k poklesu celkových glycidů. Tento trend je zřejmý i z hodnot pro glukózu, trehalózu a glykogen. Koncem zimy s nástupem vyšších teplot dochází k obnově energetických zásob u všech tří sledovaných cukerných zásob. Tyto doplněné rezervy jsou nesmírně důležité pro další vývoj lýkožrouta. Slouží mu k obnovení tkání (létacích svalů a pohlavních orgánů), které během diapauzy atrofovaly, a jsou nezbytné pro disperzi a reprodukci.

Z výsledků je patrné, že hladina glukózy během zimy je vyšší než hladina trehalózy. Tyto výsledky jsou v rozporu s daty získanými Košťálem a kol. (2007), kde byla naměřena vyšší hladina trehalózy. V této práci používali pro stanovení polyolů a kryoprotektivních cukerných složek LC/MS analýzu. Poměr mezi hladinami cukrů vykazuje v mé práci opačný vzorec. Tato skutečnost se dá vysvětlit použitím jiné metodiky. Pro měření jednotlivých cukrů byla použita biochemická analýza, oproti dříve použité metodě LC/MS. Avšak hlavní vliv na poměr cukrů bude mít pravděpodobně teplota. V letech, kdy byly stanovovány cukry a polyoly byla velmi chladná zima. Mnou získané vzorky byly sbírány během roku, kdy se setkáváme s nadprůměrně vysokými teplotami (Příloha 2). Vliv teploty a aktivita lýkožrouta má pravděpodobně vliv na poměr celkového množství mezi glukózou a trehalózou. Hodnoty získané během letního období potvrzují tento vztah. V době, kdy se lýkožrout aktivně pohybuje je hladina trehalózy vyšší

oproti glukóze (Příloha 3). Tento fakt potvrzuje skutečnost, že trehalóza je hlavním zdrojem energie pro svalovou aktivitu (Thompson, 2003). V budoucnu plánujeme tento jev podrobně sledovat: lýkožrouti budou ve své aktivní fázi konfrontováni s nízkými teplotami a bude sledován poměr mezi hladinami výše zmíněných cukrů. Z výsledků je patrné, že během léta se poměr cukrů mění. Srpnová data vykazují vzestupný trend glukózy oproti trehalóze, avšak během tohoto období byli lýkožrouti vystaveni velmi nízké teplotě, díky které se stali částečně neaktivní (viz výše).

6 Závěr

Tématika lýkožrouta smrkového je v dostupné literatuře zastoupena poměrně hojně, přičemž hlavní snahou je zefektivnit strategie boje proti němu. Naproti tomu otázky spojené s fyziologií tohoto škůdce nejsou až na výjimky řešeny téměř vůbec. Vlastní výsledky proto není možno porovnávat se staršími pracemi a vyvozovat obecně platné závěry. Nové poznatky o adipokinetických hormonech a energetických zásobách u lýkožrouta by však mohly přinést řadu užitečných informací o jeho životním cyklu.

Ačkoliv nebyl u lýkožrouta smrkového konkrétní adipokinetický hormon identifikován, lze usuzovat, že zástupce AKH/RPCH rodiny zde existuje. Funkce tohoto hormonu odpovídá funkci jiných adipokinetických hormonů vyskytujících se u dalších zástupců z třídy *Insecta*. Data o energetickém metabolismu měřená během celého roku přináší řadu nových výsledků. Většina autorů se zabývala měřením energetických zásob pouze během přezimování. Mé výsledky potvrdily, že během chladného období před nástupem do diapauzy lýkožrout smrkový ukládá energetické rezervy v podobě lipidů a glykogenu, které jsou následně využívány během zimy, a že cukerné složky mají kryoprotektivní účinek. Informace o využívání a ukládání rezerv během aktivní části života jsou pilotními daty, která nelze porovnat s ostatními autory. Výsledky rovněž naznačují, že během aktivní fáze životního cyklu lýkožrout smrkový neukládá energetické rezervy a jako přímý zdroj energie využívá potravu, které je v okolí stále dostatek.

7 Použitá literatura

Arrese E. L., Soulages J. L., (2010): Insect fat body: Energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology*, 55: 207-225.

Bloemen R. E. B., Beenackers A. M. T., (1985): The effect of sense organ deprivation on the release of adipokinetic hormone in *Locusta migratoria*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 81: 915-919.

Botterweg P. F., (1982): Dispersal and flight behaviour of the spruce bark beetle *Ips typographus* in relation to sex, size and fat content. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 94: 466-489.

Byers, J. A., (1995): Host tree chemistry affecting colonization in bark Beetles. In R.T. Cardé and W.J. Bell (eds.). *Chemical Ecology of Insects 2*. Chapman and Hall, New York, 154-213.

Crowe J. H., Crowe L. M., Carpenter J. F., Aurel Wistrom A., (1987): Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochemical Journal*, 242: 1-10.

Crowther J. R., (1995): ELISA: Theory and Practise. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, 042: 223pp.

Danks H. V., (1999): Dehydration in dormant insects. *Journal of Insect Physiology* 46: 837-852

Doležal P., (2002): Diapauza u lýkožrouta smrkového *Ips typographus* (L.), Biologická fakulta JU, Magisterská diplomová práce, 51 pp.

Doležal P., Sehnal F. (2007a): Effects of photoperiod and temperature on the development and diapause of the bark beetle *Ips typographus*. *Journal of Applied Entomology*, 131: 165-173.

Doležal P., Sehnal F. (2007b): A simple method for the detection of imaginal diapause in beetles. *Journal of Applied Entomology*, 131: 221-223.

Dubios M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Revers P. A., Smith F. (1957): Colorimetric method for determination of sugars and related substance. *Analytical Chemistry*, 28: 350-356.

Edwards H. A., (1982): Free amino acids as regulators of osmotic pressure in aquatic insect larva. *Journal of Experimental Biology*, 101: 153-160.

Erbilgin N., Krokene P., Kvamme T., Christiansen E., (2007): A host monoterpene influences *Ips typographus* (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae) response to its aggregation pheromone. *Agricultural and Forest Entomology*, 9: 135-140.

Faccoli M., (2009): Effect of weather on *Ips typographus* (Coleoptera; Curculionidae) phenology, voltinism, and associated spruce mortality in the southeastern Alps. *Environmental Entomology* 38, 307-316.

Faccoli M., (2002): Winter mortality in sub-corticolous populations of *Ips typographus* (Coleoptera, Scolytidae) and its parasitoids in the south-eastern Alps. *Journal of Pest Science*, 75: 62-68.

Gäde G., (2009): Peptides of the adipokinetic hormone/red pigment-concentrating hormone family. A new taken on biodiversity. *Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology*, 1163: 125-136.

Gäde G., Auerswald L., (2002): Beetles' choice — proline for energy output: control by AKHs. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B Biochemistry and Molecular Biology*, 132: 117-129

Gäde G., Auerswald L., (2003): Mode of action of neuropeptides from the adipokinetic hormone family. *General and Comparative Endocrinology*, 132: 10-20.

Gäde G., Hoffmann K. H., Spring J. H., (1997): Hormonal regulation insects: facts, gaps, and future directions. *Physiological Reviews*, 77: 963-1032.

Goldsworthy G. J., (1983): The endocrine control of flight metabolism in locust. *Advances in Insect Physiology*, 17: 149-204.

Goldsworthy G. J., Kodrik D., Comley R., Lightfoot M., (2002): A quantitative study of adipokinetic hormone of the firebug, *Pyrhocoris apterus*. *Journal of Insect Physiology*, 48: 1103 – 1109.

Hahn D. A., Denlinger D. L., (2011): Energetics of insect diapause. *Annual Review of Entomology*. 56:103-121.

Hahn D. A., Denlinger D. L., (2007): Meeting the energetic demands of insect diapause: Nutrient storage and utilization. *Journal of Insect Physiology*, 53: 760-773.

Holwerda D. A., Van Doorn J., Beenakkers A. M. T., (1977): Characterization of the adipokinetic and hypertrehalosemic substance from the locust corpus cardiacum. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 7: 422-435.

Christiansen E., Warning R. H., Berryman A. A., (1987): Resistance of Conifers to Bark Beetle Attack: Searching for General Relationships. *Forest Ecology and Management*, 22: 89-106.

IPCC, (2007): Renewable energy sources and climate change mitigation. Special report of the intergovernmental panel on climate change 2007 climate change 2007. Cambridge University Press, 1088 pp.

Kikawada T., Saito A., Kanamori Y., Nakahara Y., Iwata K., Tahala D, Watanabe M., Okuda T., (2007): Trehalose transporter 1, a facilitated and high-capacity trehalose transporter, allows exogenous trehalose uptake into cells. *Proceeding of the National Academy of Science*, 104: 11585-11590.

Kirkendall L. R., (1983): The evolution of mating systems in bark and ambrosia beetles (Coleoptera: Scolytidae and Platypodidae). *Zoological journal of the Linnean Society* 77: 293-352.

Kodrík D., (2008): Adipokinetic hormone functions that are not associated with insect flight. *Physiological Entomology*, 33: 171-180.

Kodrík D., Šimek P., Lepša L., Socha R., (2002): Identification of the cockroach neuropeptide Pea-CAH-II as a second adipokinetic hormone in the firebug *Pyrrhocoris apterus*. *Peptides*, 23: 585-587.

Kodrík D., Socha R., Šimek P., Zemek R., Goldsworthy G. J., (2000): A new member of the AKH/RPCH family that stimulates locomotory activity in the firebug, *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30: 489-498.

Košťál V., (2006): Eco-physiological phases of insect diapause. *Journal of Insect Physiology*, 52: 113-127.

Košťál V., Renault D., Rozsypal J., (2011): Seasonal changes of free amino acids and thermal hysteresis in overwintering heteropteran insect, *Pyrrhocoris apterus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 160A: 245-251.

Košťál V., Zahradníčková H., Šimek., Zelený J., (2007): Multiple component system of sugars and polyols in the overwintering spruce bark beetle, *Ips typographus*. *Journal of Insect Physiology*, 53: 580-586.

Moravcová M., (2010): Sezónní změny hladiny adipokinetických hormonů u lýkožrouta smrkového (*Ips typographus* L.), Přírodovědecká fakulta, JČU, Bakalářská práce, 29 pp.

Orchard I., Ramirez J. M., Lange A. B., (1993): A multifunctional role for octopamine in locust flight. *Annual Review of Entomology*, 38: 227-249.

Passier P. C. C. M., Vullings H. G. B., Diederén J. H. B., Van der Horst D. J. (1995): Modulatory effects of biogenic amines on adipokinetic hormone secretion from Locust corpora cardiaca in vitro. *General and Comparative Endocrinology*, 97: 231-238.

Rozeder T., (2001): Octopamine in invertebrates. *Progress in neurobiology*, 59: 533-561.

Scaraffia P. Y., Wells M. A., (2003): Proline can be utilized as an energy substrate during flight of *Adres aegypti* females. *Journal of Insect Physiology*, 49: 591-601.

Scarborough R. M., Jamieson G. C., Kalisz F., Kamer S. J., McEnroe G. A., Miller C. A., Schooley D. A., (1984): Isolation and primary structure of two peptides with cardio acceleratory and hyperglycemic activity from corpora cardiaca of *Periplaneta americana*. *Proceeding of the National Academy of Science*, 81: 5575-5579.

Schlyter F., Birgersson G., Byers J. A., Löfqvist J., Bergström G., (1987): Field response of spruce bark beetle, *Ips typographus*, to aggregation pheromone candidates. *Journal of Chemical Ecology*, 13: 706-716.

Skuhřavý V., (2002): Lýkožřout smrkový (*Ips typographus*) a jeho kalamity. Agrospoj, Praha, 196 pp.

Storey K. B., (1997): Organic Solutes in Freezing Tolerance. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 117: 319-326.

Šrámek V., Novotný R., (2012): Povětrnostní podmínky a biotická poškození v roce 2011. Sborník referátů z celostátního semináře s mezinárodní účastí. Průhonice, 17.4.2012, 85 pp. Zpravodaj ochrany lesa 16, p. 8-12.

Thompson S. N., (2003): Trehalose – The Insect ‘Blood’ Sugar. *Advances in Insect Physiology*, 31: 205-285.

Van der Horst D. J., VAN Marrewijk W. J. A., Diederer J. H. B., (2001): Adipokinetic hormones of insect: release, signal transduction, and responses. *International Review of Cytology* 211: 179-240.

Van Marrewijk W. J. A., Van Den Broek A. T. M., Van der Horst D. J., Beenakkers A. M. T., (1984): Hypertrehalosemic and hyperlipaemic responses to adipokinetic hormone in fifth larval instar locusts, *Locusta migratoria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 14: 151-157

Vullings H. G. B., Diederer J. H. B., Veelaert D. Van der Horst D. J., (1999): Multifactorial control of the release of hormones from the locust retrocerebral complex. *Microscopy Research and Technique* 45:142–153.

Wermelinger, B. (2004): Ecology and management of the spruce bark beetle *Ips typographus*-a review of recent research. *Forest Ecology and Management*, 202: 67-82.

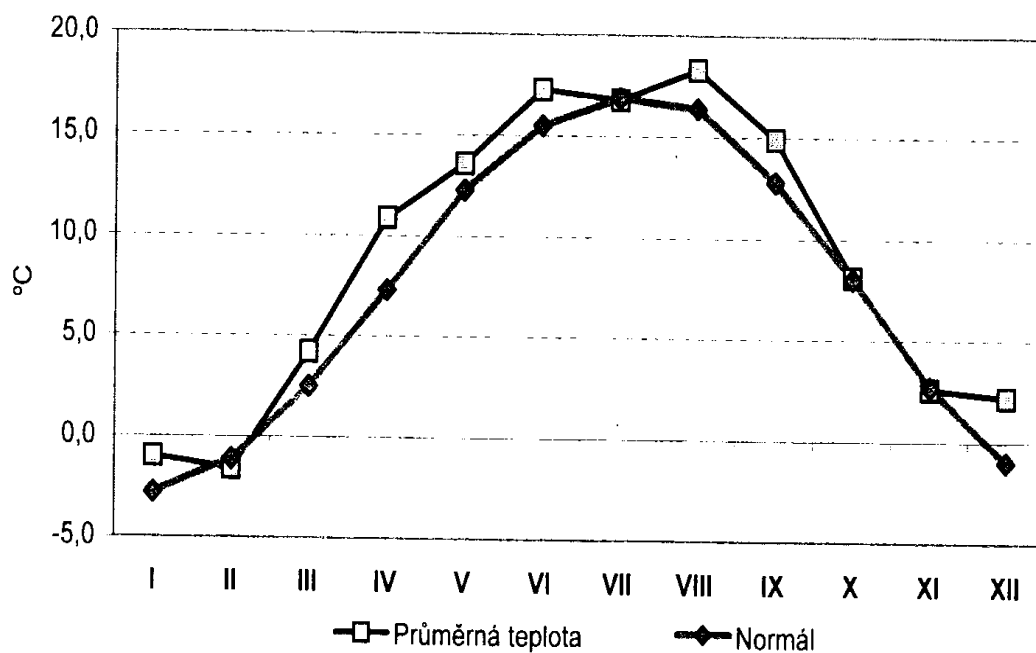
Zahradník P., Geráková M., (2010): Lýkožřout smrkový *Ips typographus* (L.) Lesnická práce, 89 (12): i-viii (příloha).

Zöller N., Kirch K., (1962): Über die quantitative Bestimmung von Lipoiden (Mikromethode) mittels der vielen natürlichen Lipoiden (allen bekannten Plasmalipoiden) gemeinsamen Sulfophosphovanillin-Reaktion. *Zeitschrift für die Gesamte Experimentelle Medizin*, 135: 545-561

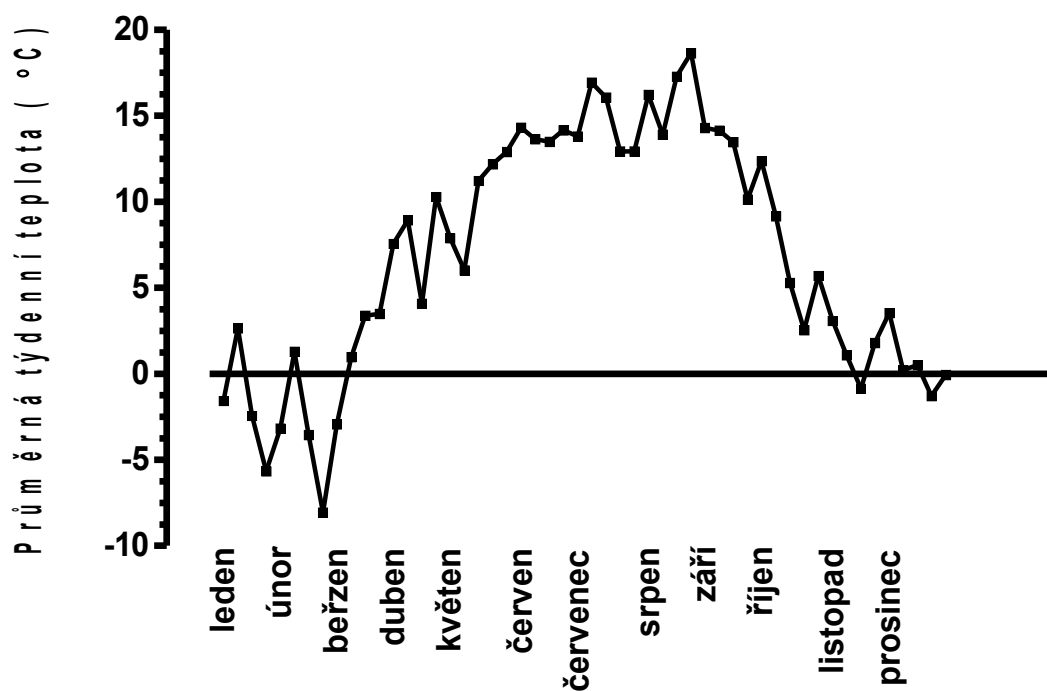
Zumr V., (1995): Lýkožřout smrkový – biologie, prevence a metody boje. Matice lesnická, Písek, 132 pp.

Zumr V., (1985): Biologie a ekologie lýkožřouta smrkového (*Ips typographus*) a ochrana proti němu. Academia, Praha, 124 pp.

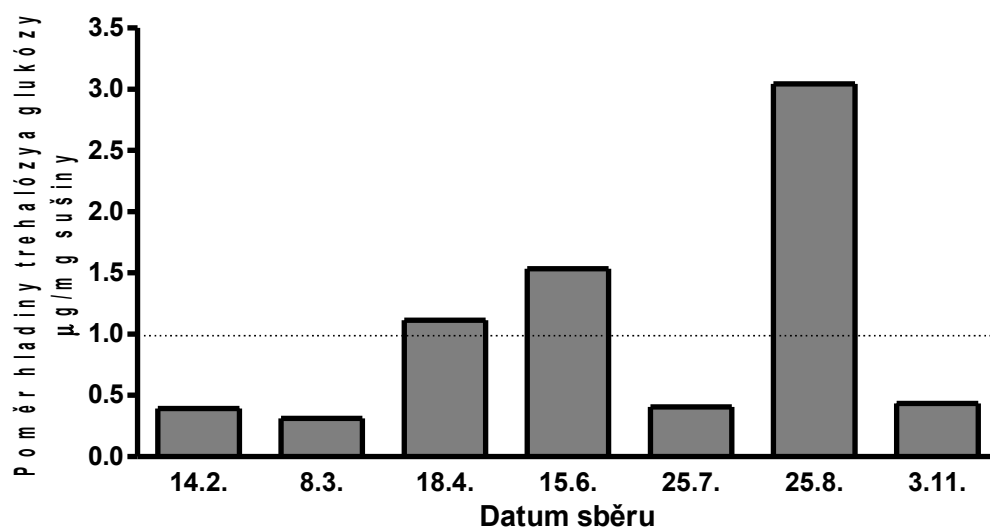
8 Přílohy



Příloha 1: Průměrné měsíční teploty vzduchu v roce 2011 (zdroj ČHMÚ) (Šráme & Novotný, 2012).



Příloha 2: Průměrné týdenní teploty měřené ve stínu na lokalitě Hradiště během roku 2011.



Příloha 3: Poměr mezi naměřeným množstvím trehalózy a glukózy.