

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.

**Juvenoidy a juvenogeny – možnosti jejich využití
v ochraně rostlin před herbivorním hmyzem**

Pavel Jedlička



Disertační práce
Přírodovědecká fakulta University Karlovy
Praha, 2008

Poděkování

Předkládanou disertační práci jsem vypracovával od června 2004 do prosince 2007 v Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i. (ÚOCHB) v Praze pod vedením konzultantů Doc. RNDr. I. Hrdého, DrSc. a Doc. Ing. Z. Wimmera, DrSc. (v současné době Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i.). Dále mým školitelem na Katedře ekologie (Přírodovědecká fakulta UK) byl Prof. RNDr. V. Jarošík, CSc. Výše zmíněným bych rád poděkoval za prostorové a materiální zabezpečení pro práci a za rady a pomoc při zpracování a prezentaci získaných dat.

Můj dík rovněž patří J. Kuldové, CSc. (ÚOCHB) za uvedení do metodiky testování juvenoidů a pomoc s jazykovou úpravou textu v mých výstupech a dále RNDr. K. Slámovi, CSc. (Entomologický ústav, Biologické centrum AV ČR, v.v.i.) a Prof. RNDr. J. Žďárkovi, DrSc. (ÚOCHB) za cenné konzultace a poskytnutí literatury.

Zvláštní poděkování věnuji mé ženě za velkou podporu a trpělivost.

Prohlášení

Výsledky uvedené v mé disertační práci ani jejich podstatnou část jsem nepředložil k získání jiného nebo stejného akademického titulu

.....

Obsah

1. ÚVOD K PROBLEMATICE - PŘEHLED LITERATURY	1
1.1 JUVENILNÍ HORMONY – PODSTATA, FUNKCE	1
1.2 VÝZKUM ANALOGŮ JUVENILNÍHO HORMONU – HISTORIE, CHEMICKÁ STRUKTURA A CÍLOVÉ ORGANISMY	3
1.2.1 Počátky výzkumu.....	3
1.2.2 Syntéza JHA, isoprenoidní juvenoidy (1965 – 1975).....	4
1.2.3 Syntetické juvenoidy po roce 1975.....	5
1.2.4 Současná éra bicyklických juvenoidů.....	6
1.3 VÝZKUM JUVENOIDŮ V ČESKÉ REPUBLICĚ.....	7
1.4 JUVENOGENY.....	9
1.5 JH A JHA versus MŠICE.....	10
1.5.1 Rozmnožování a morfy mšic	10
1.5.2 JH a mšice	11
1.5.3 JHA a mšice	11
1.5.4 Práce na mšicích v ÚOCHB	12
1.5.5 Hodnocení účinků juvenoidů na mšice, tabulky přežívání	13
1.6 CITLIVOST SLUNÉČEK (COLEOPTERA, COCCINELLIDAE) K JHA	14
1.7 MODELOVÝ DRUH RUMĚNICE POSPOLNÁ - <i>Pyrrhocoris apterus</i>.....	16
2. CÍLE PRÁCE.....	18
3. VÝSLEDKY	19
3.1 PUBLIKACE.....	19
3.1.1 Článek 1	19
3.1.2 Článek 2	30
3.1.3 Článek 3	43
3.2 KONFERENCE	51
3.2.1 Poster.....	51
3.3 NEPUBLIKOVANÉ VÝSLEDKY	54
3.3.1 Testy esterových juvenogenů na <i>Pyrrhocoris apterus</i>	54
4. SOUHRN	56
4.1 NAPLNĚNÍ CÍLŮ PRÁCE.....	56
4.2 VÝHLEDY DO BUDOUCNA	58
5. POUŽITÁ LITERATURA	60

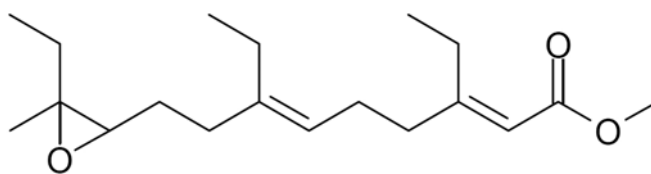
1. ÚVOD K PROBLEMATICE - PŘEHLED LITERATURY

1.1 JUVENILNÍ HORMONY – PODSTATA, FUNKCE

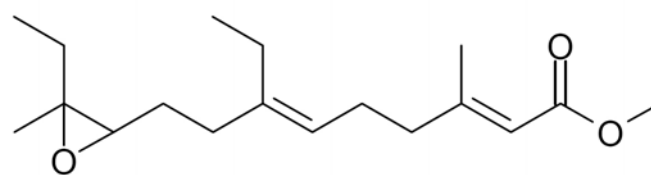
Juvenilní hormony (JH) jsou produktem specializovaných endokrinních žláz corpora allata (Sláma a kol., 1974; Nijhout, 1994). Tyto žlázy jsou buďto párové (u většiny hmyzu) a nebo splývají v jeden celek (jako v případě zástupců skupiny Hemiptera). Po chemické stránce jsou JH seskviterpenoidy s methylesterovou skupinou na jednom a epoxidovou skupinou na druhém konci řetězce. Za přibližně čtyřicet let výzkumu bylo popsáno jen šest strukturálně odlišných látek s označením JH (Obr. 1; Morgan, 2004). Syntéza JH v corpora allata je regulována neurohormony (allatotropin a allatostatin), zpětnovazebně specifickými JH esterázami, přítomností nebo absencí ovarii a přímo napojením na centrální nervový systém (Nijhout, 1994). Vzhledem k nepolární povaze těchto látek se předpokládá mechanismus jejich působení přímou interakcí s receptory jaderné DNA (jako u steroidních hormonů obratlovců). Tento princip byl popsán v buňkách tukového tělesa u saranče *Locusta migratoria* (L.) (Braun a kol., 1995) a švába *Leucophaea maderae* (Fabricius) (Engelmann, 1995) a dále u epidermálních buněk lišaje *Manduca sexta* L. (Riddiford, 1994). Současně však byl u folikulárních buněk ovarii zákeřnice *Rhodnius prolixus* Stall (Ilenchuk a Davey, 1985) a *L. migratoria* (Sevala a kol., 1995) popsán i mechanismus účinku JH vazbou na receptory buněčných membrán, který je jinak typický pro hydrofilní neurohormony peptidického charakteru. Molekulární charakteristika samotných receptorů JH stále není jasná. Známe pouze dva kandidáty – ultraspiracle (USP) a methoprene-tolerant (Met) gene u mušky rodu *Drosophila* sp. (Davey, 2000; Wheeler a Nijhout, 2003). Nejvýznamnější a nejvíce prostudovanou funkcí JH je vliv na vývoj hmyzu – tedy udržení larválních a inhibice vývoje imaginálních struktur. Dlouho přijímaná „teorie gradientu“ navržená Piephem (1950, 1951), který předpokládal postupný pokles titru JH u jednotlivých vývojových stadií: larva (vysoký titr) – kukla (nízký titr) – imago (žádný JH), je postupně nahrazovaná teorií „všechno nebo nic“, ukazující na důležitost presence nebo absence JH v cílových tkáních ve více méně jasně časově omezené tzv. citlivé (senzitivní) periodě – tedy v době, kdy dochází k přepnutí larválního programu na program syntézy imaginálních tkání (Sláma, 1975; Nijhout a Wheeler, 1982). Studium ultrastruktury kutikuly epidermálních buněk dokázali Sláma a Weyda (1997) reakci na přítomnost analogu JH v této citlivé periodě na úrovni jednotlivých buněk. Druhou podstatnou funkci hraje JH v reprodukci hmyzu. Jeho význam spočívá v iniciaci syntézy a produkce fosfoglykolipoproteinu vitellogeninu v tukovém tělese a umožnění jeho transportu

přes folikulární epitel do oocytů (Hoffman, 1995). Ve formě vitelinu je pak základním zdrojem výživy vajíček v průběhu vitelogeneze (Nijhout, 1994).

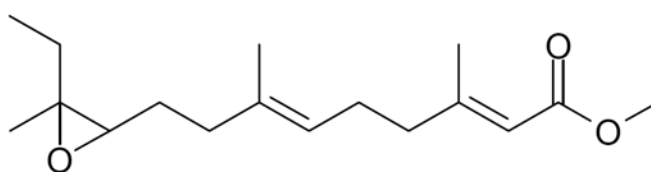
Obraz 1. Strukturní vzorce juvenilních hormonů.



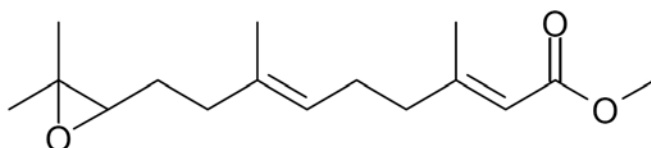
JH 0 – vajíčka lišaje *Manduca sexta*



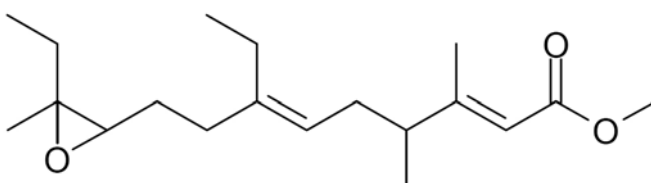
JH I – motýli (Lepidoptera), ve směsi s JH II



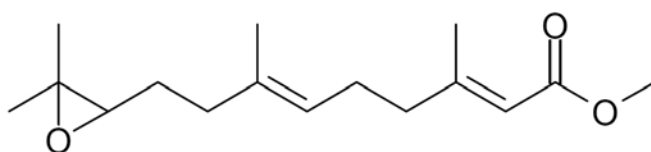
JH II - motýli (Lepidoptera)



JH III – řády rovnokřídlí (Orthoptera), brouci (Coleoptera), skupina řádů Hemiptera, blanokřídlí (Hymenoptera)



4-methyl-JH I – vajíčka lišaje *Manduca sexta*



JH III bisepoxid – vyšší mouchy (Diptera)

Další význam JH spočívá v diferenciaci kast u sociálního hmyzu, vlivu na fázový polymorfismus (sarančata), na polyfenismus mšic, terminaci diapauzy u hmyzu obecně a na další funkce spojené s výše popsanými (Nijhout a Wheeler, 1982; Hartfelder, 2000).

1.2 VÝZKUM ANALOGŮ JUVENILNÍHO HORMONU – HISTORIE, CHEMICKÁ STRUKTURA A CÍLOVÉ ORGANISMY

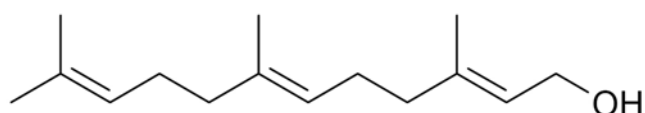
Syntetické analogy JH (dále jen JHA), juvenoidy, jsou látky vykazující účinek JH, které mohou být chemickou strukturou buď blízké, nebo i zcela odlišné od známých JH. Souhrnné práce podávající přehled o strukturální rozmanitosti syntetizovaných juvenoidů a jejich účinnosti na hmyz v laboratorních i polních podmínkách uveřejnili Sláma (1971), Sláma a kol. (1974), Staal (1975), Sláma (1981), Sláma (1985), Henrick (1991), Grenier a Grenier (1993), Miyamoto a kol. (1993), Wimmer (1997a), Dhadialla a kol. (1998), Hoffmann a Lorenz (1998) a Sláma (1999). Hlavně z těchto prací čerpá následující text.

1.2.1 Počátky výzkumu

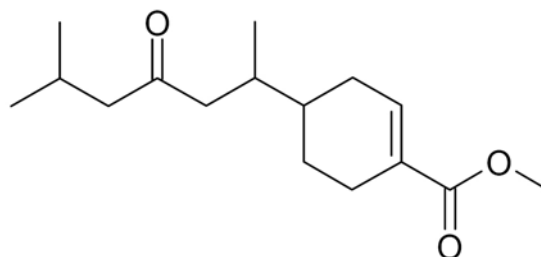
Možnosti využití JHA jako účinných insekticidů v boji proti ekonomicky významným druhům hmyzu předpověděl Carroll Williams v roce 1956 (Henrick, 1991). První látkou s aktivitou JH s definovanou chemickou strukturou byl seskviterpenoidní alkohol farnesol (Obr. 2), který byl původně známý jako běžná součást rostlinných olejů. Byl izolovaný z exkrementů potměníka *Tenebrio molitor* L. a z kvasinek (Schmialek, 1961). Následoval intenzivní výzkum terpenoidních látek s JH aktivitou jako jsou farnesylnmethylether a farnesyldiethylamin (Schneiderman a Gilbert, 1964). Teprve až lipidický extrakt z abdomenů martináče *Hyalophora cecropia* L. (známý jako „cecropia extract“) identifikovaný týmem Herberta Röllera, byl považován za pravý JH a je označován jako JH-I (Röller a Bjerke, 1965). Ovšem nejsilnějším impulsem k zahájení výzkumu juvenoidů byl objev „papírového faktoru“ Slámou a Williamsem (1965), kteří popsali vliv přítomnosti papíru z některých amerických tiskovin z jedle balzámové, *Abies balsamea* (L.) Mill., v chovech ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus* L.) na její vývoj. Díky tvorbě přechodných morfologických forem mezi imágem a nymfou, ploštice nebyly schopné dokončit imaginální ekdysi, popřípadě se svlékaly do dokonalých nadpočetných instarů. Látka, která tento jev způsobila byla později izolovaná a popsána jako methylester kyseliny todomatuové – juvabione (Bowers a kol., 1966; Černý a kol., 1967; Obr. 2) a po testování na řadě druhů hmyzu ukázala výlučnou účinnost na zástupce ploštic (Heteroptera) z čeledi ruměnicovitých – Pyrrhocoridae (Bowers a kol., 1966; Manville

a kol., 1977). Tato skutečnost podpořila původní Williamsovu myšlenku a předpoklad vysoké specifčnosti určitých JH v rámci třídy hmyzu minimálně na úrovni čeledi. Její rostlinný původ také vedl k hypotéze, že syntéza sekundárních metabolitů s JH aktivitou u určitých rostlin může být důsledkem jejich evoluční adaptace vedoucí k rezistenci proti herbivorům (Sláma a Williams, 1965).

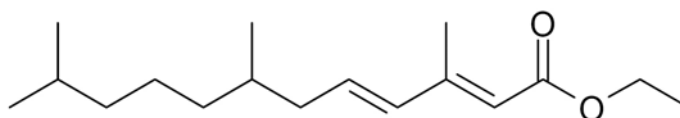
Obraz 2. Strukturní vzorce farnesolu, juvabione a komerčních alifatických juvenoidů.



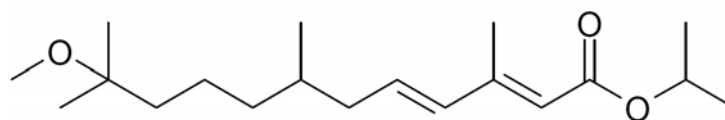
farnesol – rostlinné oleje, exkrementy potměníka *Tenebrio molitor*



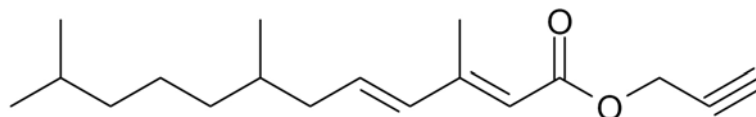
juvabione – jedle balzámová, *Abies balsamea*



hydroprene



methoprene



kinoprene

1.2.2 Syntéza JHA, isoprenoidní juvenoidy (1965 – 1975)

Výše popsané události odstartovaly „boom“ syntézy juvenoidů. Chronologicky řazená období jsou převzatá a upravená (Sláma, 1999).

Výzkum syntézy JHA isoprenoidní povahy kulminoval v letech 1965-70 (Williams a Robbins, 1968). Z počátku šlo o farnesoáty, popř. jejich chlorované deriváty (Law a kol., 1966; Romaňuk a kol., 1967). Ovšem největší biologickou účinnost v laboratorních a později i polních podmínkách ukázaly 2,4-dodekadienoáty vyvinuté firmou Zoecon Corp. v USA známé jako hydroprene a methoprene (Henrick a kol., 1973; Henrick, 1982; Obr. 2). Tyto látky byly obě patentovány v roce 1972 jako tzv. regulátory růstu hmyzu (IGR – Insect Growth Regulators) – hydroprene jako „Altozar“ a methoprene jako „Altosid“. Obě mají relativně jednoduchou, k přírodním isoprenoidům blízkou strukturu, s čímž souvisí i jejich relativně snadná biodegradabilita a malá zátěž pro životní prostředí. Methoprene byl prvním komerčně úspěšným juvenoidem a začal se prodávat v roce 1973 jako prostředek na regulaci populací komárů (Henrick, 1991). V této době také vznikla velká skupina aromaticko-terpenoidních éterů původně objevená Bowersem (Bowers, 1971), a skupina aromatických terpenoidních juvenoidů příbuzných juvabione (Suchý a kol., 1968; Mori a Matsui, 1970). Dalším novým typem látek byly juvenoidy peptidické povahy, z nichž některé vykazovaly vysokou aktivitu již při dávkách několika pikogramů na jedince u některých druhů ploštic čeledi Pyrrhocoridae (Zaoral a Sláma, 1970; Poduška a kol., 1971; Babu a Sláma, 1972). Poslední z citovaných prací popisuje i vysoký systemický účinek na ruměnici *Dysdercus cingulatus* (F.) přes slunečnici roční, *Helianthus annuus* L.

Juvenoidy syntetizované před rokem 1975 lze podle chemické struktury rozdělit na: 1. Acyklické terpenoidy; 2. Acyklické terpenoidy s heteroatomy v řetězci; 3. Typ Cecropia JH-I; 4. Typ juvabione; 5. Aromatické terpenoidní étery; 6. Peptidické JHA; 7. Ostatní neterpenické analogy; 8. Synergisté insekticidů příbuzné sesamexu (Sláma, 1971). Podrobnější členění lze nalézt v publikaci Sláma a kol. (1974).

1.2.3 Syntetické juvenoidy po roce 1975

Rok 1975 byl zlomový díky plné komerční registraci methoprene Americkou agenturou pro ochranu životního prostředí (EPA – Environmental Protection Agency) pod obchodní značkou Altosid®. Byl označen za první tzv. „bioracionální“ insekticid, tedy chemické agens přijatelné pro prostředí, jehož mechanismus působení není založen na přímé toxicitě látky, ale na ovlivnění fyziologie cílového druhu hmyzu (Henrick, 1991). Methoprene byl postupně registrovaný a s úspěchem používán na různé druhy komárů, much (např. *Haematobia irritans* L.), blech, motýlů (*Ephestia elutella* Hübner), brouků – *Rhyzopertha dominica* (Fabricius), *Oryzaephilus surinamensis* L. a *Lasioderma serricorne* F. a rovněž mravence *Monomorium pharaonis* (L.). Druhý 2,4-dodekadienoát – hydroprene, byl, vzhledem

k problémům s odbytem těchto pomalu působících insekticidů, registrovaný u EPA až v roce 1984 pod obchodní značkou Gencor[®]. Začal se prodávat a používat jako účinný prostředek proti švábům *Blattella germanica* (L.), u kterých způsobuje sterilitu.

Druhy hmyzu s krátkým vývojovým cyklem a vysokým reprodukčním potenciálem, tak jako zástupci řádů Auchenorrhyncha (křísi) a Sternorrhyncha (mery, molice, mšice a červci), jsou dobrou cílovou skupinou pro juvenoidy, zvláště v dobře definovatelném prostředí typu skleníků. Další z řady juvenoidů od společnosti Zoecon, kinoprene (Obr. 2), ukázal vysokou účinnost právě na zástupce Sternorrhyncha. V roce 1975 byl registrovaný proti mšicím a molícím na ochranu okrasných rostlin pěstovaných ve sklenících (Henrick, 1991).

1.2.4 Současná éra bicyklických juvenoidů

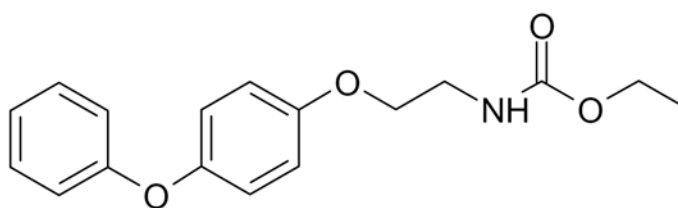
Vysoká biodegradabilita a nízká perzistence isoprenoidních juvenoidů vedla chemiky k syntéze stabilnějších aromatických sloučenin. Takovými JHA jsou CGA 045128 (Karrer a Farooq, 1981) a fenoxycarb (Masner a kol., 1981) vyvinuté vědci z firem Ciba-Geigy a Hoffmann-La Roche (Dr. R. Maag). Fenoxycarb byl prvním juvenoidem zavedeným do systému ochrany proti polním škůdcům (Miyamoto a kol, 1993; Obr. 3). Je dostatečně stabilní k použití proti polyvoltinním druhům motýlů (Lepidoptera) a proti řadě druhů červců (Sternorrhyncha, Coccoidea) v sadech a vinicích. V různých formulacích je používán na mravence ohňového, *Solenopsis invicta* Buren a v domácnostech na blechy a šváby. Nicméně podle Henricka (1991) jsou juvenoidy jako hydroprene a methoprene díky rychlé redistribuci aktivní složky v prostoru (těkavost – volatilita) účinnější. Mimoto methoprene ukázal v některých aplikacích relativně vyšší selektivitu pro cílové druhy hmyzu než fenoxycarb. Zvýšení stability juvenoidů vložením 4-fenoxyferyl skupiny do strukturálního vzorce juvenoidů srovnává Sláma (1999) s podobnou úpravou neurotoxických pyretroidů na příkladu fenvalerate (Obr. 3). Vědci japonské firmy Sumitomo Chemical Company vyvinuli řadu aromatických juvenoidů z nichž velkou biologickou aktivitu vykazoval pyriproxifen, který se s úspěchem prosadil i komerčně. Chemicky je pyriproxifen v podstatě také derivát 4-fenoxyfenolu jako fenoxycarb, jen alifatická část molekuly byla nahrazena pyridyl oxyethylenem (Obr. 3). Tento juvenoid je registrován proti mouchám, komárům, mravenci *S. invicta*, mšici broskvoňové, *Myzus persicae* (Sulzer), červci *Unaspis yanonensis* Kuwana a molici skleníkové, *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Sullivan, 2000). Srovnání účinků fenoxycarbu a pyriproxifenu podávají Grenier a Grenier (1993) a Miyamoto a kol. (1993). Dalším aromatickým juvenoidem s 4-fenoxyferyl skupinou je diofenolan (Obr. 3), který vykazuje aktivitu na škodlivé druhy motýlů a červců v sadech (Dhadialla a kol, 1998).

Po dlouhé době jedinou publikací popisující účinek strukturálně nových JHA je studie Martina Demutha a jeho kolegů, kteří testovali JH aktivitu mono- a polyenbenzenů na octomilce *Drosophila virilis* Sturtevant a motýlech *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) a *Araschnia levana* (L.) (Demuth a kol., 2007).

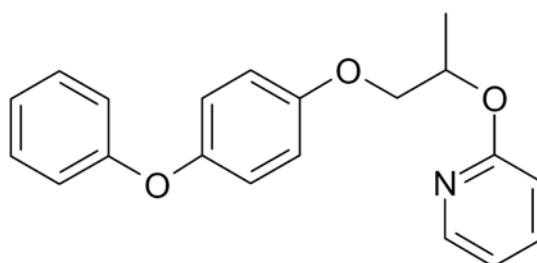
1.3 VÝZKUM JUVENOIDŮ V ČESKÉ REPUBLICĚ

Od objevení juvabione v polovině 60tých let minulého století až po současnost se výzkumníci pražského Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR (dále jen ÚOCHB) věnovali syntéze řady JHA a jejich testování na různých druzích hmyzu (Sláma a kol., 1974; Wimmer a kol., 1997a).

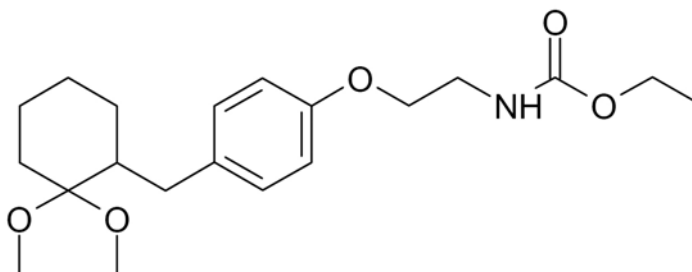
Obraz 3. Strukturální vzorce vybraných aromatických juvenoidů a fenvaleratu.



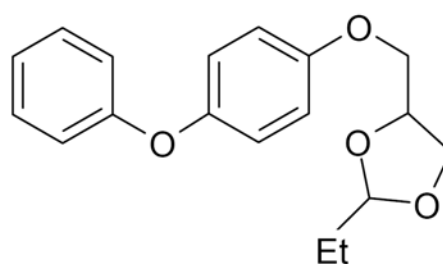
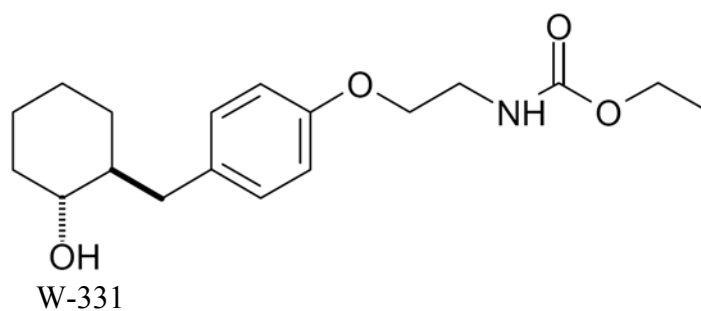
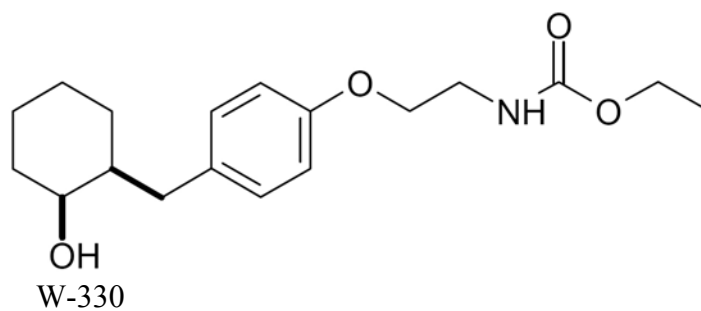
fenoxycarb



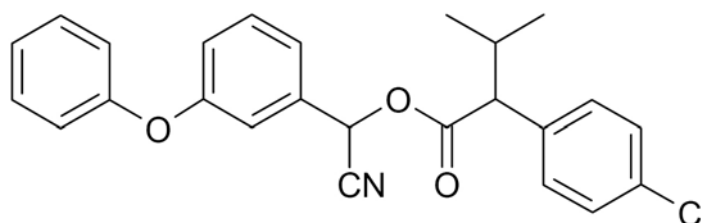
pyriproxifen



W-328



diofenolan



fenvalerate

Před rokem 1975 bylo v ÚOCHB syntetizováno a na řadě modelových druhů hmyzu otestováno množství alifatických juvenoidů popřípadě analogů s jedním aromatickým kruhem (Sláma a kol., 1974).

Přehled syntetizovaných bicyklických juvenoidů, tedy derivátů 2-(4-hydroxybenzyl)-1-cyclohexanonu a jejich účinností na hmyz předložil Wimmer a kol. (1997a). V této publikaci je uvedeno celkem 87 látek lišících se alifatickou podjednotkou a stereoizomerií. Všechny byly testovány na řadě druhů hmyzu a selektovány na základě získaných JH aktivit vyjádře-

ných v jednotkách ID50 nebo IC50 („Inhibition Dose“ nebo „Inhibition Concentration“ – množství látky, které způsobí 50 % potlačení metamorfózy v imago v μg na jedince nebo mg na ml media). Mezi testovanými druhy byly potěmník *T. molitor*, ploštice *D. cingulatus*, *P. apterus*, zavíječ voskový, *Galleria mellonella* (L.), *L. migratoria* a kyjatka hrachová, *Acyrtosiphon pisum* Harris. Hodnoty aktivit byly rovněž stanoveny pro dva juvenilní hormony (JH-I a JH-II) a pro komerčně dostupné juvenoidy (methoprene, fenoxycarb a pyriproxyfen). Vysokého účinku na *T. molitor* dosahovaly karbamátové estery, konkrétně analog známý pod označením W-328 a *cis* a *trans* izomery alkoholů karbamátových esterů s označením W-330 a W-331 (Obr. 3). ID50 v těchto testech byly plně srovnatelné s komerčními juvenoidy. Obecně nejúčinnější juvenoid W-328 byl v nedávné době laboratorně testován na termitech *Reticulitermes santonensis* (De Feytaud), *R. flaviceps* (Oshima) a *Coptotermes formosanus* Shiraki (Hrdý a kol., 2001) a švábovi *Blaberus craniifer* Br. (Goudey-Perrière a kol., 2003). Výsledky z prvních terénních pokusů v Austrálii ukázaly, že použitím analogu W-328 mohou být úspěšně eliminovány kolonie termita *Coptotermes lacteus* (Froggatt) (Lenz a kol., nepublikované výsledky; Hrdý a kol., 2001).

Studium biodegradace a toxicity degradačních produktů JHA identifikovaných pomocí značených izotopů je další oblastí výzkumu JHA v ÚOCHB (Wimmer a kol., 1997b; Tykva a kol., 1998; Forman a kol., 2002; Tykva a kol., 2004; Tykva a kol., 2005). Pro praktické použití výše popsaných karbamátových analogů jsou nejprínosnější výsledky z prací Forman a kol. (2002) a Tykva a kol. (2004). Z těchto vyplývá, že míra toxicity analogu W-328, měřená životaschopností lidských (HeLa) buněk, je srovnatelná s chlorovaným insekticidem DDT. Nicméně u jeho degradačního produktu (W-329) se toxicita snižuje (Forman a kol., 2002). Při srovnání degradability kvasinkou rodu *Candida* sp. a výše popsané toxicity značených *cis* a *trans* izomerů W-330 a W-331 se ukázalo, že analog W-330 je hůře degradovatelný a současně toxičtější. Na druhé straně právě tento izomer vykazuje vyšší juvenilizační účinky na některé druhy hmyzu (Tykva a kol., 2004; Wimmer a kol., 1997a).

1.4 JUVENOGENY

Historii juvenogenů jsem podrobně popsal v úvodu své publikace Jedlička a kol. (2007) a proto zde jen stručně popíšu jejich charakteristiku a informace v tomto článku neuvedené. Jde o komplexní sloučeniny z nichž se po aplikaci na hmyz uvolňuje enzymatickou činností aktivní JHA. Podle chemické struktury jsme se doposud zabývali dvěma typy juvenogenů – esterovými a glykosidickými.

První skupinou jsou estery juvenoidů s alkoholovou skupinou a organických kyselin. K aktivaci (uvolnění) juvenoidu u nich dochází činností nespecifických karboxylesteráz (Sláma a Romaňuk, 1976; Sláma a kol., 1978a). Na základě současných výsledků z výběrových testů esterů mastných kyselin a výše uvedených alkoholů karbamátových juvenoidů W-330 a W-331 je tento typ juvenogenů považován za možný nástroj na regulaci termitích kolonií (Wimmer a kol., 2002; Hrdý a kol., 2004a; Hrdý a kol., 2006). Z těchto prací vyplývá, že nejúčinnějším juvenogenem byl ester alkoholu W-330 a kyseliny máselné. Později při polních testech se však ukázalo, že tato látka, vzhledem k silnému pachu po kyselině máselné, není v praxi použitelná (Hrdý a kol., 2004b). Proto je v současné době snaha hledat k daným juvenoidům jiné organické kyseliny. První takovou sérií juvenogenů jsou estery zmíněných juvenoidů a nenasycených kyselin jejichž syntéza a první biologické testy byly recentně publikovány (Wimmer a kol., 2007a).

Druhou skupinou juvenogenů jsou alkylglykosidy připravené z monosacharidů (glukózy nebo galaktózy) a juvenoidů s alkoholovou skupinou. Popsané a testované byly poprvé Slámou a kol. (1978b), nicméně přesný popis jejich syntézy a měření enantiomerní čistoty získaných produktů byly publikovány až nyní (Wimmer a kol., 2007b). Tyto sloučeniny byly a priori designované jako potenciální systemické pesticidy. Vycházelo se ze znalostí aktivit specifických β -glykosidáz přítomných pouze v zažívacím traktu hmyzu (Sláma a kol., 1978b; Sláma a Němec, 1981; Sláma, 1981). Další informace o glykosidických juvenogenech jsou uvedené v příložené práci Jedlička a kol. (2007).

1.5 JH A JHA VERSUS MŠICE

1.5.1 Rozmnožování a morfy mšic

Mšice (Sternorrhyncha, Aphidoidea) se rozmnožují rodozměnou – heterogonií (Miller, 1956; Dixon, 1985). To znamená, že v průběhu roku střídají několik nepohlavně se rozmnožujících (=parthenogenetických) generací s jednou rozmnožující se pohlavně (=amfigonní). Parthenogenetické samice se nazývají virgines (=panny) a vyskytují se během vegetační sezóny. Poslední generace panen, sexupary, se objevuje na podzim a dává vznik pohlavním jedincům (sexuales) – oviparám (samicím) a samcům. Ty se potom spáří a přezimují nakladená vajíčka. Virginy a ovipary jednoho druhu mšic se navzájem liší vnější i vnitřní morfologií a jako takové představují různé formy – morfy v rámci jednoho druhu. Tento jev, kdy z jednoho genotypu mohou za daných podmínek prostředí vznikat různé fenotypy, se nazývá polyfenismus popř. sezónní polymorfismus (např. Lees, 1966; Tagu, 2005). Poslední morfologickou modifikací mšic, kterou zmíním jsou alates tedy okřídlené mšice

(tzv. migrantes). Ty vznikají buď jako ekologická alternativa parthenogenetických virgines či jako geneticky determinovaní samci u sexuales (genetický polymorfismus; Caillaud a kol., 2002). Pokud sexuales určitého druhu využívají stejný typ hostitele jako virgines nazýváme tento autoekním (monocyklickým), pokud ho mění je to druh heteroekní (dicyklický).

1.5.2 JH a mšice

Jako juvenilní hormon mšic byl identifikován již dříve známý JH III u kyjatky vikvové, *Megoura viciae* Buckton a recentně u *A. pisum* (Hardie a kol, 1985; Westerlund a Hoffmann, 2004). Ten byl ovšem přítomen ve velmi nízké koncentraci vzhledem k hmotnosti analyzovaného vzorku, proto autoři nevyloučili možnost, že může existovat ještě jiný tzv. juvenilizační faktor v těle mšic. Funkce JH u mšic byla odvozena z aplikací JHA na jedince specifické morfy a podmínkami prostředí chovů (délkou světelného dne a teplotou). JH má vliv na tři fyziologické procesy související s rozmnožováním mšic. První dva jsou společné s ostatním hmyzem – jde o vliv na vývoj vnějších a vnitřních imaginálních struktur – rudimentálních gonapophys a ovarii a přímý vliv na plodnost – negativní ovlivnění vývoje embryí u parthenogenetických morf (např. Lees, 1966; Benskin a Perron, 1973; Mittler a kol., 1976). Funkcí specifickou pro mšice je potom vliv JH na určení typu vznikající morfy u sexupar při krátké fotoperiodě a snížené teplotě. Experimentálně bylo zjištěno, že aplikace JH nebo JHA potlačí vliv podmínek prostředí na jejich nervovou soustavu. Namísto ovipar se pak diferencují přechodné formy mezi oviparami a virginoparami popřípadě čisté virginopary (Hardie, 1984; Nijhout a Wheeler, 1982; Tagu a kol., 2005).

1.5.3 JHA a mšice

Pro studium JHA jsou mšice jako model vhodné hlavně ze dvou důvodů: 1. jsou významnými škůdci zemědělských plodin a 2. mají rychlý vývoj a tedy velký počet generací za sezónu – což znamená, že při případném ošetření juvenoidem je relativně stále procento jedinců v citlivé periodě.

Pionýrské práce o juvenilizačním účinku *trans-trans* farnesolu a tzv. „cecropia extraktu“ na vývoj kyjatky vikvové, *M. viciae* předložil Lees (1961, 1966). White (1968) a White a Lamb (1968) získali údaje o aktivitě směsi juvenoidů (tzv. „Law mixture“) včetně methyl 7,11-dichlorodihydrofarnesátu na mšici zelnou, *Brevicorine brassicae* (L.). První komerční JHA s alifatickou strukturou vyvinuté firmou Zoecon corporation hydroprene a kinoprene byly testované na mšici *M. persicae* (Nassar a Staal, 1971; Nassar a kol., 1973). Hrdý (1974) uveřejnil srovnávací studii účinků hydroprene a kinoprene spolu s dalšími juvenoidy

a organofosfátem malathionem na třech druzích mšic – *M. persicae*, *Aphis fabae* Scop. a *Therioaphis maculata* (Buckton). Hydroprene a kinoprene ukázali vyšší účinnost než malathion, (vyjádřeno v jednotkách EC50 /Effective Concentration/ – účinná koncentrace juvenoidu, při které je u 50 % jedinců zaznamenán juvenilizační účinek). Byla ověřena předpokládaná spřažená rezistence (cross resistance) malathion-rezistentního kmenu *M. persicae* k hydroprene. Při testech kinoprene na mšice s různou úrovní rezistence proti malathionu, se prokázala jeho negativně korelovaná účinnost. Znamená to vyšší účinek kinoprene na kmeny malathion-rezistentní a jeho nižší aktivitu u kmenů citlivých (Hrdý, 1974). Ovšem díky zjištěné vysoké toxicitě kinoprene (Thanassoulopoulos, 1974), nenaplnil tento juvenoid předpoklad čistě hormonálního účinku. Další práce z této doby viz Kuldová (1989) – kapitola „2.2. Účinnost juvenoidů na mšice“.

Pyriproxifen je v současnosti nejvíce testovaným a zkoumaným juvenoidem na mšicích. Jeho juvenilizační účinky byly popsány na mšicích *Aphis glycines* Matsamura, *M. persicae*, *Lipaphis erysimi* (Kaltenbach), *Aphis gossypii* (Glover), *A. pisum* (Richardson a Lagos, 2007; Sullivan, 2000; Liu a Chen, 2001; Kerns a Stewart, 2000; Gao a Hardie, 1996). Nicméně i na tuto nadějnou látku byla již popsána rezistence u mšicím příbuzných molic (Sternorrhyncha, Aleyrodoidea), konkrétně u některých kmenů molice skleníkové, *T. vaporariorum* (Westwood) a molice *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Ishaaya a Horowitz 1995; Horowitz a Ishaaya, 1994).

Nejčastějšími účinky juvenoidů na mšice shrnuté z výše uvedených prací jsou: nadpočetná svlékání popř. produkce přechodných forem mezi nymfou a imagem (většinou s deformovanými nebo nevyvinutými strukturami), redukce plodnosti (nedostatečně vyvinutá embrya) a přežívání, přímá toxicita, potlačení vlivu krátké fotoperiody – produkce virginopar namísto ovipar a jejich přechodných forem.

1.5.4 Práce na mšicích v ÚOCHB

Ethyl a methyl 11-chlor-3,7,11-trimethyl-2-dodecenoát byly prvními juvenoidy navržené a syntetizované v ÚOCHB, testované na *Phorodon humuli* (Schrank) a tři výše uvedené druhy mšic (Hrdý a Zelený, 1973; Hrdý, 1974). Nejrozsáhlejší studii popisující vztah mezi chemickou strukturou JHA a jejich biologickou aktivitou na mšicích podává Kuldová (1989). Pomocí postřikové metody („spray residue“ testu) je zde zkoušena řada 21 nově syntetizovaných juvenoidů (6 alifatických a 15 aromatických) na mšici *A. pisum*. Nejvýznamnějším výsledkem této práce bylo zjištění vysoké účinnosti již zmíněného

karbamátu W-328. Ten byl o řád účinnější než u komerční hydroprene, který byl použit jako referenční juvenoid (Kuldová a kol., 1994). Na základě tohoto výsledku byl juvenoid W-328 podroben nejdříve laboratornímu a poté polnímu testu na *P. humuli* (Kuldová a kol., 1998). Zatímco zkoušky z ošetření na semenáčcích a jednotlivých rostlinách chmele byly velmi slibné, výsledky z komerční chmelnice nebyly jednoznačné. Vzhledem k vysoké rychlosti růstu chmele stihla přeživší část populace migrovat z ošetřených částí na čerstvé neošetřené výhonky (Kuldová a kol., 1998). První testy na systemický účinek glykosidických juvenoidů na *A. pisum* byly zmíněny v práci Wimmer a kol. (2006).

1.5.5 Hodnocení účinků juvenoidů na mšice, tabulky přežívání

Při testech biologické aktivity JHA se u testovaných druhů hmyzu hodnotí tzv. juvenilizační efekt (účinek) – tedy míra zachování larválních morfologických znaků po poslední (předpokládané imaginální) ekdyzi jedince. Tato je vyjadřovaná hmotností (ID = Inhibition Dose v $\mu\text{g}\cdot\text{ind}^{-1}$) nebo koncentrací (IC = Inhibition Concentration v $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) daného juvenoidu, která způsobí u každého jedince 50 % juvenilizační efekt nebo jinými slovy 50 % inhibici metamorfózy – ID50 a IC50 (Sláma a kol., 1974; Wimmer a kol., 1997a).

Standardizaci metodiky hodnocení účinků JHA na mšice se věnoval Hrdý (1974, 1981). Běžné hodnocení juvenilizačních účinků JHA odstupňovanou škálou přechodných morfologických forem (Sláma a kol., 1974; Staal, 1975) bylo používáno i u mšic (Nassar a Staal, 1971; Nassar a kol., 1973). Vzhledem k tomu, že u různých druhů mšic bylo udáváno různé období pro citlivou periodu (většinou II. a III. instar), Hrdý (1974, 1981) zavedl jediné kritérium pro hodnocení juvenilizačního účinku JHA – retence larvální kaudy u jedinců po IV. (za normálních podmínek imaginální) ekdyzi.

Vyjadřování účinnosti látky na hmyz v jednotkách ID50 a IC50 vychází z metod hmyzí toxikologie (Bushvine, 1957). V současné době je žádoucí, aby (eko-)toxikologické studie také zahrnovaly, kromě vyjádření tzv. akutní toxicity (popř. inhibice vývoje), sestavení tzv. tabulek přežívání (life tables) a následné výpočty demografických charakteristik (Walthall a Stark, 1997; Stark a Banks, 2003). Základní demografické charakteristiky a jejich výpočet jsou shrnuty v Tabulce 1. Zatímco testy akutní toxicity vyjadřují účinek dané látky na průměrného jedince, hlavní výhodou užití demografických charakteristik je, že tyto výsledky lze vztahovat na celé populace. Demografické studie dále zahrnují celý život studovaného organismu a míru růstu jeho populace. Nejvýznamnějším parametrem pro srovnání toxicity/inhibice dané látky na různé druhy živočichů je potom vnitřní rychlost růstu – r_m (intrinsic rate of increase; Stark a Banks, 2003). Důkaz významu použití těchto charakteristik na příkladu sledování vlivu in-

sekticidu imidacloprid a těžkého kovu (kadmium) na populaci mšice *A. pisum* předložil Laskowski (2001).

Jediné dosud publikované práce popisující demografické charakteristiky a jejich změny po aplikování rostoucích koncentrací juvenoidu jsou na mšici bavlníkové, *A. gossypii* a na mšici *L. erysimi* (Kerns a Stewart, 2000; Liu a Chen, 2001). Více v příložené publikaci Jedlička a kol. (2007).

Tabulka 1. Základní demografické charakteristiky používané při sestavování tabulek přežívání (podle Walthall a Stark, 1997).

Symbol	Popis charakteristiky	Výpočet
X	Věk (dny)	-
L_X	Věkově specifické přežívání samic ke dni X	-
M_X	Věkově specifická plodnost samic věku X	-
U_X	Realizovaná plodnost	$L_X M_X$
R_0	Čistá reprodukční rychlost	$\sum_{x=0}^{\infty} L_X M_X$
T	Průměrná generační doba	$\frac{\sum_{x=0}^{\infty} x L_X M_X}{R_0}$
r_m	Vnitřní rychlost růstu	$\frac{(\log_e R_0)}{T}$

1.6 CITLIVOST SLUNÉČEK (COLEOPTERA, COCCINELLIDAE) K JHA

Z pohledu integrované ochrany rostlin je požadovaná vysoká selektivita aplikovaných insekticidů. V praxi to znamená vysokou účinnost na cílový organismus a neškodnost pro jeho přírodní predátory. Z tohoto důvodu byly JHA současně s testy na mšicích zkoušeny i na jejich bioregulátorech včetně slunéček.

Zde uvádím několik příkladů prvních testů JHA na slunéčkách. Bull a kol. (1973) popsali vysokou účinnost hydroprene a dalších juvenoidů na významného predátora mšice bavlníkové – slunéčko *Hippodamia convergens* Guerin. Hrdý a Zelený (1973) zaznamenali negativní vliv hydroprene a ethyl 11-chlor-3,7,11-trimethyl-2-dodecenoátu na líhnutí vajíček slu-

něček *Adalia bipunctata* L. a *Coccinella septempunctata* L. Hrdý a kol. (1975) rovněž zjistili výrazný účinek hydroprene a kinoprene na *H. convergens*, ale také na další afidofágní slunéčko *Cycloneda limbifer* Casey.

Hrdý (1981) udává, že vzhledem k různým metodickým přístupům nelze údaje o účinnosti JHA na mšice dobře porovnat s údaji na účinnost těchto látek na jejich predátory. Tento autor porovnal výsledky pokusu na mšicích (Hrdý, 1974) a paralelního testu na sluněčku *H. convergens* s údaji o účinnosti některých klasických insekticidů. Došel k závěru, že ve srovnání s parathion, diazinon a DDT se juvenoidy hydroprene, kinoprene a ZR 699 nejeví jako příliš selektivní. Hydroprene v dalších pokusech ukázal stejnou míru toxicity jako organofosfát malathion na další druh sluněčka *Semiadalia undecimnotata* (Schneider). Z autorových závěrů vyplývá, že testované juvenoidy nelze považovat za dostatečně selektivní (Hrdý, 1981).

Kuldová (1989) stanovovala účinnost dvou juvenoidů syntetizovaných v ÚOCHB (W-328 a strukturou blízký juvenoid W-147) na sluněčkách *C. septempunctata* a *C. limbifer*. Látky byly testovány topikálně (na čerstvě svlečené kukly) a postřikovacím reziduálním testem (přímo na sluněčka v postřikové věži). Vyjádřeno hodnotami ID50 a IC50, oba druhy sluněček se ukázaly být stejně nebo dokonce více citlivé k testovaným juvenoidům než cílový druh mšice *A. pisum*. Důležitým zjištěním zde bylo dále velké rozpětí v citlivosti jednotlivých testovaných sluněček. Na druhé straně při topikální aplikaci W-328 na dospělé jedince *C. septempunctata* nebyla zaznamenána žádná toxicita ani vliv na reprodukci.

Dále Olszak a kol. (1994) udává vliv některých látek ze skupiny tzv. regulátorů růstu (Insect Growth Regulators) na vajíčka, larvy a dospělé *A. bipunctata* a *C. septempunctata*. Použitím fenoxycarbu se redukovala plodnost dospělců obou druhů a to hlavně při podávání kontaminovaných mšic ke krmení.

Citlivost sluněček k JHA může být zvýšena nevhodnou potravou při absenci preferovaného druhu (popř. druhů) mšic (Kalushkov, 1999).

Většina dostupné literatury na téma sledování toxicity JHA a jejich účinků na vývoj a plodnost sluněček se v současné době zabývá druhy živíci se červci (Sternorrhyncha, Coccoidea), molicemi (Sternorrhyncha, Aleyrodidea) a fytofágními roztoči (Acarina). Zde jsou uvedeny některé příklady.

Hatting a Tate (1995) popsali vliv reziduí pyriproxyfenu a některých inhibitorů syntézy chitinu po aplikaci na červce *Aonidiella autantii* (Maskell) (Sternorrhyncha, Coccoidea) na sluněčka *Chilocorus nigrita* (Fabricius) a *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant. U vajíček nakla-

dených dospělci *C. nigrita* na ošetřené listy byla téměř stoprocentně potlačená líhivost a to i u reziduí starých 19 týdnů. Nicméně, počet kladených vajíček nebyl u tohoto druhu ovlivněn. Týden stará rezidua pyriproxyfenu a triflumuronu významně redukovala počet nakladených vajec u *C. montrouzieri*.

Smith a kol. (1999) zjišťovali reziduální toxicitu pyriproxyfenu u slunéček *C. montrouzieri* a *Chilocorus circumdatus* Gyllenhal – klíčových predátorů červců škodících na citrusech v jižním Queenslandu. Různá vývojová stádia slunéček byla vystavená listům pomeřančovníku po postřiku pyriproxyfenem v šesti koncentracích. U obou druhů zaznamenali zvýšenou mortalitu larev, inhibici vzniku kukel, potlačení líhnutí z vajíček a kombinovaný účinek na larvy i vajíčka v dávkách mezi 10 a 100 mg.L⁻¹. Narušení vývoje larev a líhivosti vajíček bylo dosaženo už při koncentracích 2 a 5 mg.L⁻¹.

Cloyd a Dickinson (2006) sledovali toxicitu řady insecticidů, včetně pyriproxyfenu, na slunéčko *C. montrouzieri* – přirozeného predátora červce *Planococcus citri* (Risso) postřikem v laboratoři. Pro tento JHA zaznamenali jednu z nejnižších hodnot mortality z testovaných látek.

Z výsledků dalších srovnávacích studií účinku pyriproxyfenu a buprofezinu (inhibitoru syntézy chitinu) na mortalitu a vývoj různých stádií některých druhů slunéček vyplývá, že juvenoid může být méně toxický a tedy vhodnější pro zařazení do systému integrované ochrany rostlin než inhibitor syntézy chitinu (Liu a Stansly, 2004; Magagula a Samways, 2000).

Biddinger a Hull, (1995) testovali toxicitu řady insekticidů včetně juvenoidu fenoxycarbu na vajíčka, larvy, kukly a imaga slunéčka, *Stethorus punctum* (LeConte) – predátora fytofágních roztočů. Z jejich výsledků vyplývá, že fenoxycarb měl ovicidní účinek v laboratoři a v polních podmínkách vykazoval rušivý vliv na ekdyzi z larev na kukly.

Z výše uvedených prací vyplývá, že JHA obecně zvyšují mortalitu, potlačují vývoj a plodnost slunéček. Nicméně jednotlivé druhy se v reakci vyjádřené těmito charakteristikami mohou výrazně lišit. Proto je nezbytné, aby začlenění JHA do specifického systému ochrany (hostitelská rostlina – mšice – slunéčko) předcházely laboratorní a polní testy těchto látek v daném systému.

1.7 MODELOVÝ DRUH RUMĚNICE POSPOLNÁ - *PYRRHOCORIS APTERUS*

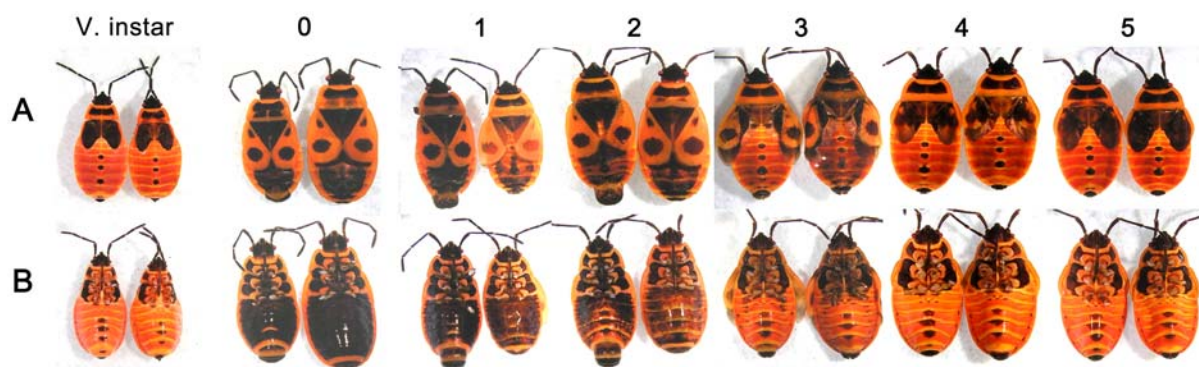
Biologie této na chov nenáročné a dobře dostupné ploštice je u nás studována už téměř padesát let (k prvním fyziologickým publikacím patří práce Nováka a Červenkové, 1960). Většinu

získaných informací o taxonomii, bionomii, fyziologii a genetice *P. apterus* shrnul ve své práci Socha (1993).

Chemická struktura JH není zatím u celého řádu ploštic (Heteroptera) identifikovaná. Bylo jen zjištěno, že jejich corpus allatum produkuje látku jiné chemické struktury než jsou dosud popsané JH (Baker a kol., 1988; Kotaki, 1996; Hodková a kol., 1996). Nicméně díky základním fyziologickým technikám jako jsou excize, implantace a reimplantace žláz corpus allatum a corpora cardiaca a jejich kombinace, u této ploštice přesně známe výše zmíněnou citlivou periodu (viz. kapitola 1.1), při které je za fyziologicky normálních podmínek corpus allatum nečinné. Tento poznatek využíváme při testování JHA, kdy v závislosti na aktivitě látky a době aplikace v rámci citlivé periody dostáváme po imaginální ekdyzi řadu přechodných morfologických forem mezi imágem a larvou tzv. adultoidů, ale i dokonalé nadpočetné larvální instary (Sláma a kol., 1974; Sláma, 1985; Obr. 4).

Přesné vymezení senzitivní periody a velká citlivost *P. apterus* na řádově tisíce JHA (Sláma, 1985), umožňuje tento druh používat jako model pro základní srovnávací testy nově syntetizovaných látek (Sláma a kol., 1974; Wimmer a kol., 1997a). Ty jsou na *P. apterus* aplikovány buď topikálně nebo perorálně (viz metodika v Jedlička a kol., 2007).

Obraz 4. Vliv JHA na metamorfózu ruměnice *Pyrrhocoris apterus*. A – náhled na dorsum, B – náhled na ventrum. Samci jsou na levé a samice na pravé straně v každém páru. Stupnice hodnocení popisující míru morfologických změn: 0 – normální dospělec, 1 – 4 adultoidi a 5 – supernymfy (dokonalé nadpočetné instary). Pro srovnání jsou zařazeni i jedinci V. instaru.



2. CÍLE PRÁCE

Hlavními otázkami mé práce bylo:

- Jaký účinek mají vybrané juvenoidy a juvenogeny různé chemické struktury testované na modelové druhy hmyzu?
- Mohou být tyto látky vhodné pro použití v ochraně rostlin před mšicemi a současně bezpečné pro jejich predátory – slunéčka?

Na základě těchto otázek jsem potom formuloval vlastní cíle práce:

- I. Testování biologické aktivity řady juvenoidů a juvenogenů na modelových druzích hmyzu – ruměnici pospolné, *Pyrrhocoris apterus* a kyjatce hrachové, *Acyrtosiphon pisum*
 - Biotesty juvenoidů a juvenogenů syntetizovaných v ÚOCHB a srovnání jejich účinnosti se známými komerčními juvenoidy. Použití topikálních a perorálních aplikací na *P. apterus* a aplikace přes kořeny hostitelské rostliny u *A. pisum* – systemický účinek
 - Hodnocení získaných dat, posouzení vztahů mezi chemickou strukturou JHA a jejich juvenilizačním účinkem
 - Výběr perspektivních látek pro následné testování
- II. Formulování závěrů pro další výzkum a pro praktické aplikace
- III. Odhad účinnosti juvenoidů a juvenogenů při začlenění vybraných látek do tri-trofického systému: hostitelská rostlina (bob koňský – *Vicia faba* L.), mšice *A. pisum* a slunéčko *Cycloneda limbifer*
 - Krmení larev a dospělců slunéčka mšicemi kontaminovanými JHA a sledování vlivu na vývoj a plodnost
 - Experimenty v izolátorech: Vypuštění larev (nebo dospělců) slunéček na lov mšic sajících na rostlinách systemicky ošetřených vybraným juvenoidem.

4. SOUHRN

4.1 NAPLNĚNÍ CÍLŮ PRÁCE

I. Testování biologické účinnosti řady juvenoidů a juvenogenů na modelových druzích hmyzu – ruměnici pospolné, *Pyrrhocoris apterus* a kyjatce hrachové, *Acyrtosiphon pisum*.

- Biotesty juvenoidů a juvenogenů syntetizovaných v ÚOCHB a známých komerčních juvenoidů pro srovnání jejich účinnosti. Použití topikálních a perorálních aplikací na *P. apterus* a systemická aplikace přes kořeny hostitelské rostliny u *A. pisum*.

Pyrrhocoris apterus

Pomocí obou aplikačních metod jsem na tomto modelovém druhu otestoval celkem 41 různých JHA. Z toho bylo 15 juvenoidů (4 komerčně používané, 2 z jedle balzámové, *A. balsamea* a 9 syntetizovaných v ÚOCHB) a 26 odvozených juvenogenů (14 esterových a 12 glykosidických).

Acyrtosiphon pisum

Na základě výsledků z předchozích testů (Kuldová, 1989) a údajů z dostupné literatury (Liu a Chen, 2001; Kerns a Stewart, 2000) jsem pro testy systemického účinku vybral 11 JHA.

- Hodnocení získaných dat, zvážení vztahů mezi chemickou strukturou JHA a jejich juvenilizačním účinkem.

Pyrrhocoris apterus

Při srovnání účinností juvenoidů a z nich odvozených juvenogenů jsem u dvou skupin esterových juvenogenů (estery mastných kyselin a nenasycené estery) zaznamenal stejnou nebo vyšší biologickou aktivitu při topikální aplikaci a vždy výrazně nižší účinnost při aplikaci perorální. Vzhledem k tomu, že relativně stejná účinnost juvenoidů s jejich juvenogeny znamená vyšší účinnost juvenogenů na molární úrovni, má tento strukturní typ JHA naději být vhodným kontaktním pesticidem proti fytofágnímu hmyzu.

U glykosidických juvenogenů odvozených z α,β -nenasycených esterů jsem potvrdil vysoký a výlučně systemický účinek na *P. apterus*, který byl již dříve demonstrován na plošticí *D. cingulatus* (Sláma a kol., 1978b). Na druhé straně deriváty tohoto typu odvozené od karbamátových juvenoidů ukázaly, kromě relativně vysoké systemické aktivity, i kontaktní účinek. Příčinou může být menší fyzikální stabilita těchto glykosidů.

Acyrtosiphon pisum

Navzdory předpokladům, glykosidické juvenogeny neprojeví vyšší systemickou aktivitu než jejich „parentální“ juvenoidy.

Nedostatečná účinnost glykosidických juvenogenů může mít mnoho příčin. Nevíme jak probíhá příjem a transport těchto látek rostlinou popřípadě jestli a jak je látka metabolizována. Na druhé straně se nepodařilo dokázat předpokládaný systemický účinek ani podáváním juvenoidu a jeho juvenogenu mšicím v roztoku sacharózy přes parafilmové membrány, tedy s vyloučením rostliny z testovacího systému. Vzhledem k faktu, že pro samotný juvenoid (typ α,β -nenasycených esterů) v postřikových testech byla zaznamenána relativně vysoká účinnost právě na *A. pisum* (Kuldová, 1994), lze absenci systemického účinku vysvětlit dvěma způsoby. Glykosidy (nebo z nich enzymaticky uvolněné juvenoidy) nemusely být vůbec vstřebány epitelem trávicího traktu a mohly být spolu s oligosacharidy „přefiltrovány“ do zadního střeva a pak v medovici vyloučeny z těla mšice ven. Druhou příčinou mohla být různá úroveň degradace těchto JHA ať už v trávicím traktu nebo v hemolymfě.

- Výběr perspektivních látek pro následné testování

Juvenoid W-331

Nejvyšší systemický účinek byl zaznamenán u *trans* izomeru karbamátového juvenoidu W-331. Ten v následném „dose response“ experimentu ukázal podobný charakter změn demografických charakteristik mšice *A. pisum*, jaký popisují autoři prací s blízkou tématikou – Liu a Chen (2001) a Kerns a Stewart (2000).

II. Formulování závěrů pro další výzkum a pro praktické aplikace

- Ze získaných výsledků vyplývá, že zkoušené glykosidické juvenogeny nelze doporučit jako potenciální systemické insekticidy proti mšicím. Jejich podávání ve vod-

ném roztoku pro plošnice *D. cingulatus* a *P. apterus* tak zůstává jediným funkčním modelem, z kterého lze pro další úvahy o jejich aplikaci vycházet.

- V testech systemické účinnosti JHA na mšici *A. pisum* obstál jediný JHA syntetizovaný v ÚOCHB – juvenoid W-331. Nicméně proti úvahám o dalších zkouškách této kandidátní látky stojí několik skutečností:
 1. Koncentrace, při které dochází k významné redukci plodnosti kohort *A. pisum* – 50 mg.L^{-1} – je ve srovnání s postříkovými aplikacemi pyriproxifenu ve výše zmíněných pracích vysoká. Je třeba počítat s tím, že v prostředí např. skleníku by musela být (díky substrátu pro rostliny) koncentrace juvenoidu podstatně větší. S tím se zvyšuje možnost negativního vlivu na přirozené predátory mšic – slunéčka, která jsou na JHA relativně citlivá (viz. kapitola 1.6).
 2. Samotná biologická účinnost W-331 na *A. pisum* zjištěná v předchozích postříkových testech je ve srovnání s ostatními JHA velmi malá (Kuldová, 1989). I pro výběr systemicky působícího JHA jsou data o jejich kontaktním účinku důležitá, protože nás (buď nepřímo) informují o schopnosti látky vázat se na receptory cílových buněk v epidermis a ovariích.
 3. Na základě prvních testů biodegradace a ekotoxicity (Tykva a kol., 2004), nelze juvenoid W-331 považovat za vhodný k začlenění do systému integrované ochrany rostlin.

III. Odhad účinnosti juvenoidů a juvenogenů při začlenění vybraných látek do tritrofitického systému: hostitelská rostlina (bob koňský – *Vicia faba* L.), mšice *A. pisum* a slunéčko *Cycloneda limbifer*.

- Vzhledem k rozsahu práce v rámci prvního z vytyčených cílů a na základě závěrů popsaných v předchozím bodě, nebyl poslední z cílů uskutečněn.

4.2 VÝHLEDY DO BUDOUCNA

Hlavní myšlenkou vedoucí k syntéze obou typů juvenogenů bylo zvýšení jejich fyzikální a metabolické stability (popř. kombinace obou). Proto výběr juvenoidu konkrétní chemické

struktury je prvním důležitým krokem před vývojem takovýchto komplexních sloučenin a je třeba vycházet z následujících předpokladů:

- Cílový druh (popř. širší taxon) škodlivého hmyzu a jeho ekologické (potravní) specifikace
- Účinnost samotného juvenoidu na tento taxon – tedy (nepřímé) zjištění citlivosti receptorů cílových tkání na juvenoid dané chemické struktury
- Základní ekotoxikologické a biodegradační testy juvenoidu (včetně testů na konkrétní přirozené predátory cílového druhu)

Teprve z takto vybraných juvenoidů by bylo vhodné vyvíjet juvenogeny a ty pak aplikovat na daný cílový druh a následně v celém systému ochrany proti němu.

5. POUŽITÁ LITERATURA

- Babu, T.H. a Sláma, K. 1972. Systemic activity of a juvenile hormone analog. *Science* **175**, 78-79.
- Baker, F.C., Tsai, L.W., Reuter, C.C. a Schooley, D.A. 1988. The absence of significant levels of juvenile hormones and related compounds in the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*. *Insect Biochemistry* **18**, 453-462.
- Benskin, J. a Perron, J.M. 1973. Effects of an insect growth regulator with high juvenile hormone activity on the apterous form of the potato aphid, *Macrosiphum euphorbiae* (Hemiptera: Aphididae). *Canadian Entomologist* **105**, 619-622.
- Biddinger, D.J. a Hull, L.A. 1995. Effects of several types of insecticides on the mite predator, *Stethorus punctum* (Coleoptera, Coccinellidae), including insect growth regulators and abamectin. *Journal of Economic Entomology* **88**, 358-366.
- Bowers, W.S. 1971. Chemistry and biological activity of morphogenetic agents. *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft* **44**, 115-130.
- Bowers, W.S., Fales, H.M., Thompson, M.J. a Uebel, E. 1966. Juvenile hormone: identification of an active compound from Balsam fir. *Science* **154**, 1020-1021.
- Braun, R.P., Edwards, G.C., Yagi, K.J., Tobe, S.S. a Wyatt, G.R. 1995. Juvenile hormone binding components of locust fat body. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **28**, 291– 309.
- Bull, D.L., Ridgway, R.L., Buxkemper, W.E., Schwarz, M., McGovern, T.P. a Sarmiento, R. 1973. Effect of synthetic juvenile hormone analogues on certain injurious and beneficial arthropods associated with cotton. *Journal of Economic Entomology* **66**, 623-626.
- Busvine, J.R. 1957. A critical review of the techniques for testing insecticides. Commonwealth Institute of Entomology, London, 208 pp.
- Caillaud, M.C., Boutin, M., Braendle, C. a Simon, J.C. 2002. A sex-linked locus controls wing polymorphism in males of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris). *Heredity* **89**, 346-352.
- Cloyd, R.A. a Dickinson, A. 2006. Effect of insecticides on mealybug destroyer (Coleoptera: Coccinellidae) and parasitoid *Leptomastix dactylopii* (Hymenoptera: Encyrtidae), natural enemies of citrus mealybug (Homoptera: Pseudococcidae). *Journal of Economic Entomology* **99**, 1596-1604.

- Černý, V., Dolejš, L., Lábler, L., Šorm, F. a Sláma, K. 1967. Dehydrojuvabione – a novel compound with juvenile hormone activity from balsam fir. *Tetrahedron Letters*, 1053-1057.
- Davey, K.G. 2000. The modes of action of juvenile hormones: some questions we ought to ask. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **30**, 663-669.
- Demuth, M., Zambrano, J.L., Rosales, V. a Lorenz, M.W. 2007. Juvenile hormonal activity of mono- and polyenehomobenzenes in *Drosophila virilis*, *Spodoptera frugiperda* and *Araschnia levana*. *Pest Management Science* **63**, 809-814.
- Dhadialla, T.S., Carlson, G.R. a Le D.P. 1998. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annual Review of Entomology* **43**, 545-569.
- Dixon, A.F.G. 1985. Structure of aphid populations. *Annual Review of Entomology* **30**, 155-174.
- Engelmann, F. 1995. The juvenile hormone receptor of the cockroach *Leucophaea maderae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **25**, 721-26.
- Forman, S., Novák, J., Tykva, R., Káš, J., Wimmer, Z. a Ruml, T. 2002. Evaluation of toxicity of pesticides and their biodegradation products using human cells. *Chemosphere* **46**, 209-217.
- Gao, N. a Hardie, J. 1996. Pre- and post-natal effects of precocenes on aphid morphogenesis and differential rescue. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **32**, 503-510.
- Goudey- Perrière, F., Lemonnier, F., Perrière, C., Dahmani, F.Z. a Wimmer, Z. 2003. Is the carbamate juvenoid W-328 an insect growth regulator for the cockroach *Blaberus craniifer* Br. (Insecta, Dictyoptera)? *Pesticide Biochemistry and Physiology* **75**, 47-59.
- Grenier, S. a Grenier, A.M. 1993. Fenoxycarb, a fairly new insect growth regulator: a review of its effects on insects. *Annals of Applied Biology* **122**, 369-413.
- Hardie, J. 1984. A hormonal basis for the photoperiodic control of polymorphism in aphids, *Ciba Foundation Symposium* **104**, 240-253.
- Hardie, J., Baker, F., Jamieson, G., Lees, A. a Schooley, D. 1985. The identification of an aphid juvenile hormone, and its titre in relation to photoperiod. *Physiological Entomology* **10**, 297-302.
- Hartfelder, K. 2000. Insect juvenile hormone: from "status quo" to high society. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **33**, 157-177.
- Hattingh, V. a Tate, B. 1995. Effects of field-wethered residues of insect growth regulators on some Coccinellidae (Coleoptera) of economic importance as biocontrol agents. *Bulletin of Entomological Research* **85**, 489-493.

- Henrick, C.A. 1982. Juvenile hormone analogues: structure-activity relationships In: Coats, J.R. (Ed.), *Insecticidal Modes of Action*, Academic Press.
- Henrick, C.A. 1991. Juvenoids and anti-juvenile hormone agents: Past and present. In: Hrdý, I. (Ed.), *Insect Chemical Ecology*. Academia Publisher, Tábor, Czech Republic, pp. 429-452.
- Henrick, C.A., Staal, G.B. a Siddal, J.B. 1973. Alkyl 3,7,11-trimethyl-2,4-dodecadienoates, a new class of potent insect growth regulators with juvenile hormone activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **21**, 354-359.
- Hodková, M., Okuda, T. a Wagner, R. 1996. Stimulation of corpora allata by extract from neuroendocrine complex; Comparison of reproducing and diapausing *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Pyrrhocoridae). *European Journal of Entomology* **93**, 535-543.
- Hoffmann, K.H. a Lorenz, M.W. 1998. Recent advances in hormones in insect pest control. *Phytoparasitica* **26**(4), 1-8 MINIREVIEW.
- Hoffmann, K.H. 1995. Oogenesis and the female reproductive tract. In: Leather, S.R. a Hardy, J. (Eds), *Insect reproduction*. CRC Press, New York, pp. 1-32.
- Horowitz, A.R. a Ishaaya, I. 1994. Managing resistance in insect growth-regulators in the sweet-potato whitefly (Homoptera, Aleyrodidae). *Journal of Economical Entomology* **87**, 866-871.
- Hrdý, I. 1974. Effects of juvenoids on insecticide susceptible and resistant aphids (*Myzus persicae*, *Aphis fabae* and *Therioaphis maculata*; Homoptera, Aphididae). *Acta Entomologica Bohemoslovaca* **71**, 367-381.
- Hrdý, I. 1981. Rezistence mšic k insekticidům (Problémy integrované ochrany rostlin), Doktorská disertace. Entomologický Ústav ČSAV, Praha, 439 pp.
- Hrdý, I. a Zelený, J. 1973. Effects of juvenoids on the population density of *Phorodon humuli* in a cage experiment (Homoptera, Aphididae). *Acta Entomologica Bohemoslovaca* **70**, 386-389.
- Hrdý, I., Zelený, J., Hůrková, J., Matolín, S. a Weyda, F. 1975. Juvenoids and some derived compounds as potential aphicides and miticides, 8th International Plant Protection Congress, Section V. Moscow, pp. 97-109.
- Hrdý, I., Kuldová, J. a Wimmer, Z. 2001. A juvenile hormone analogue with potential for termite control: laboratory tests with *Reticulitermes santonensis*, *Reticulitermes flaviceps* and *Coptotermes formosanus* (Isopt., Rhinotermitidae). *Journal of Applied Entomology* **125**, 403-411.

- Hrdý, I., Kuldová, J. a Wimmer, Z. 2004a. Juvenogens as potential agents in termite control: laboratory screening. *Pest Management Science* **60**, 1035-1042.
- Hrdý, I., Kuldová, J., Wimmer, Z., Lenz, M. a Gleeson, P.V. 2004b. Laboratory and field trials with juvenogens as potential termite control agents, XXII International Congress of Entomology, Abstracts on CD-ROM. Brisbane, Australia.
- Hrdý, I., Kuldová, J., Hanus, R. a Wimmer, Z. 2006. Juvenile hormone III, hydroprene and a juvenogen as soldier caste differentiation regulators in three *Reticulitermes* species: potential of juvenile hormone analogues in termite control. *Pest Management Science* **62**, 848-854.
- Ilenchuk, T.T. a Davey, K.G. 1985. The binding of juvenile hormone to the membranes of the follicle cells in *Rhodnius prolixus*. *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology* **63**, 102–106.
- Ishaaya, I. a Horowitz, A.R. 1995. Pyriproxyfen, a novel insect growth-regulator for controlling whiteflies – mechanisms and resistance management. *Pesticide Science* **43**, 227-232.
- Jedlička, P., Hrdý, I., Kuldová, J. a Wimmer, Z. 2007. The systemic effects of juvenoids on the red firebug *Pyrrhocoris apterus* and on the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* with data on life table response. *Pest Management Science* **63**, 1026-1035.
- Kalushkov, P. 1999. The effect of aphid prey quality on searching behavior of *Adalia bipunctata* and its susceptibility to insecticides. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **92**, 277-282.
- Karrer, F. a Farooq, S. 1981. Some insect growth regulators with aromatic rings: Their synthesis and biological properties. In: Sehnal, F., Zabza, A., Menn, J.J. a Cymbrowski, B. (Eds.), Regulation of Insect Development and Behaviour. Wroclaw, Poland, pp. 289-302.
- Kerns, D.L. a Stewart, S.D. 2000. Sublethal effects of insecticides on the intrinsic rate of increase of cotton aphid. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **94**, 41-49.
- Kotaki, T. 1996. Evidence for a new juvenile hormone in a stinkbug, *Plautia stali*. *Journal of Insect Physiology* **42**, 279-286.
- Kuldová, J. 1989. Účinnost juvenoidů na vybrané druhy mšic, Kandidátská disertační práce. Entomologický Ústav ČSAV, Praha, 156 pp.
- Kuldová, J., Hrdý, I. a Wimmer, Z. 1994. Selection of compounds acting as aphid development and reproduction regulators: Laboratory screening. *Pesticide Science* **41**, 319-325.

- Kuldová, J., Hrdý, I. a Wimmer, Z. 1998. Response of the hop aphid, *Phorodon humuli* (Homoptera: Aphididae), to the application of juvenile hormone analogue in field trials. *Crop Protection* **17**, 213-218.
- Laskowski, R. 2001. Why short-term bioassays are not meaningful – effects of a pesticide (imidacloprid) and a metal (cadmium) on pea aphids (*Acyrtosiphon pisum* Harris). *Ecotoxicology* **10**, 177-183.
- Law, J.H., Yuan, C. a Williams, C.M. 1966. Synthesis of a material with juvenile hormone activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **55**, 576-578.
- Lees, A.D. 1961. Clonal polymorphism in aphids. *Symposium of Royal Entomological Society of London* **1**, 68-79.
- Less, A.D. 1966. The control of Polymorphism in Aphids. *Advances in Insect Physiology* **3**, 207-277.
- Liu, T.X. a Chen, T.Y. 2001. Effects of a juvenile hormone analog, pyriroxyfen, on the apterous form of *Lipaphis erysimi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **98**, 295-301.
- Liu, T.X. a Stansly, P.A. 2004. Lethal and sublethal effects of two insect growth regulators on adult *Delphastus catalinae* (Coleoptera: Coccinellidae), a predator of whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae). *Biological Control* **30**, 298-305.
- Magagula, C.N. a Samways, M.J. 2000. Effects of insect growth regulators on *Chilocorus nigritus* (Fabricius) (Coleoptera: Coccinellidae), a non-target natural enemy of citrus red scale, *Aonidiella aurantii* (Maskell) (Homoptera: Diaspididae), in southern Africa: evidence from laboratory and field trials. *African Entomology* **8**, 47-56.
- Manville, J.F., Greguss, L., Sláma, K. a von Rudloff, E. 1977. Occurrence of juvabione-type or epijuvabione-type insect juvenile hormone analogues in three “Czechoslovakian firs”. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **42**, 3658-3666.
- Masner, P., Dorn, S., Vogel, W., Kálin, M., Graf, O. a Günthart, E. 1981. Types of response of insects to a new IGR and to proven standards. In: Sehnal, F., Zabza, A., Menn, J.J. a Cymbrowski, B. (Eds.), *Regulation of Insect Development and Behaviour*. Wrocław, Poland, pp. 809-811.
- Miller, F. 1956. *Zemědělská entomologie*. ČSAV Publishing House, pp. 171-270.
- Mittler, T.E., Nassar, S.G. a Staal, G.B. 1976. Wing development and parthenogenesis induced in progenies of kinoprene-treated gynoparae of *Aphis fabae* and *Myzus persicae*. *Journal of Insect Physiology* **22**, 1717-1725.

- Miyamoto, J., Hirano, M., Takimoto, Y. a Hatakoshi, M. 1993. Insect growth regulators for pest control, with emphasis on juvenile hormone analogs: present and future prospects. In: Duke, O.S., Menn, J.J. a Plimmer, J.R. (Eds), *Pest Control with Enhanced Environmental Safety*, Washington D.C., ACS Symp Ser 524, 144-168.
- Morgan, E.D. 2004. *Biosynthesis in insects*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 101-102.
- Mori, K. a Matsui, M. 1970. Synthesis of compounds with juvenile hormone activity, Part V. Some β -bisabolene derivatives. *Agricultural and Biological Chemistry* **34**, 115-121.
- Nassar, S. a Staal, G.B. 1971. A novel JH analog with high activity on the green peach aphid *Myzus persicae*. *Abstracts of the Entomological Society of America* No 423.
- Nassar, S.G., Staal, G.B. a Armanious, N.J. 1973. Effects and control potential of insect growth regulators with juvenile hormone activity on the greenbug. *Journal of Economic Entomology* **66**, 847-850.
- Nijhout, H.F. 1994. *Insect hormones*, Princeton university press, Princeton, New Jersey, 267 pp.
- Nijhout, H.F. a Wheeler, D.E. 1982. Juvenile hormone and the physiological basis of insect polymorphisms. *Quartely Review of Biology* **57**, 109-133.
- Novák, V.J.A. a Červenková, E. 1960. The function of corpus allatum in the last larval instar of metabolic insects, In: *The ontogeny of insects*. Publ House of Czech AcadScis, Prague, pp. 152-156.
- Olszak, R.W., Pawlik, B. a Zajac, R.Z. 1994. The influence of some insect growth regulators on mortality and fecundity of the aphidophagous coccinellids *Adalia bipunctata* L and *Coccinella septempunctata* L (Coleoptera, Coccinellidae). *Journal of Applied Entomology* **117**, 58-63.
- Piepho, H. 1950. Über die Hemmung der Falterhäutung durch Corpora allata. *Biologische Zentralblatt* **69**, 261-271.
- Piepho H. 1951. Über die Lenkung der Insektenmetamorphose durch Hormone. *Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft*, 62-76.
- Poduška, K., Šorm, F. a Sláma, K. 1971. Natural and synthetic materials with insect hormone activity, 9. Structure-juvenile activity relationship in simple peptides. *Zeitschrift für Naturforschung* **26b**, 719-722.
- Riddiford, L.M. 1994. Cellular and molecular actions of juvenile hormone I. General considerations and premetamorphic actions. *Advances in Insect Physiology* **24**, 213-74.

- Richardson, M.L. a Lagos, D.M. 2007. Effects of a juvenile hormone analogue, pyriproxyfen, on the apterous form of soybean aphid (*Aphis glycines*). *Journal of Applied Entomology* **131**, 297-302.
- Röller, H. a Bjerke, J.S. 1965. Purification and isolation of juvenile hormone and its action in lepidopteran larvae. *Life Sciences* **4**, 1617-1624.
- Romaňuk, M., Sláma, K. a Šorm, F. 1967. Constitution of a compound with a pronounced juvenile hormone activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **57**, 349-352.
- Sevala, V.L., Davey, K.G. a Prestwich, G.D. 1995. Photoaffinity labeling and characterization of a juvenile hormone binding protein in the membranes of follicle cells of *Locusta migratoria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **25**, 267-73.
- Schmialek, P. 1961. Die Identifizierung zweier in Tenebriokot und in Hefe vorkommender Substanzen mit Juvenilhormonwirkung. *Zeitschrift für Naturforschung* **18b**, 513-515.
- Schneiderman, H.A. a Gilbert, L.I., 1964. Control of growth and development in insects. *Science* **143**, 325-333.
- Sláma, K. 1971. Insect juvenile hormone analogues. *Annual Review of Biochemistry* **40**, 1079-1102.
- Sláma, K. 1975. Some old concepts and new findings on hormonal control of insect morphogenesis. *Journal Insect Physiology* **21**, 921-995.
- Sláma, K. 1981. Juvenoids in retrospect and juvenogens in prospect. In: Sehnal, F., Zabza, A., Menn, J.J. a Cymbrowski, B. (Eds.), *Regulation of Insect Development and Behaviour*. Wrocław, Poland, pp. 853-868.
- Sláma, K. 1985. Pharmacology of insect juvenile hormones. In: Kerkut, G.A. a Gilbert, L.I., (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*, Vol. 11. Pergamon Press, Oxford, pp. 357-394.
- Sláma, K. 1999. The history and current status of juvenoids. In: Robinson, W.H., Rettich, F. a Rambo, G.W. (Eds.), *Proc. 3rd Internat. Conf. Urban Pests*, Hronov, Czech Republic, pp. 9-25.
- Sláma, K. a Williams, C.M. 1965. Juvenile hormone activity for the bug *Pyrrhocoris apterus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **54**, 411-414.
- Sláma, K., Romaňuk, M. a Šorm, F. 1974. *Insect hormones and bioanalogues*, Springer-Verlag, New York Wien, 477 pp.

- Sláma, K. a Romaňuk, M. 1976. Juvenogens, biochemically activated juvenoid complexes. *Insect Biochemistry* **6**, 579-586.
- Sláma, K., Kahovcová, J. a Romaňuk, M. 1978a. Action of some aromatic juvenogen esters on insects. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **9**, 313-321.
- Sláma, K., Wimmer, Z. a Romaňuk, M. 1978b. Juvenile hormone activity of some glycosidic juvenogens. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie* **359**, 1407-1412.
- Sláma, K. a Němec, V. 1981. Intestinal β -glucosidase related to hormonal activity of the glycosidic juvenogens in *Dysdercus cingulatus*. *Acta Entomologica Bohemoslovaca* **78**, 1-9.
- Sláma, K. a Weyda, F. 1997. The All-Or-None Rule in Morphogenetic Action of Juvenile The All-Or-None Rule in Morphogenetic Action of Juvenile Hormone on Insect Epidermal Cells. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **264**, 1463-1470.
- Smith, K.M., Smith, D. a Lisle, A.T. 1999. Effect of field-weathered residues of pyriproxyfen on the predatory coccinellids *Chilocorus circumdatus* Gyllenhal and *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **39**, 995-1000.
- Socha, R. 1993. *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera) – an experimental model species: A review. *European Journal of Entomology* **90**, 241-286.
- Staal, G.B. 1975. Insect growth regulators with juvenile hormone activity. *Annual Review of Entomology* **20**, 417-460.
- Stark, J.D. a Banks, J.E. 2003. Population-level effects of pesticides and other toxicants on arthropods. *Annual Review of Entomology* **48**, 505-519.
- Suchý, M., Sláma, K. a Šorm F. 1968. Insect hormone activity of p-(1,5-dimethylhexyl) benzoic acid derivatives in *Dysdercus* species. *Science* **162**, 582-583.
- Sullivan, J. 2000. Environmental fate of pyriproxyfen,
<http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/pyrprxfn.pdf> (listopad, 2007)
- Tagu, D., Sabater-Muñoz, B. a Simon, J.C. 2005. Deciphering reproductive polyphenism in aphids. *Invertebrate Reproduction and Development* **48**, 71–80.
- Thanassoulopoulos, A.C. 1974. Some effects of the Insect growth Regulator ZR-777 on Bean aphid *Aphis fabae* (Scop.). *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* **77**, 171-174.
- Tykva, R., Wimmer, Z., Bennettová, B. a Vlasáková, V. 1998. A study of the metabolic degradation of an insect juvenile hormone analog using different radiolabeling. *Helvetica Chimica Acta* **81**, 163-173.

- Tykva, R., Vlasáková, V., Novák, J. a Havlíček, L. 2004. Radio-high-performance liquid chromatography for ecotoxicity assessment of insect growth regulators, *Journal of Chromatography A* **1032**, 59-63.
- Tykva, R., Wimmer, Z., Vlasáková, V., Novák, J. a Havlíček, L. 2005. Biodegradation of juvenoid diastereoisomers: radio-HPLC and MS analysis. *Chemosphere* **60**, 1197-1202.
- Walthall, W.K. a Stark, J.D. 1997. A comparison of acute mortality and population growth rate as endpoints of toxicological effect. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **37**, 45-52.
- Westerlund, S.A. a Hoffmann, K.H. 2004. Rapid quantification of juvenile hormones and their metabolites in insect haemolymph by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **379**, 540– 543.
- Wheeler, D.E. a Nijhout, H.F. 2003. A perspective for understanding the modes of juvenile hormone action as a lipid signaling system. *BioEssays* **25**, 994-1001.
- White, D.F. 1968. Postnatal treatment of the cabbage aphid with synthetic juvenile hormone. *Journal of Insect Physiology* **14**, 901-912.
- White, D.F. a Lamb, K.P. 1968. Effects of a synthetic juvenile hormone on adult cabbage aphids and their progeny. *Journal of Insect Physiology* **14**, 395-402.
- Williams, C.M. a Robbins, W.E. 1968. Conference on insect-plant interactions. *Bio Science* **18**, 791-799.
- Wimmer, Z., Rejzek, M., Zarevúcka, M., Kuldová, J., Hrdý, I., Němec, V. a Romaňuk, M. 1997a. A series of bicyclic insect juvenile hormone analogs of Czech origin: Twenty years of development. *Journal of Chemical Ecology* **23**, 605-628.
- Wimmer, Z., Tykva, R., Bennettová, B., Vlasáková, V. a Elbert, T. 1997b. Degradation of a radiolabeled juvenile hormone analog using two insect species. *Invertebrate Neuroscience* **3**, 193-197.
- Wimmer, Z., Šaman, D., Kuldová, J., Hrdý, I. a Bennettová, B. 2002. Fatty acid esters of juvenoid alcohols as insect hormonogen agents (juvenogens). *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **10**, 1305-1312.
- Wimmer, Z., Kuldová, J., Hrdý, I. a Bennettová, B. 2006. Can juvenogens, biochemically targeted hormonogen compounds, assist in environmentally safe insect pest management? *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **36**, 442-453.
- Wimmer, Z., Jurček, O., Jedlička, P., Hanus, R., Kuldová, J., Hrdý, I., Bennettová, B. a Šaman, D. 2007a. Insect Pest Management Agents: Hormonogen Esters (Juvenogens). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 7387-7393.