

CHEMICKÉ SIGNÁLY ČMELÁKŮ

IRENA VALTEROVÁ a KLÁRA URBANOVÁ

Ustav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6

Došlo dne 21. VII. 1997

Obsah

1. Úvod
2. Zařazení čmeláků a typy produkovaných sloučenin
3. Sexuální feromon královny a mateří tlumící látka
4. Obranné látky
5. Stopovací feromony
6. Dominantní signály dělnic
7. Označení zdroje potravy
8. Značkovací feromony samečků
 - 8.1. Předkopulační chování samečků
 - 8.2. Složení sekretu labiální žlázy
 - 8.3. Používané metody analýzy sekretu
 - 8.4. Podobnosti a rozdíly ve složení sekretu
 - 8.5. Chemotaxonomické studie
9. Závěr

1. Úvod

Chemická ekologie se jako vědní obor definovala poměrně nedávno (v 70. letech). Jde o typicky hraniční obor mezi tradičními disciplinami chemie a biologie, který se zabývá studiem chemicky zprostředkovaných interakcí mezi organismy. Nejvíce pozornosti je v chemicko-ekologické literatuře věnováno látkám, produkovaným hmyzem ke vzájemné komunikaci.

Čichové a chuťové vjemy hrají v životě hmyzu velmi důležitou roli. Hmyzí jedinci se jimi řídí ve všech fázích svého vývoje, rozmnožování a dalších činnostech, jako je např. vyhledávání potravy, vhodného partnera pro páření i místa pro naklazení vajíček a vývoj další generace. Dlouhodobým vývojem se vzájemně přizpůsobily zdroj chemic-

ké informace (specializovaná exokrinní žláza) a odpovídající receptor (tykadlo, jde-li o těkavý čichový signál, či makadlo příp. jinde umístěný chemoreceptor, jde-li o netěkavý chuťový signál). V tomto článku se zaměříme na chemické signály předávané mezi jedinci téhož biologického druhu, tj. na feromony.

Obzvlášť nepostradatelné jsou chemické signály uvnitř kolonie společenského (sociálního) hmyzu. Klasickým příkladem společenského hmyzu, vývojově nejvyššího a vzhledem k jeho užitečnosti i nejlépe prozkoumaného, je včela medonosná. Chemické signály předávané mezi jedinci včelího společenstva obsahují řadu důležitých informací a napomáhají udržet pořádek v hnízdě. Dělnice se vzájemně informují o zdroji potravy, o přítomnosti nepřítelů, i vlastní hnízdo rozpoznávají podle vůně. Mateří látka, produkovaná včelí matkou a šířená ve včelstvu dělnicemi, nese informaci o matčině přítomnosti, brání vývoji další (konkurenční) královny a udržuje dělnice v „pracovní náladě“.

Ve srovnání se včelami máme k dispozici mnohem méně znalostí o komunikaci vývojově nižších druhů společenského hmyzu, jako jsou čmeláci. Život uvnitř hnízda čmeláků je mnohem méně prozkoumán přes nespornou důležitost tohoto hmyzu pro opylování zemědělských plodin. V důsledku dlouhodobého společného vývoje rostlin a hmyzu se vzájemně přizpůsobil jednak tvar jazýčku a hmyzího těla vůbec, jednak tvar květu opylované kvetoucí rostliny tak, aby byly vytvořeny optimální podmínky jak pro opylení rostliny, tak pro uspokojení hmyzu hledajícího nektar a pyl. Čmeláci mají dlouhý jazýček, proto se stali nepostradatelnými pro opylení těch rostlin, které mají dlouhé trubkovité koruny (např. jetel, náprstník) a do nichž se včely nedostanou. Studium chování a komunikace čmeláků má proto významný praktický smysl.

2. Zařazení čmeláků a typy produkovaných sloučenin

Čmeláci (Bombicinae), patřící do čeledi včelovití (Apidae), jsou jednou z mnoha skupin v řádu blanokřídlých (Hymenoptera). Žijí především v severním mírném pásmu,

ale zasahují v menší míře i do subtropů a tropů. Zde se vyskytují zejména ve středních a vyšších horských polohách. Ve světě je známo přes 300 druhů čmeláků, nejvíce jsou rozšířeni v Asii. Na území bývalého Československa se vyskytuje téměř 30 druhů čmeláků¹.

Obecně jsou uznávány dvě skupiny - čmeláci patřící v tradičním pojetí do rodu *Bombus*² a pačmeláci, patřící do rodu *Psithyrus*. Čmeláčí matka po založení hnízda produkuje nejprve dělnice, které jí pomáhají v péči o další potomstvo. Teprve z dostatečně rozrostlého hnízda se později v létě rodí pohlavní jedinci - samečkové a mladé královny. Pačmeláci jakožto hnízdní paraziti se chovají podobně jako kukačky mezi ptáky. Pačmeláčí matky kladou vajíčka do hnízd čmeláků, nemají vlastní dělnice a jejich pohlavní jedinci se vyvíjejí a rodí jen díky péči dělnic hostitelského druhu čmeláka³. Jsou známy případy, kdy pačmelák parazituje pouze na určitém druhu čmeláka, jindy je výběr hostitele méně specializovaný a děje se z většího počtu druhů, vyskytujících se v dané lokalitě. U specializovaných dvojic parazit-hostitel je prokázáno, že vyhledávání hostitelského hnízda se děje na základě specifické vůně. Matky pačmeláků reagují na feromonem označený vchod do hnízda hostitele^{4,6}.

Z chemického hlediska jsou složky sekretů žláz produkovaných různými kastami čmeláků dosti jednoduché struktury⁷. Jde většinou o látky s alifatickým řetězcem délky 10-35 uhlíkových atomů, nasycené i nenasycené. Větvení řetězce bylo popsáno jen u uhlovodíků, jichž je čmeláky produkována bohatá škála. Ostatní alifatické látky (alkoholy, aldehydy, estery) nacházené u čmeláků mají řetězce nevětvené. Mezi uhlovodíky výrazně převažují sloučeniny s lichým počtem uhlíkových atomů, a to s nejvyšším zastoupením uhlovodíků o délce řetězce 23, 25 a 27 atomů uhlíku. Mezi kyslíkatými látkami jsou vždy pouze takové, které mají sudý počet atomů uhlíku. U nenasycených látek je dvojná vazba vždy umístěna v liché poloze a má u dosud určených látek Z-konfiguraci. Z esterů mastných kyselin se u čmeláků vyskytují methyl- a ethylestery, vzácně byly popsány i isopropylestery. Z esterů odvozených od dlouhých alifatických alkoholů je čmeláky produkována pestřejší paleta látek počínaje acetáty, přes butyráty a hexanoáty až k esterům voskového typu s mastnými kyselinami o délce řetězce do 18 uhlíkových atomů. Kromě alifatických sloučenin se ve žlázách čmeláků nacházejí i látky isoprenoidní povahy - monoterpeny, seskviterpeny a diterpeny, vždy v oxidované formě jako alkoholy a jejich estery, případně aldehydy. Složení sekretů žláz je druhově specifické a soudí se, že i uvnitř téhož druhu existují rozdíly v některých signálech, jako je „voňavé“ označení vchodu

do toho kterého hnízda. Bohatě směsi složek sekretů různých žláz jednotlivých kast téhož druhu obsahují často tytéž látky, i když sekrety sdělují rozdílnou informaci. Specificty této „chemické řeči“ se dosahuje mimo jiné i rozdíly v kvantitativním zastoupení jednotlivých složek, které si příjemce signálu správně dešifruje a zareaguje odpovídající změnou v chování.

3. Sexuální feromon samiček a mateří tlumící látka

Plodná samička, v české literatuře označovaná jako matka (královna), je základem čmeláčí kolonie. Na jejím těle je umístěna řada exokrinních žláz, z nich jako nejdůležitější se jeví mandibulární (kusadlová) žláza. Ta je u panenské samičky zdrojem sexuálního feromonu, působícího na krátkou vzdálenost. Extrakt této žlázy vyvolává u čmeláčích samců kopulační chování⁸. Chemická podstata sekretu v této fázi vývoje nebyla dosud studována. Analyzován byl však sekret mandibulární žlázy matky čmeláka zemního (*Bombus terrestris*), která již měla založeno hnízdo s dělnicemi⁹. Podle literatury je mandibulární žláza matky hlavním zdrojem mateří tlumící látky, která složitým mechanismem reguluje diferenciaci kast v kolonii¹⁰. Mateří látka, je-li přítomna v kolonii čmeláků v dostatečné koncentraci, inhibuje činnost přilehlých tělísek (corpora allata) u dělnic a tím i produkci juvenilního hormonu¹¹. Při nízké koncentraci juvenilního hormonu v organismu dělnic je potlačen vývoj jejich vaječnků. Jakmile koncentrace mateří látky poklesne, rozeběhne se biosyntéza juvenilního hormonu a vaječníky dělnic se začnou zvětšovat, až tento vývoj vyvrcholí kladením vajíček dělnicemi. Tato vajíčka jsou ovšem neoplozená, a proto z nich vznikají (jako u všech blanokřídlých) pouze haploidní samci. Uvedené mechanismy jsou již detailně prozkoumány u včely medonosné a zdá se, že v principu platí i pro čmeláky.

Chemická podstata mateří látky je samozřejmě v popředí zájmu vědců i komerčních firem, které se zabývají pěstováním a prodejem malých čmeláčích kolonií pro opylování ve sklenících. Snahou je udržet hnízdo ve stadiu dělnic po co nejdélší dobu a bránit vývoji pohlavních jedinců, kteří již pro opylení nemají velký význam. Vhodná formulace mateří látky by mohla matku po určitou dobu nahradit. Chemicky ovšem vyřešení této otázky nebude jednoduché. Prozatím existuje jen jedna práce zabývající se analýzou mateří látky. V sekretu mandibulární žlázy čmeláka zemního autoři identifikovali na 500 sloučenin přede-

vším alifatické povahy⁹. Je zřejmé, že nalezení aktivních složek takovéto směsi bude pracná a dlouhodobá záležitost. Nejvíce zastoupenými složkami sekretu byly kyseliny 3-hydroxydekanová, 9-oktadecenová a oktadekanová. Chirální (3*S*)-hydroxydekanová kyselina měla vysokou enantiomerní čistotu přes 99 % e.e. Předpokládáme-li jistou podobnost se včelou medonosnou, mohli bychom očekávat, že aktivní bude kyselina 3-hydroxydekanová (včelí mateří látka obsahuje dvě aktivní složky - kyseliny 9-oxo-(2*E*)-decenovou a 9-hydroxy-(2*E*)-decenovou¹²). Konečnou odpověď na otázku aktivity však může dát jedině biologický test.

4. Obranné látky

Mandibulární žláza všech kast čmeláků má ještě další funkci¹³. Při ohrožení produkuje sekret, jehož složky jsou považovány za obranné látky. Hlavní složkou tohoto obranného sekretu je kyselina máselná, dále jsou v něm obsaženy alifatické 2-ketony s kratší délkou řetězce (C₅-C₉) a odpovídající 2-alkoholy. Monoterpenické alkoholy geraniol a citronellol byly také nalezeny v obranném sekretu. Zajímavé je, že obranný sekret se neliší složením u různých kast a dokonce není ani druhově specifický. U deseti studovaných druhů čmeláků a pačmeláků byly nalezeny tytéž látky vždy s výraznou dominancí kyseliny máselné. Nejde zde o sekret, který by kromě obrany současně plnil i funkci poplašného feromonu, jak tomu často bývá u jiných druhů společenského hmyzu (např. u termitů)¹⁴, neboť na něj nereagují příslušníci téhož druhu změnou v chování.

5. Stopovací feromony

K orientaci uvnitř hnízda slouží čmelákům stopovací feromony. Nejvíce znalostí máme opět o čmeláku zemním, který zakládá hnízda v zemních dutinách. Ústí hnízda a především voňavá stopa vedoucí od vchodu k vlastnímu hnízdu jsou dělnicemi spolehlivě rozpoznány¹⁵. Vizuální orientace při návratu do hnízda je v konečné fázi méně důležitá. Zdrojem stopovacího feromonu je především Dufourova žláza, umístěná v zadečku dělnic. Jiné žlázy (v nohách) patrně také k signálu přispívají. Složení sekretu Dufouroy žlázy je druhově specifické¹⁶. Dokonce i mezi různými koloniemi téhož druhu existují rozdíly¹⁷⁻¹⁸. Jde především o kvantitativní rozdíly ve složení sekretu, tvořeném převážně uhlovodíky s řetězcem o 19–31 atomech uhlíku, nasy-

cenými i nenasycenými. Liché délky řetězce vždy převažují, především s počtem uhlíkových atomů 23, 25, 27 a 29. Dále jsou v sekretu přítomny alifatické estery s různou délkou řetězce obou částí. Velikost molekul i počet složek (kolem 150) zaručují dostatečnou variabilitu ve složení feromonu pro jednotlivé druhy.

6. Dominantní signály dělnic

Dufourova žláza čmeláků je zajímavým orgánem vzhledem k jeho mnohostranné funkci. Označení vchodu a vnitřní chodby vedoucí k hnízdu je jen jednou z důležitých funkcí. Sekrety Dufouroy žlázy označují i společenské zařazení dělnic v kolonii. Stejně jako u včel i zde existuje dělba práce v kolonii, v níž ne všechny dělnice mají stejné postavení. V zásadě lze dělnice rozdělit do tří skupin - dominantní dělnice, u nichž se jako první začínou vyvíjet vaječníky v případě oslabení královny, dále podřízené dělnice a létavky, které zásobují hnízdo potravou¹⁹. Takováto dělba práce může dobře fungovat jen tehdy, není-li pochyb o tom, co má která dělnice na starosti a ke které skupině patří²⁰. Kromě morfologických znaků (velikost těla) a způsobu chování se zde opět uplatňuje voňavá řeč. Zdrojem této informace je zřejmě více žláz²¹. Signifikantní rozdíly mezi studovanými skupinami byly pozorovány ve složení sekretů žláz umístěných v hlavě, Dufouroy žlázy i oplachu celého těla. To je v souladu se zjištěním Oldhama a spolupracovníků, že uhlovodíky v extraktu Dufouroy žlázy se složením velmi podobají uhlovodíkům v kutikule²². Složení sekretů skupiny dominantních dělnic se nejvíce podobalo sekretu královny, zatímco dělnice-zásobovačky se chemismem od nich diametrálně lišily²¹.

7. Označení zdroje potravy

K označení zdroje potravy slouží čmelákům tarsální žlázy, umístěné v chodidlech²³. Předávání informace o bohatých zdrojích potravy není u čmeláků tak důmyslně vyvinuto jako u včel, ani se dělnice chemicky nepřivolávají na pomoc s bohatou sklizní, jak to známe například u mravenců. Čmeláci prostě tím, že častěji navštěvují na nektar bohaté květy, zanechávají na nich stopy v podobě vyšší koncentrace složek sekretu tarsální žlázy. Ty jsou pro další dělnice znamením, že se vyplatí označený květ navštívit²⁴. Složení sekretu zapadá do téže palety látek, se kterými jsme se již setkali v mandibulárních a Dufourových žlázách s tím

rozdílem, že v tarsální žláze jsou přítomny pouze uhlovodíky. I zde dominují látky s lichým počtem uhlíkových atomů C_{23} – C_{29} , méně zastoupeny jsou ostatní délky řetězce mezi 19 a 31 atomy uhlíku. Z nenasycených uhlovodíků byly zjištěny pouze monoeny, zato směs mnoha polohových izomerů. Odpověď čmeláků na testované směsi uhlovodíků byla závislá na použité koncentraci. Zvyšující se koncentrace stimulovala dělnice k dalším návštěvám květu, ale příliš vysoké koncentraci se dělnice vyhýbaly. Vysoká koncentrace „stop“ tak může být znamením, že daný zdroj potravy je již vyčerpán²⁵.

8. Značkovací feromony samečků

8.1. Předkopulační chování samečků

Doposud nejvíce byly z chemického hlediska studovány značkovací feromony samečků²⁶. Typické chování samců většiny čmeláků a pačmeláků se nazývá patrolování. Dospělci pačmeláků se v předkopulační fázi chovají stejně jako čmeláci. Poprvé popsal patrolující chování Newman již v roce 1851 (převzato z literatury²⁷). Toto chování můžeme pozorovat od časného léta až do podzimu. Čmeláci obléhávají hranice svého teritoria a značkují je svým feromonem. Feromon je produktem cefalické části labiální žlázy, umístěné v hlavě²⁸. Sekret je samečkem nanášen na okraje listů či suché květy a takto označená místa jsou pak lákadlem pro samičky téhož druhu k páření.

Období patrolujících letů i umístění značek závisí na druhu čmeláka a souvisí do jisté míry i s polohou hnízda. Některé druhy patrolují hned nad zemí, jiné až v korunách stromů. Mezi druhová teritoria bývají většinou dobře oddělena, ale trasy patrolujících čmeláků stejného druhu se mohou křížit²⁷. Čmeláci mohou patrolovat až několik stovek metrů od svých rodných hnízd a jimi střežené území má velikost několika set m^2 , jiní si zvolí vyvýšenou pozorovatelnou, ze které vylutují směrem ke kolem letícím živočichům ve snaze nepropást vlastní samičku. Setkání jedinců opačného pohlaví má opět umožnit feromon, jímž sameček pozorovatelnou označil²⁹. Existují ale i druhy, které nepatrolují a na samičky svého druhu číhají přímo před ústím hnízda. I tyto druhy mají funkční labiální žlázu, přestože ji zdánlivě nepotřebují, vizuální orientace se zdá dostačující³⁰. Složení značkovacího feromonu je pro každý druh specifické a funguje (spolu se segregací geografickou, prostorovou a časovou) jako jedna ze zábran mezidruhového křížení^{26, 31}.

8.2. Chemické složení sekretu labiální žlázy

Sekret labiální žlázy je tvořen v některých případech několika málo sloučeninami, častěji jde ale o bohatší směs s několika dominantními látkami a řadou minoritních složek. Nejvíce studií chemismu labiálních žláz bylo prováděno ve Švédsku²⁶. Složení značkovacího feromonu je známo u více než 30 druhů čmeláků rodu *Bombus* (tabulky I, II a III) a 10 druhů pačmeláků rodu *Psithyrus* (tabulka IV). V taxonomii čmeláků a pačmeláků jsme se přiklonili k tradičnímu zařazení do dvou rodů *Bombus* a *Psithyrus* a k jejich dalšímu rozdělení na podrody². Složení sekretů samčích labiálních žláz je oproti žlázám dělnic a královný jednodušší, ale co do typů sloučenin pestřejší (typické příklady jsou na obr. 1). Byla identifikována široká škála sloučenin zahrnující monoterpeny, sesquiterpeny, diterpeny, alifatické alkoholy, aldehydy a různé deriváty mastných kyselin. V sekretech byly dále nalezeny nasycené i nenasycené uhlovodíky s délkou řetězce 21–27 atomů uhlíku a s lichým počtem uhlíkových atomů. Feromonové složení je druhově specifické, ale v rámci jednoho druhu (např. *Bombus lucorum*) existují i formy, lišící se zbarvením, složením feromonu i místem výskytu³². V některých případech vedly rozdíly v chemickém složení značkovacího feromonu k rozdělení do poddruhů nebo dokonce k popisu nových druhů³³.

8.3. Používané metody analýzy sekretů

Základní analytickou metodou je spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GC-MS). Labiální žláza jednoho samečka však poskytuje dostatečně koncentrovaný vzorek nejen pro plynovou chromatografii, ale i pro sloupcovou chromatografii v mikroměřítku a následnou derivatizaci frakcí či separovaných složek. Z jedné žlázy lze extrakcí získat řádově desítky mikrogramů směsi. Po získání hmotnostního spektra, které poskytne první informaci o molekulové hmotnosti a typu sloučeniny, je nejčastěji řešeným problémem u nenasycených látek poloha a konfigurace dvojnás vazby.

Poloha dvojnás vazby se stanovuje ozonolýzou, přípravou aduktu s dimethyldisulfidem (DMDS) a v některých případech (alkoholy, aldehydy) oxidací na kyseliny a přípravou jejich methylesterů⁴⁰. Produkty ozonolýzy nebo DMDS adukty se podrobí GC-MS analýze, zatímco u methylesterů se využívá ECL hodnot (Equivalent Chain Length), které

Tabulka I

Obsah složek sekretu labiální žlázy dosud studovaných druhů čmeláků (rod *Bombus*, podrody *Megabombus*, *Subterraneobombus*, *Fervidobombus*, *Thoracobombus*, *Alpinobombus*)

Látka ^a	Podrod	<i>Mega-</i> <i>bombus</i>		<i>Subterra-</i> <i>neobombus</i>		<i>Fervido-</i> <i>bombus</i>	<i>Thoracobombus</i>					<i>Alpinobombus</i>				
	<i>B. hortorum</i>	<i>B. consobrinus</i>	<i>B. subterraneus</i>	<i>B. distinguendus</i>	<i>B. senarius</i>	<i>B. pascuorum</i> ^b	<i>B. humilis</i>	<i>B. muscorum</i>	<i>B. rudervarius</i>	<i>B. sylvarum</i>	<i>B. veteranus</i>	<i>B. alpinus</i>	<i>B. polaris</i>	<i>B. hyperboreus</i>	<i>B. balteatus</i>	
Isoprenoidy																
Citronellol															x	
Farnesol	xxx															
2,3-Dihydrofarnesol															xx	
2,3-Dihydrofarnesal															x	
Geranylgeraniol	x		xxx		xx											
Geranylgeranial	xxx	xx		xxx												
Geranylcitronellol															x xx	
Geranylcitronellal			xxx													
Geranylinalool				xx												
Alifatické alkoholy																
Dodekanol																x
Tetradekanol					xx	x										x
Hexadecenol						xxxΔ ⁷	xxxΔ ⁹	xxxΔ ⁹	xxxΔ ⁹	xxxΔ ⁹	xxx	xxxΔ ⁹	xxx			
Hexadekadienol												x	xxx			
Oktadecenol	xxΔ ⁹	x			xxxΔ ¹¹	xxΔ ⁹	xxx	xxxΔ ⁹	x	xxx				xxxΔ ⁹		
Oktadekadienol															x	
Ikosenol							xx									
Aldehydy																
Hexadekanal						x										
Hexadecenal						xxxΔ ⁷	xxΔ ⁹									
Oktadecenal							xxxΔ ¹¹									
Ikosenal							xx									
Estery																
Dodecylacetát																x
Dodecylbutyrát																xx
Tetradecylacetát																xxx
Tetradecylbutyrát																xx
Hexadecenylacetát							xx		xxxΔ ⁷	xxx	x					
Oktadecenylacetát								xxxΔ ⁹		xx						
Uhlovodíky																
Nonadecen	xxxΔ ⁹	xxxΔ ⁹														
Henikosan												x	x	x		
Henikosen												x				
Trikosan					xx	xx						x	x	x	x	
Trikosen												x	x	x	x	
Pentakosan					x	x									x	
Pentakosen							x									
Literatura	34,35	35	34,35	35	30	34-38	35	34,35	35	35	35	39	39	39	39	

^a xxx - hlavní složka (> 10 %), xx - středně zastoupená složka (2-10 %), x - minoritní složka (1-2 %), Δⁿ - poloha dvojné vazby, pokud je známa, ^b *B. pascuorum* je synonymem *B. agrorum*

jsou tabelovány pro daný typ kolony a vedou k určení polohy dvojných vazby. Dvojných vazby ve sloučeninách identifikovaných ve čmelácích se vyskytují v jedné z těchto pozic: 7, 9, 11, 13 nebo 15 podle délky řetězce. Sloučenin s větším počtem dvojných vazeb se vyskytuje méně. Poloha

dvojných vazby je určena její polohou v mastných kyselinách, které jsou *prekursory*⁴⁰. Přestože jde o poměrně jednoduché látky, naše znalosti o jejich biosyntéze ve žlázách čmeláků jsou minimální. Biosyntetické důvody patrně determinují i konfiguraci dvojných vazeb. K jejímu určení se

Tabulka II

Obsah složek sekretu labiální žlázy dosud studovaných druhů čmeláků (rod *Bombus*, podrody *Pyrobombus*, *Kallobombus*, *Cullumanobombus* a *Melanobombus*)

Látka ^a	Podrod <i>Pyrobombus</i>								<i>Kallobombus</i> - <i>Cullumanobombus</i> - <i>Melanobombus</i>		
	<i>B. monticola</i>	<i>B. scandinavicus</i>	<i>B. lapponicus</i>	<i>B. hyporum</i>	<i>B. pratorum</i>	<i>B. huntii</i>	<i>B. jonellus</i>	<i>B. cingulatus</i>	<i>B. sorosis</i>	<i>B. cullumanus</i>	<i>B. lapidarius</i>
Isoprenoidy											
Geraniol					x						x
Citronellol					x						
Geranylacetát					x						x
Citronellylacetát					x						
Farnesen					x			x			
Farnesol					xxx	x		xxx			
2,3-Dihydrofarnesol						xxx	xxx	xxx			
2,3-Dihydrofarnesal							xx	x			
Farnesylacetát					xxx						x
Geranylgeraniol					x						x
Geranylcitronellol			xxx	xxx							
Geranylgeranylacetát				x	xx				xxx	xxx	
Alifatické alkoholy											
Dodekanol								x			
Tetradekanol											x
Hexadekanol	xx	x	xx	xxx	xxx	x					xx
Hexadecenol				xxx Δ^9							xxx Δ^9
Oktadecenol					xxx Δ^{11}	xxx Δ^{11}					
Aldehydy a estery											
Hexadecanal				x							
Hexadecylacetát	xx	xx									
Hexadecenylacetát	xxx	xxx									
Ikosylacetát			x								
Ethylhexadecenoát				x							
Uhlovodíky											
Henikosan			x								
Trikosan		x	xx			x					
Trikosen			x								
Pentakosen			x								
Pentakosan		x	x			x					
Literatura	26	33	33	34,40, 41	26,34, 40,41	30	26,41	41	34	34	34,37, 40

^a xxx – hlavní složka (> 10 %), xx – středně zastoupená složka (2–10 %), x – minoritní složka (1–2 %), Δ^n – poloha dvojných vazeb, pokud je známa

Tabulka III

Obsah složek sekretu labiální žlázy dosud studovaných druhů čmeláků (rod *Bombus*, podrody *Bombus*, *Alpigenobombus* a *Confusibombus*)

Látka ^a	Podrod <i>Bombus</i>					<i>Alpigenobombus</i> <i>B. wurffleini</i> <i>mastrucatus</i>	<i>Confusibombus</i> <i>B. confusus</i> ^b
	<i>B. terrestris</i>	<i>B. lucorum</i> (tmavá forma)	<i>B. lucorum</i> (světlá forma)	<i>B. patagiatus</i>	<i>B. sporadicus</i>		
Isoprenoidy							
2,3-Dihydrofarnesol	xxx						
2,3-Dihydrofarnesylacetát	x						
Geranylgeraniol		x					
Geranycitronellol	xx						xxx
Geranycitronellal							x
Geranylgeranylacetát		x				xxx	x
Geranycitronellylacetát							x
Geranycitronellylhexanoát							x
Geranycitronellyloktanoát							xx
Geranycitronellyldecanoát							xx
Alifatické alkoholy							
Tetradekanol	x						
Hexadekanol	x		x			x	
Hexadekadienol						x	
Oktadecenol							xΔ ^b
Aldehydy a ketony							
Tetradekanal					x		
Hexadekanal						x	
2-Pentadekanon						x	
Kyseliny a estery							
Kyselina hexanová							x
Tetradecylacetát					xxx		
Hexadecylacetát			x		x		
Oktadecenylacetát							xxxΔ ^b
Ethyldecanoát	x	x					
Ethyldecanoát	xx	xxx	xx	xxx	x		
Ethyltetradekanoát	x	x	x				
Ethyltetradecenoát	xΔ ^b	xΔ ^b	xxxΔ ^b				
Ethylhexadecenoát	x	x	x				
Ethylhexadekadienoát			x				
Ethylhexadekatrienoát			x				
Ethyldecanoát		x					
Ethyldecanoát		x	x				
Ethyldekadecadienoát		x					
Ethyldekadekatrienoát		x	x				
Methyldekadecenoát							xΔ ^b
Uhlíkovodíky							
Henikosan		x	x				
Trikosan		xx	xx			xx	xx
Trikosen		x	x			x	
Pentakosan		x	xx				x
Pentakosen		xx	x			x	xΔ ⁷ Δ ⁹
Literatura	26,34,40,42	32	32,37	34	34	43	29

^axxx - hlavní složka (> 10 %), xx - středně zastoupená složka (2-10 %), x - minoritní složka (1-2 %), Δⁿ - polohadvojná vazba, pokud je známa, ^b ve stopovém množství (< 1 %) byly dále nalezeny látky: kyselina oktanová, ethyl-9-oktadecenoát, ethyldekadekanoát, oktadecylacetát, geranycitronellyldecanoát, geranycitronellyltetradekanoát, pentakosadien, heptakosadien, 7-heptakosen a heptakosan

může využít prosté plynové chromatografie a srovnání se standardy, pokud jsou k tyto dispozici a pokud se retenční

časy *Z*- a *E*-izomerů liší. Lišit se mohou i retenční časy DMDS aduktů *Z*- a *E*-izomerů. V poslední době se geome-

Tabulka IV

Obsah složek sekretu labiální žlázy dosud studovaných druhů pačmeláků (rod *Psithyrus*)

Látka ^a	<i>P. vestitus</i> ^b	<i>P. bohemicus</i>	<i>P. rupestris</i>	<i>P. campestris</i>	<i>P. barbutellus</i>	<i>P. insularis</i>	<i>P. sylvestris</i>	<i>P. quadricolor</i> ^c	<i>P. norvegicus</i>	<i>P. flavidus</i>
Isoprenoidy										
Citronellol		xx								
Farnesol					xxx					
Farnesylacetát					xx					
Geranylcitronellol	xx		xxx			xxx				
Geranylcitronellylacetát	xxx									
Geranylgeranylacetát			xx							
Alifatické alkoholy										
Tetradekanol			xx				x			
Tetradecenol			xΔ ⁹							
Hexadekanol			xx			xx		x		
Hexadecenol		xxxΔ ¹¹	xxx				xxxΔ ¹¹		xx	xxx
Oktadecenol		xxΔ ¹³		xx		xxxΔ ¹¹	x	xx	xxx	
Oktadekadienol		x								
Ikosenol	xxΔ ¹⁵	xxΔ ¹⁵		xxx						
Ikosadienol	x	xx								
Aldehydy										
Tetradekanal		x	x				xx	xx		
Hexadekanal		x	x				x	x		
Hexadecenal		xxΔ ¹¹						xxΔ ¹¹	xxx	
Oktadecenal	xΔ ¹¹	xxΔ ¹¹								
Ikosenal	xxΔ ¹⁵	x ^e Δ ¹⁵								
Ikosadienal	xxx	xxx								
Kyseliny a estery										
Tetradecenová kyselina							xx	xx		
Oktadecylacetát					x					
Ikosadienylacetát	xx									
Ethylododekanoát							x			
Ethyltetradekanoát							x			xx
Ethyltetradecenoát							xΔ ⁹	x		xx
Uhl vodíky										
Henikosadien	xxxΔ ^{5,9}									
Trikosan	xx	xx				xx				
Pentakosan	x	xx				x				
Heptakosan	x	x								
Literatura	44,45	34,40,45,46	34,40,46	34,46	34,46	30	34,40,46	34,46	46	46

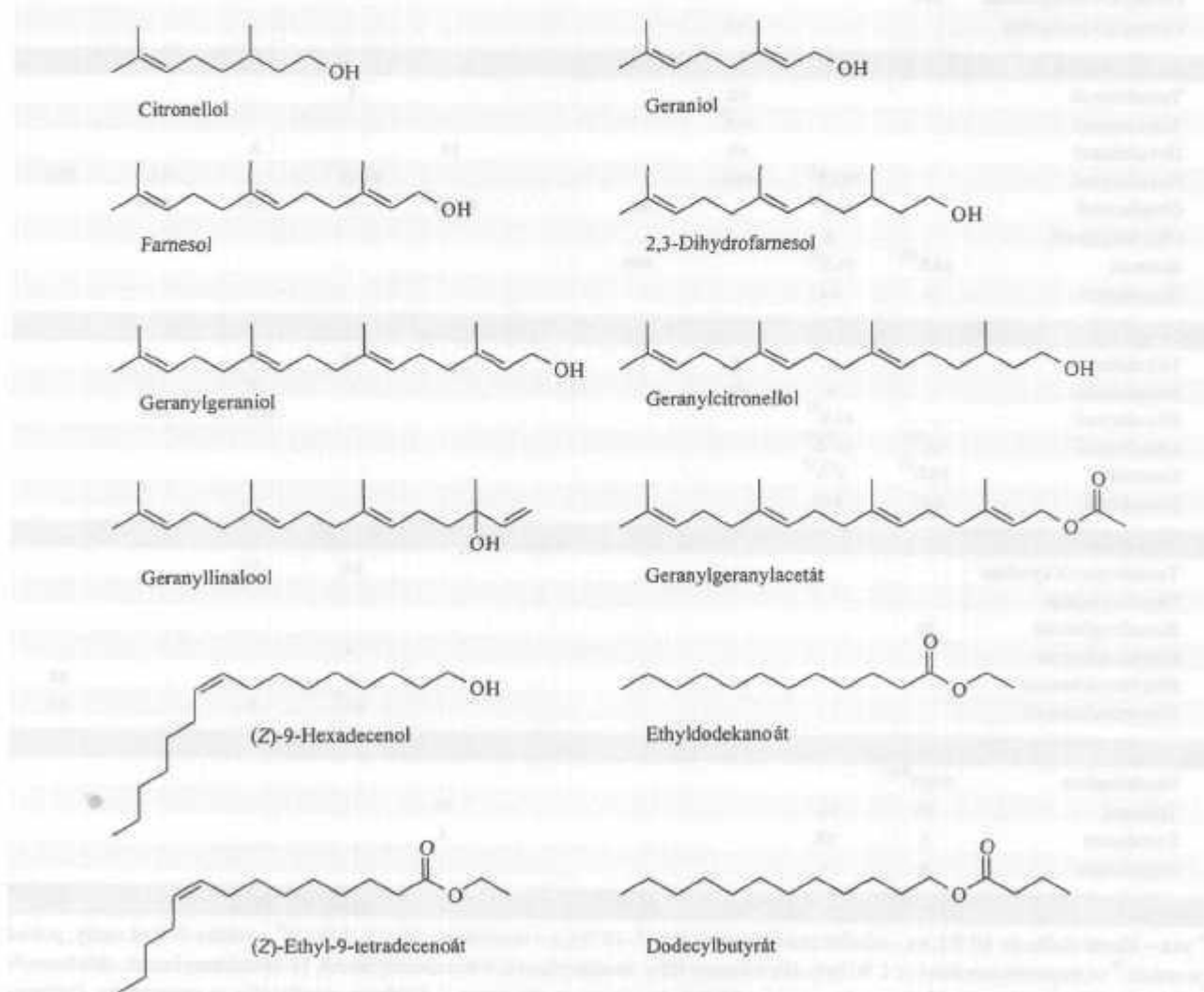
^axxx - hlavní složka (> 10 %), xx - středně zastoupená složka (2-10 %), x - minoritní složka (1-2 %), Δⁿ - poloha dvojnás vazby, pokud je známa, ^b ve stopovém množství (< 1 %) byly dále nalezeny látky: tetradecylacetát, 9-hexadecenylacetát, 11-hexadecenylacetát, oktadecenylacetát, oktadekadienylacetát, 15-ikosenylacetát, oktadekanal, hexakosan a oktakosan, ^c *Psithyrus quadricolor* je synonymem *Psithyrus globosus*, ^d v malém množství byl přítomen i Δ¹³ isomer, ^e v malém množství byl přítomen i Δ¹¹ isomer

trie dvojn  vazby určuje z infračerveného spektra m ren ho v plynn  f zi⁴⁷ (GC-FTIR). Ve všech dosud zkoumaných případech byla u složek  mel  ch sekretů nalezena Z-konfigurace dvojných vazeb.

Mezi isoprenoidn mi složkami sekretu jsou i chirální látky (citronellol, dihydrofarnesol, geranylcitronellol, geranylinalool a odvozen  estery). Doposud byla absolutn  konfigurace určena pouze u jedine látky - 2,3-dihydrofarnesolu (terrestrolu) z druhu *B. terrestris*⁴⁸. Syntézou srovnávacího vzorku, zm ren m optick  rotace a p ipravou diastereoizomerů bylo potvrzeno, že přirodní látka má konfiguraci 3S(-). Přes nespornou důležitost znalosti absolutn  konfigurace feromonových složek i dostupnost moderních technik, jako je chirální plynov  chromatografie, nemáme dosud  adn  informace o absolutn  konfiguraci či *enantiomern *  istot  ostatních chirálních látek u dal ich druhů čmeláků.

8.4. Podobnosti a rozdíly ve složení sekretu

Pokusme se nyní o malou statistiku látek, produkovaných same ky v labiální zl ze, a jejich distribuce v jednotlivých druzích (tabulky I-IV). V ice než polovina druhů čmeláků pou iv  isoprenoidní látky jako hlavn  složku, a to jak voln  alkoholy, tak jejich acetáty a odpovídající aldehydy. Nejčastěji se setkáváme s 2,3-dihydrofarnesolem, geranylcitronellolem a geranylgeranylacet tem. Také farnesol je často p itomen. I u pačmeláků m  polovina dosud studovaných druhů v sekretu isoprenoidy, mezi nimiž je nej ast j  výskyt geranylcitronellolu. 2,3-Dihydrofarnesol nebyl zatím u pačmeláků nalezen. Z alifatických sloučenin se nejčastěji setkáváme s alkoholy, jejichž řetězce jsou nev tvn  a hydroxyskupina je vždy v poloze 1. Nejbe n j mi



Obr. 1. Typick  p klady látek p itomn ch v sekret ch labiálních zl z samečků čmeláků a pačmeláků

alkoholy jsou hexadecenol (u 10 druhů čmeláků jako hlavní složka, dvojná vazba většinou v poloze 9) a oktadecenol (12 druhů *Bombus*). Podobně je tomu u pačmeláků, kde je navíc běžný i ikosenol. Aldehydy nacházíme u čmeláků jen vzácně (2 druhy, délka řetězce opět 16 a 18 uhlíkových atomů), zato u pačmeláků jsou aldehydy běžnější (14–20 uhlíkových atomů v řetězci). Zcela výjimečně byly nalezeny i ketony (*B. wurfleini mastrucatus*) s ketoskupinou v poloze 2 a s řetězcem o lichém počtu atomů uhlíku (15 a 17). Estery přítomné v labiálních žlázách jsou odvozeny buď od voskových alkoholů (acetáty, vzácněji i butyráty), nebo od mastných kyselin (methyl- a ethylestery). Acetáty alifatických alkoholů jsou prakticky všudypřítomné v rodu *Bombus* i *Psithyrus*, zatímco ethylestery mastných kyselin jsou typické pro čmeláky z podrodu *Bombus*. Pokud jde o přítomnost uhlovodíků v labiální žláze, je situace stejná prakticky ve všech druzích. Délky řetězce 23, 25 a 27 jsou nejběžnější. Stejně je tomu i u uhlovodíků v hmyzí kutikule.

U některých příbuzných druhů z téhož podrodu můžeme nalézt podobnosti v typech látek, ale není to vždy pravidlem. Pro podrod *Pyrobombus* jsou charakteristické mono-, sesqui- a diterpeny, přítomné ve většině druhů tohoto podrodu (tab. II). Rod *Alpinobombus* je charakterizován hlavně nerozvětvenými volnými alkoholy (tab. I). Z tabulky I je patrná podobnost dvou podrodů v levé části (*Megabombus* a *Subterraneobombus*), obsahujících isoprenoidy. Podrod *Thoracobombus* neobsahuje naopak vůbec isoprenoidy a dominují v něm C₁₆ a C₁₈-alkoholy. U pačmeláků (tab. IV) jsou určité podobnosti vidět uvnitř podrodu *Ashtonipsithyrus* (druhy *P. vestalis* a *P. bohemicus*) i podrodu *Fernaldaepsithyrus* (4 druhy v pravé části tab. IV, *P. sylvestris* - *P. flavidus*). Genetická příbuznost se tedy projevuje jak v podobnosti morfologické, tak i v podobnosti produkovaných chemických látek.

8.5. Chemotaxonomické studie

Pokud se budeme jednotlivými rody zabývat podrobněji, je jistě velmi zajímavým druhem čmeláka *Bombus lucorum*³². Byl nalezen na téže lokalitě jižního Švédska ve dvou formách, morfologicky rozlišených na světlou a tmavou na základě různého zbarvení těla. V chemickém složení sekretu obou forem je také signifikantní rozdíl. U tmavé formy je hlavní složkou ethyldodekanoát, zatímco u světlé formy je to (Z)-9-ethyltetradecenoát (tab. III).

Podobný případ byl popsán i pro druh *Bombus lapponicus*³³. V Evropě existuje celkem sedm forem tohoto druhu, lišící se zbarvením těla. Z chemického hlediska byly

studovány dvě formy (světlá a tmavá) vyskytující se ve Švédsku. Chemická analýza jasně potvrdila existenci dvou forem, zřetelně se lišících ve složení značkovacího sekretu (tab. II). Tyto formy byly následně v literatuře definovány nejprve jako poddruhy, později byly rozděleny na samostatné druhy. Hlavní složkou světlé formy byl geranylcitronellol. Tmavá forma je charakterizována hexadecenylacetátem a zastoupen byl též hexadecylacetát. Na základě chemické analýzy a morfologických znaků jsou jedinci klasifikováni jako světlí považováni za druh *B. lapponicus* a skupina tmavých jedinců je definována jako druh *B. scandinavicus*⁴¹. Tato práce je typickým příkladem využití chemické analýzy k určení a definování nových taxonů nebo k upřesnění charakteristiky již morfologicky rozdělených druhů (chemotaxonomie).

Statistické vyhodnocení přítomnosti různých sloučenin v sekretech labiální žlázy většího souboru druhů čmeláků i pačmeláků naznačuje podobnosti v chemismu u blízké příbuzných druhů⁴⁸. Dokonce i dvojice parazit-hostitel, jako např. *Psithyrus rupestris* a *Bombus lapidarius*, mají v sekretech stejné typy látek⁴⁹. Chemické výsledky tak mohou být podporou taxonomům, případně mohou upozornit na určité vztahy mezi druhy. Pro spolehlivé využití analytických dat k taxonomickým účelům by však bylo třeba zpracovat mnohem větší soubor dat, zahrnující i variabilitu uvnitř druhu. Pohled na data v tabulkách I–III potvrzuje správnost zařazení druhů do podrodů, ke kterému jsme se v taxonomii přiklonili.

9. Závěr

Podíváme-li se podrobně na přehled složek značkovacího feromonu čmeláčích samců, nenajdeme dva druhy, u nichž by složení sekretu bylo identické. I když jsou si některé sekrety složením podobné, vždy se liší přítomností minoritních složek nebo alespoň kvantitativním zastoupením látek. Dosud máme málo informací o geografických odchylkách ve složení sekretu uvnitř jednotlivých druhů. Zdá se, že v některých druzích tyto odchylky existují (*B. lucorum*), zatímco složení samčích značek jiných druhů je stabilní bez ohledu na lokalitu výskytu druhu (*B. pratorum*, *B. wurfleini*)⁵⁰. Také individuální rozdíly ve složení sekretu u jednotlivých samečků téhož druhu nebyly studovány. Nejvíce ale dosud chybí zásadní informace o tom, které ze složek sekretu jsou funkčně důležité, zda jsou rozhodující jen hlavní složky či zda je pro biologickou aktivitu významná celá směs látek. Hlavními důvody jsou na jedné straně

nesnáze s realizací vhodného biologického testu, neboť samečkové čmeláky potřebují pro patrolování velký otevřený prostor a v umělých testovacích podmínkách se nechovají přirozeně. Dalším důvodem je i nedostupnost syntetických preparátů některých složek sekretu, konkrétně seskviterpenů a diterpenů, opticky čistých v dostatečném množství. Syntézy seskví- a diterpenických složek sekretu byly provedeny buď v racemické formě, nebo i v opticky čisté formě^{44,51,52}. Náročné syntézy však neposkytly větší množství látky, potřebné pro rozsáhlejší biologické testy. Proto je v oblasti chemických signálů čmeláků ještě stále dostatek prostoru pro další výzkum biologů i chemiků.

Autorzy děkují RNDr. Oldřichu Hovorkovi a Mgr. Jiřímu Kindlovi za pomoc s taxonomií čmeláků a pačmeláků. Finanční podporu pro výzkum čmeláků u nás poskytl Grantová agentura České republiky (grant č. 203/95/0269).

LITERATURA*

- Bouček Z., Šustera O., v knize: *Klíč zvířeny ČSR*, II. díl, (Kratochvíl J., ed.), str. 377. ČSAV, Praha 1957.
- Richards O. W.: Bulletin of the British Museum (Natural History), Entomology 22, 209 (1968).
- Morse D. H., v knize: *Social Insects* (Hermann H. R., ed.), sv. III, str. 245. Academic Press, New York 1979.
- Cederberg B.: Entomol. Tidskr. 100, 128 (1979).
- Cederberg B.: Ann. Ent. Fenn. 49, 11 (1983).
- Fisher R. M., Greenwood D. R., Shaw G. J.: J. Chem. Ecol. 19, 77 (1993).
- Duffield R. M., Wheeler J. W., Eidkwort G. C., v knize: *Chemical Ecology of Insects* (Bell W. J., Cardé R. T., ed.), str. 387. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts 1984.
- van Honk C. G. J., Velthuis H. H. W., Röseler P.-F.: Experientia 34, 838 (1978).
- Hefetz A., Taghizadeh T., Francke W.: Z. Naturforsch. 51c, 409 (1996).
- van Honk C. G. I, Velthuis H. H. W., Röseler P.-F., Malotiaux M. E.: Ent. Exp. Appl. 28, 191 (1980).
- Röseler P.-F., Röseler I., van Honk C. G. J.: Experientia 37, 348 (1981).
- Slessor K. N., Kaminski L.-A., King G. G. S., Borden J. H., Winston M. L.: Nature 332, 354 (1988).
- Cederberg B.: *Proc. VIII Int. Cong. IUSSI*, str. 77: Wageningen, Netherlands, 1977.
- Vrkoč J., Křeček J., Hrdý I.: Acta Ent. Bohemoslov. 75, 1 (1978).
- Cederberg B.: Zoon 5, 143 (1977).
- Tengö J., Hefetz A., Bertsch A., Schmitt U., Lübke G., Francke W.: Comp. Biochem. Physiol. 99B, 641 (1991).
- Foster R. L., Gamboa G. J.: Ethology 81, 273 (1989).
- Hefetz A., Tengö J., Lübke G., Francke W., v knize: *Sensory Systems of Arthropods* (Wiese K., ed), str. 469. Birkhäuser Verlag, Basel 1993.
- Van Doorn A.: Neth. J. Zool. 37, 255 (1987).
- Van Doorn A.: Physiol. Entomol. 14, 211 (1989).
- Ayasse M., Marlovits T., Tengö J., Taghizadeh T., Francke W.: Apidologie 26, 163 (1995).
- Oldham N. J., Billen J., Morgan D.: Physiol. Entomol. 19, 115 (1994).
- Schmitt U.: Experientia 46, 1080 (1990).
- Schmitt U., Lübke G., Francke W.: Chemoecology 2, 35 (1991).
- Kato M.: Oecologia 76, 364 (1988).
- Bergström G., Svensson B. G., Appelgren M., Groth I., v knize: *Biosystematics of Social Insects* (Howse B., Clément J.-L., ed.), str. 175. Academic Press, London and New York 1981.
- Svensson B. G.: Abstr. Upps. Diss. Fac. Sci. 549, 1 (1980).
- Kullenberg B.: Zoon Suppl. 1, 31 (1973).
- Hovorka O., Urbanová K., Valterová I.: J. Chem. Ecol. 23, v tisku (1997).
- Bergström G., Bergman P., Appelgren M., Schmidt J. O.: Bioorg. Med. Chem. 4, 515 (1996).
- Free J. B., v knize: *Pheromones of Social Bees* (Free J. B., ed.), str. 157. University Press, Cambridge 1987.
- Bergström G., Kullenberg B., Stallberg-Stenhagen S.: Chem. Scr. 4, 174 (1973).
- Bergström G., Svensson B. G.: Chem. Scr. 4, 231 (1973).
- Kullenberg B., Bergström G., Stallberg-Stenhagen S.: Acta Chem. Scand. 24, 1481 (1970).
- Appelgren M., Bergström G., Svensson B. G., Cederberg B.: Acta Chem. Scand. 45, 972 (1991).
- Bergström G., Appelgren M., Svensson B. G., Ågren L., Descoins C., Frerot B., Gallios M., Lettère M.: Apidologie 16, 57 (1985).

* Obtížně dostupné entomologické práce jsou v plném znění k nahlédnutí v archivu autorek

37. Calam D. H.: *Nature* 221, 856 (1969).
38. Descoins C, Frerot B., Gallios M., Lettere M., Bergström G., Appelgren M., Svensson B. G., Ågren L.: *Nova Acta Reg. Soc. Ups. Ser. V:C* 3, 149 (1984).
39. Svensson B. G., Bergström G.: *J. Chem. Ecol.* 5, 603 (1979).
40. Lanne B. S., Bergström G., Wassgren A., Tornback B.: *Comp. Biochem. Physiol.* 88B, 631 (1987).
41. Svensson B. G., Bergström G.: *Insectes Soc.* 24, 213 (1977).
42. Bergström G., Kullenberg B., Stållberg-Stenhagen S., Stenhagen E.: *Arkiv Kemi* 28, 453 (1968).
43. Svensson B. G., Appelgren M., Bergström G.: *Nova Acta Reg. Soc. Ups. Ser. V:C* 3, 145 (1984).
44. Valterová I., Svatoš A., Hovorka O.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 61, 1501 (1996).
45. Bergman P., Bergström G., Appelgren M.: *Chemoecology* 7, v tisku (1996).
46. Cederberg B., Svensson B. G., Bergström G., Appelgren M.: *Nova Acta Reg. Soc. Ups. Ser. V:C* 3, 161 (1984).
47. Attygalle A. B., Svatoš A., Wilcox C: *Anal. Chem.* 66, 1696(1994).
48. Stållberg-Stenhagen S.: *Acta Chem. Scand.* 24, 358 (1970).
49. Bellés X., Galofré A., Ginebreda A.: *Apidologie* 231, 18 (1987).
50. Urbanová K., Valterová I.: nepublikované výsledky.
51. Ahlquist L., Stållberg-Stenhagen S.: *Acta Chem. Scand.* 25, 1685 (1971).
52. Ahlquist L., Bergström G., Liljeborg C: *Prog. Chem. Fats other Lipids* 16, 231 (1978).

I. Valterová and K. Urbanová (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Chemical Signals of Bumblebees**

The review summarises chemical compounds found in exocrine glands of different castes of bumblebees. The sex pheromone of queens, queen pheromones, defence substances, trail pheromones, dominant signals of workers, marks of a food source, and male's marking pheromones are described. Attention is paid especially to the constituents of labial gland secretions of males. An overview is given of the chemistry of 32 species of bumblebees (genus *Bombus*) and 10 species of cuckoo bumblebees (genus *Psithyrus*), occurring in Europe and America. Similarities and differences in the chemical composition of secretions of related species within subgenera are discussed.