

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

KATEDRA EKOLOGIE



**Determinácia ekonomicky významných skupín hmyzu
pomocou prietokovej cytometrie**

Genom size determination of economically important groups
of selected insects by flow cytometry

BAKALÁRSKA PRÁCA

Bakalant: Viktória Kovaľová

Vedúci bakalárskej práce: Ing. Hana Šípková, Ph.D.

2020

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Viktória Kovaľová

Environmentální vědy
Aplikovaná ekologie

Název práce

Determinace ekonomicky významných skupin hmyzu pomocí průtokové cytometrie

Název anglicky

Genom size determination of economic importance of selected group in Insects

Cíle práce

Cílem práce bude analýza absolutní velikosti genomu vybraných zástupců z různých řádů hmyzu, kteří jsou bráni jako "škůdci" resp. hospodářsky významní, s přihlédnutím k jejich odlišným ekologickým vlastnostem a nárokům. Součástí práce je i literární přehled dosud publikovaných prací zabývajících se problematikou ekologických vlastností dané skupiny a velikosti genomu jako druhově specifického parametru.

Metodika

V bakalářské práci bude v úvodní části zpracovaná rešerše z dostupných literárních zdrojů včetně přehledu dosavadních znalostí o ekologii vybraných zástupců skupin hospodářsky významných bezobratlých a o velikosti genomu jako parametru, který může být odlišnou ekologií druhů ovlivněn. V praktické části práce bude provedeno měření absolutní velikosti genomu vybraných zástupců dvoustupňovou metodikou dle Otto 1990 (Doležel et al. 2007) s využitím průtokové cytometrie a propidium iodidu jako fluorescenčního barviva. Získaná data autorka statisticky zpracuje (zhodnocení mezidruhových rozdílů pomocí ANOVy, Tukyho testu, boxplotů s přihlédnutím k ekologickým vlastnostem) a vhodnou diskuzí zhodnotí výsledky s ohledem na již publikované práce.

Doporučený rozsah práce

cca 30 stran

Klíčová slova

průtoková cytometrie, škůdci, ekologie

Doporučené zdroje informací

Gregory T.R., 2011: Animal genome size database. <http://www.genomesize.com>

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

Kraaijeveld K., 2010: Genome size and species diversification. *Evolutionary Biol.*, 37:227–233

Předběžný termín obhajoby

2019/20 LS – FŽP

Vedoucí práce

Ing. Hana Šípková, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra ekologie

Konzultant

mgr. Petr Vít, Ph.D.

Elektronicky schváleno dne 22. 11. 2019

doc. Ing. Jiří Vojar, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 25. 11. 2019

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Děkan

V Praze dne 29. 03. 2020

Prehlásenie:

Prehlasujem, že som bakalársku prácu na tému: Determinácia ekonomicky významných skupín hmyzu pomocou prietokovej cytometrie vypracovala samostatne a citovala som všetky informačné zdroje, ktoré som v práci použila a ktoré som taktiež uviedla na konci práce v zozname použitých informačných zdrojov. Som si vedomá, že na moju bakalársku prácu sa plne vzťahuje zákon č. 121/2000 Sb., o práve autorskom, o právach súvisiacich s právom autorským a o zmene niektorých zákonov, v znení neskorších predpisov, predovšetkým ustanovenia § 35 odst. 3 tohoto zákona, tj. o užití tohoto diela. Som si vedomá, že odovzdaním bakalárskej práce súhlasím s jej zverejnením podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o zmene a doplnení ďalších zákonov, v znení neskorších predpisov, a to i bez ohľadu na výsledok jej obhajoby. Svojím podpisom taktiež prehlasujem, že elektronická verzia práce je totožná s verziou tlačenou a že s údajmi uvedenými v práci bolo nakladané v súvislosti s GDPR.

V Prahe_____

Podpis_____

Pod'akovanie

Rada by som pod'akovala predovšetkým svojej školiteľke Ing. Hane Šípkovej, Ph.D. a konzultantovi Mgr. Petrovi Vítovi, Ph.D. za ich trpezlivosť, a hlavne za cenné pripomienky. Veľké ďakujem taktiež patrí Mgr. Tomášovi Vendlovi, Ph.D. z Výskumného ústavu rastlinnej výroby, v.v.i. za poskytnutie vzoriek na analýzu a užitočných informácií o hmyzích škodcoch a roztočoch.

Abstrakt:

Veľkosť genómu je celkové množstvo DNA obsiahnuté v haploidnej sade chromozómov daného organizmu. V rámci druhu predpokladáme, že je veľkosť genómu stabilná. Modernou metódou pomocou ktorej zisťujeme veľkosť genómu je prietoková cytometria. Táto metóda je využívaná hlavne na výskum ľudských, rastlinných a živočíšnych buniek. Táto práca je zameraná na analýzu veľkosti genómu ekonomicky významných skupín hmyzu, konkrétne škodcov plodín a skladovaných produktov v súvislosti s ekológiou konkrétneho druhu. Z nášho merania vykazoval rád Coleoptera s dokonalou premenou hodnoty od $2C = 0,20$ pg po $2C = 1,81$ pg. Oproti tomu u rádu Blattodea s premenou nedokonalou sa hodnoty pohybovali od $2C = 4,37$ pg po $2C = 11,17$ pg. Na základe dosiahnutých výsledkov môžeme predpokladať, že veľkosť genómu súvisí s dĺžkou a typom vývoja. Nižšie genómy sa ukázali u jedincov so zložitejším vývojom.

Kľúčové slová: veľkosť genómu, prietoková cytometria, ekológia, škodcovia plodín

Abstract:

The genome size is a total amount of DNA that is contained in a haploid set of chromosomes. Within the species, we assume that the genome size is stable. Flow cytometry is a modern method for determining genome size. This method is mainly used in research of human, plant and animal cells. This work is focused on genome size research of economically important groups of insects, specifically crop pests and stored products pests in connection with ecology of particular species. From our research, the order Coleoptera with complete metamorphosis showed values from $2C = 0.20$ pg to $2C = 1.81$ pg. In contrast, values in the order Blattodea with incomplete metamorphosis ranged from $2C = 4.37$ pg to $2C = 11.17$ pg. Based on the results we can say that the genome size is related to the length and type of metamorphosis. Smaller genomes have been shown in individuals with more complex development. At the same time, the genome size is also influenced by the size of the individual.

Key words: genome size, flow cytometry, ecology, crop pests

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Cieľ práce.....	1
3. Prietokový cytometer.....	2
3.1. Princíp metódy.....	2
3.2. Základné komponenty prietokového cytometru.....	2
3.2.1. Fluidný systém.....	3
3.2.2. Optický systém.....	3
3.2.3. Detekčný systém.....	4
3.3. Rozptyl žiarenia.....	4
3.4. Farbivá a štandardy.....	5
3.4.1. Štandardy.....	5
3.4.2. Farbivá.....	5
3.5. Výhody a nevýhody.....	6
3.6. Využitie.....	7
3.6.1. Stanovenie veľkosti genómu.....	7
4. Charakteristika významných škodcov zásob a plodín.....	9
4.1. Škodca.....	9
4.2. Škodcovia potravinových zásob.....	9
4.2.1. Škodcovia s vývojom v potravinách.....	10
4.2.2. Škodcovia s vývojom mimo potravín.....	13
4.3. Populácia.....	14
4.3.1. Populačná dynamika.....	15
5. Metodika.....	16
5.1. Preprava hmyzieho materiálu.....	16
5.2. Príprava hmyzieho materiálu.....	16
5.3. Príprava farbiva.....	17
5.4. Analýza prietokovým cytometrom.....	17
5.4.1. Nastavenie parametrov.....	19
5.4.2. Vyhodnotenie výsledkov.....	20
5.4.3. Výpočet veľkosti genómu.....	20
5.5. Štatistické spracovanie výsledkov.....	21
6. Výsledky merania.....	22
6.1. Porovnanie škodcov a neškodcov z rádu Coleoptera.....	34
6.2. Rozdiel medzi pohlaviami.....	35

7. Diskusia.....	37
8. Záver.....	42
9. Literatúra.....	43
10. Prílohy.....	48

1. Úvod

Prietoková cytometria je moderná a rýchlo sa rozvíjajúca metóda založená na analýze jadra buniek v pohybe, ktorá zaznamenáva vybrané optické vlastnosti jednotlivých častíc. V súčasnej dobe je považovaná za štandardnú analýzu častíc v suspenzii. Umožňuje nám kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu fyzikálnych (optických) a chemických (fluorescenčných) vlastností častíc (Roubalová 2013).

Aplikácia a využitie prietokového cytometru sa v minulých rokoch veľmi rýchlo rozšírila v smere teoretickej vedy. Napríklad dnes sa využíva v botanike, molekulárnej biológii, embryológii, biochémií, morskej ekológii, genetike, mikrobiológii a imunológii. Ďalej taktiež v klinickej diagnostike a lekárstve a to konkrétne v oblasti hematológie, bakteriológie, patológie, onkológie, pôrodníctve a chirurgii (Givan 2001).

V biologických oboroch sa využíva napríklad k stanoveniu obsahu jadrovej DNA, určeni ploidie rastlín, analýze bunkového cyklu, detekcii a charakteristike mikroorganizmov, ale taktiež k triedeniu požadovaných častíc. Čo sa týka využitia prietokového cytometru v oblasti živočíšnej bunky, konkrétne bezstavovcov a hmyzu, existuje len malá časť odborných štúdií. Tie sa hlavne zaoberajú veľkosťou genómu u vybraných taxónov. Táto informácia je dosť zaujímavá vzhľadom k tomu, že táto metóda nesie oproti iným veľa výhod. Výhodou oproti iným metódam je napríklad jednoduchá príprava vzoriek, rýchla analýza, nízke finančné náklady, presnosť merania alebo analýza širokej škály pletív (Suda 2005).

2. Cieľ práce

Cieľom tejto práce je výskum jadra bunky hmyzu a následne vyhodnotenie výsledkov, ktoré sme získali touto metódou. Hlavným predmetom je analýza absolútnej veľkosti genómu vybraných zástupcov z rôznych tried hmyzu, ktorý sú považovaný za škodcov, s prihliadnutím na ich odlišné ekologické vlastnosti a nároky.

3. Prietokový cytometer

3.1 Princíp metódy

Prietokový cytometer bol primárne zostrojený k analýze jadra bunky. V súčasnosti môžeme analyzovať akúkoľvek suspenziu častíc i s podstatne menšími rozmermi ako bunky. Napríklad víry, chromozómy, fragmenty DNA a iné (Shapiro 2003).

Podľa Shapira (1995) je prietoková cytometria molekulárne biologická metóda, ktorá umožňuje identifikovať a kvantifikovať rôzne chemické a fyzikálne vlastnosti bunky. Pre analýzu pomocou prietokového cytometra musia byť bunky v suspenzii. Na prevedenie buniek do suspenzie sa používa tzv. nosná kvapalina (sheat fluid). V prípade celých tkanív je nutné tkanivo rozrušiť a uvoľniť jednotlivé bunky do suspenzie s nosnou kvapalinou. Princíp prietokovej cytometrie je založený na detekcii fluorescenčného signálu. Na sledovanie požadovaných znakov využívame fluorescenčne značené protilátky alebo fluorescenčné farbivá (fluorochrómy), ktoré sa viažu priamo na DNA. Zafarbené jadrá potom pretekajú špeciálnou komôrkou tak, aby v daný moment pretiekla komôrkou práve jedna bunka z analyzovanej suspenzie. Následne tak dôjde k osvieteniu lúčom o určitej vlnovej dĺžke, ktorý zapríčiní emitáciu fluorochrómu, pričom je emitované žiarenie o inej vlnovej dĺžke a to je detekované fotodetektormi.

Výstupom z merania pomocou prietokového cytometru je viacrozmerný graf, do ktorého sa zanesie intenzita každého zo sledovaných znakov. Štatistickou analýzou sa následne roztriedia jednotlivé jadrá do skupín podľa intenzity jednotlivých znakov (Givan 2001).

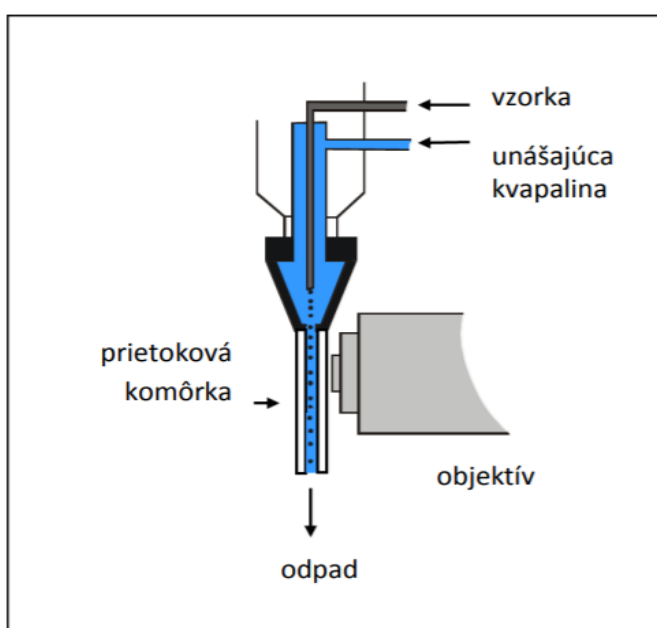
3.2 Základné komponenty prietokového cytometru

Prietokový cytometer sa skladá z 3 základných častí. Z fluidného systému, optického systému a detekčného systému – elektroniky. Tieto systémy sú vzájomne prepojené (Roubalová 2013).

Podľa Melameda a kol. (1990) musí prietokový cytometer splňovať štyri hlavné vlastnosti. Za prvé by mal poskytovať nastavenie vlnovej dĺžky emitovaného svetla. Za druhé by svetelný lúč mal byť ľahko vytvoriteľný a prenikavý. Ďalej by merateľnosť mala byť v pravouhlom svetelnom rozptyle (side scatter). Posledná hlavná vlastnosť sa týka lúča, ktorý by mal byť jednofarebný.

3.2.1 Fluidný systém

Prvá časť je fluidika. Ide o užívateľsky ovplyvnilný transport vzorku prístrojom. Častice sa transportujú zo suspenzie, odkiaľ jednotlivo a za sebou prechádzajú do prietokovej komory, kde sú následne osobitne analyzované (Robinson 2004). Toto rozdelenie buniek na jednotlivé kusy v rade zapríčiňuje vmiesenie prúdu suspenzie do rýchlejšie tečúcej hnacej tekutiny. Vzorka je vstriednutá tak, aby nedošlo k zmiešanju s tekutinou, ale aby sa vytvoril koaxiálny prúd. Zúžené kapiláry zaisťujú, že cytometrom prejde práve len jedna častica. Parametre fokusu môžeme samozrejme upravovať, napríklad nastaviť menší rozdiel tlaku vzorky a unášajúcej tekutiny. Takéto nastavenie je vhodné na analýzu jadra buniek DNA (Hawley 2004).



Obrázok 1 : Schéma prietokového cytometra so základnými časťami znázorňujúca excitáciu jadier zdrojom svetla a ich odplavenie do nádoby s odpadom. Prevzaté z Vidová (2013).

3.2.2 Optický systém

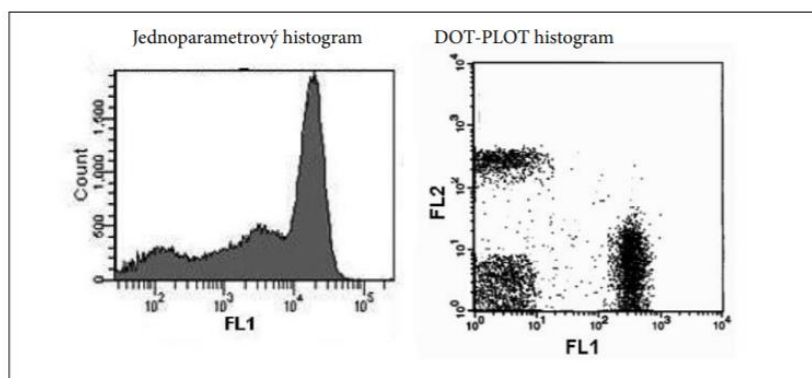
Druhou časťou je optika, ktorú delíme na excitačnú a zbernú. Excitačnú časť tvorí zdroj svetla a šošovky, ktoré tvarujú a zaostrujú laserový lúč. Zdrojom svetla môže byť laser, oblúčková lampa alebo aj LED lampa. V dnešnej dobe sa najviac využívajú lasery, pretože produkujú veľmi intenzívne lúče monochromatického svetla. Oblúčkové lampy oproti nim potrebujú optické filtre, aby boli schopné vyžiariť určitú vlnovú dĺžku (Šinkorová a kol. 2008).

Zbernú optiku tvorí súbor šošoviek zhromažďujúcich emitované svetlo vyžiarené časticou, systém optických zrkadiel a optických filtrov, ktoré zachycujú fluorescenčné žiarenie a následne ho usmerňujú na aktívnu vrstvu príslušných detektorov, kde sa nachádza rozhranie optického a elektronického systému prietokového cytometru (Shapiro 2003).

3.2.3 Detekčný systém

Posledným dôležitým komponentom je elektronika a výpočtový systém, ktoré umožňujú nastavenia parametrov cytometra. Fotodetektory nám prevádzajú svetelný signál na elektrický impulz. Zahrňuje taktiež software, cez ktorý prevádzame štatistickú analýzu dát (Rahman 2009).

Existujú rôzne spôsoby zobrazenia výsledkov. Základným prostriedkom vizualizácie získaných dát je scatter diagram. Samostatné parametre ako je FSC alebo FITC (FL1) môžeme zobraziť ako jednoparametrový histogram. Na ose x je zobrazená hodnota meraného parametra a to intenzita fluorescencie a na ose y sa zobrazuje počet zachytených častíc. Ak máme parametre dva, zobrazujeme dáta v diagrame, ktorý sa nazýva dot-plot a na osách máme vyjadrenú intenzitu fluorescencie meraného parametra (Shapiro 2005).



Obrázok 2: Príklady jednoparametrového histogramu a histogramu DOT-PLOT. Prevzaté z Roubalová (2013).

3.3 Rozptyl žiarenia

Bunky sú unášané v prúde nosnej kvapaliny a každá jednotlivá bunka prejde optickou časťou, kde zdroj svetla (laser) ožiari bunku (Shapiro 2003). Následne sa svetlo rozptýli do rôznych smerov. Podľa uhlu lomu rozlišujeme dva typy rozptylu a to priamy rozptyl - forward scatter (FSC) a bočný rozptyl - side scatter (SSC) (Prokopyeva 2012).

V prípade rozptylu v prednej časti bunky a rozptyl snímaný pri nízkych uhloch od osy (20°), sa tento rozptyl rovná polomeru gule.

Dáva nám to informáciu o relatívnej veľkosti bunky, homogenite častíc a tvare. Uhol bočného rozptylu (SSC) je 90° a je indikátorom vnútornej bunkovej štruktúry resp. granularity (Shapiro 2003).

Špeciálnym typom signálu, ktorý získame po ožiarení častice je fluorescenčné žiarenie. Intenzita fluorescencie je nízka a rovnako ako u signálu SSC, je potreba ju zosilniť fotonásobičom. Fluorescencia je jav, pri ktorom dochádza po excitácii žiarením o určitej vlnovej dĺžke k uvoľneniu energie vo forme fotónov s inou (dlhšou) vlnovou dĺžkou. Rozdiel medzi vlnovou dĺžkou excitujúceho a emitovaného žiarenia sa nazýva Stokesov posun (Roubalová 2013). Fluorochróm, ktorý je viazaný na protilátku dáva informáciu o špecificky definovanom parametre. Ide napríklad o povrchové receptory, membránový potenciál, pH, enzýmovú aktivitu alebo obsah DNA (Novák 2010).

3.4 Farbivá a štandardy

Na stanovenie veľkosti jadrového genómu sa používajú takzvané štandardy. Ide o rastliny u ktorých poznáme veľkosť genómu. Veľkosť genómu zistíme tak, že jadrá meranej rastliny a štandardu odizolujeme a zafarbíme spoločne (tzv. interná štandardizácia). Dôležitý je pomer intenzity fluorescencie štandardu a skúmanej vzorky, na základe ktorého potom určíme výsledok (Doležel a kol. 2005).

3.4.1 Štandardy

V našom výskume sme používali štyri konkrétne štandardy. Štandardy môžu byť rastlinného alebo živočíšneho pôvodu. My sme používali rastlinné štandardy, pretože nám dávajú väčšiu istotu ako živočíšne, ktoré nie sú ešte dosť dobre preskúmané a zavedené. Taktiež sú šetrnejšie, pretože na získanie informácie o veľkosti genómu nám postačí len malá časť lístku, takže celá rastlina zostáva takmer neporušená. Taktiež sú jednoduchšie na kultiváciu a použitie.

Štandardy:

1. *Carex acutiformis* 2C = 0.82 pg (ostrica ostrá)
2. *Solanum pseudocapsicum* 2C = 2.61 pg (ľuľok okrasný)
3. *Bellis perennis* 2C = 3.38 pg (sedmokráska obyčajná)
4. *Pisum sativum* 2C = 8.84 pg (hrach siaty)

3.4.2 Farbivá

Shapiro (1995) definuje fluorochrómy ako látky (farbiva), ktoré absorbujú svetelnú energiu o určitej vlnovej dĺžke (excitácii) a následne ju vyžarujú v inej vlnovej dĺžke (emisii). Niektoré fluorochrómy dokážu zvýšiť fluorescenciu a to tým, že sa špecificky naviažu na bunkové štruktúry. Ide napríklad o nukleové kyseliny, proteíny alebo lipidy. Fluorochrómy musia splňovať niekoľko základných podmienok a to rozpustnosť vo vode, fotostabilitu a nízku toxicitu.

V súčasnej dobe sa na izoláciu jadra bunky a stabilizáciu suspenzie jadier používajú rôzne druhy roztokov, takzvané pufrý. Fluorochróm môže byť súčasťou pufru, alebo sa pridáva následne po izolácii jadier. Medzi najčastejšie používané pufrý patrí Tris-MgCl₂ pufr (Pfosser a kol. 1995), Galbraithov pufr (Galbraith a kol. 1983), LB01 pufr (Doležel a kol. 1989) alebo pufrý Otto I a Otto II (Doležel a kol. 1995).

Pri tejto práci sme využili taktiež veľmi používané farbivo a to Propidium jodid (PI). Jeho molekulová hmotnosť je 668,4 g/mol. Radíme ho medzi interkalačné činidlá (viažu sa medzi vlákna dvojvláknovej molekuly DNA). Využívame ho hlavne pri hodnotení životaschopnosti buniek pomocou prietokovej cytometrie alebo k stanoveniu obsahu DNA pri analýze bunkového cyklu (Mortimer 2000). Podľa Doležela a kol. (2005) sa toto farbivo viaže i na RNA a pre presnú analýzu obsahu DNA je nevyhnutné pridať do vzorky dostatočné množstvo ribonukleázy.

3.5 Výhody a nevýhody metódy

Prvou hlavnou výhodou, ako som spomínala vyššie je určite časová nenáročnosť. Pripraviť suspenziu jadier na meranie zaberie len niekoľko málo minút. Fluorescenciu dokážeme merať pri veľmi veľkej rýchlosti a dokážeme zanalyzovať až niekoľko stoviek jadier za jednu sekundu. Za malý okamžik jednoducho a pohodlne získame informáciu o množstve DNA, stupni ploidity alebo iných skúmaných charakteristikách jedinca. Pri klasickom počítaní chromozómov by to zabralo až 50 dní nepretržitej práce. Vďaka rýchlemu hodnoteniu môžeme v priebehu jediného dňa analyzovať až desiatky až stovky vzoriek. Taktiež čo sa týka rastlinných vzoriek je táto metóda ohľaduplná k sledovaným jedincom, vďaka potrebe len nepatrného množstva pletiva a tak jedinec nemusí byť hneď odsúdený k zániku. Táto skutočnosť dáva priestor na sledovanie vzácných, ohrozených a miznúcich taxónov. Môžeme tak napríklad určiť stupeň ploidity všetkých jedincov z ustupujúcej populácie, takže nebudeme posledný kto daný druh uvidí živý (Suda 2011).

Výhodou sú aj mikroskopické objektívy s vysokou numerickou aparatórou, ktorá poskytuje vysoké rozlíšenie a taktiež signál pre šum. Tento systém má mimoriadnu citlivosť na rozptyl. Bol navrhnutý tak aby analyzovať veľmi malé častice ako sú mikroorganizmy (Robinson 2004).

Každá metóda má svoje plusy a mínusy a prietoková cytometria má tiež svoje obmedzenia. Hlavným obmedzením v meraní je potreba čerstvého a živého materiálu. Preto je nevyhnutné sa po odobraní vzorky presunúť do laboratória a v čo najkratšom čase namerať hodnoty (Suda 2005).

3.6 Využitie

Správna identifikácia a kvantifikácia prokaryotických a eukaryotických buniek je nevyhnutná pre porozumenie procesov prebiehajúcich v prírode (Vives-Rego a kol. 2000).

Botanický ústav AV ČR uvádza ako hlavné využitie prietokovej cytometrie stanovenie charakteristiky bunky (veľkosť, tvar, granularita, membránový potenciál, bunkový cyklus, apoptóza) a intracelulárne hladiny (obsah DNA a RNA, zloženie bázy, obsah proteínov, intracelulárne pH, koncentrácia vápnika, veľkosť chromozómov, centromerický index , atď.).

Je známe, že až 80% krytosemenných rastlín je polyploidných. Prietokovú cytometriu je možné využiť na spoľahlivé určenie taxónov v úzko príbuzných polyploidných skupinách. Ďalej určenie zriedkavých cytotypov alebo pohlavia (Trávniček 2006).

Jedným z najčastejších využití prietokovej cytometrie je aj určenie stupňa ploidie. Častokrát sa využíva na rozlíšenie haploidizácie, diploidizácie alebo zdvojnásobenie chromozómov (Ochatt a kol. 2005).

3.6.1 Stanovenie veľkosti genómu

Veľkosť genómu je druhovo špecifická charakteristika, ktorá nie je v korelácii s komplexnosťou organizmu. Táto hodnota sa často označuje ako záhadná C-hodnota alebo C-value paradox (Gregory 2005). Podľa Řepokovej (2013) veľkosť celého genómu určitého druhu nie je závislá na počte chromozómov. Môže súvisieť s rôznymi fyziologickými a environmentálnymi faktormi, ale sily ovplyvňujúce veľkosť genómu zostávajú nejasné (Elizabeth Montiel a kol. 2012). Vedecké obory, ktoré ťažia zo znalosti hodnôt C sú početné. Zahŕňajú molekulárnu biológiu, systematiku a ekológiu (Bennett a kol. 2000).

Napriek svojmu významu sú hodnoty C známe iba pre zlomok všetkých druhov rastlín, napr. iba 1,4% krytosemenných rastlín (Hanson kol. 2003). Čo sa týka veľkosti genómu zvierat, nájdeme všetky doposiaľ známe veľkosti v online databáze www.genomesize.com. Databáza je dostupná od Januára 2001. Momentálne je k dispozícii veľkosť genómu 3793 stavovcov a 2429 bezstavovcov. Obsah haploidnej DNA je daná v pikogramoch, pričom 1pg = 978 Mbp. Všetky dáta sú nahrané v prehľadnej tabuľke rozdelenej podľa triedy, čeľade a druhu. Trieda hmyz má v súčasnosti k dispozícii 1345 záznamov.

Veľkosť genómu je definovaná ako množstvo DNA v haploidnom genóme (Tiersch a kol. 1989). Doležel a kol. (2003) definuje veľkosť genómu ako celkové množstvo DNA, ktoré predstavuje úplnú kópiu dedičnej informácie organizmu (C-hodnota). Väčšina DNA sa v bunkách eukaryotických organizmov nachádza v jadre, časť ale obsahujú semiautonomné organely ako mitochondrie a u rastlín taktiež plastidy (Suda 2015).

Řepková (2013) upozorňuje na rozlišovanie dvoch základných pojmov. Veľkosť holoploidného genómu (hodnota C): obsah DNA v nereplikovanom haploidnom jadre (bez ohľadu na úroveň ploidie). Veľkosť homoploidného genómu (hodnota Cx): obsah DNA v monoploidnej chromozómovej sade (v priemere v polyploidoch).

Veľkosti holoploidných a homoploidných genómov sa u diploidných druhov rovnajú, v prípade polyploidných druhov je holoploidný genóm väčší ako homoploidný. Obidve hodnoty môžu byť vyjadrené buď v picogramoch DNA alebo v pároch megabáz (1 pg= 978 Mbp). Známu veľkosť genómu môžeme využiť napríklad k detekcii hybridov z homoploidných krížení (za predpokladu, že predpokladaní rodičia sa dostatočne líšia veľkosťou genómu, FCM umožňuje spoľahlivú detekciu ich homoploidných krížencov), predvídanie rôznych fenotypových znakov alebo fenologického a ekologického správania. Ďalej identifikácia druhov s rovnakým počtom chromozómov (druhovo špecifická veľkosť genómu sa vyskytuje v niekoľkých rastlinných alianciách).

4. Charakteristika významných škodcov zásob a plodín

4.1 Škodca

Turnock (2012) definuje škodcu ako hmyz, ktorý sa živí, súťaží o potravu alebo prenáša choroby na ľudí a hospodárske zvieratá. Vďaka ľudskej činnosti vznikli modifikované ekosystémy, ktoré dávajú príležitosť adaptácie hmyzu. Takýto hmyz sa častokrát stáva škodcom.

Podľa slovníka Merriam-webster (2020) je škodca rastlina alebo živočích škodlivý pre ľudí alebo ľudské záujmy (napríklad v poľnohospodárstve alebo živočíšnej výrobe).

4.2 Škodcovia potravinových zásob

Problémom intenzívneho poľnohospodárstva je sústreďovanie a uskladňovanie potravín v skladoch. Tento proces podporuje rozmnožovanie hmyzu a poskytuje im potravu. V takomto prostredí škodca často nemá konkurenciu a môže jednoducho napadnúť ktorúkoľvek časť rastliny v akomkoľvek štádiu (Turnock 2012).

Skladskoví článkonožci predstavujú významné riziko pre skladované potraviny a rôzne rastlinné a živočíšne komodity. Straty spôsobené škodcami sa každoročne pohybujú v stovkách miliónov dolárov. Škody môžu byť spôsobené priamym poškodením (teda požieraním nedospelých jedincov či nedospelých štádií), mnoho druhov môže byť navyše vektorom rôznych patogénnych organizmov, ako sú plesne alebo baktérie (Hold a kol. 1988). Činnosť škodcov môže byť taktiež nepriaznivá kvôli kontaminácii potravín zvyšky starej kutikuly, výkaly, či časťami mŕtvych jedincov. Ich prítomnosť v potravinách môže viesť k ďalším ekonomickým škodám (napr. reklamácie zákazníkov atď. (Hubert a kol. 2018). Spolu s produktami plesní (napr. aflatoxin) navyše zvyšky tiel článkonožcov predstavujú zdravotné riziko, alebo nemôžu byť alergénne či dokonca karcinogénne (Hubert a kol. 2018).

Druhová identifikácia škodcu je dôležitá, pretože rôzne (i blízko príbuzné) druhy môžu mať rôznu škodlivosť, populačnú dynamiku, chovanie, teplotné a vlhkosťné nároky, rezistenciu k insekticidom atď. Správne určenie druhu je tak prvým a kľúčovým krokom k jeho účinnej kontrole. Vedľa morfológických prístupov sa k druhej identifikácii v súčasnej dobe rozvíja taktiež molekulárne metódy (napr. DNA barcoding). Tie sa využívajú hlavne u pavšíc a roztočov, u ktorých existuje mnoho morfológicky veľmi podobných druhov (Liu kol. 2017).

Molekulárne metódy sú ale využiteľné i napríklad u skladiskových chrobákov a motýľov, u ktorých existujú v rámci druhu rôzne kmene, líšiac sa rezistenciou k fumigantom (napríklad fosforovodík), a ktoré sú morfológicky inak neodlíšiteľné (Aulický a kol. 2019).

Podľa Stejskala (1998) rozlišujeme dva typy škodcov zásob. Prvú skupinu tvoria škodcovia s vývojom v potravinách a organických zbytkoch. Ide napríklad o roztoče, chrobáky, pavši, motýle a dvojkřídly hmyz. Do druhej skupiny sa radia cvrčky, mravce, švábi a švehly. Ich vývoj prebieha mimo potravínu.

4.2.1 Škodcovia s vývojom v potravinách

Coleoptera

Najčastejšími konzumentmi suchých potravín sú chrobáky a motýle. Chrobáky majú tuhú pokrývku tela a prvý pár krídel sú premenené krovky. Ide o rad s premenou dokonalou. Vývoj larvy môže mať až osem larválnych štádií instaru a môže trvať až niekoľko rokov (McHugh 2009). U skladových škodcoch je ale vývoj omnoho rýchlejší, ide o pár týždňov alebo mesiacov (Hagstrum a kol. 2012).

Z hľadiska bionómie a ekologických nárokov jednotlivých druhov hovoríme o najdiverzifikovanejšej skupine hmyzu. Obývajú najrôznejšie terestrické a akvatické prostredie, a s takmer 6000 druhmi ide druhovo tretí najpočetnejší rád hmyzu na území ČR (Laštůvka a kol. 2001).

Rád Coleoptera je veľmi dôležitý pre prírodné ekosystémy, napríklad má veľký význam pri bioregulácii a kolobehu látok. Na druhej strane negatívne vplyvajú na rastliny, ktorým poškodzujú korene, stonky, kvety, plody a listy. Taktiež poškodzujú už spomínané uskladnené potraviny. Medzi dospelými jedincami a larvami nájdeme druhy fytofágne, zoofágne i saprofágne. Fytofágne druhy Coleoptera, sú potenciálnymi škodcami rastlín. Vyžadujú určité podmienky prostredia a to napríklad teplotu, vlhkosť, svetlo, štruktúra porastu, trvanlivosť prostredia atď. (Šefrová 2004).

Skladových chrobákov rozlišujeme pre jednoduchšiu orientáciu podľa ich vzhľadu a zvyklostí (Stejskal 1998). (1) Prvú skupinu tvoria herbivori. Vytvárajú sa vnútri celých semien.

Nájdeme ich na zrnách hrachu, fazule, šošovice a iných strukovín. Ak na zrnách nájdeme guľaté dierky, ide určite o nejaký druh zriara.

Taktiež ich nájdeme v celozrnných potravinách, kde škodí hlavne *Sitophilus granarius* (Linnaeus 1758), *S. oryzae* (Linnaeus 1758) a *Rhyzopertha dominica* (Fabricius 1792). (2) Druhou skupinou sú omnivori, ktorí nerozlišujú čím sa živia. Nachádzajú sa hlavne v čokoláde, sušienkach alebo múke. Veľmi nebezpečný je *Tenebrio molitor* (Linnaeus 1758). Poznáme ho podľa charakteristického zápachu, ktorý spôsobujú karcinogénne látky. Larva žije v priemere 360 až 500 dní, pri teplote 26 °C len 200 dní. Dospelý jedinec sa dožíva 3 mesiacov (Horáková a kol. 2008). Veľmi podobný mu je *Tribolium destructor* (Uyttenboogaart 1933), ktorý sa ale nachádza v celom byte a obľubuje sídliska. Škodlivé sú aj ďalšie dva druhy *T. confusum* (Jacquelin du Val 1868) a *T. castaneum* (Herbst 1797). V ryži a múke škodí aj *Oryzaelphus surinamensis* (Linnaeus 1758), je veľmi drobný a na okraji štítu má drobné zúbky. Špecialisti na tabak a korenie sú červotoči. Pre väčšinu škodcov je nikotín obsiahnutý v tabaku smrteľný pre *Lasioderma serricorne* (Fabricius 1792) je ale potravou.

(3) Tretia skupina sa skladá z drobných chrobákov ako napríklad *Cryptolestes spp.* (Ganglbauer 1899) a *Typhaea stercorea* (Linnaeus 1758), ktorí získavajú živiny z plesní. Ich prítomnosť nie je nebezpečná, ale indikujú prítomnosť plesní, čo je omnoho závažnejší problém.

Lepidoptera

Motýle poznáme podľa dvoch párov krídel pokrytých šupinkami. Dospelé motýle neprijímajú tuhú potravu. Na suchých potravinách škodia len húsenice. Motýlie húsenice odlišíme od húseníc chrobákov prítomnosťou panožiek na zadočku. V potravinách zanechávajú pavučinky s trusom (Stejskal 1998).

Ide o skupinu s dokonalou premenou (holometabolía) a väčšinou má 4-5 instarov. Larvami sú húsenice, ktoré sú polypódne, eruciformné a väčšina z nich je bylinožravá. Živia sa lístkami alebo koreňmi stromov. Majú dobre vyvinutú hlavu s kusacím ústrojenstvom (Meyer 2020).

Veľkým problémom v domácnostiach je *Plodia interpunctella* (Hübner 1813), ktorá je nebezpečná pre potravinové závody. Samičky sú oplodnené takmer okamžite po vyliahnutí a nasledujúci deň sú schopné naklásať prvé vajíčka. Vajíčka kladú na povrch potravy, ktoré sú nelepivé (Buss 2006).

Jej húsenice nájdeme hlavne v čokoláde, sušienkach, suchých plodoch a sušenom ovocí. Preniknú papierovými aj hliníkovými obalmi. Malé larvičky vniknú následne do suchých plodov (Stejskal 2007).

Rád Lepidoptera je ideálny pre zvyšovanie informovanosti o environmentálnych otázkach a vzdelávacích cieľoch. Pre verejnosť vytvárajú pozitívnu perspektívu bezstavovcov najmä z dôvodu ich estetickej hodnoty. Ide o vlajkový druh pre šírenie plánov ochrany bezstavovcov. Ich ekologický význam je obrovský, a to nielen z dôvodu veľkého percentuálneho podielu druhov a biomasy, ktorú v ekosystémoch predstavujú. Pre vedcov a študentov ponúkajú modelový taxón na štúdiu ochrany, odhady dopadu na životné prostredie, monitorovanie populácií zvierat, ekológiu, etnológiu, genetiku a mnoho ďalších ekologických a genetických štúdií (Perveen 2017).

Acari (Astigmata)

Acari delíme do dvoch radov, Parasitiformes a Acariformes. Prvý rad obsahuje Metastigmata a Mesostigmata. Druhý pozostáva z Astigmata, Cryptostigmata (tiež známeho ako Oribatei alebo Oribatida) a Prostigmata (Walter a kol. 2013).

Ide o malé organizmy s mäkkým telom a svetlý sfarbením. Sú závislé na vysokej vlhkosti vzduchu a substrátu. Napadajú potraviny, krmivá potravinárske suroviny, hlavne obilniny a olejiny. Spôsobujú závažné problémy na osive, pretože sa živý hlavne klíčkovou časťou. Potravu vysajú, neokusujú. Taktiež sú silno alergéne a spôsobujú napríklad astmu a kožné alergie. Vďaka svojej malej veľkosti sú veľmi ťažko určiteľné, vyžaduje to špecialistu a mikroskop. Skladištné roztoče sú menšie ako 1 mm. Rozpoznáme ich jedine lupou alebo mikroskopom, voľným okom ich rozpoznáme len ako biele bodky na tmavom podklade. Majú 4 páry nôh a patria medzi pavúkovce. Dýchajú celým povrchom tela. Delíme ich na „užitočné veľké“, ktoré majú veľké klepietka, napríklad *Cheyletus* spp. (Latreille 1796) a na „škodlivé malé“ s nepatrnými klepietkami (Stejskal 1998).

Veľmi rozšíreným roztočom je u nás *Acarus siro* (Linnaeus 1758). Jeho vývojový cyklus zahŕňa štádiá: vajíčko – larva – protonymfa – tritonymfa – dospelý jedinec. V nepriaznivých podmienkach sa pridá štádium hypopa. Vývoj trvá približne 10 – 120 dní a závisí na teplote. Optimálne podmienky pre vývoj sú 27° C s vlhkosťou substrátu 17.5 %. Ak klesne teplota pod 2° C a vlhkosť obilia je pod 13,5 % prestanú sa množiť (Stejskal 2007).

Psocoptera

Radíme ich k hmyzu, sú veľmi drobné, veľkostne majú okolo 1-4 mm. Okrídlené druhy lietajú. Sú veľmi jemné a zničí ich dotyk prsta. Nájdeme ich na vlhkých tmavých miestach a na povrchu obilnín. Potravu okusujú. Patria k hmyzu s nedokonalou premenou.

Štádium kukly chýba. Významný škodcovia sú *Liposcelis divinatorius* (Müller 1776) a *Trogium pulsatorium* (Linnaeus 1758). V chladných skladoch *Lepinotus patruelis* (Pearman 1931), v teplých zasa *Liposcelis bostrychophila* (Badonnel 1931) (Stejskal 2007).

4.2.2 Škodcovia s vývojom mimo potravín

Blattodea

Sú najrozšírenejšie v ľudských obydlíach . Radíme ich k hygienickým škodcom, prenášajú rôzne choroby a plesne. Sú aktívne hlavne v noci a za súmraku. V domácnostiach sa stretneme hlavne s *Blattella germanica* (Linnaeus 1767) a *Supella longipalpa* (Fabricius 1798). *B. germanica* poznáme podľa dvoch červených pruhov na štíte. Oproti nemu má *S. longipalpa* na štíte len jeden tmavý pruh. Vyhľadávajú hlavne šatne a knihovne kde lepia svoje vajíčka (Stejskal 1998).

Špeciálnou adaptáciou švábov pri reprodukcii je tvorba zvláštnej schránky okolo vajíčka u žien. Ide o takzvanú ootéku. Táto slúži na ochranu zárodka a tvrdne pri kontakte so vzduchom. Táto adaptácia sa vyskytuje len u švábov a modliviek (Meyer 2020).

Zygentoma

Bezkrídly hmyz s dlhými tykadlami a tromi článkovanými výrastkami na zadočku. Telo majú pokryté jemnými striebornými šupinkami a sú rovnako ako šváby aktívne v noci a za súmraku. Najznámejšie sú teplomilná *Thermobia domestica* (Packard 1837) a *Lepisma saccharina* (Linnaeus 1758), ktorá obľubuje vlhké miesta (Stejskal 1998).

Sú prispôsobené na prežitie v domácom prostredí, napríklad v pivniciach a podkrovi. Majú pestrú škálu potravy, avšak uprednostňujú škrobovú zeleninu. Žijú okolo troch rokov, niektoré sa ale dožívajú aj ôsmich. Majú jedinečný spôsob reprodukcie, kde samec točí hodvábnu niť okolo substrátu a vertikálne položeného predmetu, pod ktorý vloží spermatofór.

Samička následne kráča pod vzniknutým vláknom a pri dotyku dôjde k otvoreniu genitálu a spermie sa uvoľnia do jej reprodukčného systému. Samička vyprázdnený spermatofór skonzumuje (Hoell a kol. 1998)

Vyvíjajú sa procesom nazývaným ametabolická metamorfóza. Znamená to, že nepodliehajú žiadnej metamorfóze alebo transformácii.

Nedospelá rybenka vyzerá takmer identicky s dospelou. Tento spôsob vývoja sa považuje za veľmi primitívny a nájdeme ho hlavne u hmyzu, ktorý sa na Zemi vyskytuje čo najdlhšie (Hoy 2019).

Hemiptera

Rad Hemiptera (polokrídly) delíme ďalej na dva podrady – Heteroptera (ploštice) a Homoptera (rovnakokrídly) (Protić 2011). Brozek a kol. (2004) uvádza ako spôsob prijímania potravy spoločne modifikované bodavo-sacie ústne ústrojenstvo, ktoré umožňuje spracovanie potravy v tekutom stave. Sú primárne fytofágne sajú len rastlinné šťavy. Väčšina zvyšku je dravá alebo mycetofágna. Niektoré môžu byť aj parazitmi a živiť sa krvou väčších zvierat. Ide o rad s nedokonalou premenou (hemimetabolický), takže sa nymfa po niekoľkých štádiách podobá dospelému jedincovi (Martin a kol. 2008).

Vďaka evolúcii, ktorá trvala asi 300 miliónov rokov majú schopnosť obsadiť rôzne suchozemské a vodné ekologické niky (Goodchilda 1966).

4.3 Populácia

Ochrana pred hmyzími škodcami nespočíva v boji s určitými druhmi hmyzu, ale s ich populáciami, ktoré obývajú také prostredie, kde môžu človeku škodiť. Populáciou pritom rozumieme súbor jedincov všetkých vývojových štádií daného druhu, vyskytujúceho sa v určitom priestore (Stejskal a kol. 1993).

Hmyzí škodcovia vyhľadávajú prostredie s najpriaznivejšími podmienkami na prežitie. V takomto prostredí na nich, ale vždy pôsobia vplyvy ktorým sa musia prispôbiť – adaptovať (Jarošík 2005). Majú nízku spotrebu vody napr. škodcovia, ktorý sa živí zrnom, múkou, kožušinami, napr. kožojedy (Trnka a kol. 2006).

Jarošík (2005) uvádza že, populáciu určitého druhu ovplyvňujú na jednej strane vlastnosti prostredia, a to napríklad potrava, priestor, počasie, predátori, konkurenti atď.

Na druhej strane ich ovplyvňujú vlastnosti jedincov, napríklad ich životný cyklus, plodnosť, sexuálne chovanie, pohyblivosť atď. Všetky tieto faktory potom ovplyvňujú populačné procesy natalitu, mortalitu a migráciu populácie a v konečnom dôsledku rozhodujú o populačných premenných: hustote (počet jedincov na jednotku plochy alebo objemu), distribúcii v priestore, vekovej štruktúre a génovej frekvencii. Procesy a premenné sú navzájom prepojené spätnými väzbami.

U hmyzích škodcoch hovoríme o takzvanom náhodnom rozdelení v priestore. Ide o vzácné sa vyskytujúci rozptyl v prírode.

Stretneme sa s ním práve tam, kde je prostredie veľmi uniformné a jedinci sa nedokážu zhlukovať. Príkladom sú potemníky v múke alebo zrnokazy (Trnka a kol. 2005).

U väčšiny druhu hmyzu sa stretávame s populáciami s neprekrývajúcimi sa generáciami. To znamená, že cyklus narodenia, dospievania a smrti zahrňuje smrť všetkých členov prítomných v každej generácii, predtým ako členovia ďalšej generácie dospejú (Jarošík 2005).

4.3.1 Populačná dynamika

Populačnou dynamikou nazývame populačné zmeny v čase vyjadrené zmenami populačných hustôt. Tieto zmenami sú ale závislé na populačných procesoch (natalite, mortalite, migrácii) (Jarošík 2005).

Pohyb švába napríklad ovplyvňuje teplota, kde sa pri teplote 22°C pohybuje 630 mm.s⁻¹ a pri teplote 35°C až 1300 mm.s⁻¹. Šváb je citlivý a reaguje na fyzikálne podmienky okolitého prostredia. Vyžaduje určité teplotu, dostatok vody a potravy k migrácii. Ďalším faktorom ovplyvňujúcim migráciu je populačná hustota. V prehustenom úkryte nastáva kolonizácia hľadanie nového úkrytu. Ďalej so zvyšujúcou sa hustotou populácie (tj. zvyšuje sa koncentrácia agregáčného feromónu) sa zvyšuje atraktivita úkrytu a znižuje sa celková aktivita a akčný rádius jedincov populácie. Jedinci migrujú z menej do viac atraktívnych úkrytov (Stejskal a kol. 1993).

5. Metodika

5.1 Preprava hmyzieho materiálu

Príprava začína už mimo laboratória a to pri preprave hmyzieho materiálu. Je dôležité aby hmyz bol v živom stave, aby nedošlo k poškodeniu tkaniva a meranie by potom mohlo byť chybné. Ak vieme, že meranie nemôže prebehnúť v blízkej dobe, hmyz bude potrebné zmraziť. Zmrazené vzorky sa prejavili ako plne funkčné ako uvádza Hanrahan a Johnston (2011).

5.2 Príprava materiálu

Pri príprave materiálu som sa riadila postupom, ktorý uvádza Koutecký (2012) vo svojej publikácii o prietokovej cytometrii v botanike.

Čerstvé vzorky hmyzu boli privezené z Výskumného ústavu rastlinnej výroby v Ruzyně a následne zmerané prietokovým cytometrom ak to bolo možné v živom stave, niektoré vzorky sa analyzovali ale zo zmrazeného stavu.

Odizolujeme jadrá štandardu a hmyzieho materiálu. Vezmeme malý kus rastlinného pletiva (štandardu) o veľkosti asi 0.2-0.5 cm², u ktorého je známa veľkosť genómu a položíme ju do Petriho misky. Veľkosť pletiva štandardu a tkaniva testovaného materiálu volíme tak, aby sa nám v histograme ukázali približne rovnaké píky. K štandardu preto pridáme jednu až dve končatiny študovaného materiálu. Hmyz (študovaný materiál), musí byť vždy v živom stave a jeho nohu získame odstrihnutím. Pri problémových vzorkách, napríklad šváboch, hmyz najprv nachvíľku zmrazíme v mrazničke, aby bol šváb znehybnený. Častým problémom

pri získavaní vzorky o veľmi malej veľkosti, napríklad roztoče. Pri týchto vzorkách je nutné použiť binokulárnu lupu, a v prípade roztočov miesto nohy použiť celý organizmus.

Do Petriho misky je nutné pridať pufer Otto I. o objeme 550ml, ktorý napipetujeme pomocou pipety. Teraz je nevyhnutné žiletkou rozsekať štandard a vzorku na drobné kúsky. Túto vzniknutú suspenziu jadier nasajeme pipetou a následne do pripravenej skúmavky prefiltrujeme cez nylonové plátno. Pre každý skúmaný hmyz sme pripravili dve vzorky pre overenie výsledku analýzy. Pred farbením skontrolujeme, či sa v suspenzii nenachádzajú väčšie kúsky, ktoré by mohli narušiť správne meranie. Ak sa v suspenzii nič nenachádza, potom takáto suspenzia je pripravená k farbeniu fluorescenčným farbivom.

5.3 Príprava farbiva

Ako som spomenula vyššie, k nášmu meraniu sme využili farbivo propídium jodid (PI). Podľa Doležela a kol. (2007) na farbiaci roztok budeme potrebovať puffer Otto II, ktorý pridáme v objeme 25 ml do pripravenej fľaštičky. Následne pridávame PI a RNA, ktoré sú v zmrazenom stave v mrazničke a preto je potrebné ich rozmraziť. Pridávame 1 ml rozmrazenej RNA a PI, v našom prípade celú eppendorfku. Posledným veľmi dôležitým prvkom je 2-mercapethanol, ktorého napipetujeme do roztoku 44 μ l. Toto namiešané farbivo pridávame k suspenzii jadier v objeme 1 ml (Doležel a kol. 2007).

Po pridaní pufru Otto II musíme vzorku čo najrýchlejšie zmerať, inak sa môžu jadrá poškodiť. To neplatí pre pufer Otto I, v ktorom môžeme jadrá nechať nejakú dobu pri izbovej teplote a neovplyvniť farbenie DNA (Doležel a kol. 2005).

Otto I (Otto 1990)

Príprava pufru si vyžaduje 0,1 M monohydrát kyseliny citrónové (4,2 g) a 0,5% Tween 20 (1 ml). Rozpusť sa v destilovanej vode a vzniknutý roztok sa preleje do analytickej banky a doplní sa destilovanou vodou. Následne sa filtruje cez filter. Vzniknutý pufer skladujeme v chladničke pri 4 °C. Hlavná chemikália ktorú obsahuje pufer Otto I je kyselina citrónová. Táto kyselina slúži k fixácii izolovaných jadier a zlepšuje prístupnosť farbív k chromatínu. Druhou chemikáliou je Tween 20 [polyoxoethylensorbitanmoholaurát]. Ide o detergent ktorý zapríčiňuje rozrušenie cytoplazmy a uvoľnenie jadier. Ďalej znižuje zhlukovanie zvyškov cytoplazmy s jadrami a rozptyluje chloroplasty (Doležel a kol. 2006).

Otto II (Doležel a kol. 1995)

Pufer Otto II pripravujeme z destilovanej vody a 0,4 M dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného (28,65 g). Rozpustenú soľ prelejeme do analytickej banky a prilejeme destilovanú vodu. Prefiltrujeme cez filter a skladujeme v tme a pri izbovej teplote. Na udržanie iontovej sily sa v pufri nachádzajú ionty hydrogenfosforečnanu sodného (Doležel a kol. 2005).

5.4 Analýza prietokovým cytometrom

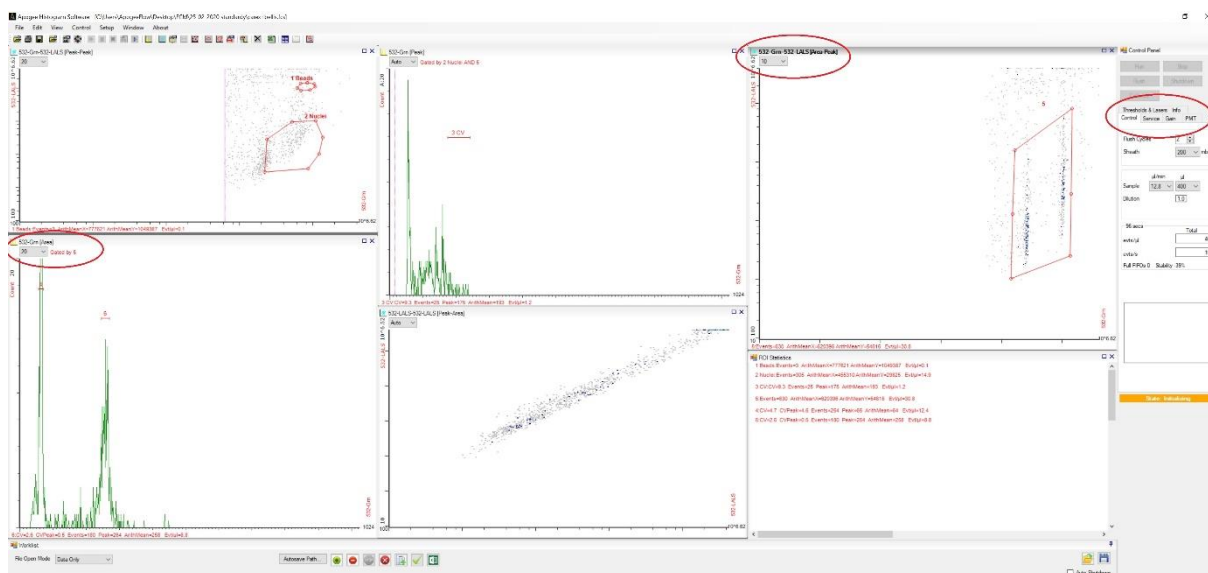
Pred zapnutím prietokového cytometru Apogee A60 je nevyhnutné skontrolovať niekoľko vecí. V prvom rade skontrolujeme nádobu na sheat fluid (destilovanú vodu). Ak v nej nie je dostatok vody, vodu doplníme a pridáme 500 μ l ProClinu. Skontrolujeme odpadnú nádobu, ak je plná je nutné ju vyprázdniť. Teraz zapíname ApogeeFlow FCM control.

Skontrolujeme či sa sampleport nachádza v polohe prepláchnutia, aby mohlo dôjsť k automatickým preplachovacím cyklom. Po tomto čistení sa nám spustí Apogee Histogram software.

Pred začiatkom už finálneho merania musíme do softwaru nahráť príslušné dáta štandardu, s ktorým sme danú vzorku nasekali. Štandard sme vyberali podľa približnej znalosti o veľkosti genómu daného druhu alebo čeľadi, ktorý sme mohli nájsť v databáze www.genomesize.com. Vzorku teraz vložíme do sampleportu, cez ktorý si prietokový cytometer nasaje 150 μ l, z ktorého zmeria asi 90 μ l. Po pár sekundách sa nám začnú objavovať body na viacerých histogramoch.

Pri našej analýze sa sústreďujeme na dva histogramy, ktoré sú pre nás dôležité. Ide o histogram 532 Grn (Area) vs. count. Tento histogram zobrazuje fluorescenciu na 1024 kanáloch. V tomto histograme sa nám zobrazia tzv. peaky. Ide o gaussovské krivky fluorescencie meraných častíc.

Druhý dôležitý histogram je 532 Grn vs. 532 LALS (area-peak). Tu sa nám zobrazuje bočný rozptyl (side scatter), ktorý analyzuje rozptyl lúča lasera. Vďaka tomuto histogramu dokážeme určiť tvar meraných častíc.



Obrázok 3: Software cytometru Apogee A60 s vyznačenými histogramami, ktoré sú dôležité pre našu analýzu. Zobrazená je analýza *Carex acutiformis* (4-CV) a *Bellis perennis* (6-CV).

5.4.1 Nastavenie parametrov

Pri analýze častíc, častokrát vidíme v histograme rôzne neusporiadané častice, ktoré nám vytvárajú šum a analýza je menej presná. Na side-scatter môžeme nastaviť orezanie našej časti záujmu, tzv. ROI (region of interest). Vďaka nahraniu dát o našom známom štandarde, je tento parameter automaticky nahraný a nie je potrebné s ním manipulovať. Je nastavený tak aby zachytil dva naše peaky a to peak nášho štandardu a vzorky. ROI je aplikovaný do 532 Grn (Area) vs. count histogramu. Ak predsa vidíme nejaký šum okolo našich hlavných peakov, môžeme ho odstrániť cez nastavenia tzv. gate. Jednoducho na danom histograme zmeníme veľkosť nášho orezaného záujmu (Pospichalova a kol. 2015).

Na ose fluorescencie je možné hýbať s peakmi cez control panel. Pre nás bolo dôležité nastavenie rýchlosti analyzovanej suspenzie. Najčastejšie sa vzorka analyzuje pri rýchlosti 6-10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Ak sa ale v suspenzii nachádza veľmi veľa častíc, budeme potrebovať rýchlosť znížiť. Naopak pri výskyte veľmi malého množstva častíc rýchlosť zvýšime. Pri zvýšenej rýchlosti, ale dochádza k zníženiu kvality výsledných dát. Toto nastavenie nájdeme v záložke Control – Sample $\mu\text{l}/\text{min}$.

Pri našej analýze sme niekedy potrebovali hýbať s peakmi po ose x, ktorá nám zobrazuje fluorescenciu. V záložke PMT môžeme upraviť hodnotu 532-Grn a môžeme pohnúť osou x doprava alebo doľava.

Toto nastavenie sme využili hlavne pri vzorkách s výrazne väčšou alebo menšou veľkosťou ako je náš štandard. Z tohto dôvodu sme na ose x nezachytili peak našej študovanej suspenzie. Vďaka širokému poznaniu rôznych rastlinných štandardov u ktorých je veľkosť genómu známa, je v takomto prípade lepšie danú vzorku hmyzu nasekať so štandardom s väčšou popripade s menšou veľkosťou genómu.

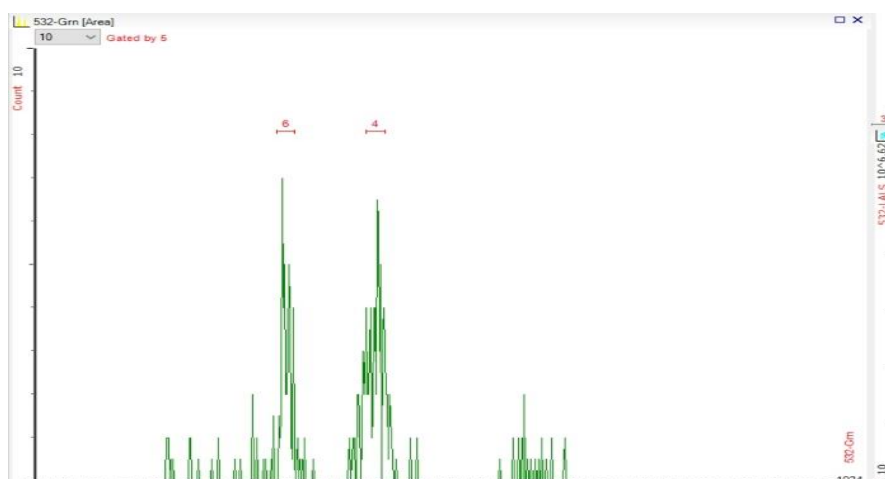
Kľúčovým parametrom, ktorý počas analýzy sledujem je tzv. variačný koeficient (CV). Udáva nám presnosť merania a vypočítame ho ako podiel smerodajnej odchýlky a priemernej pozícii peaku. Väčšinou sa pohybuje v rozmedzí od 1-10%, ideálne by sa percento CV malo pohybovať do 3%. Dôvodom rozptylu hodnôt je rozdielna farbiteľnosť častíc, neidentické podmienky alebo prístrojová chyba (Suda 2005). V niektorých prípadoch, hlavne pri analýze rastlín, je veľkosť vyššia a bohužiaľ tento parameter nie je niekedy možné ovplyvniť.

Pred tým ako danú analýzu uložíme, skontrolujeme pre správnu analýzu a presné výsledky, aby peak bol symetricky v strede úsečiek ohraničujúcich gate. Dôležité je na začiatku rozlíšiť, ktorý peak patrí štandardu a ktorý skúmanej vzorke.

Je to nevyhnutné pre správny výpočet veľkosti genómu vzorky. Vďaka nahraniu dát o štandarde, vieme približnú pozíciu peaku štandardu a preto je pre nás jednoduchšie tieto pozície rozlíšiť.

5.4.2 Vyhodnotenie výsledkov

Na vyhodnotenie výsledkov bude potrebné danú analýzu uložiť a to vo formáte histogramu v Apogee Histogram Software. Ďalej potrebujeme dáta uložiť v excelovej tabuľke, ktoré budeme môcť štatisticky spracovať a hodnotiť. V tabuľke sa nachádzajú údaje o štandarde a skúmanej vzorke. V tabuľke sa nám uložia údaje o fluorescencii vzorku a štandardu (6-mean, 4-mean). Taktiež ukladáme údaje o počte analyzovaných častíc tzv. events (6-events, 4-events). Počet eventov nám udáva počet analyzovaných jadier. Posledným údajom je údaj o variačnom koeficiente (6-CV, 4-CV).



Obrázok 4: Software cytometru Apogee A60 s histogramom 532 Grn (Area) vs. count s dvoma peakmi 6-CV (*Plodia interpunctella*) a štandardom 4-CV (*Carex acutoformis*). Vzorky boli zafarbené farbivom Propidium jodid.

5.4.3 Výpočet veľkosti genómu

Pri výpočte neznámej veľkosti genómu vzorky, ktorý uvádza Doležel a kol. (2007) budeme potrebovať informácie o fluorescencii vzorku a štandardu. Tieto dva údaje dáme do pomeru a vynásobíme to známou veľkosťou genómu štandardu.

$$VG_{\text{neznámi}} = VG_{\text{štandard}} \times \left(\frac{PI_{\text{neznámi}}}{PI_{\text{štandard}}} \right)$$

5.5 Štatistické spracovanie výsledkov

Všetky namerané hodnoty boli štatisticky spracované v programe RStudio vo verzii 1.1.463. Na grafické zobrazenie a porovnanie veľkosti medzi konkrétnymi rúdmi a čel'ad'ami som použila box plot.

6. Výsledky merania

Tabuľka 1: Počet nameraných jedincov podľa rádu.

Rád (latinsky)	Rád (slovensky)	Počet jedincov
Astigmata	roztoče	2
Blattodea	šváby	16
Coleoptera	chrobáky	36
Hemiptera	ploštice	1
Lepidoptera	motýle	1
Psocoptera	pavši	7
Zygentoma	švehlovce	2

Tabuľka 1 zobrazuje celkový počet nameraných jedincov. Celkovo sme zmerali 65 jedincov zo 7 rádiv a u 47 jedincov bolo rozlíšené pohlavie.

Astigmata

Tabuľka 2: Tabuľka znázorňujúca namerané a spriemerované hodnoty veľkosti genómu z dvoch meraní konkrétneho jedinca z rádu Astigmata v picogramoch (1pg = 978 Mbp).

Druh	Veľkosť genómu (pg)
<i>Acarus siro</i>	0,21
<i>Lepidoglyphus destructor</i>	0,33

Z rádu Astigmata boli zmerané iba dva druhy a to dva roztoče *Acarus siro* z čeľade Acaridae a *Lepidoglyphus destructor* (Schrank 1781) z čeľade Glycyphagidae. *Acarus siro* má veľkosť genómu $2C = 0,21$ pg a *Lepidoglyphus destructor* $2C = 0,33$ pg. Rozdiel medzi nimi je nepatrný a to 0,12 pg a preto nemôžeme preukázať významný rozdiel medzi druhmi. Pohlavie sa určiť nepodarilo nie len kvôli malej veľkosti jedinca.

Blattodea

Tabuľka 3: Tabuľka znázorňujúca namerané a spriemerované hodnoty veľkosti genómu z dvoch meraní konkrétneho jedinca z rádu Blattodea v picogramoch (1pg = 978 Mbp). Tabuľka taktiež zobrazuje rozdelenie pohlavia na samce a samičky.

Druh	Veľkosť genómu (pg)	Pohlavie
<i>Blaptica dubia</i>	8,90	Female
<i>Blaptica dubia</i>	9,64	Male
<i>Blatta orientalis</i>	8,07	Female
<i>Blatta orientalis</i>	7,37	Male
<i>Blattella germanica</i>	4,38	Male
<i>Blattella germanica</i>	4,99	Female
<i>Nauphoeta cinerea</i>	9,91	Male
<i>Nauphoeta cinerea</i>	10,44	Female
<i>Periplaneta americana</i>	7,27	Male
<i>Periplaneta americana</i>	7,24	Female
<i>Periplaneta australasiae</i>	10,65	Male
<i>Periplaneta australasiae</i>	11,12	Female
<i>Phoetalia pallida</i>	7,02	Male
<i>Phoetalia pallida</i>	7,20	Female
<i>Symptloce pallens</i>	8,74	Female
<i>Symptloce pallens</i>	7,53	Male

V ráde Blattodea sme namerali 16 jedincov a 8 druhov. Hodnoty sa pohybovali od $2C= 4,38$ pg u samca *Blattella germanica* (Linnaeus 1767) po $2C= 11,12$ pg u samičky *Periplaneta australasiae* (Fabricius 1775). V rámci našich meraní ide o najvariabilnejšiu skupinu čo sa veľkosti genómu týka. Taktiež sa nám podarilo určiť pohlavie na základe ich morfológických znakov. Vďaka tejto variabilite a väčšiemu počtu nameraných druhov môžeme vidieť významné rozdiely medzi druhmi.

Coleoptera

Tabuľka 4: Tabuľka znázorňujúca namerané a spriemerované hodnoty veľkosti genómu z dvoch meraní konkrétneho jedinca z rádu Coleoptera v picogramoch (1pg = 978 Mbp). Hodnoty sú zoradené podľa čeľade a následne podľa mena. Tabuľka taktiež zobrazuje rozdelenie pohlavia na samce a samičky a uvádza skratku, ktorá sa nachádza v grafe pre rád Coleoptera.

Druh	Veľkosť genómu (pg)	Pohlavie	Čeľaď	Skratka graf
<i>Rhyzopertha dominica</i>	0,29	Male	Bostrichidae	Rhyz_d
<i>Callosobruchus chinensis</i>	1,68		Bruchidae	Call_ch
<i>Callosobruchus maculatus</i>	1,67		Bruchidae	Call_m
<i>Zabrotes sp.</i>	1,44	Female	Bruchidae	Zab
<i>Zabrotes sp.</i>	1,44	Male	Bruchidae	Zab
<i>Cryptolestes capensis</i>	0,50	Female	Cucujidae	Cryp_c
<i>Cryptolestes capensis</i>	0,51	Male	Cucujidae	Cryp_c
<i>Cryptolestes ferrugineus</i>	0,50		Cucujidae	Cryp_f
<i>Cryptolestes ferugineus</i>	0,66	Male	Cucujidae	Cryp_f
<i>Cryptolestes ferugineus</i>	0,73	Female	Cucujidae	Cryp_f
<i>Cryptolestes pusillus</i>	0,61	Female	Cucujidae	Cryp_p
<i>Cryptolestes pusillus</i>	0,40	Male	Cucujidae	Cryp_p
<i>Dermestes ater</i>	1,5	Male	Dermestidae	Derm_a
<i>Dermestes ater</i>	1,64	Female	Dermestidae	Derm_a
<i>Sitophilus granarium</i>	1,05	Female	Dryophthoridae	Sit_gr
<i>Sitophilus granarium</i>	1,09	Male	Dryophthoridae	Sit_gr
<i>Sitophilus oryzae</i>	1,66		Dryophthoridae	Sit_or
<i>Sitophilus oryzae</i>	1,61	Female	Dryophthoridae	Sit_or
<i>Sitophilus oryzae</i>	1,57	Male	Dryophthoridae	Sit_or
<i>Gibbium aequinoctiale</i>	1,29	Female	Ptinidae	Gib_aeq
<i>Gibbium aequinoctiale</i>	1,21	Male	Ptinidae	Gib_aeq
<i>Lasioderma serricorne</i>	0,41	Female	Ptinidae	Las_ser
<i>Lasioderma serricorne</i>	0,41	Male	Ptinidae	Las_ser
<i>Oryzaephilus surinamensis</i>	0,20		Silvanidea	Oryz_s
<i>Oryzaephilus surinamensis</i>	0,31	Female	Silvanidea	Oryz_s
<i>Oryzaephilus surinamensis</i>	0,3	Male	Silvanidea	Oryz_s
<i>Tenebrio molitor</i>	1,65	Male	Tenebrionidae	Ten_m
<i>Tenebrio molitor</i>	1,58	Female	Tenebrionidae	Ten_m
<i>Tribolium castaneum</i>	0,46	Male	Tenebrionidae	Tri_ca
<i>Tribolium castaneum</i>	0,48	Female	Tenebrionidae	Tri_ca
<i>Tribolium confusum</i>	0,4		Tenebrionidae	Tri_co
<i>Tribolium confusum</i>	0,37	Female	Tenebrionidae	Tri_co
<i>Tribolium destructor</i>	0,41	Female	Tenebrionidae	Tri_d
<i>Tribolium destructor</i>	0,39	Male	Tenebrionidae	Tri_d
<i>Gnathocerus cornutus</i>	1,71	Female	Tenebrionidae	Gnath_c
<i>Gnathocerus cornutus</i>	1,78	Male	Tenebrionidae	Gnath_c

Najpočetnejšou skupinou, ktorú sme detekovali je rád Coleoptera. Nameraných bolo 36 jedincov a 18 druhov. V tabuľke sú pre väčší počet druhov uvedené a rozlíšené čeľade.

U 30 z nich sme určili pohlavie aj za pomoci odborníkov z VÚVR v Ruzyně. Hodnoty sa pohybovali od $2C = 0,20$ pg u *Oryzaephilus surinamensis* po $2C = 1,78$ pg u samca druhu *Gnathocerus cornutus* (Fabricius 1798). Hodnoty majú síce menší rozptyl, no napriek tomu môžeme vidieť rozdiely medzi druhmi.

Hemiptera a Lepidoptera

Tabuľka 5: Tabuľka znázorňujúca namerané a spriemerované hodnoty veľkosti genómu z dvoch meraní konkrétneho jedinca z rádu Hemiptera a Lepidoptera v picogramoch ($1\text{pg} = 978\text{ Mbp}$).

Druh	Veľkosť genómu (pg)	Rád
<i>Leptoglossus occidentalis</i>	3,49	Hemiptera
<i>Plodia interpunctella</i>	0,58	Lepidoptera

Z rádu Hemiptera a Lepidoptera som mala možnosť namerať len jeden druh z každého rádu. Ide o rády s veľkým počtom škodcov, len z čeľade Pyralidae (vijačkovité) ich je niekoľko desiatok. Z rádu Hemiptera sme namerali hodnotu $2C = 3,49$ pg u druhu *Leptoglossus occidentalis* (Heidemann 1910). Ide o plošticu, ktorá sa vyvíja na ihličnanoch a prezimuje v budovách v blízkosti ľudských obydľí. Z rádu Lepidoptera sme zmerali druh *Plodia interpunctella*, čiže vijačku paprikovú, ktorá je významným škodcom potravín. Jej veľkosť genómu je $2C = 0,58$ pg.

Zygentoma

Tabuľka 6: Tabuľka znázorňujúca namerané a spriemerované hodnoty veľkosti genómu z dvoch meraní konkrétneho jedinca z rádu Zygentoma v picogramoch ($1\text{pg} = 978\text{ Mbp}$).

Druh	Veľkosť genómu (pg)
<i>Atelura formicaria</i>	15,25
<i>Lepisma saccharina</i>	6,54

V ráde Zygentoma máme najväčšiu veľkosť genómu spomedzi všetkých meraní a to $2C= 15,25$ pg u *Atelura formicaria* (Heyden 1853). Tento druh švehly síce primárne neradíme medzi škodcov, ale zohľadnili sme ju pre porovnanie.

Taktiež sa nám načrtlo, že by veľkosť genómu mohla súvisieť s tým či daný druh je škodca, čo sme následne skúsili porovnať. Druhým meraným druhom bola *Lepisma saccharina*, ktorú už medzi škodcov radíme. Jej veľkosť genómu je $2C= 6,54$ pg.

Psocoptera

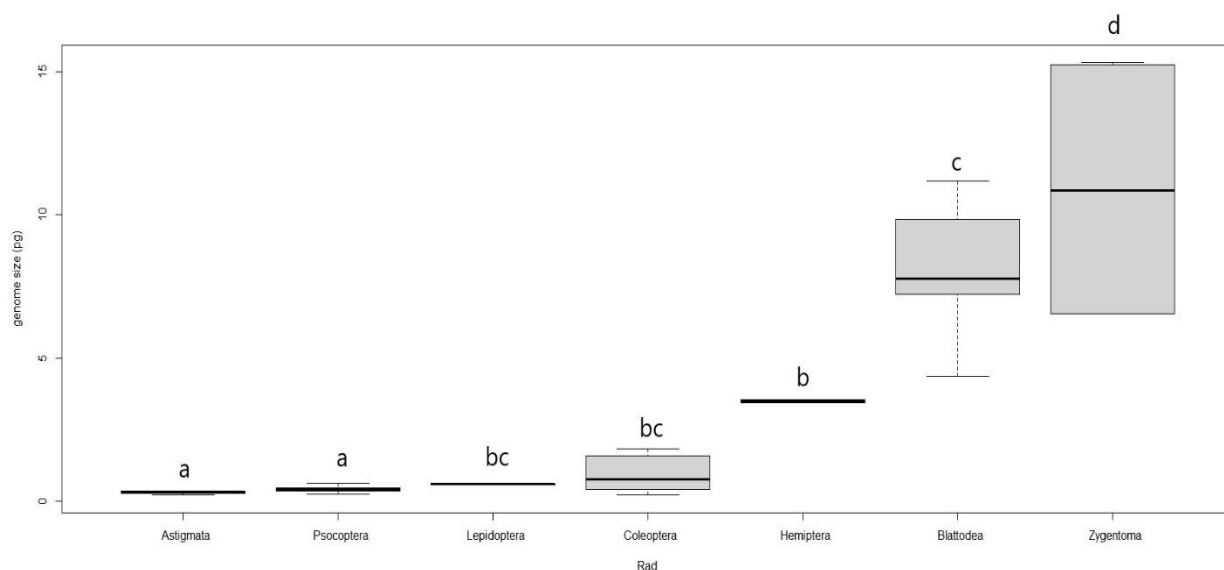
Tabuľka 7: Tabuľka znázorňujúca namerané a spriemerované hodnoty veľkosti genómu z dvoch meraní konkrétneho jedinca z rádu Psocoptera v picogramoch ($1\text{pg} = 978 \text{ Mbp}$).

Druh	Veľkosť genómu (pg)
<i>Lepinotus brunea</i>	0,37
<i>Lepinotus corrodens</i>	0,47
<i>Lepinotus decolor</i>	0,36
<i>Lepinotus entomophila</i>	0,45
<i>Lepinotus paeta</i>	0,40
<i>Lepinotus patruelis</i>	0,62
<i>Lepinotus reticulatos</i>	0,26

U rádu Psocoptera sa nám taktiež nepodarilo rozdeliť druhy na samce a samičky, pretože sú veľkostne veľmi malé od 0,6 do 2 mm.

Veľkosť genómu sa pohybovala od $2C= 0,26$ pg u *Lepinotus reticulatos* (Enderlein 1905) po $2C= 0,62$ pg u *Lepinotus patruelis*. Rozdiel medzi týmito dvoma druhmi je 0,36 pg, čo nám už ukazuje značný rozdiel.

Rády



Obrázok 5: Porovnanie relatívnej veľkosti genómu siedmych skupín hmyzu a roztočov pomocou boxplotov v programe RStudio vo verzii 1.1.463.

Obrázok 5 graficky zobrazuje porovnanie medzi všetkými rádmi. Spomedzi skúmaných vzoriek škodcov boli namerané relatívne obsahy jadrovej DNA rôznych hodnôt. Pohybovali sa od $2C = 0,20$ pg u *Oryzaephilus surinamensis* z rádu Coleoptera až po $2C = 11,12$ pg u samičky *Periplaneta australasiae* z rádu Blattodea.

Najvariabilnejšou skupinou, čo sa týka obsahu jadrovej DNA, vyšiel rád Blattodea, kde sa hodnoty pohybovali od $2C = 4,38$ pg u *Blattella germanica* po $2C = 11,12$ pg u samičky *P. australasiae*. Medzi rádmi Astigmata, Coleoptera, Lepidoptera a Psocoptera nie je signifikantný rozdiel. Všetky rády majú veľmi malú a podobnú veľkosť genómu. Výrazne sa odlišujú rády Blattodea, Hemiptera a Zygentoma.

Tabuľka 8: V tabuľke 8 vidíme výsledky z Anova testu v programe RStudio vo verzii 1.1.463.

	Df	Sum Seq	Mean Seq	F value	Pr (>F)
Druh	6	1513.1	252.18	144	<2e-16 ***
Residuals	120	210.1	1.75		

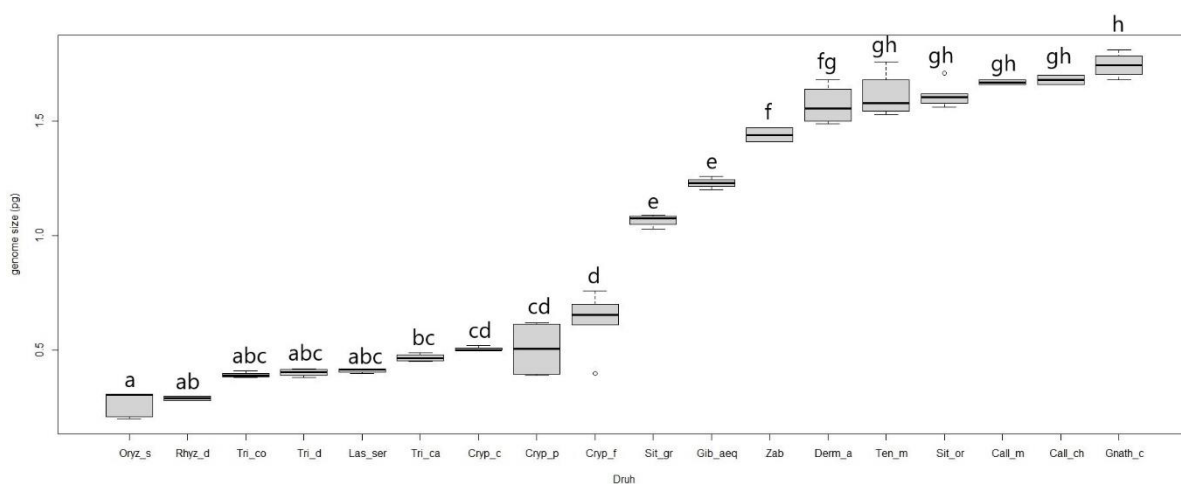
Z výsledku anova testu nás zaujíma hodnota **Pr (>F)**, ktorá nám zhodnotí, či medzi rádmi sú signifikantné rozdiely. To nám udáva počet hviezdíčiek, v našom prípade ***, čo znamená, že medzi rádmi sú signifikantné rozdiely a môžeme to určiť s 99,9% presnosťou.

Tabuľka 9: Tabuľka znázorňuje výsledky z Tukeyho testu v programe RStudio vo verzii 1.1.463. Stĺpec 2C znázorňuje spriemerované veľkosti genómu študovaných rádov hmyzu uvedené v picogramoch (1pg=978 Mbp). Stĺpec Groups znázorňuje podobnosť medzi jednotlivými rádmami.

Rád	2 C	Groups
Zygentoma	10,895	d
Blattodea	8,156	c
Hemiptera	3,49	b
Coleoptera	0,970	bc
Lepidoptera	0,580	bc
Psocoptera	0,416	a
Astigmata	0,290	a

Tukeyho HSD test nám ukáže signifikantné rozdiely medzi konkrétnymi rádmami. Písmená v stĺpci groups označujú odlišnosť alebo podobnosť medzi jednotlivými rádmami. V našom prípade vidíme jasnú odlišnosť, teda signifikantný rozdiel medzi rádmami Zygentoma (d), Blattodea (c), Hemiptera (b), Psocoptera (a) a Astigmata (a). Naopak nesignifikantný rozdiel máme medzi rádmami Coleoptera (bc) a Lepidoptera (bc). Znamená to, že tieto dve skupiny sú od seba len veľmi ťažko odlišiteľné na základe veľkosti genómu.

Coleoptera



Obrázok 6: Porovnanie relatívnej veľkosti genómu v rámci rádu Coleoptera pomocou boxplotov v programe RStudio vo verzii 1.1.463.

Rád Coleoptera je druhovo najpočetnejší. Preukázateľne a signifikantne sa od seba líšia druhy *Oryzaephilus surinamensis*, *Cryptolestes ferrugineus*, *Zabrotes sp.* (Horn 1885), *Gibbium aequinoctiale* (Boieldieu 1854) a *Gnathocerus cornutus* (Fabricius 1798). Veľkosťne podobné sú medzi sebou druhy *Tribolium confusum* (Jacquelin du Val 1868) a *Tribolium destructor* a *Lasioderma serricorne*. Veľká podobnosť je taktiež medzi štyrmi druhmi, a to *Collosobruchus maculatus* (Fabricius 1775), *Callosobruchus chinensis* (Linnaeus 1758), *Sitophilus oryzae* a *Tenebrio molitor*. Tieto výsledky sme následne otestovali aj Tukeyho HSD testom a výsledky sú uvedené v tabuľke 11.

Tabuľka 10: V tabuľke 10 vidíme výsledky z Anova testu v programe RStudio vo verzii 1.1.463.

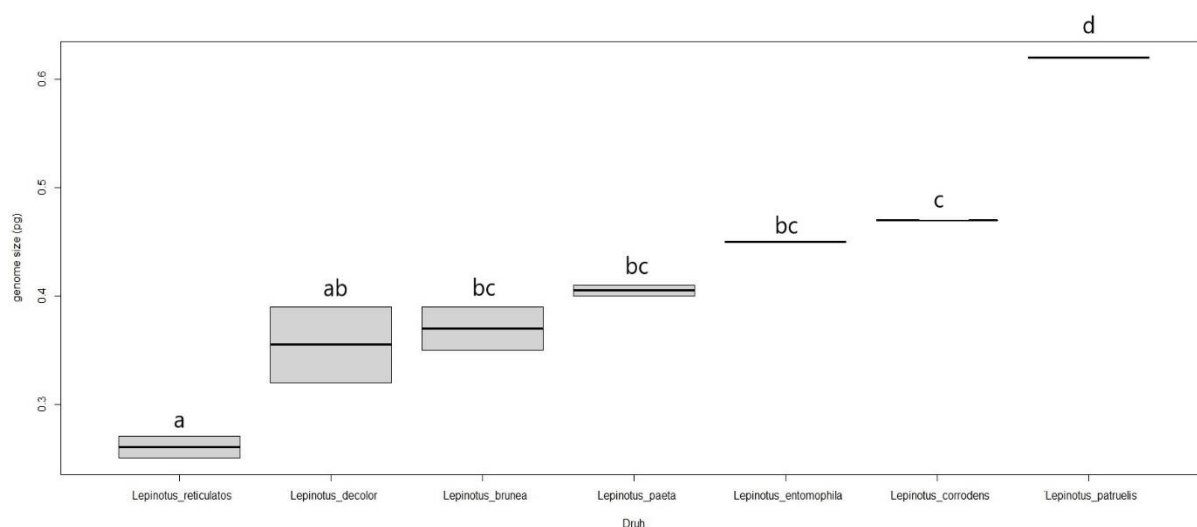
	Df	Sum Seq	Mean Seq	F value	Pr (>F)
Druh	17	21.846	1.2850	292.3	<2e-16 ***
Residuals	52	0.229	0.0044		

Tak ako v predošlom prípade, výsledok anova testu potvrdil signifikantý rozdiel medzi druhmi s 99,9% presnosťou.

Tabuľka 11: Tabuľka znázorňuje výsledky z Tukeyho testu v programe RStudio vo verzii 1.1.463 pre konkrétne druhy z rádu Coleoptera. Stĺpec 2C znázorňuje spriemerované veľkosti genómu študovaných druhov z rádu Coleoptera uvedené v picogramoch (1pg=978 Mbp). Stĺpec Groups znázorňuje podobnosť medzi druhmi.

Druh	2C	Groups
<i>Gnathocerus cornutus</i>	1,745	h
<i>Callosobruchus chinensis</i>	1,680	gh
<i>Callosobruchus maculatus</i>	1,670	gh
<i>Sitophilus oryzae</i>	1,613	gh
<i>Tenebrio molitor</i>	1,613	gh
<i>Dermestes ater</i>	1,570	fg
<i>Zabrotes sp.</i>	1,440	f
<i>Gibbium aequinoctiale</i>	1,230	e
<i>Sitophilus granarium</i>	1,068	e
<i>Cryptolestes ferrugineus</i>	0,630	d
<i>Cryptolestes pusillus</i>	0,505	cd
<i>Cryptolestes capensis</i>	0,505	cd
<i>Tribolium castaneum</i>	0,468	bc
<i>Lasioderma serricorne</i>	0,413	abc
<i>Tribolium destructor</i>	0,403	abc
<i>Tribolium confusum</i>	0,393	abc
<i>Rhyzopertha dominica</i>	0,290	ab
<i>Oryzaephilus surinamensis</i>	0,273	a

Psocoptera



Obrázok 7: Porovnanie relatívnej veľkosti genómu v rámci rádu Psocoptera pomocou boxplotov. v programe RStudio vo verzii 1.1.463.

Psocoptera čiže pisivky majú veľkosťou veľmi malý genóm v rozmedzí od $2C = 0,26$ pg po $2C = 0,62$ pg. Z grafu, ale môžeme vidieť signifikantný rozdiel medzi druhmi *Lepinotus reticulatos*, *Lepinotus corrodens* (Heyden 1850) a *Lepinotus patruelis*, čo nám potvrdil a rozlíšil Tukeyho HSD test. Reálne však medzi druhmi je rozdiel iba 0,21 pg medzi *Lepinotus reticulatos* a 0,15 pg, čo reálne nie je dostatočne veľký rozdiel.

Tabuľka 12: V tabuľke 11 vidíme výsledky z Anova testu v programe RStudio vo verzii 1.1.463.

	Df	Sum Seq	Mean Seq	F value	Pr (>F)
Druh	6	0.1508	0.025135	43.09	0.000113 ***
Residuals	6	0.0035	0.000583		

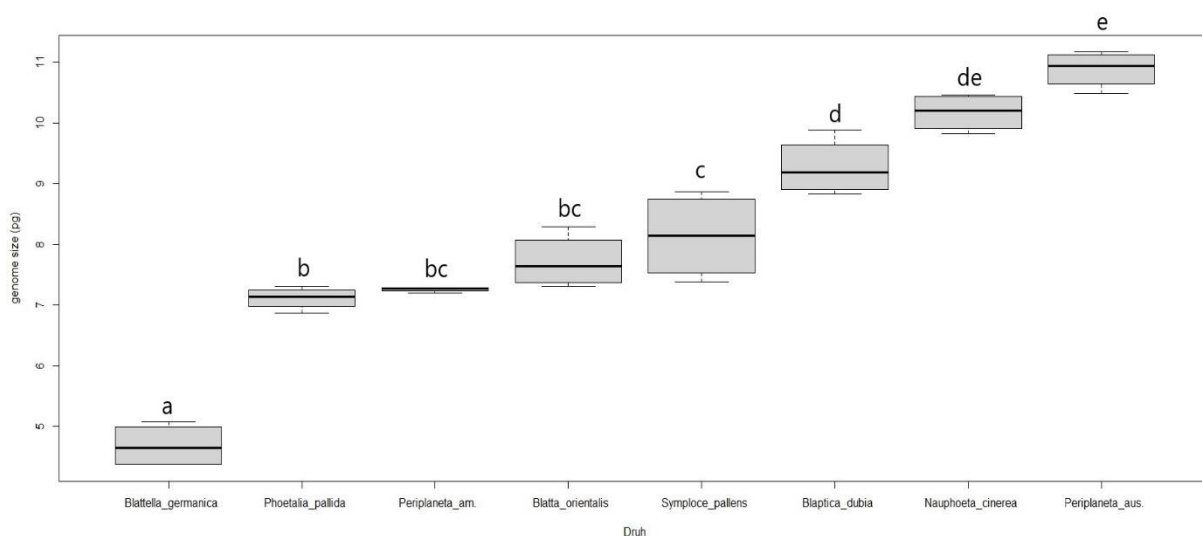
Podľa anovy, ako v predošlých prípadoch máme 3 hviezdičky, čo nám potvrdzuje signifikantné rozdiely medzi druhmi s 99,9% presnosťou.

Tabuľka 13: Tabuľka znázorňuje výsledky z Tukeyho testu v programe RStudio vo verzii 1.1.463. Stĺpec 2C znázorňuje sprimerované veľkosti genómu študovaných druhov z rádu Psocoptera uvedené v picogramoch (1pg=978 Mbp). Stĺpec Groups znázorňuje podobnosť medzi druhmi.

Druh	2C	Groups
<i>Lepinotus patruelis</i>	0,620	d
<i>Lepinotus corrodens</i>	0,470	c
<i>Lepinotus entomophila</i>	0,450	bc
<i>Lepinotus paeta</i>	0,405	bc
<i>Lepinotus brunea</i>	0,370	bc
<i>Lepinotus decolor</i>	0,355	ab
<i>Lepinotus reticulatos</i>	0,260	a

Z Tukeyho HSD testu, nám vyšlo, že druh *Lepinotus decolor* len ťažko odlišíme od druhu *Lepinotus reticulatos*. Podobnú veľkosť genómu majú taktiež druhy majú druhy *Lepinotus brunea*, *Lepinotus paeta* a *Lepinotus entomophila* (Heyden 1850).

Blattodea



Obrázok 8: Porovnanie relatívnej veľkosti genómu v rámci rádu Blattodea pomocou boxplotov programe RStudio vo verzii 1.1.463.

Z grafu (obrázok 8) vidíme, že táto skupina je najvariabilnejšia ako som spomínala vyššie. Hodnoty sa pohybujú od 2C= 4,38 pg u *Blattella germanica* po 2C= 11,12 pg u samičky *P. australasiae*.

Tabuľka 14: V tabuľke 13 vidíme výsledky z Anova testu v programe RStudio vo verzii 1.1.463.

	Df	Sum Seq	Mean Seq	F value	Pr (>F)
Druh	7	107.77	15.395	95.16	6.06e-16 ***
Residuals	24	3.88	0.162		

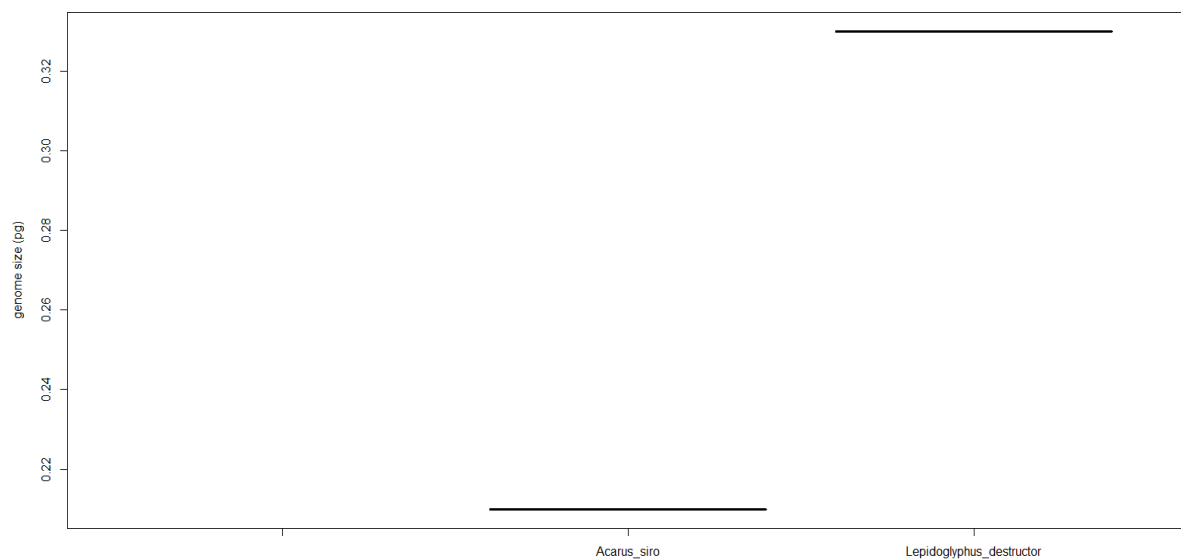
Anova test aj v ráde Blattodea potvrdil signifikantný rozdiel s 99,9% presnosťou.

Tabuľka 15: Tabuľka znázorňuje výsledky z Tukeyho testu v programe RStudio vo verzii 1.1.463. Stĺpec 2C znázorňuje spriemerované veľkosti genómu študovaných druhov z rádu Blattodea uvedené v picogramoch (1pg=978 Mbp). Stĺpec Groups znázorňuje podobnosť medzi druhmi.

Druh	2C	Groups
<i>Periplaneta australisae</i>	10,8875	e
<i>Nauphoeta cinerea</i>	10,1750	de
<i>Blaptica dubia</i>	9,2750	d
<i>Symploce pallens</i>	8,1350	c
<i>Blatta orientalis</i>	7,7200	bc
<i>Periplaneta americana</i>	7,2575	bc
<i>Phoetalia pallida</i>	7,1125	b
<i>Blattella germanica</i>	4,6825	a

Podľa Tukeyho HSD testu sú medzi sebou podobné druhy *Periplaneta americana* a *Blatta orientalis*, ktoré ťažko odlíšime od *Phoetalia pallida*. Ďalej taktiež druhy *Nauphoeta cinerea* s *Periplaneta australisae*.

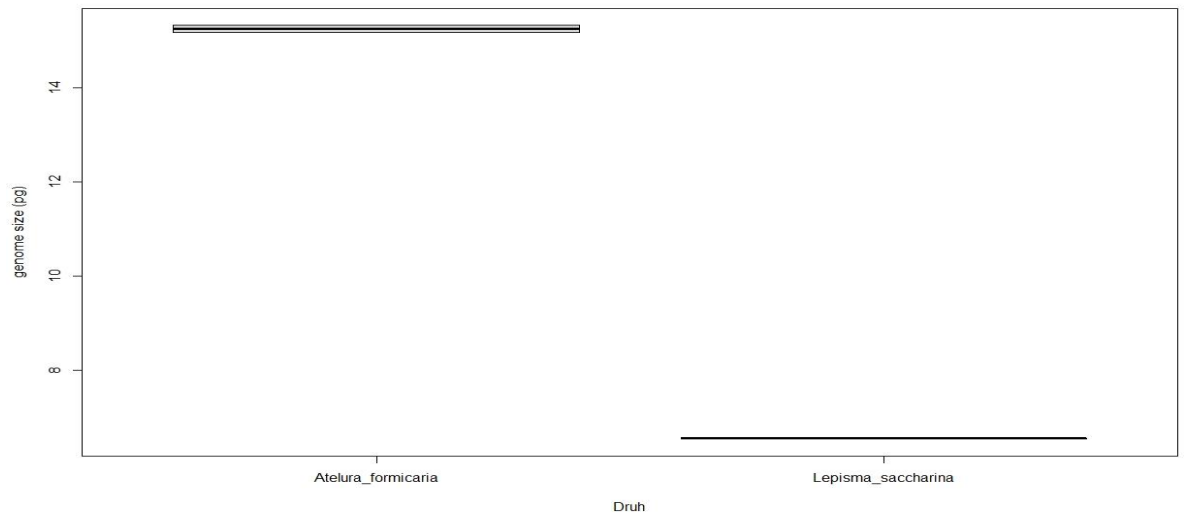
Astigmata



Obrázok 9: Porovnanie relatívnej veľkosti genómu v rámci rádu Astigmata pomocou boxplotov v programe RStudio vo verzii 1.1.463.

Z roztočov (Astigmata) boli namerané hodnoty druhu *Acarus siro* z čeľade Acaridae a *Lepidoglyphus destructor* z čeľade Glycyphagidae. Rozdiel medzi nimi je 0,12 pg.

Zygentoma



Obrázok 10: Porovnanie relatívnej veľkosti genómu v rámci rádu Zygentoma pomocou boxplotov v programe RStudio vo verzii 1.1.463.

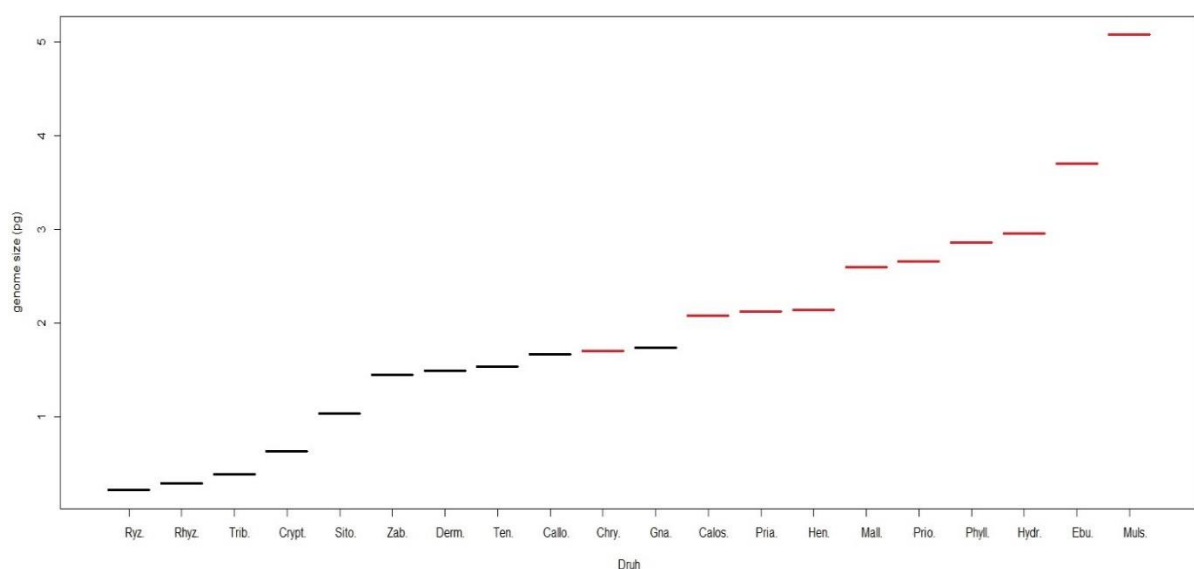
Z rádu Zygentoma sme zmerali druh *Atelura formicaria* z čeľade Nicoletiidae a druh *Lepisma saccharina* z čeľade Lepismatidae. *A. formicaria* nie je primárne škodca ako som spomínala vyššie. Rozdiel medzi týmito druhmi je až 8,71 pg, čo je naozaj výrazný rozdiel.

6.1 Porovnanie škodcov a neškodcov z rádu Coleoptera

Tabuľka 16: Tabuľka znázorňujúca namerané a priemerné hodnoty veľkosti genómu desiatich škodcov a hodnoty desiatich neškodcov stiahnuté z www.genomesize.com v picogramoch (1pg = 978 Mbp). Skratka uvádza názov použitý v boxplote. Veľkosti genómu neškodcov stiahnuté z databázy genomesize.com.

Druh (škodca)	Skratka	2C	Druh (neškodca)	2C	Skratka
<i>Oryzaephilus surinamensis</i>	Oryz.	0,21	<i>Calosoma scrutator</i>	2,08	Calos.
<i>Rhyzopertha dominica</i>	Rhyz.	0,28	<i>Priacma serrata</i>	2,12	Pria.
<i>Tribolium confusum</i>	Trib.	0,38	<i>Henosepilachna pustulosa</i>	2,14	Hen.
<i>Cryptolestes ferugineus</i>	Crypt.	0,63	<i>Mallodon dasystemus</i>	2,60	Mall.
<i>Sitophilus granarium</i>	Sito.	1,03	<i>Prionus imbricornis</i>	2,66	Prio.
<i>Zabrotes sp.</i>	Zab.	1,44	<i>Phyllophaga submucida</i>	2,86	Phyll.
<i>Dermestes ater</i>	Derm.	1,49	<i>Hydrophilus triangularis</i>	2,96	Hydr.
<i>Tenebrio molitor</i>	Ten.	1,53	<i>Eburdia haldemani</i>	3,70	Ebu.
<i>Callosobuchus maculatus</i>	Callo.	1,66	<i>Mulsanteus sp.</i>	5,08	Muls.
<i>Gnathocerus cornutus</i>	Gna.	1,73	<i>Chrysina gloriosa</i>	1,70	Chry.

Namerané hodnoty škodcov sú z vlastných meraní. Hodnoty neškodcov sú prevzaté z databázy genomesize, kde som náhodne vybrala desiatich neškodcov z rádu Coleoptera, ktorých veľkosť genómu bola zmeraná metódou FCM.



Obrázok 11: Obrázok porovnáva relatívne veľkosti genómov desiatich škodcov a desiatich neškodcov z rádu Coleoptera. Veľkosti genómu neškodcov sú rozlíšené červenou farbou. Dáta sú spracované a zobrazené pomocou grafu v programe RStudio vo verzii 1.1.463.

Z grafu môžeme jasne vidieť trend väčšej veľkosti genómu u neškodcov. Jediná veľkosť genómu u neškodcu *Gnathocerus cornutus* 2C= 1,73 pg bola vyššia ako najmenší genóm neškodcu *Chrysina gloriosa* (LeConte 1854) 2C= 1,70 pg. Zároveň, ale pre jasné potvrdenie tejto tendencie by sme potrebovali oveľa väčší rozsah dát. Výsledky by boli taktiež omnoho relevantnejšie, ak by sa porovnali veľkosti genómu medzi konkrétnymi čeľadami. Bohužiaľ v mojom prípade z ôsmich čeľadí sa päť nenachádza v databáze www.genomesize.com. Tri čeľade namerané sú, ale neboli zmerané metódou FCM.

6.2 Rozdiel medzi pohlaviami

Znalosť rozdielu vo veľkosti genómu medzi pohlavím daného jedinca môže byť užitočná práve pri jeho určovaní. Niekedy je veľmi náročné a v niektorých prípadoch i nemožné u živého jedinca určiť pohlavie na základe morfológických znakov napríklad u lariev (Picard a kol. 2012).

Tabuľka 17: Tabuľka 17 zobrazuje porovnanie medzi pohlaviami konkrétnych druhov z rádu Blattodea a Coleoptera uvedené v picogramoch (1 pg= 978Mbp).

Druh	Veľkosť genómu (pg)	Pohlavie	Rád
<i>Cryptolestes pusillus</i>	0,61	Female	Coleoptera
<i>Cryptolestes pusillus</i>	0,40	Male	Coleoptera
<i>Dermestes ater</i>	1,64	Female	Coleoptera
<i>Dermestes ater</i>	1,50	Male	Coleoptera
<i>Gibbium aequinoctiale</i>	1,29	Female	Coleoptera
<i>Gibbium aequinoctiale</i>	1,21	Male	Coleoptera
<i>Gnathocerus cornutus</i>	1,71	Female	Coleoptera
<i>Gnathocerus cornutus</i>	1,78	Male	Coleoptera
<i>Tenebrio molitor</i>	1,65	Male	Coleoptera
<i>Tenebrio molitor</i>	1,58	Female	Coleoptera
<i>Blaptica dubia</i>	8,90	Female	Blattodea
<i>Blaptica dubia</i>	9,64	Male	Blattodea
<i>Blatta orientalis</i>	8,07	Female	Blattodea
<i>Blatta orientalis</i>	7,37	Male	Blattodea
<i>Blattella germanica</i>	4,38	Male	Blattodea
<i>Blattella germanica</i>	4,99	Female	Blattodea
<i>Nauphoeta cinerea</i>	9,91	Male	Blattodea
<i>Nauphoeta cinerea</i>	10,44	Female	Blattodea
<i>Periplaneta australasiae</i>	10,65	Male	Blattodea
<i>Periplaneta australasiae</i>	11,12	Female	Blattodea
<i>Phoetalia pallida</i>	7,02	Male	Blattodea
<i>Phoetalia pallida</i>	7,20	Female	Blattodea
<i>Symploce pallens</i>	8,74	Female	Blattodea
<i>Symploce pallens</i>	7,53	Male	Blattodea

V tabuľke sú zobrazené len druhy s významnejším rozdielom vo veľkosti genómu medzi samičkou a samcom konkrétneho druhu. Najväčšie rozdiely sa vyskytli v ráde Blattodea, kde bol vždy rozdiel okolo 0,50 pg. Výnimkou bol len druh *Periplaneta americana* (Linnaeus 1758), kde bol rozdiel 0,03 pg a *Phoetalia pallida* (Brunner von Wattenwyl 1865) s rozdielom 0,18 pg. U druhu *Periplaneta australasiae*, *Blattella germanica*, *Blatta orientalis* (Linnaeus 1758), *P. pallida*, *Nauphoeta cinerea* (Olivier 1789) a *Symploce pallens* (Stephens 1835) bol genóm samičky väčší ako u samca. Genóm samca bol väčší len v dvoch prípadoch a to u druhu *P. americana* a *Blaptica dubia* (Serville 1839).

V ráde Coleoptera bol najvýraznejší rozdiel vo veľkosti genómu samičky a samca u druhu *Dermestes ater* a to 0,14 pg. Medzi ostatnými druhmi bol rozdiel od 0,1 pg po 0,8 pg.

7. Diskusia

Kontrola poľnohospodárskych škodcov je v entomológii veľkým problémom. V súčasnosti je asi len 28 druhov poľnohospodárskych škodcov, ktorí majú kompletne zanalyzované genómy. Bohužiaľ niektoré z nich majú nízku kvalitu a nízku integritu génov. Tieto problémy môžu byť spôsobené napríklad vysokou heterozygotnosťou väčšiny hmyzích škodcov (Li a kol. 2019).

V súčasnosti sa metóda aktívne využíva pri meraní rastlín, húb a lišajníkov. Je zaujímavé, že napriek tomu, že táto metóda je finančne nenáročná, kvalitná a rýchla, nevyužíva sa aktívne aj v oblasti merania veľkosti genómu živočíchov a taktiež hmyzu.

Najmenší aktuálne známy eukaryotický genóm bol nameraný hube, ktorú zaraďujeme do triedy mikrosporídiá. Vedeckým názvom *Encephalitozoon intestinalis* obsahuje asi 2,25 miliónov párov bázy (0,0023 pg DNA). Tento vnútrobunkový parazit žije v cytoplazme živočíchov a ľudí. Má veľmi redukovanú stavbu a chýbajú mu mitochondrie. Na opačnej strane sa nachádza rastlina *Paris japonica*. Ide o oktoploid, takže každý chromozóm má v 8 kópiách. Pravdepodobne vznikol hybridizáciou a následným zdvojením genómu až štyroch rôznych rodičovských druhov. Dosahuje úctyhodných 152,23 pg, 149 miliárd párov bázy (Pellicer a kol. 2010). Veľmi veľké genómy sú skôr problémom ako prínosom pre rastliny. Prinášajú komplikácie pri bunkovom delení (väčší energetický výdaj). Taktiež s narastajúcou veľkosťou genómu majú rastliny pomalší vývoj a užšie ekologické niky (Suda 2015).

Na meranie hmyzu sa ako štandardy bežne využívajú rastliny. Zatiaľ ide o najdostupnejší a najlacnejší možný štandard. V budúcnosti by ale mohlo byť efektívnejšie a vhodnejšie využitie živočíšneho štandardu. Napríklad bezstavovca, ktorý by sa dal jednoducho a rýchlo zohnať a namnožiť a mohol by byť dostupný v každom laboratóriu ako rastlinné štandardy. Samozrejme taktiež pri živočíšnom štandarde by sa museli merania zopakovať a overiť.

Čo sa týka dostupnosti hmyzieho materiálu je to o poznanie zložitejšie ako u rastlín. Rastliny (tie bežnejšie) môžeme kdekoľvek nájsť a natrhať, nemôže sa stať, že odídu alebo odletia. Pri odchyte hmyzu je problémom ich pohyb a let. Vďaka spolupráci a ochote VÚRV Ruzyně, som sa k materiálu dostala a boli mi poskytnuté vzorky priamo z ich chovu. Z tohto dôvodu som ale naopak mala len obmedzené množstvo materiálu. U malých skladkových chrobákov je ešte veľkým problémom rozlíšenie pohlavia kde je potrebná pomoc odborníka, s čím mi taktiež pomohol VÚRV Ruzyně.

Ako som už spomínala v metodike, na správne pozorovanie jadra bunky je nevyhnutné získať z jedinca končatinu, poprípade tykadlo. Keďže niektoré druhy hmyzu môžu uletieť, vyžadovalo toto spracovanie jemnosť, trpezlivosť a sústredenie. Častokrát to zabralo veľa času a niektoré živé vzorky hmyzu sme museli zamraziť a detekovať ich nasledujúci deň.

U roztočov a malých skladiskových chrobákov nám prácu sťažovala ich veľmi malá veľkosť, dokonca okom nepozorovateľná. To spôsobovalo problém pri spracovaní roztoča do suspenzie, pretože niekedy bolo veľmi náročné dostať ich telo do petriho misky aj s pomocou bino lupy.

V celosvetovej databáze www.genomesize.com nájdeme aktuálne známu veľkosť genómu triedy hmyz, práve u 1344 jedincov, pričom popísaných je približne 1 milión druhov.

Triedu hmyz delíme podľa metamorfózy na tri hlavné skupiny: hmyz s ametabolickou metamorfózou (bez metamorfózy), hmyz s hemimetabolickou metamorfózou (nekompletná metamorfóza) a holometabolickou metamorfózou (úplná metamorfóza). Ametabola je primitívny hmyz bez významného rozdielu medzi nedospelým a dospelým jedincom (Hanrahan a kol. 2011). Radíme sem rád Zygentoma a Archaeognatha. Z ametabolického hmyzu je doposiaľ zmeraný len jeden druh hmyzu a to *Thermobia domestica* (Packard 1837) s $2C= 6,18$ pg (French a kol. 1980). Z nášho výskumu sme určili genóm dvom druhom z rádu Zygentoma to konkrétne *Lepisma saccharina* ($2C= 6,54$ pg) a *Atelura formicaria* ($2C= 15,25$ pg). Ide o pomerne veľké genómy čo môže spôsobovať práve tento pomalý ametabolický vývin. Zároveň druh *Atelura formicaria* neradíme medzi škodcov.

Hemimetabola má tri štádiá života: vajíčko → nymfa (niekoľkokrát sa zvlieka) → dospelý jedinec (imago). Všetci sú plesiomorficky okridlení. Rozdiel medzi nymfou a dospelým jedincom je určený vyvinutými funkčnými krídlami u dospelého jedinca. Bežne známym hmyzom v tejto skupine sú kobylky (Orthoptera), šváby (Blattaria) a podenky (Ephemeroptera). V tejto skupine sa našli najväčšie hmyzie genómy, čo sedí pri našom meraní, kde genómy boli asi 3x väčšie ako u holometabola (Smrž 2015).

Holometabolický hmyz má 4 štádiá vývinu : vajíčko → mladá larva → dospelá larva → kukla → dospelý jedinec (imago). Bežne známy hmyz v tejto skupine zahŕňa chrobáky (Coleoptera), včely a osy (Hymenoptera), dvojkrídly hmyz (Diptera) a motýle (Lepidoptera) (Hůrka a kol. 1981). Holometabola vykazoval podľa Hanrahan a kol. (2011) najmenšie genómy a to vo väčšine prípadov do 2000 Mbp (2,04 pg). Táto korelácia bola taktiež naznačená a naše merania sa v tejto skupine pohybovali od $2C= 0,20$ pg po maximálne $2C= 1,78$ pg u Coleoptera. U Lepidoptera to bolo $2C= 0,58$ pg.

Blattodea

Z rádu Blattodea sú zmerané 9 jedinci s veľkosťou od $2C = 2,32$ pg u *Blatella germanica* po $2C = 10,30$ pg u samičky *P. australasiae*. *Blatella germanica* čiže rus domáci, sa od vývojových štádií švába líši tým, že odkladá ootéku tesne pred liahnutím. V životnom cykle švába odkladá samička ootéku dávno pred liahnutím. Tento rozdiel v životnom cykle by mohol zapríčiniť veľký rozdiel vo veľkosti genómu (Stejskal 1998). *Nauphoeta cinerea* má taktiež pomerne veľký genóm, tá sa vyznačuje falošnou vajcoživorodosťou (Speakman a kol. 2004). V tomto ráde sme namerali ďalšie 3 druhy s oddelenými pohlaviami.

U švábov taktiež rozlišujeme dokonalú premenu a sú veľkostne väčšie. Vývoj jednej generácie môže trvať aj štyri roky a dospelý jedinec žije dva mesiace. Samice tvoria za život až 8 ooték a vývoj nymfy trvá od 5 po 9 mesiacov. Tieto všetky skutočnosti môžu byť príčinou väčšej veľkosti genómu.

Coleoptera

V ráde Coleoptera sa síce nachádza o poznanie viac určených druhov a to konkrétne 278, ale dopĺňujem doposiaľ nezmerané čeľade Bruchidae, Laemopholeidae, Dryophthoridae, Ptinidae a Bostrichidae.

Čo sa týka veľmi malého genómu *Oryzaephilus surinamensis*, ako uvádza Sharaf a kol. (2008) vo svojej štúdii, ide o najmenší známy genóm v ráde Coleoptera. Jeho životný cyklus trvá od troch do desiatich týždňov (Richara, 2003).

Tieto malé veľkosti genómu podľa Sharaf a kol. (2008) môžu byť spojené s malou veľkosťou tela, holometabolickým vývojom, krátkym bunkovým cyklom, krátky generačný cyklus a schopnosť rýchlo kolonizovať nové potravinové zdroje. Je možné, že menší genóm taktiež šetrí energiu.

Výsledky nášho výskumu naznačili koreláciu medzi veľkosťou genómu a veľkosťou tela. Hmyz s výrazne väčšou veľkosťou tela ako napríklad rád Blattodea má výrazne väčší genóm. Rád *Zygentoma* má síce menšiu veľkosť a veľmi veľký genóm, ale to môže byť spôsobené pomalým vývojom, ktorý je ametabolický. Taktiež sa dožívajú pomerne vysokého veku.

U skupiny Coleoptera rozlišujeme dokonalú premenu, čo by mohlo viesť k väčšej veľkosti genómu ako napríklad u skupiny Blattodea.

No na rozdiel od švábov, škodcovia z rádu Coleoptera majú rýchly vývoj a to je pri ideálnej teplote iba 21 dní, priemerne asi 80 dní. Vďaka tomu môžu mať až sedem generácií za rok. Taktiež ide o veľmi drobné chrobáky.

Psocoptera

V celej databáze sa vôbec nenachádza celý rád Psocoptera, kde doplňujem veľkosti genómov 7 jedincov. Išlo o malé genómy vzhľadom k malej veľkosti jedinca. Hodnoty sa pohybujú od $2C = 0,25$ pg po $2C = 0,62$ pg.

V ráde Psocoptera máme drobný hmyz (0,6 – 2 mm) s kusacím ústnym ústrojenstvom a veľkou pohyblivou hlavou. Krídla sa skladajú strechovito. V ČR žije asi 100 druhov. V skladoch nájdeme bezkrídle formy ako napríklad pisivka sieťovaná (*Lepinotus reticulatus*). Majú nedokonalú premenu. Niektoré druhy tkajú nad znášku sieťku, iné ju prikryjú tvrdnúcim sekretom zmiešaným s detritom. Zvliekajú sa približne 5–6krát. Do roka majú jednu generáciu. Preferujú tmavé, vlhké a kľudné prostredie bez prúdenia vzduchu, s optimálnou teplotou 20 – 25 °C a s vlhkosťou vzduchu nad 75%. Psocoptera majú síce len jednu generáciu za rok, no majú nedokonalú premenu (Opit a kol. 2008). Z našich výsledkov by práve typ premeny mohol ovplyvňovať veľkosť genómu.

Astigmata

Roztoče majú nepriamy vývoj. Z vajíčka sa vyliadne larva. Tá ma tri páry nôh a dýcha celým povrchom tela. Vzdušnice a štvrtý pár nôh sa objavuje po prvom zvliekaní. Ide už o nymfu. Pri ďalších dvoch zvliekaniach ide o – *protonymfa*, *deutonymfa* a *tritonymfa*. Pohlavný otvor, sa vytvára u dospelého jedinca po zvlčení posledného stupňa nymfy. U niektorých druhov sa vyskytuje partenogézia alebo ovoviviparia (Hubert a kol. 2012). Ako som spomínala v rešerši u škodcu *Acarus siro* vývoj trvá 15 dní (27 °C) až 8 mesiacov (3 °C). Pohybujú sa pomaly a žijú približne 6 týždňov. Môže mať až 7 generácií za rok. Vhodné podmienky pro jeho vývoj je relatívna vzdušná vlhkosť 65-100% a nevyvíja sa pri vlhkosti substrátu do 12,8 % (Sedláčková a kol. 2010). Na rozdiel od skupiny Blattodea a Coleoptera rozlišujeme u Astigmata dokonalú premenu. Taktiež ich vývoj (pri ideálnych podmienkach) trvá len niekoľko dní a preto majú do roka viac generácií, čo by mohlo ovplyvniť ich malú veľkosť genómu.

V budúcnosti pri väčšom množstve nameraných hodnôt bude oveľa efektívnejšie a jednoduchšie stanovenie vzťahu genómu s napríklad ekologickými či morfológickými znakmi hmyzu či škodcov. Momentálne je popísané len veľmi malé množstvo C-hodnôt hmyzu. Vzhľadom k tomu, že trieda hmyz je najpočetnejšia zo všetkých, poskytuje veľký priestor a potenciál na ďalší výskum.

Táto práca bola cielená na osvojenie metodiky a práce v laboratóriu. Celý názov práce je uvedený ako determinácia ekonomicky významných skupín hmyzu, no tento názov je trochu nadnesený a moja bakalárska práca tomuto v tejto chvíli neodpovedá. Z výsledkov práce nemôžeme uvažovať o konkrétnej determinácii sporných druhov z dôvodu malého počtu nameraných jedincov. To ale necháva priestor na prípadné rozšírenie a doplnenie v diplomovej práci.

Taktiež by som rada v diplomovej práci skúsila odchyť druhov, ktorý nie sú škodcami a sú z čeľadí príbuzných k už nameraným škodcom. Porovnanie veľkosti genómu týchto druhov by nám mohlo ukázať zaujímavý výsledok.

8. Záver

Bakalárska práca zahrňuje údaje o variabilite veľkosti genómu ekonomicky významných druhov hmyzu a roztočov zistených pomocou prietokovej cytometrie, ktorá poskytuje rozsiahle informácie o bunkách a jadrovej DNA.

Cieľom práce bolo priblížiť metódu prietokovej cytometrie a jej možné využitie v rámci štúdia ekológie ekonomicky významných škodcov. V práci popisujem princíp prietokovej cytometrie, jej prínos a využitie v oblasti entomológie. Mám za to, že ciele práce boli naplnené.

Celkovo bolo pomocou tejto metódy v práci popísaných 65 druhov zo 7 rádov. Hodnoty boli rôzne a pohybovali sa od najmenšieho genómu $2C= 0,20$ pg u *Oryzaephilus surinamensis* z rádu Coleoptera až po najväčší genóm $2C= 11,12$ pg u samičky *Periplaneta australasiae* z rádu Blattodea.

V práci som sa zamerala na typ vývoja hmyzu a to ametabolický, hemimetabolický a holometabolický. Z doposiaľ známych štúdií vyplýva trend a to, že hmyz s hemimetabolickým vývojom vykazuje väčšiu veľkosť genómu ako holometabolický, čo sa mi v bakalárskej práci potvrdilo. U hmyzu s holometabolickým vývojom bol najväčší genóm $2C= 1,78$ pg v ráde Coleoptera. Hemimetabolický hmyz mal hodnoty od $2C= 2,32$ pg po $2C= 10,30$ pg, čiže výrazne väčší genóm. Jedinou výnimkou je rád Psocoptera s hemimetabolickým vývojom a hodnotami od $2C= 0,26$ pg po $2C= 0,62$ pg. To ale môže súvisieť s veľmi malou veľkosťou tela.

V rámci svojej diplomovej práce by som sa rada venovala rozšíreniu databáze nameraných veľkostí genómu hmyzu a výskumu ich ekologických vzťahov hlavne medzi skladištnými škodcami. Taktiež by som naďalej rada pokračovala v spolupráci s VÚRV, v.v.i. Ruzyně.

9. Literatúra

1. Adan A., Alizada G., Kiraz Y., Baran Y. & Nalbant A. (2007): Flow cytometry: basic principles and applications, *Crit. Rev. Biotechnol.* vol. 37(2): 163–176.
2. Aulicky R., Stejskal V. & Frydova, B. (2019): Field validation of phosphine efficacy on the first recorded resistant strains of *Sitophilus granarius* and *Tribolium castaneum* from the Czech Republic. *Journal of stored products research*, 81, 107-113.
3. Bennett M. D., Leitch I. J., Price H. J. & Johnston J. S. (2003): Comparisons with *Caenorhabditis* (approximately 100 Mb) and *Drosophila* (approximately 175 Mb) using flow cytometry show genome size in *Arabidopsis* to be approximately 157 Mb and thus approximately 25% larger than the *Arabidopsis* genome initiative estimate of approximately 125 Mb. *Annals of Botany*. 91: 547–557.
4. Brozek J. (2013): A comparison of external and internal maxilla and mandible morphology of water bugs (Hemiptera: Heteroptera: Nepomorpha). *Zootaxa*. 3635(4), 340– 378.
5. Buss L.B., Fasulo T.R. (2006): *Stored Product Pests*. University of Florida/IFAS.
6. Doležel J., Bartoš J., Voglmayr H., Greilhuber J. (2003) : Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry Part A*. 51 (2): 127-128.
7. Doležel J., Greilhuber J., Suda J. (2007): Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols*. 2: 2233–2244
8. Eckschlager T., Vybíralová H., Bartůňková J. (1999) : *Průtoková cytometrie v klinické praxi*. Grada Publishing, Praha.
9. French C.K. & Manning J.E. (1980): DNA sequence organization in the Thysanura *Thermobia domestica*. *Journal of Molecular Evolution*. 15:277– 289.
10. Goodchild, A. J. P. (1966) : Evolution of the alimentary canal in the Hemiptera. *Biological reviews*. 41(1), 97–140.
11. Gregory T. R. (2005): The C-value enigma in plants and animals: a review of parallels and an appeal for partnership. *Annals of Botany*. 95: 133–146.
12. Hanrahan S. J., Johnston J. S. (2011): New genome size estimates of 134 species of arthropods. *Chromosome Research*. 19(6):809-23
13. Hare E., Johnston J. (2011). Genome Size Determination Using Flow Cytometry of Propidium Iodide-Stained Nuclei. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 772. 3-12.
14. Hawley, T. S. & Hawley, R.G. (2004): *Flow cytometry protocols 2nd ed.*, Humana press. New Jersey.

15. Hoell H.V., Doyen J.T., Purcell A.H. (1998): *Introduction to Insect Biology and Diversity*. 2nd ed. Oxford University Press. p. 343.
16. Hoffman R. A. (2001): Standardization, Calibration, and Control in Flow Cytometry. *Current Protocols in Cytometry*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley.
17. Hold B., Olson A. and Madsen M. (1988): *Typhaea stercorea* (Coleoptera: Mycetophagidae), a Carrier of *Salmonella enterica* serovar Infantis in a Danish Broiler House. *Journal of Economic Entomology*. 91: 660-664.
18. Horáková J., Pikula J., Bnaďouchová H. (2008): Škůdci ve skladech a boj proti nim. Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí. Dostupné z : <https://www.zemedelec.cz/skudci-ve-skladech-a-boj-proti-nim/>
19. Hoy Marjorie A. (2019): Genome Evolution and Genetic Control of Embryonic Development in Insects. *Insect Molecular Genetics (Fourth Edition)*. Academic Press. 103-175
20. Hubert J., Stejskal V., Athanassiou C. G., Throne J. E. (2018): Health hazards associated with arthropod infestation of stored products. *Annual review of entomology*, 63, 553-573.
21. Hubert J., Nesvorná M., Stará J. (2012): Využití mikrobiálních pesticidů proti skladištním roztočům. *Úroda*, 60(12): 68 – 70
22. Hůrka K., Čepická A. (1981): Rozmnožování a vývoj hmyzu. SNP, Brno.
23. Jarošík V. (2005): Růst a regulace populací. Vyd. 1. Praha: Academia, 170
24. Koutecký P. (2012): Průtoková cytometrie v botanice. Laboratoř molekulární biologie rostlin. Přírodovědecká fakulta JU. Dostupné z: http://botanika.bf.jcu.cz/laboratory/doc/FCM3_LaboratorniProtokoly.pdf
25. Laštůvka Z., Gaisler J., Šťastná P., Pelikán J. (2001) : *Zoologie pro zemědělce a lesníky*. Konvoj, Brno. 267
26. Li F., Zhao X., Li M., He K., Huang C., Zhou Y., Li Z., Walters J.R. (2019): Insect genomes: progress and challenges. *Insect Molecular Biology*. 28(6), 739–758
27. Li T., Jimeng H., April M. W., Ying C., Qiang X., Wenjun B. a Hillis D. M. (2014) : Long-branch attraction and the phylogeny of true water bugs (Hemiptera: Nepomorpha) as estimated from mitochondrial genomes. *BMC Evolutionary Biology*. 14(99), 12.
28. Liu L. J., Pang A. H., Feng S. Q., Cui B. Y., Zhao Z. H., Kučerov, Z. and Li F. J. (2017): Molecular Identification of ten species of stored-product psocids through microarray method based on ITS2 rDNA. *Scientific reports*, 7(1), 1-9.
29. Marinov I. (2008) : *Průtoková cytometrie v klinické hematologii*. TRITON, Praha.
30. Martin J., Webb M. (2008): Hemiptera: Its a bug's life. *Natural History Museum*.

31. McHugh Joseph V., Liebherr J. K. (2009): *Coleoptera: (Beetles, Weevils, Fireflies)*. Encyclopedia of Insects (Second Edition), Academic Press. Pages 183-201.
32. Merriam-Webster. (n.d.) (2020):Pest. In *Merriam-Webster.com dictionary*. Retrieved February 11, 2020, from <https://www.merriam-webster.com/dictionary/pest>
33. Meyer J. R. (2020): Blattodea. *NC State University*. Dostupné z: <https://projects.ncsu.edu/cals/course/ent425/library/compendium/blattodea.html#history>
34. Montiel E., Inmaculada Manrique-Poyato M., Rocha-Sanchez S. M., Dolores Lopez-Leon M., Cabrero J., Perfectti F. (2012): Nucleolus size varies with sex, ploidy and gene dosage in insects. *Physiol. Entomol.* 37, 145–152.
35. Mortimer, F. C. (2000): Flow Cytometric Monitoring of Antibiotic-Induced Injury in *Escherichia coli* Using Cell-Impermeant Fluorescent Probes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington: American Society for Microbiology* . 44, 676-681
36. Ochatt S. J., Delaitre C., Lionneton E., Huchette O., Patat-Ochatt E. M., Kahane R. (2005): One team, PCMV, and one approach, in vitro biotechnology, for one aim, the breeding of quality plants with a wide array of species. In: *Crops Growth, Quality and Biotechnology*. WFL Publisher Sci & Technology. Helsinki, Finland.
37. Opit G.P., Throne J. E. (2008): Population growth and development of the psocid *Lepinotus reticulatus* at constant temperatures and relative humidities. *Journal of Economic Entomology*. 101: 605-615.
38. Otto F. (1990): DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. *Methods in Cell Biology. Vol. 33. Academic Press, New York*. 105-110
39. Pellicer J., Fay F. M., Leitch J. I. (2010): The largest eukaryotic genome of them all. *Botanical Journal of the Linnean Society*.164, 1, 10–15.
40. Perveen F. K., Khan A. (2017): Introductory Chapter: Lepidoptera. *IntechOpen*.
41. Picard C. J., Johnston J.S., Tarone M. (2012): Genome Sizes of Forensically Relevant Diptera. *J. Med. Entomol.* 49, 192–197.
42. Pospichalova V., Svoboda J., Dave Z., Kotrbova A., Kaiser K., Klemova D., Ilkovic L., Hampl A., Crha I., Jandakova E., Minar L., Weinberger V., Bryja V. (2015): Simplified protocol for flow cytometry analysis of fluorescently labeled exosomes and microvesicles using dedicated flow cytometer. *Journal of Extracellular Vesicles*.: 4:25530.
43. Protic (2011): *Heteroptera*. DMD, Bělehrad.
44. Richara T.A., (2003): Humidity response of adult male *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Cucujidae) with special reference to the effect of carbon dioxide. *Environmental Entomology*. 32, 264–269

45. Robinson J. P. (2004): *Flow cytometry*. Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering. Purdue University.
46. Řepková J. (2013): Struktura rostlinného genómu. Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita. Dostupné z :
<https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js13/genetika/web/pages/01-struktura-rostlinneho-genomu.html>
47. Sedláčková J., Hrudová E. (2010): Nejdůležitější skladištní škůdci. Dostupné z :
<https://www.zemedelec.cz/nejdulezitejsi-skladistni-skudci/>.
48. Shapiro H. M. (2003): *Practical flow cytometry* 4th ed. John Wiley and sons.
49. Sharaf K., Bureš P., Horová L., Pavlíček T., Nevo E. (2008): Distribution of abundance and genome size variability in the grain beetle *Oryzaephilus surinamensis* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Silvanidae). *Zoology in the Middle East* 45, 79–89.
50. Schmidt-Ott U., Rafiqi A.M., Sander K., Johnston J.S. (2009): Extremely small genomes in two unrelated dipteran insects with shared early developmental traits. *Development Genes and Evolution*. 219: 207–210.
51. SMRŽ, J. (2013): *Základy biologie, ekologie a systému bezobratlých živočichů*. Karolinum, Praha.194
52. Stejskal V. (1998): *Ochrana před potravinovými a hygienickými škůdci*. 1. vyd. Vyšehrad, Praha.
53. Stejskal V. (2007): *Detekce kontaminace skladovaných obilovin a cereálních produktů škůdci pomocí fyzikálně-chemických technik*. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Praha, Ruzyně.
54. Suda J. (2015): *Rekordman vo velikosti genomu*. Nakladatelství Academia, SSČ AV ČR, v. v. i.
55. Suda J., Trávníček J. (2006): Estimation of relative nuclear DNA content in dehydrated plant tissues by flow cytometry – Current Protocols in Cytometry. *John Wiley & Sons*.
56. Šefrová H. (2004): Changes of Coleopteran pests in agricultural, horticultural and ornamental plants during the 20th century. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. 4: 35-46.
57. Šinkorová Z., Zárybnická L. (2008): Průtoková cytometrie jako analytická a selekční metoda I. část. *Vojenské zdravotnické listy*. 3: 98 – 103.
58. Tancik J., (2013): Ochrana poľných plodín proti roztočom. *Slovenská poľnohospodárska univerzita*. Nitra. Dostupné z :
<http://old.agroporadenstvo.sk/ochrana/roztoce.htm>
59. Tiersch T.R., Chandler R.W., Wachtel S.S., Elias S. (1989): Reference standards for flow cytometry and application in comparative studies of nuclear DNA content. *Cytometry* . 10:706-710

60. Trávniček P. (2006): Flow cytometry: FCM in plant biosystematics. *Institute of Botany AS CR*. Dostupné z: <http://www.ibot.cas.cz/fcm/>
61. Turnock W. (2015): Insect Pests. *The Canadian Encyclopedia*. Dostupné z: <https://www.thecanadianencyclopedia.ca/en/article/insect-pests>
62. Vives-Rego J., Lebaron P., Nebe-Von Caron G. (2000): Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*. 2000, 24, 4: 429-448.
63. Walter D.E., Proctor H.C. (2013): *Mites: Ecology, Evolution and Behaviour. Life at a Microscale*. 2nd Edition. Springer.
64. Yanpaisan W. (1999): Flow cytometry of plant cells with applications in largescale bioprocessing. *Biotechnology Advances* . 17, 3-27.
65. Zicháčková I. (2013): Možnosti využití průtokové cytometrie ke stanovení antimikrobiálních účinků. Bakalárska práca. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická.
66. Zdroj: <http://www.ibot.cas.cz/fcm/>,
67. Zdroj obrazka cytometer: <https://theses.cz/id/4oa8ex/00158526-652159395.pdf>

Citované databáze

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

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

Zoznam skratiek

SSC – side scatter detector

FFC – forward scatter detector

FCM – flow cytometry method

10. Prílohy



Príloha 1: Príprava suspenzie jadier na meranie prietokovým cytomerom. Foto: Viktória Kovalová



Príloha 2: Nástroje a príprava suspenzie jadier. Foto: Viktória Kovaľová



Príloha 3: Štandardy a hmyzí materiál. Foto: Viktória Kovaľová



Príloha 4: Prietokový cytometer. Foto: Viktória Kovaľová