

**ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ
UNIVERZITA V PRAZE
FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ
KATEDRA EKOLOGIE**



**Česká
zemědělská
univerzita
v Praze**

**Analýza velikosti genomu u zástupců hmyzu
(Lepidoptera a Orthoptera) s odlišným postembryonálním
vývojem**

**Genome size of selected groups in Insects (Lepidoptera and Orthoptera)
with different postembryonic processes**

Bakalářská práce

Autor: Daniela Reindlová

Vedoucí práce: Ing. Hana Šípková, Ph.D.

2021

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Daniela Reindlová

Environmentální vědy

Aplikovaná ekologie

Název práce

Analýza velikosti genomu u zástupců hmyzu (Lepidoptera a Orthoptera) s odlišným postembryonálním vývojem

Název anglicky

Genome size of selected groups in Insects (Lepidoptera and Orthoptera) with different postembryonic processes

Cíle práce

Cílem práce bude analýza absolutní velikosti genomu vybraných zástupců hmyzu s kontrastním vývojovým cyklem. Jako modelové skupiny byly vybrány Orthoptera (kobyly a sarančata) a zástupci motýlů (Lepidoptera). Součástí práce bude i literární rešerše dosud publikovaných prací zabývajících se problematikou vývojového cyklu hmyzu.

Metodika

V rešeršní části práce autor podá na základě literárních zdrojů přehled dosavadních znalostí o vývojových cyklech hmyzu a o velikosti genomu jako parametru, který může odlišný postembryonální vývoj odrážet. V praktické části provede měření absolutní velikosti genomu vybraných zástupců dvoustupňovou metodou dle Otto 1990 (Doležel et al. 2007) s využitím průtokové cytometrie a propidium iodidu jako fluorescenčního barviva. Získaná data statisticky zpracuje (zhodnocení mezidruhových rozdílů pomocí ANOVy, Tukyho testu, boxplotů s přihlédnutím k odlišnému vývoji) a vhodně diskutuje výsledky s ohledem na publikované práce.

Doporučený rozsah práce

cca 30 stran

Klíčová slova

velikosti genomu, Lepidoptera, Orthoptera, rovnokřídlí hmyz

Doporučené zdroje informací

Hanrahan S.J., Johnston J.S., 2011: Nes genome size estimates of 134 species of arthropods. *Chromosome res*, 19: 809-823.

Předběžný termín obhajoby

2020/21 LS – FŽP

Vedoucí práce

Ing. Hana Šípková, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra ekologie

Konzultant

mgr. Vít Petr, Ph.D.

Elektronicky schváleno dne 9. 3. 2020

doc. Ing. Jiří Vojar, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 9. 3. 2020

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Děkan

V Praze dne 27. 03. 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma: Analýza velikosti genomu u zástupců hmyzu (Lepidoptera a Orthoptera) s odlišným postembryonálním vývojem vypracovala samostatně a citovala jsem všechny informační zdroje, které jsem v práci použila a které jsem rovněž uvedla na konci práce v seznamu použitých informačních zdrojů. Jsem si vědoma, že na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů, ve znění pozdějších předpisů, především ustanovení § 35 odst. 3 tohoto zákona, tj. o užití tohoto díla. Jsem si vědoma, že odevzdáním bakalářské souhlasím s jejím zveřejněním podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a to i bez ohledu na výsledek její obhajoby. Svým podpisem rovněž prohlašuji, že elektronická verze práce je totožná s verzí tištěnou a že s údaji uvedenými v práci bylo nakládáno v souvislosti s GDPR.

V Praze _____

Podpis: _____

Poděkování:

Chtěla bych moc poděkovat svojí vedoucí práce Ing. Haně Šípkové, Ph. D., především za její trpělivost, ale hlavně za poskytnutí vzorků pro mojí práci a cenné informace. Dále bych chtěla poděkovat mému konzultantovi Mgr. Petrovi Vítovi, Ph. D., který mě naučil pracovat s průtokovým cytometrem-přístrojem, který byl nezbytný pro předkládanou práci.

Abstrakt:

Velikost genomu je veškerá genetická informace uložená v DNA. Hodnota velikosti genomu se označuje jako C – hodnota a jednotkou jsou pg (pikogramy). Průtoková cytometrie je moderní technologie, která se využívá právě na měření velikosti genomu. Tato moderní technologie je důležitou součástí pro zjištění velikosti genomu v lidských, rostlinných a živočišných buňkách. Tato práce se zabývá analýzou velikostí genomu u řádů s odlišným postembryonálním vývojem (Lepidoptera a Orthoptera). Z výsledků měření této práce vyplývá, že druhy s proměnou dokonalou mají průměrně menší velikost genomu, zatímco druhy s proměnou nedokonalou dosahují vyšších hodnot. Můžeme tedy předpokládat na základě svých statistických výsledků, že velikost genomu závisí na délce vývoje u jednotlivých jedinců.

Klíčová slova: velikost genomu, Lepidoptera, Orthoptera, FCM, cytometrie

Abstract:

A genome size is the entire genetic information locked in DNA. The value of genome size is expressed as C-value. Unit of C-value is pg (pictogram). Flow cytometry is a modern technology used for measuring the genome size. This modern technology is an important part of the determination process of the genome size in human, plant and animal cells. This thesis analysis genome sizes of taxonomic orders with different postembryonic processes (Lepidoptera and Orthoptera). Measured genome size results conducted as a part of this thesis conclude that, on average, holometabolous species have smaller genome size, while hemimetabolous species attain higher values. Based on statistical results, we can assume that genome size is depending on duration of development process of each individual.

Key words: genome size, Lepidoptera, Orthoptera, FCM, cytometry

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Cíl práce.....	2
3. Průtoková cytometrie.....	3
3.1 Historie.....	3
3.2 Metoda.....	3
3.2.1 Fluidní systém.....	4
3.2.2 Optický systém.....	4
3.2.3 Detekční systém.....	5
4. Standardy.....	6
5. Barviva.....	7
6. Využití průtokové cytometrie.....	8
6.1 Velikost genomu.....	8
7. Výhody a nevýhody.....	9
8. Postembryonální vývoj.....	9
8.1 Přímý vývoj.....	9
8.2 Nepřímý vývoj.....	10
8.2.1 Proměna nedokonalá (Hemimetabolie).....	10
8.2.2 Proměna dokonalá (Holometabolie).....	10
9. Studované taxony.....	11
9.1 Lepidoptera.....	11
9.1.1 Vajíčko.....	11
9.1.2 Larva (housenka).....	12
9.1.3 Kukla (pupa).....	12
9.1.4 Dospělec.....	13
9.2 Orthoptera.....	14
9.2.1 Kobylinky (Ensifera).....	14
9.2.2 Sarančata (Caelifera).....	15
9.3 Rozdíly.....	16
10. Metodika.....	18
10.1 Příprava hmyzího materiálu.....	18
10.2 Příprava barviva.....	18
10.3 Analýza průtokovým cytometrem.....	19

10.4	Statistické zpracování výsledků.....	21
11.	Výsledky	22
12.	Diskuze	30
13.	Závěr	34
14.	Literatura.....	35
15.	Přílohy.....	39

1. Úvod

Průtoková cytometrie (*flow cytometry*, FCM) se řadí mezi moderní metodu používanou v základním i aplikovaném výzkumu po řadu biologických oborů (Suda, 2005). Tato technika se postupně formovala v 60. letech minulého století, a to především zásluhou federálních výzkumných pracovišť Lawrence Livermore a Los Alamos National Laboratories (Melamed, 2001). Škála využití této metody je značná, pokrývá například stanovení obsahu jaderné DNA, určení ploidie, lze provést i analýzu buněčného cyklu a slouží také k počítání a určení typu krevních buněk

(Suda, 2005).

První průtoková cytometrie byla vyvinutá jako jednoparametrový přístroj k zjištění pouze velikosti buněk. V současné době je schopná odhalit až 14 parametrů současně (Wilkerson, 2012). Principem této metody je využití fluorescenčního barviva (fluorochrom) pro navázání DNA pozorovaného vzorku (Kron et al., 2007). Tato metoda je jen zřídka využívána ke studiu bezobratlých živočichů, je jen skromný počet studií zabývající se velikostí genomu u vybraných taxonů, což je udivující k vzhledem výhodám této metody. Výhodami techniky jsou zejména rychlost, přesnost měření a poměrně nízká finanční náročnost (Trávníček et al., 2011).

2. Cíl práce

V mém případě se budu zajímat o měření velikosti genomu (v absolutních hodnotách v pikogramech) u živočišných zástupců, a to konkrétně u Orthoptera a Lepidoptera. Očekávanou velikost genomu měřeného zástupce můžeme zhruba odhadnout na základě publikovaných dat. Cílem této práce je měření velikosti genomu u zástupců Orthoptera (Rovnokřídli) a Lepidoptera (Motýli) s odlišným postembryonálním vývojem a následně porovnat a vyhodnotit naměřené výsledky.

3. Průtoková cytometrie

3.1 Historie

Andrew Moldavan sestrojil první prototyp průtokového cytometru v roce 1934, avšak tento přístroj nedokázal kvantifikovat fyzikální a chemické vlastnosti buněk. Roubalová (2012) dále popisuje, že až v šedesátých letech se začaly objevovat první vyráběné průtokové cytometry, které obsahovaly sorter pro výběr jednotlivých typů částic. Tyto přístroje byly ale příliš náročné na obsluhu a velmi drahé, proto byly určeny pouze pro vědecké účely. Vlivem několika faktorů průtoková cytometrie zaznamenala prudký rozvoj, zejména díky elektronové mikroskopii, používání fluorescenčních barviv a v neposlední řadě díky objevu monoklonálních protilátek. Záslouhou počítačů a pokročilých programů jsou v dnešní době cytometry běžnou součástí ve většině klinických laboratoří (Roubalová, 2012).

3.2 Metoda

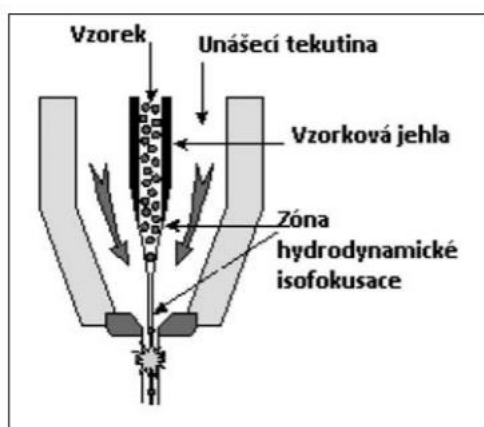
Všechna měření pomocí metody průtokové cytometrie se provádějí v pohybu a jsou zaznamenány optické vlastnosti jednotlivých částic, nejčastěji to bývá intenzita fluorescence. Na dvoušroubovici DNA měřeného předmětu se naváže fluorescenční barvivo (Fluorochrom), důležité je, aby zvolená látka nebarvila i jiné orgány a vázala se kvantitativně, tzn. aby množství navázaného fluorochromu bylo úměrné množství DNA (Suda, 2005).

Aby mohla být provedena analýza pomocí průtokové cytometrie, musí být buňky v suspenzi (Givan, 2001). Obarvená jádra pomocí fluorescenčního barviva protékají speciální komůrkou tak, aby protekla jedna buňka ze suspenze. Po této operaci dochází k osvětlení paprskem, který má určitou vlnovou délku, dochází tak k emisi fluorochromu, přičemž je emitované záření o jiné vlnové délce detekované fotodetektory. Naměřené výsledky jsou nejčastěji převáděny do histogramů, cytogramů anebo do 3D grafu (Doležel et. al, 2007).

Průtokový cytometr se skládá ze tří částí: Fluidní systém, optický systém a detekční systém. Tyto tři systémy jsou vzájemně propojené (Roubalová, 2012).

3.2.1 Fluidní systém

Analýza je provedena správně jen tehdy, kdy částice procházejí systémem jedna za druhou. Ve fluidním systému dochází k přenosu částic, které jsou vstříkovány do unášecí tekutiny malým otvorem. Jednotlivé částice musí zaujímat ideální pozici, která je seřízená pomocí hydrodynamické isofokace unášecí tekutiny neboli izotonického roztoku. Kapiláry jsou zúžené, aby nedošlo ke smísení vzorku s tekutinou, díky úzkým kapilárám nám vzniká koaxiální proud, který zajišťuje, že měřicím proudem prochází právě jedna částice. Fokusaci lze i upravovat například nastavením malého rozdílu tlaku studovaného vzorku a izotonického roztoku (Roubalová, 2012).



Obrázek 1: Schéma vstříkování vzorku. Převzaté z Šinkorová et al. (2008).

3.2.2 Optický systém

Optický systém se skládá ze dvou částí, a to z excitační a sběrné. Excitační část je tvořená laserem, soustavou čoček a hranolů usměrňujících paprsek. V části sběrné se nachází optická zrcadla a filtry umožňující detekci specifické vlnové délky příslušnými optickými detektory (Pekarčíková et al., 2014). Soustava čoček, zrcadel a optických filtrů zachycují fluorescenční a rozptýlené záření, které je převáděno na opticky aktivní vrstvu optoelektronických detektorů (fotonásobičů a fotodiod), které tvoří hranici mezi optickým a elektronickým podsystémem průtokového cytometru (Šinkorová et al., 2008). Interakcí částice a záření vzniká signál, který je detekován v závislosti na jeho intenzitě. Pokud lineárně rozptýlené záření dopadá na fotodiodu, která je umístěná v ose dopadajícího paprsku, nazýváme jej *Forward scatter (FS)*. Bočně rozptýlené záření dopadající kolmo na osu dopadajícího paprsku se nazývá *Side scatter (SS)*.

Poslední typ signálu popisuje Roubalová (2012) jako fluorescenční záření. Uvolnění energie ve formě fotonů s jinou vlnovou délkou po excitaci zářením nazýváme fluorescence. Jediná látka, která je uzpůsobená k fluorescenci jsou fluorochromy. K samotnému převodu optického signálu na elektrický a k digitalizaci pro počítačovou analýzu dochází v elektronickém systému (Pekarčíková et al., 2014)

3.2.3 Detekční systém

V detekčním systému se získané signály z optiky převádějí na elektrické impulzy a jsou zobrazeny prostřednictvím počítačového softwaru. K zobrazení každého impulzu (*event*) slouží různé grafické záznamy. Jedním z nich je jednoparametrový histogram, kde vyneseme na osu x intenzitu signálu a na osu y množství buněk. Druhým grafickým záznamem jsou dvouparametrové histogramy, které jsou i mnohem častější. Dvouparametrový histogram nastává, když je na ose x zobrazena intenzita a na ose y intenzita druhého signálu. V tomto zobrazení se každá z událostí vyobrazuje jako tečka. Množství částic je zobrazeno jako hustota bodů (dotplot histogram) anebo jako hustota čar (contour-plot histogram). Některé ze softwarů nabízí i třetí zobrazení, a to v trojrozměrném izometrickém grafu (Roubalová, 2012).

4. Standardy

Analýza výsledků není možná bez srovnání se standardem. Standard je vzorek, u kterého známe již předem velikost genomu (Doležel et al., 2007 a). Je důležité, aby referenční a cílové vzorky měly podobnou velikost genomu, ale ne stejnou, aby se nepřekrývaly vrcholy (píky) výchozích histogramů. Standardizace se rozděluje na dva typy. V externí standardizaci dochází k měření vzorku a standardu nezávisle na sobě. Toto měření, ale není doporučováno, za vhodný postup je považována interní standardizace, při kterém jsou vzorky ve správném poměru smíchány a měření probíhá současně (Stuchlíková, 2017). Očekávanou velikost genomu měřeného materiálu určíme na základě publikovaných dat v online databázi www.genomesize.cz.

Standardy mohou být jak živočišného, tak ale i rostlinného původu. V mém případě jsem aplikovala standardy rostlinného původu. Konkrétně jsem použila tyto čtyři:

1. *Carex acutiformis* 2C = 0.82 pg (ostřice ostrá)
2. *Solanum pseudocapsicum* 2C = 2.61 pg (lilek višňový)
3. *Bellis perennis* 2C = 3.38 pg (sedmikráska obecná)
4. *Pisum sativum* 2C = 8.84 pg (hrách setý)

5. Barviva

Pro snadné uvolňování jader bez cytoplazmy je důležité složení izolačního roztoku (pufru), ten navíc udržuje integritu izolovaného jádra, chrání DNA před endonukleázami a usnadňuje barvení DNA. Součástí některých pufrů je i fluorochrom, je ale i možnost přidávat ho následně po izolaci jader. Pufrů je celá řada, mezi nejčastěji používanými se řadí Galbraithův pufr, LB01, Mariin jaderný izolační pufr, Tris-MgCl₂ a v neposlední řadě Otto I. a Otto II. (Doležel & Bartoš, 2005).

V mé práci jsem použila kombinaci pufrů Otto I. a Otto II. s barvivem Propidium jodid (PI). Jedná se o malou fluorescenční molekulu, která se váže na DNA (Crowley, 2016). Propidium jodid se dostává mezi obě vlákna DNA ale i RNA, proto je zapotřebí přidat do vzorku ribonukleázu, aby proběhla správná analýza obsahu DNA (Hare, 2012).

Název	Složení
Galbraithův pufr	45 mM MgCl ₂ 30 mM citronan sodný 20 mM MOPS pH = 7
LB01	15 mM Tris 2 mM Na ₂ EDTA 0.5 mM spermin · 4HCl 8mM KCl 20 mM NaCl pH = 8
Mariin izolační jaderný pufr	50 mM glukóza 15 mM KCl 15 mM NaCl 5 mM Na ₂ EDTA 50 mM citronan sodný 50 mM HEPES pH = 7.2
Tris-MgCl₂	200 mM Tris 4 mM MgCl ₂ · 6H ₂ O pH = 7.5
Otto I. a Otto II.	I.100 mM kyselina citronová II.400 mM Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O

Tabulka 1: Složení pufrů. Převzato z Doležel & Bartoš (2005).

6. Využití průtokové cytometrie

Zpočátku sloužila průtoková cytometrie pro počítání a analýzu krevních buněk, postupem času se formovala i k využití v dalších biologických oborech (Suda, 2005).

V dnešní době nachází uplatnění v mnoha oblastech. Nejčastější využití je stanovení ploidního stupně zkoumaného materiálu. Znalost stupně ploidie je velmi důležitým prvkem pomáhající ozřejmit okolnosti v taxonomicky komplikovaných skupinách. Vyskytuje se totiž velká skupina rostlin, jejichž druhy jsou vysvětlovány pomocí ploidních stupňů, protože se jen nepatrně odlišují v morfologických znacích (Suda, 2005).

Podle Botanického ústavu AV ČR se průtoková cytometrie také zabývá určením obsahu DNA (velikosti genomu). Naměřená data slouží ke studiu diverzity a dynamiky polyploidních komplexů cévnatých rostlin a pomáhá vyhodnocovat otázky v evolučních a ekologických důsledcích genové duplikace.

6.1 Velikost genomu

Suda (2015) charakterizuje genom jako veškerou genetickou informaci uloženou v DNA. Hodnota velikosti genomu se značí jako záhada C-hodnoty anebo také C-Value paradox (Gregory, 2005). C-hodnota uvádí velikost nereplikovaného haploidního genomu, který se stanovuje v počtech párů bází nebo jako hmotnost DNA v pikogramech ($1 \text{ pg} = 10^{-12} \text{ g}$) (Suda, 2015). Gregory (2005) uvádí, že velikost genomu je druhově specifická vlastnost, která nesouvisí se složitostí organismu.

Nejdříve se usuzovalo, že velikost genomu úzce souvisí s počtem genů a organismy, které jsou vývojově pokročilejší a budou tak mít i vyšší obsah jaderné DNA. Toto tvrzení se ale vyvrátilo charakterem DNA. Jen malá část dvoušroubovice kóduje proteiny, naopak ta větší část dvoušroubovice představuje nekódující úseky, což zahrnuje repetitivní sekvence, introny, pseudogeny a regulační sekvence a také geny pro nekódující RNA (Suda, 2015).

Data o velikosti genomu se stávají nedílnou součástí pro srovnávání výzkumu evoluce genomu. Byly spuštěny tři nezávislé databáze, které poskytují údaje o velikosti genomu, rostlinných C-hodnot DNA, velikost živočišného genomu a určení velikosti genomu hub, avšak stále nejsou popsány všechny druhy, například u krytosemenných rostlin je známo jen 1,4 % hodnoty C (Gregory, 2007).

Ve své práci jsem využívala databázi www.genomesize.cz, která je spuštěná od roku 2001. Na portálu je v současné době popsáno 6 222 druhů (3 793 obratlovců a 2 479 bezobratlých), u kterých je znám obsah haploidní DNA (C-Value). Z třídy hmyzu je popsáno 1345 řádů.

7. Výhody a nevýhody

K největším přednostem průtokové cytometrie patří přesnost a rychlost měření. Přichystání suspenze jader k samotnému měření zabere jen pár minut. Samotné měření nám umožňuje zanalyzovat několik stovek jader za jednu sekundu. Jedno toto měření nám dokáže popsat informaci o množství DNA, stupni ploidie a nespočet dalších charakteristikách jedince. Za jediný den dokáže průtoková cytometrie naměřit desítky až stovky vzorků. Další výhodou je určitě finanční dostupnost studovaných vzorků, která má cenu jen pár desítek korun za vzorek (Suda, 2005).

Nicméně, co se týče finanční dostupnosti, vzorky sice stojí pár desítek korun, ale samotný přístroj je velice finančně nákladný. Další nevýhodou průtokového cytometru je, že je lepší pracovat s živým materiálem, aby byla přesnost měření co největší. Lze ale pracovat i se sušenými vzorky (Suda, 2005). V našem případě jsme pracovali se živým materiálem, která jsme následně ukládali do lihu.

8. Postembryonální vývoj

Ontogeneze (individuální vývoj) u živočichů se zahajuje od oplození vajíčka po smrt jedince. Vývoj rozlišujeme do dvou období: embryonální a postembryonální. Ve fázi embryogeneze se vyvíjí embryo (zárodek), kdy je jedinec chráněn vaječnými obaly. Postembryonální vývoj zahrnuje narození a vznik pohlavních orgánů, dělíme jej na přímý a nepřímý vývoj (Jelínek, 2005).

8.1 Přímý vývoj

Přímý vývoj nastává, když se z vajíčka vylíhne jedinec morfologicky i anatomicky velmi podobný dospělci. V přímou podobu se mění dorůstáním a dozráváním pohlavních žláz (Jelínek, 2005).

8.2 Nepřímý vývoj

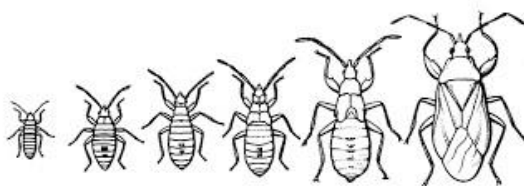
Pokud z vajíčka vzniká larva, nepodobná dospělci jedná se o vývoj nepřímý. Larva se účastní několika vývojových stadií (*instary*). Všechna vývojová stadia se od sebe oddělují svlékáním (*ekdyze*) a celý proces je řízen hormonálně. Nepřímý vývoj má dva typy proměny, patří tam proměna dokonalá (*Holometabolie*) a nedokonalá (*Hemimetabolie*) (Zahradník & Severa, 2007).

8.2.1 Proměna nedokonalá (Hemimetabolie)

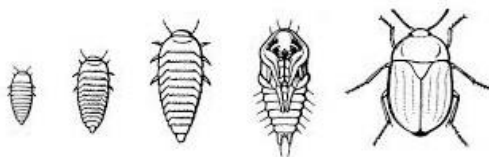
Proměna nedokonalá probíhá, když jedinci postupně dorůstají do podoby dospělého. Při posledním svlékání se vyvíjejí pohlavní orgány a křídla (Jelínek, 2005). Tato proměna obsahuje tři vývojové fáze vajíčko-larva-imago. Larva se v této fázi označuje jako nymfa. Při tomto vývoji neprobíhá žádné období klidu. Mezi zástupce proměny nedokonalé řadíme např.: vážky, jepice, kobylinky, sarančata atd. (Zahradník & Severa, 2007).

8.2.2 Proměna dokonalá (Holometabolie)

K proměně dokonalé dochází, když se z vajíček líhne larva, která není podobná s dospělcem daného druhu (Jelínek, 2005). V proměně dokonalé probíhají čtyři fáze: vajíčko-larva-kukla-dospělec. Kukla (pupa) se označuje jako klidová fáze mezi dorostlou larvou a dospělcem. Podoba ve všech stadii se velice liší. Proměnou dokonalou prochází zejména čtyři nejpočetnější řady hmyzu: brouci, motýli, blanokřídli a dvoukřídli (Zahradník & Severa, 2007).



Obrázek 2: Schéma nedokonalé proměny. Převzato ze Zahradník & Severa (2007)



Obrázek 3: Schéma dokonalé proměny. Převzato ze Zahradník & Severa (2007)

9. Studované taxony

Ve své práci jsem se zabývala porovnáním velikosti genomu u dvou řádů s odlišným postembryonálním vývojem.

9.1 Lepidoptera

Lepidoptera (motýli) patří k jedné z nejobsáhlejších řádů hmyzu. Na celém světě je doposud popsáno přes 150 000 druhů motýlů, avšak každý rok přibývají nově popsané druhy, tudíž celkový počet se odhaduje na 400 000 druhů. V České republice je známo 3 411 druhů ze 75 čeledí (Laštůvka & Liška, 2008). Jejich velikost je velice různorodá, nejmenší představitel drobníček jabloňový (*Nepticula malella*) činí v rozpětí křídel pouhých 4-5 mm, zatímco největší martináč hrušňový (*Saturnia pyri*) měří až 160 mm. (Zahradník & Severa, 2007).

U motýlů probíhá vývoj proměnou dokonalou, tudíž z vajíčka se vylíhne larva (houseska), která se několikrát svlékne a přechází v kuklu, z které se následovně vylíhne motýl (Gullan & Cranston, 2014).

9.1.1 Vajíčko

Fáze vajíčka začíná samičím uložením zralého vajíčka, samotné vajíčko tvoří zárodečná buňka, která je obalena pružnou skořápkou. K oplození vajíčka dochází pomocí otvorů na pólech vajíčka, do kterých vniká spermatozoid (samčí zárodečná buňka). Spermatozoid tak zapříčiní vznik zygoty (Gullan & Cranston, 2014).

Vajíčka motýlů mají několik tvarů, mohou být vejčitá, kulovitá, hruškovitá nebo protáhlá. I zbarvení vajíček se liší, zprvu mají bílou barvu, ale krátce po naklazení se mění do žluté, světle červené nebo se zbarvuje i do zelené. Podoba povrchu vajíčka je jemně zrnitá a běžně se na něm vyskytují podélné nebo příčné lišty, osténky nebo výrůstky. Počet naklazených vajíček se liší od druhu, samičky mohou naklást jen několik vajíček ale také několik set (Zahradník & Severa, 2007).



Obrázek 4: Ukázka tvarů vajíček. Převzato z Reichholf-Riehm (2003).

9.1.2 Larva (housenka)

Jedna z nejméně výraznějších vlastností housenky je růst a přijímání potravy. Dospělý motýl ani kukla nerostou, tudíž velikost dospělého motýla se odráží na velikosti její housenky. Hlavním faktorem velké housenky je velké množství potravy, které zkonsumuje během larválního vývoje, proto mají kusadla, uložená na hlavě, zásadní význam pro život housenky (Zahradník & Severa, 2007).

Tělo housenky je často pokryto chloupky, ale není to pravidlem u všech druhů, je štíhlé a protáhlé. Housenka se skládá z hlavy, tří článků hrudních a z deseti článků zadečkových. Na každé straně hlavy je usazeno šest jednoduchých očí, pod nimiž se nachází tykadla. Na hrudních člancích jsou připojeny nohy, na 3. a 6. článku zadečku panožky a pošinky jsou usazeny na 10. článku zadečku. Housenky mohou mít několik zbarvení šedo zelené, zelené nebo hnědé. Obranné systémy housenky před nepřáteli jsou výstražné postavení nebo stočení. Nejjednodušší pro housenku je ale spadnout do porostu a zmizet. V momentu, kdy se dostane housenka do potřebné velikosti a přestává se svlékat, hledá možná místa pro zakuklení (Zahradník & Severa, 2007).

9.1.3 Kukla (pupa)

Kukla se nachází v klidovém vývojovém stadiu, kdy probíhá rozsáhlá anatomická přeměna. Mácová (2009) charakterizovala kuklu jako pevnou schránku, kde jsou vidět náznaky orgánů budoucího motýla.

V místě pošinek vzniká tzv. kremaster. Ten je opatřený háčky, pomocí kterých se kukla přichytí k rostlině či jiné podložce. Kukla může být situována hlavou dolů, ale i hlavou vzhůru, v tomto případě si kukla opatří vlákna, kterými se přidržuje a zadeček opře o podklad. Rozlišují se tři typy kukel. Nejprimitivnější zástupci motýlů využívají kuklu volnou (*pupa libera*). Dále je to kukla nedokonalá (*pupa semilibera*). Její charakteristickou vlastností jsou volná křídelní pouzdra a volné končetiny. Třetím typem je pak kukla dokonalá (*pupa obtecta*), kde jsou přívěsky pevně přirostlé k tělu (Zahradník & Severa, 2007).

Přeměna v kukle probíhá rozpuštěním tkáně, kde se následně okolo zárodečných terčů začínají vyvíjet zcela nové základy budoucích orgánů. Imago čerstvě vylezlé z kukly dospělého motýla moc nepřipomíná, potřebuje určitý čas, aby se mu zpevnila křídla, vybarvil se a byl schopen letu (Zahradník & Severa, 2007).

9.1.4 Dospělec

Motýli se vyznačují dlouhým tělem, které je rozděleno do tří částí: hlava, hrudník a zadeček. K hrudníku jsou připojena přední a zadní křídla.

Na hlavě motýla je umístěn jeden pár velkých složených očí. Složené oči tvoří buňky světelných receptorů, které dokážou detekovat světlo. (Vane-Wright et al., 1986). Tykadla na horní části hlavy mají různý tvar, délku a počet článků. U motýlů rozlišujeme několik typů tykadel, samičky zpravidla mívají jednodušší tykadla než samci a denní motýli se vyznačují tenkými a tužšími tykadly zakončené paličkou nebo plochým terčíkem (Mácová, 2009). V neposlední řadě jsou důležitá i pro identifikaci potencionálních partnerů, protože tykadla slouží jako čichový orgán (Vane-Wright et al., 1986). K přijímání potravy mají motýli vyvinutý spirálově stočený sosák. Pomocí sosáku jsou schopni nasávat nektar, vodu či minerální látky (Reichholf-Riehm, 2003).

Hrud' (*Thorax*) se skládá ze tří článků, předohrud' (*prothorax*), středohrud' (*mesothorax*) a zadohrud' (*metathorax*). Články jsou spojeny z řady nepohyblivých skleritů (Resh&Cardé, 2003). Na každém hrudním článku nalezneme pár článkovaných nohou. Křídla jsou připojena k druhému a třetímu článku, přední křídla jsou napojena na mesothorax a zadní na metathorax (Mácová, 2009). U primitivnějších skupin jsou křídla s mesothorax a metathorax stejné velikosti, zatímco u více odvozených skupinách je mesothorax větší a má mnohem silnější svalstvo, navíc přední křídla mají silnější žilní strukturu (Resh&Cardé, 2003). Končetiny motýlů slouží k přichycení k podložce anebo k pohybu z místa na místo. Blanitá křídla jsou vyztužena vodorovnými a příčnými žilkami, které jsou pokryty šupinami. Šupinky jsou drobné a pigmentózní, stanovují celé zbarvení křídla. U některých druhů motýlů mohou být křídla zakrnělá anebo úplně scházejí (Zahradník & Severa, 2007). Základ kreseb vybarvujících se na křídlech vznikají už v kukle. Barevnost a kresba je u každého motýla, i stejného druhu, jiná. Tento jev se nazývá tzv. variabilita (Dubiel von LeRach, 2003). V klidovém režimu mají složená křídla buď kolmo na tělo (denní motýli), plošně anebo střechovitě (noční motýli) (Zahradník & Severa, 2007).

Zadeček (*Abdomen*) se skládá z deseti článků, viditelných je prvních 8 (u samic 7, mají o jeden článek méně). Na konci celého zadečku se nachází kopulační ústrojí, které nám vždy bezpečně určí druhy, které jsou si barevně velice podobné (Reichholf-Riehm, 2003). Vnitřní kopulační orgány u samců tvoří varlata a u samic vaječníky. Vnitřní orgány vyústují do vnějších orgánů společně se systémem navazujících žláz. Zažívací soustava motýlů je umístěna na obou stranách zadečku, kde se mimo jiné nachází také pulzující céva, a to na hřbetní straně. Důležitou součástí zadečku je nervová páska, která leží na břišní straně. Všechny tělní orgány jsou pomocí dýchacích trubic (*trachejí*) zásobeny kyslíkem (Mácová, 2009).

9.2 Orthoptera

Skupinu Orthoptera (rovnokřídli) zastupují středně velcí až velcí zástupci hmyzu. Řád se dělí na dva podřády: kobyly (Ensifera) a sarančata (Caelifera). Mezi společné znaky těchto dvou podřádů zařazujeme zadní nohy, které jsou uzpůsobeny ke skákání. Jejich hlava s kousavým ústrojím a makadly je orientovaná svisle dolů a dále tam řadíme jejich způsob vydávání zvuků ke tření. Orthoptera se řadí mezi řády s proměnou nedokonalou. Larvy líhnoucí se z vajíček jsou si podobné s dospělcem svého druhu a postupně se vyvíjí do podoby imaga (Dubiel von LeRach, 2003).

9.2.1 Kobyly (Ensifera)

Kobyly obývají většinu zoogeografických oblastí, celosvětově je popsáno přes 8000 druhů, v České republice se vyskytuje přes 40 druhů kobyly. Jejich domovem jsou různé biotopy, řadíme tam louky, lesy, pole, mýtiny a zahrady. Tento podřád dělíme ještě na tři rozsáhlé čeledi, kobyly (Tettigonioidea), cvrčci (Grylloidea) a koníci (Gryllacridoidea) (Zahradník & Severa, 2007).

Spermie samce jsou předávány ve váčkovitém spermatoforu (pouzdro obsahující spermie) pomocí vyvinutého kladélka na jeho zádech, který přichycuje na konec zadečku samice. Kobyly kladou vajíčka jednotlivě do rostlin nebo do půdy, tvar mají oválně protáhlý (Kočárek et al., 2013). Po vylíhnutí jsou nymfy podobné imagu, avšak liší se zbarvením, velikostí ale také absencí křídel a rozmnožovacích orgánů. Nymfy procházejí několika fázemi, kdy postupně dozrávají do imaga (Kočárek et al., 2013).

Tělo kobylek je zpravidla ze stran zploštělé a hlava je stočená dolů. Na hlavě se nachází dvě až tři jednoduchá očka a silná kusadla. Na vrcholu hlavy jsou usazená dvě mnohočlánková tykadla, která dosahují délky těla kobylek. U kobylek se nachází dva páry křídel, první pár křídel (Tegmina) je úzký, kožovitý a skvrnitý, zatímco druhý pár je průhledný (hyalinní) a někdy lehce nahnědlé (Zahradník & Severa, 2007). Nepostradatelnou součástí kobylek jsou zadní nohy, zadní stehna jsou mohutná a uzpůsobena ke skoku, na konci se nachází chodidla, která se skládají ze čtyř článků (u cvrčků ze tří), na posledním článku se nachází drápky k zachycení (Dubiel LeRach, 2003). Hrud' kobyly se zadečkem jsou k sobě pevně srostlé (Zahradník & Severa, 2007).

K lákání samic kobyly vyluzují speciální zvuk (stridulují), samice pomocí párových sluchových orgánů, nacházejících se v bazální části předních holení, zvuk zaznamenávají i na několikametrových vzdálenostech. Stridulace vzniká třením předních párů křídel anebo třením vnitřní strany zadních stehen o přední pár křídel (Dubiel LeRach, 2003).

9.2.2 Sarančata (Caelifera)

Některé druhy sarančat se označují jako nebezpeční škůdci v rostlinných porostech subtropů a tropů. Jejich rozšíření je po celém světě, je známo 10 000 druhů. V České republice se vyskytuje 40 druhů sarančat (Zahradník & Severa, 2007). Podřád Caelifera se rovněž dělí do několika rozsáhlých čeledí a to Sarančata (*Acridioide*), Marše (*Tetragoide*) a Pacvrčkové (*Tridactyloidea*). Některé druhy sarančat dosahují délky až 60 mm. V průběhu kopulace je drobný spermatofor vpraven do samičí spermatéky (Kočárek et al., 2013). Samičky pomocí kladékových valv, které jsou umístěny na zadečku, vkládají do půdy vajíčka. Sarančata na rozdíl od kobylek kladou vajíčka do půdy ve skupinách. Pouzdro vajíček tvoří sekret, jimiž je obaleno (Pecina, 1999). Barva vajíček je různorodá, může mít barvu žlutou, hnědou až černou (Kočárek et al., 2013).

Ihned po vylíhnutí prochází larva primárním svlékáním. Během larválního vývoje se nymfy svlékají 5- 6krát. Všechny druhy přezimují ve stadiu vajíčka, avšak marše (*Tetrix*) přezimují ve fázi larvy anebo jako dospělci (Zahradník & Severa, 2007).

Barva těla sarančat je většinou hnědá, hnědozelená až zelená, tělo je ze stran zploštělé a protáhlé. Složené vyvinuté oči sedí na hlavě, u některých druhů mohou být i skvrnité.

Na rozdíl od kobylek mají sarančata krátká tykadla, která jsou většinou nitkovitá a na konci široká. Oba páry křídel se od sebe liší. Přední křídlo je kožovitě dlouhé a občasně i skrvnitě, zatímco zadní je blanité a výrazně zbarvené. Zbarvení zadních křídel může být různé i u stejného druhu. Sarančata se pohybují pomocí silných a mohutných končetin. Stridulace probíhá třením zoubků na vnitřní straně stehen o vystávající žilky krovek.

9.3 Rozdíly

Rovnokřídlí se řadí mezi indikační a ochranný významnou skupinu hmyzu. Tato skupina je vázána v podmínkách střední Evropy zejména na terestrická nelesní stanoviště (Marhoul et al., 2019). Zástupci rovnokřídlého hmyzu jsou především luční, obývají otevřená stanoviště (Holuša et al., 2008).

Kobylky zpravidla obývají stromy, keře a vyšší byliny, zatímco sarančata se pohybují většinu času na zemi nebo v trávě (Kočárek et al., 2013). U motýlů je důležitým faktorem teplota, vlhkost a dostatek slunce, svou teplotu mění v závislosti nasměrování křídel k slunci. Pro motýly je charakteristický luční biotop (Landman, 1999). Většina druhů kobylek je všežravá, ale řada druhů dává přednost rostlinné potravě. V případě všežravého druhu jsou kořisti sarančata, jiné druhy kobylek a larvy hmyzu. Sarančata jsou býložravci, svou potravu zpracovávají pomocí mohutných kusadel (Kočárek et al., 2013). Motýli jsou nepostradatelnou součástí potravinového řetězce. Housenky jsou významní konzumenti a urychlují tak přeměnu zelených rostlin v humus a samotní jedinci motýlů představují potravu pro většinu predátorů, parazitů a hmyzožravých živočichů. V neposlední řadě se dospělci významně podílí na procesu opylování (Čechmánek & Hrabák, 2006).

Zatímco kobylky a motýli kladou vajíčka jednotlivě, sarančata kladou vajíčka ve skupinách, občasně i některé druhy motýlů. Počet instarů nymfy u rovnokřídlých je variabilní, ale průměrně se uvádí 4-7 stadií. U rovnokřídlých nedochází ke klidové fázi, zatímco motýli klidovou fází prochází. Kukla – klidové stadium nepřijímá potravu a pohyb je omezený (Kočárek et al., 2013).

Kobylky a sarančata využívají tzv. kryptické zbarvení jako obranný systém před predátory. Barevný odstín bývá přizpůsoben podkladu, na kterém se nachází. Při přímém napadení predátorem Rovnokřídlí vyvrhnou obsah přední části trávicího traktu, který obsahuje agresivní trávicí enzymy. Velcí zástupci kobylek se mohou bránit kousáním (Kočárek et al., 2013). Motýli využívají rovněž kryptické zbarvení jako obranný systém, ale také odstrašující zbarvení, které je navíc doprovázeno specifickým chováním, odstrašují tak predátora odkrýváním pestře zbarvených křídel. Na rozdíl o kobylek, motýlí zbarvení v některých případech je spojeno s jedovatostí, v těle se mohou vyskytovat kyanidy, alkaloidy, histamin a kardiovaskulární jedy. Motýli mají také schopnost strnutí (*katalepsie*), kdy dokážou napodobovat různé větvičky, list či ptačí trus (Čechmánek & Hrabák, 2006).

Jedinci s proměnou dokonalou prochází více stadií než druhy s proměnou nedokonalou, rovněž délka celého vývoje je delší. Několik měsíců dokonce občasně i let trvá, než se z vajíčka vylíhne housenka. Housenka se během vývoje několikrát svlékne a v momentě, kdy přestane přijímat potravu vyhledává místo ke kuklení. Stadium kukly rovněž trvá několik měsíců až let, samotný dospělec se poté dožívá až jednoho roku (Laryszová, 2010).

Velká velikost genomu by mohla být překážkou k rychlému buněčnému dělení ve stádiu kukly, protože tam dochází k velké transformaci tkání. Uvádí se, že hranice u proměny dokonalé se pohybuje do 2 pg, avšak tento parametr není nepřekonatelný (Gregory, 2002). Jedním z příkladů z holometabolního hmyzu jsou brouci (Hanrahan & Johnston, 2011). Hemimetabolní hmyz je charakterizován velkou škálou velikosti genomu, protože jejich ontogeneze je rozdělena na malé změny probíhající během larválního stadia, proto si tak mohou dovolit větší genom (Sadílek et al., 2019). Podle nejaktuálnějších dat je opravdu zřejmé, že zástupci s proměnou nedokonalou mají nejvyšší známé velikosti genomu, za zástupce můžeme považovat například saranče *Podisma pedestris* – $2C = 34,8$ pg (Westerman et al., 1987). Naopak mezi zástupce s malou velikostí genomu řadíme mšice, kteří patří k jedincům z hemimetabolního hmyzu (*Eoessigia longicauda* $2C = 0,36$ pg) (Cornette et al., 2015). Značnou rolí ve velikosti genomu jsou tedy jistě faktory jako je rychlý životní vývoj, ale i drobná velikost těla (Gregory, 2002).

10. Metodika

10.1 Příprava hmyzího materiálu

Ke správnému měření je potřeba pracovat se živým materiálem, abychom dosáhli co nejpřesnější analýze. V případě, že vzorek nebudeme měřit v nejbližší době, zamrazíme ho.

Část mých vzorků jsem získala od entomologů, kteří navštívili zajímavé lokality po celé České republice (stepní oblasti na Moravě, Třeboňsko). Někteří exempláři z řádů motýlů pochází z odchovů chovatelů, dostala jsem již vylíhlé housenky z vajíček. Pomocí entomologických sítí byli chyceni dospělí motýli převážně na exkurzích studentů Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy. Transport do laboratoře ČZU musel být proveden v co nejkratším úseku, protože motýli v epruvetách jsou velice stresovaní a mohlo by tak dojít k jejich úmrtí. Část druhů rovnokřídlých pochází ze zahraničí a zbytek sarančat a kobylek jsou odchyceni pomocí entomologické sítě na exkurzích. Determinaci druhů provedl např.: Ondřej Balvín (ČZU), Petr Šípek (PřF UK) a Tomáš Jor (PřF UK).

Před samotnou přípravou jsem si zjistila díky databázi www.genomesize.cz velikost genomu standardu, který bude mít podobnou velikost jako mnou studovaný vzorek.

Připravila jsem si dvě nadepsané zkumavky, do kterých později naliji směs odizolovaných jader standardu a vzorku. Do Petriho misky položím 0,5 -1 cm rostlinného pletiva (standardu) a odtrženou končetinu studovaného vzorku. Pokud máme problémový druh a nedaří se nám za živého stavu končetinu odtrhnout, vzorek zamrazíme, aby se nám s ním posléze lépe pracovalo. Pomocí pipety napipetujeme pufr Otto I. o objemu 550 ml a přidáme do Petriho misky. Směs standardu, končetiny a pufru pomocí žiletky rozsekáme na co nejmenší částičky, následně pomocí pipety nasajeme a profiltrujeme ho přes nylonové plátenko do připravené zkumavky. Je potřeba zkontrolovat, zda se ve zkumavce nenachází větší částičky, které by mohly narušit měření. Pro každý druh jsme připravili dva vzorky pro přesnější ověření analýzy.

10.2 Příprava barviva

K obarvení jader jsem v našem případě použila barvivo Propidium jodid (PI). Barvicí roztok připravujeme složením PI, pufru Otto II., RNA a 2-mercapethanolu. RNA a PI jsou v zamraženém stavu, proto je potřeba před přípravou roztoku eppendorfkou řádně rozmrazit.

Do připravené nádoby přilijeme 25 ml Otto II., dále je zapotřebí přidat po 1 ml RNA a PI. Roztok je hotový až po přidáním pomocí pipety 44 μ l 2-mercapethanolu. Do zkumavky s připravenou směsí jader, vždy přidáme 1 ml barvicího roztoku (Doležel et al., 2007).

Příprava pufru Otto I. není složitá. V destilované vodě se rozpustí 0,1 M mnohohydrátu kyseliny citronové společně s 1 ml 0,5 % Tween 20. Rozpuštěný roztok přelijeme do analytické baňky a přidáme destilovanou vodu. Finální roztok vzniká přefiltrováním celé směsi. Kyselina citronová je důležitá pro fixaci izolovaných jader, a navíc zlepšuje přístupnost barviva (Doležel et al., 2006). Pro přípravu roztoku, který se rovněž rozpustí v destilované vodě a následně se přefiltruje (Doležel et al., 2005).

10.3 Analýza průtokovým cytometrem

K analýze velikosti genomu jsem používala průtokový cytometr Apogee A60. Před samotným měřením je zapotřebí zkontrolovat několik komponentů přístroje. Pokud není v nádobě na destilovanou vodu (sheat fluid) dostatek vody přidáme jej společně s 500 μ l ProClinu. Dále se pod cytometrem nachází nádoba na odpadní vodu, kterou vyprázdníme. Samotný přístroj zapínáme pomocí tlačítka on/off a automaticky se nám spustí ApogeeFlow FCM control. Důležité je, aby byla proplachovací nádobka (sampleport) v poloze proplach. Přístroj následně provede několik proplachovacích cyklů a po dokončení se nastartuje hlavní program Apogee Histogram Software.

Do softwaru nahrajeme data standardu, se kterým jsme náš vzorek připravili. Obarvený vzorek ve zkumavce vložíme do sampleportu. Analýza se po zacvaknutí sampleportu rozjede a stroj začíná nasávat obarvený roztok, nasaje 150 μ l, z čehož 90 μ l změní. V průběhu měření se nám na histogramu začínají objevovat body. Pro naše měření jsou důležité dva histogramy. První histogram 532 Grn (Area) vs. Count zobrazuje fluorescenci na 1024 kanálech, kde se zobrazují gasuovské křivky fluorescence měřených částic (peaky). Druhý histogram 532 Grn vs. 532 LALS (area-peak), zde se nám zobrazuje boční rozptyl (side scatter), který analyzuje rozptyl paprsku laseru a my tak dokážeme určit tvar částic.

V histogramu se často objevují neuspořádané částice, které vytvářejí šum a znehodnocují tak samotné měření, proto je možné na side scatteru nastavit ořezání zájmové části tzv. ROI (region of interest). Tento parametr je ale automaticky nahraný díky našemu nahranému standardu, proto není potřeba s ním manipulovat.

Je nastavený, tak aby zachytil peak standardu a peak našeho studovaného vzorku. Pokud se zde přece jen nějaký šum objeví, stačí zmenšit naše zájmové území a odstranit tak šum pomocí tzv. gate.

Běžná rychlost analýzy měření je 6-10 $\mu\text{l}/\text{min}$ často se ale stává, že v suspenzi se nachází mnoho částic, proto je zapotřebí rychlost snížit. S rychlostí manipulujeme v záložce Control-Sample $\mu\text{l}/\text{min}$. Naopak při výskytu malého množství částic se rychlost zvyšuje, tam ale pak dochází ke snížení kvality měření.

V programu můžeme pohybovat i s peaky po ose x, která zobrazuje fluorescenci. Pohyb po ose x jsme využívali, když studované vzorky měly výrazně vyšší nebo menší velikost než standard, proto jsme nezpozorovali peak na ose x našeho vzorku. V tomto případě je zapotřebí připravit suspenzi jader s vyšší anebo menší velikostí genomu standardu.

Na konci měření je potřeba zkontrolovat, zda je peak ve středu úseček ohraničujících gate a rozlišit, které peaky označují standard a vzorek. Poté analýzu uložíme ve formátu histogramu v Apogee Histogram Software. Data jsem si přepracovala do excelovské tabulky, z které jsem následně čerpala po samotný výpočet genomu a statistické zpracování výsledků.

Výpočet genomu se počítá s daty o fluorescenci vzorku a standardu. Tyto údaje se dají do poměru a vynásobí se velikostí genomu známého standardu (Doležel et al., 2007).

$$VG_v = VG_s \times (PI_v / PI_s)$$

VG_v = velikost genomu studovaného vzorku

VG_s =velikost genomu standardu

PI_v = fluorescence studovaného vzorku

PI_s = fluorescence standardu

10.4 Statistické zpracování výsledků

Všechna data byla statisticky zpracována v program RStudio ve verzi 1.4.1106. Na porovnání dat a rovněž na grafické zobrazení jsem použila boxplot. Anova test jsem využila, abych zjistila, zda je nějaký rozdíl mezi řády a Tukeyho test na porovnání rozdílů mezi řády.

11. Výsledky

Od července roku 2019 jsem započala měření mých vzorků v laboratoři ČZU na katedře ekologie MCEV II.

Toto měření bylo z převážné většiny nárazové, záleželo, kdy byl k dispozici entomologický materiál (viz metodika). Měření a analýzy jsem prováděla až do 2020.

V bakalářské práci jsem analyzovala celkem 45 exemplářů z třídy Insecta (hmyz) a to konkrétně 23 jedinců z řádu Lepidoptera (motýli) a 22 jedinců z řádu Orthoptera (rovnokřídli) kam patří podřád Caelifera (sarančata) a Ensifera (kobylinky).

V tabulce č. 2 uvádím počet jedinců z každého řádu.

Tabulka 2: *Počet naměřených jedinců.*

Řád (latinsky)	Řád (česky)	Počet jedinců
Lepidoptera	motýli	23
Orthoptera	rovnokřídli	22

Lepidoptera

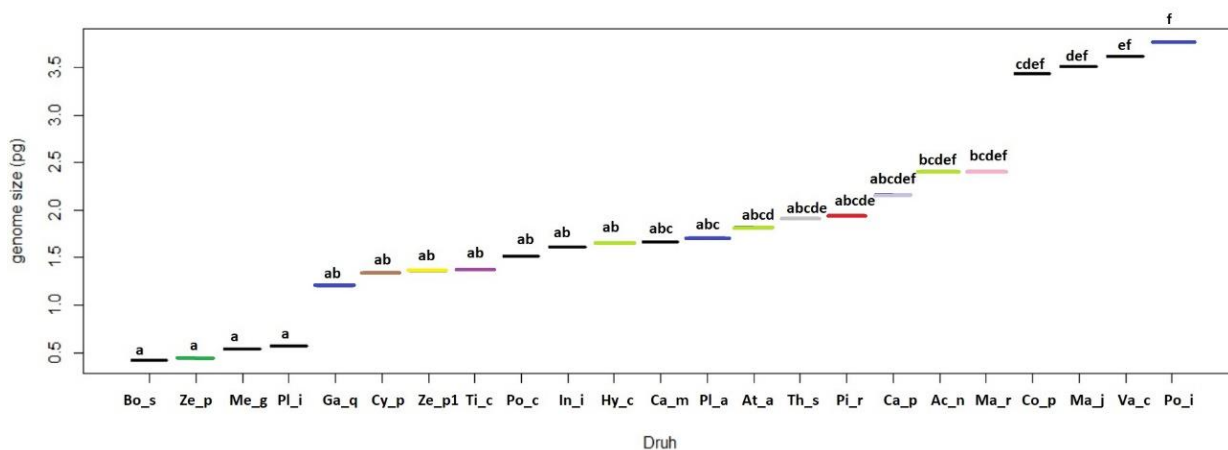
Z řádu Lepidoptera jsem naměřila velikost genomu u 23 jedinců.

Čeleď	Rod	Druh (latinsky)	Druh (česky)	Velikost genomu 2C (pg)	Zkratka	Pořadí dle velikosti genomu
Cossidae	<i>Zeuzera</i>	<i>Zeuzera pyrina</i>	drvopleň hrušnový	1,37	Ze_p1	7
Crambidae	<i>Cydalima</i>	<i>Cydalima perspectalis</i>	zavíječ zimostřezový	1,34	Cy_p	6
Erebidae	<i>Calliteara</i>	<i>Calliteara pudibunda</i>	štetconoš ořechový	2,16	Ca_p	17
Geometridae	<i>Timandra</i>	<i>Timandra comae</i>	žlutokřídlec šťovíkový	1,38	Ti_c	8
Hesperiidae	<i>Thymelicus</i>	<i>Thymelicus sylvestris</i>	soumračník metlicový	1,91	Th_s	15
Lasiocampidae	<i>Gastropacha</i>	<i>Gastropacha quercifolia</i>	bourovec ovocný	1,2	Ga_q	5
Lasiocampidae	<i>Macrothylacia</i>	<i>Macrothylacia rubi</i>	bourovec ostružinový	2,41	Ma_r	19
Lycaenidae	<i>Plebejus</i>	<i>Plebejus argus</i>	modrásek černolemý	1,71	Pl_a	13
Lycaenidae	<i>Polyommatus</i>	<i>Polyommatus icarus</i>	modrásek jehlicový	3,77	Po_i	23
Nymphalidae	<i>Boloria</i>	<i>Boloria selene</i>	perleťovec dvanáctitečný	0,42	Bo_s	1
Nymphalidae	<i>Caligo</i>	<i>Caligo memnon</i>	-	1,67	Ca_m	12
Nymphalidae	<i>Coenonympha</i>	<i>Coenonympha pamphilus</i>	okáč pohánkový	3,43	Co_p	20
Nymphalidae	<i>Inachis</i>	<i>Inachis io</i>	babočka paví oko	1,61	In_i	10
Nymphalidae	<i>Maniola</i>	<i>Maniola jurtina</i>	okáč luční	3,51	Ma_j	21
Nymphalidae	<i>Melanargia</i>	<i>Melanargia galathea</i>	okáč bojínkový	0,54	Me_g	3
Nymphalidae	<i>Polygonia</i>	<i>Polygonia c-album</i>	babočka bílé C	1,52	Po_c	9
Nymphalidae	<i>Vanessa</i>	<i>Vanessa cardui</i>	babočka bodláková	3,62	Va_c	22
Papilionidae	<i>Zerynthia</i>	<i>Zerynthia polyxena</i>	pestrokřídlec podražcový	0,44	Ze_p	2
Pieridae	<i>Pieris</i>	<i>Pieris rapae</i>	bělásek řepový	1,94	Pi_r	16
Pyralidae	<i>Plodia</i>	<i>Plodia interpunctella</i>	zavíječ paprikový	0,57	Pl_i	4
Saturniidae	<i>Actias</i>	<i>Actias ningpoana</i>	-	2,4	Ac_n	18
Saturniidae	<i>Attacus</i>	<i>Attacus atlas</i>	martináč atlas	1,81	At_a	14
Saturniidae	<i>Hyalophora</i>	<i>Hyalophora cecropia</i>	-	1,65	Hy_c	11

Tabulka 3: Velikost genomů u jednotlivých zástupců Lepidoptera.

Nejmenší velikost genomu jsem zaznamenala u druhu *Boloria selene* $2C = 0,42$ pg. V online databázi www.genomesize.cz je nejvyšší naměřená velikost genomu u druhu *Lycia pomonaria* $2C = 2,92$ pg, avšak v mém měření jsem zaznamenala větší velikost, a to u druhu *Polyommatus icarus* a to $2C = 3,77$ pg. Rozdíl velikosti u mnou naměřených jedinců s nejmenší a největší velikostí činí 3,35 pg, proto mohu konstatovat, že rozdíl mezi druhy je značný. Největší rozdíl v čeledích jsem zaznamenala u Nymphalidae. V čeledi jsem naměřila 7 druhů. U druhu *Vanessa Cardui* byla naměřena největší velikost genomu v rámci čeledi Nymphalidae a to $2C = 3,62$ pg. Celkový rozdíl v této čeledi mezi největší a nejmenší velikostí genomu je $2C = 3,2$ pg.

Z čeledi Lycaenidae jsem naměřila dva zástupce denních motýlů *Polyommatus icarus* $2C = 3,77$ pg a *Plebejus argus* $2C = 1,71$ pg, kde jsou zřejmé rozdíly i v rámci jedné čeledi. Zástupci nočních motýlů z čeledi Lasiocampidae *Gastropacha quercifolia* $2C = 1,2$ pg a *Macrothylacia rubi* $2C = 2,41$ pg mají mezi sebou rovněž výrazný rozdíl.



Obrázek 5: Porovnání velikosti genomu u jednotlivých druhů *Lepidoptera* pomocí boxplotů v *RStudio* ve verzi 1.4.1106.

Obrázek 5 charakterizuje grafické zobrazení velikosti genomů u jednotlivých druhů z řádu *Lepidoptera*. Hodnoty genomů jsou různé, pohybovaly se od nejmenšího $2C = 0,42$ pg u druhu *Boloria selene* až po největší $2C = 3,77$ u druhu *Polyommatus icarus*. Z grafu lze i vyčíst, že se zde nachází rozdíly mezi jednotlivými čeleděmi. Nejpočetnější čeledí je *Nymphalidae* (černá barva), kde jsem zaznamenala největší rozdíly. Konkrétní skupiny na základě podobnosti velikosti genomu (viz Tabulka č.4) jsem pro větší přehlednost barevně vyznačila.

Z Tukeyho HSD testu je zřejmé, že je mezi druhy signifikantní rozdíl. Sloupec groups nám řekne, zda je mezi druhy odlišnost anebo naopak podobnost. Já jsem díky testu zjistila, že veliká odlišnost je u skupiny druhů *Plodia interpunctella* (a), *Melanargia galathea* (a), *Zerynthia polyxena* (a), *Boloria selene* (a) a dalším druhem *Polyommatus icarus* (f). Naopak rozdíl mezi ostatní druhy nelze určit pouze pomocí velikosti genomu.

Zkratka	2 C	Groups
Bo_s	0,42	a
Ze_p	0,44	a
Me_g	0,54	a
Pl_i	0,57	a
Ga_q	1,2	ab
Cy_p	1,34	ab
Ze_pl	1,37	ab
Ti_c	1,38	ab
Po_c	1,52	ab
In_i	1,61	ab
Hy_c	1,65	ab
Ca_m	1,67	abc
Pl_a	1,71	abc
At_a	1,81	abcd
Th_s	1,91	abcde
Pi_r	1,94	abcde
Ca_p	2,16	abcdef
Ac_n	2,4	bcdef
Ma_r	2,41	bcdef
Co_p	3,43	cdef
Ma_j	3,51	def
Va_c	3,62	ef
Po_i	3,77	f

Tabulka 4: Výsledky Tukeyho testu v RStudio ve verzi 1.4.1106

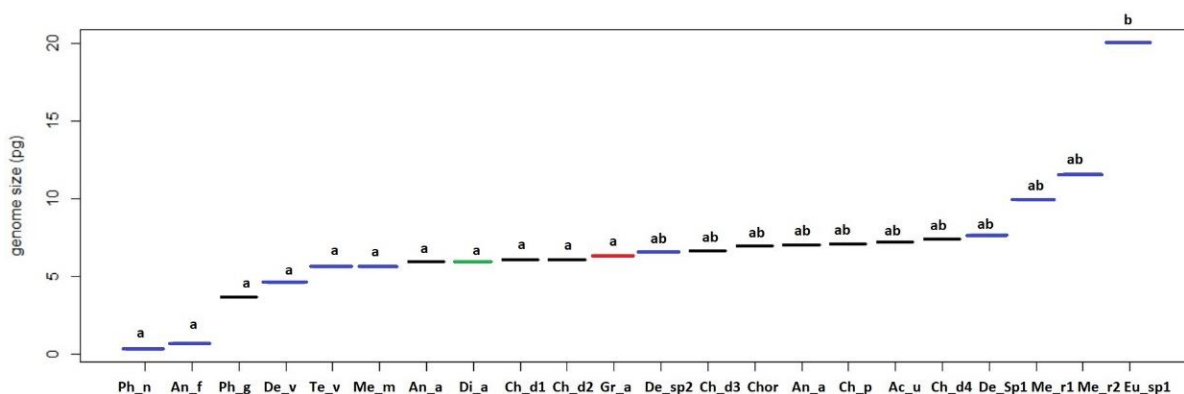
Orthoptera

Z řádu Orthoptera bylo naměřeno 22 jedinců.

Čeleď	Rod	Druh (latinsky)	Druh (česky)	Velikost genomu 2C (pg)	Zkratka	Pořadí dle velikosti genomu
Acrididae	<i>Acrida</i>	<i>Acrida ungarica</i>	saranče uherská	7,21	Ac_u	17
Acrididae	<i>Anacridium</i>	<i>Anacridium aegyptium-M</i>	saranče egyptská-M	5,97	An_a	7
Acrididae	<i>Anacridium</i>	<i>Anacridium aegyptium-F</i>	saranče egyptská-F	7,04	An_a	15
Acrididae	<i>Chorthippus</i>	<i>Chorthippus dorsatus</i>	saranče luční	6,11	Ch_d1	9
Acrididae	<i>Chorthippus</i>	<i>Chorthippus dorsatus</i>	saranče luční	6,12	Ch_d2	10
Acrididae	<i>Chorthippus</i>	<i>Chorthippus dorsatus</i>	saranče luční	6,64	Ch_d3	13
Acrididae	<i>Chorthippus</i>	<i>Chorthippus dorsatus</i>	saranče luční	7,42	Ch_d4	18
Acrididae	<i>Chorthippus</i>	<i>Chorthippus paralellus</i>	saranče obecná	7,12	Ch_p	16
Acrididae	<i>Chorthippus</i>	<i>Chorthippus sp. 1</i>	saranče sp. 1	6,97	Chor	14
Gryllidae	<i>Gryllus</i>	<i>Gryllus assimilis</i>	cvrček banánový	6,32	Gr_a	11
Rhaphidophoridae	<i>Diestrammena</i>	<i>Diestrammena asynamora</i>	koník skleníkový	5,98	Di_a	8
Tettigoniidae	<i>Ancylecha</i>	<i>Ancylecha fenestrata</i>	-	0,68	An_f	2
Tettigoniidae	<i>Decticus</i>	<i>Decticus sp. 1</i>	kobylka sp. 2	7,64	De_sp1	19
Tettigoniidae	<i>Decticus</i>	<i>Decticus sp. 2</i>	kobylka sp. 2	6,61	De_sp2	12
Tettigoniidae	<i>Decticus</i>	<i>Decticus verrucivorus</i>	kobylka hnědá	4,64	De_v	4
Tettigoniidae	<i>Eugastrini</i>	<i>Eugaster sp. 1</i>	-	20,1	Eu_sp1	22
Tettigoniidae	<i>Meconema</i>	<i>Meconema meridionale</i>	kobylka jižní	5,64	Me_m	6
Tettigoniidae	<i>Phaneroptera</i>	<i>Phaneroptera nana</i>	kobylka malá	0,31	Ph_n	1
Tettigoniidae	<i>Roseliana</i>	<i>Metrioptera roeselii-F</i>	kobylka luční-F	9,92	Me_r1	20
Tettigoniidae	<i>Roseliana</i>	<i>Metrioptera roeselii-M</i>	kobylka luční-M	11,61	Me_r2	21
Tettigoniidae	<i>Tettigonia</i>	<i>Tettigonia viridissima</i>	kobylka zelená	5,61	Te_v	5

Tabulka 5: Velikost genomů u jednotlivých zástupců Orthoptera.

U čtyř jedinců se nepodařilo determinovat konkrétní druh. Nejmenší velikost genomu jsem zaznamenala u druhu *Phaneroptera nana* $2C = 0,31$ pg, v online databázi www.genomesize.cz není popsán menší druh než právě tento mnou naměřený. Nejvyšší velikost jsem naměřila u nedeterminovaného druhu *Eugaster sp. 1* $2C = 20,1$ pg. Rovněž jako u řádu Lepidoptera jsou rozdíly ve velikosti významné, rozdíl činí 19,79 pg. Podle online databáze www.genomesize.cz má zástupce z čeledi Acrididae *Chorthippus dorsatus* $2C = 16,68$ pg, avšak u mých čtyř jedinců stejného druhu jsem naměřila menší velikost (průměr) $2C = 6,57$ pg.



Obrázek 6: Porovnání velikosti genomu u jednotlivých druhů Orthoptera pomocí boxplotů v RStudio ve verzi 1.4.1106.

Na obrázku 6 je grafické zobrazení jednotlivých druhů Orthoptera. Stejně jako u řádu Lepidoptera se rozmezí velikosti genomu u druhů liší. Nejmenší změřená velikost byla u druhu *Phaneroptera nana* $2C = 0,31$ pg, naopak největší velikost je $2C = 20,1$ pg u nedeterminovaného druhu *Eugaster sp. 1*. Rozdíly mezi jednotlivými čeleděmi lze vidět i díky barevné odlišnosti. Největší rozdíly lze vidět u čeledi Tettigoniidae, kde se nachází jedinci s nejmenší, ale i s největší hodnotou velikostí genomu.

Výsledky Anova testu pomocí symbolů (***) u hodnoty Pr (<F) nám říkají, že je mezi druhy signifikantní rozdíl s přesností 99,9 %.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Druh	1	198.9	198.88	35.6	7.8e-06 ***
Residuals	20	111.7	5.59		

Obrázek 7: Výsledky Anova testu u Orthoptera v RStudio ve verzi 1.4.1106.

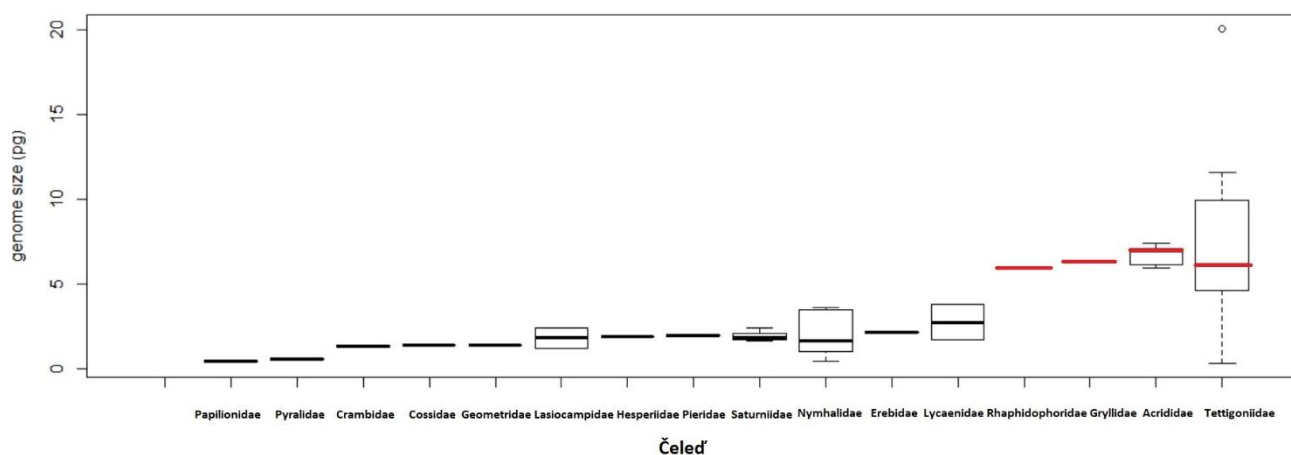
Díky výsledkům Tukeyho HSD testu jsem zjistila, že největší odlišnost je u dvanácti druhů, konkrétně *Eugaster Sp.1* (b), *Gryllus Assimilis* (a), *Chorthippus dorsatus sp 1. i sp 2* (a), *Diestrammena asynamora* (a), *Anacridium aegyptium* (a), *Meconema meridionale* (a), *Tettigonia viridissima* (a), *Decticus verrucivorus* (a), *Pholidoptera griseoptera* (a), *Ancylecha fenestrata* (a), *Phaneroptera nana* (a).

Zkratka	2C	Groups
Ph_n	0,31	a
An_f	0,68	a
Ph_g	3,67	a
De_v	4,64	a
Te_v	5,61	a
Me_m	5,64	a
An_a	5,97	a
Di_a	5,98	a
Ch_d1	6,11	a
Ch_d2	6,12	a
Gr_a	6,32	a
De_sp2	6,61	ab
Ch_d3	6,64	ab
Chor	6,97	ab
An_a	7,04	ab
Ch_p	7,12	ab
Ac_u	7,21	ab
Ch_d4	7,42	ab
De_sp1	7,64	ab
Me_r1	9,92	ab
Me_r2	11,61	ab
Eu_sp1	20,1	b

Tabulka 6: Výsledky Tukeyho testu v RStudio ve verzi 1.4.1106.

Proměna dokonalá a proměna nedokonalá

Mým primárním cílem je porovnat velikost genomů u jedinců s odlišným postembryonálním vývojem. Všechny změřené jedince z řádu Lepidoptera a Orthoptera patřící do konkrétních čeledí jsem graficky pomocí boxplotu zobrazila jejich velikost genomu. Nejvyšší velikost jsem změřila u čeledi řádu Orthoptera, které jsou v grafu (obrázek č. 9) vyznačené červenou barvou. Z mých měření se tedy zdá, že druhy s proměnou dokonalou – tedy motýli (Lepidoptera) mají výrazně nižší velikosti genomu než rovnokřídli (Orthoptera) s proměnou nedokonalou. Z diagramu je mimo jiné vidět poměrně velký rozptyl nabývajících hodnot velikosti genomu u čeledi Tettigoniidae z řádu Orthoptera. Další větší rozptyl hodnot ve velikosti genomu jsou patrné u motýlů čeledi Nymphalidae a Lycaenidae. Toto může být způsobeno nerovnoměrným zastoupením druhů ve všech čeledí.



Obrázek 8: Porovnání velikosti genomu u všech studovaných čeledí pomocí boxplotů v RStudio ve verzi 1.4.1106.

Hodnota Pr (<F) z výsledku Anova testu vypovídá, že mezi čeleděmi není signifikantní rozdíl s přesností 99,9 % ($p = 0,097$). Nicméně určitý trend lze z těchto výsledků konstatovat. Zástupci řádu Orthoptera nedosahují nižších hodnot velikosti genomu jako Lepidoptera a naopak.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
celed	15	294.0	19.60	1.754	0.0967
Residuals	28	312.8	11.17		

Obrázek 9: Výsledky Anova testu v RStudio ve verzi 1.4.1106.

12. Diskuze

I přesto, že metoda Průtokové cytometrie je velmi přesná a rychlá, nevyužívá se tak aktivně pro měření velikosti genomu u živočichů. Doposud je známo jen 1345 řádů hmyzu. V mé práci se především jedná o řád Lepidoptera, kde je známa velikost genomu u 91 druhů a u řádu Orthoptera, kde je popsána velikost genomu u 47 druhů.

Rostliny jsou nejčastěji používány jako standardy pro měření velikosti genomu, avšak pro nejefektivnější měření by bylo lepší použít živočišné standardy. Jako živočišné standardy by se mohly využívat bezobratlí, aby rozdíl mezi živočišným standardem a studovaným vzorkem byl co nejmenší a výsledek měření mohl být co nejpresnější. Výhodou u rostlinných standardů je, že jsou snadno dostupné a levné, navíc pro měření se využívá jen malá část rostliny, proto není potřeba mít nezbytně velké množství standardů. Pro mé měření jsem využila čtyři rostlinné standardy: *Carex acutiformis* 2C = 0.82 pg, *Solanum pseudocapsicum* 2C = 2.61 pg, *Bellis perennis* 2C = 3.38 pg a *Pisum sativum* 2C = 8.84 pg.

Mezi nejčastěji diskutované rozdíly velikosti genomu se řadí řády s proměnou dokonalou a nedokonalou. Podle dosavadních měření, jedinci s proměnou nedokonalou mají vyšší velikost genomu než jedinci s proměnou dokonalou, avšak toto tvrzení není pravidlem (Hanrahan & Johnston, 2011) a jsou nutná další měření a analyzování.

Mnoho faktorů může ovlivnit velikost genomu u jednotlivých druhů. Ellis et al. (2014) uvádí, že variabilita ve velikosti genomu může docházet v rámci jak chovaných druhů, tak i u druhů z přírodních linií. Takovým důkazem je druh octomilky (*Drosophila melanogaster*). Dále uvádí, že velikost genomu může ovlivňovat fenotyp daného organismu, v 5 %- 23% se jednalo o závislost vlastností a teploty.

Hanrahan & Johnston (2011) zase popisují, že významnou roli ve velikosti genomu může být i velikost použitého vzorku tkáně. Ve většině mých studovaných vzorků jsem použila celou končetinu či tykadlo od daného jedince. U malých exemplářů jsem ale byla nucena použít např. celé tělo vzorku k přípravě suspenze jader, což se následně mohlo odrazit i na výsledné hodnotě velikost genomu.

Lepidoptera

Mým zástupcem z čeledi Cossidae je *Zeuzera pyrina* (drvopleň hrušnový), u kterého jsem naměřila $2C = 1,37$ pg, řadí se ve škále mého měření mezi 7. nejmenší druh s proměnou dokonalou.

Cydalima perspectalis (zavíječ zimostřezový) je mým jediným zástupcem z čeledi Crambidae s velikostí $2C = 1,34$ pg, jednalo se o housenku, která odpovídá hypotéze, že druhy s proměnou dokonalou mají velikost genomu přibližně okolo hodnoty $2C = 2$ pg. Obdobně je to i u druhu nočního motýl *Calliteara pudibunda* (štetconoš ořechový) z čeledi Erebidae. Je zajímavé u tohoto druhu, že je polyfágní tzn. je schopen přijímat různorodou potravu.

Zástupci čeledí HesperIIDae a Pieridae, *soumračník metlicový* $2C = 1,91$ pg a *bělásek řepový* $2C = 1,94$ pg, mají téměř stejnou velikost genomu a také spadají pod hranici $<2C = 2$ pg.

Mou nejpočetnější čeledí je Nymphalidae, kde jsem naměřila 8 druhů. V této čeledi je zajímavé, že jsem dokázala změřit hned tři druhy, které mají větší velikost genomu než $2C = 2$ pg. Jedná se o druhy denních motýlů ve fázi dospělce *Coenonympha pamphilus* (okáč poháňkový) $2C = 3,43$ pg, *Maniola jurtina* (okáč luční) $2C = 3,51$ pg, *Vanessa cardui* (babočka bodláková) $2C = 3,62$ pg. *Babočka bodláková* je v mém celkovém měření jako 2. největší zástupce ve velikosti genomu u řádu Lepidoptera.

U rodu *Actias* se mi podařilo doplnit jeden druh, který není zapsán v online databázi www.genomesize.cz, jedná se o *Actias ningpoana* $2C = 2,4$ pg, v databázi je uveden druh *Actias Luna* s velikostí genomu $2C = 1,12$ pg, rozdíl mezi druhy může být díky odlišnému pohlaví u obou druhů, ale toto nemůžeme potvrdit, protože pohlaví u těchto jedinců není určené. Jedinec s největší velikostí genomu, co jsem naměřila pochází z čeledi Lycaenidae konkrétně *Polyommatus icarus* (modrásek jehlicový) $2C = 3,77$ pg. V online databázi se nachází jen jeden druh z této čeledi *Jalmenus evagoras*, kde je známa velikost genomu $2C = 0,46$ pg.

Orthoptera

V tomto řádu jsem analyzovala druhy ze čtyř čeledí. Z čeledi Acrididae jsem naměřila 5 druhů, z čehož jsou dva popsány v online databázi www.genomesize.cz. Měla jsem k dispozici čtyři jedince druhu *Chorthippus dorsatus* jejich průměr velikosti genomu činí $2C = 6,58$ pg. Všichni jedinci *Chorthippus dorsatus* byly ve stádiu nymfy a determinace je velmi obtížná.

Z čeledi Gryllidae jsem opět dokázala doplnit rod o druh *Gryllus assimilis* (cvrček banánový) $2C = 6,32$ pg. Čeleď Rhaphidophoridae není v online databázi vůbec uveden, já jsem získala jednoho jedince z této čeledi, a to konkrétně *Diestrammena asynamora* (koník skleníkový), kde jsem zaznamenala velikost genomu $2C = 5,98$ pg.

Tettigoniidae je čeleď, ze které jsem analyzovala největší počet exemplářů v rámci řádu Orthoptera. Naměřila jsem zde 10 jedinců, u kterých podle online databáze www.genomesize.cz není známa velikost genomu ani u jednoho exempláře. K nejmenším jedincům, co se týče velikosti genomu, patří druh *Phaneroptera nana* (kobyłka malá) $2C = 0,31$, která zároveň patří i mezi nejnižší hodnotu z celého řádu Orthoptera a druh *Ancylecha fenestrata* $2C = 0,68$ pg. V této čeledi jsem mohla porovnat i druhy s rozdílným pohlavím. Samičce *Metrioptera roeselii* (kobyłka luční) bylo naměřeno $2C = 9,92$ pg, zatímco u samce je velikost o nepatrně vyšší $2C = 11,61$ pg. Mezi mnou změřeného zástupce s vůbec nejvyšší velikostí genomu je determinovaný druh pouze do rodu *Eugaster* sp., kde hodnota pg činila $2C = 20,1$ pg. Tato hodnota ale není z daleka jedno z nejvyšších známých hodnot velikosti genomu u řádu Orthoptera.

V některých případech byla manipulace s hmyzem složitá, k samotnému odtrhnutí byla občas potřeba velká dávka trpělivosti a soustředivosti.

Výsledky mého měření vypovídají hypotéze o tom, že druhy s proměnou nedokonalou mají větší velikost genomu. Taktéž jsem potvrdila, že to není pravidlo, u některých druhů s proměnou nedokonalou, není platné. Zaznamenala jsem i nižší hodnoty velikosti genomu než u jedinců s proměnou dokonalou. Přesvědčila jsem se, že tvrzení, které vypovídá, že druhy s proměnou nedokonalou mají většinou velikost genomu menší než 2 pg, není vždy pravidlem. (Hanrahan & Johnston, 2011).

Dokázala jsem změřit hned 7 jedinců, kteří neodpovídají této hypotéze. Z měření vypovídá, že velikost genomu se odráží na typu a délce vývoje daného druhu.

Vzhledem k tomu, že hmyz se řadí mezi nejpočetnější třídu a změřených druhů je opravdu stále velmi málo, skýtá se tu potenciál k dalším analýzám měření velikosti genomu pomocí metody Průtokového cytometru, protože velikost genomu by mohla pomoci i při determinaci jednotlivých druhů.

13. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo přiblížit metodu Průtokové cytometrie, její využití v různých biologických oblastech, ale také princip a přínos metody.

Pomocí Průtokové cytometrie bylo naměřeno 45 jedinců z 16 čeledí. Hodnoty velikosti genomu byly rozmanité. Od nejmenší velikosti genomu u druhu *Phaneroptera nana* (kobyłka malá) $2C = 0,31$ pg až po největší změřený druh *Eugaster sp1*. $2C = 20,1$ pg.

Předmětem studia byly druhy s odlišným postembryonálním vývojem a následně jsem porovnávala jejich velikost genomu. Podle dosavadních studií vyplývá, že hmyz s proměnou dokonalou by měl dosahovat menších hodnot než druhy s proměnou nedokonalou. U hemimetabolního hmyzu je faktorem velkých velikostí genomu komplikovaný a dlouhodobější vývoj. Ve fázi kukly, u holometabolního hmyzu, probíhá totální přeměna, proto se vývoj zastaví, následkem toho je zde zřejmě menší velikost genomu. Mé měření ale toto tvrzení nepotvrzuje úplně, protože se mi podařilo naměřit hned tři druhy s proměnou dokonalou, kteří nabývají větší hodnot, než je udáváno u tohoto typu vývoje.

V neposlední řadě bylo cílem této práce osvojit si laboratorní práci. K přesnějším výsledkům a vyvození závěrů je nezbytné pokračovat v měření, potřebovala více druhů, abych tak mohla rozšířit škálu jedinců, kde je známa velikost genomu, naopak se mi ale naskytuje prostor následně v tomto výzkumu pokračovat v diplomové práci.

14. Literatura

1. Cornette, R., Gusev, O., Nakahara, Y., Shimura, S., Kikawada, T., a Okuda, T., 2015: Chironomid Midges (Diptera, Chironomidae) Show Extremely Small Genome Sizes. *Zoolog. Sci.* 32, s. 248–254.
2. Crowley C. L., Scott P. A., Marfell J. B., Boughaba A. J., Chojnowski G., Waterhouse J. N., 2016: *Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry*. Cold Spring Harbor Protoc.
3. Čechmánek Z., Hrabák R., 2006: *Život motýlů střední Evropy*. Granit, Praha, s. 136
4. Doležel J., Bartoš J., 2005: Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size. *Annals of Botany*. Volume 95, s. 99-110
5. Doležel J., Greilhuber J., Suda J., 2007: Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols* 2, s. 2233-2244
6. Dubiel von LeRach J., 2003: *Entomologie II. Motýli na Žulovsku*. Josef Dubiel von LeRach, Jeseník, s. 103
7. Ellis L. L., Huang W., Quinn A. M., Ahuja A., Alfrejd B., et al., 2014: Intrapopulation Genome size Variation in *D. melanogaster* Reflects Life History Variation and Plasticity. *PLOS Genetics*. 10
8. Givan L.A., 2001: Chapter 2 Principles of Flow cytometry: An overview. *Methods in Cell Biology*. Volume 63, s. 19-50
9. Gregory R. T., 2002: Genome size and developmental complexity. *Genetica*. 115, s. 131-146
10. Gregory R. T., 2005: Chapter 1 Genome Size Evolution in Animals. *The Evolution of Genome*, s. 3-97
11. Gullan J. P., Cranston S. P., 2014: *The insects: An Outline of Entomology, 5th Edition*, Wiley-Blackwell, s. 624
12. Hanrahan J. S., 2011: New genome size estimates of 134 species of arthropods. *Chromosome Res*, s. 809-823
13. Hare E. E., Johnston S. J., 2012: Genome Size Determination Using Flow Cytometry of Propidium Iodide-Stained Nuclei. In: Orgogozo V., Rockman M. (eds) *Molecular Methods for Evolutionary Genetics. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Volume 772. Humana, s. 3-12

14. Holuša J., Kočárek P., Konvička O., 2008: *Rovnokřídlý hmyz (Orthoptera), švábi (Blattaria), škvoři (Dermaptera), kudlanky (Mantodea) Bílých Karpat*, s. 237-241
15. Jelínek J., Zicháček V., 2005: *Biologie pro gymnázia*. Nakladatelství Olomouc, Olomouc, s. 575
16. Kočárek P., Holuša J., Vidlička L., 2005: *Blattaria, Mantodea, Orthoptera & Dermaptera České a Slovenské republiky*. Kabourek, Zlín, s. 343
17. Kočárek P., Holuša J., Vlk R., Marhoul P., 2013: *Rovnokřídlí České republiky*. Academia, Praha, s. 288
18. Kron P., Suda J., Husband C. B., 2007: Applications of Flow Cytometry to Evolutionary and Population Biology. Annual a Review of Ecology, *Evolution and Systematics* Volume 38, s. 847-876
19. Laryszová P., 2010: Ekologicko-Faunistická Charakteristika Denních Motýlů (Lepidoptera) Hornické Krajiny (Důl Staříč), Technická univerzita Ostrava, Hornicko-geologická fakulta, Ostrava, s. 32 (bakalářská práce). “nepublikováno“. Dep. Repozitář Vysoké školy báňské – Technické univerzity
20. Laštůvka Z., Liška J., 2011: *Komentovaný seznam motýlů České republiky*. Biocont laboratory, Brno, s. 148
21. Mácová P., 2009: *Společenstva motýlů v okolí Telče*. Masarykova univerzita. Pedagogická fakulta. Katedra Biologie, Brno, s. 47 (bakalářská práce). “nepublikováno“. Dep. Repozitář Masarykovy univerzity – Pedagogická fakulta
22. Marhoul P., Holuša J., Kaláb O., Kočárek P., Kuřavová K., Musiolek D., Rada S., Vlk R., 2019: *Mapování rozšíření rovnokřídlých (Orthoptera) ve vybraných krajích České republiky v letech 2012-2015*. Příroda, s. 41-54
23. Melamed R. M., 2001: Chapter 1 A brief history of flow cytometry and sorting. *Methods in Cell Biology*. Volume 63, s. 3-17
24. Pecina P., 1999: *Hmyz druhy pro začínající chovatele – strašilky, pakobylky a saranče: průvodce Pavla Peciny pro mladé chovatele*. Fragment, Havlíčkův Brod, s. 32
25. Pekarčíková L., Knopfová L., Ondroušková E., Šmarda J., 2014: The use of Flow Cytometry for Analysis of the Mitochondrial Cell Death. *Časopis České a Slovenské Onkologické Společnosti* 1, s. 15-21
26. Reichholf-Riehm H., 2003: *Motýli*. Euromedia Group, Praha, s. 288

27. Resh V.H., Cardé T. R., 2003: *Encyclopedia of Insects*. Academic Press, California, s. 1266
28. Roubalová L., 2012: Průtoková cytometrie. *FONS: buletín pro odborníky z oblastí: klinické biochemie, laboratorní diagnostiky, výpočetní techniky, laboratorní a zdravotnické techniky*. 22, s. 5-9
29. Sadílek D., Urfus T., Vilímová J., Hadrava J., Suda J., 2019: Nuclear Genome Size in Contrast to Sex Chromosome Number Variability in Human Bed Bug, *Cimex lectularius* (Heteroptera: Cimicidae). *Journal of Quantitative Cell Science. Cytometry Part A*, s. 746-756
30. Stuchlíková M., 2017: Průtoková cytometrie a její využití ke studiu hmyzu. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Praha. s. 31. (bakalářská práce). “nepublikováno“. Dep. Repozitář závěrečných prací UK.
31. Suda J., 2005: Co se skrývá za rostlinnou průtokovou cytometrií? *Živa* 53. s. 46-48
32. Suda J., 2015: Co je nového v Biologii Rekordman ve Velikosti Genomu. *Živa* 1, s. 4
33. Šinkorová Z., Zárybnická L., 2008: Průtoková cytometrie jako analytická a selekční metoda I. část. *Vojenské zdravotnické listy* 3, s. 98-103
34. Trávníček P., Kubátová B., Čurn V., Rauchová J., Krajníková E., Jersáková J., Suda J., 2011: Remarkable coexistence of multiple cytotypes of *Gymnadenia conopsea* aggregate (the fragrant orchid): Evidence from flow cytometry. *Annals of Botany*. Volume 107, s. 77-87
35. Vane-Wright I.R., Ackery R.P., Ford E., 1986: The Biology of Butterflies. *Journal of Animal Ecology*. Volume 55, s. 752
36. Westerman, M., Barton, N.H., a Hewitt, G.M., 1987: *Differences in DNA content between two chromosomal races of the grasshopper Podisma pedestris*. *Heredity* (Edinb). 58, 221–228.
37. Wilkerson M. J., 2012: Principles and applications of flow cytometry and cell sorting in companion animal medicine. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. Volume 42, s. 53-71
38. Zahradník J., Severa F., 2007: *Hmyz*. Aventinum, Praha, s. 326

Citované databáze:

Animal Genome Size Database. Online: <http://www.genomesize.com/>

Biological library. Online: <https://www.biolib.cz/>

Seznam zkratek:

FCM – flow cytometry method

PI – Propidium jodid

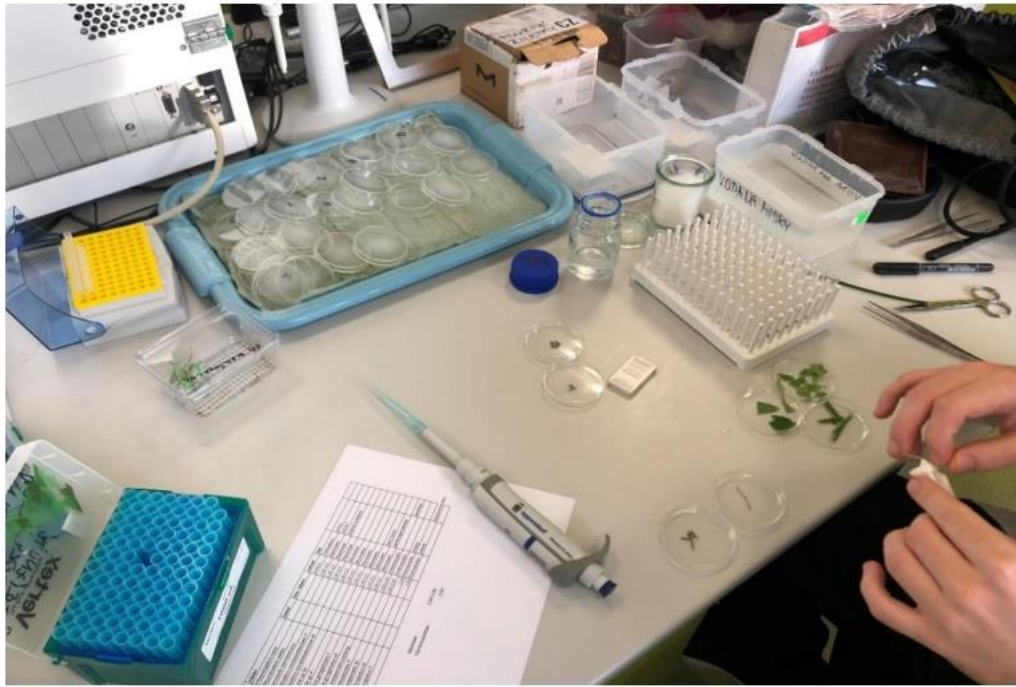
FS – forward scatter

SS – side scatter

15. Přílohy



Příloha 1: *Průtokový cytometr. Foto: Viktória Kovaľová*



Příloha 2: *Nástroje pro přípravu suspenze jader. Foto: Viktória Kovaľová*



Příloha 3: *Končetina vzorku se standardem. Foto: Daniela Reindlová*



Příloha 4: *Laboratorní tým. Foto: Daniela Reindlová*