

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2010

Martina KOJECKÁ

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin

Výskyt a význam ekdysteroidů pro zemědělské plodiny

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Doc. Ing. Daniela Pavlíková, CSc.

Autor práce: Martina Kojecká

2010

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Výskyt a význam ekdysteroidů pro zemědělské plodiny“ vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v přiložené bibliografii.

V Praze dne:

.....

podpis autora práce

Poděkování

Na tomto místě bych bych ráda poděkovala Doc. Ing. Daniele Pavlíkové, CSc. a Ing. Milanu Pavlíkovi, CSc. za zájem, připomínky a čas, který věnovali mé práci.

Autorský referát

Ekdysteroidy jsou steroidní hormony, které řídí svlékání a metamorfosu hmyzu. Bylo objeveno, že tyto steroidy jsou přítomny ve všech stádiích hmyzího vývoje. Regulují mnoho biochemických a fyziologických procesů od naklazení vajíčka přes embryonální a postembryonální vývoj až po dospěléce. Regulují metamorfosu, reprodukci a diapauzu. Vyskytují se ve všech třídách členovců a pravděpodobně i bezobratlých. Analogy ekdysteroidů (fytoekdysteroidy) byly nalezeny také v rostlinách. Nejvyšší obsah ekdysteroidů byl objeven v parše saflorové (*Leuzea carthamoides*). Ze zemědělských plodin obsahuje aktivní formu ekdysteroidu pouze špenát a u kukuřice bylo zjištěno, že obsahuje neaktivní ekdysteroidfosfáty. Jejich funkce v rostlinách je dosud hypotetická a existuje na ni mnoho teorií. Nejčastěji se uvádí, že jde o určitý stupeň ochrany rostliny před fytofágním hmyzem nebo půdním hlístům. Hmyz však zpravidla ekdysteroidy může poměrně snadno měnit na neúčinné formy.

Fytoekdysteroidy byly nalezeny ve více než 100 rostlinných druhů (např.: nahosemenných, krytosemenných, jednoletých, víceletých a vytrvalých). Okolo 2 % světové flóry bylo podrobena zkoumání ohledně přítomnosti ekdysteroidů a je překvapivé, že přítomnost ekdysteroidů se jeví jako náhodná.

Hladina fytoekdysteroidů není stejná pro rostliny, které ekdysteroidy obsahují. Fytoekdysteroidy se akumulují během života rostliny, ale kvůli jejich možné migraci v rostlině jejich distribuce se může měnit během ontogeneze a vlivem podmínek pěstování. Také profil ekdysteroidů se mění orgán od orgánu.

Do dnešní doby bylo identifikováno více než 300 různých fytoekdysteroidů. Byla vytvořena databáze ekdysteroidů na internetu, kterou autoři nazvali Ecdybase. Databáze obsahuje jejich struktury a také jejich spektrální a biologická data, která jsou přejata z článků ve vědeckých časopisech. Analogy ekdysteroidů se od sebe liší počtem atomů uhlíků (24C – 29C), počtem, polohou a pozicí hydroxylové a karbonylové skupiny na základním steroidním skeletu. Ekdysteroid může být volný nebo konjugovaný (polární nebo nepolární). Mohou existovat také násobné konjugáty.

Hypotéza, že fytoekdysteroidy jsou chemickou ochranou rostlin proti fytofágnímu hmyzu a půdním hád'átkům se objevuje v řadě prací. Logicky se dá očekávat, že jejich produkce bude zvýšena mechanickým poškozením rostliny, nebo poškozením činností hmyzu.

Fyziologické podmínky spojené s odolností hmyzu k exogenním ekdysteroidům jsou dosud neznámé. Na rozdíl od analogů juvenilního hormonu, který může vstupovat do hmyzího organismu kutikulou, ekdysteroidy mohou vstupovat pouze orální cestou s potravou. Je nezbytné si uvědomit, že endogenní účinek ekdysonu je přísně limitován periodami hmyzu, ve kterých hmyz potravu nepřijímá.

Byly testovány různé druhy hmyzu (74 herbivorní a 52 karnivorní) na parše saflorové (*Leuzea carthamoides*). Na některé druhy hmyzu rostlina *Leuzea carthamoides* vykazovala určitou rezistenci. Vysoký obsah 20-hydroxyekdysonu nezpůsobuje universální rezistenci rostliny proti fytofágnímu hmyzu. Nejvíce rezistentní herbivorní organismy, které mohou dokončit svůj životní cyklus na této rostlině, patří do skupiny, na kterou je účinek ekdysteroidních hormonů neznámý.

Zemědělské plodiny (kromě špenátu) neobsahují aktivní formy ekdysteroidů. Ze zemědělských plodin obsahuje aktivní formu ekdysteroidu pouze špenát a u kukuřice bylo zjištěno, že obsahuje neaktivní ekdysteroidfosfáty. Lze usuzovat, že ekdysteroidy v rostlinách neplní obranou funkci proti hmyzu.

Pokud přijmeme fakt, že ekdysteroidy primárně v rostlinách neplní obrannou úlohu proti hmyzu, pak musíme zjistit pro objasnění jejich skutečné úlohy, kde se aktivní nebo neaktivní formy ekdysteroidů v buňce vyskytují.

Abstract

The ecdysteroid 20-hydroxyecdysone is a steroid hormone found in arthropods and plants. It is suspected to have agrochemical, biotechnological, medicinal, and pharmaceutical applicability. In insects, 20-hydroxyecdysone controls or elicits molting and other developmental processes, and several characterized P450 enzymes are involved in its biosynthesis. In plants, it may act as a defensive substance against insects and nematodes. It is suspected that 20-hydroxyecdysone, being a physiologically active compound, may affect morphological and physiological processes in plants and that C27 phytosterols may be its precursors. However, neither its precise function nor its mechanism of biosynthesis in plants is fully understood. Here, the importance of 20-hydroxyecdysone and current understanding of its structure, potential functions, and biosynthesis in both plants and insects are reviewed.

Some plant defenses are known to be rapidly induced following attack by phytophagous insects. Plant-produced insect molting hormones, termed phytoecdysteroids, are believed to aid plant resistance, however, their dynamics are poorly understood. Using spinach (*Spinacia oleracea*) as a model system, the inducibility of phytoecdysteroids, primarily 20-hydroxyecdysone was examined in an effort to characterize potential interactions with herbivorous insects. Rapid phytochemical induction was investigated using damage treatments and applications of defense-related plant-signal analogs, specifically methyl jasmonate and methyl salicylate. Spinach (*Spinacia oleracea*) is one of the very few crop plants which produce large amounts of phytoecdysteroids, of which 20-hydroxyecdysone is the major component. Insect-molting hormones, phytoecdysteroids, have been reported to occur in over 100 plant families. Plants, unlike insects, are capable of the biosynthesis of ecdysteroids from mevalonic acid, and in several cases the biosynthesis of phytoecdysteroids was also demonstrated to proceed via sterols. Spinach (*Spinacia oleracea*) biosynthesizes polypodine B and 20-hydroxyecdysone, which is the predominant insect-molting hormone found in plant species. The onset of ecdysteroid production in spinach requires the appropriate ontogenetic development within the plant, which is related to leaf development. In spinach, lathosterol is the biosynthetic precursor to ecdysone and 20-hydroxyecdysone. *Zea mays* biosynthesizes primarily ecdysteroid conjugates and does not appear to produce detectable levels of non-conjugated ecdysteroids.

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíl práce	2
3	Literární rešerše	3
3.1	Stres u rostlin.....	3
3.1.1	Mechanismy stresových reakcí.....	6
3.2	Sekundární metabolity	7
3.3	Ekdysteroidy.....	8
3.3.1	Distribuce ekdysteroidů v rostlinách	10
3.3.2	Charakteristiky rostlinných ekdysteroidů	10
3.4	Funkce ekdysteroidů u hmyzu.....	13
3.5	Spojení fytoekdysteroidů s metabolismem rostliny, především s významnými rostlinnými látkami (brassinosteroidy a RuBisCO).....	16
3.6	Metabolismus ekdysteroidů u hmyzu	20
3.6.1	Interakce mezi rostlinou a patogenem nebo škůdcem a reakce rostliny na mechanické poškození	21
3.6.2	Význam ekdysteroidů pro lidský organismus	23
3.6.3	Výskyt ekdysteroidů v zemědělských plodinách.....	24
4	Závěr	27
5	Seznam literatury	29

1 Úvod

V ekologické fyziologii je obsažena část, která se nazývá stresová fyziologie. Ta se speciálně zaměřuje jen na nepříznivé působení jednotlivých faktorů prostředí (stresové faktory, stresory) na rostliny. Kromě rostlinných ekologů má velký zájem na tomto výzkumu zemědělská praxe, neboť vyšlechtění nových genotypů polních plodin s větší odolností k nepříznivým podmínkám je z mnoha důvodů velmi žádoucí. Racionální postup při tvorbě odolnějších genotypů by měl vycházet ze znalostí fyziologických a biochemických mechanismů podmiňujících zvýšenou odolnost.

Rostliny jsou vystaveny stálému nebezpečí poškození svých orgánů mnoha druhy patogenů (viry, bakterie, houby), živočichů, zejména z početných skupin fytofágního hmyzu, ale i pastvou evolučně vyspělejších býložravců. Kromě mnoha morfologických a morfogenetických adaptací k omezení herbivorie (např. ostré trny či trichomy, vysoký obsah tuhých sklerenchymatických pletiv či schopnost rychlé regenerace poškozených orgánů) se uplatňuje také stresový obranný metabolismus.

Z velkého množství sekundárních metabolitů, které se syntetisují v rostlinách, mnohé eliminují trávení, působí odpudivě nebo toxicky na patogeny nebo herbivorní živočichy. Z hlediska množství, v jakém se vyskytují, lze je rozdělit do dvou kategorií. První z nich zahrnuje látky kvalitativně významné, které se sice vyskytují jen v malých koncentracích, ale zato jsou pro živočichy a patogeny velmi toxické. Patří sem nejrůznější alkaloidy, glykosidy uvolňující kyanovodík, glukosinoláty, ekdysteroidy a mnoho dalších. Rostliny s kvalitativně významnými ochrannými metabolity jsou sice před většinou organismů dobře chráněny, nicméně bývají ohrožovány virulentními klony patogenů nebo specializovanými škůdci, kteří v koevolučním procesu získali nové vlastnosti, jako např.: dokonalejší rezistenci proti příslušnému rostlinnému toxinu. Vytvářejí specificky modifikovaný enzym nebo toxin, které jsou schopny překonat rostlinné obranné mechanismy.

Do druhé kategorie řadíme kvantitativně významné metabolity, které sice nejsou tak toxické, ale ve větším množství (často tvoří více než 10% sušiny!) způsobují špatnou stravitelnost, nechutnost až toxicitu jako jsou fenolické látky např.: lignin a taniny. Energetická náročnost syntesy těchto metabolitů je vysoká a rostliny, které jsou jimi vybaveny, mají obvykle pomalejší růst. Tato zdánlivá nevýhoda však za jistých okolností může být vyvážena bezpečnější ochranou před poškozením, neboť jen málo živočišných druhů ji dokáže překonat.

2 Cíl práce

Cílem této práce je vypracování rešerše o výskytu a významu ekdysteroidů a jim podobných látek v plodinách využívaných v zemědělství. Zpracovaná rešerše by měla poskytnout vyhodnocení výskytu těchto látek, ale také zhodnocení jejich významu pro rostliny.

3 Literární rešerše

3.1 Stres u rostlin

Rostliny jsou v průběhu svého životního cyklu vystaveny velmi proměnlivým podmínkám vnějšího prostředí. Tyto podmínky ovlivňují životní funkce rostlin. Mohou poškozovat jednotlivé orgány a při velkém poškození může dojít i k úhynu rostliny (Procházka a kol., 1998).

Nepříznivé vlivy vnějšího prostředí, které negativně působí na rostliny jsou stresové faktory neboli stresory. Stav, kdy se rostlina nachází pod vlivem stresorů, je nazýván stresem. Nejedná se přitom nikdy o ustálený a snadno popsatelný stav, ale jde o dynamický komplex mnoha reakcí (Procházka a kol., 1998), který se promítá především do změny metabolismu rostliny.

Stresový metabolismus rostlin je výrazně složitější než u živočichů. Pramení to nejen z přisedlého způsobu života, který rostlinám znemožňuje uniknout možným stresorům, ale také výrazně větší mezidruhovú variabilitu a heterogenitu rostlinných buněk a pletiv (Procházka a kol., 1998). Výjimkou je předpoklad úniku na jiné stanoviště, kdy dochází k přenosu pylu a semen.

Výzkum vztahů mezi vnějším prostředím a stresem v rostlinách většinou začíná studiem přenosu podnětů vyvolávajících stres na receptory, které jsou umístěny na rozhraní orgánů rostliny s vnějším prostředím a dále pak studiem přenosem signálů uvnitř rostliny a nakonec změnu metabolismu rostliny (Pavlíková a kol., 2002a, 2005). Stresové faktory působící na rostliny se dělí na dva druhy: abiotické a biotické.

Abiotické faktory

- I. Fyzikální
 - a) mechanické účinky větru
 - b) nadměrné záření (UV, viditelné)
 - c) extrémní teploty (horko, chlad, mráz)
- II. Fyzikálně - chemické
 - a) oxidačně-redukční půdní podmínky
 - b) pH půdy

- III. Chemické
- a) nedostatek vody
 - b) nedostatek kyslíku (hypoxie, anoxie)
 - c) nedostatek živin v půdě
 - d) zasolení půdy - nadbytek solí v půdě
 - e) vysoká hladina přijatelných toxických kovů z půdy
 - f) organické polutanty v půdě
 - g) rozkladné produkty organismů v půdě
 - h) toxické plyny ve vzduchu

Biotické faktory

- a) herbivorní živočichové (spásání, poranění)
- b) patogenní mikroorganismy (virý, mikroby, houby)
- c) vzájemné ovlivňování (allelopathie, parazitizmus)

Proti těmto faktorům jsou rostliny schopné se do jisté míry bránit tím, že mají vyvinuté různé ochranné mechanismy. Tyto mechanismy dělíme na dva základní typy - pasivní a aktivní. Pasivní obrana má trvalý charakter (např. tlustá kutikula na listech, výrazná impregnace buněčných stěn, rezervoáry vody a snadno rozložitelných organických látek tlumící jejich nedostatek) a díky nim mohou tyto stresové faktory pronikat do vnitřního prostředí různých druhů rostlin obtížněji (Kůdela a kol., 1989). Jedná se vlastně o schopnost eliminovat stresor, k čemuž přispívají také vhodně načasované životní cykly (Procházka a kol., 1998). Například změna ve výživě rostlin po vyklíčení semen (fáze semenáčků - angl. seedlings) působí na růst a vývoj rostliny více než v pozdějším období rostliny (Duchon a Hampl, 1962, Ivanič a kol., 1984).

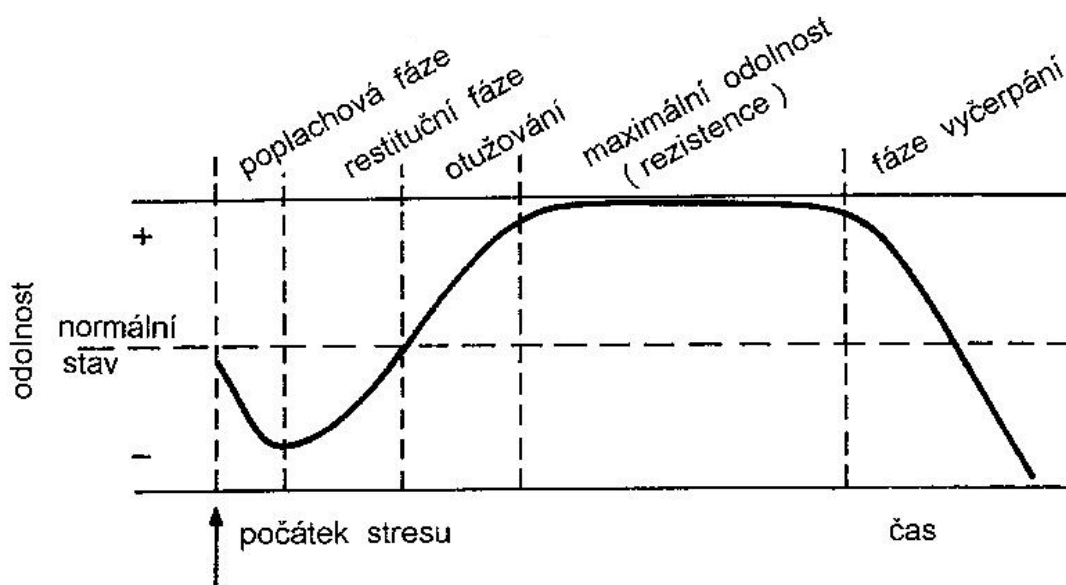
Po proniknutí stresoru k plazmatické membráně buněk a do symplastu dochází ke spuštění tzv. stresové reakce.

Tu dělíme podle průběhu stresové reakce na čtyři fáze:

- I. Poplachová fáze - spouští se bezprostředně po začátku působení stresového faktoru kdy dochází k narušení buněčných struktur a funkcí
- II. Restituční fáze – dochází k mobilisaci kompenzačních mechanismů pokud intenzita působení stresoru nepřekračuje letální úroveň, ale ne vždy má toto zvýšení trvalý charakter
- III. Fáze rezistence - mobilisace kompenzačních mechanismů směřuje ke zvýšení odolnosti rostliny vůči působícím faktorům

IV. Fáze vyčerpání - při dlouhodobém a intenzivním působení stresového faktoru může být vystřídáno dalším poklesem

Obr. 1 Idealizovaný průběh stresové reakce (Procházka a kol., 1998)



Konkrétní průběh stresové reakce rostlin špenátu (*Spinacia oleracea*) na toxické prvky (Zn a Cd) ve vztahu k enzymu glutamát kinasy během vegetace je graficky znázorněn v práci Pavlíková a kol. (2008). Průběh stresové reakce a její konečný výsledek závisí jak na intenzitě a délce působení stresového faktoru na danou rostlinu, tak i na geneticky vázaných předpokladech odpovědi, souhrnně označovaných jako adaptační schopnosti. Zvýšení odolnosti rostlin, která byla získána působením stresoru je nazývána aklimatizací. Může to znamenat změny v metabolismu rostlin jak rychle pomíjivé jako je např. tvorba specifických metabolitů, například fytoalexinů (Kůdela a kol., 1989), tak i změny trvalejší jako jsou změny v tvorbě nových orgánů a v jejich vnitřní struktuře (Procházka a kol., 1998).

Studium stresu u rostlin rostoucích v přírodních ekosystémech je komplikováno tím, že často více stresových faktorů působí současně (např. silné záření, vysoká teplota a nedostatek vody). Interakce mezi nimi mohou podstatně měnit charakter stresové reakce ve srovnání s působením každého faktoru odděleně. Příkladem může být i pěstování rostlin špenátu na čistírenských kalech, kde působí na stresový metabolismus rostliny mnoho stresorů (Pavlíková a kol., 2002b). Působení stresorů bývá také často omezeno pouze na část

rostliny (listy či kořeny), ve které dochází k lokální stresové reakci, ale ta může druhotně způsobit stres i v ostatních částech rostliny.

3.1.1 Mechanismy stresových reakcí

Stresové reakce jsou závislé na aktivaci určitých genů, které mohou být za jistých okolností spuštěny, a to někdy i několika odlišnými mechanismy. Náhlou změnou teploty (teplotním šokem – chladem, mrazem, zvýšením teploty, působením těžkých kovů) můžeme například indukovat tvorbu skupiny proteinů, jejichž zastoupení je shodné nejen u všech druhů rostlin, ale i u mikrobů a živočichů. Hlavní abiotické stresové faktory, jako např. nedostatek vody, extrémní teploty či zasolení, formovaly metabolické procesy živých organismů už od samého začátku kolonizace souší. Dokonalá a trvalá adaptace k široké amplitudě kolísání vnějších faktorů nebyla možná, už jen z důvodů fyzikálně-chemických vlastností základních stavebních kamenů živé hmoty, molekul, makromolekul a membrán. Jediným možným řešením byla dočasná úprava struktur a metabolických cest podle aktuálního stavu vnějších podmínek, a také zajištění rychlé opravy poškozených součástí. Metabolické změny v buňkách při působení i velmi odlišných stresorů mají sice řadu společných znaků, avšak představa jediné obecně platné stresové reakce je přesto nereálná (Gloser, 1998).

Typickým příkladem je regulace tvorby prolinu z kyseliny glutamové. Jde o změnu aktivity enzymu glutamát kinasy prolinem. Zvýšený obsah prolinu zvýší aktivitu glutamát kinasy, když další zvýšení prolinu způsobí allostericou inhibici tohoto enzymu. Prolin je třeba k tvorbě glykoproteinů potřebných k tvorbě fertilního pylu, k tvorbě specifických proteinů pomáhající rostlině překonat chlad, mraz a zasolení půdy. Naopak zvýšená biosyntesa kyseliny glutamové na úkor prolinu je třeba k tvorbě fytochelatinů (Pavlíková a kol., 2007, 2008).

K nejčastějším společným změnám, které vedou ke zvýšení odolnosti proti stresovým faktorům (Gloser, 1998; Kůdela a kol., 1989; Pavlíková a kol., 2004), patří:

- příjem a vnitrobuněčný přenos signálů
- tvorba stresových proteinů (metallothioneiny, metallothioneinu podobné proteiny, patogen – odvozené proteiny) a enzymů (cytochrom P450, antioxidační enzymy)
- tvorba a odstraňování aktivních forem kyslíku (enzymaticky, sekundárními metabolity)

- tvorba „stresových“ fytohormonů (kyseliny abscisové, ethylenu, kyseliny jasmonové, methyl jasmonátu) ale i dalších signálních molekul jako jsou NO a polyaminy
- tvorba nízkomolekulárních specifických látek například fytoalexinů, kyseliny salicylové, glutathionu a jeho oligomerů například fytochelatinů

3.2 Sekundární metabolity

Přírodní látky dělíme na primární a sekundární metabolity. Sekundárním metabolitům například s farmakologickým využitím se obvykle věnovala menší pozornost než primárním metabolitům. V poslední době se ovšem zájem zvýšil o sekundární metabolity, i když nemají primární význam pro přežití samotného organismu. Mají ovšem zásadní význam pro přežití biologického druhu, a tím i pro ekologické vztahy a fylogenetický vývoj organismů v přírodě (Schoonhoven a kol., 1998; Harborne, 1993).

Význam sekundárních metabolitů rostlin je v současné době komplexní, protože se zkoumá z různých hledisek. Jedním z velmi důležitých hledisek je právě chemická ekologie. V ní jde hlavně o chemické interakce mezi rostlinou a organismem, který je na ní závislý. Je to například vztah hosta a hostitele. Hostem může být parazit nebo partner v symbiose. Někdy jde jenom o vztah rostlinného konkurenta například jiného rostlinného druhu, rodu v životním prostředí. Existuje ovšem mnoho typů, a tím i mnoho zkoumaných modelů takovýchto interakcí. Nejznámějšími jsou interakce: rostlina-mikroorganismus (sem patří např. výzkum fytoalexinů) nebo rostlina-rostlina (například výzkum allelopatické účinnosti plevelů na užitkové rostliny), anebo rostlina-býložravec (obvykle jím je herbivorní hmyz).

Vztah rostlina hmyz je vhodným modelem, kde se dá funkce sekundárních metabolitů velmi dobře a bezprostředně studovat (Schoonhoven a kol., 1998; Harborne, 1993). Koevoluce rostlin a hmyzu vytvořila totiž velmi rozsáhlou a složitou škálu specifických chemických interakcí. Je zřejmé, že herbivorní hmyz reaguje na velký počet chemických sloučenin rostlin, které pak mohou indukovat různé změny v chování, jiné zase v růstu, vývoji a rozmnožování. Je to velká rozmanitost biologických účinků, ale ještě větší je rozmanitost makromolekulárních struktur (receptory, enzymy), které tyto účinky způsobují. Z hlediska účinků je lze dělit do několika skupin (Harmatha, 2000; Hoskovec, 2000):

- 1) Regulátory chování – semiochemikalie (s účinkem informačním)
 1. Kairomony – atraktanty, arestanty, stimulanty (výhoda pro příjemce)
 2. Allomony – repelenty, deterenty, antinutrienty (výhoda pro producenta)
 3. Rostlinné složky, například prekurzory feromonů

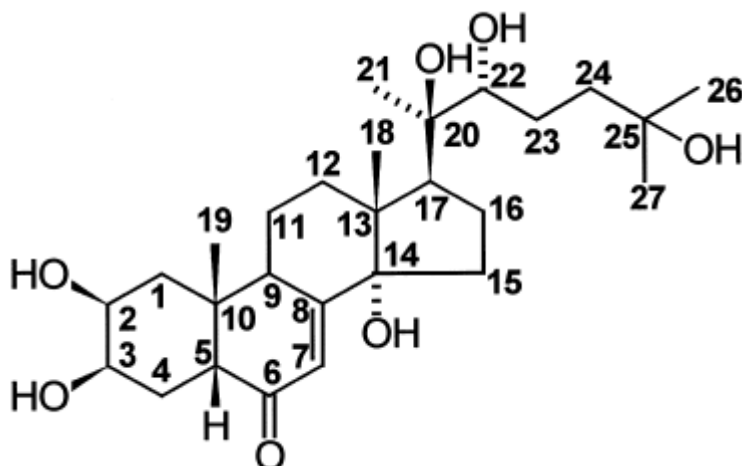
- 2) Regulátory růstu a vývoje (s účinkem fyziologickým / farmakologickým)
 1. Juvenoidy – rostlinné analogy juvenilního hormonu
 2. Fytoekdysteroidy – rostlinné analogy metamorfosního hormonu
 3. Chemosterilanty a antihormonální látky
 4. Přírodní insekticidy a rostlinné toxiny

Z hlediska chemické struktury se v interakci mezi rostlinami a hmyzem uplatňují téměř všechny typy nízkomolekulárních přírodních látek: alifatické látky, terpenoidy, steroidy, alkaloidy, látky fenypropanového metabolismu, peptidy, i mnohé jejich deriváty, nejčastěji estery, glykosidy nebo saponiny (Schoonhoven a kol., 1998; Harborne, 1993; Harmatha, 2000). Tyto deriváty nebo jiné konjugáty se stávají aktivními často až po uvolnění aktivní složky. Tak velká komplexnost struktur a vztahů umožňuje uplatnění celé šíře analytických postupů, izolačních technik, strukturně analytických metod, chemických transformací a syntes analogů pro určení strukturně-aktivitních vztahů, pro objasnění problémů synergismu a pro odlišení vlastních nativních aktivních látek od jejich artefaktů.

3.3 Ekdysteroidy

První ekdysteroid, ekdyson, byl izolován v roce 1954 (Butenandt a Karlson, 1954) z kukly bource morušového. Jeho struktura byla určena v roce 1965 rentgenovou krystalografií (Huber a Hope, 1965). První izolace ekdysteroidů z rostlin byla provedena v roce 1966 z výhonků rostliny nohoplodu (*Podocarpus nakaii*) (Nakanishi a kol., 1966). Od objevu analogu ekdysteroidu v rostlinách se ukázalo, že je vhodné tyto označit jako fytoekdysteroidy, aby se odlišily od těch, které byly izolovány z hmyzu, korýšů (zooekdysteroidy). Toto rozdělení není zcela přesné neboť mnoho ekdysteroidů se nachází zároveň ve zvířatech i v rostlinách (např.: 20-hydroxyekdyson, Obr. 2).

Obr. 2 Struktura 20-hydroxyekdysonu



Nejznámější zástupce - ekdyson je klasický steroidní hormon s obvyklým čtyřkruhovým jádrem (steran) odvozeným od cholesterolu. Pro ekdyson je typická ketoskupina na B kruhu a 5 hydroxylových skupin. Ekdyson je vlastně prohormon pravého svlékacího hormonu 20-hydroxyekdysonu.

Ekdysteroidy jsou steroidní hormony, které řídí svlékání a metamorfosu hmyzu. Bylo objeveno, že tyto steroidy jsou přítomny ve všech stádiích hmyzího vývoje. Regulují mnoho biochemických a fyziologických procesů od naklazení vajíčka přes embryonální a postembryonální vývoj až po dospěléce. Regulují metamorfosu, reprodukci a diapauzu. Vyskytují se ve všech třídách členovců a pravděpodobně i bezobratlých (Koolman, 1989). Analogy ekdysteroidů (fytoekdysteroidy) byly nalezeny také v rostlinách. Jejich funkce v rostlinách je dosud hypotetická a existuje na ni mnoho teorií. Nejčastěji se uvádí, že jde o určitý stupeň ochrany rostliny před fytofágním hmyzem nebo půdními hlísty (Bergamasco a Horn, 1983; Kubo a Hanke, 1986). Z těchto prací vyplývá, že fytoekdysteroidy v rostlinách ať už samotné nebo v interakci se sekundárními metabolity nebo společně s dalšími ochrannými faktory chrání rostlinu před predátory což způsobuje snížení poškození rostliny. Členovcům může způsobit endokrinní poruchy, případně smrt. Byly dělány také pokusy s hád'átky v korýši, ale účinek fytoekdysteroidů byl nižší.

3.3.1 Distribuce ekdysteroidů v rostlinách

Fytoekdysteroidy byly nalezeny ve více než 100 rostlinných druzích (např.: nahosemenných, krytosemenných, jednoletých, víceletých a vytrvalých). Okolo 2 % světové flóry bylo podrobena zkoumání ohledně přítomnosti ekdysteroidů a je překvapivé, že přítomnost ekdysteroidů se jeví jako náhodná. To je například v rozporu s chemotaxonomickým tříděním rostlin.

Hladina fytoekdysteroidů není stejná pro rostliny, které ekdysteroidy obsahují. Jejich množství je různé v různých orgánech rostliny a může se také měnit během ontogeneze rostliny a vlivem podmínek pěstování. Také profil ekdysteroidů se mění orgán od orgánu. Není známo, v které části rostlinné buňky nebo tkáně se ekdysteroidy akumulují. Často se spekuluje o tom, že se jedná o vakuolu. Data o biosyntetické schopnosti různých rostlinných orgánů jsou vzácná, stejně jako informace o kinetice a mechanismu syntézy a distribuce v rostlině. Koncentrace ekdysteroidů jsou vyšší ve tkáních, které jsou důležité pro přežití rostliny. U jednoletých rostlin se vyskytuje vyšší koncentrace například v semenech, které jsou důležité pro přežití do další generace. Jednoletý merlík bílý (*Chenopodium album*) obsahuje vysokou hladinu ekdysteroidu v prašnicích, které chrání vyvíjející se pylová zrna, v semenech a v mladých výhoncích (Dinan, 1992).

3.3.2 Charakteristiky rostlinných ekdysteroidů

Do dnešní doby bylo identifikováno více než 300 různých fytoekdysteroidů (Lafont a kol., 2002). Byla vytvořena databáze ekdysteroidů na internetu, kterou autoři nazvali Ecdybase. Databáze obsahuje jejich struktury a také jejich spektrální a biologická data, která jsou přejata z článků ve vědeckých časopisech. Analogy ekdysteroidů se od sebe liší počtem atomů uhlíků (24C – 29C), počtem, polohou a pozicí hydroxylové a karbonylové skupiny na základním steroidním skeletu. Ekdysteroid může být volný nebo konjugovaný (polární nebo nepolární). Mohou existovat také násobné konjugáty.

Nejběžnějším známým fytoekdysteroidem je 20-hydroxyekdyson (Obr. 2) a polypodin B. Většinou rostliny obsahující fytoekdysteroidy obsahují 1-3 majoritní ekdysteroidy, což tvoří 95% celkového obsahu ekdysteroidů v rostlině. Počet minoritních ekdysteroidů může být velmi široký. V mnoha případech byly izolovány a identifikovány pouze majoritní ekdysteroidy. Parcha saflorová (*Leuzea carthamoides*), která je bohatá na

ekdysteroidy byla intenzivně studována. Bylo v ní identifikováno více než 20 různých ekdysteroidů (Buděšínský a kol., 2008).

Ve skutečnosti vysoký obsah ekdysteroidů v rostlinách je výsledkem jejich postupné akumulace během vegetace, což nevyžaduje tak velkou rychlost biosyntesy ve srovnání se syntesou ve hmyzích prothorakálních žlázách.

Jedním z prekurzorů C27 ekdysteroidů je cholesterol, ale není tomu tak u všech druhů rostlin. Například špenát setý (*Spinacia oleracea*) obsahuje zejména Δ^7 -steroly a lathosterol, které jsou prekurzory ekdysteroidů (Greibenok a Adler, 1993). Acetát a mevalonát na biosyntese fytoesterolů, které jsou pak přeměňovány na C27, C28 a C29 ekdysteroidy (Tomás a kol., 1993; Tabulka 1). Steroly C28 nebo C29 jsou prekurzory odpovídajících C28 nebo C29 z ekdysteroidů (Okuzumi a kol., 2003). Hydroxylované deriváty cholesterolu (25-hydroxycholesterol, 22R-hydroxycholesterol) jsou obsaženy v prvoklíčku rostliny osladiče obecného (*Polypodium vulgare*) a velmi účinně se přeměňují na ekdyson a 20-hydroxyekdyson (Reixach a kol., 1999). Naopak ve zkoumaných rostlinách: *Podocarpus elata* (Joly a kol., 1969), srpice barvířská (*Serratula tinctoria*) a silenka ušnice (*Silene otites*) (Dinan a kol., 2009) bylo zjištěno, že 25-hydroxycholesterol není prekurzorem ekdysteroidů.

Je známo, že ekdysteroidy jsou v rostlinné buňce stabilní molekuly, které mohou velmi pomalu podstoupit přeměnu (Schmelz a kol., 2000). Fytoekdysteroidy se akumulují během života rostliny, ale kvůli jejich možné migraci v rostlině jejich distribuce se může měnit během ontogeneze. Ekdysteroidy jsou tvořeny ve špenátu ve starších částech výhonků, ale jsou transportovány a akumulovány v mladých apikálních výhoncích, kde je však rostlina není schopna syntetisovat (Greibenok a kol., 1991; Grebenok a Adler, 1993). Odstranění apikálních výhonků způsobí ukončení produkce ekdysteroidů ve starší části výhonků (Bakrim a kol., 2008).

Prvoklíček rostliny osladiče obecného (*Polypodium vulgare*) aktivně syntetisuje ekdysteroidy (zejména 20-hydroxyekdyson) do určité koncentrace (Reixach a kol., 1997, 1999). Ponoření prvoklíčku do horké vody (45 °C) po dobu 60 min způsobí teplotní šok a indukuje se tvorba ekdysteroidů *de novo* (Reixach a kol., 1997). Tato metoda byla použita pro zvýšení konverze 25-hydroxycholesterolu na ekdysteroidy (Reixach a kol., 1999).

Hypotéza, že fytoekdysteroidy jsou chemickou ochranou rostlin proti fytofágnímu hmyzu a půdním hád'átkům se objevuje v řadě prací. Logicky se dá očekávat, že jejich produkce bude zvýšena mechanickým poškozením rostliny, nebo poškozena činností hmyzu. Syntesa fytoekdysteroidů je tedy odpovědí rostliny na stres. Ukázalo se to na rostlině špenátu setého (*Spinacia oleracea*), ale pouze v kořenech (Schmelz a kol., 1998, 1999).

Prokázalo se, že jasmonát, signální lipid produkovaný rostlinou při odezvě na hmyzí činnost, byl schopen zvýšit produkci ekdysteroidu (Schmelz a kol., 1998; Tab. 1).

Devarenne a kol., (1995) zjistili, že rostliny kukuřice seté (*Zea mays*) neakumulují detekovatelné množství ekdysteroidů, ačkoliv při použití značeného [14C]mevalonát izolovali ekdyson a konjugáty 20-hydroxyekdysonu, které uvolňovaly volné ekdysteroidy po působení glycosidas.

Tab. 1: Biosyntetické studie vzniku ekdysteroidů v zemědělských rostlinách

Prekurzor	Rostlina	Ekdysteroid	Literatura
Acetát	Špenát setý (<i>Spinacia oleracea</i>)	20-hydroxyekdyson, Polypodin B	Grebenok a Adler, 1993
Mevalonát	Špenát setý (<i>Spinacia oleracea</i>)	20-hydroxyekdyson, Polypodin B	Grebenok a kol., 1994
Lathosterol	Špenát setý (<i>Spinacia oleracea</i>)	20-hydroxyekdyson	Grebenok a Adler, 1993
Cholesterol	Špenát setý (<i>Spinacia oleracea</i>)	20-hydroxyekdyson, Polypodin B	Grebenok a kol., 1994
Cholesterol	Kukuřice setá (<i>Zea mays</i>)	konjugát 20-hydroxyekdysonu	Devarenne a kol., 1995
5 β -cholest-7-en-3,6-dion	Špenát setý (<i>Spinacia oleracea</i>)	20-hydroxyekdyson	Dinan a kol., 2009
2-deoxyekdyson	Špenát setý (<i>Spinacia oleracea</i>)	20-hydroxyekdyson, ekdyson, 2-deoxy- 20 -hydroxyekdyson	Bakrim a kol., 2008
Ecdyson	Špenát setý (<i>Spinacia oleracea</i>)	20-hydroxyekdyson, Polypodin B, konjugát ekdysonu	Grebenok a Adler, 1993 Grebenok a kol., 1994

3.4 Funkce ekdysteroidů u hmyzu

Ekdysteroidy jsou svlékácí hormony členovců, ale byly nalezeny i u dalších bezobratlých, kde však mohou mít i jinou roli. U hmyzu řídí řadu biologických funkcí, které mají vztah ke svlékání embrií, larev a nymf a dále k reprodukci dospělců (Obr. 3). Některé skupiny hmyzu například ploštice (*Heteroptera*), blanokřídli (*Hymenoptera*) a dvoukřídli (*Diptera*) mají další homolog ekdysonu 24-metyl-20-hydroxyekdyson neboli makisteron A. U embryí se vyskytuje 2-deoxyekdyson a 26-hydroxyekdyson. Mimo to existují desítky dalších zoo a fytoekdysteroidů, ale ne všechny jsou však aktivní.

Fytoekdysteroidy slouží rostlinám jako ochrana proti herbivornímu hmyzu, jako toxiny nebo antifeedanty. Hmyz je však zpravidla může poměrně snadno měnit na neúčinné formy.

a) Syntesa

Ekdysteroidy jsou primárně syntetisovány v prothorakálních žlázách, odkud jsou uvolňovány exocytózou do hemolymfy. Celý proces je řízen prostřednictvím prothoracicotropního hormonu z mozku. Kromě prothorakálních žláz se ekdysteroidy syntetizují také v jiných orgánech. U imág, kde prothorakální žlázy chybí, jsou to ovária a testes. Zdá se, že zdrojem mohou být v určitých fázích vývoje i části epidermu. Ekdysteroidy se transportují buď navázány na transportní bílkovinu nebo i volně, protože jsou značně rozpustné ve vodných roztocích. Ekdyson se mění na 20-hydroxyekdyson ve tkáních například v tukovém tělese, Malpighických trubicích a střevě (Oeh a kol., 1998).

Ekdysteroidy se syntetisují z cholesterolu. Hmyz neumí cholesterol vyrobit a musí ho proto přijímat v potravě přímo (zoofágové) nebo si ho musí připravit dealkylací z rostlinných sterolů: sitosterolu, stigmasterolu nebo kamposterolu (fytofágové). Hmyz, který není této reakce schopen, musí produkovat makisteron A jako hlavní svlékácí hormon. U motýlů bylo zjištěno, že prothorakální žlázy produkují směs 2 a 3-dehydroekdysonu, která je v hemolymfě rychle redukována na ekdyson.

b) Mechanismus působení ekdysteroidů

Ekdysteroidy působí jako steroidní hormony tj. aktivují syntesu nových enzymů expresí genů tak, že vstupují do cílových buněk a dostávají se k jádru, kde se váží na příslušný receptor. Tento komplex pak interaguje s DNA a indukuje RNA transkripci. Ekdysteroidové receptory jsou proteiny o molekulové hmotnosti asi 100kDa a vyskytují se v

buňkách v extrémně nízké koncentraci (asi 1000 molekul/buňku). U octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*) byl takový receptor charakterisován včetně svého genu. Dobře popsaným příkladem regulace genové exprese řízené ekdysteroidy je melanizace hmyzí kutikuly u larev lišaje tabákového (*Manduca sexta*). Ekdysteroidy zde regulují expresi genu pro dihydroxyfenylalanindekarboxylasu, což vede k syntese tohoto enzymu a spuštění kaskády syntetických reakcí na jejímž konci je melanin (Oeh a kol., 1998).

c) Řízení hladiny ekdysteroidů

Syntesa ekdysteroidů je spouštěna na základě stimulu z mozku prostřednictvím prothoracikotropního hormonu. U některých druhů hmyzu byl popsán i inhibiční hormon prothoracikostatin (Oeh a kol., 1998). Koncentrace ekdysteroidů v hemolymfě je kontrolována kombinací biosyntesy, odbourávání (katabolismu) a exkrece. Poměr všech tří procesů je koordinován a kolísá během vývoje. V době zvýšené syntesy jsou metabolismus a exkrece sníženy a naopak (Oeh a kol., 1998).

d) Metabolismus ekdysteroidů

Mnoho druhů hmyzu může metabolisovat ekdysteroidy v různých tkáních, nejčastěji v tukovém tělese, Malpighických trubicích, střevě či ováriích. Existuje zde tkáňově i časově specifická heterogenita. Vzhledem k relativní složitosti molekuly ekdysteroidů existuje řada specifických reakcí, kterým tyto látky podléhají (hydroxylace, oxidace, redukce, štěpení postranního řetězce, tvorba konjugátů a hydrolysa konjugátů). Dobře známá je tvorba konjugátů, které se nachází především ve vajíčkách, kde jsou v této formě ekdysteroidy často ukládány (aby mohly být později zase uvolňovány). Vysoká aktivita příslušných ekdysteroidy odbourávajících enzymů ve střevě je důležitá pro fytofágy, kteří se tak chrání před fytoekdysteroidy (Oeh a kol., 1998).

e) Funkce fytoekdysteroidů

Ekdysteroidy patří spolu s juvenilními hormony k hlavním metamorfosním hormonům. V zásadě mají několik základních funkcí (řízení svlékání, růstu, metamorfosy a rozmnožování) a několik funkcí odvozených:

1. Ovlivňující svlékání a metamorfosu

Svlékání je řízeno ekdysteroidy během embryogeneze i během larválního vývoje. V tomto období dochází k velkému kolísání v titru ekdysteroidů v hemolymfě, což je časově korelováno se svlékacím procesem. U holometabolismu i hemimetabolismu (dokonalé i nedokonalé metamorfosy) dochází k prudkému nárůstu titru ekdysteroidů na začátku každého larválního svlékání. Obecně platí, že titr ekdysteroidů roste před apolysou staré kutikuly,

dosahuje maxima v době nebo krátce po apolyse a pak padá dolů na nízkou až nedetekovatelnou úroveň po ekdysi. Hladina titru ekdysteroidů podléhá také circadiánním změnám, které souvisí s circadiánním uvolňováním prothoracikotropního hormonu (Oeh a kol., 1998). U hemimetabolismu je larválně-imaginální přeměna (metamorfosa) indukována uvolněním jedné velké dávky ekdysteroidů. Naopak u většiny motýlů (*Lepidoptera*) se ekdysteroidy vylévají koncem posledního instaru ve dvou dávkách (u některých zástupců je ale první dávka jen naznačena nebo chybí – bourec-*Bombyx*, lišaj-*Manduca*). První, menší dávka obsahuje jak ekdyson, tak 20-hydroxyekdyson (v poměru 1:1). Její hlavní funkcí je reprogramace larválního vývoje na kuklový vývoj. Larva mění své chování přestává žrát a hledá si vhodné místo ke kuklení. Druhá dávka je mnohem větší, poměr ekdysonu a 20-hydroxyekdysonu je asi 1:5, a spouští larválně-pupální svlékání. Je pravděpodobně analogická dávce ekdysteroidů, která se uvolňuje mezi larválními instary. Po zakuklení dochází k dalšímu výlevu velké dávky ekdysteroidů, což souvisí s imaginálním vývojem. Jestliže kukla prodělává diapauzu, tak je nárůst titru ekdysteroidů v hemolymfě pozdržen až do doby než diapauza odezní (Oeh a kol., 1998).

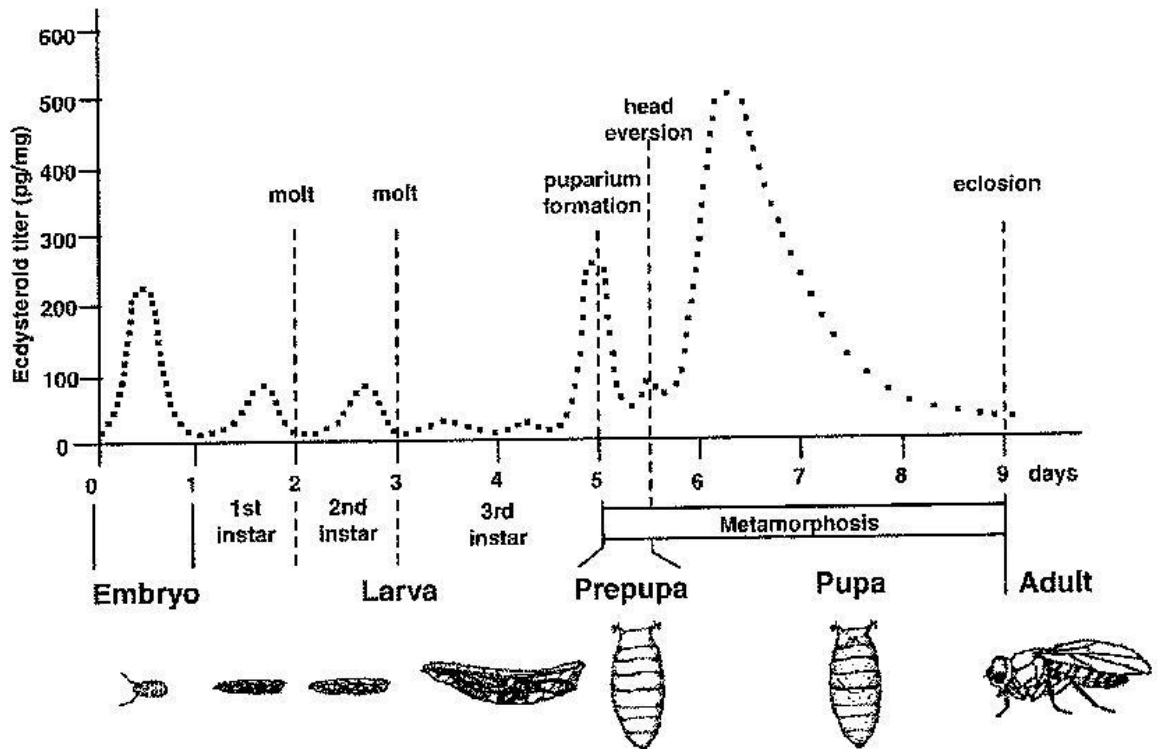
2. Ovlivňující reprodukci

Ekdysteroidy mají úzký vztah k rozmnožování. U mnoha druhů jsou produkovány ováriemi a odtud ukládány jako konjugáty do zrajících vajíček. Během embryogeneze se z konjugátu ekdysteroidy uvolňují a ovlivňují embryonální svlékání. 20-Hydroxyekdyson zvyšuje u některých druhů především u dvoukřídlech (*Diptera*) také syntesu vitellogeninu v tukovém tělese (hlavní role zde však připadá juvenilnímu hormonu) a jeho sekreci do hemolymfy. Ovariální ekdysteroidy pozitivně ovlivňují také zrání oocyty stimulací meiózy, jejich uvolňování z germária a ovipozici. Zdá se, že vliv ekdysteroidů na činnost pohlavního ústrojí samice je druhově specifický, protože zde existuje mnoho kontroverzních údajů, z nichž některé se do značné míry vylučují. O vlivu ekdysteroidů na samčí pohlavní orgány existuje mnohem méně údajů - u samců je obecně nižší hladina ekdysteroidů než u samic, i když existují výjimky. Ekdysteroidy hrají u samců především úlohu ve spermatogenezi. Ovlivňují buňky testes i diferenciaci spermií. Podílí se také na tvorbě spermatoforu. Po kopulaci dochází zpravidla ke zvýšení hladiny ekdysteroidů, což je významné pro tvorbu nových spermií (Oeh a kol., 1998).

3. Ovlivňující metabolické a fyziologické procesy

Ekdysteroidy ovlivňují také metabolické procesy a diapauzu, stimuluji proteosyntesu atd., většinou jde o procesy, které přímo či nepřímo souvisí s výše uvedenými funkcemi.

Obr. 3 Úloha ekdysteroidu ve vývoji hmyzu (Thummel, 2001)



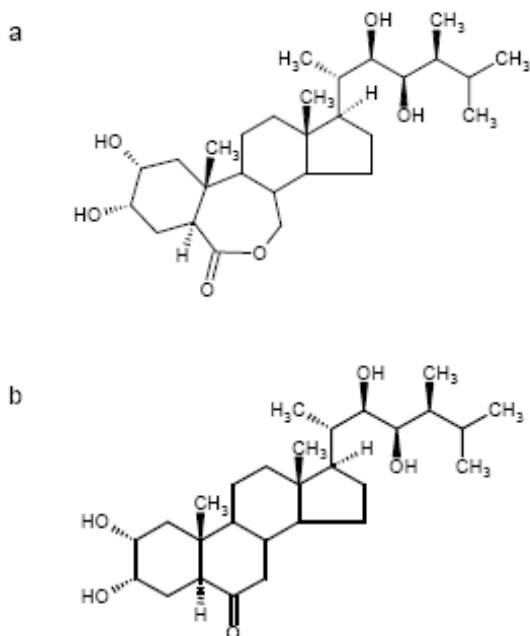
3.5 Spojení fytoekdysteroidů s metabolismem rostliny, především s významnými rostlinnými látkami (brassinosteroidy a RuBisCO)

Mezi steroidní látky s povahou hormonů, které byly v rostlinách nalezeny, patří brassinosteroidy a ekdysteroidy. Jejich základní strukturu tvoří podobně jako je tomu u živočišných hormonů – steranový skelet. V rostlinách se vyskytují buď volné, nebo vázané. Zatímco volnou formu představují různé steroly (steroidy s 3β -hydroxylovou skupinou a 17β -alifatickým postranním řetězcem) a oxysteroly (steroly, jež mají atomem kyslíku modifikován A- či B-kruh steranového skeletu, příp. i postranní řetězec), vázaná forma je zastoupena

různými typy konjugátů, zvláště estery sterolů s nasycenými i nenasycenými kyselinami, méně často pak glykosidy (Kamlar a kol., 2010).

Brassinosteroidy (Obr. 4) hrají v životě rostliny nezastupitelnou roli. Ovlivňují tvorbu biomasy, růst a diferenciaci orgánů, regulují počet a velikost semen i plodů a v neposlední řadě oddalují senescenci, tedy stárnutí rostliny. Kromě toho se též podílejí na přizpůsobivosti rostliny nepříznivým životním podmínkám, jimiž jsou např. nedostatek živin či vody, přítomnost herbicidů, nadbytek solí, chlad, popř. napadení rostliny škůdce. Bylo zjištěno, že brassinosteroidy působí podobně jako peptidové hormony u živočichů, tj. prostřednictvím přenosu signálu přes receptor lokalizovaný na buněčné membráně. Někteří autoři vědeckých prací předpokládají nutnost vazby samotného steroidu na vazebnou bílkovinu a následnou interakci vzniklého aduktu s membránovým receptorem, jiní (Kamlar a kol., 2010) zase usuzují na přímou vazbu steroidu na membránový receptor.

Obr. 4 a) Brassinolid, první objevený brassinosteroid, b) kastasteron, biosyntetický prekurzor ekdyzonu a brassinolidu (Kamlar a kol., 2010)

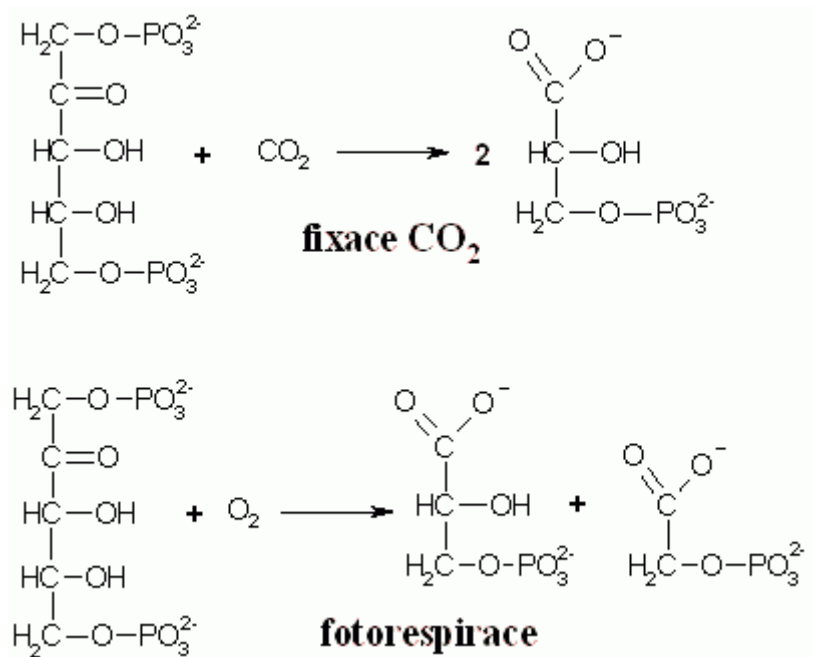


Mechanismus působení brassinosteroidů je založen na přenosu signálu přes receptor lokalizovaný na buněčné membráně. K tomu může teoreticky docházet buď přímou vazbou

steroidu na receptor, nebo nepřímo navázáním steroidu na vazebnou bílkovinu a následnou interakcí vzniklého aduktu s receptorem (Kamlar a kol., 2010). Výsledky z poslední doby (Kamlar a kol., 2010) sice ukazují spíše na platnost první z teorií, nicméně ani druhá možnost není ještě zcela vyloučena.

RuBisCO (ribulosa-1,6-bisfosfát karboxylasa), enzym ze třídy lyas, který v temné fázi fotosyntézy katalyzuje připojení CO₂ k molekule ribulosa-1,5-bisfosfátu a následné rozštěpení vzniklého meziprojektu na dvě molekuly 3-fosfoglycerátu. Kromě této karboxylační reakce (fixace CO₂) katalyzuje oxygenační reakci, při níž se na molekulu stejného akceptoru váže molekulový kyslík a kromě 3-fosfoglycerátu vzniká fosfoglykolát. Z něho se sice v rostlinách syntetisuje serin a glycin, většina se však katabolicky odbourává.

Obr. 5 Fixace CO₂ a fotorespirace katalyzovaná ribulosa-1,5-bisfosfát karboxylasa/oxygenasou (RuBisCO)



Enzym ribulosa-1,5-bisfosfát karboxylasa/oxygenasa (RuBisCO) je nejhojnějším proteinem zemské biosféry. Nachází se ve stromách chloroplastů ve velké koncentraci a tvoří

až 50 % rozpustných listových bílkovin. Je nejdůležitějším fotosyntetickým enzymem, protože katalyzuje první reakci Calvin-Bensonova cyklu, tj. karboxylaci, při které je CO₂ fixován v organických molekulách. Při karboxylaci dochází k přeměně ribulosa-1,5-bisfosfátu na 3-fosfoglycerát, jeho redukci na glycerinaldehyd-3-fosfát a ten pak slouží jako výchozí látka pro tvorbu sacharosy, škrobu a dalších sloučenin.

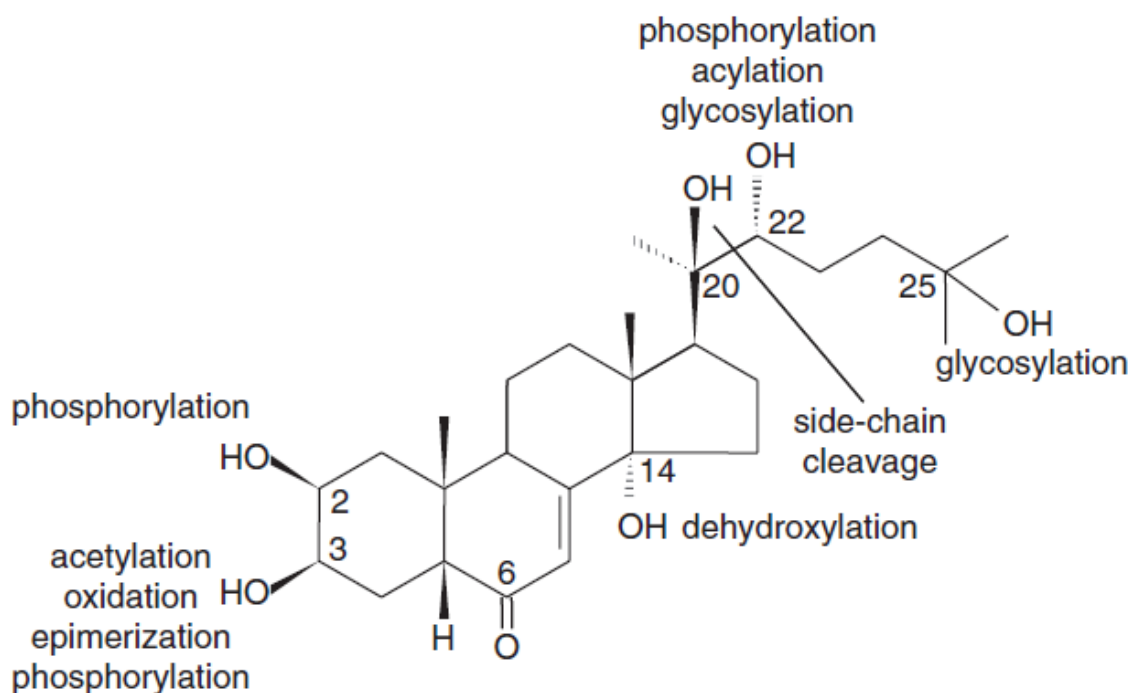
Změny v aktivitě i v obsahu enzymu RuBisCO jsou používány jako citlivý diagnostický parametr při zjišťování negativních efektů biotických i abiotických faktorů životního prostředí. Hlavním faktorem prostředí, které významně ovlivňuje růst a vývoj rostlin, je ozáření a koncentrace CO₂ v atmosféře. Působení zvýšené CO₂ obecně vede jak ke zvýšení kapacity fotosyntesy (pozitivní aklimace) spojené se zvýšeným využitím absorbované energie ve fotochemických reakcích, tak i k poklesu kapacity fotosyntesy (aklimační deprese). Aktivita enzymu RuBisCO může být stanovena *in vivo* použitím měření výměny plynů nebo *in vitro* spektrofotometrickými metodami. Obsah enzymu RuBisCO může být stanovován separačními metodami, jako jsou gelová a kapilární elektroforéza a radioimunoprecipitační metoda (Kalina a kol., 2006).

Zatímco u živočichů je struktura ekdysonového receptoru popsána poměrně podrobně, u rostlin je tomu naopak. Lze sice usuzovat na jistou konzervativnost a tedy možnou podobnost s výše uvedenou strukturou, není ovšem vyloučeno, že by mechanismus působení ekdysteroidů u rostlin nemohl být založen na zcela jiném principu. Stejně jako v případě živočišných ekdysteroid receptorů, kdy je např. DNA-vazebná doména receptor pro retinoid X, resp. ultrašterbinu proteinů, vysoce konzervovaná, zatímco hormon-vazebná doména vykazuje výrazné evoluční rozdíly (Kamlar a kol., 2010), tak i u rostlin na různých vývojových stupních se mohou receptory, resp. přímo jejich strukturní prvky, vzájemně odlišovat. Uhlík a kol. (2008) dále poukazují na možnost pozitivní regulace enzymové aktivity RuBisCO pomocí některých druhů ekdysteroidních látek. Jak přesně k ovlivnění dochází a případně na jaké místo na jeho molekule se tyto látky mohou vázat, je předmětem dalších experimentů. Že má smysl se tímto problémem vůbec zabývat, je zřejmé již ze samotné podstaty temnostní fáze fotosyntesy, tj. spotřeby CO₂ a jeho využití k tvorbě sacharidů, mastných kyselin či aminokyselin, tedy základních složek rostlinného organismu. Jakékoliv výraznější zvýšení aktivity výše zmiňovaného enzymu či zvýšení jeho obsahu v rostlinách tak může vést jednak ke snižování přebytků CO₂ z ovzduší a jednak ke zvýšení tvorby biomasy pro energetické či potravinové účely. Problematika vazebných bílkovin fytoekdysteroidů tak díky možné spojitosti s fotosyntesou přechází z úrovně ryze teoretické na úroveň praktickou (Kamlar a kol., 2010).

3.6 Metabolismus ekdysteroidů u hmyzu

Ekdysteroidy, které byly přijaty hmyzem v potravě (zejména 20-hydroxyekdyson) měly škodlivý účinek na vývoj a přežití velkého počtu hmyzích druhů jako například bourec morušový (*Bombyx mori*) (Kubo a kol., 1983), makadlovka bavlníková (*Pectinophora gossypiella*) (Kubo a kol., 1981, 1983), blýskavka kukuřičná (*Spodoptera frugiperda*) (Kubo a kol., 1981), molík česnekový (*Acrolepiopsis assectella*) (Arnault a Sláma, 1986; Harmatha, 2000), lišaj svlačcový (*Agrius convolvulus*) (Tanaka a Naya, 1995), způsobily inhibici růstu přes početnost larválních instarů smrt bez svlékání a smrt spojenou s částečným svlékáním. Určité hmyzí druhy jako černopáska (*Heliothis virescens*), černopáska bavlníková (*Heliothis armigera*), saranče stěhovavé (*Locusta migratoria*), lišaj tabákový (*Manduca sexta*), blýskavka (*Spodoptera littoralis*), můra kapustová (*Lacanobia olereaceae*), lišaj smrtihlav (*Acherontia atropos*) (Dinan, 1998) jsou výrazně tolerantní k ekdysteroidům v potravě. Nevykazují škodlivé účinky při dávce 400 ppm 20-hydroxyekdysonu nebo vyšší, ačkoliv larva blýskavky (*Spodoptera littoralis*) je ovlivněna 1000 ppm 20-hydroxyekdysonu (Ufimtsev a kol., 2006). Některé z druhů černopáska (*Heliothis virescens*), černopáska bavlníková (*Heliothis armigera*), blýskavka (*Spodoptera littoralis*), můra kapustová (*Lacanobia olereaceae*) a zavíječ kukuřičný (*Ostrinia nubilalis*) (Rharrabe a kol., 2007) detoxifikují ekdysteroid konjugací s mastnými kyselinami a tím zablokují C-22 hydroxylovou skupinu, která je důležitá pro biologickou aktivitu ekdysteroidů (Dinan a Horrmann, 2005; Obr. 6). Takový detoxifikační mechanismus je energeticky značně náročný. V případě, že hmyz má dostatečné množství jídla může přežít, v případě nedostatku může dojít k poškození vývoje. Dalším detoxifikačním mechanismem je například tvorba 22-glukosidů, 2,22-fosfátů, 3-acetátů, 3-oxoderivátů nebo rozštěpení postranního řetězce (Rharrabe a kol., 2007). Potravou přijatý 20-hydroxyekdyson může být také hmyzem nezmetabolisovaný vyloučen, například lišaj smrtihlav (*Acherontia atropos*) (Blackford a Dinan, 1997b). Další hmyzí druhy jsou částečně tolerantní k ekdysteroidům v potravě. Jsou schopny se vyrovnat s nízkou koncentrací například babočka bodláková (*Cynthia carduy*), přástevník starčkový (*Thyria jacobaeae*) (Blackford a Dinan, 1997a), zatímco vyšší dávky jsou toxické. Jiné druhy jsou extrémně citlivé k ekdysteroidům v potravě takže rychle podléhají velmi nízkým koncentracím například babočka kopřivová (*Aglais urticae*) nebo jsou odrazeny od požití potravy, která obsahuje ekdysteroid a zemřou hlady, například babočka paví oko (*Inachis io*) (Blackford a Dinan, 1997a). Vysoce polyfágní druhy jsou k ekdysteroidu tolerantní, zatímco olyfágní druhy jsou semitolerantní a monofágní druhy jsou na ekdysteroid citlivé (Dinan a kol., 2009).

Obr. 6 Schopnost hmyzu detoxifikovat fytoekdysteroidy přijaté potravou (Dinan a kol., 2009)



3.6.1 Interakce mezi rostlinou a patogenem nebo škůdcem a reakce rostliny na mechanické poškození

Interakce mezi rostlinou a patogenem mohou vést k infekci. Po napadení rostlinné buňky viry, bakteriemi, houbami nebo hmyzem dochází k elicitaci lokálních odpovědí kolem infikované buňky. Dochází ke změně stavby buněčné stěny a tím k následné inhibici penetrace patogenu. Poté dochází k syntese celé řady látek *de novo* a k expresi vybraných obranných genů, které mají za úkol znesnadnit pronikání patogenu do buňky a jeho následné množení. Na základě lokálních odpovědí pak nastávají změny v expresi genů v neinfikovaných částech rostliny a dochází k syntese celé řady sekundárních metabolitů, mezi něž patří např. fytoalexiny (Heil a Bostock, 2002) a ekdysteroidy (Heil a Bostock, 2002). Hlavní signální molekulou související s obranou reakcí proti patogenům je kyselina salicylová. Při mechanickém poškození rostliny např. vlivem herbivorního hmyzu se rovněž spouští obranné mechanismy vedoucí k expresi obranných genů, zde je však ale hlavní signální molekulou kyselina jasmonová (Obr. 7; Gloser, 1998; Heil a Bostock, 2002).

Obr. 7 Přenos signálu pomocí jasmonové kyseliny (Gloser, 1998)

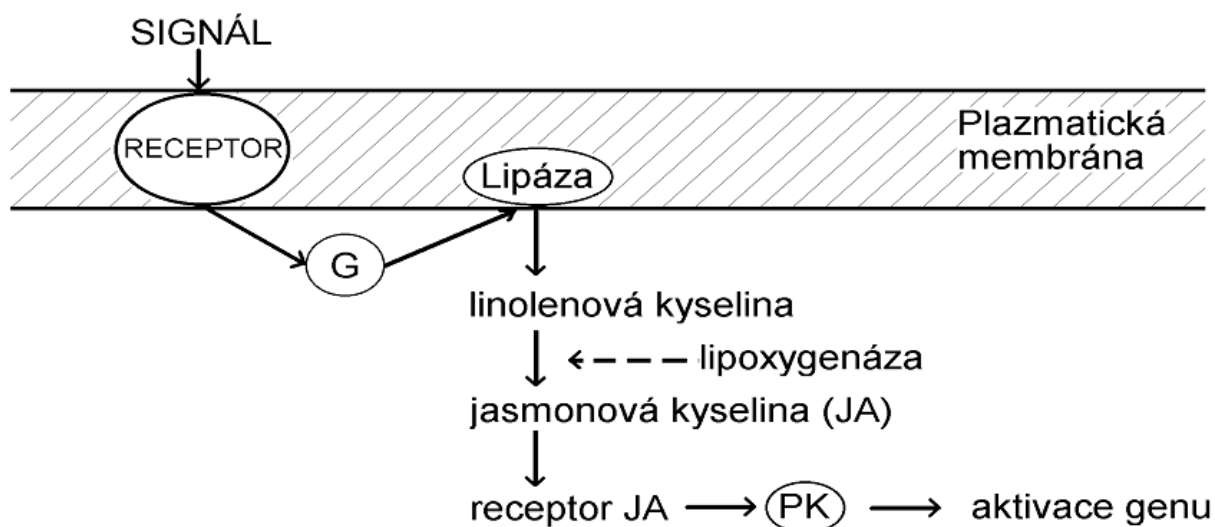


Schéma přenosu signálu pomocí jasmonové kyseliny, která se tvoří z linolenové kyseliny (dehydrací a β -oxidací) za účasti enzymu lipoxygenasy. Linolenová kyselina je uvolňována membránově vázanou lipázou po její aktivaci signálem přeneseným z receptoru. Tato cesta, běžná při poranění listu herbivory i některými patogeny, vede zejména k tvorbě inhibitorů proteáz, které působí herbivorům poruchy trávení. (G = G-protein, PK = proteinkinasa).

Obranná reakce začíná rozpoznáním cizorodé látky, elicitoru, pomocí specifických receptorů vytvořených během evoluce. Receptor je poté spojen se signální dráhou kyseliny jasmonové, kyseliny salicylové nebo ethyleny. Tyto látky následně spouští expresi obranných genů spojenou se syntézou proteinů, fytoalexinů a jiných sekundárních metabolitů. Velmi často rovněž dochází k tvorbě aktivních forem kyslíku, které mají za následek nekrózu napadené části rostliny, podobně jako fytoalexiny.

Zvýšená tvorba ekdysteroidů byla indukována také kyselinou jasmonovou jak uvádí ve své práci Schmelz a kol. (1998). To je spojuje s fytoalexiny. Na rozdíl od ekdysteroidů se ale fytoalexiny v rostlině před napadením nevyskytují.

Podle předchozích prací Zelený a kol. (1997) evropské plantáže parchy saflorové (*Leuzea carthamoides*) byly málo zasaženy hmyzími škůdci. Opletal a kol. (1993) popsal *Phyllobius maculicornis*, jehož larva požírá kořeny a dospělec požírá výhonky této rostliny. Rostliny s vysokým obsahem ekdysteroidu jsou chráněny před extenzivním útokem fytofágů Zelený a kol. (1997). Výsledky, ale ukázaly, že zvýšený obsah ekdysteroidů neomezil množství hmyzu na *Leuzea carthamoides*.

Byly testovány různé druhy hmyzu (74 herbivorní a 52 karnivorní) na parše saflorové (*Leuzea carthamoides*). Na některé druhy hmyzu rostlina *Leuzea carthamoides* vykazovala určitou resistenci. Vysoký obsah 20-hydroxyekdysonu nezpůsobuje universální resistenci rostliny proti fytofágnímu hmyzu. Nejvíce rezistentní herbivorní organismy, které mohou dokončit svůj životní cyklus na této rostlině, patří do skupiny, na kterou je účinek ekdysteroidních hormonů neznámý. Ekonomicky důležitá a fyziologicky senzitivní skupina hmyzu na ekdysteroidy, endopterygotní hmyz je reprezentován poněkud malým množstvím druhů s malou četností. Většina druhů evropského hmyzu, která kolonizuje na sibiřských rostlinách jsou polyfágní druhy, které obývají různé druhy hostitelských rostlin (Zelený a kol., 1997).

Fyziologické podmínky spojené s odolností hmyzu k exogenním ekdysteroidům jsou dosud neznámé. Na rozdíl od analogů juvenilního hormonu, který může vstupovat do hmyzího organismu kutikulou, ekdysteroidy mohou vstupovat pouze orální cestou s potravou. Je nezbytné si uvědomit, že endogenní účinek ekdysonu je přísně limitován periodami hmyzu, ve kterých hmyz potravu nepřijímá.

3.6.2 Význam ekdysteroidů pro lidský organizmus

Kořen parchy saflorové (*Leuzea carthamoides*; Obr. 8) obsahuje především ekdysteroidy, flavonoidy a polyacetyleny. Ekdysteroidy jsou hlavní účinnou látkou: zvyšují nespecifickou odolnost organismu, mají adaptogenní aktivitu (působí „proti stresu“) (Lafont a kol., 2003), při jejich používání je organizmus regenerován daleko rychleji, tyto látky působí stimulačně na centrální nervový systém. Zkracují dobu spánku po uklidňujících prostředcích, zlepšují metabolismus cukrů, tuků a cholesterolu, zvyšují ukládání bílkovin do příčně pruhovaného svalu (tento „anabolický„ účinek je s úspěchem využíván u sportovců, kteří se věnují jak silovým, tak vytrvalostním (Lafont a kol., 2003) sportům; je však nutno říci, že tento účinek není škodlivý jako v případě zbytečného používání anabolických hormonů). Ekdysteroidy mají také ochranný vliv na játra a působí ochranně i na srdce a cévy (Lafont a kol., 2003). Flavonoidy biologický účinek ekdysteroidů doplňují: podílejí se na snížení hladiny cholesterolu a mají ochranný účinek na cévní stěnu. Polyacetyleny v rostlinách jsou charakterizovány často jako fytoalexiny a proto lze předpokládat, že budou mít antimikrobiální účinek.

Obr. 8 Parcha saflorová (*Leuzea carthamoides*)



3.6.3 Výskyt ekdysteroidů v zemědělských plodinách

Byl proveden rozsáhlý průzkum ekdysteroidů v zemědělských plodinách včetně zeleniny a ovoce a bylo zjištěno, že pouze špenát obsahuje biologicky aktivní formu ekdysteroidů (20-hydroxyekdyson), kukuřice obsahuje neaktivní formu (20-hydroxyekdysonfosfát).

Je známé, že špenát syntetisuje a akumuluje ekdysteroidy, přednostně 20-hydroxyekdyson, v apikálních výhoncích a stoncích (Grebek a Adler, 1991). Byla popsána rychlá indukce 20-hydroxyekdysonu, která byla vyvolána poraněním a následnou aplikací analogů jasmonové kyseliny (Schmelz a kol., 1998). Kořeny napadené herbivorem lalokonosec rýhovaný (*Otiorhynchus sulcatus*) stimuluje tvorbu 20-hydroxyekdysonu (Schmelz a kol., 1999). Úloha signálu jasmonové kyseliny byla provedena přes analogy salicylové kyseliny, potenciální inhibitory enzymu biosyntézy jasmonové kyseliny (allene oxide synthasy; Pan a kol., 1988), a to inhibovalo produkci 20-hydroxyekdysonu.

U špenátu (Obr. 9) byla potvrzena syntéza polyfosfátů ekdysteroidů (Grebek a kol., 1994), které však mají negativní odezvu na regulující látky endogenní syntézy ekdysteroidů (Horn a Bergamasco, 1985). Nízká hladina polyfosforylovaných ekdysteroidů pomalu reguluje biosyntézu ekdysteroidů. Některé rostliny, které přednostně tvoří polyfosforylované

ekdysteroidy mohou biosyntetisovat jen malé množství těchto produktů. Takové rostliny také biosyntetisují jen malé množství nekonjugovaných ekdysteroidů. Kukuřice setá (*Zea mays*; Obr. 10) syntetisuje 20-hydroxyekdysonpolyfosfát a ekdysonpolyfosfát v nanogramovém množství na gram čerstvé hmoty rostliny. Nekonjugované ekdysteroidy nebyly v kukuřici nalezeny.

Endogenní biosyntéza ekdysteroidů ve formě polyfosfátů byla prokázána v kukuřici seté (*Zea mays*) inkubací [14C] mevalonové kyseliny. Byl izolován radioaktivně značený ekdyson a 20-hydroxyekdyson (Devarenne a kol., 1995). Vysoká specifická aktivita pozorovaná v lathosterolu v kukuřici snižuje s časem rychlost přeměny a to tak, že lathosterol je metabolisován na ekdysteroidpolyfosfáty nebo se jeho množství snižuje přítomností nově vznikajících látek. Lathosterol je přeměněn na cholesterol a specifická aktivita vznikajícího cholesterolu se zvyšuje s časem. [14C]Cholesterol je znám, že přechází na ekdysteroidy ve špenátu (Grebek a Adler, 1993). V kukuřici [14C]cholesterol je metabolizován na 20-hydroxyekdysonpolyfosfát. Lathosterol je upřednostňovaný substrát v biosyntese ekdysteroidů v kukuřici i ve špenátu. Radioaktivně značený cholesterol je méně vhodným substrátem, rychlost jeho přeměny na ekdysteroidpolyfosfáty byla menší v obou rostlinách.

Obr. 9 Špenát setý (*Spinacia oleracea*)



Obr. 10 Kukuřice setá (*Zea mays*)



4 Závěr

Tato rešerše ukazuje, že metabolismus ekdysteroidů u hmyzu je velmi složitě regulován. Na základě studia uvedených prací je zřejmé, že se liší metabolismus endozooekdysteroidů od metabolismu exofytoekdysteroidů ačkoliv některé detoxifikační metabolity jsou totožné. Hmyz potřebuje endozooekdysteroidy v určitém časovém úseku svého života a proto hmyz musí mít detoxifikační a aktivační cesty, které vedou k efektivní přeměně aktivních forem zooekdysteroidů na neaktivní a naopak. Princip těchto metabolických přeměn musí být energeticky nenáročný, aby jedinec či druh dokázal přežít během evoluce. Proto se jeví z evolučního pohledu jako velmi výhodné pro hmyz konzumovat rostlinnou stravu obsahující fytoekdysteroidy. Jejich průnik přes stěnu střevní do organismu není tak markantní, protože ekdysteroidy jsou velmi polární sloučeniny a do těla hmyzu pronikají jejich nepolární estery s mastnými kyselinami což jsou detoxifikované deriváty aktivních ekdysteroidů. Naopak pokud vývojové stádium hmyzu potřebuje ekdysteroidy tak je výhodnější je získat z potravy, než je složitou cestou syntetisovat z fytoosterolů jako je například β -sitosterol nebo kampesterol přes cholesterol na aktivní 20-hydroxyekdyson.

Na základě těchto poznatků, které zde uvádím je jasné, proč autoři ve svých pracech opomíjejí práci Zelený a kol. (1997), protože z této práce jednoznačně vyplývá, že široké spektrum herbivorního hmyzu může žít na rostlině *Leuzea carthamoides*. Tato práce je opomíjena na základě těchto skutečností. Rostliny *Leuzea carthamoides* byly pěstovány v polních podmínkách a proto hmyz mohl kolonizovat tuto polní kulturu postupně, protože *Leuzea carthamoides* je víceletá rostlina. Pro rostlinu *Leuzea carthamoides* je typické, že obsahuje vysoké množství tohoto aktivního hmyzího hormonu. Jeho hladina je daleko vyšší, než je hladina obsažená ve špenátu a to i po napadení hmyzem, kdy dochází k několikanásobnému zvýšení hladiny 20-hydroxyekdysonu ve špenátu. Jestliže v polních podmínkách je široké spektrum hmyzu schopno adaptability na rostliny obsahující vysoké procento 20-hydroxyekdysonu, tedy aktivního hmyzího svlékacího hormonu, pak musíme jednoznačně kriticky přistoupit k pracem, které v laboratorních pokusech dokazují využitelnost 20-hydroxyekdysonu v zemědělství jako potencionálního pesticidu 3. generace. Řada autorů při diskusi o zvyšování 20-hydroxyekdysonu v rostlinách špenátu, které jsou napadeny hmyzem opomíjí skutečnost, že hladina 20-hydroxyekdysonu se liší v různých rostlinných částech a navíc v těchto částech se hladina ekdysteroidů mění v závislosti na vegetační části rostliny. To znamená, že primární význam ekdysteroidů v rostlinné buňce musíme hledat mezi fyziologickými faktory, které předurčují přežití druhu, než v obranných

faktorech rostliny, které předurčují přežití jedince. Evoluční vývoj preferuje přežití druhu před přežitím jedince. Z tohoto pohledu je velmi zajímavá práce Uhlík a kol. (2008).

Zemědělské plodiny (kromě špenátu) neobsahují aktivní formy ekdysteroidů. Ze zemědělských plodin obsahuje aktivní formu ekdysteroidu pouze špenát a u kukuřice bylo zjištěno, že obsahuje neaktivní ekdysteroidfosfáty. Lze usuzovat, že ekdysteroidy v rostlinách neplní obranou funkci proti hmyzu.

Pokud přijmeme fakt, že ekdysteroidy primárně v rostlinách neplní obrannou úlohu proti hmyzu, pak musíme zjistit pro objasnění jejich skutečné úlohy, kde se aktivní nebo neaktivní formy ekdysteroidů v buňce vyskytují.

5 Seznam literatury

Arnault C., Sláma K. (1986): Dietary effects of phytoecdysone in the leek-moth, *Acrolepiopsis assectella* Zell. (Lepidoptera: Acrolepiidae). J. Chem. Ecol., 12, 1979–1986.

Bakrim A., Maria A., Sayah F., Lafont R., Takvorian N. (2008): Ecdysteroids in spinach (*Spinacia oleracea* L.): biosynthesis, transport and regulation of levels. Plant. Physiol. Biochem., 46, 844–854.

Bergamasco R., Horn D.H.S. (1983): Distribution and role of insect hormones in plants. In: R. G. H. Downer, H. Laufer, (ed.), Endocrinology of Insects, A.R. Liss Inc., New York, 627–654.

Blackford M., Dinan L. (1997a): The effects of ingested 20-hydroxyecdysone on the larvae of *Aglais urticae*, *Inachis io*, *Cynthia cardui* (Lepidoptera: Nymphalidae) and *Tyria jacobaeae* (Lepidoptera: Arctiidae). J. Insect. Physiol., 43, 315–327.

Blackford M., Dinan L. (1997b): The effects of ingested ecdysteroid agonists (20-hydroxyecdysone, RH5849 and RH5992) and an ecdysteroid antagonist (cucurbitacin B) on larval development of two polyphagous lepidopterans (*Acherontia atropos* and *Lacanobia oleracea*). Entomol. Exp. Appl., 83, 263–276.

Buděšínský M., Vokáč K., Harmatha J., Cvačka J. (2008): Additional minor ecdysteroid components of *Leuzea carthamoides*. Steroids, 73, 502–514.

Butenandt A., Karlson P. (1954): Über die Isolierung eines metamorphose-hormons der Insekten in kristallisierter Form. Z. Naturforsch. (B), 9, 389–391.

Devarenne T.P., Sen-Michael B., Adler J.H. (1995): Biosynthesis of ecdysteroids in *Zea mays*. Phytochemistry, 40, 1125–1131.

Dinan L. (1992): The analysis of phytoecdysteroids in single (pre-flowering stage) specimens of fat hen, *Chenopodium album*. Phytochem. Anal., 3, 132–138.

Dinan L. (1998): A strategy towards the elucidation of the contribution made by phytoecdysteroids to the deterrence of invertebrate predators on plants. *Russ. J. Plant. Physiol.*, 45, 296-305.

Dinan L., Harmatha J., Volodin V., Lafont R. (2009): Chapter 1 Phytoecdysteroids: diversity, biosynthesis and distribution. In: G. Smagghe (ed.), *Ecdysone: Structures and Functions*. Springer Science & Business Media B.V., Dordrecht, 3-45.

Dinan L., Hormann R.E. (2005): Ecdysteroid agonists and antagonists. In: L.I. Gilbert, K. Iatrou, S. Gill (eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier, Oxford, 197–242.

Duchoň F., Hampl J. (1962): *Agrochemie. Úvod do studia chemie užití v rostlinné výrobě*. ČAZV a SZN, Praha, 87-106.

Gloser J. (1998): *Fyziologie rostlin*. Masarykova univerzita, Brno, 157stran.

Grebenok R.J., Adler J.H. (1991): Ecdysteroid distribution during development of spinach. *Phytochemistry*, 30, 2905–2910.

Grebenok R.J., Ripa P.V., Adler J.H. (1991): Occurrence and levels of ecdysteroids in spinach. *Lipids*, 26, 666–668.

Grebenok R.J., Adler J.H. (1993): Ecdysteroid biosynthesis during the ontogeny of spinach leaves. *Phytochemistry*, 33, 341–347.

Grebenok R.J., Venkatachari S., Adler J.H. (1994): Biosynthesis of ecdysone and ecdysone phosphates in spinach. *Phytochemistry*, 36, 1399–1408.

Harborne J. B. (1993): *Introduction to Ecological Biochemistry*, Academic Press, London, 318 stran.

Harmatha J. (2000): Chemo-ecological role of spirostanol saponins in the interaction between plants and insects. In: W. Oleszek, A. Marston (eds.), *Saponins in Food, Feedstoffs and Medicinal Plants*, Proceedings of the Phytochemistry Society of Europe. Kluwer, Dordrecht, 45, 129–141.

Heil M., Bostock R.M. (2002): Induced systemic resistance against pathogens in the context of induced plant defences. *Ann. Bot.*, 89, 503-512.

Horn D.H.S., Bergamasco R. (1985): Chemistry of ecdysteroids. In: G. A. Kerkut, L. I. Gilbert (eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Pergamon Press, Oxford, 185–248.

Hoskovec M. (2000): Chemická komunikace hmyzu pohledem organického chemika. *Chem. Listy*, 94, 897-904.

Huber R., Hoppe W. (1965): Die Kristall- und molekülstrukturanalyse des insektenverpuppungshormons ecdyson mit der automatisierten faltmolekülmethode. *Chem. Ber.*, 98, 2403–2404.

Ivanič J., Havelka B., Knop K. (1984): *Výživa a hnojení rostlín*. Příroda a SZN, Bratislava, Praha, 67 - 78.

Joly R., Svahn C.M., Bennett R.D., Heftmann E. (1969): Investigation of intermediate steps in the biosynthesis of ecdysterone from cholesterol in *Podocarpus elata*. *Phytochemistry*, 8, 1917–1920.

Kalina J., Urban O., Bukovská R. (2006): Rubisco jeden z mnoha enzymů. *Chem. Listy*, 100, 700–708.

Kamlar M., Uhlík O., Kohout L., Harmatha J., Macek T. (2010): Steroidní fytohormony: funkce, mechanismus účinku a význam. *Chem. Listy.*, 104, 93-99.

Koolman J. (1989): Ecdysone: From Chemistry to Mode of Action. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 482 stran.

Kubo I., Klocke J.A., Asano S. (1981): Insect ecdysis inhibitors from the East African medicinal plant *Ajuga remota* (Labiatae). Agric. Biol. Chem., 45, 1925–1927.

Kubo I., Klocke J.A., Asano S. (1983): Effects of ingested phytoecdysteroids on the growth and development of two Lepidopterous larvae. J. Insect Physiol., 29, 307–316.

Kubo I., Hanke F.J. (1986): Chemical methods for isolating and identifying phytochemicals biologically active in insects. In: J.R. Miller, T.A. Miller (eds.), Insect Plant Interactions. Springer Verlag, New York, 225–249.

Kůdela V., Bartoš P., Čača Z., Dirlbek J., Frič F., Lebeda A., Šebesta J., Ulrychová M., Valášková E., Veselý D. (1989): Obecná fytopatologie. Academia, Praha, 388 stran.

Lafont R., Dinan L. (2003): Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: and update. J. Insect Sci., 7, 1-30.

Lafont R., Harmatha J., Marion-Poll F., Dinan L., Wilson I.D. (2002): Ecdybase - The Ecdysone Handbook. Cybersales, Praha, online <http://ecdybase.org> (datum vyhledání: 10. 1. 2010).

Nakanishi K., Koreeda M., Sasaki L., Chang M.L., Hsu H.Y. (1966): Insect hormones I. The structure of ponasterone A, an insect molting hormone from the leaves of *Podocarpus nakaii* H. Chem. Commun., 915–917.

Pan Z., Camara B., Gardner H., Backhaus R.A. (1998): Aspirin inhibition and acetylation of the plant cytochrome P450, allene oxide synthase, resembles that of animal prostaglandin endoperoxide H synthase. J. Biol. Chem. 273.18139–18145.

Pavlíková D., Pavlík M., Vašíčková S., Száková J., Tlustoš P., Vokáč K., Balík J. (2002a): The effect of soil properties on cadmium bonds to organic substances of spinach biomass. Appl. Organomet. Chem., 16, 187-191.

Pavlíková D., Pavlík M., Száková J., Vašíčková S., Tlustoš P., Balík J. (2002b): The effect of Cd and Zn contents in plant on Fe binding into organic substances of spinach biomass. *Rostl. Vyroba*, 48, 531-535.

Pavlíková D., Pavlík M., Vašíčková S., Száková J., Tlustoš P., Vokáč K., Balík J. (2004): Separation of organic compounds binding trace elements in seeds of *Leuzea carthamoides* (Willd.) DC. *Appl. organomet. chem.*, 18, 619 – 625.

Pavlíková D., Pavlík M., Vašíčková S., Száková J., Vokáč K., Balík J., Tlustoš P. (2005): Development of a procedure for the sequential extraction of substances binding trace elements in plant biomass. *Anal. Bioanal. Chem.*, 381, 863-872.

Pavlíková D., Pavlík M., Staszková L., Tlustoš P., Száková J., Balík J. (2007): The effect of potentially toxic elements and sewage sludge on the activity of regulatory enzyme glutamate kinase. *Plant. Soil. Environ.*, 53, 201-206.

Pavlíková D., Pavlík M., Staszková L., Motyka V., Száková J., Tlustoš P., Balík J. (2008): Glutamate kinase as a potential biomarker of heavy metal stress in plants. *Ecotox. Environ. Safe.*, 70, 223-230.

Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J., Gloser J., Havel L., Nátr L., Prášil I., Sladký Z., Šantrůček J., Tesařová M., Vyskot B. (1998): *Fyziologie rostlin*. Academia, Praha, 412-431.

Tanaka Y., Naya S. (1995): Dietary effect of ecdysone and 20-hydroxyecdysone on larval development of two Lepidopteran species. *Appl. Entomol. Zool.*, 30, 285–294.

Tomás J., Camps F., Coll J., Melé E., Messeguer J. (1993): Phytoecdysteroid production by *Ajuga reptans* tissue cultures. *Phytochemistry*, 32, 317–324.

Oeh U., Lorenz M. W., Hoffmann K. H. (1998): Ecdysteroid release by the prothoracic gland of *Gryllus bimaculatus* (Ensifera: Gryllidae) during larval–adult development. *J. Insect Physiol.*, 44, 941–946.

- Okuzumi K., Hara N., Fujimoto Y., Yamada J., Nakamura A., Takahashi K., Morisaki M. (2003): Biosynthesis of phytoecdysteroids in *Ajuga* hairy roots: clerosterol as a precursor of cyasterone, isocyasterone and 29-norcyasterone. *Tetrahedron Lett.*, 44, 323–326.
- Opletal L., Klimeš J., Sovová M., Bajer J., Mysliveček M., Dvořák J., Krásný O., Zvoníček J. (1993): Upper parts of *Leuzea carthamoides* and their use in livestock production. In: L. Opletal (ed.), *Cadiso 92*, Proceedings of Cadiso conference. Faculty of Pharmacy, Charles university, Hradec Králové, 86-88.
- Reixach N., Lafont R., Camps F., Casas J. (1999): Biotransformations of putative phytoecdysteroid biosynthetic precursors in tissue cultures of *Polypodium vulgare*. *Eur. J. Biochem.*, 266, 608–615.
- Reixach N., Irurre-Santilari J., Casas J., Melé E., Messeguer J., Camps F. (1997): Biosynthesis of phytoecdysteroids in *in vitro* prothalli cultures of *Polypodium vulgare*. *Phytochemistry*, 43, 597–602.
- Rharrabe K., Alla S., Maria A., Sayah F., Lafont R. (2007): Diversity of detoxification pathways of ingested ecdysteroids among phytophagous insects. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, 65, 65–73.
- Schmelz E.A., Grebenok R.J., Galbraith D.W., Bowers W.S. (1998): Damage-induced accumulation of phytoecdysteroids in spinach: a rapid root response involving the octadecanoic acid pathway. *J. Chem. Ecol.*, 24, 339–360.
- Schmelz E.A., Grebenok R.J., Galbraith D.W., Bowers W.S. (1999): Insect-induced synthesis of phytoecdysteroids in spinach, *Spinacia oleracea*. *J. Chem. Ecol.*, 25, 1739–1757.
- Schmelz E.A., Grebenok R.J., Ohnmeiss T.E., Bowers W.S. (2000): Phytoecdysteroid turnover in spinach: long-term stability supports a plant defense hypothesis. *J. Chem. Ecol.*, 26, 2883–2896.
- Schoonhoven L.M., Jermy T., van Loon J.J.A. (1998): *Insect-Plant Biology: From Physiology to Evolution*, Chapman & Hall, London. 174–177.

Thummel C.S. (2001): Molecular mechanisms of developmental timing in *C. elegans* and *Drosophila*. *Dev. Cell*, 1, 453-465.

Ufimtsev K., Shirshova T., Volodin V., Volodina S., Alekseev A., Raushenbakh I. (2006): Effect of exogenous ecdysteroids on growth, development and fertility of the Egyptian cotton leafworm *Spodoptera littoralis* Boisd. (Lepidoptera: Noctuidae). *Dokl. Biol. Sci.*, 411, 512–514.

Uhlík O., Kamlar M., Kohout L., Jezek R., Harmatha J., Macek T. (2008): Affinity chromatography reveals RuBisCO as an ecdysteroid-binding protein. *Steroids*, 73, 1433-1440.

Zelený J., Havelka J., Sláma K. (1997): Hormonally mediated insect-plant relationships: Arthropod populations associated with ecdysteroid-containing plant, *Leuzea carthamoides* (Asteraceae). *Eur. J. Entomol.*, 94, 183-198