

Štěnice „na paprice“ aneb Jak se vaří obsah jaderné DNA

Vezmeme jednu středně velkou štěnici domácí (*Cimex lectularius*, obr. 1) a oddělíme část (nejlépe hlavu, ale může být i kousek hrudi nebo zadečku), přidáme přibližně desetinásobné množství listu „papričky“ lilku višňového (*Solanum pseudocapsicum*, obr. 3) a rozsekáme žiletkou nejmenno v kapce roztoku kyseliny citronové a Tweenu (detergentu). Vzniklou směs přefiltrujeme přes nylonovou sítku s oky o rozměru 42 μm a suspenzi uvolněných buněčných jader nakonec obarvíme roztokem fluorescenčního barviva propidium jodidu. Po několikaminutové inkubaci při pokojové teplotě můžeme tuto směs servírovat průtokovému cytometru. Takhle nějak by mohl být uveden protokol přípravy vzorku na měření obsahu jaderné DNA. Že je to až příliš snadné? Úžasné věci nemusejí být složité, ačkoli tomu tak obvykle opravdu bývá.

Je s podivem, že v dnešní „době sekvenční“ se tak málo ví o velikosti jaderného genomu některých skupin organismů. Třeba z celkového počtu kolem milionu známých druhů hmyzu byl obsah jaderné DNA zjištěn přibližně u 1 100 druhů. Většinu těchto údajů máme úhledně srovnánu v internetové databázi Animal Genome Size Database (Gregory 2019). Přítom množství DNA v jádře představuje jeden ze znaků determinujících druh a v některých případech může významně pomoci při rozlišení kryptických druhů, nebo naznačuje, jakou evoluční cestou se daný taxon vydal. Velikost genomu je nicméně důležitá i pro vlastní sekvenční projekty a pokročilé molekulárně-fylogenetické studie.

Naproti tomu rostliny jsou z hlediska velikosti genomu prozkoumány mnohem intenzivněji než hmyz, hlavně kvůli tomu, že botanici často řeší otázky interakcí populací určitého druhu s rozdílným počtem sad chromozomů (ploidií) a jejich kříženců. Analýzou obsahu DNA se elegantním způsobem dá jednoduše a efektivně na spoustu těchto otázek odpovědět.

Kdo má velký a kdo malý genom?

Z dosud publikovaných velikostí genomu hmyzu vyplývá jeden zajímavý trend, který souvisí s typem metamorfózy. Hmyz s proměnou dokonalou (holometabolní) vykazuje obecně nižší hodnoty obsahu DNA v jádrech s maximálními hodnotami pro diploidní buňku (tzv. 2C) něco přes 4 pg (1 pikogram odpovídá zhruba 978 milionům párů bází). Hmyz s proměnou nedokonalou (hemimetabolní) se naopak „nebojí“ ani vysokých hodnot a obsahy DNA sahají od 0,22 pg u vši hlavové (*Pediculus capitis*) do 33,86 pg u saraně modronohé (*Podisma pedestris*). Uvedený rozdíl je vysvětlován tím, že při vývoji během stadia kukly, kdy musí být celá holometabolní larva přeměněna na dospělé, dochází k velkému množství buněčných dělení. To je usnadněno v případě menšího objemu DNA, která se musí při tomto náročném procesu zkopírovat. Hmyz bez stadia kukly roste kontinuálně, buněčná dělení mohou probíhat pozvolna a organismus zvládne proto replikovat i velké objemy DNA.

Podobný trend rozdílného obsahu DNA pozorujeme i u rostlin, kde jednoleté dru-

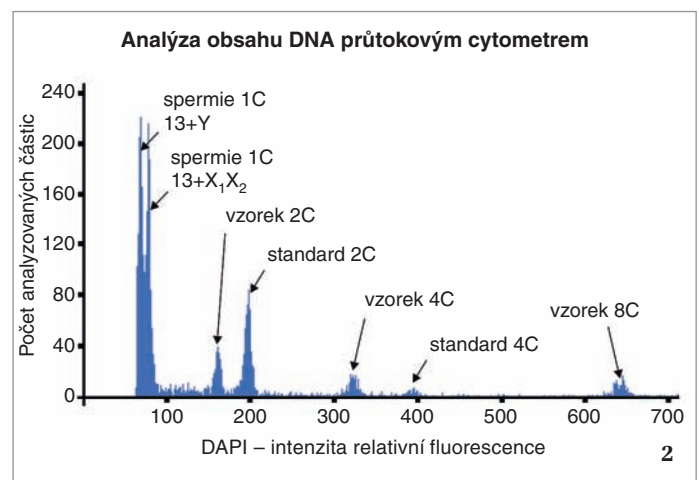
hy mají výrazně menší velikost genomu než rostliny vytrvalé. Obecně lze tedy říci, že organismy s kratším životním cyklem, resp. s menšími buňkami a rychlejšími cykly buněčného dělení mají menší genom než dlouhověké organismy. Uvedené podmínky ovlivňující zmenšení velikosti genomu se uplatňují i u parazitických druhů hmyzu. Obecně mají paraziti nižší obsah DNA než jejich neparazitických příbuzných. Zmíněná veš má v současné době nejnižší známou velikost genomu mezi hemimetabolním hmyzem. Miniaturizované genomy mají i holometabolní úzce specializovaní paraziti hmyzu z řádu řasnokřídli (Strepsiptera), jejichž obsah DNA se pohybuje okolo 0,24 pg. Hezkým příkladem je srovnání dvou blízkých příbuzných taxonů holometabolního hmyzu, kde na jedné straně stojí obligátní parazit blecha kočičí (*Ctenocephalides felis*), která má se svými 0,92 pg výrazně menší obsah DNA než její volně žijící příbuzná srpice *Panorpa nuptialis* se 4,36 pg.

A jak jsou na tom s genomem ploštitice?

V našem výzkumu jsme se zaměřili na řád polokřídli (Hemiptera), jmenovitě na ploštitice (Heteroptera). Polokřídli jsou zajímaví zejména velkými rozdíly velikosti genomu napříč studovanými skupinami. Malé genomy jsou charakteristické např. pro mšice (Aphididae; 0,36–3,54 pg) a největší byly nalezeny u cikád (Cicadidae; 10,72–14,32 pg). Je s podivem, že u ploštic jakožto jedné z nejrozmanitějších skupin hmyzu čítající přes 42 300 druhů (Henry 2017) známe obsah DNA jen u 40 z nich. Ba co víc, z těch změřených jde o 25 jihoamerických zástupců z jediné čeledi zákeřnic (Reduviidae; 0,52–5,80 pg), které jsou obecně intenzivně studovány kvůli přenosu nechvalně známé Chagasovy choroby na člověka. Za pozornost by možná stála ještě data 6 druhů jihoamerických mohutnatek rodu *Belostoma* (Belostomatidae; 1,06–3,86 pg), ale zbylých 9 druhů představuje náhodně vybrané zástupce, kteří nějaký komplexnější trend vývoje velikosti genomu v rámci ploštic bohužel odhalit nepomohou.

Štěnice a „paprika“ – jak jim to jde dohromady?

Studiem chromozomů štěnice domácí se v naší laboratoři zabýváme již delší dobu a podařilo se nám v populacích tohoto ekto-parazita zaznamenat na 12 variant lišících se počtem pohlavních chromozomů X,



1 Samice (vlevo) a samec (vpravo) štěnice domácí (*Cimex lectularius*). Samice má obecně širší tělo s oblym koncem zadečku, zatímco štíhlejší samec má spodní okraj zadečku asymetrický (zleva „vykouslý“) – v tomto místě vybíhá mečovitá paramera, která slouží jako penis při traumatické inseminaci (blíže Živa 2008, 6: 274–276). Foto D. Sadílek

2 Primární výstup analýzy obsahu DNA průtokovým cytometrem ve formě histogramu. Výzkumník potřebuje jen přesně vědět, který vrchol reprezentuje použitý standard, v tomto případě „papričku“ lilek višňový (*Solanum pseudocapsicum*). Základní vrchol standardu je označen standard 2C, vše ostatní se pak už dá odvodit. Vrchol reprezentující diploidní buňky štěnice domácí je vzorek 2C, o polovinu nižší hodnotu 1C vykazují oba typy haploidních spermií. Vrcholy označené 4C zahrnují buňky v tzv. G2 fázi buněčného cyklu, kdy se duplikovala DNA a buňka se připravuje na dělení. Dalším zdvojením chromozomových sad vznikají 8C buňky, které jsou endopolyploidní a vyskytují se především v tkáních, jako jsou různé žlázy. Tyto buňky nesou zmnožený počet chromozomových sad, v tomto případě 8 místo obvyklých dvou u diploidních buněk. Upraveno podle: D. Sadílek a kol. (2019)

3 Původní domovinou lilku višňového je Brazílie, u nás se běžně pěstuje jako okrasná rostlina. Jeho výrazně zbarvené plody jsou stejně jako u některých dalších lilkovitých (*Solanaceae*) jedovaté. Převzato z Wikimedia Commons, v souladu s podmínkami použití

jejichž počet se pohybuje od 2 do 20 (pro samce $2n = 26 + X_1X_2Y$ až $26 + X_{20}Y$; viz také Živa 2016, 2: 77–80). Chováním v průběhu jaderného dělení nadbytečné chromozomy odpovídají právě pohlavním chromozomům a již od poloviny 20. století byly považovány za fragmenty vzniklé rozpadem pohlavních chromozomů X. Fragmenty mohou bez problémů v jádře přetrvávat díky holokinetickému charakteru chromozomů ploštic, štěnice nevyjímaje. U holokinetických chromozomů má totiž většina povrchu vlastnosti centromery a je schopna vázat mikrotubuly v průběhu jaderného dělení. Ztráta centromery, nerozlučně spojená s fragmentací monocentrického chromozomu, je tím pádem v jaderném dělení nijak výrazně neomezuje a chromozomové fragmenty se bez problémů rozdělí. Nicméně jasnější důkaz o původu nadbytečných chromozomů chyběl, tedy až donedávna.

Pro vyřešení původu nadbytečných chromozomů jsme zvolili právě měření velikosti genomu. Nejprve bylo nutné vybrat vhodný standard, vztíci kterému se bude obsah DNA štěnic vztahovat. A protože celé měření probíhalo na katedře botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy, byla po několika pokusech s octomilkou obecnou (*Drosophila melanogaster*), ruměnicí pospolnou (*Pyrrhocoris apterus*), drápatkou vodní (*Xenopus laevis*) a lidskou krví (vlastní) zvolena jako standard paprička, přesněji lilek višňový. Na daném praco-



višti se běžně používá, má podobnou velikost genomu (2,61 pg) jako štěnice (což byl asi nejzásadnější důvod jejího výběru) a je modulární, z jednoho jedince můžeme postupně odebírat listy a změřit tak všechny pokusné štěnice proti jednomu stabilnímu jedinci standardu. Testované živočišné standardy měly neoptimální velikosti genomu, octomilka moc malý (0,36 pg) a ruměnice zase moc stejný (2,44 pg), často by se vrcholy histogramů spojovaly. Obratlovčí standardy měly zase příliš velký obsah DNA (7 pg) a manipulace s jejich biologickým materiálem je i z legislativních důvodů výrazně komplikovanější. Kromě vhodného standardu bylo nutno získat také nemálo (200) štěnic.

„Štěničičí kejkle“ s obsahem DNA

Recept přípravy směsi jader pro měření obsahu DNA popsáný v úvodu se může zdát nadnesený, ale jinak zcela dokonale sedí (podrobněji v naší publikaci – Sadílek a kol. 2019). Výstupem analýzy našeho vzorku průtokovým cytometrem je histogram složený z údajů o několika tisících změřených jader (obr. 2), kdy laserový paprsek cytometru zjistí velikost genomu každého jádra podle absorbance navázaného barviva na DNA. Je důležité správně identifikovat jednotlivé vrcholy histogramu, což může být někdy velmi komplikované, a v případě, že se vzorek se standardem v obsahu DNA (téměř) shodují, se vrcholy spojují. Pak je nutné volit sekundární standard s vyšším nebo nižším obsahem DNA a analýzu zopakovat. V našem případě se některé vzorky štěnice musely poměřovat proti sekundárnímu standardu sedmikrásky chudobky (*Bellis perennis*) s vyšším obsahem DNA (3,38 pg).

Vzhled histogramu se může lišit i podle typu analyzované tkáně. Některé části těla mohou obsahovat i polyploidní buňky (nesou tři a více sad chromozomů oproti standardním dvěma). Takové buňky mají často nějakou sekreční funkci a u hmyzu se mohou vyskytovat třeba v létacích svalech nebo ve střevě. Velmi zajímavé, a dokonce i zcela zásadní, bylo měření velikosti genomu u buněk z vývodů varlat, ve kterých byly uloženy vyprodukované spermiie. Bylo s podivem, že vzorek spermií obarvených propidium jodidem netvořil v grafu žádný vrchol. Barvivo se pravděpodobně do jádra vůbec nedostalo, nebo kompaktní způsob sbalení DNA v hlavič-

kách spermií vmezeření (interkalaci) barviva neumožňuje. V této souvislosti je zajímavé, že s použitím barviva DAPI, které se přednostně váže jen na určitou složku DNA, a to báze adenin-thymin, byly spermiie normálně barvitelné (menší molekula DAPI velmi dobře prochází buněčnou membránou a nevmezeřuje se do DNA) a v histogramu vystupovaly jako jasné dvojvrcholy (viz obr. 2). Jeden z nich odpovídal spermiím s chromozomy X ($13 + X_1X_2$), druhý s chromozomem Y ($13 + Y$), histogram tak zachycoval delikátní rozdíly v obsahu DNA mezi jednotlivými typy spermií. Právě tento výsledek nás přivedl na pravděpodobnou stopu původu chromozomových přestaveb tvořících nadpočetné chromozomy u naší štěnice domácí.

Relativní obsahy DNA (jak se data získána pomocí barvení DAPI odborně nazývají) spermií s Y byly u všech měřených jedinců téměř identické, ale relativní obsahy DNA spermií nesoucích chromozomy X se zvyšovaly spolu se zvyšujícím se počtem nadpočetných chromozomů (obr. 4). Z toho vyplývá, že nadpočetné chromozomy jsou opravdu pohlavní chromozomy X (nebo alespoň segregují vždy do spermiie nesoucí X) a nevznikají pouhou fragmentací.

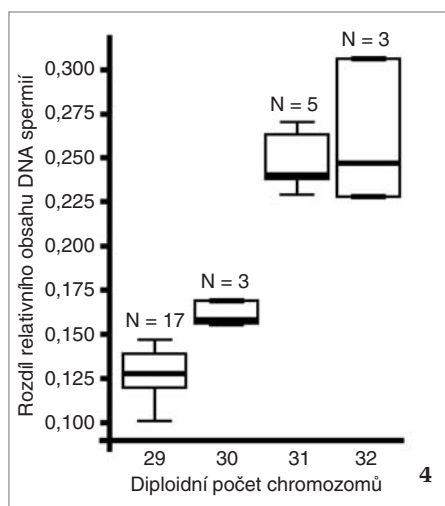
Pokud by nadbytečné chromozomy vznikaly jen čistě fragmentací, měly by karyotypy s nadbytečnými chromozomy ukazovat stejný obsah DNA jako ty se základním počtem – tento stav u štěnic rozhodně znamená nebyl. Místo toho jsme u jedinců se základním počtem pozorovali jakési kontinuum obsahů DNA s několika zcela extrémními jedinci. Průměrný obsah DNA pro samce se základním počtem 29 chromozomů byl 1,94 pg, ale vyskytli se i jedinci s obsahem pouhých 1,7 pg, nebo naopak neskutečných 2,65 pg. Takové rozpětí ukazuje na vysokou četnost chromozomových přestaveb, takže se jich na pozorovaném vnitrodruhovém „gulášiči“ obsahů DNA patrně podílí hned několik. Jedinci s více chromozomy a průměrným obsahem DNA prodělali pravděpodobně jen fragmentací chromozomů X, ale u ostatních již muselo dojít k delecím (ztrátám části chromozomu), či naopak rozsáhlým přestavbám typu duplikace, která navyšuje obsah DNA. Celý mechanismus by mohl být následující: jedinec postupně hromadí tandemové duplikace (zmnožení úseku DNA, kopie následují bezprostředně za sebou) v určité oblasti chromozomu X, tím se toto místo stává náchylnějším k fragmentaci a v určitém okamžiku v něm dojde ke zlomu.

Variabilita, kam se podíváš

Z našich výsledků tedy vyplývá, že štěnice domácí vykazuje velkou variabilitu nejen v počtu chromozomů, ale i v obsahu DNA, a navíc dokáže obě tyto variability kombinovat. Nicméně variabilita obsahu DNA může být mezi organismy rozšířenější, než by se mohlo na první pohled zdát. Někdy je zapříčiněna jen použitím odlišných měřicích přístrojů, standardů nebo metodických postupů, ale někdy k nim dochází zcela přirozeně. Možné příčiny mohou být různé. Nadpočetné „parazitické“ B chromozomy zvyšují obsah DNA svých nositelů, a to nejčastěji bez jakéhokoliv benefitu. Tak např. kukuřice setá

(*Zea mays*) vykazuje v důsledku přítomnosti B chromozomů vnitrodruhovou variabilitu s rozdílem až 40 % obsahu DNA. Variabilitu zapříčiňuje i zmnožení balastní DNA, která je vysoce repetitivní, nekóduje žádný gen a může se manifestovat jako expanze heterochromatinu (inaktivní, vysoce kondenzované a tedy tmavě barvitelné úseky chromozomů), jako např. u několika již zmíněných jihoamerických zákeřnic. I stabilita obsahu DNA člověka (přibližně 7 pg) bývá někdy zpochybňována, a jeho zcela přesná velikost je stále předmětem diskuzí (Doležel a Geilhuber 2010, Suda a Leitch 2010).

Použití rostlinného standardu při zjišťování obsahu DNA živočichů se zdá být na první pohled dost kontroverzní. Ale při bližším pohledu do cytometrické literatury se najde nejedna práce, kde tento postup není považován za nikterak výjimečný. Některé užívané rostlinné standardy byly kalibrovány proti člověku jako standardu (používají se bílé krvinky, červené krvinky savců jsou bezjaderné). A naopak, obsah DNA zásadní modelové brukvovité rostliny, jako je huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*), byl zjišťován za použití živočišných standardů, modelových druhů octomilky obecné a hádátka *Caenorhabditis elegans*. Samozřejmě najdeme použití



rostlinného standardu i u výzkumu genomu hmyzu, např. v nedávné studii (Rodrigues a kol. 2016) analyzovali obsahy DNA dvou druhů kříšů rodu *Philaenus* a jako standard byla použita rostlina rajče jedlé (*Solanum lycopersicum*). Takže ať se vybere standard jakýkoli, vždy je nezbytné ho v každé studii co nejpřesněji definovat, protože kdyby se obsah DNA standardu v budoucnu stanovil přesněji, bude možné DNA našich měřených vzorků snadno přepočítat.

4 Graf zachycující rozdíl obsahu DNA spermií nesoucích chromozomy X a chromozom Y. Se zvyšujícím se počtem chromozomů v karyotypu se zvyšuje i rozdíl obsahu DNA mezi těmito dvěma typy spermií. Je důležité doplnit, že „samčí“ spermie s chromozomem Y vykazují ve všech početních variantách karyotypu téměř identický obsah DNA a zvyšující se obsah DNA mají pouze „samičí“ spermie s chromozomy X. Z toho vyplývá, že chromozomy, které se objevují navíc, směřují při buněčném dělení pouze do spermií s chromozomy X. Jde tudíž opravdu o pohlavní chromozomy X. Z distribuce hodnot obsahů DNA je zřejmé, že nevznikají jen prostou fragmentací chromozomu X, ale nějakou formou duplikace spojenou se zvýšením obsahu DNA. N značí počet analyzovaných jedinců. Upraveno podle: D. Sadílek a kol. (2019)

Výzkum proběhl za finanční podpory projektu Grantové agentury Univerzity Karlovy č. 277815/2015.

Seznam použité a doporučené literatury je uveden na webové stránce Živy.

Tomáš Holer, Daniela Budská, Jiří Vojar, Andrej Funk

K výskytu čolka horského v Praze

V článku v letošní Živě (2019, 2: 94–96) byl hodnocen aktuální stav přírodní památky Milíčovský les a rybníky v oblasti Jižního Města v Praze hlavně srovnáním historických údajů a současných poznatků o výskytu obojživelníků. Tato lokalita byla totiž opakovaně uváděna jako nejvýznamnější místo z hlediska počtu druhů obojživelníků i početnosti populací některých z nich na území hlavního města Prahy (např. Kerouš 1992, Moravec 2009, Petřík 2008 a 2011, Němec a kol. 2015). V současnosti se zde vyskytují mimo jiné čolky obecný (*Lissotriton vulgaris*) a č. velký

(*Triturus cristatus*). U čolka horského (*Ichthyosaura alpestris*) však jediný diskutabilní a téměř neznámý údaj pocházel z června 1987 (M. Zaňka, nepublikováno) a v článku byl proto hodnocen jako nejspíše chybný, nebo pokus o introdukci. Na třech místech v Praze byl totiž tento druh v minulosti vysazen a stále tam přežívá – v Botanické zahradě Přírodovědecké fakulty UK na Novém Městě, v parku Stanice mladých přírodovědců na Smíchově a v zahradním jezírku v Dejvicích. Další záznam, který by naznačoval možnost případného přirozeného výskytu čolka hor-



1 Mokřad v sousedství Milíčovského rybníka. Foto A. Funk

2 Čolek horský (*Ichthyosaura alpestris*), nahoře samice, dole samec. Foto T. Holer

ského v Praze, ale dále zatím nepotvrzený, je nález jedné larvy v tůni V Libří ve Velké Chuchli (J. Veselý 2014, nepublikováno). Jiná lokalita nejasného původu v Libni již zanikla (K. Kerouš, osobní sdělení).

Už v r. 2016 a následně krátce po vydání článku v Živě se však podařilo prvnímu autorovi tohoto příspěvku pozorovat a posléze v květnu 2019 druhé autorce odchytem i doložit hned několik jedinců čolka horského v mokřadní olšíně u Milíčovského rybníka. Druh tedy v této přírodní památce žije a reálný může být i přirozený původ vzhledem k relativně nedalekým lokalitám přirozeného výskytu čolka horského jižně od Prahy (např. v okolí Říčán).

Práce byla podpořena projektem Monitoring vodních biotopů a na vodu vázaných organismů na území hl. m. Prahy.

Použitá literatura uvedena na webu Živy.

