

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Studium adipokinetické hormonální odpovědi na infekci
způsobenou entomopatogenní houbou druhu *Isaria fumosorosea***

Autor: Jan Černý

Vedoucí práce: prof. RNDr. Dalibor Kodrík CSc.

Místo a rok vypracování: České Budějovice, 2016

Černý J., 2016: Studium adipokinetické hormonální odpovědi na infekci způsobenou entomopatogenní houbou druhu *Isaria fumosorosea*. [Study of adipokinetic hormonal response to infection elicited by entomopathogenic fungus *Isaria fumosoroesa*. Bc. Thesis, in Czech.] – 53 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

The goal of this bachelor thesis was to find out how to elicit the infection by entomopathogenic fungus *Isaria fumosoroesa* in the firebug *Pyrrhocoris apterus*. When firebugs were successfully infected by blastospores of these fungus, the level of AKH in the central neural system and metabolic activities were measured. The results revealed that the infection caused decrease of AKH level in the CNS and activation of energy sources (lipids) in haemolymph. The flow cytometry analyses indicated certain changes of hemocyte numbers and populations in the hemolymph after the infection.

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

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

V Českých Budějovicích dne 15. dubna 2016

.....

Jan Černý

Na této stránce bych rád poděkoval především panu prof. RNDr. Daliboru Kodríkovi CSc. za jeho vedení, užitečné rady a připomínky po celou dobu práce v laboratoři. Mé díky patří i členům laboratoře za pomoc a přátelské prostředí. Dále bych rád poděkoval panu Ing. Rostislavu Zemkovi CSc. za odborné konzultace, rady a ochotu při zpracování části práce týkající se *Isaria fumosorosea* a paní Ing. Katce Šimáčkové, Ph.D. za kultivaci houby. Také děkuji paní Mgr. Jaroslavě Lieskovské, Ph.D. za pomoc s cytometrií. V neposlední řadě bych také rád poděkoval rodině a kamarádům za podporu při studiu.

Obsah

1. Úvod	1
1. 1. Adipokinetické hormony	1
1. 1. 1. Endokrinní soustava hmyzu	1
1. 1. 2. Základní charakteristika AKH	2
1. 1. 3. Místo syntézy AKH	3
1. 1. 3. 1. Detekce AKH	3
1. 1. 4. Mechanismus působení AKH	4
1. 1. 5. Porovnání AKH s hormony obratlovců	5
1. 1. 6. Funkce AKH	6
1. 1. 7. Vliv AKH na insekticidy	7
1. 2. <i>Isaria fumosorosea</i>	9
1. 2. 1. Obecné charakteristika	9
1. 2. 2. Morfologické znaky	10
1. 2. 3. Výskyt v přírodě a geografická lokalizace	10
1. 2. 4. Hostitelé	11
1. 2. 5. Průběh infekce houbou <i>I. fumosorosea</i>	11
1. 2. 6. Metabolity a toxiny <i>I. fumosorosea</i>	13
2. Cíle práce	14
3. Materiály a metody	15
3. 1. Modelový organismus <i>Pyrrhocoris apterus</i>	15
3. 2. Kultivace houby <i>I. fumosorosea</i> (CCM 8367)	15
3. 3. Vyvolání infekce u <i>P. apterus</i> pomocí entomopatogenní houby <i>I. fumosorosea</i>	16
3. 4. Elektronová mikroskopie.....	18
3. 5. Pitva CNS a příprava extraktů	18
3. 6. Kvantitativní stanovení AKH	18
3. 6. 1. HPLC	18
3. 6. 2. ELISA	19

3. 7. Kvantitativní stanovení lipidů v hemolymfě	21
3. 8. Průtoková cytometrie (flow cytometry)	22
3. 9. Výsledky a jejich zpracování	24
4. Výsledky	25
4. 1. Vypracování metodiky vyvolání infekce houbou <i>I. fumosorosea</i> u <i>plošnice P. apterus</i>	25
4. 2. Kvantitativní stanovení AKH	30
4. 3. Kvantitativní stanovení lipidů v hemolymfě.....	32
4. 4. Měření buněčné populace hemocytů.....	32
5. Diskuze	35
5. 1. Vyvolání infekce u <i>P. apterus</i> pomocí <i>I. fumosorosea</i>	35
5. 2. Změny hladiny AKH a metabolitů během infekce	36
5. 3. Cytometrické měření.....	38
6. Závěr	40
7. Seznam citované literatury.....	41

1. Úvod

1. 1. Adipokinetické hormony

1. 1. 1. Endokrinní soustava hmyzu

Hmyzí endokrinní soustava reprezentuje nejlépe vyvinutý a vyspělý humorální systém řídicí tělesné funkce mezi bezobratlými. Jeho hlavní část je tvořena dvěma centry – (1) neurosekrečními buňkami v mozku společně s *corpora allata*, *corpora cardiaca* a (2) prothorakální žlázou. Tato centra jsou doprovázena několika oddělenými skupinami endokrinních buněk (v nervových gangliích, střevě, gonádách a epidermis). Takto tvořený endokrinní systém syntetizuje a secernuje tři hlavní skupiny hmyzích hormonů a biologicky aktivních faktorů: ekdysteroidy, juvenilní hormony a neurohormony (Gilbert a kol., 2005).

- (1) Ekdysteroidy jsou produkovány především prothorakální žlázou, která se nachází v prothoraxu, a částečně také gonádami, epidermis a několika dalšími tkáněmi. Ekdysteroidy regulují základní funkce v hmyzím životě, jako jsou např.: vývoj, svlékání a reprodukce. Dále se podílí na celé řadě dalších procesů. Jak je již zřejmé z jejich názvu, jsou ekdysteroidy odvozené od steroidních hormonů.
- (2) Juvenilní hormony jsou syntetizovány v endokrinní žláze, která se jmenuje *corpora allata*. Hrají hlavní roli v regulaci hmyzí metamorfózy, tím že brání jejímu předčasnému spuštění, a při kontrole reprodukce, kde stimulují vývoj gonád a syntézu vitelloninu pomocí řízení exprese vitellogeninových genů. Juvenilní hormony však také regulují procesy, jako je chování hmyzu, diapauza, kastovní systém a různé polyfenizmy (Gilbert a kol., 2005; Nijhout, 1998).
- (3) Neurohormony jsou produkovány specializovanými neurosekrečními buňkami. Tyto buňky se nejvíce nachází v mozku, ale také se objevují v ostatních gangliích nervového systému. Neurohormony jsou peptidické sloučeniny, které regulují základní fyziologické a biochemické pochody v těle hmyzu, včetně těch, které byly zmíněny u ekdysteroidů a juvenilních hormonů (Gäde a kol., 1997). Klasifikace a nomenklatura neurohormonů nejsou jednotné, ale dle své funkce se mohou dělit na: metabolické, vývojové, reprodukční, myotropní a chromatotropní.

Jedny z nejlépe prozkoumaných hormonů z říše hmyzu jsou takzvané adipokinetické hormony z rodiny AKH/RPCH (adipokinetic hormone/red pigment concentrating hormone).

AKH jsou metabolické neurohormony, které spouští obranné reakce ve stresových situacích a jsou zodpovědné za udržování homeostázy v těle hmyzu (Kodrík, 2008). Vlastnosti a funkce AKH budou podrobněji popsány v následujících kapitolách.

1. 1. 2. Základní charakteristika AKH

Adipokinetické (AKH/RPCH rodina) patří mezi nejlépe prostudovanou skupinu neuropeptidů mezi členovci. Jméno této rodiny vzniklo podle prvních zástupců těchto hormonů, které byly zcela charakterizovány – tj. chromatoforotropinu (RPCH) z krevet *Pandalus borealis* (Fernlund a Josefson, 1972) a adipokinetického hormonu (Locmi – AKH-I) ze saranče stěhovavé *Locusta migratoria* (Stone a kol., 1976). Tato skupina má dnes už okolo 50 zástupců a jejich počet stále narůstá.

AKH jsou syntetizovány v endocytoplasmatickém retikulu neurosekretorických buněk v *corpora cardiaca* a následně transportovány do Golgiho aparátu, kde vytváří sekreční granule (Jansen a kol., 1989; Harthoorn a kol., 1999; Van der Horst a kol., 2001). AKH pre-pro-hormony mají konzervovanou strukturu charakterizovanou hydrofobním peptidem, který je následovaný jednou kopií aktivního AKH spolu s takzvaným AKH-asociovaným (přídavným) peptidem (Noyes a kol., 1995). Přídavné peptidy pravděpodobně hrají roli v hromadění finálních AKH v sekretorických granulích. (Noyes a kol., 1995; Van der Horst a kol., 2001), a nebo přispívají k degradaci špatně sbalených sekretorických produktů (Bassetti a kol., 1995). Vlastní adipokinetické hormony (AKHs) jsou tedy malé peptidické molekuly skládající se z 8 – 10 aminokyselin. Výjimku tvoří AKH motýla *Vanessa cardui* (Köllisch a kol., 2000), který je 11-mer: tento AKH si zanechává částečnou strukturu prohormonu a vyskytuje se s prodlouženým C-koncem. Všechny AKH molekuly mají blokováný N-konec pyroglutamátovým zbytkem; C-konec je blokován amidovou skupinou (výjimkou je již výše zmiňovaný AKH hormon *V. cardui*). Na pozici 8 a 9 jsou navázány aminokyseliny tryptofan a glycin (jsou-li přítomny); kromě tryptofanu molekula hormonu obsahuje ještě nejméně jednu aromatickou aminokyselinu, nejčastěji to bývá fenylalanin na pozici 4 (Gäde a kol., 1997).

U většiny studovaných druhů hmyzu se nachází jeden AKH, u některých jsou však dva nebo dokonce tři (Gäde a kol., 2009). Například u modelového druhu hmyzu plošnice

Pyrrhocoris apterus jsou přítomny dva AKH: Pyrap-AKH a Peram-CAH-II, které se liší pouze jednou aminokyselinou (Kodrík a kol., 2000; 2002):

Pyrap-AKH: pGlu-Leu-**Asn**-Phe-Thr-Pro-Asn-Trp-NH₂

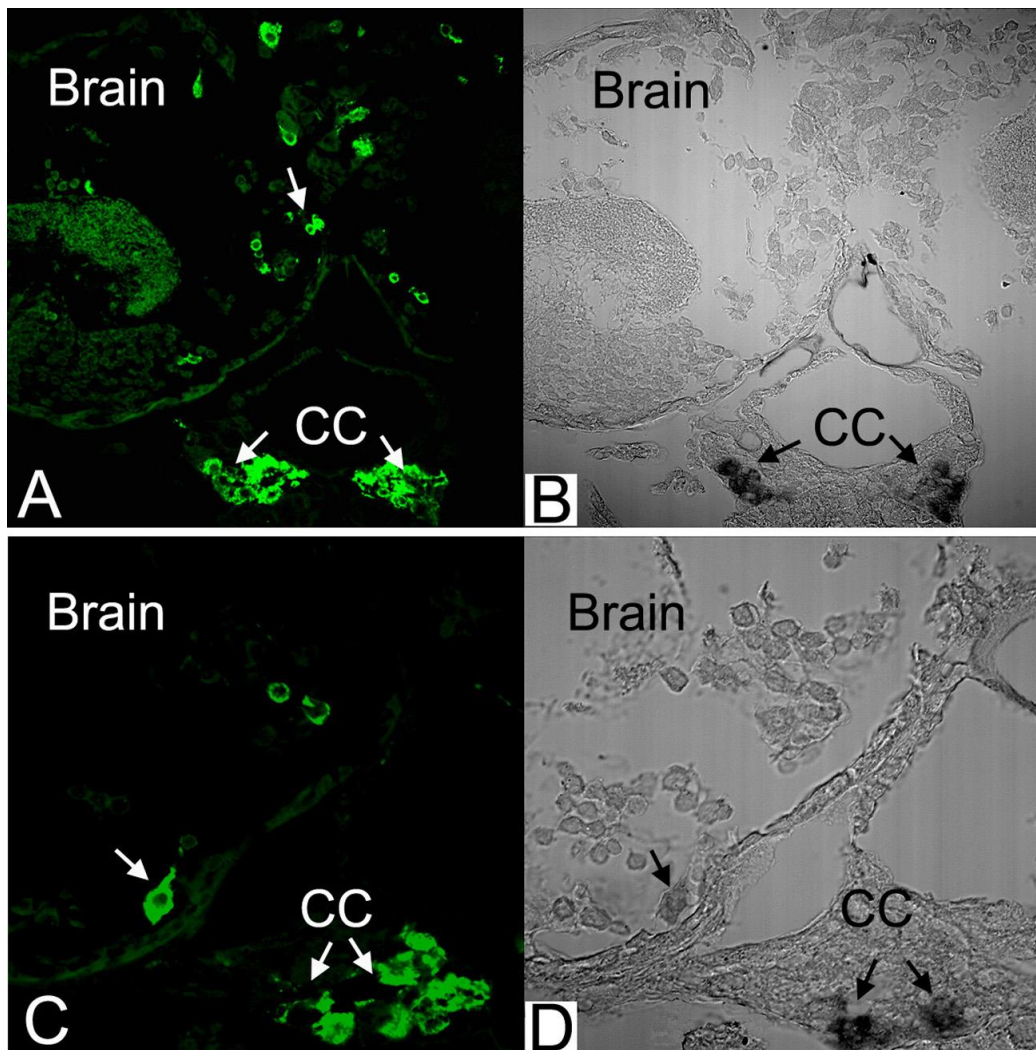
Peram-CAH-II: pGlu-Leu-**Thr**-Phe-Thr-Pro-Asn-Trp-NH₂

1. 1. 3. Místo syntézy AKH

AKH jsou primárně syntetizovány v sekretorických a skladovány glandulárních buňkách *corpora cardiaca* (CC), což je neuroendokrinní žláza napojená na mozek; odtud jsou hormony uvolňovány do hemolymfy. Mimo hlavního produkčního centra v CC byla u některých druhů hmyzu prokázána syntéza AKH přímo v mozku, jako třeba *L. migratoria* (Schooneveld a kol., 1985; Bray a kol., 1993; Moshitzky a kol., 1987a), *Carausius morosus* a *Sarcophaga bullata* (Clottens a kol., 1989), *P. apterus* (Kodrík a kol., 2003; 2015a, b, c) (Obr. 1), nebo *Aedes aegypti* (Kaufmann a kol., 2009). Například u *P. apterus* byl AKH detekován zhruba ve 140 neuronech (v tělech i axonech) v různých částech mozku včetně neuropilárních oblastí (Kodrík a kol., 2003). Navíc bylo nedávno zjištěno, že exprese AKH genů v mozku a CC probíhají nezávisle na sobě (Kodrík a kol., 2015c).

1. 1. 3. 1. Detekce AKH

Přítomnost AKH v místě jejich syntézy nebo skladování je možné prokázat buď pomocí imunochemických metod, radioimunologicky (RIA - radioimmunoassay) (Schooneveld a kol., 1985; Bray a kol., 1993), nebo lze jejich hladinu určit semikvantitativně užitím HPLC (high-performance liquid chromatography) (Moshitzky a kol., 1987b). Právě použitím imunoreakce byla přítomnost AKH prokázána také v jiných částech nervové soustavy než jsou *corpora cardiaca* a mozek. Několik skupin buněk imunologicky reagovalo v subesofagálním gangliu u *P. apterus* (Kodrík a kol., 2003) a v thorakálním gangliu u některých komárů (Kaufmann a Brown, 2006; Kaufmann a kol., 2009). Je ale zajímavé, že například u *Drosophila melanogaster*, se AKH imunoreakce vyskytuje pouze v CC buňkách (Noyes a kol., 1995; Nassel, 2002).



Obr. 1: Positivní reakce na protilátku proti Pyrap – AKH (A a C; zelená místa), a exprese AKH genů (in situ hybridizace) (B a D; tmavší místa) v neurosekrečních buňkách CNS u samice *P. apterus* (Kodrík a kol., 2015c).

1. 1. 4. Mechanismus působení AKH

Hlavním cílovým orgánem pro AKH uvolněný z *corpora cardiaca* je tukové těleso. U tohoto orgánu byla velmi dobře popsána signální transdukcce AKH na buněčné úrovni (Van der Horst a kol., 2001; Gäde a Auerswald, 2003). AKH jakožto peptidický hormon nemůže volně procházet přes buněčnou membránu, proto je jeho komunikace s cílovými buňkami zprostředkována pomocí specifických membránových receptorů (Park a kol., 2002; Staubli a kol., 2002; Hansen a kol., 2006; Kaufmann a Brown, 2006). Tyto receptory jsou spojeny s G-

proteinem, který aktivuje pomocí adenylát cyklázy (cAMP) nebo fosfolipázy C (diacylglycerol, inositol-trifosfát) protein kinázovou kaskádu vedoucí k mobilizaci energetických substrátů – trehalózy, diglyceridů nebo u některých hmyzích druhů i aminokyseliny prolinu. Tyto sloučeniny jsou transportovány k buňkám cílových efektorových orgánů, což jsou nejčastěji svaly (Gäde a Auerswald, 2002; 2003). AKH receptory se podařilo charakterizovat u octomilky obecné *D. melanogaster*, bource morušového *Bombyx mori* (Park a kol., 2002; Staubli a kol., 2002), švába amerického *Periplaneta americana* (Wicher a kol., 2006) a komára *Anopheles gambiae* (Kaufman a Brown, 2006). Receptory adipokinetických hormonů jsou strukturálně podobné receptorům z gonadotropin-releasing hormon rodiny známé u obratlovců.

1. 1. 5. Porovnání AKH s hormony obratlovců

S určitým zjednodušením můžeme nalézt analogii mezi hmyzím endokrinním komplexem mozek – *corpora cardiaca* – *corpora allata* a hypotalamo-hypofyzárním systémem u obratlovců (Scharrer a Scharrer, 1944). V obou případech neurosekreční buňky v mozku syntetizují neurohormony, které jsou uvolňovány do hemolymfy/krve v neurohemálních orgánech: *corpora cardiaca* nebo *corpora allata* u hmyzu a neurohypofýza u obratlovců. Nicméně *corpora cardiaca* i *corpora allata* u hmyzu i adenohipofýza u obratlovců jsou schopné produkovat také své vlastní hormony. Na druhou stranu se zdá, že mezi AKH není podobný analogický hormon produkováný hypotalamo-hypofyzární soustavou, nicméně funkčně AKH připomínají savčí glukagon, peptidický hormon produkováný α -buňkami pankreatu. Hlavní funkcí glukagonu v těle obratlovců, je mobilizace uložené energie v podobě glukózy. Sekundárně je prostřednictvím glukagonu kontrolována glykémie, tedy hladina glukózy v krvi, aby neklesla pod fyziologickou hranici (Jones a kol., 2012): glukagon je svou funkcí antagonistický inzulínu, nejznámějšímu obratlovčímu metabolickému hormonu s hypoglykemickým účinkem. Nicméně řízení hladiny glycidů v hmyzí hemolymfě nepodléhá tak přísné kontrole jako je tomu u obratlovců - hmyz snáší vyšší výkyvy koncentrací těchto metabolitů (Chapman, 1998). Existují jisté imunologické důkazy o tom, že u některých druhů hmyzu se vyskytují hormony, které jsou glukagonu podobné – tzv. glucagon-like proteiny (Kramer a kol., 1980; Alquicer a kol., 2009). Jejich úloha

v energetickém metabolismu však není jasná, výsledky získané příslušnými experimenty jsou nejednotné a často protichůdné (Tager a kol., 1976). Zdá se však, že hmyzí glukagon by mohl mít význam v aktivaci antioxidantní stresové odpovědi v těle hmyzu (Alquicer a kol., 2009; Bednářová a kol., 2013).

Příklad sekvence glukagonu užívaného v lidské medicíně (syntetizován pod názvem H-6790): **H-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-OH** (<http://shop.bachem.com/h-6790.html>).

Příklad sekvence adipokinetického hormonu (Pyrap-AKH): **pGlu-Leu-Asn-Phe-Thr-Pro-Asn-Trp-NH₂** (Kodrík a kol., 2000).

1. 1. 6. Funkce AKH

AKH se podílí na řízení homeostázy ve stresových situacích u hmyzu (energetický stres, toxiny, insekticidy, infekce, zranění atd.) skrze regulaci metabolismu a řady dalších faktorů, které s metabolismem přímo či nepřímo souvisí (Gäde a Goldsworthy, 2003; Gäde a kol., 1997; Kodrík, 2008; Krishnan a Kodrík, 2012). Obecně se efekt AKH může rozdělit do tří kategorií:

- (1) Aktivace metabolismu – mobilizace lipidů, glycidů a stimulace syntézy prolinu skrze aktivaci příslušných enzymů (viz následující bod).
- (2) Biochemické aktivity na subbuněčné úrovni – aktivace adenylát cyklázy (Spencer a Candy, 1976) a fosfolipázy C (Vroenen a kol., 1997), stimulace lipázy (Spencer a Candy, 1976) a glykogen fosforilázy (Van Marrewijk a kol., 1980), stimulace antioxidantních mechanismů (Kodrík a kol., 2007) a inhibice syntézy lipidů (Gokuldas a kol., 1988), proteinů (Carlisle a Loughton, 1979) a RNA (Kodrík a Goldsworthy, 1995).
- (3) Fyziologické aktivity – stimulace srdeční aktivity (Scarborough a kol., 1984), zvýšení svalového tonu (O'Shea a kol., 1984) a celkové lokomoce (Socha a kol., 1999), zlepšení imunitní odpovědi (Goldsworthy a kol., 2002), regulace chování u

hladovějících octomilek (Lee a Park, 2004), inhibice dozrávání vajíček (Lorenz, 2003) a stimulace trávicího traktu včetně trávicích enzymů (Kodrík a kol., 2012; Bodláková a kol., 2016).

Zmíněné aktivity lze experimentálně vyvolat aplikací externího AKH (injikce nebo topikální aplikace). Na druhé straně bylo experimentálně prokázáno, že řada stresových situací (aplikace toxinů, patogenů, nucený pohyb, konstantní tma atd.) vyvolá zvýšení hladiny AKH v hemolymfě nebo i *corpora cardiaca* (Kodrík, 2008; Kodrík a kol., 2015c).

1. 1. 7. Vliv AKH na insekticidy

Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole (1. 1. 6. Funkce AKH) hladina AKH kolísá v závislosti na stresové situaci. Jedním z faktorů, vyvolávajících stresovou reakci, jsou insekticidy. Při kontaktu s nimi se v hmyzím těle aktivují obranné reakce a mobilizují se energetické zásoby (Kodrík a kol., 2015c) s cílem účinek insekticidů eliminovat, nebo alespoň zmírnit.

O vlivu insekticidů na hladinu AKH v těle hmyzu existuje hned několik důkazů. Hladina AKH průkazně vzrostla poté, co byla mandelinka bramborová *Leptinotarsa decemlineata* krmena geneticky modifikovanými bramborami exprimujícími *Galanthus nivalis* aglutinin (GNA) nebo *Bacillus thuringiensis* toxin (Cry 3Aa) (Kodrík a kol., 2007). Podobného zvýšení hladiny AKH bylo dosaženo také aplikací několika neurotoxických insekticidů (permethrin, endosulfan, malathion, pirimiphos-methyl a deltamethrin) na dvou hmyzích modelech: ruměnici pospolné *P. apterus* (Kodrík a Socha., 2005; Velki a kol., 2011) a potměníku hnědém *Tribolium castaneum* (Plavšín a kol., 2015). Tyto pokusy naznačily, že AKH hraje jistou roli při aktivaci obranné reakce na insekticidy. Je však třeba poznamenat, že hladina AKH při těchto pokusech narůstala především v hemolymfě, ne vždy byl tento nárůst provázen navýšením hladiny hormonu také v *corpora cardiaca* (Kodrík a Socha, 2005; Kodrík a kol., 2007; Velki a kol., 2011). Tento výsledek však není nijak překvapivý, neboť je obecně známo, že propojení mezi sekrecí a syntézou AKH je velmi malé a u některých druhů dokonce ani neexistuje (Diederer a kol., 2002). Fyziologicky je hladina AKH v hemolymfě několiksetkrát nižší než v *corpora cardiaca* (Goldsworthy a kol., 2002) a k jejímu zvýšení jsou často využity zásoby již nasyntetizovaného AKH. Přímá potřeba AKH

v těle tedy nemusí být doprovázena bezprostředním navýšením syntézy AKH (Kodrík a kol., 2015a).

Je ovšem zajímavé, že obranná reakce vůči insekticidům řízená AKH působí v jistém směru kontraproduktivně. Bylo totiž zjištěno, že společná aplikace insekticidů spolu s AKH významně zvyšovala mortalitu ve srovnání s aplikací insekticidů samotných. Například injekce 200ng endosulfanu s 80pmol AKH do těla *P. apterus* vyvolala 90% mortalitu, zatímco při injekci samotného endosulfanu byla mortalita pouze 30% (Velki a kol., 2011). Tento jev byl potvrzen dalším pokusem, kdy AKH-deficientní *T. castaneum* vykazovali významně vyšší rezistenci vůči insekticidům, než jedinci s normální produkcí AKH (Plavšin a kol., 2015).

Na jakém principu funguje vztah „AKH + insekticid = vyšší mortalita“ nebylo dosud zcela objasněno. Lze však předpokládat, že zvýšení metabolismu po aplikaci AKH do těla hmyzu může hrát svou roli: AKH zvyšuje obrat všech látek včetně toxinů a napomáhá tak jejich rychlejšímu pronikání do buněk a tkání. Vystává otázka, zda je možné stejný či podobný vztah očekávat i po aplikaci entomopatogenních hub spolu s AKH – čili jestli tento hormon pomůže rychlejšímu růstu a šíření houby, poté co by zvýšil celkový metabolismus a obohatil tak hemolymfu i buňky o metabolické substráty.

1. 2. *Isaria fumosorosea*

1. 2. 1. Obecná charakteristika

Entomopatogenní houby představují skupinu parazitických hub, jejichž hostitelem jsou různé druhy hmyzu. Tohoto faktu se využívá již delší dobu ke kontrole hmyzích populací, a to ze dvou prostých důvodů: jsou přirozeným nepřítelem hmyzu a toto ošetření nijak neohrožuje životní prostředí nebo člověka (Eilenberg a kol., 2009). Entomopatogenní houby obecně potřebují ke svému životu určitou teplotu, vlhkost prostředí, vodu a sluneční záření – všechny tyto abiotické faktory výrazně ovlivňují klíčení, vegetativní růst i životaschopnost houby, včetně její patogenity (Vidal a kol., 1997).

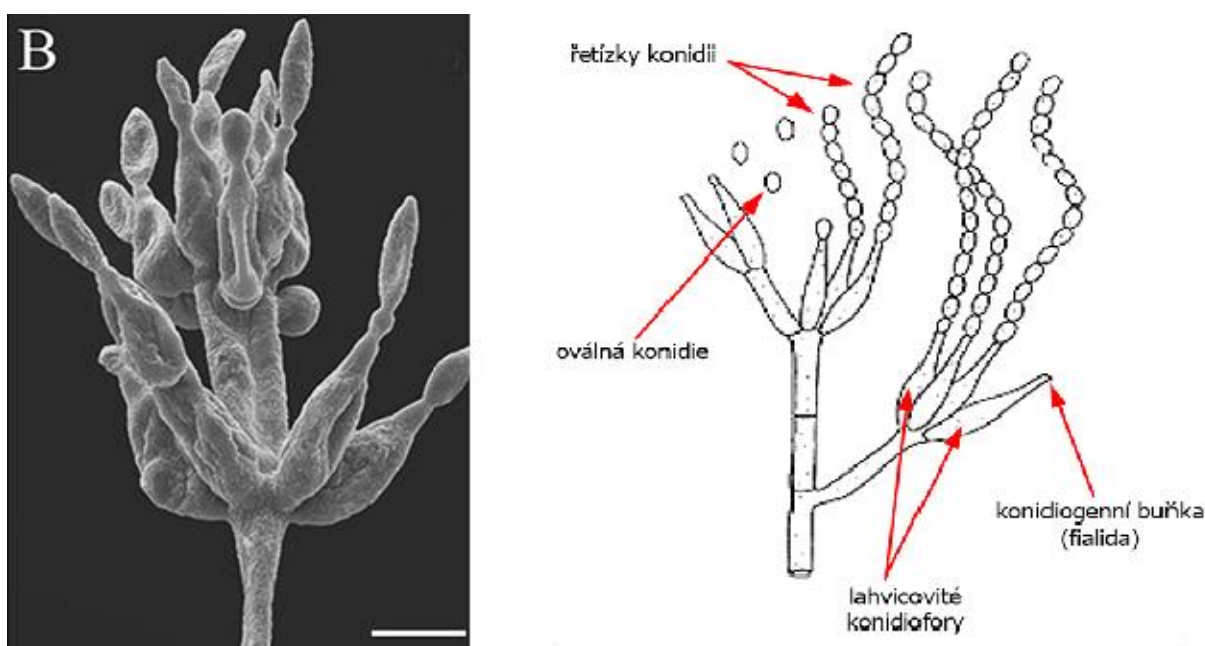
Také *Isaria fumosorosea* (dříve označována jako *Paecilomyces fumosoroseus*) se řadí mezi entomopatogenní houby a první zmínka o ní pochází z roku 1832. Ale až v roce 1904 ji samostatně izoloval Wize z larvy brouka rýhonosce řepného *Cleonus punctiventris*. Taxonomicky se *I. fumosorosea* řadí do říše: Fungi, oddělení: Ascomycota, třída: Ascomycetes, řád: Eurotiales, čeleď: Trichocomaceae a rod: Paecilomyces. Na druhou stranu s příchodem moderních molekulárních metod je taxonomické zařazení *I. fumosorosea* přehodnocováno a navíc se ukázalo, že jde nejspíše o celý komplex různých druhů.

Tento druh entomopatogenní houby je kosmopolitně rozšířen díky velké rozmanitosti možných hostitelů a sčítá pestrou škálu různých kmenů. Z těchto důvodů se stala objektem výzkumu, jakožto možným biologickým nástrojem na kontrolu hmyzích populací. Některé kmeny již byly úspěšně využity místo běžných insekticidů, zejména proti molicím či vlnatkám. (Zimmermann, 2008; Hussein a kol., 2013).

Obecně je *I. fumosorosea* schopná růstu v teplotním rozmezí 5 – 32°C (Mietkiewski a kol., 1994), avšak nejvíce vyhovující teplota se pro jednotlivé kmeny liší v závislosti na místě výskytu. Například nejlepší podmínky pro druh vyskytující se v Evropě je v rozmezí 8 – 30°C s optimem 20 – 25°C, zatímco v USA a západní Asii roste při 8 – 35°C s optimem 25 – 28°C (Vidal a kol., 1997).

1. 2. 2. Morfologické znaky

I. fumosorosea je velmi rychle rostoucí houbou, zprvu produkující bílé kolonie, které se později zbarvují na fialové nebo růžové. Častěji jsou produkovány růžové kolonie, jejichž synnemata (struktury nesoucí konidiofory) jsou dlouhé 100 – 200 μ m. Fialidy (Obr. 2) této houby mají lahvicovitý tvar s širokou elipsoidníází přecházející do štíhlého krčku a konidie jsou válcovité, vřetenovité, hyalinní s obvyklými rozměry 3 – 4 x 1 – 2 μ m. *I. fumosorosea* také často slouží jako hostitel jiné houbě z třídy ascomycetes *Syspastospora parasitica* (Zimmermann, 2008; Posada a kol., 2004).



Obr. 2: Na obrázku vlevo je snímek konidioforů *I. fumosorosea* z elektronového mikroskopu. Vpravo je schématický obrázek *I. fumosorosea* (vlevo: Meyer a kol. (2008); vpravo: www.mycolab.cz/cz/projekty/mycobanka.html).

1. 2. 3. Výskyt v přírodě a geografická lokalizace

Komplex druhů *I. fumosorosea* je rozšířen po celé naší planetě s výjimkou Antarktidy. Mimo hostitele se nachází také ve vzduchu, vodě, na rostlinách a velmi často v půdě (Zimmermann, 2008).

Jen na území České republiky se podařilo z půdních vzorků izolovat 16 kmenů *I. fumosorosea* (Landa a kol., 2002). Také se hojně vyskytuje zejména na zemědělských plochách. Například v Dánsku byla *I. fumosorosea* nejčtenější entomopatogenní houbou v půdě živého plotu poblíž ekologicky obhospodařovaných polí – byla zastoupena v 82% půdních vzorků v roce 2002 a v 63% v roce 2003 (Meyling a Eilenberg, 2006). Na druhé straně v Německu v okolí Darmstadtu byla *I. fumosorosea* jen ve 23% půdních vzorků (Kleespies a kol., 1989) a ve Finsku dokonce jen v několika málo procentech (Vänninen, 1996). Existují důkazy i o mykoparasitismu *I. fumosorosea* – tato houba byla nalezena na některých druhích rží a padlí (Kavková a Čurn, 2005).

1. 2. 4. Hostitelé

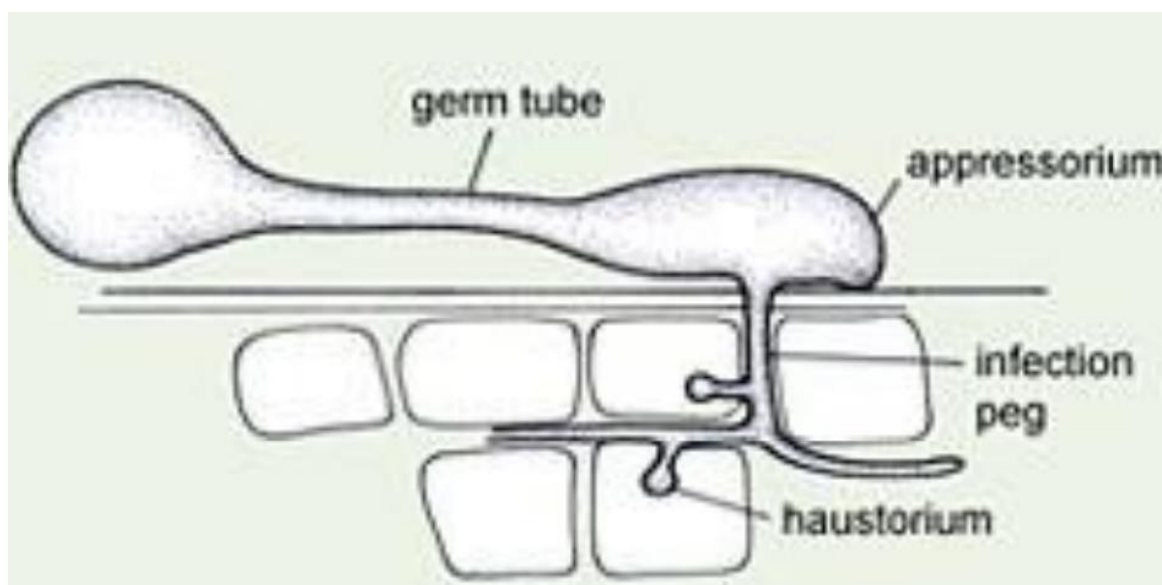
Vzhledem k tomu, že se *I. fumosorosea* vyskytuje na mnoha místech napříč různými kontinenty (viz kapitola 1. 2. 3.), tak má i poměrně široké spektrum možných hostitelů, z nichž nejpočetnější jsou zástupci *Lepidoptera*. Nicméně v porovnání s nejznámější entomopatogenní houbou *Beauveria bassiana* je počet hostitelských organismů mnohem menší (Zimmermann, 2007). Přesto má *I. fumosorosea* celkem přes 40 možných hostitelů z řádů: *Acari*, *Blattodea*, *Coleoptera*, *Diptera*, *Hemiptera*, *Hymenoptera*, *Isoptera*, *Lepidoptera*, *Neuroptera* a *Thysanoptera* (Smith, 1993). Kompletní seznam hostitelů se dá vyhledat například v katalogu „USDA – ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures“ (ARSEF) (Humber a Hansen, 2005) nebo v práci Zimmermann (2008).

1. 2. 5. Průběh infekce houbou *I. fumosorosea*

Pro *I. fumosorosea* platí stejný model infekce jako pro většinu entomopatogenních hub. Nejprve se spora uchytlí na povrchu kutikuly hostitele – mechanicky, případně prostřednictvím hydrofobních interakcí - kde za vhodných podmínek (vlhkost, teplota) začne klíčit (bobtnat) a vytváří primární klíček. K vytvoření primárního klíčku má spora dostatek vlastní energie a živin, tudíž je nemusí čerpat externě, až v pozdější fázi klíčení se začne spoléhat na živiny z těla hostitele. Nejprve využívá látek, které jsou součástí kutikuly a následně i živin z vnitřních orgánů/tkání. Za tímto účelem proniká houba do vnitřního

prostředí (hemocoel) přímou penetrací kutikuly (biochemické a fyzikální mechanismy) nebo prostřednictvím přirozených tělních otvorů (tracheální systém, alimentární či řitní otvor).

Při penetraci se v oblasti apresoria (Obr. 3) syntetizují enzymy (viz kapitola 1. 2. 6.), které rozpouští kutikulu, takže se koncová špička invazivní hyfy může tlakem dostat do hemocoelu. Jakmile se houba dostane do tělní dutiny, vytváří blastospory, které se rychle množí a kolonizují tkáň hostitele. V této fázi je hostitel již usmrčen a mumifikován. Když jsou živiny hostitele téměř vyčerpány, začne houba prorůstat zpět na jeho povrch za účelem tvorby myceliální sítě. Na vzdušném myceliu houba dokončuje svůj vývojový cyklus vytvořením nových konidiofor a konidií, za pomoci nichž infikuje další hostitele. Celý cyklus trvá 3 – 14 dní (Landa 2009; Hajek a Leger, 1994; Srivastava a kol., 2009).



Obr. 3: Schématický obrázek spory prorůstající do vnitřního prostředí organismu (<http://mastermikrobiologi.com/2015/11/morfologi-cendawan.html>).

1. 2. 6. Metabolity a toxiny *I. fumosorosea*

Detailní znalosti o produkci metabolitů a toxinů *I. fumosorosea* bohužel chybí (Zimmermann, 2008). Prvním objeveným a zároveň nejdůležitějším toxinem *I. fumosorosea* je beauvericin (Bernardini a kol., 1975; Peeters a kol., 1983), který je schopný paralyzovat hostitelské buňky (Hajek a Leger, 1994). Mimoto je beauvericin zajímavý i z hlediska farmakologického jako potenciálně využitelná agens proti tuberkulóze nebo malárii (Nilanonta a kol., 2000, 2002). Dále se podařilo izolovat pyridin-2,6-dikarboxylovou kyselinu (Roberts, 1981) a dva typy beauverolidů – L a La (Jegorov a kol., 1994). Pomocí enzymů (proteázy, chitinázy, chitosonázy a lipázy) se houba dostává do vnitřního prostředí hostitele (penetrací kutikuly) a inhibuje jeho regulační systém (Ali a kol., 2010). Zdá se, že metabolity produkované houbou také napomáhají k její patogenitě, ale jakým způsobem není známo (Hajek a Leger, 1994).

2. Cíle práce

Cílem práce bylo popsat fyziologické změny, které probíhají v těle ruměnice psočné *P. apterus* v důsledku infekce způsobené entomopatogenní houbou *I. fumosorosea* (CCM 8367). Dále pak posoudit, jestli do těchto změn nějak zasahuje, případně je řídí adipokinetické hormony.

Hlavní cíl lze rozdělit do následujících bodů:

- ❖ Zjistit za jakých podmínek je možné infekci vyvolat.
- ❖ Změřit množství AKH v CNS po infekci.
- ❖ Stanovit hladinu lipidů v hemolymfě po infekci pomocí fosfovanilinové reagens.
- ❖ Zjistit zdali infekce způsobí změny v populaci hemocytů pomocí cytometrie.

3. Materiál a metody

3. 1. Modelový organismus *Pyrrhocoris apterus*

Laboratorní chov plošnice ruměnice pospolné *P. apterus* (Heteroptera, Insecta) použité v této práci pocházel ze sběrů populace z Českých Budějovic (Stromovka, 49°N). Larvy a dospělí jedinci byly chovány od vajíček do dospělců v 0,5l sklenicích (cca 40 jedinců/sklenice), krmeni plody lípy malolisté a napájeni vodou při stálé teplotě $26 \pm 1^\circ\text{C}$ a fotoperiodě 18:6 (18h světlo : 6h tma). K pokusům byly použity reprodukční brachypterní plošnice (samci + samice), které byly 10 dní po imaginální ekdyzi.

3. 2. Kultivace houby *I. fumosorosea* (CCM 8367)

V experimentech byl použit kmen *I. fumosorosea* s označením CCM 8367. Kmen byl izolován z kukel klíněnky jírovcové *Cameraria ohridella* Decka a Dimic (Lepidoptera: Gracillariidae) a je uložen jako patentová kultura v České sbírce mikroorganismů v Brně (Prenerová a kol., 2013).

Konidiospory houby byly získány povrchovou kultivací v Petriho miskách na pevném médiu (Sabouraudův agar (SA), IMUNA – složení na 1000ml vody: 8g pepton pro bakteriologii, 18g glukóza, 18g maltóza, 15g agar, pH 5,5 – 6,3).

Blastospory byly získány po 120 hodinách submerzní kultivace v běžném kapalném médiu pro mikrobiologii PDA (potato dextrose agar) s použitím orbitální třepačky při 140 kmitech za minutu a teplotě 23°C . Po kultivaci byly blastospory odstředěny a uchovány v mrazáku.

3. 3. Vyvolání infekce u *P. apterus* pomocí entomopatogenní houby

I. fumosorosea

K vyvolání infekce byly použity spory výše uvedené houby a to dvěma metodami:

1) Dip-metoda: v této metodě byla pokusná ploštica na okamžik imerzně ponořena do suspenze konidiospor *I. fumosorosea* o dané koncentraci. Tato metoda využívá přirozenou schopnost konidiospor infikovat hostitele přes jeho povrch (viz kapitola 1. 2. 5.). Infikovaní jedinci byli chováni v Petriho miskách za podmínek uvedených v kapitole 3. 1.

Příprava suspenze konidiospor *I. fumosorosea*:

1. Do manuálního homogenizátoru bylo nalito 10ml dest. H₂O a přidáno 2μl Tween-80.
2. Štětečkem, který byl namočen ve vzniklém roztoku, byly z povrchu média setřeny konidiospory a přemístěny do roztoku v homogenizátoru. Tento proces byl opakován až do narůžovělého zakalení roztoku.
3. Suspenze konidiospor byla homogenizována zhruba 2 minuty.
4. Koncentrace zásobního roztoku konidiospor byla spočítána pod světelným mikroskopem pomocí Bürkerovi komůrky (Brand, Wertheim, Německo) při 625x zvětšení. Konidiospory zde byly počítány diagonálně v 26 malých čtvercích (strana 0,05mm a objem 1/4000 mm³).

5. Výpočet: koncentrace spor v zás. roz./1ml = $\frac{\text{Celkový počet spor}}{26} * (4 * 10^6)$

6. Výpočet: požadovaná koncentrace a objem výsledného roztoku

A – požadovaná koncentrace, B – požadovaný objem (ml), C – koncentrace zásobního roztoku, D – objem ze zásobního roztoku (ml), E – množství H₂O (ml)

$$\frac{A * B}{C} = D$$

$$B - D = E$$

$$\underline{\underline{\text{Výsledný roztok} = D + E}}$$

Poznámka: H₂O na ředění (E) se připraví: 10ml dest. H₂O + 2μl Tween-80.

7. Výsledný roztok konidiospor byl přes noc udržován v lednici, aby došlo k jejich aktivaci.

Kontrolní skupina pokusných ploštic byla na okamžik imerzně ponořena do destilované H₂O + Tween-80 a chována za stejných podmínek.

2) Injikace blastospor: v této metodě byly pokusným plošticím injikovány 2μl suspenze blastospor o dané koncentraci pomocí Hamiltonovi injekční mikrostříkačky (10μl, Hamilton Co., Reno, Nevada). Vpich byl prováděn skrz metathorakálně abdominální intersegmentální membránu do hrudi, aby došlo k co nejmenšímu poranění ploštice. Důvod použití blastospor k injikaci - viz kapitola 1. 2. 5. Infikovaní jedinci byli chováni za podmínek - viz kapitola 3. 1.

Příprava suspenze blastospor *I. fumosorosea*:

Příprava suspenze blastospor probíhala stejně jako příprava konidiospor – viz Dip-metoda na předešlé straně s tím rozdílem, že byly použity zamražené blastospory a místo dest. H₂O + Tween byl použit Ringerův roztok. Vzniklou suspenzi blastospor nebylo nutné dávat přes noc do ledničky a mohla se ihned použít k injikaci.

Všechny infikované ploštice, stejně tak jako kontrolní ploštice ošetřené Ringerovým roztokem, byly chovány za stejných podmínek jako ploštice základních chovů (viz kapitola 3. 1.). Hemolymfa a CNS byly na stanovení odebrány první, druhý a třetí den po aplikaci.

Ringerův roztok (fyziologický roztok)

Chemikálie pro kvantitativní přípravu 1 litru roztoku (rozpuštědlo dest. H₂O):

- NaCl – 7,5g
- KCl – 0,1g
- CaCl₂ * 2H₂O – 0,2g
- MgCl₂ * 6H₂O – 0,4g
- NaHCO₃ – 0,2g

3. 4. Elektronová mikroskopie

V průběhu infekce, kdy již bylo možné na pokusných ploštících *P. apterus* pozorovat mycelium pouhým okem, byly pomocí kryometody a mrazového lámání (cryofracturing) pořízeny snímky na skenovacím elektronovém mikroskopu (JEOL JSM-7401F; Laboratoř elektronové mikroskopie, Parazitologický ústav BC, České Budějovice). Samotné pokovení preparátů (paladium + platina) a mrazové lámání bylo provedeno v zařízení kryo-attachment ALTO2500.

3. 5. Pitva CNS a příprava extraktů

Hlava *P. apterus* byla odstřižena do pitevní jamky s Ringerovým roztokem. Za pomoci entomologických pinzet a binolupy byl z hlavy vypitván komplex mozek + *corpora cardiaca* + *corpora allata* (někdy i se suboesophagálním gangliem). Komplex byl vkládán do mikrozkuvek eppendorf 1,5ml držných na ledě v počtu 5 komplexů/zkuvku.

AKH byl z komplexu *P. apterus* vyextrahován pomocí methanolu. Do mikrozkuvky s CNS bylo přidáno 200 μ l 80% methanolu, mozky pak byly rozdrceny pomocí sonikátoru za chlazení ledem. Homogenát byl následně centrifugován při 4°C 2min. při 6 000 otáčkách. Supernatant byl opatrně odpipetován do nové mikrozkuvky a celý proces zopakován ještě jednou. Čili na extrakci jednoho vzorku (5 ks. komplexů) bylo použito 400 μ l methanolu - ten se pak nechal odpařit ve vakuové centrifuze (Speed Vac).

3. 6. Kvantitativní stanovení AKH

3. 6. 1. HPLC

Pro semikvantitativní stanovení obsahu AKH ve vzorku bylo použito HPLC (high-performance liquid chromatography) zařízení firmy Waters. K dělení byl použita kolona Chromolith Performance C18 (Merck), která pracuje v reverzní fázi při gradientu acetonitril – voda: 0 – 2min 25% B, 2 – 12min 25-87% B a 12 – 15min 87% B při rychlosti 2ml/min. K detekci AKH by použit fluorimetrický detektor Waters (typ 2475) při vlnových délkách Ex 280nm, Em 348nm.

Touto metodou byly analyzovány methanолоvé extrakty AKH z CNS, které byly před vlastní analýzou rozpuštěny v acetonitrilovém pufru (25% B + 75% A). Každý vzorek obsahoval ekvivalent 5 kusů CNS. Množství AKH ve vzorku bylo odhadnuto pomocí syntetických standardů AKH analyzovaných v HPLC systému za stejných podmínek jako tomu bylo u vzorků. Vlastní kvantifikace probíhala na základě srovnání plochy peaků v programu Clarity.

Roztoky:

- A: 0,11% TFA (trifluoctová kyselina) v H₂O
- B: 60% CH₃CN v 0,1% TFA v H₂O

3. 6. 2. ELISA

Enzym – linked immunosorbent assay (ELISA) je imunoenzymatická metoda používaná ke kvantifikaci antigenu ve směsi vzorků. V této práci byla pro zjištění obsahu AKH v CNS a hemolymfě použita kompetitivní ELISA podle Goldsworthyho a kol. (2002). Principem metody je soutěž známého množství značeného AKH (viz níže) s neznámým stanovovaným množstvím AKH obsaženým ve vzorku o vazbu na limitovaném množství protilátky navázané na pevné fázi. Použitá protilátka (viz níže) dobře reaguje s oběma AKH nalezenými u *P. apterus*, proto ELISA vždy stanoví celkovou hladinu obou peptidů dohromady.

ELISA pufrы

Aplikační pufr (coating buffer)

- pH = 9,6
- 0,1M bikarbonátový pufr (Na₂CO₃, NaHCO₃)

Promývací pufr (washing buffer)

- pH = 7,5
- 10mM PBS pufr (Na₂HPO₄ * 2H₂O, NaH₂PO₄ * 2H₂O, NaCl)
- Tween-20

Protokol:

1. Králičí protilátka (IgG) proti Cys¹ – Pyrap-AKH (Sigma Genosys, Cambridge, UK) byla ředěna v aplikačním pufru v poměru 1 : 5000 a aplikována do jamek mikrotitrační destičky (100μl/jamku) (High binding Coaster, Corning Incorporated, Corning, NY, USA); inkubace probíhala přes noc při 4°C.
2. Destička byla 3 x 200μl promyta pomocí promývacího pufru.
3. Blokováno 5% netučným sušeným mlékem 200μl/jamku v promývacím pufru při 37°C na 2h.
4. Destička byla 3 x 200μl promyta pomocí promývacího pufru.
5. Bylo aplikováno 50μl vzorku z CNS (0,5 komplexu ekviv.) na jamku rozpuštěného v promývacím roztoku bez Tween-20 a 50μl (100fmol) roztoku Cys¹ – Pyrap-AKH – BLAM značeného biotinem (Biotin Long Arm Maleimide) (Vector Laboratories, Petebrough, UK). Současně byl do dalších jamek destičky aplikován roztok syntetického Pyrap-AKH o známém množství (zpravidla od 5000 do 0,0763fmol), na výpočet standardní křivky, dále pak byla připravena pozitivní kontrola (maximální reakce) 100μl (= 100fmol) Cys¹ – Pyrap-AKH – BLAM/jamku a negativní kontrola (minimální reakce) 100μl promývacího pufru bez Tween-20/jamku. Kompetice probíhala 1h při 37°C.
6. Destička byla 3 x 200μl promyta pomocí promývacího pufru.
7. Bylo přidáno 100μl HRPS/jamku (Horse Radish Peroxidase Streptavidin) (Vector Laboratories, Burlingame, USA)/ředěný v promývacím pufru 1:500 a inkubováno 1h při 37°C.
8. Destička byla 6 x 200μl promyta pomocí promývacího pufru.
9. Bylo aplikováno 100μl 3, 3', 5, 5' – tetrametylbenzediene (SIGMA - ALDRICH)/jamku a inkubováno 40min. ve tmě při 37°C.
10. Reakce byla zastavena 50μl 0,5M H₂SO₄/jamku.
11. Intenzita zbarvení byla měřena na ELISA čtečce (Molecular Devices) při vlnové délce 450nm.

12. Naměřené hodnoty A_{450} byly přepočítány na hodnoty kompetice v % podle vzorce:

$$\% \text{ kompetice} = \left(\frac{\text{test.OD} - \text{background}}{\text{max OD} - \text{min OD}} * 100 \right)$$

OD – naměřená absorbance

Background – průměr hodnot u negativní kontroly

13. Ze sestrojené kalibrační křivky pro Pyrap-AKH a procenta kompetice bylo vypočteno množství Pyrap-AKH ekvivalentu v každé jamce.

3. 7. Kvantitativní stanovení lipidů v hemolymfě

Hladina lipidů v hemolymfě byla měřena pomocí sulfo – fosfovanilinové testu (Zöllner a Kirch 1962; modifikace podle Kodrík a kol., 2000). Principem této metody je reakce dvojně vazby mastné kyseliny odštěpené z lipidů v prostředí silných kyselin s vanilínem za vzniku barevné reakce. Hmyzí lipidy jsou většinou nenasycené, takže je tato metoda pro ně velmi citlivá.

Vanilinová reagencie

- 1, 98g vanilinu se rozpustí v 668ml kyseliny fosforečné a zahřeje na 60°C, ochladí a doplní se destilovanou vodou na 1l. Vytvoří se žlutý roztok, který se nechá stát v temnu a chladu alespoň 1 týden.

Protokol:

1. Do mikrozkušavky eppendorf bylo napipetováno 100 μ l koncentrované H_2SO_4 .
2. Ploštici bylo nastřeženo tykadlo a vytékající hemolymfa jímána na kousku parafilmu. Z vytvořené kapičky pak bylo odebráno 0,5 μ l hemolymfy do kyseliny sírové.
3. Vzorky byly povařeny 10min. při 100°C.
4. Do ochlazené směsi bylo přidáno 1ml vanilinové reagencie a vzorek krátce promíchán.

5. Po 30 minutách byla měřena hodnota absorbance na spektrofotometru (Helios - Chromspec) při 546nm proti slepému vzorku (100 μ l H₂SO₄ + 1ml vanilinové reagencie).
6. Takto získané hodnoty absorbancí vzorků byly přepočteny na hodnoty koncentrací lipidů v mg/ml pomocí kalibrační křivky sestavené pro kyselinu olejovou (od 0,01284mg do 128,4mg).

3. 8. Průtoková cytometrie (flow cytometry)

Průtoková cytometrie je metoda umožňující studovat různé parametry, nejčastěji buněčné částice v suspenzi. Suspenze buněk je unášena kapalinou a pomocí systému hydrodynamické fokusace prochází paprskem laseru po jedné buňce. Při kontaktu paprsku a buňky dochází ke specifickému rozptylu světla a navíc k excitaci fluorochromů (pokud byly specificky navázány). Energie emitovaná fluorochromy může být využita k dalšímu hodnocení.

Nejdůležitějšími snímanými parametry jsou rozptyl laserového paprsku v malém úhlu (0 - 18°) neboli tzv. forward scatter (FSc), který říká jak je buňka velká. Dalším parametrem je rozptyl laseru pod úhlem 90°, side scatter (SSc), který vypovídá o granularitě buňky. Pod stejným úhlem (90°) je detekována i fluorescence daného laseru (Penka a kol., 2012).

Chemikálie

- Antikoagulační pufr – 98mM NaOH, 186mM NaCl, 17mM EDTA, 41mM kyselina citronová, pH = 4,5.
- Pringlesova sůl – 154,1mM NaCl, 27mM KCl, 14mM CaCl₂, 22,2mM dextróza.
- Propidium jodid (PI) - Invitrogen 3,75mM, ředění 1000x

Příprava vzorků (podle Nakahara a kol., 2009)

1. Do mikroskopické eppendorfky bylo napipetováno 1ml antikoagulačního pufru.
2. Ploštica byla odebrána hemolymfa – viz předchozí odstavec str. 21. Na stanovení byly použity 2 μ l hemolymfy, které byly přepipetovány do antikoagulačního pufru při současném chlazení ledem.
3. Směs byla centrifugována při 500 RCF, 1 minutu a 4°C.
4. Supernatant byl odsán a sediment znovu rozsuspendován v 1ml Pringlesovy soli.
5. 3. a 4. bod byl zopakován ještě jednou. Chlazení ledem do začátku měření.
6. Před měřením bylo přidáno 2 μ l PI a procezeno přes buněčné sítko.

Měření na cytometru

Měření buněk probíhalo na cytometru BD FACSCanto II (Katedra medicínské biologie, PŘF JU). Před zahájením měření bylo pomocí BD FACSDiva Software optimalizováno nastavení cytometru pro měřené buňky (viz Tab. 1). U buněk byla sledována velikost pomocí forward scatteru (FSc), granularita pomocí side scatteru (SSc) a životnost buněk byla sledována pomocí značení propidium jodidem (PE-Texas red).

Tab. 1: Nastavení cytometru.

Parametr	Vlnová délka (nm)
FSc	500
SSc	401
Pe-Texas red	662

3. 9. Výsledky a jejich zpracování

Výsledky byly zpracovány v programech Excel 2013, Graph Pad Prism 4 a BD FACSDiva Software. Pro výpočty stanovovaných hodnot a jejich odečtení ze standardních křivek byl použit program Graph Pad Prism 4. V tomtéž programu byly vytvořeny i grafy a provedeno statistické hodnocení výsledků (viz příslušné grafy). Uvedené výsledky jsou vyjádřeny jako průměr hodnot \pm SD; pro počet opakování viz příslušný graf. Pro vyhodnocení výsledků z cytometrického měření byl použit program BD FACSDiva Software.

4. Výsledky

4. 1. Vypracování metodiky na vyvolání infekce houbou *I. fumosorosea* u plošnice *P. apterus*

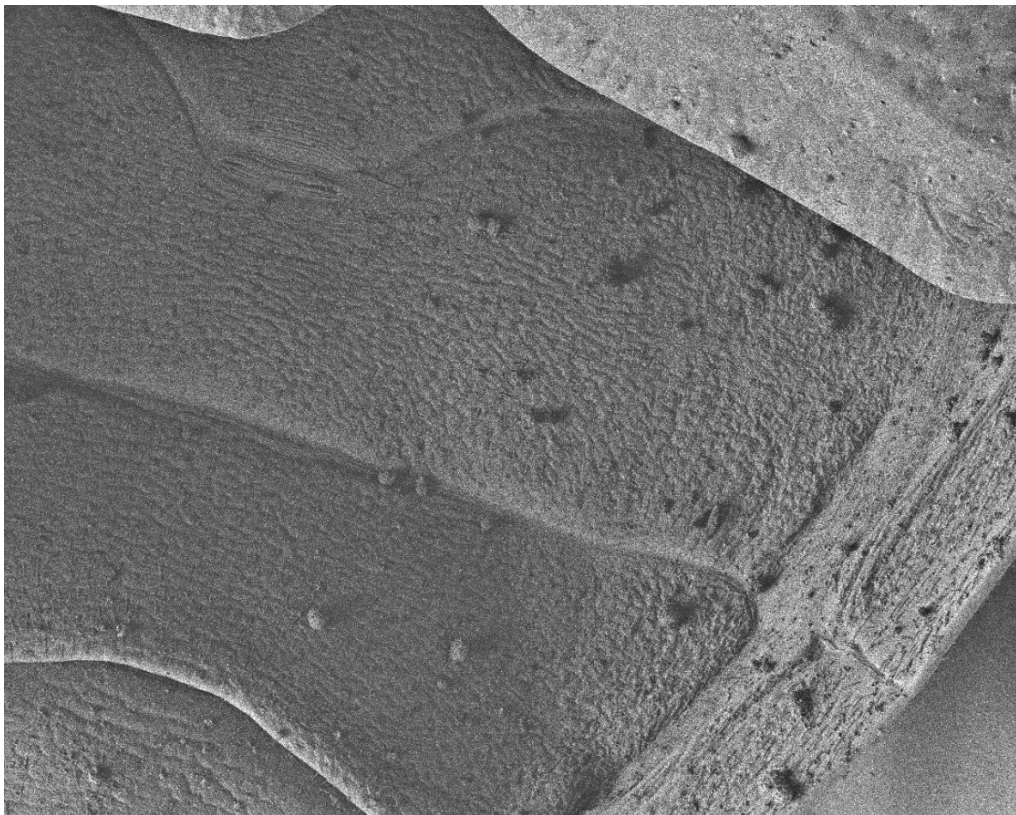
Prvním cílem práce bylo vypracování metodiky, jakým způsobem lze infekci pomocí entomopatogenní houby *I. fumosorosea* (CCM 8367) u *P. apterus* vyvolat.

Jako první byla zvolena Dip-metoda, neboť se více podobá přirozenému způsobu nákazy. Výsledky však ukázaly, že tato metoda není pro laboratorní stanovení fyziologických charakteristik infekce zcela vhodná, protože infekce probíhala velmi pomalu a s malou účinností - nebylo tak možné přesně vytipovat vhodnou dobu testování. Například při vysoké koncentraci $5,4 \cdot 10^8$ spor/ml byla mortalita po 6 dnech pouze 10%. Přesto byla tato metoda použita na fotodokumentaci průběhu infekce. Na Obr. 4 je vyfotografovaný jedinec *P. apterus*, který byl nakažen pomocí Dip-metody (koncentrace $5,4 \cdot 10^8$ spor/ml) dvanáctý den po aplikaci konidiospor houby *I. fumosorosea*, kde je již zcela porostlý touto houbou.

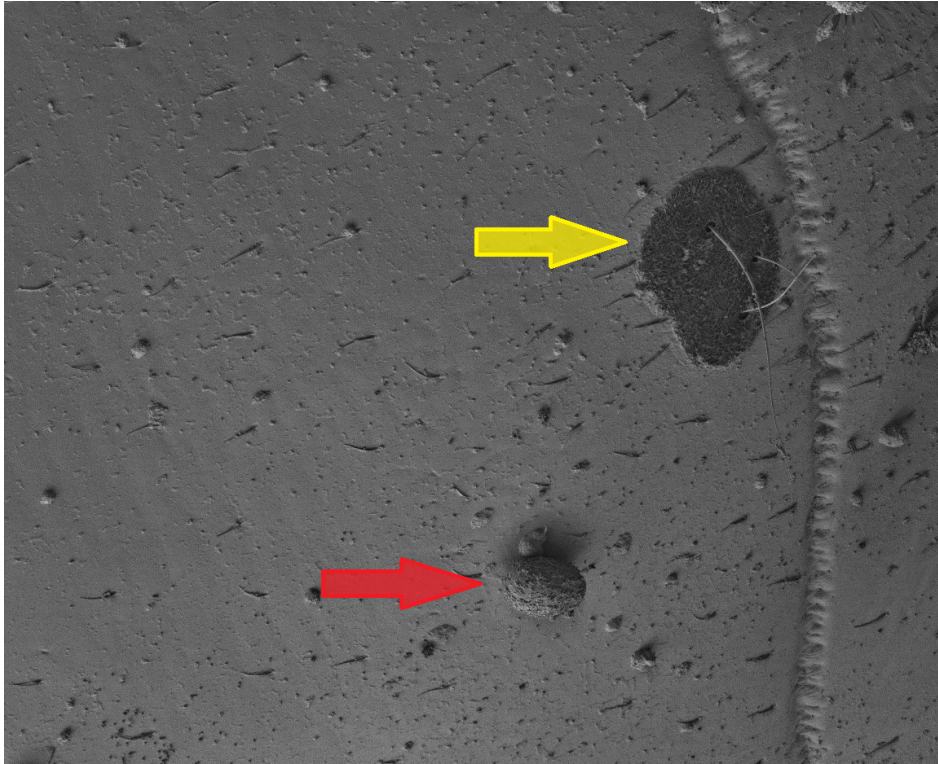
Pro kontrolu přítomnosti konidiospor na povrchu kutikuly *P. apterus* a dokumentaci některých vývojových stádií houby byla dále použita skenovací elektronová mikroskopie. Na pořízených snímcích je možné pozorovat přichycené spory na povrchu kutikuly a místa na těle, kde *I. fumosorosea* prorůstá na povrch (Obr. 5, 6, 7 a 8). Na Obr. 9 byla pomocí mrazového lámání odlomena hlava plošnice. Touto úpravou pak bylo možné pozorovat mycelium *I. fumosorosea* prorostlé v oblasti tukového tělesa.



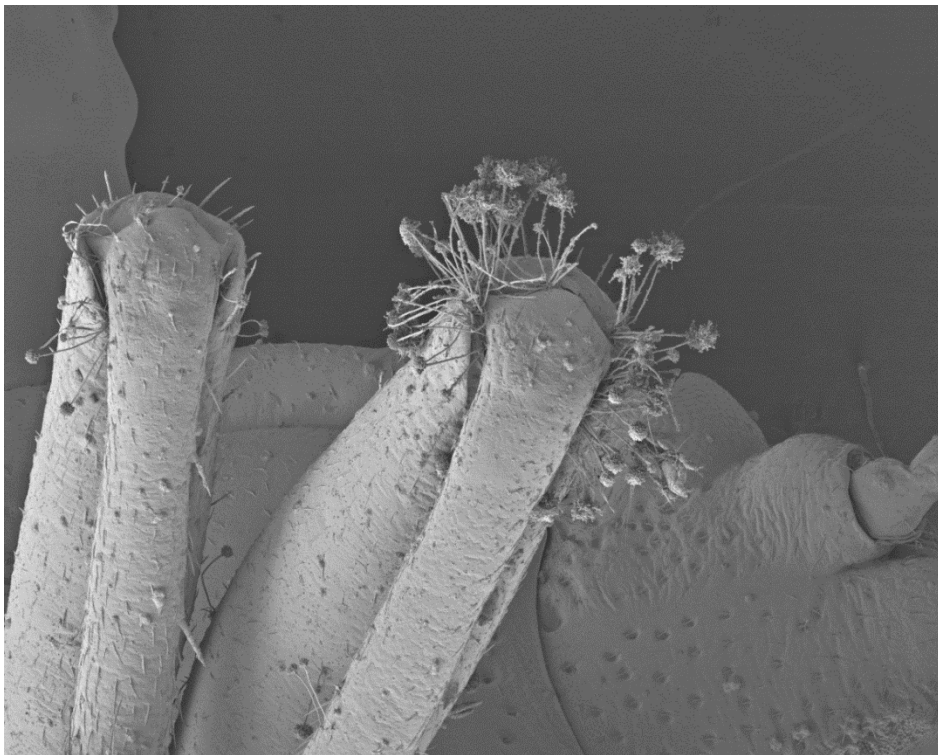
Obr. 4: *P. apterus* dvanáctý den od infekce porostlý *I. fumosorosea*.



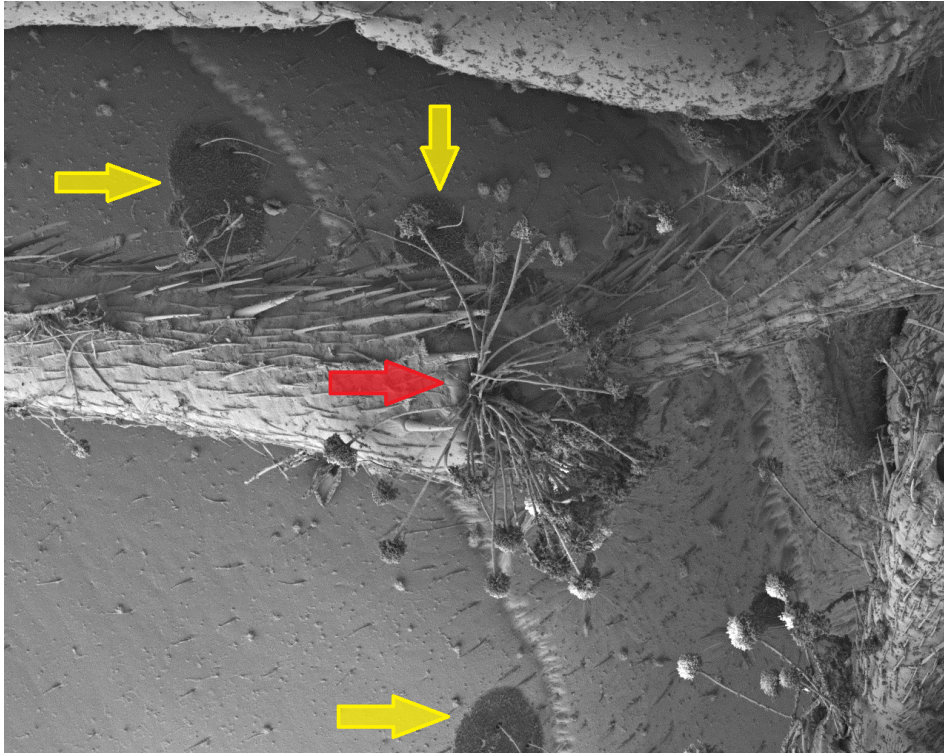
Obr. 5: Dorzální strana zadečku ploštky s přichycenými konidiosporami houby *I. fumosorosea*. Zvětšeno 43x.



Obr. 6: Houba *I. fumosorosea* (žlutá šipka) prorůstající na povrch těla infikované ploštice *P. apterus* a konidiospora (červená šipka) této houby. Zvětšeno 100x.



Obr. 7: Konidiofory *I. fumosorosea* prorostlé skrze kloubní spojení ploštice. Zvětšeno 50x.



Obr. 8: Konidiofory *I. fumosorosea* prorostlé skrz kloubní spojení plošnice (červená šipka) a houba prorůstající skrze kutikulu zpět na povrch (žlutá šipka). Zvětšeno 70x.



Obr. 9: Mycelium *I. fumosorosea* prorostlé v oblasti tukového tělesa plošnice. Zvětšeno 37x.

Když se po první sérii pokusů Dip-metoda ukázala pro měření fyziologických charakteristik reakce ploštic na infekci jako nevhodná, byl vyzkoušen jiný postup. Tentokrát byly použity blastospory *I. fumosorosea*, které byly injikovány ve formě suspenze (viz kapitola 3. 3.) přímo do tělní dutiny ploštic. Přiložená tabulka (Tab. 2) ukazuje procenta mortality ošetřených ploštic v závislosti na použité koncentraci blastospor a na době po injikaci.

Tab. 2: Mortalita pokusných ploštic v závislosti na dnu a koncentraci suspenze blastospor. V každé sérii pokusů bylo použito 20 pokusných jedinců.

Koncentrace = $4,45 * 10^7$ spor/ml		Koncentrace = $1 * 10^6$ spor/ml		Koncentrace = $1 * 10^5$ spor/ml	
Den infekce	mortalita (%)	Den infekce	mortalita (%)	Den infekce	mortalita (%)
1.	0	1.	0	1.	0
2.	40	2.	5	2.	0
3.	100	3.	10	3.	0
4.	/	4.	10	4.	0
5.	/	5.	10	5.	0
6.	/	6.	10	6.	0
7.	/	7.	25	7.	0

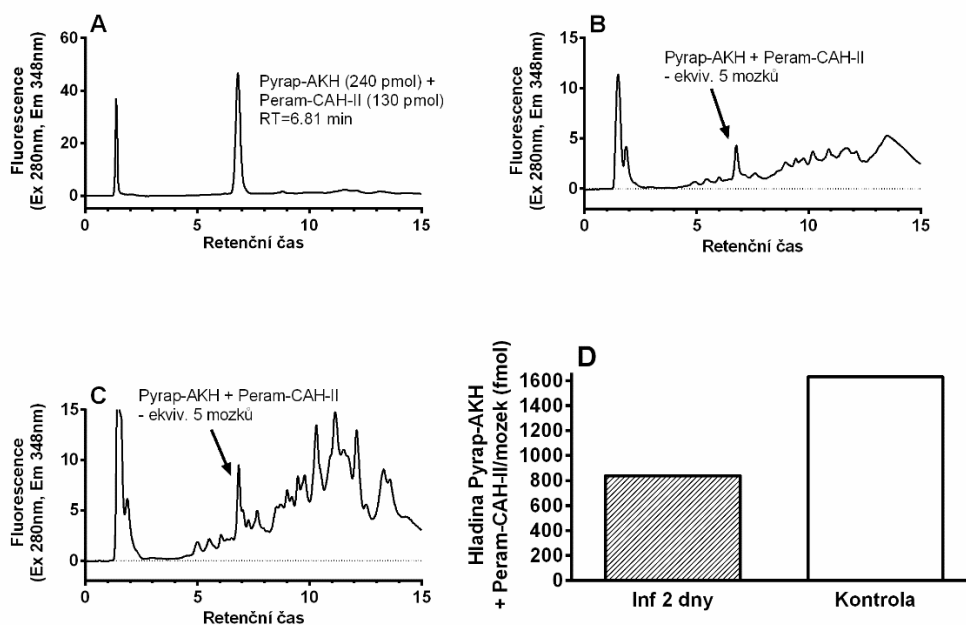
Již na první pohled lze z tabulky 2 vyčíst, že vyvolání infekce u pokusných ploštic pomocí injikace blastospor bylo rychlé a dobře definovatelné. Dalším cílem práce bylo určit takovou koncentraci suspenze blastospor, která zaručeně vyvolá infekci a přitom pokusné ploštice ihned nezabije. Jak můžeme z Tab. 2 vidět, koncentrace $4,45 * 10^7$ spor/ml vyvolala 100% mortalitu již třetí den po jejich vpichu, zatímco u koncentrace $1 * 10^6$ spor/ml byl průběh infekce mnohem mírnější. U koncentrace $1 * 10^5$ spor/ml nebyla dokonce zaznamenána žádná mortalita.

K dalším pokusům byla nakonec používána koncentrace $1 * 10^6$ spor/ml, protože bylo zřejmé, že je schopná vyvolat infekci dokumentovanou 10% mortalitou, takže v kritických dnech (1, 2 a 3 dny po aplikaci) zbýval dostatek pokusných ploštic na testování fyziologických charakteristik.

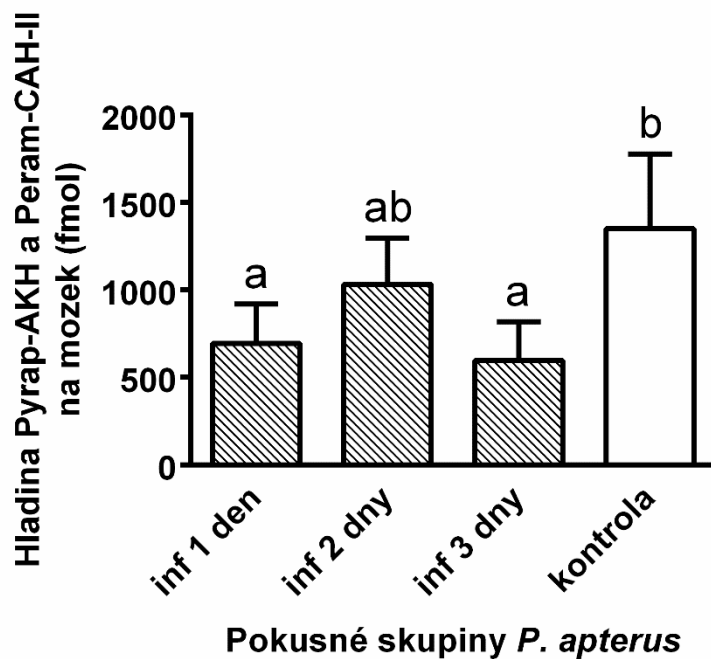
4. 2. Kvantitativní stanovení AKH

Semikvantitativní analýza hladiny AKH v CNS ploštic pomocí HPLC ukázala, že u infikovaných jedinců došlo po vyvolání infekce k jejímu poklesu (Obr. 10). Za tímto účelem byl extrakt z CNS infikovaných (Obr. 10B) i kontrolních (Obr. 10C) ploštic obsahující AKH rozdělen na chromatografické koloně a příslušné peaky identifikovány pomocí retenčního času známého množství syntetických hormonů (Obr. 10A; RT = 6,81min, pozn.: na použité koloně se oba hormony od sebe neoddělují a tvoří jeden peak). Pomocí ploch určených peaků a jejich porovnání se syntetickými standardy bylo zjištěno, že u infikovaných ploštic došlo k 1,94x násobnému poklesu hladiny AKH v CNS (Obr. 10D).

Pro přesnější stanovení hladiny AKH v CNS byla použita ještě druhá metoda – ELISA. Pomocí této metody, založené na principu antigen-protilátka, lze dosáhnout mnohem přesnějších měření. ELISA také ukázala pokles hladiny AKH v CNS (Obr. 11). Tento pokles byl první den po infekci téměř dvakrát nižší (1,95x); druhý den byl pokles 1,3x nižší a třetí 2,3x nižší, přičemž statisticky významný pokles byl prokázán pouze u 1. a 3. dne po vyvolání infekce.



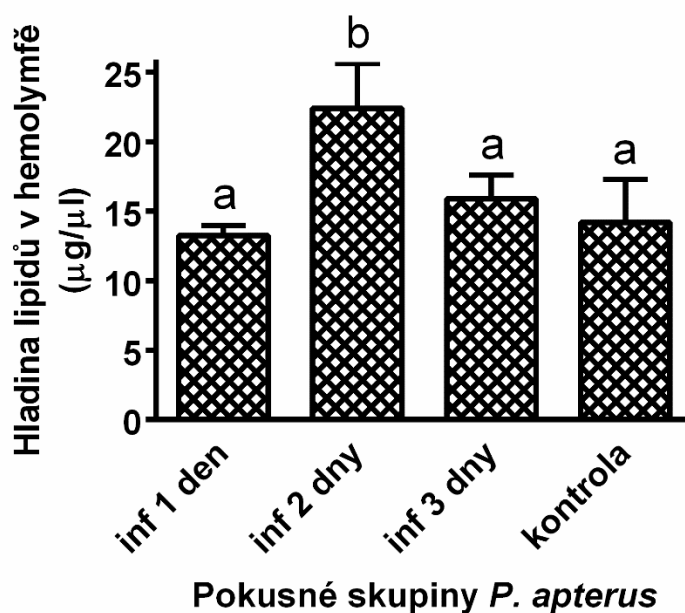
Obr. 10: HPLC analýza a stanovení hladiny AKH v CNS ploštic *P. apterus* infikovaných entomopatogenní houbou *I. fumosorosea*. A – chromatografický záznam analýzy syntetického Pyrap-AKH a Peram-CAH-II. B – chromatografické dělení extraktu CNS z infikovaných ploštic. C – chromatografické dělení extraktu CNS z kontrolních ploštic. D – semikvantitativní stanovení hladiny AKH v CNS ploštic vypočítané z analýz A, B a C.



Obr. 11: ELISA – kvantitativní stanovení AKH v CNS ploštic *P. apterus* infikovaných entomopatogenní houbou *I. fumosorosea*. Statistické hodnocení výsledků bylo provedeno testem jednocestná ANOVA s Tukeyho post-testem; rozdíly na 5% hladině významnosti jsou označeny různými písmeny (n=4).

4. 3. Kvantitativní stanovení lipidů v hemolymfě

Pomocí sulfo-fosfovanilinové testu bylo zjištěno, že infekce vyvolaná entomopatogenní houbou *I. fumosorosea* způsobila u infikovaných ploštic zvýšení hladiny lipidů v hemolymfě (Obr. 12). Toto zvýšení bylo statisticky významné druhý den po vyvolání infekce, kdy se hladina lipidů v hemolymfě zvýšila oproti kontrolám asi 1,6x.

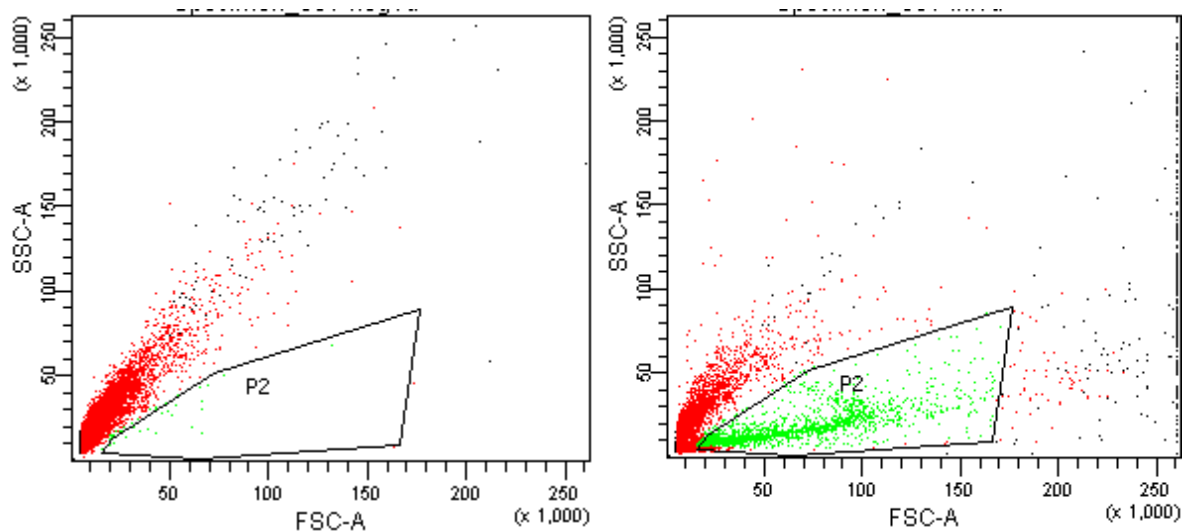


Obr. 12: Kvantitativní stanovení lipidů v hemolymfě ploštic *P. apterus* infikovaných entomopatogenní houbou *I. fumosorosea*. Statistické hodnocení výsledků bylo provedeno testem jednocestná ANOVA s Tukeyho post-testem; rozdíly na 5% hladině významnosti jsou označeny různými písmeny (n=4-5).

4. 4. Měření buněčné populace hemocytů

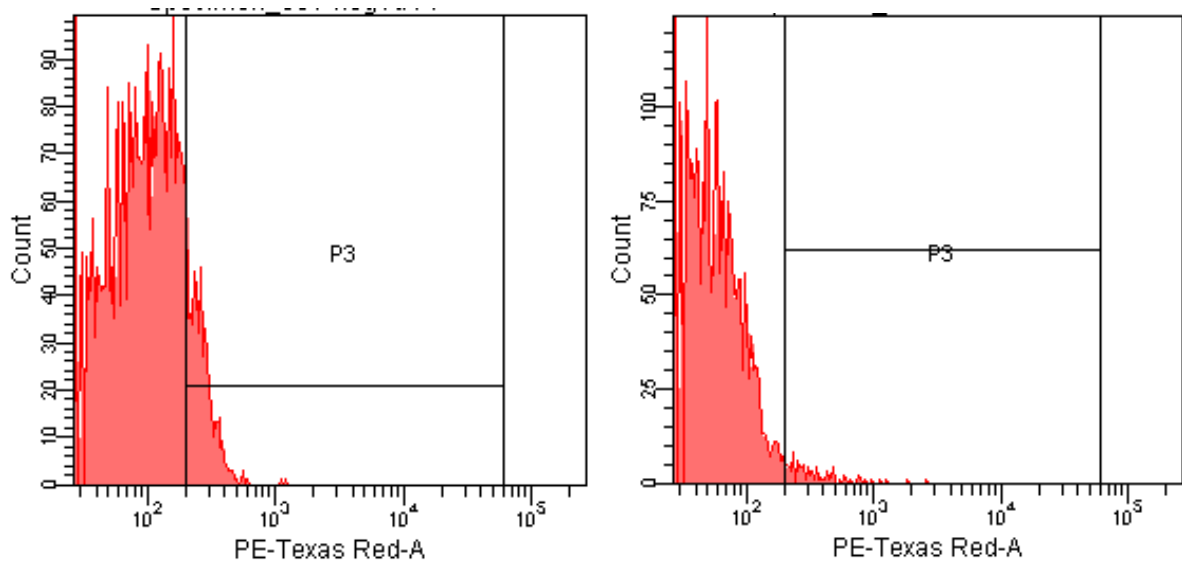
Na základě předchozích výsledků bylo zjištěno, že v těle *P. apterus* dochází po infekci houbou *I. fumosorosea* k jistým fyziologickým změnám. Tyto závěry potvrdila také cytometrická stanovení v hemolymfě pokusných ploštic. Výsledky ukázaly, že u infikovaných ploštic se vyskytuje zcela jiná sub-populace hemocytů oproti kontrole (ošetřené pouze Ringerovým roztokem). Obrázek 12 ukazuje, že ve vytipované oblasti P2 se u kontrolní ploštiny vyskytovalo pouze 0,4% z celkového počtu buněk hemolymfy, zatímco u

infikovaného jedince se tato hodnota zvýšila na 29,9%. Měření životnosti hemocytů značených propidium jodidem ve vytipované oblasti P3 zase ukázalo, že u infikovaných jedinců činil podíl mrtvých/porušených buněk na celkové buněčné populaci 1,67%, což bylo v porovnání s kontrolou asi 5,2 krát méně (Obr. 13).



Kvantifikace – procento populace vybraných hemocytů	
Kontrola	0,4%
Infikace 2 dny	29,9%

Obr. 12 Cytometrické stanovení populace hemocytů. Dot plot vlevo – populace hemocytů z kontrolního jedince *P. apterus* (ošetřeného Ringerovým roztokem). Dot plot vpravo – populace hemocytů z jedince *P. apterus* 2 dny po injikaci blastospor *I. fumosorosea*. Tabulka dole – kvantifikace výsledků z uvedených dot plotů.



Kvantifikace – procento mrtvých hemocytů	
Kontrola	8,73 ± 3,27% (n=3)
Infikace 2 dny	1,67 ± 1,06% (n=2)

Obr. 13: Příklad cytometrického stanovení životnosti hemocytů pomocí značení propidium jodidem. Histogram vlevo – hemocyty z kontrolního jedince *P. apterus* (ošetřeného Ringerovým roztokem). Histogram vpravo – hemocyty z jedince *P. apterus* 2 dny po injikaci blastospor *I. fumosorosea*. Tabulka dole – kvantifikace výsledků (statistické hodnocení nebylo vzhledem k malému počtu opakování provedeno).

5. Diskuze

Pro studium obranné reakce vůči nákaze způsobené entomopatogenní houbou a zapojení adipokinetických hormonů byla zvolena ploštice *P. apterus*. Tento druh nepatří mezi škodlivé druhy hmyzu, ale pro dané studium je velmi výhodný. O biologii této ploštice existuje rozsáhlá literatura (Socha, 1993). Vlastnosti a funkce adipokinetických hormonů *P. apterus* ve stresových situacích jsou velmi podrobně prostudovány (Kodrík, 2008). Navíc v naší laboratoři existují všechny dostupné prostředky umožňující tento druh studia. Nicméně pokud je mi známo, tento hmyzí druh pro studium entomopatogenní nákazy zatím ještě nikdo nepoužil, proto bylo jedním z hlavních cílů bakalářské práce vypracovat podmínky, za kterých je možné nákazu u tohoto pokusného druhu vyvolat.

5. 1. Vyvolání infekce u *P. apterus* pomocí *I. fumosorosea*

V první sérii pokusů byla zvolena Dip-metoda, protože Hussein a kol. (2013) měli s touto metodou úspěšné výsledky při infekci housenky *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). Tyto housenky byly imerzně ponořeny do roztoku konidiospor *I. fumosorosea* (CCM 8367) + 0,02% Tween – 80 o koncentraci $5 \cdot 10^7$ spor/ml a chovány v Petriho miskách za standartních podmínek. Mortalita po čtyřech dnech dosahovala více než 50% a maximální úmrtnost (93,3%) byla zaznamenána devátý den od vyvolání infekce. Při testech prováděných v této práci byla mortalita *P. apterus* i při vysokých koncentracích suspenze konidiospor ($5,4 \cdot 10^8$ spor/ml) velmi malá a v závislosti na délce infekce nebyla konstantní. Snímky z elektronového mikroskopu však ukázaly, že konidiospory se při použití této koncentrace na povrchu kutikuly skutečně nachází. Nejpravděpodobnější vysvětlení pro tento jev je odolnost a pevnost kutikuly *P. apterus*, kterou tato entomopatogenní houba rozpouští pomaleji než například u výše zmíněných housenek.

Když se Dip-metoda ukázala jako nepříliš vhodná pro studium fyziologických procesů, byla vyzkoušena injekce blastospor *I. fumosorosea* do těla ploštic. Podle předchozích prací (např.: Kodrík a kol., 2015a, c; Goldsworthy a kol., 2002) bylo známo, že vpich pomocí Hamiltonovi mikrostříkačky skrz metathorakálně abdominální intersegmentální membránu do hrudi nezpůsobuje téměř žádná poškození pokusné ploštici *P. apterus*. Tento fakt potvrdilo i v této práci ošetření kontrolní skupiny ploštic (injikován

pouze Ringerův roztok), kde mortalita byla prakticky nulová. Na druhou stranu je zřejmé, že injekcí blastospor se snižuje entomopatogenita houby, neboť i tím jak se konidiospory dostávají přirozenou cestou skrz exoskelet do coelomové dutiny, vytvářejí svými enzymy metabolity, které přispívají k toxicitě houby (Hajek a Leger, 1994). Ale tento mechanismus není zřejmě z hlediska adipokinetické hormonální odpovědi stěžejní.

5. 2. Změny hladiny AKH a metabolitů během infekce

Jak již bylo řečeno v Úvodu, AKH se podílí na udržování homeostáze a řízení dalších regulačních procesů v těle hmyzu při stresových situacích. Lze tedy předpokládat, že aplikace stresového faktoru bude spojena se změnami hladiny AKH v hmyzím těle - výjimku netvoří ani infekce či vystavení pokusných jedinců insekticidům. Jak prokázali při svých pokusech Kodrík a Socha (2005) a Velki a kol. (2011) došlo u *P. apterus* po ošetření insekticidy k navýšení hladiny AKH. V *corpora cardiaca* však bylo toto navýšení buď minimální - při aplikaci malathionu či endsufanu (Velki a kol., 2011) nebo dokonce nulové - při aplikaci permethrinu (Kodrík a Socha, 2005). Výraznější změny hladiny AKH byly zaznamenány u všech použitých insekticidů v hemolymfě. Z tohoto faktu byla vytvořena hypotéza, že po injekci blastospor *I. fumosorosea* by také mělo dojít k navýšení hladiny AKH v těle pokusných ploštic *P. apterus*. Již první série měření AKH pomocí HPLC však tento předpoklad vyvrátila – hladina AKH v CNS byla 2. den od ošetření blastosporami *I. fumosorosea* téměř dvojnásobně nižší v porovnání s kontrolní skupinou, která byla ošetřena pouze Ringerovým roztokem.

Pro potvrzení tohoto nečekaného výsledku byla použita metoda ELISA, která umožňuje kvantifikovat daný antigen (AKH) s mnohem vyšší přesností. ELISA potvrdila výsledek získaný pomocí HPLC a prokázala až více než dvojnásobný pokles hladiny AKH v CNS během sledovaného období infekce. Jak tento fakt vysvětlit? Je možné, že během infekce došlo vlivem intenzivního stresu k masivnímu výdeji AKH do hemolymfy. Jedná se však pouze o hypotézu, která zatím není podložena experimentálními daty, protože stanovení hladiny AKH v hemolymfě již nebylo možné v rámci této bakalářské práce z časových důvodů provést. Tato otázka zůstává zajímavým námětem pro budoucí výzkum.

Adipokinetické hormony uvolněné do hemolymfy během stresové situace jsou následně transportovány k cílovým orgánům a tkáním. Hlavním cílovým orgánem AKH je tukové těleso, kde dochází k mobilizaci energetických zásob. U ploštice *P. apterus* jsou hlavním energetickým substrátem transportovaným hemolymfou do místa spotřeby lipidy (Kodrík a kol., 2000). Je zajímavé, že první den po infekci pokusných jedinců *P. apterus* houbou *I. fumosorosea* nebylo naměřeno prakticky žádné zvýšení hladiny lipidů oproti kontrolní skupině, druhý den však bylo zaznamenáno maximální (asi 1,6 násobné) zvýšení a třetí den hladina lipidů opět klesla téměř na kontrolní hladinu. Nabízí se následující vysvětlení: první den se infekce začíná rozbíhat a organismus na ni reaguje s určitým zpožděním. Druhý den již mobilizace energetických zásob pro boj s infekcí probíhá naplno. Následně hladina lipidů klesá, neboť organismus začíná být buď vyčerpán - tato skutečnost se začíná projevovat také na zvýšené mortalitě (3. den infekce byla 10% mortalita) - případně sama houba využívá mobilizované lipidy hostitele pro své metabolické aktivity a růst.

Studiem vlivu entomopatogenních hub na obranné reakce hmyzu a hormonální účasti v nich se zabývali Goldsworthy a kol. (2005) a Mullen a Goldsworthy (2006). Tito autoři prováděli pokusy na dospělých a nymfách *L. migratoria*, kdy jedné skupině pokusných jedinců injikovali blastospory entomopatogenní houby *Metarhizium anisopliae* a druhé skupině injikovali blastospory této houby společně s Locmi-AKH-I. Při porovnávání výsledků zjistili, že koinjekce adipokinetického hormonu a spor způsobuje rychlejší růst houby v důsledku vlivu AKH, který oslabil imunitní systém inhibicí syntézy proteinů a navíc aktivoval energetické zásoby, jenž byla houba schopna využívat pro svůj metabolismus. Společná injekce konidiospor s AKH do těla *L. migratoria* vedla také k průkaznému nárůstu mortality ve srovnání s injekcí konidiospor samotných. Podobný fakt byl popsán i pro společné aplikace insekticidů a AKH, které vyvolávalo významné zvýšení mortality ve srovnání s aplikací insekticidů samotných (více viz Kodrík a kol., 2015a). Autoři si tento fakt vysvětlují hormonálně podmíněným zvýšením metabolismu, které zajišťuje rychlejší vstup toxinů do tkání a buněk a jejich větší účinnost.

5. 3. Cytometrické měření

Účelem cytometrického měření bylo zjistit, zdali buněčný imunitní systém plošnice reaguje na uvedenou infekci a zdali je možné tuto reakci nějak monitorovat nebo kvantifikovat. Dle dostupných informací analýzy pomocí průtokové cytometrie na hemocytech u *P. apterus* nebyly dosud prováděny. Napřed bylo tedy nutné zjistit, v jakém množství hemolymfy lze změřit dostatečný počet hemocytů a jak vzorky zpracovat. Pro první startovací pokusy (jejichž výsledky v této práci nejsou uvedeny), bylo použito 1, 2, 3, 4 a 5 μ l hemolymfy/mikrozkumavku, dvakrát promyto v 1ml 1% BSA a výsledná směs měřena na cytometru v Ringerově fyziologickém roztoku za chlazení ledem. Výsledky takto připravených vzorků ukázaly, že vhodné množství hemolymfy na cytometrické stanovení populace hemocytů je 2 μ l; je to objem, ve kterém se nachází více než dostatečné množství hemocytů (10 000 events).

Také na druhou cytometrickou analýzu, kde se prováděl test živovaschopnosti buněk byly použity 2 μ l hemolymfy. K této analýze byla úspěšně použita metoda podle Nakahara a kol. (2009), který prováděl ve svém výzkumu cytometrická měření hemocytů v hemolymfě larev *B. mori* (Lepidoptera).

Ve výsledcích na obrázku 12 je na první pohled zřetelný rozdíl mezi infikovaným a kontrolním jedincem. U infikovaného jedince se objevila nová sub-populace buněk, které jsou oproti kontrole větší - jedná se pravděpodobně o důsledek imunitní reakci organismu na infekci. Tento výsledek odpovídá literárním údajům: např. Zibae a Malagoli (2014) zjistili, že po aplikaci několika druhů entomopatogenních hub včetně *I. fumosorosea* na larvách *Chilo suppressalis* se významně zvýšil počet plasmatocytů v hemolymfě po 3 hodinách po vyvolání infekce. Stejného výsledku bylo dosaženo při sledování populací hemocytů účastnících se obranné reakce proti aplikovaným entomopatogenním houbám u *Plutella xylostella* (Yan-Yuan a kol., 2011) a *Hyphantria cunea* (Ajamhassani a kol., 2013).

Zajímavý výsledek ukázalo změření životnosti hemocytů pomocí značení propidium jodidem, kdy v kontrole bylo 5,23x více mrtvých buněk ve srovnání s infikovaným jedincem. K tomuto fenoménu se nepodařilo najít žádné literární údaje, lze snad tedy spekulovat, že mohlo dojít k aktivaci všech hemocytů účastnících se obranné reakce, a tedy v době analýzy hemolymfy byl počet mrtvých hemocytů relativně nižší než tomu bylo u kontrol. Nelze ani vyloučit podobnou situaci, která byla popsána u larev *D. melanogaster* parazitovaných

vosičkou *Leptopilina boulardi* (Márkus a kol., 2009). U napadených larev došlo k masivnímu uvolnění hemocytů z hematopoetických orgánů krátce po parazitaci. Tyto spekulace však může potvrdit pouze další studium dané problematiky.

6. Závěr

Při studiu adipokinetické hormonální odpovědi na infekci způsobenou entomopatogenní houbou druhu *I. fumosorosea* na modelovém organismu *P. apterus* byly zjištěny následující skutečnosti:

- ✓ Infekci houbou *I. fumosorosea* u ploštiny *P. apterus* lze dobře vyvolat pomocí injekce blastospor. Konidiospory této houby jsou pro vyvolání infekce a následná fyziologická měření u ploštic nevhodné.
- ✓ Po vyvolání infekce houbou *I. fumosorosea* lze naměřit fyziologické změny v těle ploštiny *P. apterus* – hladina AKH v CNS klesne až dvojnásobně a dochází k mobilizaci energetických zásob.
- ✓ Pro analýzu hemocytů pomocí průtokové cytometrie u *P. apterus* je zapotřebí alespoň 2μl hemolymfy. Buněčné populace infikovaných ploštic se od kontrol ošetřených pouze fyziologickým roztokem liší.

7. Seznam citované literatury

1. **Ajamhassani, M., Sendi, J. J., Zibae, A., Askary, H., Farsi, M. J. (2013)** Immunological Responses of *Hyphantria Cunea* (Drury) (Lepidoptera: Arctiidae) to Entomopathogenic Fungi, *Beauveria Bassiana* (Bals.-Criy) and *Isaria Farinosae* (Holmsk.) Fr., Journal of Plant Protection Research, 53, 110 – 118.
2. **Ali, S., Huang, Z., Ren, S. (2010)** Production of cuticle degrading enzymes by *Isaria fumosorosea* and their evaluation as a biocontrol agent against diamondback moth., Journal of Pest Science, 83, 361 – 370.
3. **Alquicer, G., Kodrık, D., Krishnan, N., Večeřa, J., Socha, R. (2009)** Activation of insect anti-oxidative mechanisms by mammalian glucagon., Comparative Biochemistry and Physiology B, 152, 226 – 233.
4. **Bassetti, M., Pasinu, D. L., Rosa, P. (1995)** Degradation of gonadotropin b-subunits retained in the endoplasmic reticulum of the gonadotropes of castrated rats., Endocrinology 136, 1168 – 1176.
5. **Bednářová, A., Kodrık, D., Krishnan, N. (2013)** Unique roles of glucagon and glucagon-like peptides: Parallels in understanding the functions of adipokinetic hormones in stress response in insect., Comparative Biochemistry and Physiology A, 164, 91 – 100.
6. **Bernardini, M., Carilli, A., Pacioni, G., Santurbano, B. (1975)** Isolation of Beauvericin From *Paecilomyces fumoso-roseus*., Phytochemistry, 14, 1865.
7. **Bodláková, K., Jedlička, P., Kodrık D. (2016)** Adipokinetic hormones control amylase activity in the cockroach *Periplaneta americana* gut., Insect science.

8. **Bray, M. M., Shafi, S., Wheeler, C. H., Goldsworthy, G. J. (1993)** Quantification by radioimmunoassay of the adipokinetic hormone-I in neural tissues in the head of *Locusta migratoria*., *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 106, 257 – 262.
9. **Carlisle, J., Loughton, B. G. (1979)** Adipokinetic hormone inhibits protein synthesis in locusta., *Nature*, 282, 420 – 421.
10. **Chapman, R. F. (1998)** *The Insects. Structure and Function*, 4th edn., Cambridge University Press, U. K.
11. **Clottens, F., Gade, G., Huybrechts, R., De Loof, A. (1989)** Immunohistochemical localisation of the hypotrehalosaemic hormone II (Cam-HrTH-II) and related peptides in the nervous system of *Carausius morosus* and *Sarcophaga bullata*., *Cell and Tissue Research* 258, 631 – 636.
12. **Diederer, J. H. B., Oudejans, R. C. H. M., Harthoorn, L. F., Van der Horst, D. J. (2002)** Cell biology of the adipokinetic hormone-producing neurosecretory cells in the locust corpus cardiacum., *Microscopy Research and Technique*, 56, 227 – 236.
13. **Eilenberg, J., Vitt Meyling N., Jensen A. B. (2009)** Insect pathogenic fungi in biological control: status and future challenges., *IOBC/wprs Bull*, 45, 7 – 10.
14. **Fernlund, P., Josefsson, L. (1972)** Crustacean color-change hormone: amino acid sequence and chemical synthesis., *Science* 177, 173 – 175.
15. **Gäde, G. (1997)** The explosion of structural information of insect neuropeptides. In: Herz, W., Kirby, G. W., Moore, R. E., Steglich, W., Tamm, C. (Eds.), *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* 71., Springer Verlag, New York, 1 – 128.
16. **Gäde, G., Auerswald, L. (2002)** Beetles' choice – proline for energy output: control by AKHs., *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 132, 117 – 129.

17. **Gäde, G., Auerswald, L. (2003)** Mode of action of neuropeptides from the adipokinetic hormone family., *General and Comparative Endocrinology*, 132, 10 – 20.
18. **Gäde, G., Goldsworthy, G. J. (2003)** Insect peptide hormones: a selective review of their physiology and potential application for pest control., *Pest Management Science*, 59, 1063 – 1075.
19. **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.
20. **Gäde, G., Hoffmann, K. H., Spring, J. H. (1997)** Hormonal regulation in insects: Facts, gaps, and future directions., *Physiological Reviews* 77, 963 – 1032.
21. **Gilbert, L. I., Yatrou, K., Gill, S. S. (2005)** *Comprehensive Molecular Insect Science.*, Elsevier: Oxford, UK, Volume 3, p. 842.
22. **Gokuldas, M., Hunt, P. A., Candy, D. J. (1988)** The inhibition of lipid synthesis in vitro on the locust, *Schistocerca gregaria*, by factors from corpora cardiaca., *Physiological Entomology*, 13, 43 – 48.
23. **Goldsworthy, G. J., Opoku-Ware, K., Mullen, L. M. (2005)** Adipokinetic hormone and the immune responses of locusts to infection., *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1040, 106 – 113 .
24. **Goldsworthy, G. J., Kodrík, D., Comley, R., Lightfoot, M. (2002)** A quantitative study of the adipokinetic hormone of the firebug, *Pyrhocoris apterus.*, *Journal of Insect Physiology*, 48, 1103 – 1108.

25. **Hajek, A., Leger, R. (1994)** Interactions between fungal pathogens and insect hosts., Annual Review of Entomology, 39, 293 – 322.
26. **Hansen, K. K., Hauser, F., Cazzamali, G., Williamson, M., Grimmelikhuijzen, C. J. P. (2006)** Cloning and characterization of the adipokinetic hormone receptor from the cockroach *Periplaneta americana*., Biochemical and Biophysical Research Communication, 343, 638 – 643.
27. **Harthoorn, L. F., Diederer, J. H. B., Oudejans, R. C. H. M., Van der Horst, D. J. (1999)** Differential location of peptide hormones in the secretory pathway of insect adipokinetic cells., Cell and Tissue Research, 298, 361 – 369.
28. **Humber, R. A., Hansen, K. S. (2005)** USDA-ARS Collection of entomopathogenic fungal cultures (ARSEF)., ARSEF-Catalog: Host by Fungus., <http://arsef.fpsnl.cornell.edu>.
29. **Hussein, H. M., Zemek, R., Habušťová, S. O., Prenerová, E., Manal A. Adel (2013)** Laboratory evaluation of a new strain CCM 8367 of *Isaria fumosorosea* (syn. *Paecilomyces fumosoroseus*) on *Spodoptera littoralis* (Boisd.)., Archives Of Phytopathology And Plant Protection, 46, 11, 1307 – 1319.
30. **Jansen, W. F., Diederer, J. H. B., Dorland, M., Langermans, J., Messen, B. P. M., Mink, K., Vullings, H. G. B. (1989)** Ultrastructural enzyme-cytochemical study of the intrinsic glandular cells in the corpus cardiacum of *Locusta migratoria*: relation to the secretory and endocytotic pathways, and to lysosomal system., Cell and Tissue Research 255, 167 – 178.
31. **Jones, B. J., Tan, T., Bloom, S. R. (2012)** Minireview: Glucagon is stress and energy homeostasis., Endocrinology, 153, 1049 – 1054.
32. **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.
33. **Kaufmann, C., Merzendorfer, H., Gade, G. (2009)** The adipokinetic hormone system in Culicinae (Diptera: Culicidae): Molecular identification and characterization of two adipokinetic hormone (AKH) precursors from *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* and two AKH receptor variants from *A. aegypti*., *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39, 770 – 781.
34. **Kavková, M., Čurn, V. (2005)** *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a Potential Mycoparasite on *Sphaerotheca fuliginea* (Ascomycotina: Erysiphales)., *Mycopathologia*, 159, 53 – 63.
35. **Kleespies, R., Bathon, H., Zimmermann, G. (1989)** Untersuchungen zum natürlichen Vorkommen von entomopathogenen Pilzen und Nematoden in verschiedenen Boden in der Umgebung von Darmstadt., *Gesunde Pflanzen*, 41, 350 – 355.
36. **Kodrík, D. (2008)** Adipokinetic hormone functions that are not associated with insect flight., *Physiological Entomology*, 33, 171 – 180.
37. **Kodrík, D., Goldsworthy, G. J. (1995)** Inhibition of RNA synthesis by adipokinetic hormones and brain factor(s) in adult fat body of *Locusta migratoria*., *Journal of Insect Physiology*, 41, 127 – 133.
38. **Kodrík, D., Socha, R. (2005)** The effect of insecticide on adipokinetic hormone titre in insect body., *Pest Management Science*, 61, 1077 – 1082.
39. **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.

40. **Kodrík, D., Socha, R., Syrová, Z. (2003)** Developmental and diel changes of adipokinetic hormone in CNS and haemolymph of the flightless wing-polymorphic bug, *Pyrrhocoris apterus.*, *Journal of Insect Physiology*, 49, 53-61.
41. **Kodrík, D., Bednářová, A., Zemanová, M., Krishnan N. (2015b)** Hormonal Regulation of Response to Oxidative Stress in Insects—An Update; *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 25788 – 25816.
42. **Kodrík, D., Plavšín, I., Velki, M., Stašková, T. (2015a)** Enhancement of insecticide efficacy by adipokinetic hormones. In: Montgomery J. (Ed.) *Insecticides: Occurrence, Global Threats and Ecological Impact.*, Nova Science Publishers, Inc., New York, ISBN: 978-1-63483-475-9, 77 – 91.
43. **Kodrík, D., Šímek, 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.
44. **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.
45. **Kodrík, D., Socha, R., Šímek, P., Zemek, R., Goldsworthy, G. J. (2000)** A new member of the AKH/RPCH family that stimulates locomotory activity in the firebug, *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera)., *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, 489 – 498.
46. **Kodrík, D., Stašková, T., Jedličková, V., Weyda, F., Závodská, R., Pfliegerová, J. (2015c)** Molecular characterization, tissue distribution, and ultrastructural localization of adipokinetic hormones in the CNS of the firebug *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera, Insecta)., *General and Comparative Endocrinology*, 210, 1 – 11.
47. **Köllisch, G. V., Lorenz, M. W., Kellner, R., Verhaert, P. D., Hoffman K. H. (2000)** Structure elucidation and biological activity of an unusual adipokinetic hormone

- from corpora cardiaca of the butterfly, *Vanessa cardui*., *European Journal of Biochemistry*, 267, 5502 – 5508.
48. **Kramer, K. J., Tager, H. S., Childs, C. N. (1980)** Insuline-like and glucagon-like peptides in insect hemolymph., *Insect Biochemistry*, 10, 179 – 182.
49. **Krishnan, N., Kodrík, D. (2012)** Endocrine control of oxidative stress in insects. In: *Farooqui T. and Farooqui A. A. (Eds.), Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates: Molecular Aspect of Oxidative Stress and Cell Signaling.*, Wiley-Blackwell, New Jersey, pp 261 – 270.
50. **Jegorov, A., Sedmera, P., Matha, V., Šimek, P., Zahradníčková, H., Landa, Z., Eyal, J. (1994)** Beauverolides L and La from *Beauveria tenella* and *Paecilomyces fumosoroseus*., *Phytochemistry*, 37, 1301 – 1303.
51. **Landa, Z. (2009)** Entomopatogenní houby. Katedra rostlinné výroby a agroekologie, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích [online] [vid. 21. únor 2014]. Dostupné z: <http://rl.zf.jcu.cz/docs/ruzne/ruz-MOR-P4f-f6c167a163.pdf>.
52. **Landa, Z., Hornák, P., Charvátová, H., Osborne, L. S. (2002)** Distribution, Occurrence and Potential Use of Entomopathogenic Fungi in Arable Soils in Czech Republic., *ISTRO-Conference, Brno, Session II*, 195 – 201.
53. **Lee, G., Park, J. H. (2004)** Hemolymph sugar homeostasis and starvation-induced hepyractivity affected by genetic manipulations of the adipokinetic hormone-encoding gene in *Drosophila melanogaster*., *Genetics*, 167, 311 – 323.
54. **Lorenz, M. W. (2003)** Adipokinetic hormone inhibits the formation of energy stores and egg productions in the cricket *Gryllus bimaculatus*., *Comparative Biochemistry and Physiology*, 136, 197 – 206.
55. **Márkus, R., Laurinyecz, B., Kurucz, É., Honti, V., Bajusz, I., Sipos, B., Somogyi, K., Kronhamn, J., Hultmark, D., Andó, I. (2009)** Sessile hemocytes as a hematopoietic

- compartment in *Drosophila melanogaster*., Proceedings of the National Academy of Sciences, 106, 4805 – 4809.
56. **Meyer, J. M., Hoy, M. A., Boucias, D. G. (2008)** Isolation and characterization of an *Isaria fumosorosea* isolate infecting the Asian citrus psyllid in Florida., Journal of invertebrate pathology, 99, 96 – 102.
57. **Meyling, N. V., Eilenberg, J. (2006)** Occurrence and Distribution of Soil Borne Entomopathogenic Fungi within a Single Organic Agroecosystem., Agriculture, Ecosystems and Environment, 113, 336 – 341.
58. **Mietkiewski, R., Klukowski, Z., Balazy, S. (1994)** Entomopathogenic Fungi Isolated from Soil of Mid-Forest Meadows of Sudety Mountains., Roczniki Nauk Rolniczych, Seria E, 24, 33 – 38.
59. **Moshitzky, P., Henzel, W. J., Rafaeli, A., Ramachandran, J., Applebaum, S. W., (1987a)** Synthesis of adipokinetic hormone (AKH-I) in the locust brain., Insect Biochemistry 17, 1133 – 1137.
60. **Moshitzky, P., Yamashiro, D., Stuve, L., Ramachandran, J., Applebaum, S. W. (1987b)** Determination of locust AKH-I by radioimmunoassay and the identification of an AKH-like factor in the locust brain., Insect Biochemistry, 17, 765–769.
61. **Mullen, L. M., Goldsworthy, G. J. (2006)** Immune responses of locusts to challenge with the pathogenic fungus *Metarhizium* or high doses of laminarin., Journal of Insect Physiology, 52, 389 – 398.
62. **Nakahara, Y., Shimura, S., Ueno, C., Kanamori, Y., Mita, K., Kiuchi, M., Kamimura, M. (2009)** Purification and characterization of silkworm hemocytes by flow cytometry., Developmental and Comparative Immunology, 33, 439 – 448.

63. **Nassel, D. R. (2002)** Neuropeptides in the nervous system of *Drosophila* and other insects: multiple roles as neuromodulators and neurohormones., *Progress in Neurobiology*, 68, 1 – 84.
64. **Nijhout, H. F. (1998)** *Insect Hormones.*, Princeton University Press: Princeton, NJ, USA.
65. **Nilanonta, C., Isaka, M., Kittakoop, P., Trakulnaleamsai, S., Tanticharoen, M., Thebtaranonth, Y. (2002)** Precursor-directed biosynthesis of beauvericin analogs by the insect pathogenic fungus *Paecilomyces tenuipes* BCC 1614., *Tetrahedron Letters*, 58, 3355 – 3360.
66. **Noyes, B. E., Katz, F. N., Schaffer, M. H. (1995)** Identification and expression of the *Drosophila* adipokinetic hormone gene., *Molecular and Cellular Endocrinology*, 109, 133 – 141.
67. **O’Shea, M., Witten, J., Schaffer, M. (1984)** Isolation and characterization of two my active neuropeptides: further evidence for an invertebrate peptide family., *Journal of Neuroscience*, 4, 521 – 529.
68. **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.
69. **Peeters, H., Zocher, R., Madry, N., Kleinkauf, H. (1983)** Incorporation of Radioactive Precursors into Beauvericin Produced by *Paecilomyces fumoso-roseus.*, *Phytochemistry*, 22, 1719 – 1720.
70. **Penka, M., Tesařová, E., a kolektiv (2012)** *Hematologie a transfuzní lékařství I.*, Grada Publishing a. s.

71. **Posada, F., Vega, F. E., Rehner, S. A., Blackwell, M., Weber, D., Suh, S. O., Humber, R. A. (2004)** *Sypastospora parasitica*, a Mycoparasite of the Fungus *Beauveria bassiana* Attacking the Colorado Potato Beetle *Leptinotarsa decemlineata*: A Tritrophic Association., *Journal of Insect Science*, 4, 24.
72. **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.
73. **Prenerová, E., Zemek, R., Volter, L., Weyda, F. (2013)** Strain of entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* CCM 8367 (CCEFO.011.PFR) and the method for controlling insect and mite pests., Patent US 08574566.
74. **Roberts, D. W. (1981)** *Toxins of Entomopathogenic Fungi in Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970 – 1980*, ed. H. D. Burges, London, UK: Academic Press, 441 – 464.
75. **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 akceleratory 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.
76. **Scharrer, B., Scharrer, E. (1944)** Neurosecretion IV. Comparison between the intercerebralis-cardiacum-allatum system of the insects and the hypothalamo-hypophyseal system of the vertebrates., *Biological Bulletin*, 87, 242 – 251.
77. **Schooneveld, H., Romberg-Privee, H. M., Veenstra, J. A. (1985)** Adipokinetic hormone-immunoreactive peptide in the endocrine and central nervous system of several insect species: a comparative immunocytochemical approach., *General and Comparative Endocrinology*, 57, 184 – 194.

78. **Smith, P. (1993)** Control of *Bemisia tabaci* and the Potential of *Paecilomyces fumosoroseus* as a Biopesticide., *Biocontrol News and Information*, 14, 71 – 78.
79. **Socha, R. (1993)** *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera)-an experimental model species: a review., *European Journal of Entomology*, 90, 241 – 286.
80. **Socha, R., Kodrík, D., Zemek, R. (1999)** Adipokinetic hormone stimulates insect locomotor activity., *Naturwissenschaften*, 88, 85 – 86.
81. **Spencer, I. M., Candy, D. J. (1976)** Hormonal control of diacylglycerol mobilization from fat body of the desert locust, *Schistocerca gregaria*., *Insect Biochemistry*, 6, 289 – 296.
82. **Srivastava, Ch. N., Maurya, P., Sharma, P., Mohan, L. (2009)** Prospective role of insecticides of fungal origin: Review., *Entomological Research*, 39, 341 – 355., ISSN 1748 – 5967.
83. **Staubli, F., Jorgensen, T. J. D., Cazzamali, G., Williamson, M., Lenz, C., Sondergaard, L., Roepstorff, P., Grimmelikhuijzen, C. J. P. (2002)** Molecular identification of the insect adipokinetic hormone receptors., *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 99, 3446 – 3451.
84. **Stone, J. V., Mordue, W., Blatney, K. E., Morris, H. R. (1976)** Structure of locust adipokinetic hormone, a neurohormone that regulates lipid utilization during flight., *Nature* 263, 207 – 211.
85. **Van der Horst, D. J., Van Marrewijk, W. J. A., Diederens, H. B. (2001)** Adipokinetic hormones of insect: release, signal transduction, and responses., *International Review of Cytology*, 211, 179 – 240.
86. **Van Marrewijk, W. J. A., Van der Broek, A. T. M., Beenackers, A. M. T. (1980)** Regulation of glycogenolysis in the locust fat body during flight., *Insect Biochemistry*, 10, 675 – 679.

87. **Vänninen, I. (1996)** Distribution and Occurrence of Four Entomopathogenic Fungi in Finland: Effect of Geographical Location, Habitat Type and Soil Type., *Mycological Research*, 100, 93 – 101.
88. **Velki, M., Kodrík, D., Večeřa, J., Hackenberger, B. K., Socha, R. (2011)** Oxidative stress elicited by insecticides: a role for the adipokinetic hormone., *General and Comparative Endocrinology*, 172, 77 – 84.
89. **Vidal, C., Fargues, J., Lacey, L. A. (1997)** Intraspecific Variability of *Paecilomyces fumosoroseus*: Effect of Temperature on Vegetative Growth., *Journal of Invertebrate Pathology*, 70, 18 – 26.
90. **Vroenen, S. F., Van Marrewijk, W. J. A., De Meijer, J., Van der Broek, A. T. M., Van der Horst, D. J. (1997)** Differential induction of inositol phosphate metabolism by three adipokinetic hormones., *Molecular and Cellular Endocrinology*, 130, 131 – 139.
91. **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.
92. **YanYuan, L., YuRong, H., LiHua, L. (2011)** Physiological defense responses of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) larvae infected by entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea*., *Acta Entomologica Sinica*, 54, 887 – 893.
93. **Zibae, A., Malagoli, D. (2014)** Immune response of *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Crambidae) larvae to different entomopathogenic fungi., *Bulletin of entomological research*, 104, 155 – 163.

94. **Zimmermann, G. (2007)** Review on Safety of the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*., *Biocontrol Science and Technology*, 17, 553 – 596.
95. **Zimmermann, G. (2008)** The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control., *Biocontrol Science and Technology*, 18, 865 – 901.
96. **Zöllner, N., Kirch, K. (1962)** Über die quantitative Bestimmung von Lipoiden (Mikromethode) mittels der vielen natürlichen Lipoiden (allen bekannten Plasmolipoiden) gemeinsamen Sulfo – phosphovanillin Reaktion., *Zeitschrift für die Gesamte Experimentelle Medizin*, 135, 545 – 561.