

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Jak souvisí velikost těla sameček komárů s
jejich reprodukční zdatností a jakou roli
zde hraje juvenilní hormon**

Bakalářská práce

Kateřina Holická

Školitel: Ing. Marcela Nouzová, PhD.

Parazitologický ústav, Biologické centrum AVČR, v.v.i.

České Budějovice 2024

Bibliografické údaje

K. Holická, 2024: Jak souvisí velikost těla sameček komárů s jejich reprodukční zdatností a jakou roli zde hraje juvenilní hormon [How the size of male mosquitoes bodies relates to their reproductive fitness and what role the juvenile hormone plays here, Bc. Thesis, in Czech] – 44 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Anotace

The work focused on analyzing the effect of body size on mating in *Ae. aegypti* and revealing the role of juvenile hormone regulating reproductive behaviour. A series of mating experiments were conducted in which we varied the size of male and female mosquitoes and also used an analogue of the juvenile hormone. This showed that both body size and the absence of juvenile hormone impaired the mating ability of males, which could not be reversed by the administration of an analogue of juvenile hormone.

Financování

Tato práce byla financována z grantu 22-21244S Grantové agentury České republiky a ze Studentské grantové agentury Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval(a) pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích,

dne

Podpis studenta

Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala své vedoucí práce Ing. Marcela Nouzová, PhD. za odborné vedení, cenné rady a předané zkušenosti, a především za vstřícnost, trpělivost a spoustu času, který mi věnovala při vedení této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat MSc. Houda Ouns Maaroufi, Ph.D. a Fernando Gabriel Noriega, Ph.D. za poskytnutí cenných rad a připomínek. Děkuji také za vřelé přijetí od kolektivu laboratoře. V neposlední řadě patří poděkování také mé rodině a přátelům za podporu nejen při psaní bakalářské práce, ale též při studiu.

Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	Taxonomie	1
1.2	Aedes aegypti	1
1.2.1	Životní cyklus.....	1
1.2.1.1	Vejce	2
1.2.1.2	Larva.....	3
1.2.1.3	Kukla	3
1.2.1.4	Dospělec	3
1.2.2	Rozšíření.....	4
1.2.3	Vektor chorob	5
1.2.4	Kontrola populace.....	7
1.3	Rozmnožování.....	8
1.3.1	Pohlavní orgány	8
1.3.1.1	Samec	8
1.3.1.2	Samice	9
1.3.2	Páření.....	9
1.3.3	Faktory ovlivňující páření	10
1.3.4	Odmítnutí.....	11
1.3.5	Přenos spermií a krevní potrava	12
1.4	Juvenilní hormon (JH).....	12
1.4.1	Funkce JH.....	13
1.4.2	Syntéza	14
1.4.3	Metopren.....	14
2	Cíle práce.....	16
3	Metodika a materiály.....	17
3.1	Použité linie komárů.....	17
3.2	Chov komárů	17
3.3	Měření křídel	17
3.4	Pářící experiment.....	18
3.5	Aplikace metoprenu.....	19
3.6	Imunohistochemické barvení pohlavních orgánů samce.....	19
3.7	Měření velikosti přídatných žláz	19
3.8	Statistická analýza	20
4	Výsledky.....	21

4.1	Měření křídel	21
4.2	Volba <i>wt</i> samic mezi <i>wt</i> and <i>epox^{-/-}</i> samci	22
4.3	Volba <i>epox^{-/-}</i> samic mezi <i>wt</i> and <i>epox^{-/-}</i> samci	23
4.4	Role velikosti těla u <i>wt</i> komárů	23
4.4.1	Volba velkých <i>wt</i> samic	23
4.4.2	Volba malých <i>wt</i> samic	24
4.5	Volba velkých <i>wt</i> samic mezi <i>wt</i> a <i>epox^{-/-}</i> samci stejné velikosti	25
4.6	Volba velkých <i>wt</i> samic mezi <i>epox^{-/-}</i> samci a malými <i>wt</i> samci	26
4.7	Volba malých <i>wt</i> samic mezi <i>epox^{-/-}</i> samci a malými <i>wt</i> samci	26
4.8	Volba malých <i>wt</i> samic mezi malými <i>epox^{-/-}</i> samci a velkými <i>wt</i> samci	27
4.9	Vliv ektopické aplikace analogu JH na reprodukční zdatnost <i>epox^{-/-}</i> samců	28
4.10	Analýza velikosti přídatných žláz u <i>wt</i> a <i>epox^{-/-}</i> samců	29
4.11	Vliv ektopické aplikace metoprenu na velikost přídatných žláz u <i>epox^{-/-}</i> samců ..	30
5	Diskuze	32
6	Závěr	36
7	Seznam literatury	37

1 Úvod

1.1 Taxonomie

Komáři patří do čeledi komárovitých (*Cocinellidae*) řádu dvoukřídlí (*Diptera*). Jedná se o létající hmyz, který je tvořený více než 3 700 druhy, které nalezneme téměř po celém světě. Různé zástupce rodu komárů nalezneme v blízkosti lidských obydlí, ale také v lesích, na loukách s vysokými travnatými porosty, popřípadě v bažinách. Nejdůležitějším faktorem pro výběr stanoviště je přítomnost vodních ploch, z toho důvodu, že samice kladou vajíčka do přímé blízkosti stojatých nebo mírně tekoucích vod (About Mosquitoes, 2020).

Jednotlivé druhy komárů dělíme do dvou kmenů podle toho, jaký druh prostředí preferují pro kladení vajíček a následný vývoj (Foster a Walker, 2002).

Prvním kmenem jsou *Sabethina* (Foster a Walker, 2002), kteří pro kladení vajíček preferují trvalé nebo polotrvalé vody, jako jsou jezera, bažiny, popřípadě jakékoliv nádoby, které jsou naplněny vodou (About Mosquitoes, 2020). Samice kladou vajíčka přímo na vodní hladinu, nebo do těsné blízkosti okrajů, ke kterým dosahuje voda. Vajíčka nejsou příliš odolná vůči vyschnutí a z toho důvodu dochází k téměř okamžitému vylíhnutí po dokončení embryogeneze. Do této skupiny řadíme druhy rodu *Anopheles*, *Culex*, *Culiseta* a *Toxorhynchites* (Foster a Walker, 2019).

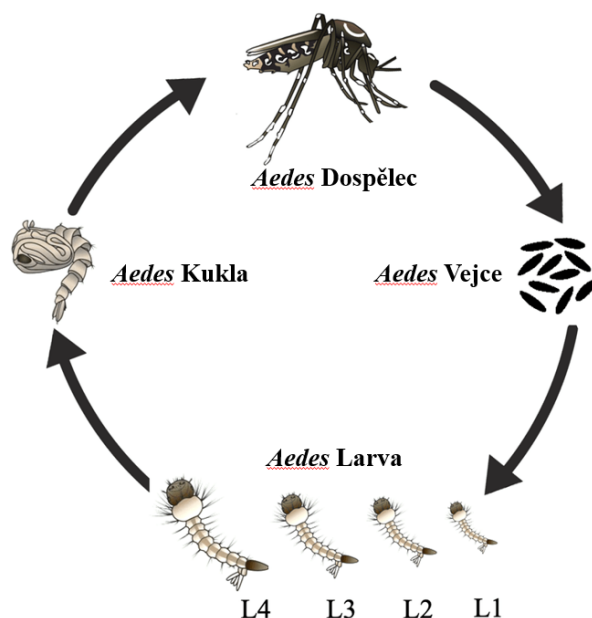
Do druhého kmene s názvem *Aedini* (Foster a Walker, 2002) řadíme druhy, u kterých samice kladou vajíčka do míst, které bývají zaplavovány vodou, jako jsou kaluže, nádoby, či díry ve stromech, nebo různé potůčky a jezírka vzniklá po záplavách, nebo tání sněhu (About Mosquitoes, 2020). Vajíčka se nelíhnou bezprostředně po embryogenezi, ale naopak jsou velmi odolná vůči vyschnutí a dokážou v takovémto stavu přetrvat po dobu několika měsíců či let. K líhnutí a následnému vývoji dochází po kontaktu s odkysličenou vodou. Tento způsob kladení vajíček je typický pro rody *Aedes*, *Ochlerotatus*, *Psorophora* a *Haemagogus* (Foster a Walker, 2019).

1.2 *Aedes aegypti*

1.2.1 Životní cyklus

Životní cyklus *Ae. aegypti* se rozděluje na čtyři fáze, kterými jsou vajíčko, larva, kukla a dospělec, které jsou znázorněny na Obr. 1.. Celý životní cyklus trvá běžně od sedmi do deseti

dnů. V určitých případech se může délka životního cyklu protáhnout až na několik týdnů. Celý proces se odehrává ve dvou různých prostředích. Prvním prostředím je vodní, kde probíhá líhnutí, vývoj larev a následně i kukel. Při přechodu mezi kuklou a dospělcem dochází ke změně prostředí z vodního na suchozemské a dospělci jsou poté plně suchozemští. Po spáření jsou vajíčka kladena do blízkosti vod (Foster a Walker, 2002).



Obr. 1. Životní cyklus rodu *Aedes* od vaječ k dospělci. L1-4 znázorňuje 4 larvální stádia. Staženo a upraveno z Hossain et al. (2022).

1.2.1.1 Vejce

Samice v jedné snůšce kladou 100-200 vaječ a jsou schopné za život naklást až pět snůšek. Vejce druhu *Ae. aegypti* jsou přibližně 1 mm dlouhá, doutníkového tvaru (Nelson, 1986). Druh *Ae. aegypti* řadíme do kmene *Aedini* (Foster a Walker, 2002), což znamená, že samice kladou vajíčka jednotlivě do míst, které bývají zaplavovány vodou. Při výběru stanoviště samice zvažuje různé fyzikální i chemické faktory jako například množství stínu, kvalitu vody i teplotu. Poté vajíčka pevně lepí na stěnu nádoby či jiného povrchu těsně nad hladinu vody (Foote, 1961). Krátce po nakladení, mají vajíčka bílou barvu a s postupným ztmavováním chorionu do pár hodin vznikají vajíčka s pevným černým povrchem. Embryonální vývoj trvá 2-3 dny v případě, že embryogeneze probíhá v tropických a subtropických oblastech, nebo teplých oblastech mírného pásu. Naopak v chladnějších oblastech, může být vývoj prodloužen až na týden nebo déle. Vejce jsou velmi odolná proti vyschnutí po dobu několika měsíců či let a díky tomu mohou přežít až do doby, dokud nebudou zaplaveny vodou a nebudou mít ideální podmínky k vylíhnutí (Foster a Walker, 2002).

1.2.1.2 Larva

K líhnutí larev dochází při vysokých teplotách, kdy dojde k dostatečnému zvýšení vlhkosti v okolí, nebo k ponoření vajíček pod hladinu odkysličené vody, která vzniká činností mikrobiálních organismů. Líhnutí není synchronizované, některá vajíčka potřebují být ponořena pod vodu vícekrát, než dojde k jejich vylíhnutí. Po vylíhnutí vzniká plně vodní stádium larvy. Při dostatku tepla a potravy se larva vyvíjí 5-6 dní, během kterých projde čtyřmi instary, než dospěje v kuklu. Při přechodu mezi jednotlivými instary dochází k svlékání vnější kostry exuvie, což umožňuje rychlý růst. Běžně se první tři instary vyvíjejí každý po jednom dni a poslední instar přibližně tři dny. Samci mají dobu vývoje v kuklu zkrácenou o jeden den. I v tomto případě hraje hlavní roli při průběhu vývoje okolní teplota, množství potravy a také prostoru (Foster a Walker, 2002).

1.2.1.3 Kukla

Je trvale vodní a většinu svého života tráví na hladině (Foster a Walker, 2002). Kukla *Ae. aegypti* je pohyblivá a schopná reagovat na různé vibrace. V klidovém stavu se vznášejí u hladiny díky vztlaku, který je nadnáší. Vývoj v dospělce trvá dva až tři dny (Nelson, 1986). Během této doby dochází k rozpadu původních tkání a vytvářejí se nové tkáně dospělců. V momentě, kdy je dokončena vnitřní přestavba těla dochází k vyplavání kukly na hladinu. Celé tělo jedince se protáhne (Foster a Walker, 2002), dojde k nasátí vzduchu, který způsobí otevření kůže na hřbetní straně těla a dojde k eklozi dospělého jedince hlavou napřed (Nelson, 1986). Ve většině případů dochází k eklozi nejprve u samců a posléze až u samic (Foster a Walker, 2002).

1.2.1.4 Dospělec

Po eklozi nově vzniklý jedinec setrvává krátkou chvíli na hladině, dokud nedojde k usušení křídel i celého těla. Poté je jedinec schopný létat pouze na krátké vzdálenosti, dokud nedojde ke kompletní sklerotizaci křídel. Následně se letové vzdálenosti mohou prodlužovat (Foster a Walker, 2002). Po dosažení dospělosti a získání schopnosti letu si jedinci začínají shánět potravu a partnera, s kterým se budou pářit. Všichni dospělí jedinci se živí rostlinnými cukry, které získávají v podobě nektaru, či ovocných šťáv (Foster a Walker, 2019), ty fungují jako zdroj energie nezbytný k základním životním potřebám. Po rozmnožování dochází k rozrůznění potravy mezi pohlavími. Samice po spáření vyhledávají krevní potravu, která obsahuje nezbytné živiny nutné pro produkci vajíček. Samičky se živí krví na různých druzích

plazů, ptáků, savců a též na lidech. Délka života se pohybuje v rozmezí dvou týdnů až několika měsíců v závislosti na podmínkách prostředí (Nelson, 1986).

1.2.2 Rozšíření

Ae. aegypti je původem ze Subsaharské Afriky, kde se dodnes vyskytuje v podobě poddruhu *Ae. aegypti formosus* (Facchinelli et al., 2023). Ten je specifický tím, že po spáření samice preferují zvířecí krev namísto lidské (Powell a Tabachnick, 2013) a z toho důvodu nepřispívá k rozšiřování lidských onemocnění (Facchinelli et al., 2023). Z něj se poté vyvinul další poddruh, který se nazývá *Ae. aegypti aegypti* a v současné době se o něm mluví jako o *Ae. aegypti*. U něho došlo ke zdomácnění, naučil se ke kladení vajíček využívat jakékoliv nádoby. To mu přineslo mnoho příležitostí v blízkosti lidských obydlí a začal, jako svou krevní potravu využívat lidskou krev (Wint et al., 2022), s čímž je spojený přenos celé řady nemocí (Facchinelli et al., 2023).

Ae. aegypti se byl, díky domestikaci, schopný rozšířit i do okolních kontinentů. K prvnímu rozšíření došlo již v 16. století s rozvojem lodní dopravy (Wint et al., 2022). To umožnilo rozšiřování jedinců (vajíček) v barelech s vodou na území Jižní Evropy, a také ze Starého světa do Nového do oblastí tropických a subtropických (Nelson, 1986). Na počátku 20. století se hojně vyskytoval ve Francii, Řecku, Portugalsku, Itálii, Španělsku a Rusku. Následně mezi lety 1960 až 2000 došlo k významnému úbytku populace *Ae. aegypti* na území Palearktidy. Příčinou mohla být aktivní účast na kontrole populace vektorů chorob či zavedení vodovodů do vesnic, které zamezily přílišnému rozmnožování. Momentálně existují záznamy o výskytu jedinců na území Madeiry, jižního Egypta a Kavkazu, a také informace o sporadických výskytech na Tureckém pobřeží v oblasti Černého moře (Wint et al., 2022).

Podobný průběh rozšiřování byl též v Americe, kde se na počátku 19. století rozšířili jedinci ze střední části Ameriky směrem k jihu. To vedlo k zavedení programů na kontrolu velikosti populace, který pomohl na určitou dobu snížit její velikost. Efekt kontroly populace nebyl trvalý a později docházelo k opětovnému navracení jedinců do krajiny (Nelson, 1986).

Do východní Asie byl *Ae. aegypti* zavlečen podstatně později, koncem 19. století. I přes nárůst populace komárů v období 2. světové války se momentálně daří úspěšně kontrolovat velikost populace (Wint et al., 2022).

V současné době se tedy druh *Ae. aegypti* vyskytuje v celé tropické a subtropické oblasti napříč všemi kontinenty (Nelson, 1986).

Faktor, který momentálně zamezuje jeho šíření i do částí světa s mírným podnebím je především jeho neschopnost přežít zimy (Šebesta, 2016). Vajíčka jsou sice velmi dobře přizpůsobena k přežití teplých a suchých období, ale naopak mnohem hůře snášejí chladná období s minimálním obdobím sucha (Juliano et al., 2002). Ovšem ze studie Obholz et al. (2022) vyplývá, že z vajíček, která byla testována na přežití zimy v oblastech okrajového výskytu na území Ameriky, bylo na konci experimentu schopno se vylíhnout a pokračovat ve vývoji více než 50 %. Z čehož vyplývá, že nízké teploty již nadále nemusejí tvořit překážku v budoucí expanzi jedinců směrem do studenějších oblastí mírného pásu. Zároveň vlivem klimatické změny, dochází ke globálnímu oteplování, a to pro *Ae. aegypti* přináší mnohé příležitosti k znovuosídlení Evropy na území Submediteránu (Trájer, 2021) i ve vyšších nadmořských výškách (Ryan et al., 2019). Důležitou oblastí pro expanzi tohoto druhu může být břeh Černého moře, který by mohl v budoucnu sloužit jako výchozí bod pro budoucí šíření *Ae. aegypti* do Evropy (Trájer, 2021).

1.2.3 Vektor chorob

Ae. aegypti je hlavní přenašeč Žluté zimnice, podle čehož je též v anglickém jazyce nazýván „Yellow fever mosquito“ (Foote, 1961). Dále se výrazně podílí na přenosu virů Dengue, Zika a Chikungunya (Šebesta, 2016) a též na rozšiřování onemocnění zvířat, jako například *Dirofilariózy psů* (srdeční červivost) (Foote, 1961). Samice rodu *Ae. aegypti* nemají problém, na rozdíl od jiných druhů, shánět potravu během dne, a to jak ve venkovních prostorech, tak i ve vnitřních (Nelson, 1986).

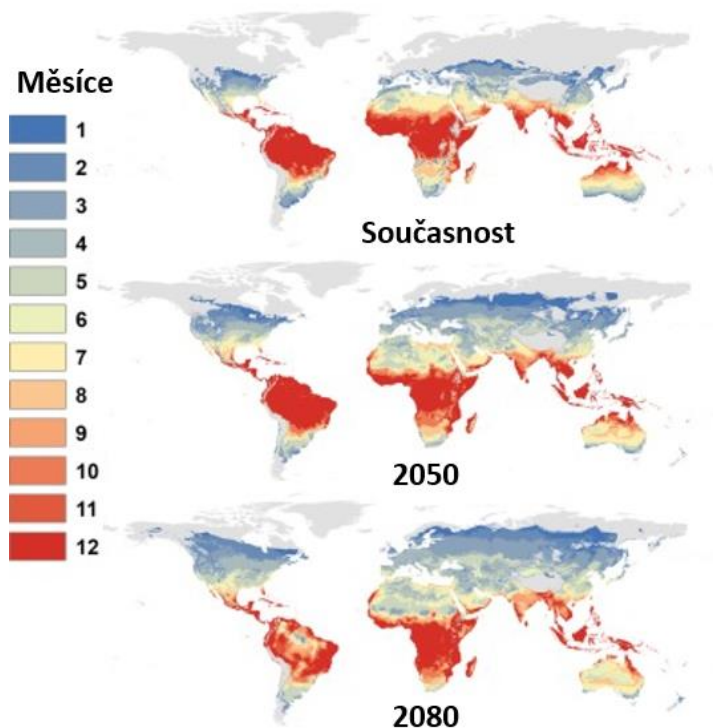
Expanze *Ae. aegypti* do nových oblastí v minulosti zapříčinila celou řadu celosvětových pandemií (Wint et al., 2022). Jakožto hlavní přenašeč viru Dengue je zodpovědný za propuknutí horečky Dengue v různých částech Ameriky a jihovýchodní Asie (Halstead, 2006) a velmi pravděpodobně také v Řecku mezi lety 1927 až 1928 (Wint et al., 2022) a v roce 2012 na Madeiře. Žlutá zimnice je běžně přítomna na území subsaharské Afriky a v tropické části Jižní a Střední Ameriky (Gianhecchi et al., 2022). V Evropě propukla poprvé ve Španělsku v letech 1819-1824 (Wint et al., 2022). *Ae. aegypti* se také podílel na propuknutí pandemie viru Zika v roce 2016 (Baud et al., 2017) a Chikungunyi například v Keni roku 2004 (Staples et al., 2009).

V tropických oblastech se mohou jedinci pářit celoročně, ale tento trend klesá směrem s oběma pólům Země. Ryan et al. (2019) navrhla mapu světa s rozšířením *Ae. aegypti* a délku přežití jeho dospělců (v počtech měsíců) na daném území. Z mapy vyplývá, že v současné

době žije na území, na kterém hrozí propuknutí nemocí přenášených *Ae. aegypti* během minimálně jednoho měsíce v roce 6,01 miliardy osob. Pouze nákaza horečkou Dengue hrozí pro více než polovinu populace Země a k nákaze dochází přibližně u 400 milionů osob ročně. Podobně významný je i virus Žluté zimnice, který ročně zabije 30 000 osob (Facchinelli et al., 2023).

Odhaduje se, že se do roku 2050 výrazně rozšíří území, kde budou schopni *Ae. aegypti* přežít jeden až dva měsíce v roce. Spolu s tím souvisí i zvětšení oblastí, kde se bude vyskytovat celoročně. K těmto územím se přidají i výše položené oblasti v tropech (Ryan et al., 2019).

S přibývajícím globálním oteplováním se předpokládá, že dojde v tropických oblastech k nárustu denních teplot na takovou hodnotu, při které nebudou *Ae. aegypti* schopni přenášet patogeny. Model od Ryan et al. (2019) naznačující očekávaný vývoj rozšíření a dobou přežití na jednotlivých kontinentech ukazuje, že dojde k úbytku oblastí, kde v minulosti docházelo k celoročním přenosům z důvodu přílišného nárustu teplot, příkladem je okolí řeky Amazonky, jak naznačuje Obr. 2. Nicméně se předpokládá, že momentálně žije na území, na kterém by v budoucnu mohl *Ae. aegypti* přežít po dobu celého roku dalších 600 milionů lidí, kteří mohou být ohroženi (Ryan et al., 2019).



Obr. 2. Mapa znázorňující současné oblasti s vhodnými teplotami pro přenos nemocí *Ae. aegypti* a predikce pro rok 2050 a 2080. Rozdílné barvy reprezentují počty měsíců, které znázorňuje měřítko, během kterých může docházet k přenosu nemocí. Staženo a upraveno z Ryan et al. (2019).

1.2.4 Kontrola populace

Z důvodu neustálého rozšiřování populace *Ae. aegypti* a s tím spojenému přenosu řady již zmíněných patogenů a vzniku epidemií, je zapotřebí kontrolovat velikost populace tohoto druhu (Mosquito Control, 2022).

Mezi metody, díky kterým mohou lidé udržet komáry mimo domov patří používání sítí ve všech oknech a dveřích, vyvarování se větrání a nahradit ho používáním klimatizací. V případě, že komáři proniknou do prostorů budov, je třeba pravidelně odstraňovat, nebo alespoň umívat veškeré nádoby se stojatou vodou, do kterých by mohly samice klást vajíčka. Dále je možnost použít vnitřní insekticidy, v horším případě kontaktovat odborníka (Mosquito Control, 2022).

Podobná pravidla platí i pro boj se škůdci mimo domov. Je třeba zbavit se veškerých stojatých vod. Pokud to není možné, je třeba použít víko či síť s dostatečně malým vzorkem, kterým komáři neproniknou (Mosquito Control, 2022).

Stále nejpoužívanější pro boj s komáry je aplikace chemických insekticidů, ale postupem času si jsou jedinci čím dál častěji schopni vytvořit si vůči insekticidům rezistenci, což z nich tvoří méně účinný nástroj ke kontrole komárů (Barrera et al., 2018).

Organizace pro kontrolu komárů používají různé strategie k regulaci velikosti populace. Jednou z nich je vypouštění predátorů. Například vypouštění klanonožců do míst, kde často dochází k vývoji larev (Kay a Nam, 2005). Mezi nové metody patří modifikace samců a jejich následné vypouštění do volné přírody. Prvním způsobem je genetická modifikace, kdy je do samčího genomu zabudují samoomezující geny, který samičkám brání vyvinout se v dospělého jedince a rozmnožit se. Další možností je ke kontrole využívat samce ozářené ionizujícím zářením. To zapříčiní jejich následnou sterilitu a po spáření dojde k naklazení vajíček, ale vajíčka se následně nejsou schopna vylíhnout. Na podobném principu je založený i poslední způsob. Jedná se o vypouštění samečků, kteří jsou nakaženi bakterií *Wolbachii*, která též způsobuje jejich sterilitu (Mosquito Control, 2022). Všechny tyto metody dokážou připravit samice o jednu snůšku, čím výrazně regulují růst populace. I přes to, že jsou tyto metody účinné, není možné tímto způsobem vyhubit celou populaci *Ae. aegypti* a též se mnohokrát ukázalo, že i přes to, že po vypouštění sterilních samců dojde ke snížení populace, po ukončení této činnosti dochází k opětovnému nárůstu počtu jedinců do původních hodnot (Dusfour a Chaney, 2021).

1.3 Rozmnožování

1.3.1 Pohlavní orgány

1.3.1.1 Samec

Samčí pohlavní soustava je složená ze tří hlavních částí, kterými jsou varlata, semenné váčky a přídatné žlázy.

U samců najdeme jeden pár varlat, která jsou uložena v dorsální části abdomenu v oblasti pátého a šestého segmentu. Ve varlatech se vytvářejí zralé spermie, které postupují přes kanálky až do semenných váčků (Clements, 1992c).

Semenné váčky jsou též párovým orgánem. Jsou v nich uloženy zralé spermie a poté přechází do ejakulačního vývodu, který ústí přímo do genitálního póru (Oliva et al., 2014). Stěny semenných váčků jsou roztažitelné a jejich velikost odpovídá množství uložených spermií. Bylo zjištěno, že s větším tělem přímo souvisí větší zásoba ejakulátu (De Jesus a Reiskind, 2016) a přenos většího počtu spermií během páření (Ponlawat a Harrington, 2007). Tento fakt ale nijak výrazně neovlivňuje plodnost samic, samice nezávisle na velikosti těla partnera produkují vždy stejný počet vajíček (De Jesus a Reiskind, 2016).

Přídatné žlázy jsou posledním párovým orgánem, který je navázán v koncové části ejakulačního vývodu. Pomocí svalových kontrakcí, je produkováno přídatnými žlázami velké množství sekretu, který se v místě ejakulačního kanálku setkává se spermiemi a napomáhá jim v migraci do spermaték (Oliva et al., 2014). Přídatné žlázy nejsou nezbytné k přenosu spermií do samice, ale jsou esenciální pro oplodnění oocytů. Sekrety přídatných žláz mají řadu dalších funkcí v těle samice (Clements, 1999b). Spolu se sekrety přídatných žláz předávají samci samicím během kopulace proteiny z matrony, které inhibují páření (Ramalingam a Craig, 1976), díky čemuž samice po spáření již nadále nevyžadují další kopulaci a nereaguje na případné pokusy po dobu jednoho či více cyklů kladení vajíček (Cator et al., 2009) a zvyšují ovipozici. Tyto proteiny jsou obsaženy v přední oblasti a v zadních žlázách přídatných žláz a ke zvýšení ovipozice je dostačující pouze zlomek. Dále také dochází k přenosu JH, jehož funkce je popsána v kapitole 1.4.1. (Ramalingam a Craig, 1976). Přítomnost sekretů přídatných žláz též snižuje procento harmonických konvergencí o více než 50 % oproti panenským samicím (League et al., 2019).

Samci se nemohou pářit bezprostředně po vylíhnutí. V prvních 24 hodinách po eklozi u nich musí dojít ke vztyčení fibrilárních chlupů tykadel pro získání schopnosti vnímat polohu samic a také dochází k rotaci terminální části genitálií o 180° (Oliva et al., 2014). Stejně tak

je zapotřebí, aby během prvních dnů dospělého života samce došlo k dozrání přídatných žláz (Takken et al., 2006).

Samci mohou během jednoho rojení kopulovat s velkým počtem samic, ale jejich zásoby ejakulátu jsou schopné oplodnit pouze pět až šest samic. Poté dochází k vyčerpání zásob spermií a sekretů přídatných žláz. Obnova začíná po kopulaci a je dokončena do původního stavu po dvou dnech (Jones, 1968).

1.3.1.2 Samice

Samice mají pohlavní soustavu složenou z vaječníků, spermaték a přídatných žláz.

Vaječníky jsou párovým orgánem, který se skládá z řady ovariol. Ovarioly ústí do laterálního vejcovodu, který se dál spojuje do jednoho společného. Každá ovariola je tvořena částí, kde dochází k mitotickému dělení a částí, kde je uložen primární a sekundární folikul. Vaječníky jsou obaleny ovarialní pochvou (Clements, 1992b).

Ae. aegypti má tři spermatéky, napojené v oblasti vagíny. Tento orgán slouží k shromažďování spermií po kopulaci. Samice jsou schopné uchovat spermie ve spermatéce po dobu několika dnů až měsíců, než je využijí k oplodnění vajíček (Clements, 1999c).

Přídatná žláza slouží ke tvorbě terciálních obalů vajíčka a k jeho ochraně (Clements, 1999a).

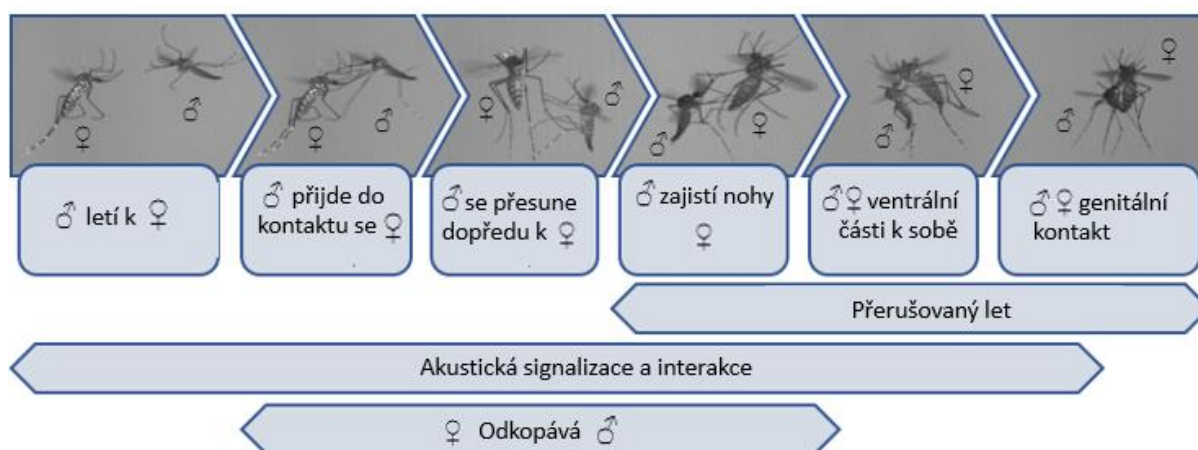
Samice jsou uzpůsobené k páření okamžitě po vynoření z kukly, ale ve většině případů dochází k páření 24-48 hodin po vykuklení (Takken et al., 2006).

1.3.2 Páření

Páření probíhá ve vzdušných rojích tvořených samci s malým množstvím samic, ale též v malých skupinách či jednotlivě (Oliva et al., 2014). Pářící roje se vytvářejí v blízkosti hostitelů, kteří následně mohou sloužit samicím jako zdroj potravy (Downes, 1969). Doposud nebylo prokázáno, že by u samců během rojení docházelo k obraně vlastního teritoria, spíše se jedná o souboj v rychlosti o to, kdo dříve dosáhne úspěšné kopulace se samicí (Diabaté et al., 2011).

Celkový proces páření je velmi rychlý a ve většině případů je kratší než šedesát sekund (League et al., 2021). Samice jsou schopné nalézt vzdušné roje pomocí čichu, který je pravděpodobně podpořený též vizuálními signály (Takken et al., 2006). Samci naopak rozpoznávají přilétající samice za pomoci sluchu (Benton P., 1994), samice mají nižší

frekvenci úderů křídel a díky tomu jsou snadno rozpoznatelné (Takken et al., 2006). K rozpoznání samic používají samci i chemické či vizuální signály, což dokazují výsledky experimentu Araripe et al. (2018), kde byli samci schopni identifikovat samici i v případě, kdy byla připravena o křídla. V momentě, kdy samice přilétá do roje, začíná být atakována samci, kteří se k ní pokoušejí přiblížit a pářit se s ní. V případě, že se některému samci podaří dostatečně přiblížit k samici bez toho, aniž by byl odmítnut (Aldersley a Cator, 2019), zachytí samici pomocí nohou s malými háčky (Jones, 1968), přesune se dopředu a zaujme pozici, kdy se ventrální části těl obou jedinců srovnají proti sobě. Tato pozice je uváděna jako zásadní pro dosažení genitálního kontaktu (Jones a Pilitt, 1973). Jestliže se tak stane, následuje finální část procesu, při kterém se samec snaží přiblížit své genitálie do těsné blízkosti samičích genitálií, aby mohlo dojít ke kopulaci (Jones, 1968). Celý proces kopulace je znázorněn na Obr. 3..



Obr. 3. Diagram znázorňující jednotlivé kroky páření mezi uvázanou samicí a volně létajícím samcem *Ae. aegypti*. Před úspěšným pářením prochází pár všemi kroky. K odmítnutí pomocí kopů dochází od původního kontaktu do srovnání ventrálních částí těl obou partnerů k sobě. K odmítnutí pomocí přerušování letu dochází od zajištění samičích nohou samcem až po genitální kontakt. K akustické signalizaci a interakci dochází po celou dobu před genitálním kontaktem. Staženo a upraveno z Aldersley a Cator (2019).

Během kopulace se stává, že kopulující pár opouští prostředí roje, což může mít dvě vysvětlení. První říká, že se jedná o způsob, jakým se vyvarují rušení. V druhém případě by k tomuto mohlo docházet na popud samice, která se pokouší zabránit kopulaci nárazem na zem či substrát (Aldersley a Cator, 2019).

1.3.3 Faktory ovlivňující páření

Výběr partnera je řízený vizuálními, hmatovými, čichovými, ale především akustickými podněty.

Celá řada studií se zabývala jevem zvaným Harmonická konvergence (HK). K té dochází během námluv, kdy se k sobě dva jedinci přiblíží a samci upravují svůj letový tón tak,

aby se co nejvíce podobal letovému tónu samičky (Cator et al., 2009). Rozmezí frekvence letového tónu samiček je 300-600 Hz. Tato variabilita je způsobena tím, že letový ton samiček je velmi ovlivňován okolní teplotou a zjistilo se, že s každým oteplením o jeden °C dochází ke zvýšení letového tónu o 8-13 Hz (Villarreal et al., 2017). Ve studii Cator a Herrington 2011 bylo prokázáno, že pokud během námluv došlo k HK, zvýšila se pravděpodobnost na úspěšné vytvoření kopule. Zároveň bylo prokázáno, že potomci konvergujících párů byli více úspěšní ve svém páření oproti potomků párů, které nedosáhly během páření HK. To poukazuje na možný genetický přenos úspěchu páření. Ovšem toto tvrzení vyvrací práce League et al. 2021, která neprokázala, že by HK byla signálem dobrých genů, které by byly schopné ovlivnit kvalitu potomků a přenos těchto vlastností do dalších generací. Úspěšná HK je především znakem dobré fyzické zdatnosti samce (Aldersley a Cator, 2019). A bylo prokázáno, že u samců nelze docílit zvýšení úspěšnosti HK za pomoci zvýšení množství potravy během vývoje (Cator a Zanti, 2016).

Důležitou roli při výběru partnera může též hrát velikost těla. Co se týká úspěšnosti samců, tak v tomto ohledu bylo dokázáno, že malé samice *Ae. aegypti* preferují pro páření malé samce (Callahan et al., 2018). Naopak velcí samci jsou úspěšnější při páření s velkými samicemi v případě, když dochází ke konvergenci, ale jsou méně úspěšní u malých samic (Cator a Zanti, 2016). K páření velkých samic dochází častěji, než k páření malých a ve většině případů samice preferují starší partnery (Harrington a Ponlawat, 2009). U *Anopheles gambiae* bylo prokázáno, že větší samci byly v páření více úspěšní než menší (Sawadogo et al., 2013), což je v rozporu s výsledky Charlwood et al. 2002, kde se ukázalo, že u tohoto druhu nezáleží na velikosti těla při výběru partnera.

Celkově lze tedy říct, že úspěšné páření je závislé nejen na signálech HK, ale i na velikosti těl obou partnerů (Cator a Zanti, 2016).

1.3.4 Odmítnutí

Aldersley a Cator 2019 tvrdí, že o tom, zda dojde k páření rozhodují výhradně samice. V případě nespokojenosti odmítají partnera, ale mají pouze pár sekund, kdy jsou toho schopné. V počáteční fázi námluv může docházet k zamezení přiblížení pomocí uhýbání v letu. Pokud dojde ke kontaktu a samice není schopná odletět, existují dva způsoby, kterými se může vymanit z interakce. V experimentu bylo zaznamenáno u více než poloviny interakcí odmítnutí samce za pomoci kopů, jak naznačuje Obr. 3.. K tomuto dochází s vysokou četností především během prvních několika sekund interakce. Pokud byli samci schopni překonat tuto

počáteční fázi a zaujali pozici, kdy jsou srovnáni ventrální stranou k samici, jejich šance na kopulaci se poté pohybovala kolem 77 %. Bylo prokázáno, že samci, kteří kopulovali, byli kopáni s nižší frekvencí a dokázali déle udržet párový let. Vysoké množství kopů může negativně ovlivňovat celoživotní zdatnost samice, což se projevuje i na frekvenci kopů, kterých s přibývajícím množstvím kontaktů ubývá. Posledním způsobem, kterým jsou samci odmítáni je prosté zastavení letu, které též vede k ukončení interakce, ale bylo účinné pouze do doby, než byly srovnány ventrální části těl k sobě. Ve většině případů dochází k tomu, že úspěšně kopulující samci jsou tací, kteří nebyli ani jednou odmítnuti.

1.3.5 Přenos spermií a krevní potrava

Během jedné kopulace samec obvykle přeneše do samice okolo 2 000 spermií. Spermie putují do bursy. Poté dojde k úplné změně směru plavání, spermie se otáčejí a putují kanálky do spermaték. Ve většině případů dochází k osídlení dvou spermaték ze tří, kdy jedna spermatéka v sobě může uchovávat až 1 000 spermií. Spermie ve spermatékách přežívají, dokud nedojde k jejich použití k oplodnění vajíček, nebo do konce života samičky (Jones, 1968). K páření dochází zpravidla jednou za život samice, ale není tomu tak vždy. V případě, kdy není spermatéka dostatečně naplněna spermiemi dochází k polyandrii a samice si hledá i dalšího partnera. Toto se děje u méně než 10 % jedinců (Helinski et al., 2012). Spermie se dostávají do vajíčka v momentě, kdy dochází ke kladení. Za nepříznivého počasí je samice schopná uchovávat zralá vajíčka ve vaječnicích, dokud nenastanou ideální podmínky pro vývoj vajíček (Jones, 1968).

Ve většině případů dochází k jednomu krmení krví pro produkci jedné snůšky vajíček. Výjimečně se samice krmí dvakrát v závislosti na velikosti a zásobách energie. Po nasátí krví přestávají být samice pro samce atraktivní. Příčinou je právě příjem potravy, který zvýší celkovou hmotnost samice, na což reaguje zrychlením frekvence tlukotu křídel, a právě tato změna již nadále není pro zbylé samce přitažlivá (Cator et al., 2009).

1.4 Juvenilní hormon (JH)

Jedná se o acyklický seskviterpen, který je produkován v *corpora allata* (CA). CA je miniaturní endokrinní žláza, která je spojena s mozkiem. Množství JH v hemolymfě organismu je převážně řízeno rychlostí jeho syntézy v CA (Saleuddin et al., 2021).

1.4.1 Funkce JH

JH ovlivňuje růst, vývoj, diapauzu, metamorfózu, reprodukci, ale též chování (Saleuddin et al., 2021).

Během vývoje JH reaguje na aktuální nutriční stav organismu, především na hladinu inzulínu a ekdyzonu. V závislosti na tom řídí růst a metamorfózu mezi jednotlivými vývojovými stádii. Nejdůležitější funkcí JH je udržování juvenilního stavu tak dlouho, dokud larvy nebudou mít dostatečnou velikost pro metamorfózu. Když se tak stane, dochází k vymizení nebo k poklesu hladiny JH, což spouští metamorfózu. U *Bombyx mori* bylo prokázáno, že JH není potřebný během embryonálního vývoje (Saleuddin et al., 2021). Během nepříznivých období JH zahajuje diapauzu, během níž dochází k snížení hladiny JH v hemolymfě (Batz et al., 2019).

JH je důležitý při řízení reprodukce. V případě, kdy jedinec nemá dostatek živin, dokáže vyřadit reprodukční chování a donutí ho soustředit se na přežití (Saleuddin et al., 2021). JH se u samic podílí na vývoji folikulů (Clements, 1992a). U komárů je JH potřebný k přípravě samičích orgánů na oogenezi, přípravě střev na příjem krevní potravy a zvyšuje ukládání lipidů před nasátím krví. Před nasátím krví a během vitelogeneze se též podílí na alokaci živin (Saleuddin et al., 2021). V případě, kdy jsou larvy komárů chovány s nižším množstvím potravy, dochází k vývoji menších jedinců, kteří mají nižší zásoby lipidů, proteinů a glykogenu, než je běžné a mají menší množství JH. Tento stav se dá zvrátit zvýšeným přísunem potravy s vysokým obsahem cukru u dospělců (Caroci et al., 2004). Z počátku po nasátí krví klesá množství JH, ale následně dochází k opětovnému zvýšení do původního stavu. Na rychlém poklesu hladiny JH v hemolymfě během pár hodin po nasátí krví se podílí JH esteráza, která je produkována převážně tukovým tělesem (Clements, 1992a). Záleží nejen na hladině JH v hemolymfě, ale též na množství receptorů JH. Ten ovlivňuje katabolismus lipidů a následně působí na líhivost vajíček (Lyu et al., 2023).

U samců *Ae. aegypti* dokáže množství potravy ovlivňovat nejen rychlost syntézy JH v CA, ale také koreluje s množstvím JH, který je samec schopný během inseminace předat samici (Clifton et al., 2014). JH u samců také řídí sekreci přídatných žláz (Nouzova et al., 2018) jejich vývoj a velikost (Ramalingam a Craig, 1977). Právě JH přítomný v sekretech přídatných žláz předaný samici během kopulace následně zvyšuje hladinu JH samice a tím dochází k zvýšení zásoby lipidů uložených ve vaječnicích, snižuje resorpci a zvyšuje množství

vyprodukovaných vajíček (Clifton et al., 2014). V případě odstranění CA u samců dochází k přerušení sekrece přídatnými žlázami (Ramalingam a Craig, 1977).

Obecně JH ovlivňuje i chování a nervovou soustavu jedince (Saleuddin et al., 2021). Například u *Drosophila melanogaster* dokáže ovlivnit vnímavost panenských samic k samcům během námluv, načasování páření a stimuluje produkci feromonů. Při odstranění CA u obou pohlaví se prodloužila doba začátku produkce feromonů a tím i začátku páření, samice se jeví pro samce méně atraktivní (Bilen et al., 2013). U samců má vliv na paměť námluvních tanců. V případě, kdy se sníží hladina JH dochází ke zhoršení kvality paměti. U obou pohlaví JH působí na agresivitu jedince, která vzrůstá s přítomností pohlavních peptidů, které stimuluje jeho produkci (Saleuddin et al., 2021).

1.4.2 Syntéza

Syntéza JH se skládá z 13 enzymatických reakcí. Poslední přeměna, která vede ke vzniku JH je přeměna methyl farnesoátu (MF) na JH pomocí JH epoxidázy (EPOX). Tok isoprenoidů je důležitým regulátorem syntézy JH (Saleuddin et al., 2021).

Nouzova et al. 2021 vytvořila mutantní jedince, kteří postrádají EPOX (*epox^{-/-}*) a syntetizují pouze MF. Ukázalo se, že JH není nezbytný k vývoji životaschopného jedince, a že k tomu stačí pouze MF. K určitým změnám ale dochází již během vývoje. Vývoj je prodloužený a k zakuklení dochází 8. den. Dále se ukázalo, že larvy 4. instaru vykazují různé fenotypové změny, jako jsou tmavěji zbarvené hlavové pouzdro a sifon, ale též menší velikost těla, která se promítá i na dospělé jedince, kteří jsou menší než wild type (*wt*) jedinci. U *epox^{-/-}* samic se vyvinuly menší previtelogenní folikuly v nižším počtu s nižší zásobou lipidů a daly vzniku polovičnímu počtu jedinců oproti *wt* samicím průměrné velikosti. U samců mutace ovlivnila jejich reprodukční zdatnost, kdy nebyli schopni konkurovat *wt* samcům o *wt* samice a zplodili méně potomstva. Výsledky práce Nouzova et al. 2021 prokázaly, že epoxidace JH byla důležitou inovací ve vývoji hmyzu, která umožnila zvýšení jeho reprodukční schopnosti. Linie *epox^{-/-}* bude využita v této práci pro studium vlivu JH na reprodukční schopnost samců *Ae. aegypti*.

1.4.3 Metopren

Je analog JH, který se významně podílí na regulaci vývoje. Používá se jako insekticid, který po aplikaci na larvy *Ae. aegypti* způsobí, že dochází k zakuklení a posléze jedinci umírají

ve stádiu kukly (Parthasarathy a Palli, 2021). Pro zahubení dospělého jedince je zapotřebí mnohem vyšší dávka. Malé dávky mají dopad na snížení plodnosti samic a líhivosti vajec (Brabant a Dobson, 2013). Naopak při aplikaci metoprenu samicím, které se vyvinuly malé s nedostatečnou zásobou živin napomáhá zvýšit previtelogenní vývoj primárních folikulů (Caroci et al., 2004) a takováto aplikace je schopna zvýšit zásobu lipidů ve folikulech na úroveň samic, které byly krmeny stravou s dostatečným obsahem sacharózy (Clifton a Noriega, 2012). V případě *epox^{-/-}* samic byl schopný též zvýšit počet a velikost previtelogenních folikulů a zvýšil obsah lipidů v oocytech. Při aplikaci na průměrné *wt* samice také došlo ke zvětšení previtelogenních folikulů (Nouzova et al., 2021).

U *wt* samců *Aa. aegypti*, aplikace metoprenu urychlila a zvýšila sekreci přídatných žláz i celkovou velikost orgánu. Vedla též k zvýšení počtu inseminovaných samic, což platilo i u jedinců, u kterých před aplikací došlo k vyčerpání zásob sekretu přídatných žláz. U samic byly následně nalezeny spermie i v třetí spermatéce (Ramalingam a Craig, 1977).

2 Cíle práce

Cílem práce bylo zjistit, proč *epox^{-/-}* samci postrádající JH nejsou schopni konkurovat samcům *wt*. Otestovali jsme dvě hypotézy:

1. *Wt* samice si vybírají partnera na základě tělesné velikosti, a proto menší *epox^{-/-}* samci jsou méně úspěšní v konkurenci s většími *wt* samci. Snížení velikosti *wt* samců by mělo odstranit tuto výhodu.
2. Snížená reprodukční zdatnost u *epox^{-/-}* samců je způsobena slabší MF signalizací, proto by ektopická aplikace silného analogu JH metoprenu měla obnovit *epox^{-/-}* samčí reprodukční zdatnost.

3 Metodika a materiály

3.1 Použité linie komárů

K experimentům byly použity následující linie komárů druhu *Aedes aegypti* (kmen Orlando): Linie wild type (*wt*), mutantní line *epox^{-/-}*, která byla vytvořena v minulosti v laboratoři doktorky Nouzové pomocí CRISPR/CAS9 editace genomu (Nouzova et al., 2021). Do čtvrtého exonu genu pro epoxidázu byl vložen gen eCFP umožňující identifikovat mutantní jedince pod fluorescenčním mikroskopem podle modrého eCFP signálu v očích a linie komárů exprimující v očích červený fluorescenční protein dsRed, která se v heterozygotní formě chová jako *wt* (dsRed *wt*).

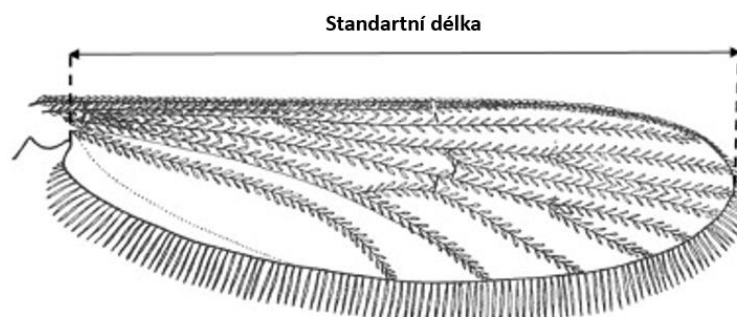
3.2 Chov komárů

Komáři byli chováni v insektáriu při teplotě 28 °C, relativní vlhkosti 80 % a pravidelném střídání světla a tmy v intervalech 16 hodin světlo následované 8 hodinami tmy. Vajíčka byla líhnuta v deionizované, odkysličené vodě za přítomnosti potravy v podobě rozpuštěné tablety krmiva pro tropické ryby „Tablets TabiMin“ značky Tetra (dávkování na nádobu: den 1. ¼ tablety, den 2. 1 tableta, den 3. 1 tableta, den 4. dvě tablety, den 5. 2 tablety, den 6. 1 tableta). Larvy byly chovány v obdélníkových poloprůhledných plastových nádobách v 6 litrech destilované vody. Přibližně po 6 dnech docházelo k zakuklení larev. V tomto stádiu bylo již možné rozlišit jednotlivá pohlaví a bylo prováděno oddělování samců a samic, aby se zamezilo případnému spáření jedinců hned po vykuklení. K vykuklení docházelo přibližně po 48 hodinách. Dospělí jedinci byli chováni v klecích o objemu 4,7 litru a byly krmeny na čtvercích vaty napuštěných desetiprocentním vodným roztokem sacharózy. Pro získání dospělců menší velikosti, než je běžné při ideálních podmínkách, bylo zapotřebí upravit životní podmínky, v kterých se vyvíjely larvy. Larvy byly chovány v menších plastových poloprůhledných kontejnerech v 0.65 litru vody a množství potravy bylo sníženo na jednu čtvrtinu.

3.3 Měření křídel

Pro přesné určení délky křídla bylo křídlo odříznout a umístěno na podložní skličko. Poté byla křídla měřena pomocí kalibrovaného binokulárního mikroskopu (Leica MZ75) od apikálního zářezu po axilární konce křídel s výjimkou křidelního lemu, znázorněno na Obr. 4.

(Mohammed a Chadee, 2011). Délka křídel byla odečtena dle měřítka v okuláru kalibrovaného mikroskopu při zvětšení 0,8x a následně byla převedena na mm.



Obr. 4. Délka křídla měřená od apikálního zářezu po axilární konce křídla s výjimkou křídelního lemu. Převzato a upraveno z Mohammed a Chadee (2011).

3.4 Pářící experiment

Dospělí samci a samice byli chováni odděleně po dobu 4 dnů od vykuknutí. Pro pářící experiment bylo většinou 10 a 10 samců dvou testovaných genotypů či velikostí ponecháno k aklimatizaci po dobu 4 hodin v kleci o velikosti 4,7 litru a následně k nim bylo přidáno 10 samic. Po uplynutí 48 hodin, během kterých si mohly samice zvolit partnera a s ním se spářit, byly samci odděleni, roztríděni podle signálu v očích pod mikroskopem s fluorescencí (Axioplan 2 Zeiss) a byla jim změřena křídla. Oplodněné samice byly nakrmeny krví a ponechány 48 hodin. Během této doby byla pro každou samici připravena sklenička s filtračním papírkem a s 2ml destilované vody. Následně byly samice jednotlivě umístěny do skleniček, kde mohly klást vajíčka na filtrační papírek. Po 4 dnech byly samice odebrány a byla jim změřena délka křídel. Vajíčka byla vylíhnutá v deionizované, odkysličené vodě s krmivem. Následující den byly larvy prvního instaru odděleny od papírku s vaječnými skořápkami a nevylíhnutými vajíčky. Pro každou samici bylo spočteno, kolik vajíček bylo nakladeno a kolika vajíčkům se nepodařilo vylíhnout. Počítání bylo prováděno z důvodu kontroly konstantního průběhu experimentu. Pro určení otcovství, byly larvy prvního instaru analyzovány pod fluorescenčním mikroskopem. Larvy jejichž otcem byl samec *epox*^{-/-} měly pod fluorescenčním mikroskopem v oku modrý signál, larvy jejichž otcem byl samec *dsRed wt* měly červený signál a larvy jejichž otcem byl *wt* samec byly bez fluorescenčního signálu. Všechny experimenty byly prováděny ve 3-10 opakováních a všechny získané hodnoty byly zaznamenávány a následně statisticky vyhodnoceny.

3.5 Aplikace metoprenu

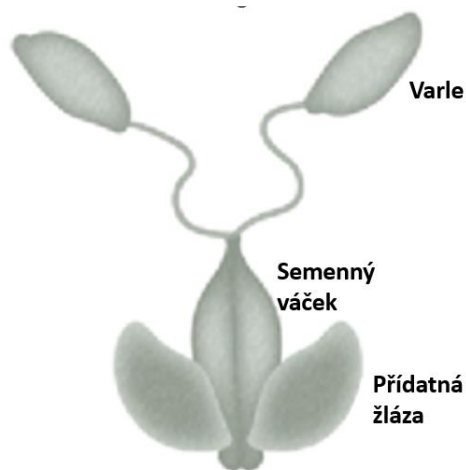
Pro metoprenový test byli použiti 12–24 hodin staří dospělí samci. Roztok metoprenu v acetonu o koncentraci 1000 ng/μl byl ektopicky aplikován do přední části zadečku *epox^{-/-}* samců v množství 0,25 μl. *Wt* samcům byl aplikován aceton v množství 0,25 μl. Jako kontrola byli použiti *wt* i *epox^{-/-}* samci, kterým bylo aplikováno 0,25 μl acetonu. Dále byly experimenty prováděny stejným způsobem jako je popsáno v části 3.4.. Účinnost roztoku metoprenu byla ověřena aplikací připraveného roztoku na *wt* samice. Je známo, že aplikací analogu JH dochází ke zvýšení akumulaci lipidů v primárních previtelogeních folikulech (Clifton a Noriega, 2012).

3.6 Imunohistochemické barvení pohlavních orgánů samce

Metoda byla převzata z protokolu imunohistochemického barvení Maaroufi et al. (2022) s drobnými úpravami. Komáří *wt* i *epox^{-/-}* samci, samci *wt* i *epox^{-/-}* s aplikovaným acetonem a *epox^{-/-}* samci s aplikovaným metoprenem byli vybráni a umístěni do studené anestezie, poté byli krátce ponořeni do etanolu, aby se tělesná kutikula zbavila přebytečného kyslíku. Následně byli samci umístěni do fosfátového pufru (1xPBS) k pitvě. Reprodukční systém byl vyjmut, očištěn od nežádoucích tkání a fixován ve 4 % paraformaldehydu (PFA) po dobu 20 minut. Následně byly tkáně dvakrát promyty po dobu 10 minut; nejprve v 0,01 % PBST (1xPBS s 0,01 % Tritonem) a poté v 0,3 % PBST. Následně byly vzorky inkubovány v roztoku DAPI (#MBD0015, Sigma-Aldrich, Německo) (0,7 μl DAPI + 1 ml 0,01 % PBST) po dobu 10 minut. Po dalších třech kolech promytí 1xPBS vždy po dobu 5 minut byly vzorky umístěny mezi krycí a podložní skličko a fixovány přes noc pomocí montážního média Fluoromount G .

3.7 Měření velikosti přídatných žláz

Reprodukční orgány byly zobrazeny pomocí laserového skenovacího konfokálního mikroskopu FluoView™ FV1000 (Olympus, Tokio, Japonsko). Pro zjištění velikosti přídatných žláz (Obr. 5) byly snímky analyzovány pomocí softwaru ImageJ (Schneider et al., 2012).



Obr. 5. Mužské pohlavní orgány rodu *Aedes*. Znázorňuje varlata, semenné váčky a přídavné žlázy. Staženo a upraveno z Alfonso-Parra et al. (2022).

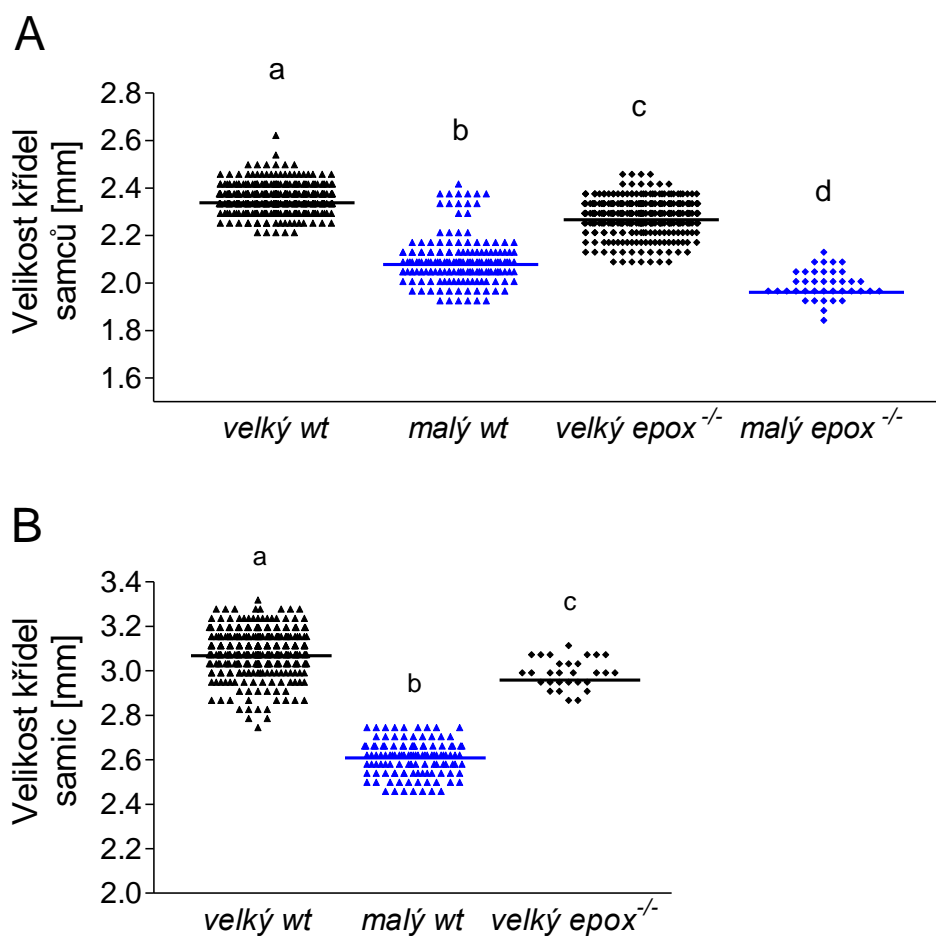
3.8 Statistická analýza

Všechna získaná data byla analyzována pomocí softwaru GraphPad Prism. Statistická průkaznost rozdílů byla stanovena pomocí nepárového t-testu, nebo jednocestnou ANOVOU s následným užitím Tukeyho testu.

4 Výsledky

4.1 Měření křídel

Pro ověření našich hypotéz jsme potřebovali vytvořit jedince různých velikostí. Toho jsme docílili úpravou životních podmínek, v kterých se jedinci vyvíjeli. Pro získání jedinců menší velikosti jsme zvýšili počet larev na objem vody a snížili jsme množství potravy, jak je popsáno v části Metodika a materiály (3.2).



Obr. 6. Průměrná délka křídel *wt* a *epox^{-/-}* jedinců. Délka křídel, měřena od apikálního zářezu po axilární konce křídel s výjimkou křídelního lemu, byla odečtena dle měřítka v okuláru kalibrovaného mikroskopu. (A) Křídla velkých *wt*, malých *wt*, velkých *epox^{-/-}* a malých *epox^{-/-}* samců. Každý bod představuje délku křídla jednoho samce. (B) Křídla velkých *wt*, malých *wt* a velkých *epox^{-/-}* samic. Každý bod představuje délku křídla jedné samice. Čáry v obou grafech znázorňují průměry měření, písmena nad značkami naznačují průkazné rozdíly ($P \leq 0,001$, jednocestná analýza variance s Tukeyho mnohonásobným porovnáním).

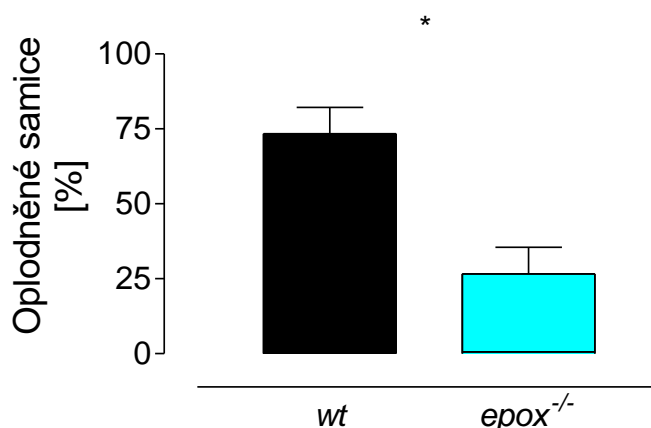
Z Obr. 6. vyplývá, že úpravou životních podmínek jsme vytvořit malé a velké jedince obou pohlaví i genotypů. Velcí *wt* samci měli průměrnou délku křídla 2,360 mm ($n = 359$), malí *wt* samci 2,097 mm ($n = 164$), velcí *epox^{-/-}* samci 2,286 mm ($n = 340$) a malí

epox^{-/-} samci 1,995 mm (n = 39). Velké *wt* samice měly průměrnou délku křídla 3,089 mm (n = 304), malé *wt* samice 2,610 mm (n = 117) a velké *epox*^{-/-} samice 2,993 mm (n = 29).

Naměřené hodnoty velikosti křídel dokazují, že se nám podařilo vytvořit malé a velké jedince pomocí úpravy životních podmínek, a že existují značné rozdíly mezi malými a velkými jedinci stejného genotypu. Dále se potvrdilo, že velcí *epox*^{-/-} jedinci jsou v porovnání s velkými *wt* jedinci menší, ale byly jsme schopni vytvořit i *wt* jedince menší velikosti.

4.2 Volba *wt* samic mezi *wt* and *epox*^{-/-} samci

Nejprve byl zopakován původní experiment, který testoval reprodukční konkurenceschopnost *epox*^{-/-} samců vůči *wt* samcům při kontaktu s *wt* samicemi. Do klece o velikosti 4,7 l bylo umístěno 10 velkých *wt* samic spolu s 10 velkými *epox*^{-/-} samci a 10 velkými *wt* samci. Experiment byl proveden ve třech opakování.



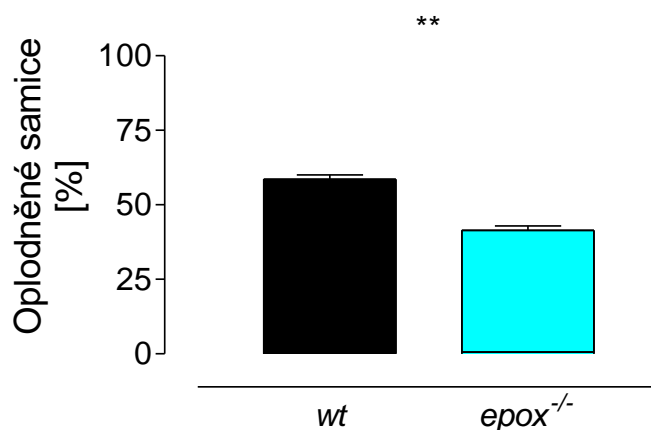
Obr. 7. Test reprodukční konkurenceschopnosti mezi *wt* a *epox*^{-/-} samci. 10 velkým samcům obou genotypů bylo umožněno pářit se s 10 velkými *wt* samicemi v pářící kleci. Po genotypizaci potomstva larev pomocí eCFP transgenu, který označuje mutovanou alelu *epox*, byl vyhodnocen počet inseminovaných samic samci obou genotypů v procentech. Sloupce představují průměr procent ± SEM ze třech nezávislých testů (nepárový t test, * $P \leq 0,05$).

Z Obr. 7. vyplývá, že úspěšnost *wt* samcům byla 73.33 ± 8.819 % pro třech opakování. Oproti tomu *epox*^{-/-} samci byli úspěšní u 26.67 ± 8.819 % samic.

Výsledky testu ukázaly, že experimenty prováděné v našich laboratorních podmínkách odpovídají původním experimentům Nouzova et al. (2021). V případě, kdy má *wt* samice možnost zvolit si partnera z obou genotypů maximální zdatnosti, ukazuje se prokazatelná preference *wt* samců. *Epox*^{-/-} samci nejsou schopni konkurovat *wt* samcům.

4.3 Volba *epox*^{-/-} samic mezi *wt* and *epox*^{-/-} samci

V tomto experimentu jsme chtěli zjistit, jak se budou chovat *epox*^{-/-} samice, zda budou preferovat maximálně velké samce stejného genotypu, nebo budou raději volit velké *wt* samce. Z tohoto důvodu bylo do klece o velikosti 4,7 l umístěno 10 velkých *epox*^{-/-} samic spolu s 10 velkými *wt* samci a 10 velkými *epox*^{-/-} samci. Experiment byl proveden ve třech opakování.



Obr. 8. Test reprodukční konkurenceschopnosti mezi *wt* a *epox*^{-/-} samci. 10 velkým *epox*^{-/-} samcům a 10 velkými *wt* samcům bylo umožněno pářit se s 10 velkými *epox*^{-/-} samicemi v pářící kleci. Po genotypizaci potomstva larev pomocí eCFP transgenů, který označuje mutovanou alelu *epox*, byl vyhodnocen počet inseminovaných samic samci obou genotypů v procentech. Sloupce představují průměr procent ± SEM ze třech nezávislých testů (nepárový t test, ** $P \leq 0,01$).

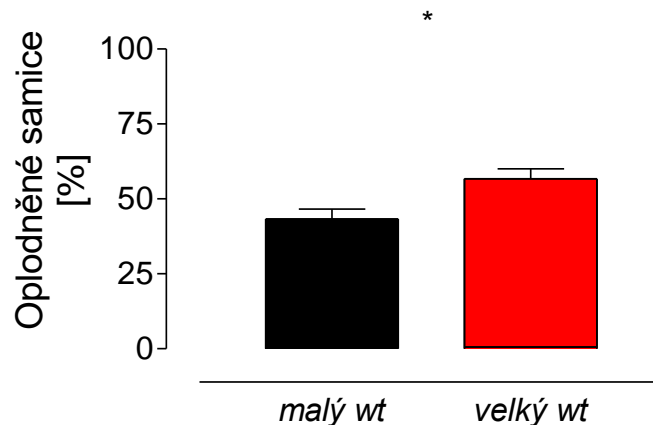
Z Obr. 8. vyplývá, že *wt* samci byli v tomto případě úspěšní u 58.52 ± 1.481 % samic na rozdíl od *epox*^{-/-} samců, kteří se průměrně pářili s 41.48 ± 1.481 % samic.

I *epox*^{-/-} samice pro páření preferují *wt* samce.

4.4 Role velikosti těla u *wt* komárů

4.4.1 Volba velkých *wt* samic

Chtěli jsme zjistit, jakou roli hraje velikost těla při výběru samců u *wt* komárů. Z toho důvodu bylo nutné označit samce. K experimentu byli použiti *wt* samečci, kteří měli jednu alelu genu pro dsRed pod 3xP3 promotorem a díky tomuto značení mohli být jejich potomci identifikováni pod fluorescenčním mikroskopem. Nejprve jsme otestovali preference velkých *wt* samic, zda si zvolí spíše velké dsRed *wt* samce, nebo malé *wt* samce. Pro tento test bylo do klece o velikosti 4,7 l umístěno 10 velkých *wt* samic spolu s 10 velkými dsRed *wt* samci a 10 malými *wt* samci. Test byl prováděn ve čtyřech opakováních.



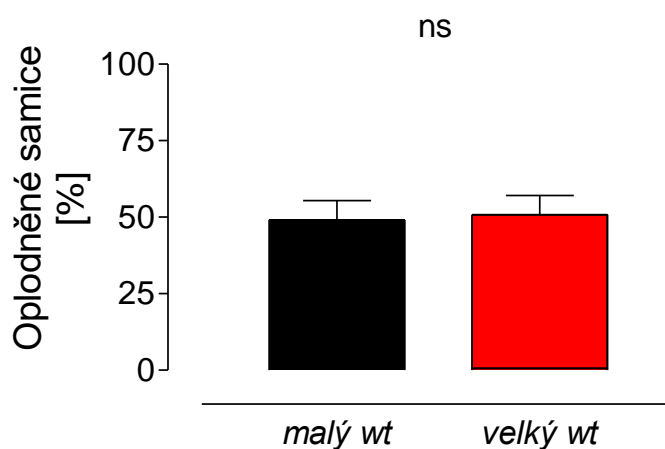
Obr. 9. Test reprodukční konkurenceschopnosti mezi *wt* samci různých velikostí. 10 malým *wt* samcům a 10 velkým *dsRed wt* samcům bylo umožněno pářit se s 10 velkými *wt* samicemi v pářicí kleci. Po genotypizaci potomstva larev pomocí *dsRed* transgenu, který označuje mutovanou alelu nesenou velkými *wt* samci, byl vyhodnocen počet inseminovaných samic samci obou velikostí v procentech. Sloupce představují průměr procent \pm SEM ze čtyř nezávislých testů (nepárový t test, * $P \leq 0,05$).

Z Obr. 9. vyplývá, že malí *wt* samci se průměrně spáрили s 43.33 ± 3.333 % všech samic. U velkých *wt* samců byla úspěšnost průměrně u 56.67 ± 3.333 % samic.

Experiment s volbou velkých *wt* samic prokázal, že velké *wt* samice dávají přednost velkým *wt* samcům.

4.4.2 Volba malých *wt* samic

V druhém případě se testovalo, zda budou i malé *wt* samice preferovat velké *dsRed wt* samce, nebo si raději zvolí malé *wt* samce. Pro tento test bylo do klece o velikosti 4,7 l umístěno 10 malých *wt* samic spolu s 10 velkými *dsRed wt* samci a 10 malými *wt* samci. Test byl prováděn ve čtyřech opakování.



Obr. 10. Test reprodukční konkurenceschopnosti mezi *wt* samci různých velikostí. 10 malým *wt* samcům a 10 velkým *dsRed wt* samcům bylo umožněno pářit se s 10 malými *wt* samicemi v pářicí kleci. Po genotypizaci potomstva larev pomocí *dsRed* transgenu, který označuje mutovanou alelu nesenou velkými *wt* samci, byl

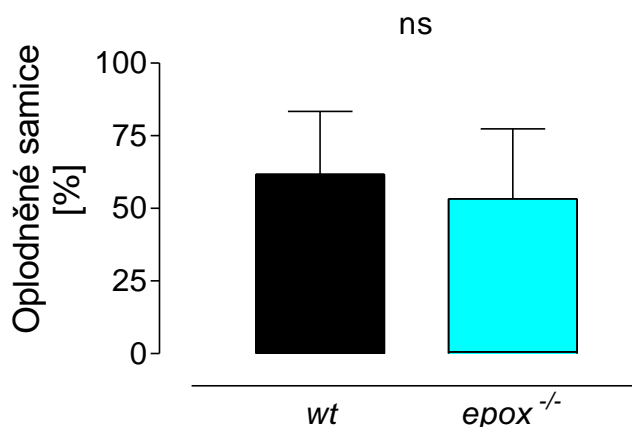
vyhodnocen počet inseminovaných samic samci obou velikostí v procentech. Sloupce představují průměr procent \pm SEM ze čtyř nezávislých testů (nepárový t test, ns, neprůkazný).

Z Obr. 10. vyplývá, že v tomto případě byly malí *wt* samci úspěšní u 49.17 ± 6.292 % samic a velcí *wt* samci u 50.83 ± 6.292 % samic.

To naznačuje, že malým *wt* samicím nezáleží na velikosti těla partnera. Přibližně se stejnou frekvencí doházelo ke spáření se samečkou obou velikostí.

4.5 Volba velkých *wt* samic mezi *wt* a *epox*^{-/-} samci stejné velikosti

V tomto experimentu bylo zjišťováno, jestli rozdíl ve velikosti těla je důvodem, proč si *wt* samice vybírají velké *wt* samce oproti menším *epox*^{-/-} samcům. Testovali jsme, jaká bude preference velkých *wt* samic v případě, že odstraníme velikostní rozdíl mezi oběma genotypy samců. Byli vychováni *wt* samci stejné velikosti, jako se dorůstají *epox*^{-/-} samci při ideálních podmínkách. Do pářicí klece o velikosti 0,4 l bylo umístěno pět velkých *wt* samic spolu s pěti *epox*^{-/-} a pěti *wt* samci, kteří měli téměř totožnou velikost těla. Experiment byl prováděn ve třech opakování.



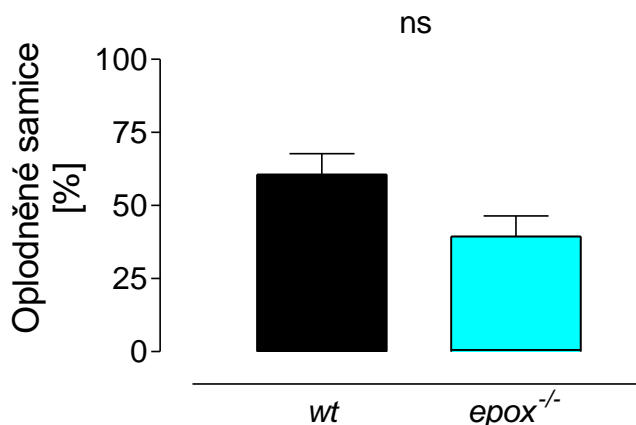
Obr. 11. Test reprodukční konkurenceschopnosti mezi *wt* a *epox*^{-/-} samci stejné velikosti. Pět samců každého genotypu přibližně stejné velikosti bylo umožněno pářit se s pěti velkými *wt* samicemi v pářicí kleci. Po genotypizaci potomstva larev pomocí eCFP transgenů, který označuje mutovanou alelu *epox*, byl vyhodnocen počet inseminovaných samic samci obou genotypů v procentech. Sloupce představují průměr procent \pm SEM ze třech nezávislých testů (nepárový t test, ns, neprůkazné).

Z Obr. 11. vyplývá, že *wt* samci byli schopni průměrně oplodnit 61.67 ± 21.67 % a v případě *epox*^{-/-} samců byla průměrná úspěšnost 53.33 ± 24.04 %.

Výsledek experimentu ukazuje mírnou preferenci pro *wt* samce, ale rozdíl není statisticky průkazný a variabilita je značná, jak ukazuje Obr. 11. Zdá se tedy, že odstraníme-li rozdíl velikosti těla samců, *epox*^{-/-} samci jsou schopni konkurovat *wt* samcům.

4.6 Volba velkých *wt* samic mezi *epox*^{-/-} samci a malými *wt* samci

V tomto experimentu bylo testováno, zda budou velké *wt* samice preferovat pro spáření raději mutantní *epox*^{-/-} samce maximální velikosti, nebo si raději zvolí *wt* samce, kteří dosahovali menších velikostí těla než mutantní samci. Do klece o velikosti 4,7 l bylo umístěno 10 velkých *wt* samic spolu s 10 velkými *epox*^{-/-} samci a 10 malými *wt* samci. Experiment byl proveden ve čtyřech opakování.



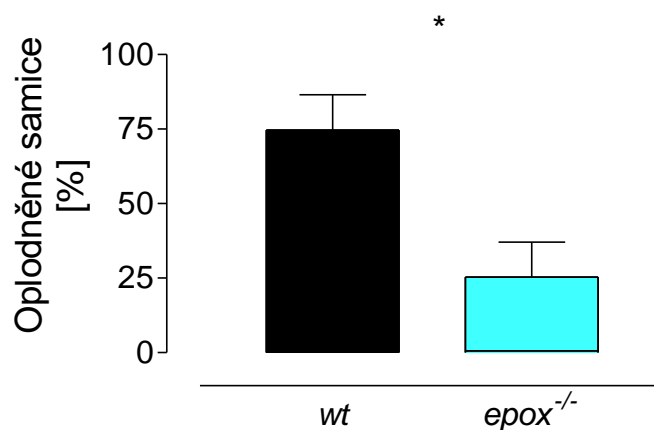
Obr. 12. Test reprodukční konkurenceschopnosti mezi *wt* a *epox*^{-/-} samci. 10 velkým *epox*^{-/-} samcům a 10 malým *wt* samcům bylo umožněno pářit se s 10 velkými *wt* samicemi v pářící kleci. Po genotypizaci potomstva larev pomocí eCFP transgenu, který označuje mutovanou alelu *epox*, byl vyhodnocen počet inseminovaných samic samci obou genotypů v procentech. Sloupce představují průměr procent ± SEM ze čtyř nezávislých testů (nepárový t test, ns, neprůkazný).

Z Obr. 12. vyplývá, že *wt* samci byli v tomto případě úspěšni u 60.63 ± 7.099 % samic na rozdíl od *epox*^{-/-} samců, kteří se průměrně pářili s 39.38 ± 7.099 % samic.

Výsledek experimentu ukazuje mírnou preferenci pro *wt* samce, ale rozdíl není statisticky průkazný. Zdá se tedy, že dojde-li ke znevýhodnění *wt* samců v podobě zmenšení velikosti jejich těla, *epox*^{-/-} samci jsou schopni lépe konkurovat *wt* samcům. Jinými slovy zmenšením velikosti těla *wt* samců odstraníme jejich výhodu nad *epox*^{-/-} samci.

4.7 Volba malých *wt* samic mezi *epox*^{-/-} samci a malými *wt* samci

Následně bylo testováno, zda si malé *wt* samice raději zvolí za partnera *wt* samce, který při vývoji neměl dostatek živin a vyvinul se tedy menší, než je obvyklé, nebo budou preferovat raději *epox*^{-/-} samce, kteří jsou větší než *wt* samci. Do klece o velikosti 4,7 l bylo umístěno 10 malých *wt* samic spolu s 10 velkými *epox*^{-/-} samci a 10 malými *wt* samci. Experiment byl proveden ve třech opakování.



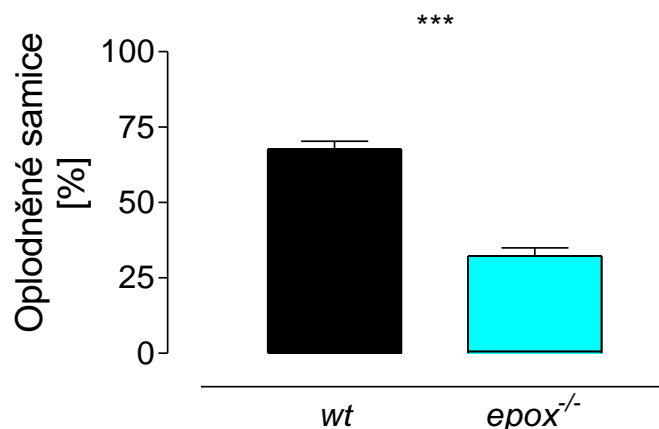
Obr. 13. Test reprodukční konkurenceschopnosti mezi *wt* a *epox^{-/-}* samci. 10 velkým *epox^{-/-}* samcům a 10 malým *wt* samcům bylo umožněno pářit se s 10 malými *wt* samicemi v pářící kleci. Po genotypizaci potomstva larev pomocí eCFP transgenu, který označuje mutovanou alelu *epox*, byl vyhodnocen počet inseminovaných samic samci obou genotypů v procentech. Sloupce představují průměr procent ± SEM ze třech nezávislých testů (nepárový t test, * $P \leq 0,05$).

Z Obr. 13. vyplývá, že malí *wt* samci se průměrně spářili s 74.72 ± 11.79 % všech samic. U velkých *epox^{-/-}* samců byla úspěšnost průměrně u 25.28 ± 11.79 % samic.

Tento experiment ukázal, že v případě malých samic odstranění velikostního handicapu *epox^{-/-}* samců nehraje roly, malé *wt* samice volily raději malé *wt* samce.

4.8 Volba malých *wt* samic mezi malými *epox^{-/-}* samci a velkými *wt* samci

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda je pro malé *wt* samice stále hlavním faktorem pro výběr nepřítomnost mutantních projevů i v případě, kdy si může partnera zvolit mezi velkými *wt* samci, nebo budou preferovat malé *epox^{-/-}* samce. Do klece o velikosti 4,7 litru bylo umístěno 10 malých *wt* samic spolu s 10 malými *epox^{-/-}* samci a 10 velkými *wt* samci. Experiment proveden ve čtyřech opakování.



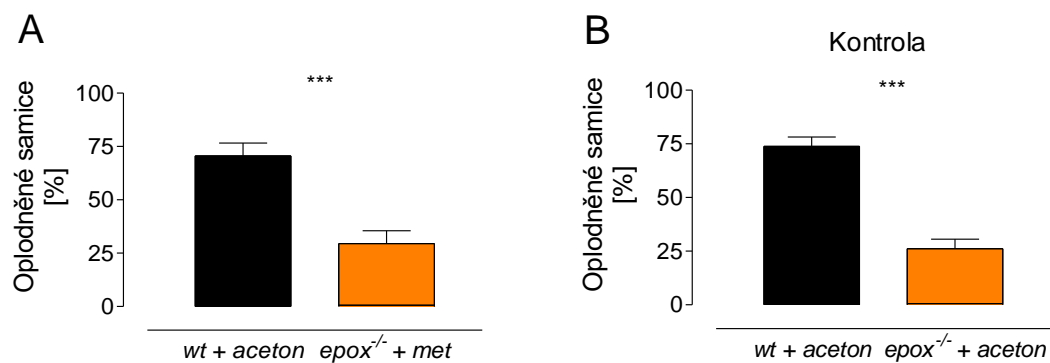
Obr. 14. Test reprodukční konkurenceschopnosti mezi *wt* a *epox*^{-/-} samci. 10 malým *epox*^{-/-} samcům a 10 velkým *wt* samcům bylo umožněno pářit se s 10 malými *wt* samicemi v pářící kleci. Po genotypizaci potomstva larev pomocí eCFP transgenů, který označuje mutovanou alelu *epox*, byl vyhodnocen počet inseminovaných samic samci obou genotypů v procentech. Sloupce představují průměr procent ± SEM ze čtyř nezávislých testů (nepárový t test, *** $P \leq 0,001$).

Z Obr. 14. vyplývá, že *wt* samci byli schopni průměrně oplodnit 67.71 ± 2.621 % samic a v případě *epox*^{-/-} samců byla průměrná úspěšnost 32.29 ± 2.621 %.

Výsledky experimentu ukazují velmi průkaznou preferenci malých *wt* samic k *wt* samcům. To naznačuje, že malým *wt* samicím nezáleží na velikosti samce, ale kladou důraz především na nepřítomnost znaků *epox*^{-/-} samců.

4.9 Vliv ektopické aplikace analogu JH na reprodukční zdatnost *epox*^{-/-} samců

Tímto experimentem jsme chtěli ověřit hypotézu, že snížená reprodukční zdatnost u *epox*^{-/-} samců je způsobena slabší signalizací MF, proto by ektopická aplikace silného analogu JH metoprenu (met) mohla obnovit *epox*^{-/-} samčí reprodukční zdatnost. K tomuto experimentu bylo použito 10 velkých *wt* samic a bylo k nim přidáno 10 velkých *epox*^{-/-} samců s aplikovaným metoprenem (250 ng/jedince, 0,25 μ l) a 10 velkých *wt* samců s aplikovaným acetonem (0,25 μ l). Experiment byl proveden v 10 opakování. V kontrolním experimentu bylo pářeno 10 velkých *wt* samic s 10 velkými *epox*^{-/-} i *wt* samci s aplikovaným acetonem. Experiment byl proveden v devíti opakování.



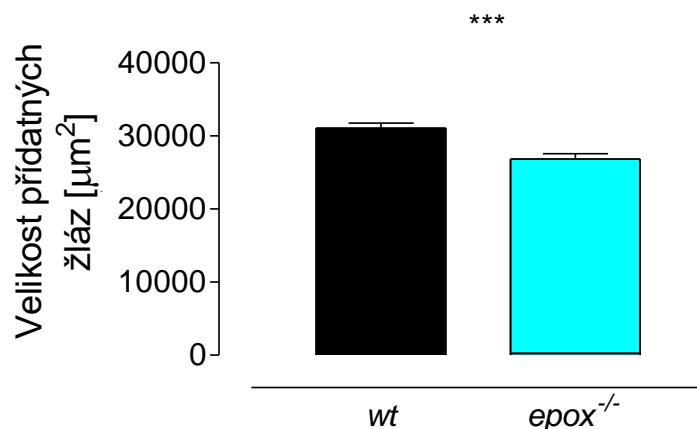
Obr. 15. (A) Test reprodukční konkurenceschopnosti mezi *wt* a *epox*^{-/-} samci při aplikaci metoprenu. 10 velkým *epox*^{-/-} samcům s aplikovaným metoprenem a 10 velkým *wt* samcům s aplikovaným acetonem bylo umožněno pářit se s 10 velkými *wt* samicemi v pářící kleci. (B) Kontrolní test reprodukční konkurenceschopnosti mezi *wt* a *epox*^{-/-} samci při aplikaci acetonu. 10 velkým samcům obou genotypů s aplikovaným acetonem bylo umožněno pářit se s 10 velkými *wt* samicemi v pářící kleci. (A a B) Po genotypizaci potomstva larev pomocí eCFP transgenů, který označuje mutovanou alelu *epox*, byl vyhodnocen počet inseminovaných samic samci obou genotypů v procentech. (A) Sloupce představují průměr procent ± SEM z deseti nezávislých testů (nepárový t test, *** $P \leq 0,001$). (B) Sloupce představují průměr procent ± SEM z devíti nezávislých testů (nepárový t test, *** $P \leq 0,001$).

Z Obr. 15. vyplývá, že v metoprenovém testu byli *wt* samci s aplikovaným acetonem schopni průměrně oplodnit 70.56 ± 6.072 % samic a *epox*^{-/-} samci s aplikovaným metoprenem oplodnili 29.44 ± 6.072 % samic. V kontrolním testu byla průměrná úspěšnost *wt* samců 73.83 ± 4.398 % a u *epox*^{-/-} samců byla 26.17 ± 4.39 %.

Kontrolní test potvrdil výsledky z experimentu v oddíle 4.2, značnou preferenci pro *wt* samce. To potvrzuje, že ektopická aplikace acetonu neovlivňuje průběh pářícího experimentu. Metoprenový experiment prokázal, že aplikace metoprenu neměla vliv na zvýšení úspěšnosti *epox*^{-/-} samců, a stále přetrvává statisticky průkazný rozdíl mezi oběma genotypy s preferencí pro *wt* samce.

4.10 Analýza velikosti přídatných žláz u *wt* a *epox*^{-/-} samců

Z literatury je známo, že JH má u samců vliv na funkci a velikost přídatných žláz (Ramalingam a Craig, 1977). Pro ověření, zda nepřítomnost JH a přítomnost pouze MF ovlivňuje velikost přídatných žláz samců, jsme oddělili pohlavní orgány samců, imunochemicky obarvili a následně změřili jejich velikost přídatných žláz u obou genotypů.



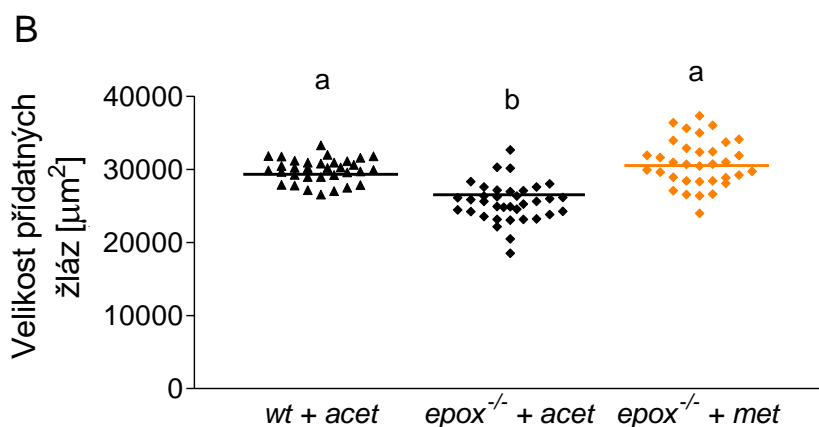
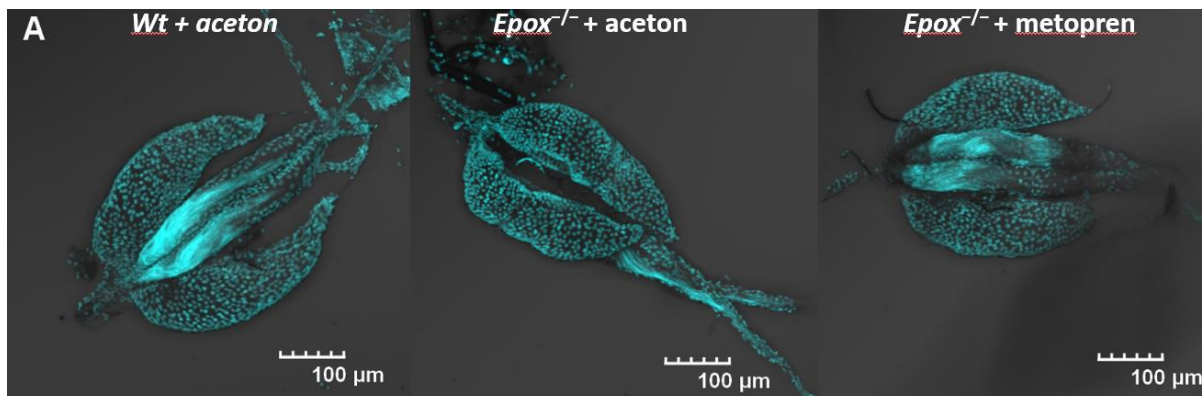
Obr. 16. Průměrná velikost přídatných žláz *wt* a *epox*^{-/-} samců. Velikost přídatných žláz byla měřena v programu ImageJ. Sloupce představují průměr velikostí přídatných žláz \pm SEM (nepárový t test, *** $P \leq 0,001$).

Z Obr. 16. vyplývá, že velikost přídatných žláz *wt* samce v průměru dosahovala $31050 \pm 698.2 \mu\text{m}^2$ (n = 21) a v případě *epox*^{-/-} samců $26850 \pm 736.5 \mu\text{m}^2$ (n = 20).

Výsledky potvrdily statisticky průkazný rozdíl mezi oběma genotypy. Přídatné žlázy *wt* samců dosahují prokazatelně větších rozměrů, než přídatné žlázy *epox*^{-/-} samců, což ukazuje na možný vliv nedostatečné signalizace MF při vývinu přídatných žláz *epox*^{-/-} samce.

4.11 Vliv ektopické aplikace metoprenu na velikost přídatných žláz u *epox*^{-/-} samců

Abychom ověřili, zda je menší velikost přídatné žlázy u *epox*^{-/-} samců způsobena nedostatečnou signalizací MF ve srovnání s JH. Otestovali jsme, zda dojde ke zvětšení přídatné žlázy u *epox*^{-/-} samců po aplikaci metoprenu. Aplikace metoprenu byla provedena stejným způsobem a ve stejné dávce jako u experimentu v oddílu 4.10. Čtvrtý den po aplikaci metoprenu byly přídatné žlázy vypitvány, obarveny a změřeny. Jak je znázorněno v Obr. 17A.



Obr. 17. Velikosti přídatných žláz *wt* samců s aplikovaným acetonem (25 ml/jedince), *epox*^{-/-} samců s aplikovaným acetonem (25 ml/jedince) a *epox*^{-/-} samců s aplikovaným metoprenem (250 ng/jedince). (A) Přídatné žlázy se semennými váčky obarveny DAPI. Měřítko 100 µm. (B) Velikost přídatných žláz byla měřena v programu ImageJ. Každý bod představuje velikost přídatné žlázy jednoho samce. Čáry v grafech znázorňují průměry měření, písmena nad značkami naznačují průkaznost rozdílů ($P \leq 0,001$, jednocestná analýza variance s Tukeyho mnohonásobným porovnáním).

Z Obr. 17. vyplývá, že naměřené velikosti přídatných žláz *wt* samců s aplikovaným acetonem průměrně dosahovali velikosti $29940 \pm 283,6 \mu\text{m}^2$ ($n = 33$), pro *epox*^{-/-} samce s aplikovaným acetonem dosahovali průměrně $25578 \pm 445,2 \mu\text{m}^2$ ($n = 36$) a pro *epox*^{-/-} samce s aplikovaným metoprenem $30919 \pm 548,3 \mu\text{m}^2$ ($n = 34$).

Naměřené hodnoty velikosti přídatných žláz ukazují, že po aplikaci acetonu k oběma genotypům samců dochází k zachování rozdílů ve velikosti mezi oběma genotypy. Aplikace metoprenu na *epox*^{-/-} samce způsobila zvětšení jejich přídatných žláz na úroveň velikosti *wt* samců. Došlo tedy ke zvrácení negativního účinku MF na velikost přídatných žláz u *epox*^{-/-} samců.

5 Diskuze

Cílem práce bylo navázat na výsledky Nouzové et al. z roku 2021 a objasnit, jaký vliv na rozmnožování *Aa. aegypti* má velikost těla všech zúčastněných a jakou roli v tomto procesu hraje JH.

Z práce Nouzové et al. (2021) vyplývá, že mutantní forma *Aa. aegypti*, která postrádá EPOX v syntéze JH a *corpora allata* produkuje pouze MF, nemá problém vyvinout se v dospělého jedince a rozmnožit se. Problém v páření nastal v momentě, kdy byli $epox^{-/-}$ samci vystaveni konkurenci *wt* samců. V takovém případě nebyli $epox^{-/-}$ samci schopni *wt* samcům konkurovat a oplodnili výrazně nižší počet *wt* samic než *wt* samci (Nouzova et al. 2021). Domnívali jsme se, že důvodem neúspěchu $epox^{-/-}$ samců by mohla být již zmíněná menší velikost těla a z toho důvodu jsme se v první části práce rozhodli ověřit hypotézu, že *wt* samice si vybírají partnera na základě tělesné velikosti, a proto menší $epox^{-/-}$ samci jsou méně úspěšní v konkurenci s většími *wt* samci. Proto by snížení velikosti *wt* samců mělo odstranit tuto výhodu.

Nejprve byl experimentem v oddílu 4.2 zopakován původní test podle Nouzova et al. (2021), kterým bylo ověřeno, že experiment v našich laboratorních podmínkách reaguje stejným způsobem, což bylo potvrzeno a byla prokazatelná preference pro *wt* samce. V návaznosti na tyto výsledky jsme se rozhodli ověřit, zda by byli $epox^{-/-}$ samci úspěšnější, pokud by se dostali do obdobné situace, pouze s takovým rozdílem, že by se tentokrát měli možnost pářit s genotypově stejnou $epox^{-/-}$ samicí. Očekávalo se, že by si $epox^{-/-}$ samice mohly přednostně vybírat jedince stejného genotypu, čímž by se zvýšila úspěšnost $epox^{-/-}$ samců. Výsledky byly opačné, a i v tomto případě si samice pro páření volily *wt* samce. V obou případech se jeví velikost těla jako možný faktor, který hrál hlavní roli při výběru partnera a z toho důvodu nebyly schopni menší $epox^{-/-}$ samci konkurovat větším *wt* samcům. Tyto výsledky odpovídají výsledkům u *An. Gambiae ss*, kde bylo prokázáno, že větší samci jsou v páření úspěšnější než menší (Sawadogo et al., 2013).

Poté jsme se zaměřili samostatně na *wt* jedince *Ae. aegypti* a bylo otestováno, zda u samic existuje určitá preference pro velikosti těla samce v závislosti na velikosti těla vlastního. Byla použita linie dsRed pro snadné rozpoznání potomků samců dvou odlišných velikostí těla. V první řadě byla otestována preference velkých *wt* samic a ukázalo se, že pokud měly samice možnost volit mezi velkými a malými *wt* samci, tak s větší četností vybíraly velké samce, což se shoduje s výsledky Cator a Zanti (2016). Odůvodněním, proč k takovému výběru dochází,

může být dobrá fyzická zdatnost velkých samců, která se může projevovat na párovém letu, během kterého může docházet k lepší souhře obou partnerů, a to může vést k úspěšné HK (Aldersley a Cator, 2019). Následně bylo otestováno, zda i malé *wt* samice budou upřednostňovat samce, kteří dosahují menších velikostí, jako tomu bylo v práci Callahan et al. (2018), nebo zda i malé samice budou preferovat velké samce. Výsledky našeho experimentu jsou v rozporu s výsledky Callahan et al. (2018). Náš experiment neprokázal preferenci malých *wt* samic k žádné velikosti samce a docházelo k stejnému počtu páření s oběma velikostmi samců. Důvodem rozporu mezi našimi výsledky a výsledky Callahan et al. (2018) může být, že Callahan et al. (2018) v pářících experimentech používali některé jedince infikované *Wolbachii*, která negativně působí na velikost těla jedinců a pářící test probíhal s větší hustotou jedinců v pářící kleci než v našich podmínkách.

Jelikož nám vyšla prokazatelná preference velkých *wt* samic k velkým *wt* samcům, rozhodli jsme se otestovat, jaký vliv na úspěšnost *epox*^{-/-} samců by mělo, pokud bychom upravili velikost těl konkurenčních *wt* samců. Upravili jsme velikost *wt* samců tak, že byli stejně velcí, nebo dokonce menší než *epox*^{-/-} samci. V obou případech se ukázalo, že úprava velikosti těl *wt* samců měla negativní vliv na jejich úspěšnost a docházelo v obou případech k páření s oběma genotypy se stejnou četností. Z čehož vyplývá, že *epox*^{-/-} samci jsou schopni konkurovat *wt* samcům o velké *wt* samice v případě, kdy jsou stejně velcí, nebo větší než *wt* samci.

V neposlední řadě jsme testovali, zda bude mít vliv přítomnost mutantních *epox*^{-/-} samců na výběr malých *wt* samic, které při výběru z *wt* samců různých velikostí nejevily známky preference k velikosti těla partnera. Provedli jsme dva experimenty. V prvním případě jsme dali samicím na výběr z velkých *epox*^{-/-} samců a malých *wt* samců a v druhém případě jsme prohodili velikosti samců a malé *wt* samice si mohly volit mezi malými *epox*^{-/-} samci a velkými *wt* samci. Ukázalo se, že v tomto případě hraje přítomnost mutantní alely významnou roli a bez ohledu na velikost těl samců, samice prokazatelně preferovali *wt* samce. Úspěšnost velkých *wt* samců v druhém případě, by se dala vysvětlit tím, že malé samice mají nižší zásoby energie, a pokud docházelo k opakovaným atakům ze strany velkých samců, tak mohlo u samice dojít k vyčerpání energie potřebné k odmítnutí a mohlo tedy docházet k páření se samci, o kterého samice nestála (Aldersley a Cator, 2019). Tuto hypotézu vyvrací výsledky prvního testu, kde byli *epox*^{-/-} samci velcí, a i přes to u nich docházelo k nízkému počtu páření. Což potvrzuje negativní vliv mutantní alely *epox*^{-/-} samců na páření s malými samicemi.

Z toho vyplývá, že velikost těla všech zúčastněných hraje při výběru partnera určitou roli, ale dalším důležitým faktorem je přítomnost mutantních alel, které v žádném z experimentů nepřinášely pozitivní efekt na úspěšnost samce. To naznačuje, že mutantní alely mohou ovlivňovat i jiné vlastnosti, které mohou hrát roly při páření než pouze změny velikosti těla. Přítomnost slabšího MF může ovlivňovat například i chování a nervou soustavu jedince, jako tomu bylo u *Drosophila melanogaster*, u které v případě nízké hladiny JH nedochází k produkci feromonů, což následně ovlivňuje celý proces páření, ke kterému dochází se zpožděním (Bilen et al., 2013). V případě samců *Drosophila melanogaster* může nízká hladina JH zhoršit kvalitu paměti, a to může negativně ovlivnit schopnost HK (Saleuddin et al., 2021).

V druhé části práce jsme se snažili otestovat hypotézu, že snížená reprodukční zdatnost u *epox*^{-/-} samců je způsobena právě slabší MF signalizací, proto by ektopická aplikace silného analogu JH metoprenu měla obnovit *epox*^{-/-} samčí reprodukční zdatnost. Očekávalo se, že aplikace metoprenu by mohla působit podobně jako v mnohých případech, například v práci Yamamoto et al. (2013) a Lee et al. (2017), kde i přes odstranění CA byla aplikace analogu JH schopna zvrátit negativní účinky nízké hladiny JH. Též by mohl mít metopren podobný účinek jako na *epox*^{-/-} samice, kde dokázal zvýšit počet a velikost previtelogenních folikulů a zvýšil obsah lipidů v oocytech (Nouzova et al., 2021).

Kontrolním testem jsme si ověřili, že ektopická aplikace acetonu k obou genotypům samců neovlivnila jejich konkurenceschopnost. Kontrola proběhla úspěšně a nedošlo ke změně úspěšnosti žádného ze samců a výsledky prokázaly signifikantní preferenci samic k *wt* samcům. Následně byl proveden test, při kterém byl k *epox*^{-/-} samcům aplikován metopren rozpuštěný v acetonu a k *wt* samcům pouze aceton. Výsledky experimentu byly v rozporu s naším očekáváním a ukazují stále signifikantní preferenci pro *wt* samce. Důvodem může být načasování aplikace metoprenu na dospělé jedince, případně použití nesprávné dávky, i když dávka byla vzhledem k velikosti samců ve srovnání s dávkou užitou na *epox*^{-/-} samice v práci Nouzova et al. (2021) snížena na polovinu. Je rovněž možné, že důsledkem působení MF při vývoji samce dochází ke změnám, které není možné ektopickou aplikací analogu JH v dospělosti zvrátit.

Z prací Odhiambo (1966), Wigglesworth (1936) a Scharrer (1946) vyplývá, že JH u různých druhů hmyzu řídí velikost samčích přídatných žláz i jejich sekreci. V závislosti na těchto tvrzeních, jsme se rozhodli zjistit, zda se přítomnost MF namísto JH u *epox*^{-/-} samců projeví na velikosti jejich přídatných žláz. Naše výsledky průkazně potvrdily rozdíl ve

velikosti přídatných žláz mezi *wt* a *epox*^{-/-} samci. *Epox*^{-/-} samčí přídatné žlázy dorůstají menších rozměrů než přídatné žlázy *wt* samců, což potvrzuje výsledky již zmíněných prací.

Následně jsme se rozhodli zjistit, jestli by aplikace metoprenu na *epox*^{-/-} samce zvýšila velikost přídatných žláz, jako tomu bylo v práci Ramalingam a Craig (1977). I v tomto případě naše výsledky odpovídají výsledkům Ramalingam a Craig (1977) a došlo k výraznému zvětšení velikosti přídatných žláz *epox*^{-/-} samců, které průměrně dosahovali velikostí přídatných žláz *wt* samců.

Z našich výsledků vyplývá, že přítomnost JH je nezbytná ke správnému vývoji přídatných žláz samců, ale v případě aplikace metoprenu do 24 h po eklozi, jsme schopni zvrátit negativní účinek jeho nepřítomnosti. Tyto změny nejsou dostatečné k tomu, aby byly *epox*^{-/-} samci s aplikovaným metoprenem schopni v páření konkurovat *wt* samcům s aplikovaným acetonem. Důvodem může být přítomnost dalších faktorů, které ovlivňují samčí konkurenceschopnost při páření, které není možné změnit ektopickou aplikací analogu JH v dospělosti a v této práci nebyly zohledněny.

6 Závěr

Cílem práce bylo analyzovat vliv velikosti těla na úspěšnost páření a zjistit proč $epox^{-/-}$ samci postrádající JH nejsou schopni konkurovat wt samcům. Řadou experimentů jsme v první části ověřovali vliv velikosti těla všech zúčastněných na úspěšnost $epox^{-/-}$ samců při páření. Bylo prokázáno, že velikost obou partnerů hraje roli při páření, ale dalším důležitým faktorem je přítomnost mutantních alel, které v žádném z experimentů nepřinášely pozitivní efekt na úspěšnost samce. Následně bylo testováno, zda je snížená reprodukční zdatnost u $epox^{-/-}$ samců způsobena slabší MF signalizací, a zda jsme schopni ektopickou aplikací silného analogu JH metoprenu obnovit $epox^{-/-}$ samčí reprodukční zdatnost. Ukázalo se, že ektopická aplikace metoprenu může zvrátit negativní účinek nepřítomnosti JH na vývoj přídatných žláz, ale jeho účinek není dostatečný, aby zvýšil $epox^{-/-}$ samčí reprodukční zdatnost.

V budoucnu by bylo zajímavé pro pářící experiment, s použitím metoprenu na $epox^{-/-}$ samce, otestovat reakci malých wt samic, u kterých nehrála roli velikost partnera při výběru mezi wt samci, ale v přítomnosti mutantních $epox^{-/-}$ samců preferovaly malé wt samice vždy wt samce, bez ohledu na jejich velikost.

7 Seznam literatury

About Mosquitoes. (2020). Centers for disease control and preventio. <https://www.cdc.gov/mosquitoes/about/index.html>

Aldersley, A. a Cator, L. J. (2019). Female resistance and harmonic convergence influence male mating success in *Aedes aegypti*. *Scientific Reports*, 9, 2145. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38599-3>

Alfonso-Parra, C., Osorio, J., Agudelo, J., Díaz, S., Ramírez-Sánchez, L. a Avila, F. (2022). Más que ovulos y esperma: factores masculinos, femeninos, y ambientales que influyen en la reproducción de mosquitos de *Aedes* y *Anopheles*. *Revista Colombiana de Entomología*, 48(2) e11405. <https://doi.org/10.25100/socolen.v48i2.11405>

Araripe, L. O., Bezerra, J. R. A., Rivas, G. B. da S. a Bruno, R. V. (2018). Locomotor activity in males of *Aedes aegypti* can shift in response to females' presence. *Parasites Vectors*, 11, 254. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2635-9>

Barrera, R., Amador, M., Munoz, J. a Acevedo, V. (2018). Integrated vector control of *Aedes aegypti* mosquitoes around target houses, *Parasites Vectors*, 11, 88. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2596-4>

Batz, Z. A., Brent, C. S., Marias, M. R., Sugijanto, J. a Armbruster, P. A. (2019). Juvenile hormone III but not 20-Hydroxyecdysone regulates the embryonic diapause of *Aedes albopictus*. *Frontiers in Physiology*, 10, 1352. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01352>

Baud, D., Gubler, D. J., Schaub, B., Lanteri, M. C. a Musso, D. (2017). An update on Zika virus infection. *The Lancet*, 390(10107), 2099-2109. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31450-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31450-2)

Benton P. (1994). Attraction of male mosquitoes to sound. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 10(2), 297-301.

Bilen, J., Atallah, J., Azanchi, R., Levine, J. D. a Riddiford, L. M. (2013). Regulation of onset of female mating and sex pheromone production by juvenile hormone in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(45), 18321-18326. <https://doi.org/10.1073/pnas.1318119110>

- Brabant, P. J. a Dobson, S. L. (2013). Methoprene effects on survival and reproductive performance of adult female and male *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 29(4), 369-375. <https://doi.org/10.2987/13-6365.1>
- Callahan, A. G., Ross, P. A. a Hoffmann, A. A. (2018). Small females prefer small males: size assortative mating in *Aedes aegypti* mosquitoes, *Parasites Vectors*, 11, 445. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3028-9>
- Caroci, A. S., Li, Y. a Noriega, F. G. (2004). Reduced juvenile hormone synthesis in mosquitoes with low teneral reserves reduces ovarian previtellogenic development in *Aedes aegypti*. *Journal of Experimental Biology*, 207(15), 2685-2690. <https://doi.org/10.1242/jeb.01093>
- Cator, L. J. a Harrington, L. C. (2011). The harmonic convergence of fathers predicts the mating success of sons in *Aedes aegypti*. *Animal Behaviour*, 82(4), 627-633. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2011.07.013>
- Cator, L. J. a Zanti, Z. (2016). Size, sounds and sex: interactions between body size and harmonic convergence signals determine mating success in *Aedes aegypti*, *Parasites Vectors*, 9, 622. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1914-6>
- Cator, L. J., Arthur, B. J., Harrington, L. C. a Hoy, R. R. (2009). Harmonic convergence in the love songs of the dengue vector mosquito. *Science*, 323(5917), 1077-1079. <https://doi.org/10.1126/science.1166541>
- Cator, L. J., Wyer, C. A. S. a Harrington, L. C. (2021). Mosquito sexual selection and reproductive control programs. *Trends in Parasitology*, 37(4), 330-339. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.11.009>
- Clements, A. N. (1992a). Juvenile hormone. In *The Biology of Mosquitoes, Volume 1: Development, Nutrition and Reproduction* (pp. 400-401). Chapman and Hall.
- Clements, A. N. (1992a). The female accessory gland. In *The Biology of Mosquitoes, Volume 2: Sensory Reception and Behaviour* (p. 355). CUBI Publishing.
- Clements, A. N. (1992b). Structure of the ovaries and oviducts. In *The Biology of Mosquitoes, Volume 1: Development, Nutrition and Reproduction* (pp. 328-332). Chapman and Hall.

- Clements, A. N. (1992b). The male accessory glands and their secretions. In *The Biology of Mosquitoes, Volume 2: Sensory Reception and Behaviour* (pp. 342-348). CUBI Publishing.
- Clements, A. N. (1992c). Structure of the testes and male genital duct. In *The Biology of Mosquitoes, Volume 1: Development, Nutrition and Reproduction* (pp. 327-328). Chapman and Hall.
- Clements, A. N. (1999c). The spermathecae. In *The Biology of Mosquitoes, Volume 2: Sensory Reception and Behaviour* (pp. 355-359). CUBI Publishing.
- Clifton, M. E. a Noriega, F. G. (2012). The fate of follicles after a blood meal is dependent on previtellogenic nutrition and juvenile hormone in *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology*, 58(7), 1007-1019. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.05.005>
- Clifton, M. E., Correa, S., Rivera-Perez, C., Nouzova, M. a Noriega, F. G. (2014). Male *Aedes aegypti* mosquitoes use JH III transferred during copulation to influence previtellogenic ovary physiology and affect the reproductive output of female mosquitoes. *Journal of Insect Physiology*, 64, 40-47. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.03.006>
- De Jesus, C. E. a Reiskind, M. H. (2016). The importance of male body size on sperm uptake and usage, and female fecundity in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Parasites Vectors*, 9, 447. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1734-8>
- Degner, E. C. a Harrington, L. C. (2016). Polyandry depends on postmating time interval in the dengue vector *Aedes aegypti*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(4), 780-785. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0893>
- Diabaté, A., Yaro, A. S., Dao, A., Diallo, M., Huestis, D. L. a Lehmann, T. (2011). Spatial distribution and male mating success of *Anopheles gambiae* swarms. *BMC Evolutionary Biology*, 11, 184. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-184>
- Downes, J. A. (1969). The swarming and mating flight of diptera. *Annual Review of Entomology*, 14(1), 271-298. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.14.010169.001415>
- Dusfour, I. a Chaney, S. C. (2021). Mosquito control. In *Mosquitopia: The Place of Pests in a Healthy World* (pp. 213-233). New York: Routledge. <https://doi.org/10.4324/9781003056034-19>

- Facchinelli, L., Badolo, A. a McCall, P. J. (2023). Biology and behaviour of *Aedes aegypti* in the human environment: opportunities for vector control of arbovirus transmission. *Viruses*, *15*(3), 636. <https://doi.org/10.3390/v15030636>
- Foster, W. a Walker, E. (2002). Mosquitoes (Culicidae). *Medical and Veterinary Entomology*, 203-262. <https://doi.org/10.1016/B978-012510451-7/50014-1>
- Foster, W. a Walker, E. (2019). Chapter 15 - Mosquitoes (Culicidae). *Medical and Veterinary Entomology* (3.rd ed.). 261-325 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814043-7.00015-7>
- Giancetti, E., Cianchi, V., Torelli, A., & Montomoli, E. (2022). Yellow fever: origin, epidemiology, preventive strategies and future prospects. *Vaccines*, *10*(3), 372. <https://doi.org/10.3390/vaccines10030372>
- Halstead, S. B. (2006). Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ? *Revista Panamericana de Salud Pública*, *20*(6), 407-415. <https://doi.org/10.1590/S1020-49892006001100007>
- Harrington, L. C. a Ponlawat, A. (2009). Factors associated with male mating success of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *80*(3), 395-400. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.80.395>
- Helinski, M. E. H., Scott, T. W., Facchinelli, L., Valerio, L., Harrington, L. C. a Ramsey, J. (2012). Evidence of polyandry for *Aedes aegypti* in semifield enclosures. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *86*(4), 635-641. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0225>
- Hossain, M. S., Raihan, M. E., Hossain, M. S., Syeed, M. M. M., Rashid, H. a Reza, M. S. (2022). *Aedes* larva detection using ensemble learning to prevent dengue endemic. *BioMedInformatics*, *2*(3), 405-423. <https://doi.org/10.3390/biomedinformatics2030026>
- Charlwood, J. D., Pinto, J., Sousa, C. A., Ferreira, C. a Rosário, V. E. D. (2002). Male size does not affect mating success (of *Anopheles gambiae* in São Tomé). *Medical and Veterinary Entomology*, *16*(1), 109-111. <https://doi.org/10.1046/j.0269-283x.2002.00342.x>

- Jones, J. C. (1968). The sexual life of a mosquito. *Scientific American*, 218(4), 108-16. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0468-108>
- Jones, Jack Colvard a Pilitt, Dana Richard. (1973). Observations on the sexual behavior of free-flying *Aedes aegypti* mosquitoes. *The Biological Bulletin*, 144(3), 480-488. <https://doi.org/10.2307/1540302>
- Juliano, S. A., O'Meara, G. F., Morrill, J. R. a Cutwa, M. M. (2002). Desiccation and thermal tolerance of eggs and the coexistence of competing mosquitoes. *Oecologia*, 130(3), 458-469. <https://doi.org/10.1007/s004420100811>
- Kay, B. a Nam, V. S. (2005). New strategy against *Aedes aegypti* in Vietnam. *The Lancet*, 365(9459), 613-617. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)17913-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)17913-6)
- League, G. P., Baxter, L. L., Wolfner, M. F. a Harrington, L. C. (2019). Male accessory gland molecules inhibit harmonic convergence in the mosquito *Aedes aegypti*. *Current Biology*, 29(6), R196-R197. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.02.005>
- League, G. P., Harrington, L. C., Pitcher, S. A., Geyer, J. K., Baxter, L. L., Montijo, J., Rowland, J. G., Johnson, L. M., Murdock, C. C., Cator, L. J. a Kittayapong, P. (2021). Sexual selection theory meets disease vector control. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 15(7), e0009540. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009540>
- Lee, S. S., Ding, Y., Karapetians, N., Rivera-Perez, C., Noriega, F. G. a Adams, M. E. (2017). Hormonal signaling cascade during an early-adult critical period required for courtship memory retention in *Drosophila*. *Current Biology*, 27(18), 2798-2809. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.08.017>
- Lyu, X. -Y., Wang, X. -L., Geng, D. -Q., Jiang, H. a Zou, Z. (2023). Juvenile hormone acts on male accessory gland function via regulating 1-asparaginase expression and triacylglycerol mobilization in *Aedes aegypti*. *Insect Science*, 30(1), 81-94. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.13084>
- Maaroufi, H. O., Pauchova, L., Lin, Y. -H., Wu, B. C. -H., Rouhova, L., Kucerova, L., Vieira, L. C., Renner, M., Sehadova, H., Hradilova, M. a Zurovec, M. (2022). Mutation in *Drosophila* concentrative nucleoside transporter 1 alters spermatid maturation and mating

- behavior. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 945572. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.945572>
- Mohammed, A. a Chadee, D. D. (2011). Effects of different temperature regimens on the development of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) mosquitoes. *Acta Tropica*, 119(1), 38-43. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.04.004>
- Mosquito Control*. (2022). Centers for disease control and prevention. <https://www.cdc.gov/mosquitoes/mosquito-control/index.html>
- Nelson, M. J. (1986). *Aedes aegypti: biology and ecology*. 1-34. Pan American Health Organization.
- Nouzova, M., Edwards, M. J., Michalkova, V., Ramirez, C. E., Ruiz, M., Areiza, M., DeGennaro, M., Fernandez-Lima, F., Feyereisen, R., Jindra, M. a Noriega, F. G. (2021). Epoxidation of juvenile hormone was a key innovation improving insect reproductive fitness. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(45), e2109381118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2109381118>
- Nouzova, M., Michalkova, V., Hernández-Martínez, S., Rivera-Perez, C., Ramirez, C. E., Fernandez-Lima, F. a Noriega, F. G. (2018). JH biosynthesis and hemolymph titers in adult male *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 95, 10-16. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.02.005>
- Obholz, G., San Blas, G., Fischer, S. a Diaz, A. (2022). Winter survival of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) eggs at its southern limit distribution. *Acta Tropica*, 231, 106471. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106471>
- Odhiambo, T. R. (1966). Growth and the hormonal control of sexual maturation in the male desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forskål). *Transactions of the Royal Entomological Society of London*, 118(13), 393-412. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.1966.tb00831.x>
- Oliva, C. F., Damiens, D. a Benedict, M. Q. (2014). Male reproductive biology of *Aedes* mosquitoes. *Acta Tropica*, 132, 12-19. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.11.021>
- Parthasarathy, R. a Palli, S. R. (2021). Stage-specific action of juvenile hormone analogs. *Journal of Pesticide Science*, 46(1), 16-22. <https://doi.org/10.1584/jpestics.D20-084>

- Ponlawat, A. a Harrington, L. C. (2007). Age and body size influence male sperm capacity of the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 44(3), 422-426. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2007\)44\[422:AABSIM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2007)44[422:AABSIM]2.0.CO;2)
- Powell, J. R. a Tabachnick, W. J. (2013). History of domestication and spread of *Aedes aegypti* – a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(1), 11-17. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130395>
- Ramalingam, S. a Craig, G. B. (1976). Functions of the male accessory gland secretions of *Aedes* mosquitoes (Diptera: Culicidae). *The Canadian Entomologist*, 108(9), 955-960. <https://doi.org/10.4039/Ent108955-9>
- Ramalingam, S. a Craig, G. B. (1977). The effects of a JH mimic and cauterization of the corpus allatum complex on the male accessory glands of *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae). *The Canadian Entomologist*, 109(7), 897-906. <https://doi.org/10.4039/Ent109897-7>
- Ryan, S. J., Carlson, C. J., Mordecai, E. A., Johnson, L. R. a Han, B. A. (2019). Global expansion and redistribution of *Aedes*-borne virus transmission risk with climate change. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(3), e0007213. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007213>
- Saleuddin, S., Lange, A. B. a Orchard, I. (2021). *Advances in Invertebrate (neuro)endocrinology a collection of reviews in the post-genomic era, volume 2: Arthropoda*. 1-56. Apple Academic Press.
- Sawadogo, S. P., Diabaté, A., Toé, H. K., Sanon, A., Lefevre, T., Baldet, T., Gilles, J., Simard, F., Gibson, G., Sinkins, S. a Dabiré, R. K. (2013). Effects of age and size on *Anopheles gambiae* s.s. male mosquito mating success. *Journal of Medical Entomology*, 50(2), 285-293. <https://doi.org/10.1603/ME12041>
- Scharrer, B. (1946). The relationship between corpora allata and reproductive organs in adult *Leucophaea maderae* (orthoptera). *Endocrinology*, 38(1), 46-55. <https://doi.org/10.1210/endo-38-1-46>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S. a Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671-675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>

Staples, J. E., Breiman, R. F. a Powers, A. M. (2009). Chikungunya fever: an epidemiological review of a re-emerging infectious disease. *Clinical Infectious Diseases*, 49(6), 942-948. <https://doi.org/10.1086/605496>

Šebesta, O. (2016). Current presence of invasive mosquitoes species in europe and risk their spreading to the Czech Republic. *Hygiena*, 61(1), 24-28. <https://doi.org/10.21101/hygiena.a1412>

Takken, W., Costantini, C., Dolo, G., Hassanali, A., Sagnon, N. 'F. a Osir, E. (2006). Mosquito mating behaviour. *In Bridging laboratory and field research for genetic control of disease vectors*, 183-188.

Trájer, A. J. (2021). Aedes aegypti in the Mediterranean container ports at the time of climate change: A time bomb on the mosquito vector map of Europe. *Heliyon*, 7(9), 807981. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07981>

Villarreal, S. M., Winokur, O. a Harrington, L. (2017). The impact of temperature and body size on fundamental flight tone variation in the mosquito vector Aedes aegypti (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 54(5), 1116-1121. <https://doi.org/10.1093/jme/tjx079>

Wigglesworth, V. B. (1936). The function of the corpus allatum in the growth and reproduction of rhodnius prolixus (Hemiptera). *Journal of Cell Science*, 2-79(313), 91-121. <https://doi.org/10.1242/jcs.s2-79.313.91>

Wint, W., Jones, P., Kraemer, M., Alexander, N. a Schaffner, F. (2022). Past, present and future distribution of the yellow fever mosquito Aedes aegypti: The European paradox. *Science of The Total Environment*, 847, 157566. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157566>

Yamamoto, R., Bai, H., Dolezal, A. G., Amdam, G. a Tatar, M. (2013). Juvenile hormone regulation of Drosophila aging. *BMC Biology*, 11, 85. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-11-85>