

METABOLISMUS EKDYSTEROIDŮ U HMYZU (*Insecta*) A VÝZNAM HMYŽÍ STŘEVNÍ MIKROFLÓRY

MILAN PAVLÍK^a, HANA RYŠAVÁ^{a,b}
a ZDENĚK WIMMER^a

^a Izotopová laboratoř, ÚEB AV ČR, Videňská 1083, 142 20 Praha 4 – Krč, ^b Katedra ochrany rostlin, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, Praha 6 – Suchbátka
pavlik@biomed.cas.cz

Došlo 1.9.09, přepracováno 2.12.09, přijato 5.1.10.

Klíčová slova: střevní symbiotické mikroorganismy, biotesty 20-hydroxyekdysonu

Obsah

1. Ekdysteroidy – svlékáci hmyzí hormony
2. Charakteristika zoekdysteroidů
3. Metabolismus ekdysteroidů hmyzu
4. Injektováním ke stanovení kapacity a variability detoxifikačních cest ekdysteroidů
5. Metabolismus aktivních a neaktivních fytoekdysteroidů přijímaných hmyzem
6. Reprodukovatelnost testů sledujících vliv fytoekdysteroidů podávaných potravou
7. Význam střevní symbiotické mikroflóry pro vývoj hmyzu
8. Závěr

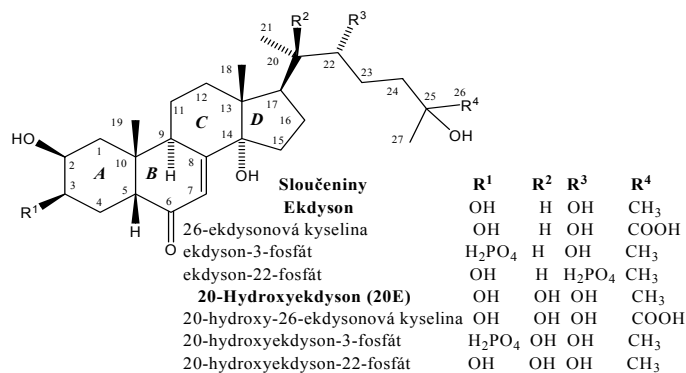
1. Ekdysteroidy – svlékáci hmyzí hormony^{1–4}

Podle výskytu v organismech jsou ekdysteroidy rozdělovány na zoekdysteroidy a fytoekdysteroidy. Zoee-

kdysteroidy, které fungují v organismech patřících do členovců (*Arthropoda*), mají ekdysonovou aktivitu. 20-Hydroxyekdyson (20E) je příkladem hlavního aktivního ekdysteroidního hormonu, který reguluje svlékáci proces u hmyzu (*Insecta* nebo také *Hexapoda*) a korýšů (*Crustaceae*). 20E, nazývaný také β -ekdyson, ekdysteron, kommisteron A, isoinokosteron, polypodin A, nebo hmyzí svlékáci hormon (insect moulting hormone) vzniká aktivací ekdysonu jako prohormonu. Mezi ekdysteroidy patří produkty hmyzích detoxifikačních (katabolických) drah, které vedou k jejich neaktivním analogům, většinou konjugátům. Regulace aktivních zoekdysteroidů musí být z důvodů fylogenetického vývoje pro úspěšné druhy hmyzu energeticky minimálně náročná. Právě energetická nenáročnost regulace metabolismu v živých organismech je jedním z významných faktorů obecně zaručující úspěšnost druhu. Proto neaktivní formy zoekdysteroidů jsou strukturně tak podobné aktivním formám (obr. 1).

Ekdysteroidy jsou nejvíce testovány právě na hmyzu. Entomologové vycházejí z biologické funkce fytoekdysteroidů, a proto uvádějí, že funkce fytoekdysteroidů spočívá v obraně rostliny proti herbivornímu hmyzu⁵. Lékaři a farmaceuti se přiklánějí k názoru, že biologická funkce fytoekdysteroidů je spojena se steroidními účinky na býložravce, nebo všežravce. Přes tyto poznatky stále není plně zřejmá úloha fytoekdysteroidů v rostlině^{6,7}.

Cílem práce je posoudit, zda na základě současných znalostí o detoxifikačních mechanismech je reálné uvažovat o možnostech využívání těchto typů látek pro ochranu rostlin v zemědělství, nebo zda je reálnější využití strukturní znalosti o aktivitě zoekdysteroidů pro tvorbu specifických látek zasahujících do ekdyse škůdců. Tento výzkum nabude na aktuálnosti, protože Evropský parlament připravuje směrnice k omezení použití insekticidních organofosfátů a karbamátů.



Obr. 1. Ekdysteroidy – ekdyson a 20-hydroxyekdyson, analogy jejich kyselin a fosfátů

2. Charakteristika zoekdysteroidů^{1–4}

K zoekdysteroidům a jejich odvozeným sloučeninám řadíme velkou skupinu látek, které ačkoliv splňují strukturní kritéria⁸, nemusí ale vykazovat ekdysonovou aktivitu. Zoekdysteroidy obsahují chromofor konjugovaného ketonu 7-en-6-on cholestanového typu cytoskeletu – C₂₇ a 5β-vodík (*cis* A/ B-spojení kruhů), které jsou velmi důležité pro aktivitu, protože 5α-vodík (*epi*; *trans* A/ B-spojení kruhů) tvoří neaktivní analogy, podobně jako dvojná vazba 4-en (se pak přibližuje spíše *trans* A/ B-spojení kruhů). Podmínkou je i přítomnost několika hydroxylových skupin, které umožňují lepší rozpustnost ve vodě, resp. dobrou rozpustnost v cytosolu hmyzu nebo v rostlinné buňce. Hydroxylové skupiny vytváří podmínky pro tvorbu vodíkových můstků s okolními sloučeninami obsaženými v cytosolu. To vysvětluje kvantitativní omezení izolovaných fytoekdysteroidů postupně pomocí sekvenční extrakce do 4 frakcí rozpouštědly EtOAc, BuOH, MeOH nebo MeOH + voda (1:1). Extrakce je diskontinuitní, s rozložením obsahu fytoekdysteroidů ve frakcích^{9,10} dle Gausovy křivky. Kromě toho jsou hydroxylové skupiny také pro hmyz východiskem deaktivčních procesů exekdysteroidů a endoekdysteroidů.

3. Metabolismus ekdysteroidů hmyzu^{1–3}

Biosyntéza zoekdysteroidů začíná u 24-dealkylace fytoosterolů ve střevech všežravého a býložravého hmyzu a korýšů až postupně vznikne cholesterol. Cholesterol se změní buď postupně přes 5β-ketodiol a 2-deoxyekdyson na ekdyson^{11,12} v protorakálních žlázách, a nebo především v hemolymfě postupně přes 5β-diketol a 3-dehydroekdyson na ekdyson^{11–13}. Ten se pak v povrchových tkáních v protorakálních žlázách přemění po hydroxylaci katalyzovanou ekdyson-20-monooxygenasou z ekdysonu na 20E. Systém 24-dealkylace sterolů probíhá také u několika dalších kmenů bezobratlých, včetně prvoků, zelených řas, hub, hlístů, a některých měkkýšů¹¹. Regulace syntézy zoekdysteroidů je složitá, protože je propojená s vývojovými stádii jedince¹⁴. Vajíčka hmyzu obsahují různé zoekdysteroidy ve volné i konjugované formě¹⁵. Množství zoekdysteroidů se mění během vývoje embrya. Zoekdysteroidy podporují fungování regulace embryogeneze^{14,16} a pomáhají při kontrole reprodukce¹⁴.

U hmyzu existuje několik možností deaktivace a detoxifikace ekdysteroidů. Detoxifikace probíhá u všech druhů adaptovanou střevní symbiotickou mikroflórou. U některých druhů hmyzu je ovlivněna také přítomností specifických střevních hmyzích enzymů. Hmyz během svého životního cyklu reguluje metabolismus svlékacích hormonů, přeměnou aktivních forem ekdysteroidů na neaktivní a nebo naopak. Tento proces je pro organismy, v nichž se tyto látky vyskytují, energeticky méně náročný, než tyto látky komplexně katabolickými procesy degradovat. Detoxifikace proto nastává také po průniku trávicím

traktem přímo ve vlastním organismu.

Čerstvě nakladená vajíčka obsahují mateřské konjugované fyziologicky neaktivní fosfatové estery ekdysteroidů. Fosfáty zoekdysteroidů jsou umístěny v žloutkových zrnech, kde jsou vázány na žloutkový protein vitellin¹⁷. Ve vajíčkách mimo diapauzu je vytvářen 20E přeměnou mateřských fosfatů zoekdysteroidů. Další metabolickou cestou tvorby 20E v hmyzím organismu je biosyntéza *de novo* z cholesterolu. U vajíček v diapauze se ani jeden z těchto metabolických procesů nevyskytuje¹⁵. Tvorba 20E během vývoje rané embryogeneze je regulována společně přes 2 enzymy¹⁸: ekdyson-20-hydroxylasu a ekdysteroid-fosfat-fosfatasa. Ekdysteroid-fosfat-fosfatasa katalyzuje přeměnu fyziologicky neaktivních konjugovaných fosfatů ekdysteroidů, jako např. ekdyson-22-fosfátu a 20E-22-fosfátu s vitellinem na volné neaktivní fosfáty ekdysteroidů¹⁹. Fosfatové vazby komplexu vitellinu s fosfáty zoekdysteroidů jsou obtížně hydrolyzovány ekdysteroid-fosfat-fosfatasa, na rozdíl od volných fosfatů zoekdysteroidů, které mohou být ekdysteroid-fosfat-fosfatasa kompletně hydrolyzovány¹⁷. Ekdysteroid-fosfat-fosfatasa nebyla objevena u vajíček v diapauze, jejichž vývoj je chráněn v pozdním stadiu gastruly²⁰. Kromě několika jiných enzymů byla objevena kinasa regulovaná extracelulárním signálem, který má klíčovou roli v ukončení diapauzy²¹. Deaktivace probíhá několika způsoby včetně jejich kombinací:

- Tvorba různých konjugátů, především fosfatů.
- Hydroxylace na uhlíku C26 a další oxidace až na příslušnou kyselinu na uhlíku C26.
- Tvorba 3-dehydroekdysteroidů za katalýzy ekdyson-oxidasy. Po následné redukci vzniká epiekdysteroid, který pak tvoří různé fosfatové konjugáty za katalýzy fosfotransferasy²².

Biotransformace aktivních zoekdysteroidů na neaktivní spočívá především v tvorbě ekdysteroidních konjugátů, na uhlíku C22 s mastnými kyselinami, glukosou nebo již uvedenou kyselinou fosforečnou. Deaktivace zoekdysteroidů je pozorovaná např. během posledního larválního instaru u *Lepidoptera* ve středním střevě, kde probíhá pomocí aktivní cytosolové ekdysonoxidasy a ekdysteroid-fosfotransferasy. Transformace vede přes 3-dehydroekdysteroidy k odpovídajícímu 3-epiekdysteroidu (3α-hydroxy), až k fosfatové konjugaci. Pro zoekdysteroidy je charakteristická postupná deaktivace, která je většinou nakonec završena fosforylací. Produkty fosforylace jsou převážně 2-fosfáty ekdysteroidů doprovázené malým množstvím odpovídajícího 22-fosfátu ekdysteroidů^{22,23}.

U všech organismů je znám význam enzymu v detoxifikaci xenobiotik a v rezistenci hmyzu k rostlinným látkám²⁴. Hmyzí genom obsahuje přes 100 různých genů enzymu Cytochromu P450 (CyP450). Tyto geny jsou složitě regulovány. U živočichů se CyP450 účastní biotransformace steroidních hormonů (testosteron, progesteron). CyP450 je životně důležitý v biotransformaci endogenních steroidních substrátů u *Crustacea*, protože je spojen s aktivací ekdysonu jako prohormonu na 20E (cit.^{24,25}), či konverzí ponasteronu A na 20E (cit.²⁶). Stejná biotransforma-

ce ekdysonu na 20E za katalýzy CyP450 je známá také u rostlin. U hmyzu je biosyntéza ekdysonu dána hydroxylací na C2 a/nebo C22 (mitochondriální CyP450) a na C25 mikrosomální CyP450 (cit.²⁴). Úloha CyP450 při aktivaci 20E je známá, ale pozapomíná se na její funkci i při deaktivaci ekdysteroidů, zvláště pak ekdysonu a 20E, která vede přes jejich hydroxylaci na uhlíku C26 a končí oxidací přes aldehyd až u příslušné karboxylové kyseliny^{24,27,28}.

Vzájemné regulace v celém těle nebo pouze např. v hemolymfě a/nebo ovarii^{12,14,15,29–33} ve vztahu k ekdysonu hmyzu je spojena s několika cestami deaktivace. Tyto regulační mechanismy vzájemné biotransformace zoekdysteroidů³¹ umožňují hmyzu určitou míru adaptability, pokud přes střevní stěnu do hemolymfy pronikne jak aktivní, tak neaktivní forma fytoekdysteroidů. K pochopení regulace je nutné znát rychlost dynamické změny (nárůst, pokles) koncentrace aktivních nebo neaktivních analogů zoekdysteroidů převážně v těle hmyzu, nebo v hemolymfě v průběhu vývoje jedince^{34,35}, či v průběhu embryogeneze³⁶. Tyto znalosti jsou významné při hodnocení toxikokinetických procesů (biologická dostupnost)³⁷ a následně toxikodynamických procesů (interakce – tvorba specifických bílkovin, inhibice či aktivace specifických enzymů) po podání fytoekdysteroidů potravou^{37,38}, protože vedou k vyvolání odpovědi, regulaci³⁸ fyziologických procesů během vývoje jedince.

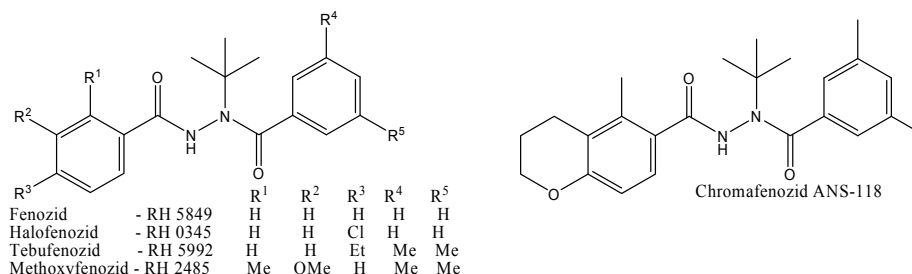
4. Injektováním ke stanovení kapacity a variability detoxifikačních cest ekdysteroidů^{1–3}

Sledování efektu exoekdysteroidů, lze obecně shrnout do sledování toxikokinetických a toxikodynamických procesů, které vyvolá injektovaný ekdysteroid a do jeho biotransformace³³. Proto se objasnění biotransformačních mechanismů zoekdysteroidů neobejde bez injektování radioisotopem značeného ekdysteroidu do testovaných jedinců vybraného druhu hmyzu.

Injektování exoekdysteroidů do hmyzu musí předcházet stanovení akutní toxicity (dávka ekdysonu a 20E do 10 µg) a chronické toxicity (do 100 ppm 20E)³⁹. Exoekdysteroidy stimulují ovaria v dávkách 1–5 µg 20E / samičku a plodnost v dávce 1 µg 20E / samičku³³. Naopak

ve vyšších koncentracích 10 µg 20E / samičku je inhibován vývoj ovarii⁴⁰. Při opakovaném injektování dávek 2 až 5 µg, a to jak ekdysonu, tak 20E / samičku, dochází u nich ke stimulaci produkce vajíček⁴¹.

Injekční aplikace ekdysonu nebo 20E značeného isotopem ³H ([³H]ekdysonu a [³H]20E) v poloze C23 a C24 do hemolymfy v dávkách od 0,8 ng do 10 µg přes břišní stěnu larev můry blýskavky (*Spodoptera littoralis*) v 6. instaru potvrdila dva hlavní (polární a nepolární) detoxifikační mechanismy zoekdysteroidů. Injektovaný ekdyson byl hydroxylován buď na C26, kde je dále oxidován na 26-ekdysonovou kyselinu, a nebo na C20 na 20E. Ten je také hydroxylován na C26 s následnou oxidací až na 20-hydroxy-26-ekdysonovou kyselinu. Injektovaný ekdyson byl ale transformován méně na 20E 22-acyl estery mastných kyselin a/nebo více na ekdyson 22-acyl estery mastných kyselin, které byly např. jako palmitát nalezeny v hemolymfě. Odstraňování injektovaných zoekdysteroidů z hemolymfy do střev bylo velmi rychlé. Za 30 minut bylo 35 % injektovaných metabolitů ve střevech, za 3 hodiny bylo injektovaných metabolitů v hemolymfě pouze 27 % a 20 % již bylo současně ve střevních výkalech. Po 24 hodinách, podobně jako i u podávání fytoekdysteroidů potravou, byly zaznamenány pouze stopy radioaktivity injektovaných zoekdysteroidů⁴². Tyto výsledky jsou proto velmi významné ve vztahu k rychlosti trávení, množství spotřebované potravy a rozmezí obsahu fytoekdysteroidů v rostlinách např. ve špenátu setém (*Spinacia oleracea*) nebo parše saflorové (*Leuzea carthamoides*). Tato hlavní polární detoxifikační cesta byla potvrzena i po injektování 20E do larev bource morušového (*Bombyx mori*) a *Heliothis virescens*, když doplňkovou detoxifikací byla epimerizace 20E. Detoxifikační analogy vytvořily konjugáty. V *B. mori* to byl sulfát, který je ojedinělý oproti obvyklým fosfátovým konjugátům nalezeným v *H. virescens*⁴³. Tyto poznatky jsou ve shodě s výsledky dřívějšího injektování ekdysonu⁴⁴ i do dalšího hmyzího zástupce octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*), kde u nepolární detoxifikační cesty byl hlavním neaktivním produktem konjugát s mastnou kyselinou na C22. U polární detoxifikační cesty jsou hlavními deaktivujícími produkty 26-ekdysonová kyselina a 20-hydroxy-26-ekdysonová kyselina, dále 3-dehydroekdyson a nejméně 20E.



Obr. 2. Diacylhydrazinovi (DAH) agonisté ekdysteroidů

Během fylogenetického vývoje hmyzu se biotransformace endoekdysteroidů na příslušné kyseliny na uhlíku C26 (cit.^{27,45,46}) stala obecnou, protože je energeticky výhodné oxidací vytvořit hormonálně neaktivní analogy. Začíná po hydroxylaci uhlíku C26. Účastní se jí 20-monooxygenasa, která je indukována substrátem ekdysonu na produkt 20E. Finální biotransformaci indukují substráty ekdysonu a 20E, které aktivují 26-hydroxylasu, jejíž produktem je hydroxylová skupina na uhlíku C26 jak u ekdysonu, tak 20E. Tuto reakci také indukuje agonista RH5849 (obr. 2, 1,2-dibenzoyl-1-*terc*-butylhydrazin)^{47,48}. Pokud pronikne ekdyson do těla, hmyz má dostatečné mechanismy k jeho eliminaci na neaktivní analogy. A to i přesto, že část se aktivuje na 20E, protože i tento následně rychle podléhá biotransformaci. Existují dva mechanismy deaktivace, metabolizace ekdysteroidů. Vedle deaktivace spouštěné endoekdysteroidy byl potvrzen i mechanismus spouštěný exoekdysteroidy, které vstupují do hmyzu přes trávicí soustavu potravou. Ve střevě dochází ke trávení potravu včetně začátku deaktivace ekdysteroidů. Nesteroidní agonisti odvození od diacylhydrazinů jsou komerčně používané insekticidy³. Fenozid (obr. 2) indukuje deaktivací metabolickou cestu přes hydroxylaci ekdysteroidů na C26 a po následné oxidaci přes jeho aldehyd vzniká příslušná kyselina na C26 (cit.^{22,48}).

5. Metabolismus aktivních a neaktivních fytoekdysteroidů přijímaných hmyzem^{1–3}

Enzymový systém ve střevěch larev hmyzu má mnoho funkcí. Z cytosolu střední části střev byly izolovány enzymy, jako jsou ekdysonoxidasa, 3-dehydroekdyson-3 α -reduktasa, 3-dehydroekdyson-3 β -reduktasa, ekdysteroid-2-fosfotransferasa a ekdysteroid-22-fosfotransferasa, které se podílejí na detoxifikaci (deaktivaci) ekdysteroidů^{23,49,50}. Rozsah optimálního pH pro tyto enzymy je stanoven mezi 6,5–7,8. Metabolity detoxifikace ekdysteroidů tvoří neaktivní analogy. Při deaktivaci je uplatňována nejen polární cesta, ale přednostně i nepolární cesta. U nepolární cesty je nezbytná acyltransferasa, která je účinná pro oba hlavní substráty ekdysonu a 20E. Menší část potravou přijatého 20E odchází ale v nezměněné formě ze střev výměty (např. u zavíječe paprikového – *Plodia interpunctella*)⁵¹. Z detoxifikace ekdysteroidů ale nelze vyloučit ani střevní symbiotické bakterie, ačkoliv byly nalezeny v cytosolu středního střeva enzymy larev, které umožňují tvorbu neaktivních ekdysteroidů.

Deaktivaci ekdysteroidů se tvoří hormonálně neaktivní méně polární konjugáty ekdysteroidů s estery kyseliny octové (3-acetát ekdysteroidů), nacházející se v larvách sarančete stěhovavého (*Locusta migratoria*)⁵² a především s mastnými kyselinami na C(22)-acylestery ekdysteroidů, které se vyměšují ze střev výměty larev černopásky bavlníkové (*Heliothis armigera* syn. *Helicoverpa armigera*)⁵³, *H. virescens*^{43,54,55}, cvrčka dvouskvrnného (*Gryllus bimaculatus*)⁵⁶, *S. littoralis*⁴², *P. interpunctella*⁵¹. *P. interpunctella* odstraňuje 20E z potravu také jako 3-oxo-20E a 3-

epi-20E, které také tvoří konjugáty s mastnými kyselinami⁵¹. Oproti tomu zavíječ kukuřičný (*Ostrinia nubilalis*) produkuje pouze konjugáty s mastnými kyselinami⁵¹. Již po 15 minutách se z těla hmyzu ve výmětech (exkrementech) nejdříve vylučují estery ekdysteroidů. Obecně se vylučuje zpracovaná potrava výměty po 2–4 hodinách. Oproti tomu např. pro černopásku bavlníkovou (*H. armigera*) je rychlost trávení větší než 12 hodin⁵³ a pro *Helicoverpa virescens* je menší než 1 hodina⁵⁴. Ekdysteroidy značené isotopem ³H podané spolu s potravou se projeví na nízké úrovni radioaktivity u uhynulých jedinců⁵³. Radioaktivita ve střevěch je nepřímo úměrná výmětům⁴².

Přes stěnu střevní do těla více vstupují estery 20E než polárnější 20E. V tomto případě je proto tvorba esterů 20E pouze pseudodetoxifikací. K této deaktivaci ekdysteroidů přes jejich estery může dojít, pokud fytofágní hmyz trvale žije na rostlinách obsahujících ekdysteroidy. Biotransformace ekdysteroidů z fytoosterolů je energeticky náročná. Odtud se může opět část těchto esterů ekdysteroidů vrátit zpět do střeva pomocí molekulárních buněčných pump (není známa žádná práce popisující, zda a jak dochází k aktivaci), a nebo vstoupit do hemolymfy. Hlavní funkcí hemolymfy je roznášení výživných a exkrečních látek. Proto deaktivované ekdysteroidy včetně esterů, jako stále relativně polární látky, pokud nemají upotřebení v metabolismu larev, mohou být postupně z hemolymfy vylučovány přes malpighické žlázy do zadního střeva (*proctodaeum*), kterým odcházejí zbytky potravu do konečnicků.

Deaktivace probíhá v larvách přes 14-deoxyekdysteroidy (*G. bimaculatus*)⁵⁷, odštěpením postranního řetězce na poststeron (*B. mori*)⁵⁸ a také přes 3-dehydroekdysteroidy (*S. littoralis*)^{23,50}, *D. melanogaster*⁵⁹, *P. interpunctella*⁵¹ na 3-epiekdysteroidy (bělásek zelný – *Pieris brassicae*)⁶⁰, *Manduca sexta*^{49,61,62}, *S. littoralis*)^{23,50}. Z těchto biotransformovaných ekdysteroidů se následně mohou vytvářet především fosfátové konjugáty. Deaktivaci ekdysteroidů se tvoří hormonálně neaktivní polární konjugáty ekdysteroidů se sacharidy, jako je 22-glukosid ekdysteroidů (obsaženo v medovici mšic, např. u mšice broskvoňové – *Myzus persicae*)⁵¹, a především s kyselinou fosforečnou, jako je 2-fosfát ekdysteroid (*L. migratoria*, cit.^{52,63}, *M. sexta*)⁶¹, *S. littoralis*)^{23,50}, 3 α -fosfát ekdysteroid (*P. brassicae*)⁶⁰, 22-fosfát ekdysteroid (*M. sexta*)⁶¹, *S. littoralis*)^{23,50}, které se rychle vyměšují ze střev larev. Enzymatická deaktivace cytosolu středního střeva ukázala u larev *S. littoralis* v podmínkách *in vitro*^{23,50} tvorbu především 3-fosfátů ekdysteroidů a méně 22-fosfátů ekdysteroidů²³. Neaktivní konjugáty ekdysteroidů s glukosou nebo galaktosou v poloze C22 jsou tvořeny glukosyltransferasou v hemolymfě hmyzu infikovaného bakulovirem⁶⁴.

Diverzita detoxifikačních metabolických cest zoeekdysteroidů fytofágního hmyzu umožňuje larvám překonat negativní účinky v potravě přítomných fytoekdysteroidů. Diverzita detoxifikačních mechanismů může být také příčinou rozdílné citlivosti jednotlivých druhů k obsahu fytoekdysteroidů v potravě.

6. Reprodukovatelnost testů sledujících vliv fytoekdysteroidů podávaných potravou

Při studiu repelentní aktivity rostlinných látek na hmyzu jsou testy dobře reprodukovatelné^{65,66}. Metodiky sledující toxicitu rostlinných látek, zvláště pak ekdysteroidů nebo s tím spojenou biologickou aktivitu na hmyzu, vypadají také bezchybně. Jsou ale do určité míry specifické. Za standardní lze považovat biotest využívající ekdysteroid značený izotopem ³H, který je aplikován potravou larvám většinou v 6. instaru. Pro povzbuzení spotřeby potravy, zvýšení krmeného poměru jsou larvy např. *S. littoralis* předem vyhladověny. Postup je standardně využíván v ekotoxikologických testech. Ekdysteroidy musí být rovnoměrně aplikovány na povrch zkrmovaných listů o maximálním průměru 1,2 mm (cit.⁴²).

Vyhladovění a minimalizace potravy umožňuje dobrou organizaci pokusu, protože jsou relativně dostatečně odděleny potrava a výměty. Problém může nastat s určením hodnoty množství látky ovlivňující 1 kg testovaného organismu (LD₅₀, ED₅₀ či ID₅₀). To lze eliminovat aplikací látky (juvenilní hormon) pitnou vodou, ne potravou. Podmínkou je, že ruměnice pospolná (*Pyrrhocoris apterus*) v testované životní fázi (poslední nymfální ekdyse) nezbytně potřebuje k životu v daných podmínkách přesně stanovenou denní dávku vody (55 μl)⁶⁷. Účinné koncentrace ekdysteroidů podávané potravou^{68–72} byly již od 10 ppm (ED₅₀ – inhibice růstu), resp. od 50 ppm, kdy byla pozorována 90% mortalita. U hmyzu ale nebyly pozorovány změny v ekdyse či jiné specifické fyziologické změny pozorované při injektování.

Během ekdyse při zvýšeném obsahu 20E roste i specifický glykoprotein (Gp 150), který je součástí slizu a má i imunitní funkci. Vyskytuje se v hemocytech a slinných žlázách. Odtud se dostává do předního střeva (*stomadaeum*). Část vyloučeného Gp 150 změní strukturu a polapí bakterie. Proto má hmyz během ekdyse a zvýšené hladině ekdysteroidů vyšší imunitu proti patogenním bakteriím. Při podávání 20E potravou v biozkouškách se zvyšuje obsah Gp 150 nejen v hemocytech, ale i ve slinných žlázách a následně i ve střevech⁷³. To zpětně vyvolává negativní vliv na střevní symbiotickou mikroflóru významnou nejen pro trávení potravy, ale i pro celkový vývoj jedince. Je proto nutné obezřetně postupovat při interpretaci výsledků biozkoušek ekdysteroidů aplikované potravou, pokud není zároveň sledována změna diverzity střevní symbiotické mikroflóry.

Velký počet nalezených druhů hmyzu v polní kultuře *L. carthamoides*, mající vysoký obsah 20E, jej musí z potravy eliminovat⁶. To dává předpoklad, že součástí fenotypové proměnlivosti hmyzu je i adaptace střevní symbiotické mikroflóry spolupodílející se na rezistenci hmyzu k fytoekdysteroidům. Při biotestech se nedoceňuje fakt, že v tomto případě hmyz žil na rostlině obsahující v listech několikanásobně větší množství 20E, než je v jiných rostlinách např. špenátu, po napadení hmyzem. Protože se obsah fytoekdysteroidů v napadených listech rostliny zvyšuje,

bývají fytoekdysteroidy řazeny k faktorům podílejících se na odolnosti rostlin ke škůdcům⁵.

Larvám ektoparazitoidu *Diapetimorpha introita* žijícím na umělé výživě a nikoliv na blýskavce kukuřičné (*Spodoptera frugiperda*), se významně snižuje ve všech stádiích životaschopnost, zpomaluje se vývoj a nastávají některé změny, jako např. zvětšení očí, vyprázdněná střeva. Obsah 20E byl vyšší v hemolymfě ektoparazita chovaného na přirozené výživě především v 6. instaru. Nedostatek ekdysteroidů v hemolymfě u chovu na umělé výživě by mohl být částečně příčinou relativně vysokého procenta mortality ve 4. (maximální) a následně i u 1. a 2. instaru⁷⁴. Hexapeptid byl izolován⁷⁵ z vitellogenických ovarii s follikulostatickou aktivitou a regulující oostatický faktor inhibuje biosyntézu trypsinu ve střevech. Následné snížení koncentrace žlutkových polypeptidů v hemolymfě se projevuje v inhibici biosyntézy ekdysteroidů v larválních žlázách⁷⁶. Inhibice ekdysonu nepotlačuje aktivitu hexapeptidu, avšak je na něm závislá regulace ekdysonu. Rostlinné látky uvolněné proto ve střevech z potravy mohou být potenciálně významné v regulaci ekdysteroidů přes inhibici proteolytických enzymů nebo přes inhibici biosyntézy trypsinu⁷⁶.

Nejvhodnější je pravděpodobně koncepce biotestů používaná skupinou Rowell-Rahier^{77–79}, která přímo neeliminuje vliv změny potravy, např. přidavku potenciálně toxického sesquiterpenového laktonu kakalolu. Tito vědci založili pokusy na sledování vlivu kakalolu na specialisto- vi mandelince havězové (*Oreina cacaliae*) sebraného z rostlin obsahujících i neobsahujících kakalol. Výsledky ukázaly nejen vysokou heterogenitu srovnávaných populací, ale také nízkou heritabilitu rezistentní populace ke kakalolu^{77–79}. Fenotypová proměnlivost rezistence sledovaná pomocí růstu a mortality není závislá na genotypové variabilitě (proměnlivosti) testovaných jedinců, ale na faktorech prostředí, tedy na negenetické variabilitě. Vysvětlením je toxicita kakalolu na střevní symbiotické bakterie u hmyzu, který nežil na rostlinách obsahujících kakalol. Porušením symbiomy bakterií s hmyzem došlo k sekundárnímu projevu toxicity kakalolu.

Biotesty ekdysteroidů na hmyzu, který se živí, resp. neživí, rostlinami obsahujícími ekdysteroidy ve vztahu ke střevní symbiotické mikroflóře hmyzu nebyly provedeny. Vliv ekdysteroidů na mikroorganismy⁸⁰ není ještě dostatečně popsán. Aplikací vysokých dávek ekdysteroidů může dojít ke snížení diverzity střevních symbiotických bakterií, podobně jako při změnách potravy^{81–83}. V testech rostlinných látek aplikovaných potravou do hmyzu nebýval význam symbiosy střevních bakterií s hmyzím hostitelem doceněn. Proto se začíná se studiem vlivu rezistence střevní symbiotické mikroflóry hmyzu k přírodním látkám a insekticidům. Při sledování toxického vlivu rostlinných látek, polutantů a pesticidů na střevní symbiotickou mikroflóru hmyzu v podmínkách *in vitro* je nutné dbát na 2 základní faktory: 1. Jen zlomek z těchto bakterií, podobně jako půdních bakterií⁸⁴, je možno kultivovat *in vivo*. To omezuje studium vlivu bakterií na trávení potravy hmyzem, úlohy bakterií při detoxifikaci přírodních látek, polu-

tantů a pesticidů⁸⁵, změn střevních symbiotických bakterií způsobených toxickými látkami a jejich vlivu na patogeny v trávicím traktu hmyzu. 2. U mikroorganismů, podobně jako u pylu je nutné udávat zároveň koncentraci testovaných organismů a množství media, protože v nízkých koncentracích dramaticky vzrůstá citlivost k látce^{86,87}. Částečně lze k eliminaci využít známé referenční látky^{88,89}.

7. Význam střevní symbiotické mikroflóry pro vývoj hmyzu

Význam změny složení symbiotických bakterií ve střevech hostitelského hmyzu na trávení potravy, odolnost proti patogenům a detoxifikaci látek je nezpochybnitelný. Studium diverzity a vlastností mikroorganismů zvláště pak střevního mikroekosystému hmyzu, jejich izolace a správné taxonomické identifikace úzce souvisí s dokonalostí použitých technik v mikrobiální analýze^{84,90}. Pro sledování a taxonomické určení nekultivovatelných symbiotických mikrobů ve střevech hmyzu^{91,92} nebo háďátek⁹³, včetně stanovení komplexního střevního společenstva např. u *Poecilus chalcides*, *Harpalus pensylvanicus*, *Anisodactylus*^{82,94}, jsou využívány různé genetické analýzy (metagenomická analýza^{95,96}). Metoda značení stabilními isotopy (stable isotope probing) – SIP⁹⁰ deteguje aktivní organismy při detoxifikačním procesu a zároveň tento proces umožní studovat.

Změnou, např. přidávkou další složky do potravy (proteinový rybí hydrolyzát), je ovlivněn růst a zvětší se imunita proti patogenním bakteriím (*Vibrio anguillarum*) nejen u hmyzu, ale i jiných živočichů⁸¹. Po inokulaci střevního symbionta *Enterobacteriacea* do střev octomilky dochází k následnému zvýšení dlouhověkosti u pozorovaných jedinců⁹². Mnohé symbionty, jako např. *Enterobacteriaceae*, eliminují v potravě patogenní bakterie (*Pseudomonas aeruginosa*) nebo potenciální patogeny (*Hafnia alvei*, *Serratia* spp., zejména pak *Serratia marcescens*) ve střevech vrtule velkohlavé (*Ceratitis capitata*), *H. pensylvanicus*, *Anisodactylus sanctaerucis*^{92,94}. *S. marcescens* může být významná v subpatogenní hladině při dynamické regulaci střevního bakteriálního společenstva. Infekce entomopatogenní *Photobacterium temperata* se významně projevuje i ve snížení trávicích enzymů a následně v mortalitě motýla *Diatraea saccharalis*⁹⁷.

Ve střevech hmyzu při trávení potravy např. *S. marcescens* a *H. alvei* produkují specifické enzymy (chitinasy)⁹⁸. Bakteriální symbiotická společenstva se uplatňují v produkci vitaminů B nebo rozkladu celulosy⁹⁹. Biotransformují rostlinné steroly na cholesterol, který je důležitým meziproduktem biosyntézy zoekdysteroidů⁹⁹.

Střevní symbiotická mikroflóra hmyzu se významně podílí na trávení potravy, detoxifikaci a degradaci škodlivých látek^{100,101}. Významně rozdíly střevních symbiotických bakterií vyplývají z analýzy tří hmyzích populací (dvou laboratorních proti insekticidům rezistentní a citlivé) škůdce západníčka polního (*Plutella xylostella*) a popula-

ci, která byla nasbírána z polního ekosystému¹⁰². O bakteriích (*Burkholderia fungorum*, *H. alvei* a *Enterobacter*) detoxifikující PCB, polyaromatické uhlovodíky (fenanthren) a insekticidy (chlorpyrifos) v půdě^{103,104} víme mnohem více než o bakteriích v trávicím traktu hmyzu, které degradují přírodní látky¹⁰⁵, toxiny⁹⁴ a pesticidy, zvláště pak insekticidy⁹⁴. *Enterobacter*, degradující insekticid chlorpyrifos, byl nalezen v půdě i v trávicím traktu hmyzu⁹⁴.

8. Závěr

Pro tvorbu pesticidů 3. generace na základě využití procesů spojené s ecdysí, je vhodné jít cestou tvorby agonistů, nejen již komerčně používaných, ale vývojem nových perspektivních typů agonistů³, jako jsou agonisté odvozené od amidoketonů, oxadiazolinů, benzamidů a tetrahydroquinolinů. Alternativou jsou přírodní rostlinné fenylypropanoidní analogy lignanových agonistů nebo stilbenových antagonistů¹⁰⁶, nebo molekuly s velmi nízkou toxicitou k mikroorganismům. Takovým modelem by mohly být i některé analogy esterových konjugátů juvenilních hormonů nebo steroidní saponiny jako např. aginosid, alliporin, vyskytující se v různých druzích rodu *Allium* (česnek), nebo obecně známý digitonin¹⁰⁷. Tyto saponiny se asociují s fytosteroly důležitými to prekurzory zoekdysteroidů. Z toho vyplývá, že afinita zoekdysteroidového receptoru není tak vysoká, jak ukazují selektivní aktivátory a inhibitory insulinové signální kaskády, které aktivují nebo inhibují biosyntézu zoekdysteroidů¹⁰⁸.

Autoři děkují MŠMT za finanční podporu grantu 2B06024 (SUPRAFYT) a projektu MŠM 6046070901.

LITERATURA

Výběr z nejdůležitější literatury, v příloze (v elektronické verzi časopisu) jsou uvedeny zbylé citace.

- Sláma K., Romaňuk M., Šorm F. (ed.): *Insect hormones and Bioanalogs*. Springer-Verlag, New York 1974.
- Koolman J. (ed.): *Ecdysone. From Chemistry to Mode of Action*. Georg Thime Verlag, Stuttgart 1989.
- Smagghe G. (ed.): *Ecdysone: Structures and Functions*. Springer 2009.
- Lafont R., Harmatha J., Marion-Poll F., Dinan L., Wilson I. D.: *The ecdysone handbook*. <http://ecdybase.org>, 3rd Edition (2002), staženo 1. srpna 2009.
- Zelený J., Havelka J., Sláma K.: *Eur. J. Entomol.* 94, 183 (1997).
- Pavlík M., Pavlíková D., Száková J., Vašíčková S., Tlustoš P.: *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 54, 239 (2004).

23. Webb T. J., Powls R., Rees H. H.: *Biochem. J.* 312, 561 (1995).
42. Blackford M. J. P., Clarke B. S., Dinan L.: *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 34, 329 (1997).
43. Zhang M., Kubo I.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* 23, 831 (1993).
49. Nigg H. N., Svoboda J. A., Thompson M. J., Kaplanis J. N., Dutky S. R., Robbins W. E.: *Lipids* 9, 971 (1974).
50. Webb T. J., Powls R., Rees H. H.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26, 809 (1996).
51. Rharrabe K., Alla S., Maria A., Sayah F., Lafont R.: *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 65, 65 (2007).
52. Modde J. F., Lafont R., Hoffman J. A.: *Int. J. Invert. Reprod. Dev.* 7, 161 (1984).
53. Robinson P. D., Morgan E. D., Wilson I. D., Lafont R.: *Physiol. Entomol.* 12, 321 (1987).
54. Kubo I., Komatsu S., Asaka Y., de Boer G.: *J. Chem. Ecol.* 13, 785 (1987).
57. Hoffmann K. H., Thiry E., Lafont R.: *Z. Naturforsch., C* 45, 703 (1990).
58. Hikino H., Ohizumi Y., Takemoto T.: *J. Chem. Soc. D., Chem. Commun.* 1971, 1036.
60. Beydon P., Girault J. P., Lafont R.: *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 4, 139 (1987).
61. Weirich G. F., Thompson M. J., Svoboda J. A.: *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 3, 109 (1986).
64. O'Reilly D. R.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25, 541 (1995).
65. Hägele B., Harmatha J., Pavlík M., Rowell-Rahier M.: *Entomol. Exp. Appl.* 80, 169 (1996).
67. Jedlička P., Hrdý I., Kuldová J., Wimmer Z.: *Pest Manag. Sci.* 63, 1026 (2007).
68. Lafont R., Bouthier A., Wilson I. D.: *Insect Chemical Ecology, Proceedings of a Conference in Tábor*, 197 (1991).
73. Korayem A. M., Fabbri M., Takahashi K., Scherfer Ch., Lindgren M., Schmidt O., Ueda R., Dushay M. S., Theopold U.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 1297 (2004).
74. Gelman D. B., Carpenter J. E., Greany P. D.: *J. Insect Physiol.* 46, 457 (2000).
75. Hua Y. J., Bylemans D., De Loof A., Koolman J.: *Mol. Cell. Endocrinol.* 104, R1 (1994).
76. Bylemans D., Hua Y. J., Chiou S. J., Koolman J., Borovsky D., De Loof A.: *Eur. J. Entomol.* 92, 143 (1995).
79. Hägele B. F., Rowell-Rahier M.: *J. Evol. Biol.* 13, 131 (2000).
80. Ahmad V. U., Khaliq-Uz-Zaman S. M., Ali M. S., Perveen S., Ahmed W.: *Fitoterapia* 67, 88 (1996).
82. Lehman R. M., Lundgren J. G., Petzke L. M.: *Microb. Ecol.* 57, 349 (2009).
86. Pavlík M., Jandurová O. M.: *Environ. Exp. Bot.* 44, 49 (2000).
88. Pavlík M., Váňová M., Laudová V., Harmatha J.: *Rostl. Vyr.* 46, 343 (2000).
90. Uhlík O., Ječná K., Macková M., Leigh M. B., Demmerová K., Macek T.: *Chem. Listy* 102, 474 (2008).
92. Behar A., Yuval B., Jurkevitch E.: *J. Insect Physiol.* 54, 1377 (2008).
94. Lundgren J. G., Lehman R. M., Chee-Sanford J.: *Ann. Entomol. Soc. Am.* 100, 275 (2007).
95. Handelsman J.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 669 (2004).
97. Carneiro C. N. B., DaMatta R. A., Samuels R. I., Silva C. P.: *Protein Pept. Lett.* 15, 658 (2008).
99. Douglas A. E.: *Funct. Ecol.* 23, 38 (2009).
100. Dillon R. J., Dillon V. M.: *Annu. Rev. Entomol.* 49, 71 (2004).
101. Genta F. A., Dillon R. J., Terra W. R., Ferreira C.: *J. Insect Physiol.* 52, 593 (2006).
102. Indiragandhi P., Anandham R., Madhaiyan M., Ponguzhali S., Kim, G. H., Saravanan V. S., Sa T.: *J. Appl. Microbiol.* 103, 2664 (2007).
105. Hayashi A., Aoyagi H., Yoshimura T., Tanaka H.: *J. Biosci. Bioeng.* 103, 358 (2007).
106. Harmatha J., Dinan L.: *Phytochem. Rev.* 2, 321 (2003).
108. Riehle M. A., Brown M. R.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 855 (1999).

M. Pavlík^a, H. Ryšavá^{a,b}, and Z. Wimmer^a
^a *Isotope Laboratory, Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague,*
^b *Department of Plant Protection, Czech University of Life Sciences, Prague):* **Metabolism of Insect Ecdysteroids and Significance of Insect Intestinal Microbiota**

Metabolism of ecdysteroids, insect moulting hormones, is described including that of active (20E)-20-hydroxyecdysone, showing a low activity, and inactive 20-phosphate. Transformation of active to inactive ecdysteroids (and vice versa) must be rapid and simple, with minimum energy requirements. In addition to ecdysteroid biosynthesis from phytosterols via cholesterol, insect larvae can obtain ecdysteroids from food as nonpolar and inactive esters with fatty acids. These esters penetrate through the midgut into the hemolymph in contrast to more polar ecdysteroids. The larvae excrete useless ecdysteroids during 24 hours. Wide diversity is shown of detoxified and deactivated pathways of ecdysteroids in insects, determined by bioassay. The biotests in insects mainly ecdysteroid tests are described in detail, in relation to digestion, the influence of intestinal symbiotic microbiota, detoxification of xenobiotics and subsequent inhibition of pathogenic microorganisms. Regulation and reduction of intestinal microorganisms are affected by an increased content of (20E)-20-hydroxyecdysone during ecdysis. Based on the current knowledge, the use of ecdysis by agonist formation for plant protection in agriculture would be suitable because the specificity of ecdysteroid receptors is low and they react as activators or inhibitors of insulin signalling cascades.

Příloha literatury

5. Adler J. H., Grebenok R. J.: *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **34**, 253 (1999).
7. Uhlík O., Kamlár M., Kohout L., Ježek R., Harmatha J., Macek T.: *Steroids* **73**, 1433 (2008).
8. Dinan L., Harmatha J., Lafont R.: *J. Chromatogr., A* **935**, 105 (2001).
10. Pavlíková D., Pavlík M., Vašíčková S., Száková J., Tlustoš P., Vokáč K., Balík J.: *Appl. Organomet. Chem.* **18**, 619 (2004).
11. Grieneisen M. L.: *Insect Biochem. Molec. Biol.* **24**, 115 (1994).
12. Gilbert L. I., Rybczynski R., Warren J. T.: *Annu. Rev. Entomol.* **47**, 883 (2002).
13. Koolman J.: *Zool. Sci.* **7**, 563 (1990).
14. Subramoniam T.: *Comp. Biochem. Physiol., C* **125**, 135 (2000).
15. Sonobe H., Yamada R.: *Zool. Sci.* **21**, 503 (2004).
16. Makka T., Seino A., Tomita S., Fujiwara H., Sonobe H.: *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **51**, 111 (2002).
17. Yamada R., Yamahama Y., Sonobe H.: *Zool. Sci.* **22**, 187 (2005).
18. Maeda S., Nakashima A., Yamada R., Hara N., Fujimoto Y., Ito Y., Sonobe H.: *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* **149**, 507 (2008).
19. Davies L., Anderson I. P., Turner P. C., Shirras A. D., Rees H. H., Rigden D. J.: *Proteins* **67**, 720 (2007).
20. Yamada R., Sonobe H.: *J. Biol. Chem.* **278**, 26365 (2003).
21. Fujiwara Y., Tanaka Y., Iwata K. I., Rubio R. O., Yaginuma T., Yamashita O., Shiomi K.: *J. Insect Physiol.* **52**, 569 (2006).
22. Williams D. R., Chen J. H., Fisher M. J., Rees H. H.: *J. Biol. Chem.* **272**, 8427 (1997).
24. Feyereisen R.: *Annu. Rev. Entomol.* **44**, 507 (1999).
25. James M. O., Boyle S. M.: *Comp. Biochem. Physiol., C* **121**, 157 (1998).
26. Rewitz K., Styriřhave B., Andersen O.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **310**, 252 (2003).
27. Lafont R., Blais C., Beydon P., Modde J. F., Enderle U., Koolman J.: *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **1**, 41 (1983).
28. Kayser H., Winkler T., Spindler-Barth M.: *Eur. J. Biochem.* **248**, 707 (1997).
29. Hoffmann K. H., Wagemann M.: *Comp. Biochem. Physiol., Part A: Physiol.* **109**, 293 (1994).
30. Whiting P., Sparks S., Dinan L.: *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **35**, 279 (1997).
31. Makka T., Sonobe H.: *Zool. Sci.* **17**, 89 (2000).
32. Kamba M., Mamiya Y., Sonobe H., Fujimoto Y.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* **24**, 395 (1994).
33. Dinan L.: *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* **116**: 129 (1997).
34. Munyiri F. N., Ishikawa Y.: *J. Insect Physiol.* **50**, 1075 (2004).
35. Sakurai S., Kaya M., Satake A. I.: *J. Insect Physiol.* **44**, 867 (1998).
36. Wilder M. N., Fusetani N. Aida K.: *Fish. Sci.* **61**, 101 (1995).
37. Kelly T. J., Chen A. C.: *J. Insect Physiol.* **43**, 789 (1997).
38. Lee K. Y., Valaitis A. P., Denlinger D. L.: *J. Insect Physiol.* **43**, 897 (1997).
39. Blackford M., Clarke B., Dinan L.: *J. Insect Physiol.* **42**, 931 (1996).
40. Chudakova I., Maslennikova V., Luchnikova E.: *Zool. Jb. Physiol.* **86**, 45 (1982).
41. Behrens W., Hoffmann K. H.: *Int. J. Invert. Reprod.* **6**, 149 (1983).
44. Grau V., Lafont R.: *J. Insect Physiol.* **40**, 87 (1994).
45. Isaac R. E., Milner N. P., Rees H. H.: *Biochem. J.* **213**, 261 (1983a).
46. Thompson M. J., Svoboda J. A., Lozano R., Wilzer K. R. Jr.: *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **7**, 157 (1988).
47. Chen J. H., Hara T., Fisher M. J., Rees H. H.: *Biochem. J.* **299**, 711 (1994a).
48. Chen J. H., Kabbouh M., Fisher M. J., Rees H. H.: *Biochem. J.* **301**, 89 (1994b).
55. Zhang M., Kubo I.: *J. Chem. Ecol.* **18**, 1139 (1992).
56. Thiry E., Hoffmann K. H.: *Zool. J. Physiol.* **96**, 17 (1992).
59. Sommé-Martin G., Colardeau J., Lafont R.: *Insect Biochem.* **18**, 729 (1988).
62. Weirich G. F., Thompson M. J. Svoboda J. A.: *Insect Biochem.* **21**, 65 (1991).
63. Feyereisen R., Lagueux M., Hoffmann J. A.: *Gen. Comp. Endocrinol.* **29**, 319 (1976).
66. Hägele B. F., Wildi E., Harmatha J., Pavlík M., Rowell-Rahier M.: *J. Chem. Ecol.* **24**, 1733 (1998).
69. Singh P., Russell G. B., Fredericksen S.: *Entomol. Exp. Appl.* **32**, 7 (1982).
70. Shigematsu H., Moriyama H., Arai N.: *J. Insect Physiol.* **20**, 867 (1974).
71. Kubo I., Klocke J. A., Asano S.: *Agric. Biol. Chem.* **45**, 1925 (1981).
72. Kubo I., Matsumoto T., Klocke J. A.: *J. Chem. Ecol.* **10**, 547 (1984).
77. Knoll S., Rowell-Rahier M.: *Heredity* **81**, 412 (1998).
78. Hägele B. F., Rowell-Rahier M.: *Oikos* **85**, 234 (1999).
81. Kotzamanis Y. P., Gisbert E., Gatesoupe F. J., Infante J. Z., Cahu C.: *Comp. Biochem. Physiol., Part A: Mol. Integr. Physiol.* **147**, 205 (2007).

83. Suzer C, Çoban D., Kamaci H. O., Saka Ş. Firat K.: *Aquaculture* 280, 140 (2008).
84. Torsvik V., Daae F. L., Sandaa R. A., Øvreås L.: *J. Biotechnol.* 64, 53 (1998).
85. Laramée L., Lawrence J. R., Greer C. W.: *Can. J. Microbiol.* 46, 133 (2000).
87. Pavlík M., Jandurová O. M.: *Rostl. Výr.* 47, 536 (2001).
89. Pavlík M., Váňová M., Laudová V., Harmatha J.: *Rostl. Výr.* 48, 543 (2002).
91. Margulis L., Jorgensen J. Z., Dolan S., Kolchinsky R., Rqainey F. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 1236 (1998).
93. Georgieva-Tchakinska Y., Groudeva V., Shishiniova M.: *Biotechnol. Biotechnol. Eq.* 22, 820 (2008).
96. Frank D. N., Pace N. R.: *Curr. Opin. Gastroenterol.* 24, 4 (2008).
98. Whitaker J. O. Jr., Dannelly H. K., Prentice D. A.: *J. Mammal.* 85, 15 (2004).
103. Singh B. K., Walker A., Morgan J. A. W., Wright D. J.: *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4855 (2004).
104. Bodour A. A., Wang J. M., Brusseau M. L., Maier R. M.: *Environ. Microbiol.* 5, 888 (2003).
107. Harmatha J., v knize: *Proceedings of the Phytochemistry Society of Europe. Volume 45. Saponins in Food, Feedstuffs and Medicinal Plants* (Oleszek W., Marston A., ed.), kap. 14. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 2000.