

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Hmyzí antistresové reakce vůči přírodním toxinům

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: Tereza Broučková

Vedoucí práce: prof. RNDr. Dalibor Kodrík, CSc.

Místo a rok vydání: České Budějovice, 2020

Broučková T., 2020: Hmyzí anti-stresové reakce vůči přírodním toxinům. [Insect anti-stress reactions to natural toxins. Bachelor thesis, in Czech] – 31. p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotation

The aim of this bachelor thesis was to characterize the effect of Bt (*Bacillus thuringiensis*) toxin on adipokinetic hormone (AKH) levels in the brain, on the activity of digestive enzymes (lipases, proteases, glucosidases, amylases) in the midgut and on nutrient levels (lipids, proteins, glycidic) in the haemolymph of the firebug (*Pyrrhocoris apterus*). Bt toxin was applied by injection to the adult males 24 hours before monitoring of the above mentioned physiological characteristics. The results showed that Bt toxin reduced AKH level in the brain, modulated level of nutrients in haemolymph, but did not change activity of digestive enzymes in the midgut.

Prohlášení

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

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

V Českých Budějovicích 3. 12. 2020

.....

podpis

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu své bakalářské práce prof. RNDr. Daliboru Kodříkovi, CSc. za odbornou pomoc, cenné rady, trpělivost a připomínky k vypracování této bakalářské práce. Poděkování patří také Ing. Heleně Štěrbové za odborné rady a pečlivé vysvětlení laboratorní práce. V neposlední řadě děkuji své rodině za velikou podporu po celou dobu studia.

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Hormony u hmyzu	1
1.1.1. Hormonální soustava hmyzu	1
1.1.2. Rozdělení hmyzích hormonů	2
1.2. Adipokinetické hormony	3
1.3. Ruměnice pospolná (<i>Pyrrhocoris apterus</i>)	4
1.3.1. Základní informace	4
1.4. Trávicí enzymy u hmyzu	5
1.4.1. Amylázy	6
1.4.2. Proteázy	6
1.4.3. Lipázy	6
1.4.4. Glukosidázy	7
1.5. Reakce hmyzu na stres	7
1.5.1. Úloha AKH ve stresové situaci	7
1.6. Přírodní toxiny	7
1.6.1. <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt) toxiny	8
2. Cíle práce	9
3. Materiál a metodika	10
3.1. Chov ruměnice pospolné <i>Pyrrhocoris apterus</i> (Heteroptera)	10
3.2. Aplikace Bt toxinu	10
3.3. Stanovení mortality	10
3.4. Pitva ruměnice pospolné (<i>P. apterus</i>)	10
3.4.1. Střevo	11
3.4.2. Centrální nervová soustava, corpora cardiaca a corpora allata	11
3.5. Stanovení hladiny adipokinetických hormonů (AKH) v CNS	12
3.6. Stanovení aktivity trávicích enzymů střeva	13
3.6.1. Extrakce enzymů ze středního střeva	13
3.6.2. Stanovení amylázové aktivity	13
3.6.3. Stanovení proteázové aktivity	14
3.6.4. Stanovení lipázové aktivity	15

3.6.5.	Stanovení glukosidázové aktivity	15
3.7.	Stanovení hladiny živin v hemolymfě	16
3.7.1.	Odběr hemolymfy	16
3.7.2.	Stanovení cukrů	16
3.7.3.	Stanovení bílkovin	16
3.7.4.	Stanovení lipidů	17
3.8.	Zpracování výsledků	17
4.	Výsledky	18
4.1.	Vliv Bt toxinu na mortalitu	18
4.2.	Vliv Bt toxinu na hladinu AKH	19
4.3.	Vliv Bt toxinu na aktivitu trávicích enzymů	19
4.4.	Vliv Bt toxinu na hladinu živin v hemolymfě	22
5.	Diskuze	24
6.	Závěr	26
7.	Seznam použité literatury	27

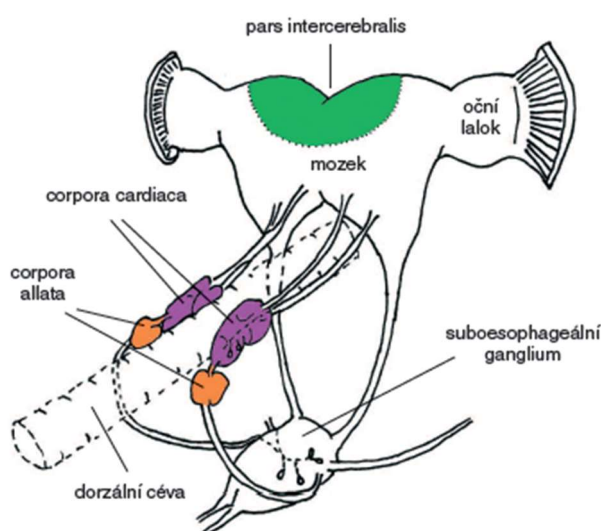
1. Úvod

1.1. Hormony u hmyzu

1.1.1. Hormonální soustava hmyzu

Hormonální soustava hmyzu je jednou z nejlépe prozkoumaných endokrinních soustav u bezobratlých. Její součástí jsou dva hlavní endokrinní systémy, prvním je neurosekretorický systém mozku spolu se žlázami corpora cardiaca a corpora allata, druhým jsou pak prorakální žlázy. Na ně navazuje několik dalších souborů endokrinních buněk (Chapman, 1998).

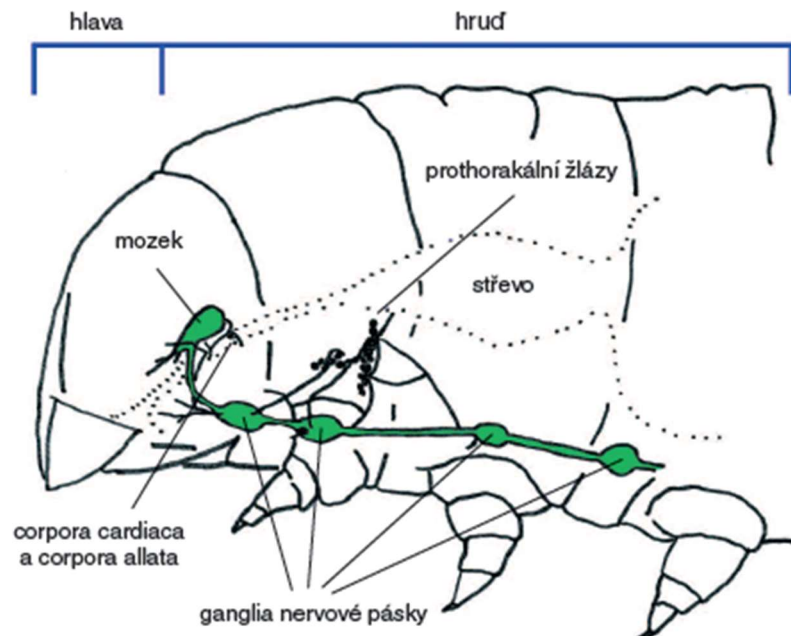
Neurosekretorický systém mozku je tvořen buňkami nervové soustavy: ve své podstatě se jedná o nadřazený komplex, který se dá přirovnat k hypotalamo-hypofyzární soustavě obratlovců. Hormony jsou v tomto komplexu vylučovány neurosekretorickými buňkami. Jde o modifikované neurony, které místo vedení vzruchu produkují hormony. Nacházejí se na několika místech v mozku, hlavně však v místě styku dvou mozkových hemisfér – pars intercerebralis (Obr. 1.) Přidružené žlázy corpora cardiaca a corpora allata vylučují jednak své vlastní hormony (corpora allata vylučují juvenilní hormony), ale slouží také jako neurohemální orgány pro některé hormony syntetizované v mozku.



Obr. 1. Schéma mozku s přidruženými žlázami – corpora cardiaca a corpora allata (Kodrík, 2014; kreslila H. Štěrbová).

Druhým zmíněným endokrinním centrem jsou prothorakální žlázy. Jde zpravidla o párový orgán, který je tvořen nepravidelným seskupením endokrinních buněk a nachází se v prvním hrudním článku – prothoraxu. Jejich úkolem je produkce steroidních hormonů (ekdysteroidů). Prothorakální žlázy se vyskytují převážně u larev, protože jejich funkce souvisejí s ekdyzí, dospělci je mají značně redukované nebo jim chybí (Obr. 2).

Dále se pak do hormonální soustavy u hmyzu řadí neurosekretorické buňky ostatních ganglií, které se nacházejí v břišní nervové pásce a produkují neuropeptidy. Endokrinní funkce mají i epitracheální buňky, produkující hormony a ovlivňující svlékání u hmyzu. Součástí hmyzí hormonální soustavy jsou i endokrinní buňky střeva, které vylučují peptidy podílející se na procesu trávení. A v neposlední řadě také gonády, které regulují pohlavní funkce (Gäde a kol., 1997).



Obr. 2. Endokrinní soustava hmyzu – ganglia nervové pásky (suboesophageální, prothorakální, mesothorakální a metathorakální) (Kodřík, 2014; kreslila H. Štěrbová).

1.1.2. Rozdělení hmyzích hormonů

Endokrinní soustava hmyzu produkuje tři základní skupiny hormonů (Chapman, 1998; Gäde a kol., 1997):

1. Ekdysteroidy

Bývají označovány jako svlékací hormony a jsou primárně produkovány v prothorakálních žlázách. Jejich syntéza je řízena pomocí PTHH (prothoracikotropní hormon). Ekdysteroidy zajišťují svlékání, metamorfózu u nymf a larev, u dospělých jedinců řídí reprodukci.

Základním zástupcem těchto hormonů je ekdyson, steroidní hormon odvozený od cholesterolu. Jedná se o prohormon pro 20-hydroxyekdyson, který se tvoří až ve tkáních.

2. Juvenilní hormony

Jsou to látky terpenoidní povahy odvozené od kyseliny farnesilové. Jsou produkovány ve žláze corpora allata, kde je jejich uvolňování řízeno pomocí nadřazených neurohormonů (allotropinů a allostatinů) nebo nervovými vzruchy. Hlavní úlohou těchto hormonů je udržování jedince v juvenilním stádiu, aby nedocházelo k předčasnému nástupu metamorfózy. K tomuto jevu dochází zablokováním exprese příslušných genů spouštějících metamorfózu. U imag se podílí na reprodukci, u samic řídí vitellogenézi. Nízká hladina a odchylky v produkci těchto hormonů vedou k vývojovým chybám.

3. Neurohormony

Tyto látky jsou peptidické povahy a syntetizují se v neurosekretorických buňkách CNS, kterými jsou následně vylučovány do hemolymfy (Gäde a kol., 1997). Peptidické neurohormony tvoří nejobsáhlejší skupinu hormonů a zasahují prakticky do všech aspektů života hmyzu. Mnoho z nich má tzv. pleiotropní účinek, kdy jeden hormon má celou řadu funkcí, mnohdy dosti odlišných. Neurohormony se dělí podle různých kritérií na řadu skupin. Mezi nejlépe prozkoumané hmyzí hormony patří adipokinetické hormony, o kterých pojednává následující kapitola.

1.2. Adipokinetické hormony

Adipokinetické hormony jsou stresové hormony spadající do skupiny peptidických hormonů, které regulují metabolismus a řídí homeostázu, a tím spouští procesy vedoucí k produkci energie. Zároveň blokují syntetické procesy a mají kontrolu nad řadou biochemických a fyziologických procesů navazujících na výše zmíněnou metabolickou funkci (Kodrík, 2008). Dnes je už známo okolo 60 zástupců této skupiny.

Adipokinetické hormony (AKH) se skládají z 8-10 aminokyselin (okta až deka-peptidy), kde N konec je blokován pyroglukamovou kyselinou a C konec je amidový. U hmyzu se nachází zpravidla jeden AKH, ale u některých druhů byly popsány dva nebo dokonce i tři AKH (Gäde a kol., 2009). U modelového organismu ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus*) se nachází dva AKH, které se liší pouze jednou aminokyselinou ve třetí pozici (Kodrík a kol., 2000; 2002):

1. Pyrap-AKH (*P. apterus* – adipokinetický hormon): pGlu-Leu-Asn-Phe-Thr-Pro-Asn-Trp-NH₂ (Kodrík a kol., 2000)
2. Peram-CAH-II (*Periplaneta americana* – cardioaccelerating hormone-II): pGlu-Leu-Thr-Phe-Thr-Pro-Asn-Trp-NH₂ (Kodrík a kol., 2002)

Adipokinetické hormony se syntetizují v párové žláze corpora cardiaca, odkud jsou uvolňovány a hemolymfou transportovány k cílovým buňkám (primárně tukové těleso). Zde spouští mobilizaci živin - cukrů, tuků nebo aminokyseliny prolinu (Gäde a Auerswald, 2003) - což bývá velmi často druhově specifické (Socha a kol., 2004). U modelového druhu *P. apterus* ovlivňují hlavně metabolismus lipidů (Kodrík a kol., 2000). V tukovém tělese se AKH váže na specifický membránový receptor (Park a kol., 2002; Wicher a kol., 2006; Kaufman a Brown, 2006) a za pomoci druhého posla v přítomnosti vápenatého kationtu Ca²⁺ aktivuje proteinkinázovou kaskádu (Gäde a Auerswald, 2002; 2003). Tato kaskáda vede k aktivaci lipázy a štěpení triacylglycerolu na diacylglycerol. Ten je pomocí lipophorinového přenašeče dopraven na místo spotřeby (např. do svalu). Ve svalových buňkách dochází ke štěpení diacylglycerolu na glycerol a mastné kyseliny, které jsou odbourávány beta-oxidací a dodávají organismu potřebnou energii. Po ukončení působení dojde k deaktivaci AKH v hemolymfě pomocí endopeptidáz (Gäde a kol., 1997).

Další funkce, které adipokinetické hormony v metabolismu mají, jsou neméně důležité a zpravidla navazují na primární funkci v mobilizaci živin. Je to například stimulace činnosti skeletálních svalů i srdce (Scarborough a kol., 1984; Socha a kol., 1999), stimulace antioxidantních mechanismů (Kodrík a kol., 2007; 2015a), mobilizace imunitních reakcí (Goldsworthy a kol., 2002) a stimulace trávicích procesů (Kodrík a kol., 2012; Bodláková a kol. 2018). U *Drosophila melanogaster* regulují tyto hormony hladovějící chování při hledání potravy (Lee a Park, 2004).

1.3. Ruměnice pospolná (*Pyrrhocoris apterus*)

1.3.1. Základní informace

Ruměnice pospolná *P. apterus* (Obr. 3) je zástupce hmyzího řádu polokřídli (*Hemiptera*) a podřádu plošnice (*Heteroptera*).

Tento druh je hojně rozšířen převážně na severní polokouli, v České republice se vyskytují pouze dva druhy této čeledi – ruměnice pospolná (*P. apterus*) a ruměnice hnědá (*P. marginatus*) (Malenovský a kol., 2011). Obecně jde o velmi společenský druh, který se

vyskytuje od dubna do září, nejčastěji na lípách a akátech. Vyhledávají především stinná místa, kde tvoří početné skupiny (Stichmann a Kretzschmar, 1998).

Hlavní složkou potravy jsou lipová semena, která ploštice nabodávají a pumpují do nich sliny, kterými rozpouštějí jejich obsah (Vinokurov a kol., 2014). Ten pak nasávají – funguje u nich tedy částečné mimotělní trávení, které je dokončeno ve střevě. K pohybu používají primárně kráčivé končetiny, kvůli špatně vyvinutým křídům let jako způsob pohybu nepoužívají. Během života projde ruměnice celkem pěti instary, než dosáhne stádia dospělce. Délka života bývá zpravidla asi 60 dní (Socha, 2013). Dospělci ruměnice pospolné dorůstají délky 10-12 milimetrů. Charakteristickým rysem je oválný tvar těla s výstražným červeno-černým zbarvením. Tyto kontrastní barvy v kombinaci s vylučovanými chemickými látkami jí poskytují ochranu před potenciálními predátory.



Obr. 3. Ruměnice pospolná *P. apterus* (Kodřík, 2014).

1.4. Trávicí enzymy u hmyzu

Enzymy jsou bílkoviny s katalytickou funkcí. Urychlují chemické reakce, aby dosáhly rovnováhy mezi výchozími látkami (substráty) a produkty tím, že snižují aktivační energii. Ta je potřebná k tomu, aby reakce proběhla, současně však nemění složení rovnovážné směsi. V rámci této práce byly měřeny trávicí enzymy, které produkuje střední střevo (mesenteron) při trávení potravy.

Enzymatická výbava hmyzího střeva odpovídá přijímané potravě, která je u hmyzu velmi rozmanitá. Významná je činnost slin, zvláště u těch druhů Hemipter (včetně *P. apterus*), které mají mimotělní trávení. Natrávená potrava je slinami nasávána zpět do trávicího ústrojí. Následně epiteální buňky ve středním střevě (mesenteron), kde probíhá hlavní část trávení, vyprodukují trávicí enzymy a trávicí procesy dokončí. Živiny jsou pak ve středním střevě také absorbovány (Chapman, 1998; Vinokurov a kol., 2014). Nicméně základní živiny jsou u hmyzu tráveny podobnými enzymy, jako je tomu u obratlovců. Mezi základní hmyzí enzymy tedy patří:

1.4.1. Amylázy

Amylázy patří mezi glykosidázy, které se dále řadí mezi hydrolázy. V organismu štěpí α -glykosidickou vazbu oligosacharidů nebo polysacharidů. Dělí se na tři základní typy – α , β , γ . Jako alfa-amyláza se označuje enzym rostlinného nebo živočišného původu štěpící endohydrolýzou 1,4- α -glykosidické vazby u polysacharidů, které obsahují tři a více glukózových jednotek. Beta-amyláza je rostlinný enzym a rovněž jako alfa-amylázy odštěpují 1,4- α -glykosidické vazby, ale pouze od neredukujícího konce polysacharidového řetězce. Gama-amylázy štěpí jak 1,4- α - nebo 1,6- α -glykosidické vazby a odštěpují molekuly glukózy (Karlson, 1981).

1.4.2. Proteázy

Proteázy řadíme mezi hydrolázy stejně jako amylázy. V organismu štěpí bílkoviny tak, že hydrolyzují peptidické vazby aminokyselin. Dělíme je podle místa štěpení na endoproteázy a exoproteázy. Endoproteázy štěpí molekulu bílkoviny uvnitř jejího řetězce. Naopak exoproteázy odštěpují aminokyseliny od konce peptidového řetězce. Při chemických reakcích bývají častěji uplatňovány endoproteázy.

1.4.3. Lipázy

Lipázy patří stejně jako proteázy a amylázy do skupiny hydroláz. Jsou zodpovědné za štěpení tuků, v případě klasických triglyceridů na glycerol a mastné kyseliny. Je zajímavé, že hlavní transportní formou lipidů jsou u hmyzu diglyceridy. Lipázy se také podílí na optimalizaci tukových zásob v těle hmyzu.

1.4.4. Glukosidázy

Glukosidázy patří také mezi hydrolázy, štěpí disacharidy a polysacharidy, které ve svém řetězci obsahují glukózu. Stejně jako amylázy se dělí na α a β . Alfa-glukosidázy štěpí vazbu α -1,4 a tím se liší od beta-glukosidáz.

1.5. Reakce hmyzu na stres

Různé toxiny, patogenní organismy, stejně jako fyzické a fyziologické stresory, mohou narušit funkční homeostázu v těle živočichů (Ivanovič a Jankovič-Hladni, 1991). Všechny tyto stresory obvykle vyvolávají typickou antistresovou reakci organismu, která je často označována jako generalizovaná obranná reakce (Hightower, 1991). Tyto reakce jsou řízeny nervovým a endokrinním systémem. Nervový systém je zodpovědný za rychlé a okamžité reakce, zatímco endokrinní systém poskytuje hlubší, obvykle dlouhodobé (od minut do dnů) změny. K boji proti stresu se u živočichů vyvinula řada antistresových hormonů. U hmyzu jsou to hlavně adipokinetické hormony.

1.5.1. Úloha AKH ve stresové situaci

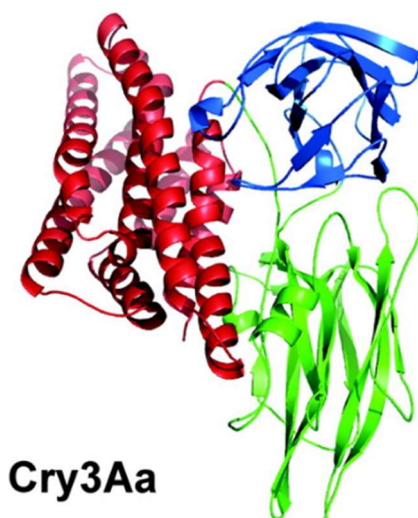
Adipokinetické hormony řídí u hmyzu obranné reakce proti celé škále stresorů (Kodrík, 2008) včetně přírodních toxinů nebo patogenů. Bylo například zjištěno, že AKH významně snižuje toxicitu jedu z parazitické vosičky *Habrobracon hebetor* (Shaik a kol., 2017). Tento jed vyvolává úplnou neuromuskulární paralýzu pohybového aparátu hmyzu (Beckage a Gelman, 2004) a silně potlačuje buněčnou a humorální imunitu (Kryukova a kol., 2011; Pennacchio, Caccia a Digilio, 2014). U ruměnice pospolné *P. apterus*, použití tohoto jedu výrazně stimuluje expresi genu pro Akh a zvyšuje hladinu vlastního AKH. Po injekční aplikaci AKH do těla plošnice dochází ke snížení toxicity jedu (Shaik a kol., 2017).

1.6. Přírodní toxiny

Toxiny produkované živočichy, rostlinami a jinými organismy jsou obecně metabolickými produkty, které se vyvinuly jako obranné prostředky za účelem odpuzování nebo zabíjení predátorů a patogenů. V přírodě jich existuje obrovské množství a některé z nich mohou mít pro člověka praktické využití.

1.6.1. *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxiny

Bt toxiny představují skupinu entomotoxických proteinů produkovaných bakterií *Bacillus thuringiensis*. Ty se tvoří během sporulace ve formě krystalů. Tyto krystaly, které zahrnují insekticidní proteiny zvané Cry (dříve také δ -endotoxiny), jsou široce používány jako biologické insekticidy proti hmyzím škůdcům (Hofte a Whiteley, 1989). Jsou také zdrojem genů používaných ke genetické úpravě řady potravinářských plodin tak, aby samy produkovaly toxin a odradily nebo zahubily různé hmyzí škůdce. V současnosti je popsáno asi 90 kmenů *B. thuringiensis*, které jsou také známé pro svou specifitu toxického účinku na různé skupiny hmyzu (Estibaliz, 2012). Kmeny se označují číslicí a malým a velkým písmenem (např. Cry1Aa). Při aplikaci Bt proteiny procházejí hmyzí zažívací soustavou, kde se enzymaticky upravují, a teprve tato finální molekula má toxický účinek (Drobník, 2004). Toxické proteiny interagují se specifickými povrchovými bílkovinami - receptory na apikálním povrchu epitelálních buněk středního střeva. To vede k tvorbě pórů a proděravění střeva, iontové nerovnováze v haemocoelu, buněčné lýze a septikémii, která končí až smrtí zasaženého hmyzu. (Estibaliz, 2012). Na obrázku č. 4 je znázorněna struktura krystalu (Cry3Aa).



Obr. 4. Struktura krystalu insekticidního proteinu Cry3Aa (Pigott a Ellar, 2007).

2. Cíle práce

Hlavním cílem této práce bylo posoudit, jestli Bt toxin, který se běžně podává hmyzu v potravě, působí i po injekční aplikaci. Tento pokus byl prováděn pomocí monitoringu mortality, hladiny AKH v CNS, hladiny živin v hemolymfě a aktivity trávicích enzymů ve střevě u ruměnice pospolné *P. apterus*.

3. Materiál a metodika

3.1. Chov ruměnice pospolné *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera)

Pokusní jedinci ruměnice pospolné pocházeli z chovů Entomologického ústavu Biologického centra AVČR v Českých Budějovicích. Dospělí samci byli od 1. dne chování odděleně od samic ve sklenicích při teplotě $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ a fotoperiodě dlouhého dne (18 hodin světlo a 6 hodin tma). Jednou týdně dostávala zvířata lipová semena a vodu, která jim byla podávána ze skleněných píttek s vatovou zátkou. Na pokusy byli použiti pouze 7 až 10 dní staří samci, aby se vyloučil případný vliv ovariačního cyklu u samic.

3.2. Aplikace Bt toxinu

Bt toxin (Novodor) byl získán od výrobce Valent Biosciences Corporation. Tento toxin byl ředěn Ringerovým fyziologickým roztokem tak, aby obsahoval 0,5 μg toxinu ve 2 μl roztoku (určení dávky viz dole). Následně byl aplikován pomocí Hamiltonovy injekční stříkačky do zadečkové části ploštice za druhým článkem. Kontrolám byl injikován stejným způsobem Ringerův roztok o objemu 2 μl .

3.3. Stanovení mortality

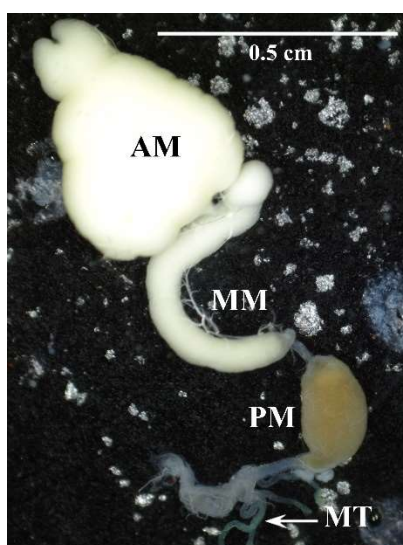
Mortalita byla zjišťována z důvodu určení účinnosti toxinu a z nutnosti vytipování vhodné dávky Bt toxinu. Mortalita by se měla pohybovat kolem 30 %, což by umožňovalo sledování účinku toxinu na fyziologické funkce ploštice při zachování dostatečného počtu živých jedinců. Pokusy pro každou dávku toxinu (včetně kontroly) se prováděly v 5 paralelkách, přičemž v každé skupině bylo nejméně 10 samců. Mortalita byla stanovena po 24 hodinách. Dávka 0,5 μg toxinu byla vytipována jako nejvhodnější, a proto byla následně podávána ve všech pokusech.

3.4. Pitva ruměnice pospolné (*P. apterus*)

U každého jedince byla provedena pitva středního střeva a mozku včetně žláz corpora cardiaca a corpora allata. Ploštice byly pitvány pod binolupou na voskové destičce pomocí nůžek, špendlíků a dvou entomologických pinzet.

3.4.1. Střevo

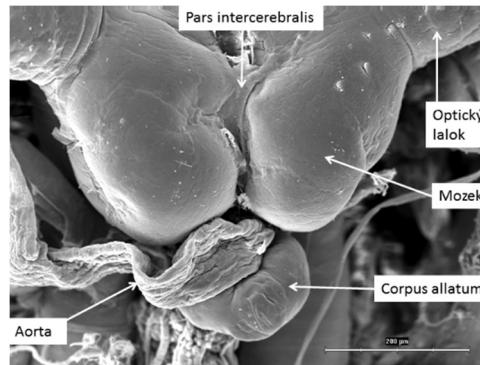
Po ustřížení hlavy bylo tělo plošnice položeno na voskovou destičku a přichyceno dvěma špendlíky ventrální stranou dolů. Nůžkami byla odstraněna křídla a tělní stěna pod nimi. Následně bylo tělo promyto Ringerovým roztokem, aby nedocházelo k vyschnutí orgánů a odstranilo se tukové těleso. Z celého střeva byla oddělena jeho střední část (mesenteron, Obr. 5), ta byla následně umístěna do mikroskopu (Eppendorf) o objemu 1,5 ml. Po celou dobu byly vzorky uchovávány na ledu. Následně bylo střevo zváženo a uchovávalo v mrazničce při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro další zpracování.



Obr. 5. Střední část střeva (mesenteron) ruměnice pospolné. AM – přední (anterior) mesenteron; MM – střední mesenteron; PM – zadní (posterior) mesenteron (Kodřík a kol., 2012).

3.4.2. Centrální nervová soustava, corpora cardiaca a corpora allata

Oddělené hlavy plošnic byly přichyceny špendlíkem za ústní ústrojí k voskové misce. Poté byla pinzetami narušena horní část hlavové schránky, tuková tkáň uvnitř vymyta Ringerovým roztokem a následně byl opatrně vyjmut mozek s endokrinními žlázami corpora cardiaca a corpora allata (CNS, Obr. 6). Celý komplex byl vždy přemístěn do mikroskopu s objemem 1,5 ml, které byly během pitvy udržovány na ledu. Poté byly vzorky uchovávány v mrazničce při $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro další zpracování.



Obr. 6. Centrální nervová soustava ruměnice psočné, corpora cardiaca jsou schována pod corpus allatum (Kodřík, 2017, foto F. Weyda).

3.5. Stanovení hladiny adipokinetických hormonů (AKH) v CNS

Adipokinetické hormony ruměnice psočné (Pyrap-AKH a Peram-CAH-II) byly z CNS extrahovány 80 % metanolem. Extrakty byly odpařeny ve vakuové centrifuze (SpeedVac) a odpadky následně uloženy v mrazáku při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Hladina adipokinetických hormonů byla stanovována pomocí kompetitivního ELISA testu, kde protilátka připravená proti Pyrapp-AKH dobře rozeznává i druhý adipokinetický hormon plošnice Peram-CAH-II (Goldsworthy a kol., 2002).

Reagencie:

- Aplikační pufr – Na_2CO_3 – 0,424 g + NaHCO_3 – 0,504 g na 100 ml, pH = 9,6
- Promývací pufr (WB+) = 10Mm PBS ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 ředěný 1:9) + 0,1 ml Tween/100 ml WB, pH 7,5
- Blokovací pufr - Skimmed milk
- Promývací pufr bez Tweenu (WB-)
- BLAM – roztok Cys 1 – Pyrapp AKH – BLAM; Pyrapp-AKH značený biotinem (Biotin Long Arm Maleimide; Vector Laboratories, Petebrough, UK)
- HRPS – Horseradish Peroxidase Streptavidin – Sigma Aldrich
- Substrát – 3, 3', 5, 5' - tetramethylbenzidin– Sigma Aldrich
- 0,5M H_2SO_4

Vlastní ELISA byla zahájena navázáním primární protilátky proti Pyrapp-AKH (100 μl ; ředění 1:5000 v aplikačním pufru) na destičku přes noc při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté bylo třeba destičku 3krát promýt WB+ roztokem, následně bylo přidáno 200 μl mléka, díky kterému došlo k blokaci neobsazených míst v dané jamce. Destička byla dále inkubována po dobu

120 minut při teplotě 37 °C. Po uplynutí inkubační doby byla destička znovu 3krát promyta WB+. V následujícím kroku byl do jamek napipetován vzorek extraktu CNS (0,5 CNS ekviv., 50 µl) a 100 fmol Pyrap-AKH-BLAM (50 µl), přičemž docházelo ke kompetici mezi AKH obsaženými ve vzorku a AKH s navázaným biotinem (Pyrap-AKH-BLAM). Paralelně se vzorky byl na destičku nanesen také standard hormonu Pyrap-AKH s počáteční dávkou 5pmol ředěný dále dvojkovou řadou, a také pozitivní (WB- a BLAM) a negativní (WB-) kontrola. Nakonec byla destička inkubována 60 minut při 37 °C a pak zase 3krát promyta WB+. Po promytí bylo naneseo do každé jamky 100 µl HRPS (ředění 1:500), jehož streptavidinový konec se váže na biotin. Následně se destička znovu inkubovala 60 minut při 37 °C a poté byla 6krát promyta WB+. V dalším kroku bylo ke vzorkům napipetováno 100 µl substrátu (3, 3', 5, 5' - tetramethylbenzidin) a destička byla zabalena do hliníkové fólie a inkubována po dobu 40 minut při 37°C.

V posledním kroku bylo k substrátu přidáno 50 µl 0,5M H₂SO₄ k zastavení reakce. Absorbance byla změřena na ELISA čtečce při vlnové délce 450 nm. Ke zpracování výsledků bylo potřeba zjistit procento kompetice (viz vzorec) a z vytvořené kalibrační křivky vypočítat množství AKH ve vzorcích.

$$\% \text{ kompetice} = ((\text{test.Abs} - \text{pozadí}) / (\text{max. Abs} - \text{min. Abs.})) * 100$$

3.6. Stanovení aktivity trávicích enzymů střeva

3.6.1. Extrakce enzymů ze středního střeva

Z vypitvaného středního střeva byly extrahovány amylázy, lipázy, proteázy a glukosidázy. K extrakci amyláz a glukosidáz byl použit fosfátový pufr (93,5 ml KH₂PO₄ a 6,5 ml NaH₂PO₄) pH 5,7 s přidáním 20mM NaCl: ke 100 ml roztoku pufru bylo přidáno 2,05 ml NaCl. K extrakci lipáz a proteáz byl použit pufr 0,2M tris pH 7,8.

Po přidání 200 µl příslušného pufru byly vzorky rozsonikovány pomocí jehlového sonikátoru (10 sekund, chlazení ledem). Následně byly vzorky stočeny v centrifuze (5 minut, 10000 otáček) a supernatanty použity ke stanovení aktivity příslušných enzymů.

3.6.2. Stanovení amylázové aktivity

Amylázová aktivita byla stanovena metodou podle Bernfelda (1955) modifikovanou na ruměnici pospolnou v práci Kodríka a kol. (2012).

Reagencie:

- 2% škrob
- DNS reagent: DNS (kyselina 3,5-dinitrosalicylová) – 0,0125 g, K-Na tartare x 4H₂O – 7,5g, NaOH – 0,4 g na 25 ml vody
- fosfátový pufr pH5,7 + 20Mm NaCl (viz výše)

Nejprve byl připraven DNS reagent (uvedené navážky byly rozpuštěny v 10 ml destilované vody a následně byl objem doplněn na 25 ml). Substrátový roztok byl připraven zředěním 2% škrobu v poměru 1:1 s fosfátovým pufrem s 20mM NaCl. Do každé eppendorfky bylo napipetováno 25 µl roztoku škrobu s fosfátovým pufrem a 25 µl vlastního vzorku (0,125 ekviv. střeva). Ke každé sadě opakování byl vždy přidán jeden kontrolní vzorek, který byl tvořen 25 µl pufru a 25 µl roztoku se škrobem. Takto připravené vzorky v eppendorfkách byly inkubovány 1 hodinu při 30 °C. Poté byla inkubace zastavena přidáním 200 µl DNS reagentie. Následně byly eppendorfky dány do blokového termostatu, kde se vařily 5 minut při 100 °C. Po vychladnutí byly eppendorfky centrifugovány (10 000 otáček, 10 minut), z každé eppendorfky pak bylo odpipetováno 200 µl do 96-jamkové destičky. Absorbance vzorků byla změřena na čtečce při vlnové délce 550 nm. Pro vytvoření grafů byly změřené výsledky přepočítány na množství maltózy/miligram hmotnosti střeva (Bodláková a kol., 2017, 2018).

3.6.3. Stanovení proteázové aktivity

Proteázová aktivita byla stanovena pomocí resorufin kaseinového kitu podle příslušného návodu firmy Roche.

Reagencie:

- substrátový roztok - 0,4% resorufin kasein
- 0,2M tris, pH 7,8
- 0,02M CaCl₂
- blokovací roztok - 5% kyselina trichloroctová (TCA)

Po připravení výše uvedených reagentů se v eppendorfkách smíchalo 20 µl 0,02M CaCl₂, 40 µl 0,2M trisu, 20 µl resorufin kaseinu a 20 µl vlastního vzorku extrahovaného v 0,2M trisu (0,1 ekviv. střeva). U každého opakování byl vždy připraven kontrolní vzorek, který obsahoval 20 µl resorufin kaseinu, 60 µl 0,2M trisu a 20 µl 0,02M CaCl₂. Následně byly vzorky inkubovány 1 hodinu při 37 °C. Po uplynutí inkubační doby bylo přidáno 240 µl blokovacího

roztoku TCA a inkubace pokračovala ještě dalších 10 minut při teplotě 37 °C. Následně byly vzorky centrifugovány (3 minuty, 10 000 otáček). K samotnému měření bylo odebráno 200 μ l z každé eppendorfky a napipetováno do 96 - jamkové destičky; absorbance byla změřena na čtečce při vlnové délce 490 nm. Výsledky byly vyjádřeny v relativní absorbanci na miligram hmotnosti střeva.

3.6.4. Stanovení lipázové aktivity

Lipázová aktivita byla stanovena podle protokolu Robertse (1985).

Reagencie:

- 50mM 4MU-butyrát (4-methylumbelliferyl butyrát) rozpuštěný v DMSO (dimethylsulfoxid); na vlastní test se roztok ředí 25x
- 0,2M tris pH 7,8

Po přípravě výše zmíněných reagentů bylo do každé jamky v černé 96 - jamkové destičce napipetováno 190 μ l 0,2M tris pH 7,8, dále 5 μ l vlastního vzorku (0,025 ekviv. střeva) a 5 μ l 4MU-butyrátu (součet musí být vždy 200 μ l). U každého opakování bylo potřeba připravit kontrolní vzorek, který obsahoval 195 μ l 0,2M tris pH 7,8 a 5 μ l 50 mM 4MU-butyrátu. Aktivita byla měřena na fluorimetru (Biotek) při vlnových délkách 327 nm/449 nm exc/em. K výpočtu lipázové aktivity byly použity hodnoty naměřené v časech 0 a 30 minut a převedené na nmol 4 MU/miligram střeva.

3.6.5. Stanovení glukosidázové aktivity

Glukosidázová aktivita byla stanovena podle metody modifikované v práci Kodríka a kol. (2012).

Reagencie:

- 20mM 4MUGlu (4-methylumbelliferyl- α -D-glucopyranoside) – 10x zředěné
- fosfátový pufr pH 5,7 – 2,722 g KH_2PO_4 rozpuštěné ve 100 ml destilované vody a 0,716 g NaH_2PO_4 rozpuštěné ve 100 ml destilované vody, poté bylo smícháno 93,5 ml roztoku KH_2PO_4 a 6,5 ml roztoku NaH_2PO_4 za vzniku 100 ml fosfátového pufru
- 0,2M Na_2CO_3

Po přípravě uvedených reagentů bylo do černé destičky napipetováno 2 μ l vlastního vzorku (0,01 ekviv. střeva) spolu s 95,5 μ l fosfátového pufru pH 5,7. Ke každému opakování byl přidán kontrolní vzorek, který obsahoval 97,5 μ l fosfátového pufru pH 5,7. Ke všem měřeným

vzorkům bylo přidáno 2,5 µl zředěného 4MuaGlu. Dále byly vzorky inkubovány po dobu 90 minut ve tmě. Po uplynutí inkubační doby bylo přidáno 100 µl 0,2M Na₂CO₃, následně byla destička promíchána a znovu inkubována 1 minutu. Na závěr byla destička změřena pomocí kinetické fluorescence na fluorimetru (Biotek) při vlnových délkách 365 nm/445 nm exc/em.

3.7. Stanovení hladiny živin v hemolymfě

3.7.1. Odběr hemolymfy

Pomocí pinzety byla plošnice přidržena a nůžkami byla nastříhnuta tykadla, která se následně přiložila na parafilm, aby zde mohla čirá hemolymfa odkapávat. Z parafilmu byla hemolymfa přepipetována do eppendorfek, kam bylo přidáno jedno zrno thiomocoviny, která zabraňuje melanizaci.

3.7.2. Stanovení cukrů

Stanovení volných cukrů bylo provedeno podle práce Carol a kol. (1956), následně modifikováno podle práce Socha a kol. (2004).

Reagencie:

- Anthronová reagens – 15 mg anthronu + 10 ml 72% H₂SO₄
- Destilovaná H₂O

Do eppendorfek bylo napipetováno 40 µl destilované H₂O, 230 µl anthronové reagens a 1 µl hemolymfy. Počet vzorků byl vždy 5-6 a ke každé sadě byl vytvořen kontrolní vzorek, který obsahoval pouze 40 µl destilované H₂O a 230 µl anthronové reagens. Eppendorfky byly po dobu 8 minut vařeny v zahřívacím bločku při 100 °C a poté bylo vždy 200 µl vzorku přepipetováno do 96-jamkové destičky a absorbance změřena na čtečce při vlnové délce 620 nm. Výsledky byly přepočítány podle kalibrační křivky známého množství glukózy.

3.7.3. Stanovení bílkovin

Stanovení bílkovin bylo provedeno podle práce Stoscheck (1990).

Reagencie:

- Reakční směs (25 ml BCA - bicinchoninová kyselina + 500 µl CuSO₄)
- Destilovaná H₂O

Jeden µl hemolymfy byl naředěn v 200 µl destilované H₂O a 50 µl roztoku smícháno s 1 ml reakční směsí. Počet opakování byl vždy 5-6 vzorků a ke každé sadě byl vytvořen kontrolní

vzorek, který obsahoval 50 μl destilované H_2O a 1 ml reakční směsi. Poté bylo do 96-jamkové destičky přepipetováno vždy 200 μl roztoku pro každý vzorek. Dále byly vzorky zahřívány na zahřívacím bločku po dobu 30 minut při 60 $^\circ\text{C}$ a poté byla jejich absorbance změřena na při vlnové délce 562 nm. Výsledky byly přepočítány podle kalibrační křivky známého množství BSA (bovinní sérový albumin).

3.7.4. Stanovení lipidů

Stanovení lipidů bylo provedeno podle práce Zöllner a Kirsch (1962) modifikováno podle Kodrík a kol. (2000).

Reagencie:

- 96% H_2SO_4
- Vanilinová reagens (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyd) – Sigma-Aldrich,
 - 1,98 vanilinu se rozpustí v 668 ml kyseliny fosforečné a zahřeje na 60 $^\circ\text{C}$, poté se ochladí a doplní se destilovanou vodou do 1 l. Vznikne žlutý roztok, který je potřeba nechat stát alespoň jeden týden v chladu.

Do skleněných zkumavek bylo napipetováno 100 μl 96% H_2SO_4 a 1 μl hemolymfy. Počet opakování byl vždy 5-6. Ke každé sadě byl vytvořen kontrolní vzorek, který obsahoval 100 μl H_2SO_4 . Dále byly zkumavky povařeny po dobu 10 minut při 100 $^\circ\text{C}$ na vodní lázni. Po vychladnutí byl do každé zkumavky přidán 1 ml vanilinové reagencie, směs byla promíchána a nechala se 30 minut odstát. Následně bylo do 96 - jamkové destičky napipetováno vždy 200 μl vzorku a změřena absorbance na spektrofotometru při vlnové délce 546 nm. Výsledky byly přepočítány podle kalibrační křivky kyseliny olejové.

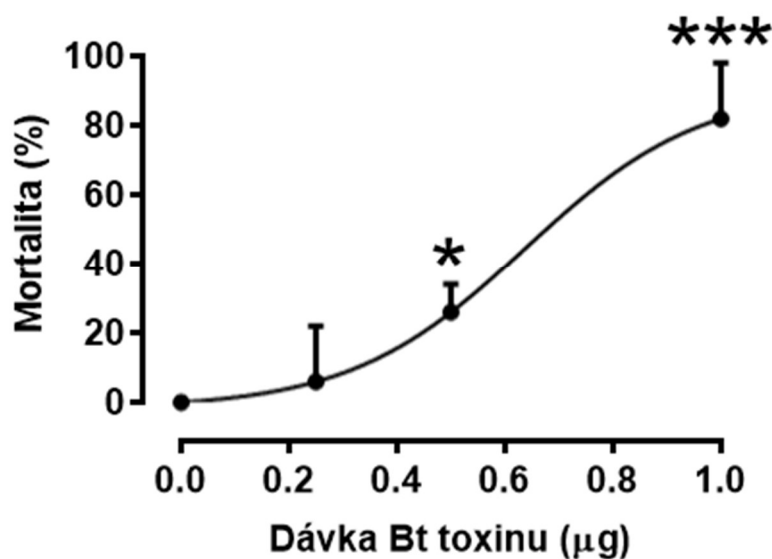
3.8. Zpracování výsledků

Všechny grafy byly připraveny pomocí GraphPad Software verze Prism 8 (San Diego, California). Pro statistické vyhodnocení byl použit Studentův t-test a jednocestná ANOVA s Dunnetovým post-testem.

4. Výsledky

4.1. Vliv Bt toxinu na mortalitu

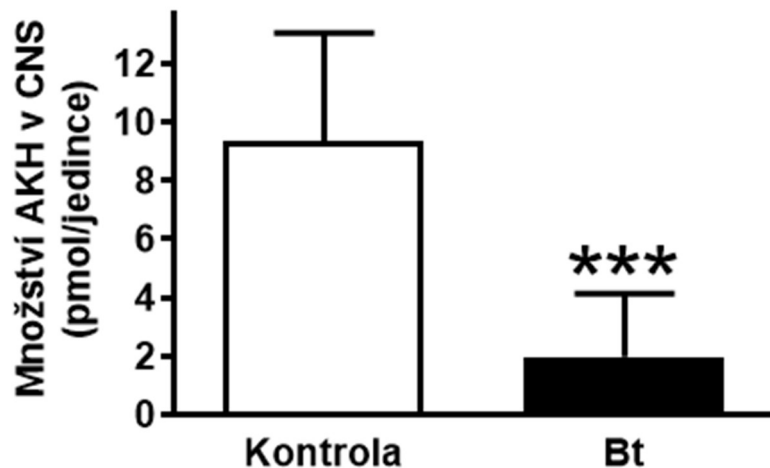
Aplikace zvyšujících se dávek Bt toxinu vyvolala u pokusných ploštic narůstající mortalitu, jejíž průměrné hodnoty jsou uvedeny na obrázku 7. Jako nejvhodnější se pro následné fyziologické pokusy jevila dávka 0,5 μg Bt toxinu rozpuštěná ve 2 μl Ringerova fyziologického roztoku, kdy mortalita nepřesahovala 30 %.



Obr. 7. Vliv dávky Bt toxinu na mortalitu ruměnice pospolné *P. apterus*. Statisticky významné výsledky byly vyhodnoceny pomocí testu jednocestná ANOVA s Dunnetovým post-testem; n=4-5 skupin, v každé skupině 10 ploštic.

4.2. Vliv Bt toxinu na hladinu AKH

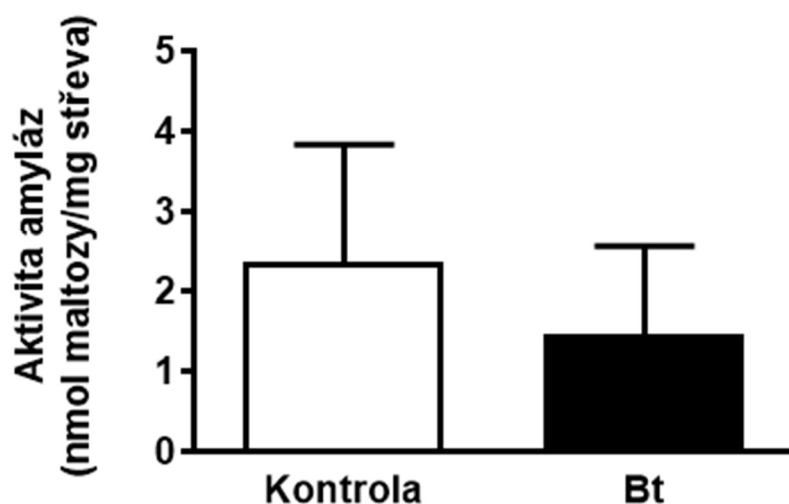
Je nepochybné, že aplikace Bt toxinu vyvolala v ruměnici pospolné silný stres. Proto byl v další sérii experimentů sledován vliv tohoto toxinu na hladinu antistresových adipokinetických hormonů v CNS. Výsledky rozdílů mezi ošetřenou a kontrolní skupinou jsou zobrazeny na Obr. 8, kde je vidět, že Bt toxin vyvolal u ošetřených jedinců asi 4,7násobný pokles hladiny AKH ve srovnání s kontrolní skupinou.



Obr. 8. Hladina AKH u ruměnice pospolné *P. apterus*. Statisticky významné rozdíly na 1% hladině významnosti testované Studentovo t-testem jsou označeny hvězdičkami nad sloupcem; n=10.

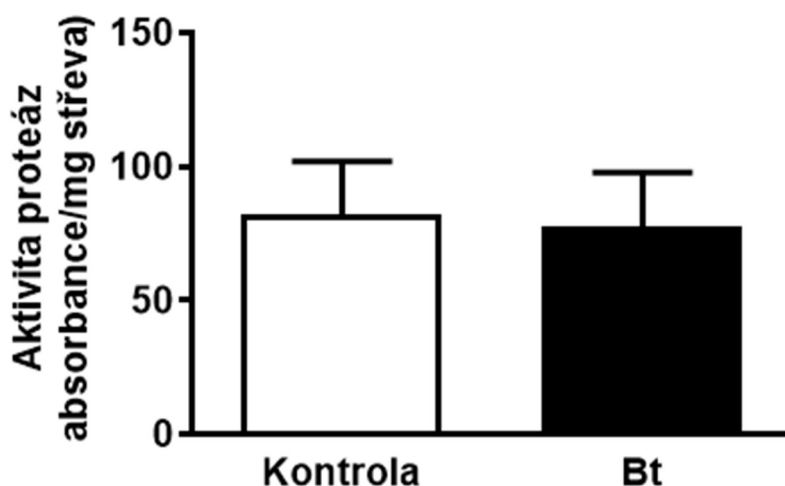
4.3. Vliv Bt toxinu na aktivitu trávicích enzymů

Je dobře známo, že primárním cílovým orgánem Bt toxinu je především střevo, proto byla dále sledována aktivita různých trávicích enzymů ve středním střevě pokusných ploštic. Obr. 9 zobrazuje výsledky aktivity amyláz ve střevech ošetřených jedinců, které jsou srovnány s kontrolními jedinci. Zdá se, že Bt toxin částečně snižuje aktivitu těchto enzymů, nicméně snížení nebylo statisticky průkazné.

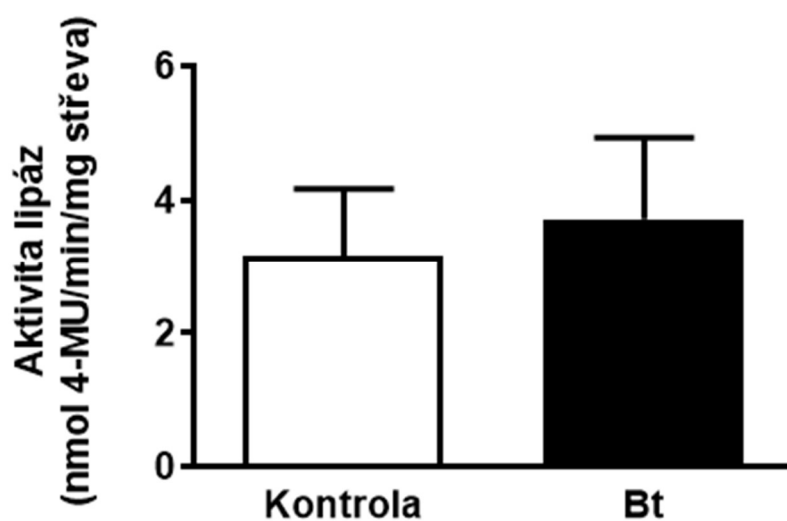


Obr. 9. Vliv Bt toxinu na aktivitu amyláz ve středním střevě ruměnice pospolné *P. apterus*. Pomocí Studentova t-testu na 5% hladině významnosti (n=10) nebyl mezi hodnotami zjištěn žádný statisticky významný rozdíl.

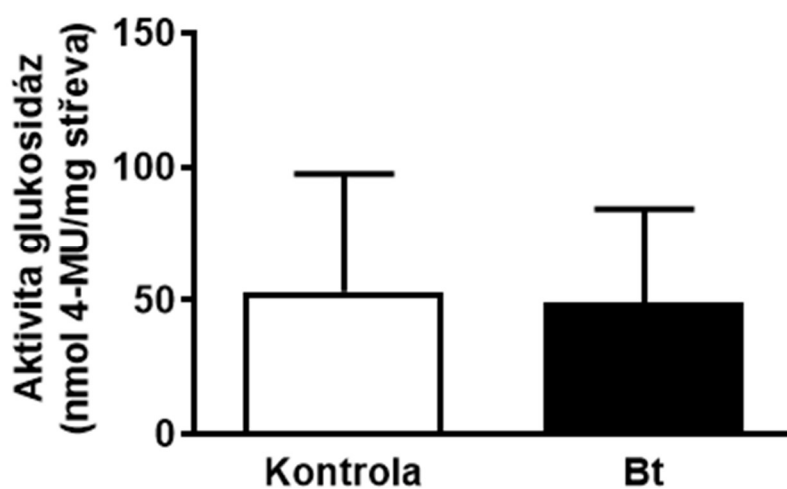
Podobný nevýznamný vliv Bt toxinu byl zjištěn i pro aktivitu proteáz (Obr. 10), lipáz (Obr. 11) a glukosidáz (Obr. 12). Tyto výsledky naznačují, že injekčně podaný Bt toxin nepůsobil na aktivitu střevních enzymů ruměnice pospolné.



Obr. 10. Vliv Bt toxinu na aktivitu proteáz ve středním střevě ruměnice pospolné *P. apterus*. Pomocí Studentova t-testu na 5% hladině významnosti (n=10) nebyl mezi hodnotami zjištěn žádný statisticky významný rozdíl.



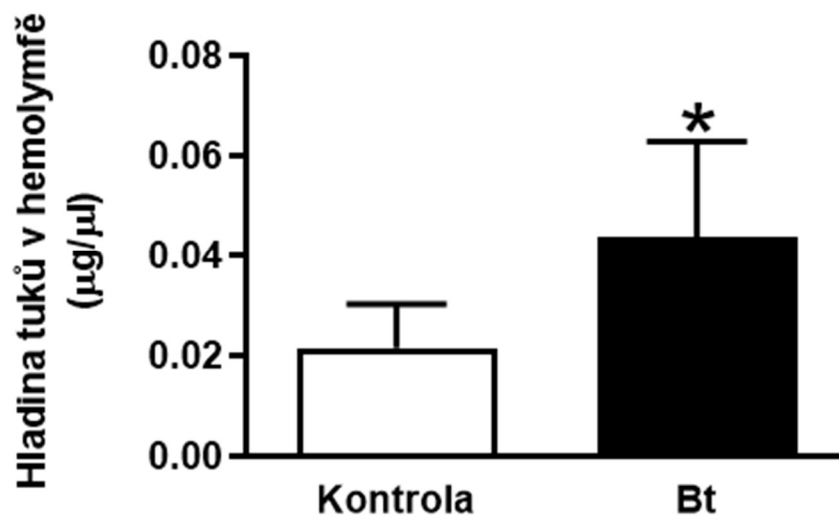
Obr. 11. Vliv Bt toxinu na aktivitu lipáz ve středním střevě ruměnice pospolné *P. apterus*. Pomocí Studentova t-testu na 5% hladině významnosti nebyl mezi hodnotami zjištěn žádný statisticky významný rozdíl; n=10.



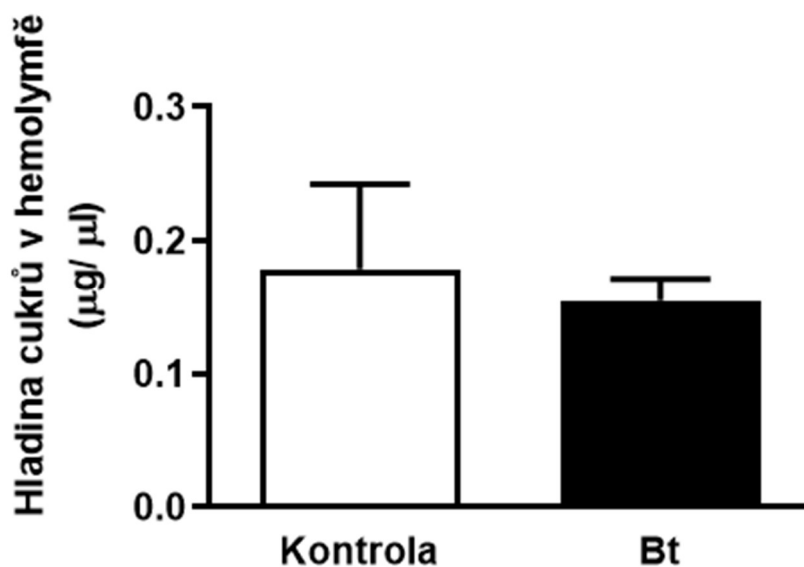
Obr. 12. Vliv Bt toxinu na aktivitu glukosidáz ve středním střevě ruměnice pospolné *P. apterus*. Pomocí Studentova t-testu na 5% hladině významnosti (n=10) nebyl mezi hodnotami zjištěn žádný statisticky významný rozdíl.

4.4. Vliv Bt toxinu na hladinu živin v hemolymfě

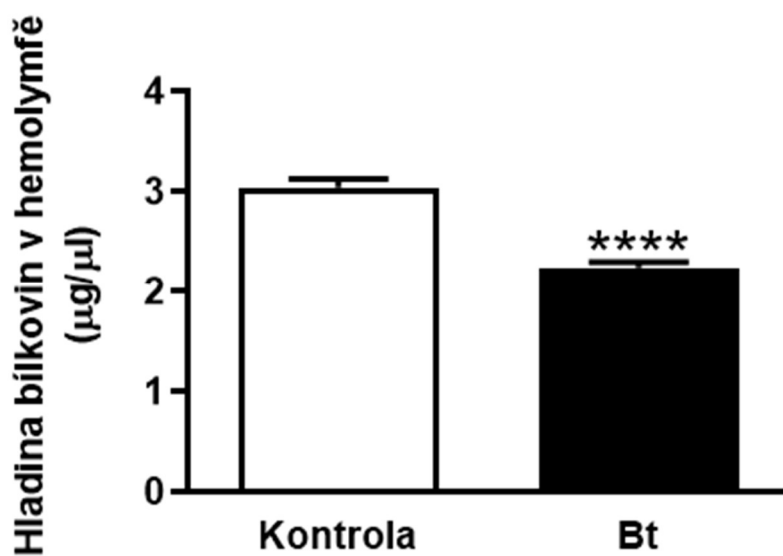
Reakce na stres u živočichů včetně hmyzu zpravidla vyvolá mobilizaci energetických zásob, aby se pokryly energetické výdaje nutné na zajištění anti-stresových reakcí. Proto byly v další fázi pokusů monitorovány hladiny živin v hemolymfě u ošetřených jedinců a porovnávány s kontrolní skupinou. V souladu s předpokladem se ukázalo, že u ošetřených jedinců se oproti kontrolní skupině po 24 hodinách významně (asi 2krát) zvýšila hladina tuků v hemolymfě (Obr. 13). U hladiny cukrů (Obr. 14) nebyl na rozdíl od tuků žádný statisticky významný rozdíl prokázán. U bílkovin (Obr. 15) byl překvapivě zaznamenán statisticky průkazný pokles u ošetřených jedinců, kdy se jejich hladina v hemolymfě snížila 1,4krát.



Obr. 13. Vliv Bt toxinu na hladinu tuků v hemolymfě u ruměnice pospolné *P. apterus*. Statisticky významné rozdíly na 5% hladině významnosti testované Studentovým t-testem jsou vyznačeny hvězdičkou nad sloupcem.



Obr. 14. Vliv Bt toxinu na hladinu cukrů v hemolymfě u ruměnice pospolné *P. apterus*. Pomocí Studentova t-testu na 5% hladině významnosti (n=10) nebyl mezi hodnotami zjištěn žádný statisticky významný rozdíl.



Obr. 15. Vliv Bt toxinu na hladinu bílkovin v hemolymfě u ruměnice pospolné *P. apterus*. Statisticky významné rozdíly na 0,01% hladině významnosti testované Studentovo t-testem jsou označeny hvězdičkami nad sloupcem; n=10.

5. Diskuze

Pro výzkum hmyzích obranných reakcí při podání Bt toxinu byl vybrán jako modelový organismus ruměnice pospolná (*P. apterus*). Tento druh je pro takový výzkum velice vhodný, protože jeho fyziologické vlastnosti, reakce na jiné stresory a funkce AKH jsou dobře prostudovány (Kodrík, 2008).

Nejprve byla potřeba určit dávku Bt toxinu, která by vyvolala mortalitu okolo 20 až 30 %. Tato procentuální hodnota byla vybrána jako optimální na základě předchozích prací (Kodrík a kol., 2010; Velki a kol., 2011; Plavšín a kol., 2015), kdy testovaná toxická látka vykazuje účinnost, ale zároveň je zachován dostatečný počet živých jedinců k dalším pokusům. Jako nejvhodnější byla vybrána dávka 0,5 µg Bt toxinu na jedince.

Po stanovení mortality a zjištění vlivu toxinu bylo potřeba zmapovat jeho účinky. Proto bylo primárně testováno jeho působení ve středním střevě (mesenteron), kde však nebyl zjištěn žádný průkazný rozdíl mezi ošetřenými a neošetřenými jedinci v aktivitě trávicích enzymů. Je obecně známo, že Bt toxin působí na epitel střeva, ve kterém tvoří póry a tím narušuje jeho strukturu (Drobník., J. 2004). Vliv Bt toxinu podávaného v potravě jako součást geneticky modifikovaných brambor, byl již dříve testován v naší laboratoři na mandelince bramborové *Leptinotarsa decemlineata*, kde byl prokázán jeho negativní účinek na řadu fyziologických charakteristik (Kodrík, 2007). V mojí práci byl Bt toxin aplikován do těla injekčně, což na aktivitu trávicích enzymů u plošnice nemělo vliv.

V další sérii pokusů jsem měřila hladinu AKH v mozku. Vzhledem k tomu, že jsou adipokinetické hormony označovány jako stresové, předpokládali jsme navýšení jejich hladiny po aplikaci Bt toxinu. Tento předpoklad byl potvrzen již u řady jiných stresorů (Kodrík a kol., 2010; Ibrahim a kol., 2017). Například podávání geneticky modifikovaných brambor exprimujících *Galanthus nivalis* aglutinin nebo Bt toxin a aplikace několika neurotoxických insekticidů (melathion, endosulfan, permethrin) na dva modelové druhy hmyzu: ruměnici pospolnou *P. apterus* (Kodrík a Socha, 2005; Kodrík a kol., 2010, Velki a kol., 2011) a potměníka hnědého *Tribolium castaneum* (Plavšín a kol., 2015) odhalilo, že intoxikace ve většině případů zvyšovala hladinu AKH v těle hmyzu. To naznačuje zapojení tohoto hormonu do aktivace obranných mechanismů proti insekticidnímu stresu, nicméně tento vliv na hladinu AKH není jednoznačný a podléhá značné variabilitě. Změny způsobené toxiny závisí nejen na jejich dávce, ale také na konkrétním toxinu. V mých výsledcích můžeme pozorovat opačný trend, kdy aplikace Bt toxinu snižuje hladinu AKH v mozku. Tento jev je překvapivý a není

zcela zřejmé, co způsobuje tento pokles. Jednou z možností by mohlo být vyloučení AKH do hemolymfy, tato možnost není ale zatím podložena a bude předmětem dalšího výzkumu. Podobné snížení bylo zaznamenáno i po aplikaci blastospor entomopatogenní houby *I. fumosorosea* do těla ruměnice pospolné, kdy byl naměřen asi dvojnásobný pokles hladiny AKH v CNS (Černý, 2016).

Jednou z rolí AKH v organismu je mobilizace energetických zásob ve stresové situaci. Pokud je organismus vystaven stresu, lze předpokládat, že se zvýší hladina živin v hemolymfě, jelikož jsou právě hemolymfou transportovány do cílových tkání. U ploštice *P. apterus* se mnohokrát prokázalo (Kodrík a kol., 2000; Socha a kol., 2004), že základem jejího metabolismu je utilizace lipidů. V souladu s tím jsem zjistila významné navýšení hladiny lipidů po aplikaci Bt toxinu. Jestli je to důsledek zmíněného uvolnění AKH z corpora cardiaca (viz výše) do hemolymfy nebo nějaké jiné signální dráhy není jasné. V souladu s malou rolí glycidů v metabolismu ploštice nebylo zaznamenáno žádné jejich zvýšení u Bt ošetřených jedinců ve srovnání s kontrolou. Nečekaný výsledek jsem zaznamenala u hladiny bílkovin v hemolymfě, kdy došlo k významnému poklesu (1,4 násobnému) u ošetřených jedinců. O možném vysvětlení lze jen spekulovat. Nelze vyloučit, že možné změny osmotických poměrů v hemolymfě vyvolají vysrážení bílkovin o vyšší molekulové hmotnosti. Ty pak použitým testem nelze stanovit. Dalším možným vysvětlením by mohla být degradace bílkovin vlivem nepřiměřených podmínek v organismu.

6. Závěr

Práce se zabývá fyziologickými změnami (hladina adipokinetických hormonů, aktivita trávicích enzymů ve střevě, množství živin v hemolymfě) v těle ruměnice pospolné *P. apterus* po injekci Bt toxinu. Z naměřených výsledků vyplývá:

- Aplikace Bt toxinu vyvolala mortalitu u jedinců ruměnice pospolné *P. apterus*. Optimální dávka toxinu byla stanovena na 0,5 µg.
- Hladina AKH po injekci Bt toxinu významně poklesla.
- Aktivita trávicích enzymů (amylázy, proteázy, lipázy, glukosidázy) se po injekci Bt toxinu významně nezměnila.
- Aplikace Bt toxinu významně modulovala hladinu živin v hemolymfě: hladina tuků vzrostla 2krát, hladina bílkovin poklesla 1,4krát a hladina cukrů žádné změny nezaznamenala.

7. Seznam použité literatury

- Beckage, N. E., Gelman, D. B. (2004)** Wasp parasitoid disruption of host development: Implications for New Biologically Based Strategies for Insect Control. *Annual Review of Entomology*, 49(1), 299–330.
- Bernfeld, P. (1955)** Amylases, a and b. In: Colowick, S. P., Kaplan, N.O. (Eds.), *Methods in Enzymology*. Vol. 1. Academic Press, New York, pp. 149-158.
- BodlÁková, K., Beňová, M., KodrÍk, D. (2018)** The effect of adipokinetic hormones on the activity of digestive enzymes. *Physiological Entomology*, 43(2), 140-148.
- BodlÁková, K., Jedlička, P., KodrÍk, D. (2017)** Adipokinetic hormones control amylase activity in the cockroach (*Periplaneta americana*) gut. *Insect Science*, 24(2), 259–269.
- Carol N.V., Longley R.W. Roe J.H. (1956)** The determination of glycogen in liver and muscles by use of anthron reagent. *The Journal of biological chemistry*, 20, 583-586.
- Černý, J. (2016)** Studium adipokinetické hormonální odpovědi na infekci způsobenou entomopatogenní houbou druhu *Isaria fumosorosea*. Č. Budějovice, bakalářská práce (Bc.). Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Přírodovědecká fakulta.
- Drobník, J. (2004)** Staronový biopesticid. *Živa* 2, 54-56.
- Sansinenea E. (2012)** Discovery and Description of *Bacillus thuringiensis*. In: Sansinenea E. (eds) *Bacillus thuringiensis Biotechnology*. Springer, Dordrecht, (1), 3–18.
- Gäde, G. (1997)** The explosion of structural information on insect neuropeptides. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 1-128.
- Gäde, G., Auerswald, L. (2002)** Beetles' choice – proline for energy output: control by AKHS., *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry and Molecular Biology*, 132, 117-129.
- Gäde, G., Auerswald, L. (2003)** Mode of action of neuropeptides from the adipokinetic hormone family., *General and Comparative Endocrinology*, 132, 10-20.
- Gäde, G., Marco, H. G. (2009)** Peptides of the adipokinetic hormone/red pigment-concentrating hormone family with special emphasis on Caelifera: primary sequences and functional considerations contrasting grasshoppers and locusts., *General and Comparative Endocrinology*, 162, 59-68.

- Goldsworthy, G., Chandrakant, S., Opoku-Ware, K. (2003)** Adipokinetic hormone enhances nodule formation and phenoloxidase activation in adult locusts injected with bacterial lipopolysaccharide. *Journal of Insect Physiology*, 49(8), 795-803.
- Hightower, L. E. (1991)** Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell*, 66(2), 191–197.
- Hofte, H., Whiteley, H. R. (1989)** Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*, 53, 242-255.
- Chapman, R. F. (1998)** *The Insects: Structure and Function*, 4th ed., Cambridge University Press, Cambridge.
- Ibrahim, E., Hejníková, M., Shaik, H. A., Doležel, D., Kodrík, D. (2017)** Adipokinetic hormone activities in insect body infected by entomopathogenic nematode. *Journal of Insect Physiology*, 98, 347-355.
- Ivanovič, J., Jankovič-Hladni, M. (1991)** *Hormones and Metabolism in Insect Stress*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Karlson, P., (1981)**, *Základy biochemie*. Academia, Praha, 3. České přepracované vydání.
- Kaufmann, C., Brown, M. R. (2006)** Adipokinetic hormones in the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*: identification and expression of genes for two peptides and a putative receptor., *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36, 466-481.
- Kodrík D. (2014)** Hormony a hormonální řízení anti-stresové odpovědi u hmyzu. *Živa* 62 (5), 206-208.
- Kodrík, D. (2008)** Adipocinetic hormone functions that are not associated with insect flight. *Physiological Entomology* 33, 171-180.
- Kodrík, D., Socha, R. (2005)** The effect of insecticide on adipokinetic hormone titre in the insect body. *Pest Management Science*, 61(11), 1077-1082.
- Kodrík D., Bártů I., Socha R. (2010)** Adipokinetic hormone (Pyrap-AKH) enhances the effect of a pyrethroid insecticide against the firebug *Pyrrhocoris apterus*. *Pest Management Science*, 66, 425-431.

Kodrík, D., Krishnan, N., Habušťová, O. (2007) Is the tier of adipokinetic peptides in *Leptinotarsa decemlineata* fed on generically modified potatoes increased by oxidative stress?, *Peptides*, 28, 974-980.

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

Kodrík, D., Vinokurov, K., Tomčala, A., Socha, R. (2012) The effect of adipokinetic hormone on midgut characteristics in *Pyrrhocoris apterus* L. (Heteroptera). *Journal of Insect Physiology*, 58, 194-204.

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

Kodrík, D., Stašková, T., Jedličková, V., Weyda, F., Závodská, R., Pfliegerová, J. (2015a) Molecular characterization, tissue distribution and ultrastructural localization of adipokinetic hormone in the CNS of the firebug *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera, Insecta). *General and Comparative Endocrinology*, 210, 1-11.

Kryukova, N. A., Dubovskiy, I.M., Chertkova, E. A., Vorontsova, Ya. L., Slepneva, I. A., Glupov, V. V., (2011) The effect of *Habrobracon hebetor* venom on the activity of the prophenoloxidase system, the generation of reactive oxygen species and encapsulation in the haemolymph of *Galleria mellonella* larvae. *Journal of Insect Physiology*. 57, 796-800.

Lee, G., Park, J. H. (2004) Hemolymph sugar homeostasis and starvation-induced hepactivity affected by genetic manipulations of the adipokinetic hormone-encoding in *Drosophila melanogaster*., *Genetics*, 167, 311-323.

Malenovský I., Baňář P., Kment P. (2011) A contribution to the faunistics of the Hemiptera (Cicadomorpha, Fulgoromorpha, Heteroptera, and Psylloidea) associated with dry grassland sites in southern Moravia (Czech Republic). *Acta Musei Moraviae, Scientiae Biologicae (Brno)* 96: 41-187.

Park, Y., Kim, Y. J., Adams, M.E. (2002) Identification of G protein – coupled receptors for *Drosophila* PRXamide peptides, CCAP, corazonin, and AKH supports a theory of ligand –

receptor coevolution., Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 99, 11423-11428.

Pennacchio, F., Caccia, S., Digilio, M. C., (2014) Host regulation and nutritional exploitation by parasitic wasps. Current Opinion in Insect Science, 6, 74–79.

Pigott, C. R., Ellar, D. J. (2007) Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 71(2), 255–281.

Plavšín, I., Stašková, T., Šerý, M., Smýkal, V., Hackenberger, H. K., Kodrík, D. (2015) Hormonal enhancement of insecticide efficacy in *Tribolium castaneum*: Oxidative stress and metabolic aspects., Comparative Biochemistry and Physiology C, 170, 19-27.

Roberts, I. M. (1985) Hydrolysis of 4-methylumbelliferyl butyrate: a convenient and sensitive fluorescent assay for lipase activity. Lipids 20, 243-247.

Roh, J., Jae, Y., Ming, S., Byung, R., Yeon, H. (2007) *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control, Journal of Microbiology and Biotechnology, 17, (4), 547-559.

Scarborough, R. M., Jamiesin, G. C., Kalisz, F., Kramer, S. J., McEnroe, G.A., Miller, C. A., Schooled, D. A. (1984) Isolation and primary structure of two peptides with cardio accelerators and hyperglycaemic activity from the corpora cardiaca of *Periplaneta americana*., Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 81, 5575-5579.

Shaik, H. A., Mishra, A., Kodrík, D. (2017) Beneficial effect of adipokinetic hormone on neuromuscular paralysis in insect body elicited by braconid wasp venom. Comparative Biochemistry and Physiology Part – C: Toxicology and Pharmacology, 196, 11-18.

Socha R. (2013) Do long and short-winged adult females of the bug *Pyrrhocoris apterus* L. (Heteroptera: Pyrrhocoridae) differ in lifespan and reproductive capacity?, European journal of entomology, 110, 115-121.

Socha, R., Kodrík, D., Zemek, R. (1999) Adipokinetic hormone stimulates insect locomotor activity., Naturwissenschaften, 88, 85-86.

Socha, R., Šula, J., Kodrík, D. (2004) Wing morph-related differences in developmental pattern of accessory gland proteins in adult males of *Pyrrhocoris apterus* (L.) and their endocrine control. Journal of Insect Physiology, 50(10), 893–90.

- Stichmann-Marny, U., Kretzschmar, E. (1998)** Der neue Kosmos Tier- und Pflanzenführer. Kosmos Natur-Klassiker, 447, ISBN: 9783440075296.
- Stoscheck C.M. (1990)** Quantitation of proteins. Methods in Enzymology, Academic Press, Inc., 182, 50-68.
- Velki, M., Kodrík, D., Večeřa, J., Hackenberger, B. K., Socha, R. (2011)** Oxidative stress elicited by insecticides: a role for adipokinetic hormone., General and Comparative Endocrinology, 172, 77-84.
- Vinokurov, K., Bednářová, A., Tomčala, A., Stašková, T., Krishnan, N., Kodrík, D. (2014)** Role of adipokinetic hormone in stimulation of salivary gland activities: the firebug *Pyrrhocoris apterus L.* (Heteroptera) as a model species. Journal of Insect Physiology 60, 58-67.
- Wicher, D., Agricola, H. J., Sohler, S., Gundel, M, Heinemann, S. H., Wollweber, L., Stengl, M., Derst, Ch. (2006)** Differential receptor activation by cockroach adipokinetic hormones produces differential effects on ion currents, neuronal activity and locomotion. Journal of Neurophysiology, 95, 2314-2325.
- Zöllner, N., Kirch, K. (1962)** Über die quantitative Bestimmung von Lipoiden (Mikromethode) mittels der vielen natürlichen Lipoiden (allen bekammten Plasmolipoiden) gemeinsamen Sulfo – phosphovanillin Reaktion, Zeitschrift für die Gesamte Experimentelle Medizin, 135, 545-561.