

Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra zoologie
Charles University, Faculty of Science, Department of Zoology

Doktorský studijní program: Zoologie

Ph.D. study program: Zoology

Autoreferát disertační práce

Summary of the Ph.D. Thesis



Cytogenetická charakteristika štěnic rodu *Cimex* (Heteroptera: Cimicidae)

Cytogenetic characteristic of *Cimex* bed bugs (Heteroptera: Cimicidae)

Mgr. David Sadílek

Školitel/Supervisor: Doc. RNDr. Jitka Vilímová, CSc.

Praha, 2020

Abstrakt

Předkládaná disertační práce představuje návrh vysvětlení původu nadpočetných pohlavních chromosomů štěnice *Cimex lectularius* (Hemiptera: Heteroptera: Cimicidae) pomocí kombinace analýzy velikosti genomu a klasické cytogenetiky. Pro srovnávací účely bylo obdobně analyzováno dalších pět příbuzných druhů z čeledi Cimicidae a 12 druhů z čeledi Nabidae. Práce zahrnuje i popisy metodik zpracování vzorků *C. lectularius*, cytogeneticky a průtokovou cytometrií.

Současné evropské populace *C. lectularius* z lidských hostitelů vykázaly 12 rozdílných cytotypů s rozdílným počtem pohlavních chromosomů X, od dvou do 20 ($2n♂ = 26+X_1X_2Y$ až $26+X_{1-20}+Y$). Hypotéza o původu nadpočetných pohlavních chromosomů X *C. lectularius* pomocí fragmentace byla formulována ve druhé polovině 20. století. Nicméně analýza velikosti genomu naznačuje, že by se mohlo jednat spíše o směs chromosomálních přestaveb typu duplikace či delece, které fragmentaci provázejí. Samci se základním cytotypem $2n = 26+X_1X_2Y$ měli velikost genomu $2C = 1,94$ pg, naproti tomu samec s $2n = 26+X_{1-7}+Y$ dosáhl $2C = 2,26$ pg, ale objevili se i jedinci se sníženou velikostí genomu $2C = 1,69$ pg. Nejdůležitější se však ukázala být relativní velikost genomu spermií $n = 13+X_1X_2$ a $n = 13+Y$, kdy jedinci s vyšším počtem chromosomů vykazovali navýšení relativní velikosti genomu pouze u spermií nesoucích X chromosomy.

Obdobná analýza chromosomů a velikosti genomu dalších pěti druhů z čeledi Cimicidae přinesla nové záznamy variability počtu pohlavních chromosomů u štěnice *C. lectularius* z netopýřích hostitelů $2n = 26+X_1X_2(X_3)Y$ a *C. pipistrelli* $2n = 28+X_1X_2(X_3)Y$. Avšak v porovnání se situací u *C. lectularius* z člověka tyto nadpočetné chromosomy vznikaly převážně jen fragmentací pohlavních chromosomů X a jedinci z obou cytotypů měli velmi podobné velikosti genomu. Mimo to, velikost genomu všech pěti druhů byla zaznamenána vůbec poprvé: *C. hemipterus* $2C = 1,47$ pg, *C. hirundinis* $2C = 1,61$ pg, *C. lectularius* z netopýřů $2C = 1,80$ pg, *C. pipistrelli* $2C = 1,68$ pg and *Paracimex* cf. *chaeturus* $2C = 1,22$ pg.

Analýza velikosti genomu zástupců čeledi Nabidae podpořila v současnosti neakceptovanou teorii o autosomové polyploidizaci. Druhy rodu *Himacerus* s $2n = 32+XY$ dosáhly dvojnásobku jaderné DNA ($2C = 9-10$ pg) oproti druhům rodu *Nabis* s $2n = 16+XY$ ($2C = 4-6$ pg). Vedle velikosti genomu studovaných zástupců čeledi Nabidae, byl poprvé popsán i karyotyp *N. biformis*, *N. maoricus* $2n = 16+XY$ a $2n = 26+XY$ pro *Prostemma aeneicolle*.

Abstract

The present thesis deals with the phenomenon of additional sex chromosomes in *Cimex lectularius* (Hemiptera: Heteroptera: Cimicidae) using genome size analysis combined with the classical cytogenetic approach. Also, five other cimicid species and 12 species from the family Nabidae were analysed identically for comparative purposes. The thesis also pursues a description of methodical approaches of cytogenetics and flow cytometry in the study of *C. lectularius*.

Recently analysed European specimens of *C. lectularius* from human host exhibited 12 distinct cytotypes, with a variable number of chromosomes X from two to 20 ($2n♂ = 26+X_1X_2Y$ to $26+X_{1-20}+Y$). The fragmentation hypothesis of *C. lectularius* additional chromosomes X origin was established in the second half of the 20th century. However, the present genome size measurements suggest that various chromosomal rearrangements as duplication or deletion besides the fragmentation could occur. Males with basic cytotype $2n = 26+X_1X_2Y$ had average genome size of $2C = 1.94$ pg, in contrast male with $2n = 26+X_{1-7}+Y$ yielded $2C = 2.26$ pg and also specimens with genome size decrease $2C = 1.69$ pg appeared. The most informative turned up to be the relative genome size of sperm cells $n = 13+X_1X_2$ and $n = 13+Y$, where specimens with higher chromosome number showed relative genome size increase in sperm cells with chromosomes X.

The similar cytogenetic and genome size analysis of the other five cimicid species brought the new record of variability in sex chromosome number of *C. lectularius* from bat hosts and *C. pipistrelli*, $2n = 26+X_1X_2(X_3)Y$ and $2n = 28+X_1X_2(X_3)Y$ respectively. However, in comparison with *C. lectularius* from human, these additional chromosomes X originated mostly by fragmentation and both cytotypes possessed specimens with very similar genome size. Moreover, genome size of all five species analysed was measured for the first time: *C. hemipterus* $2C = 1.47$ pg, *C. hirundinis* $2C = 1.61$ pg, *C. lectularius* from bats $2C = 1.80$ pg, *C. pipistrelli* $2C = 1.68$ pg and *Paracimex cf. chaeturus* $2C = 1.22$ pg.

Genome size analysis in family Nabidae supported the autosomal polyploidization theory, currently sidelined. *Himacerus* species with $2n = 32+XY$ reached twice as much nuclear DNA content ($2C = 9-10$ pg) than *Nabis* species with $2n = 16+XY$ ($2C = 4-6$ pg). Besides genome size data for all nabid species studied, also the karyotype of *N. biformis*, *N. maoricus* $2n = 16+XY$ and $2n = 26+XY$ for *Prostemma aeneicolle* was recorded for the first time.

Úvod

Heteroptera patří mezi jeden z nejpočetnějších hemimetabolních taxonů hmyzu čítající více než 42 000 druhů s mnoha různými potravními strategiemi. Jsou mezi nimi býložravci, dravci a také krev sající ektoparazité obratlovců, z nichž jsou nejdůležitější dvě čeledi: Reduviidae (podčeď Triatominae) a Cimicidae. Většina zástupců těchto dvou skupin parazituje na volně žijících zvířatech, ale zejména v čeledi Cimicidae se tři druhy specializovali výhradně na člověka – *Cimex lectularius* v mírném pásu, *C. hemipterus* v tropických oblastech a *Leptocimex boueti* v Africe.

Cimex lectularius původně parazitovala na netopýrech, a až později se část populace specializovala na člověka, který v té době začal obývat jeskyně spolu s netopýry. Nyní rozlišujeme dva oddělené kmeny netopýří a lidské *C. lectularius*. Štěnice nepřenáší na člověka žádné patogenní organismy (na rozdíl od zástupců podčeledi Triatominae přenášejících Chagasovu chorobu), ale i přes to působí velké ekonomické škody spojené s náklady na jejich hubení a mají i výrazný negativní psychologický efekt na obyvatele zamořených obydlí.

Přes všechna negativa jsou štěnice velmi zajímavými objekty vědeckého výzkumu z mnoha úhlů pohledu. Zaměřeno na cytogenetiku, sdílí se všemi ostatními Heteroptera holokinetický typ chromosomů – bez lokalizované centromery (kinetochor/y je rozprostřen po celé délce chromosomu). Tato vlastnost umožňuje „přežívání“ chromosomálních fragmentů nebo fúzovaných chromosomů. Základní počet chromosomů samce *C. lectularius* je $2n = 26 + X_1X_2Y$, ale byli zaznamenáni i jedinci s až 13 nadpočetnými chromosomy. Na základě pozorování chování těchto chromosomů v meiose (pohlavní chromosomy se dělí jinak než autosomy) bylo navrženo, že se jedná o fragmenty chromosomů X.

Průtoková cytometrie (FCM), metoda běžně používaná v botanice, může být použita také pro určení velikosti genomu u hmyzu. Bohužel velikost genomu v rámci Heteroptera je prostudována zcela nedostatečně, je známa pouze pro 40 druhů. Z celého infrařádu Cimicomorpha bylo analyzováno 25 druhů z čeledi Reduviidae, čtyři druhy z čeledi Miridae a také *C. lectularius*. Tudíž, žádné rozsáhlé srovnání mezi taxony není možné.

Cíle práce

Nejprve jsem se ve svém výzkumu snažil zmapovat variabilitu v počtu chromosomů ve sběrech *C. lectularius* z náhodných evropských lokalit. V další části mého výzkumu jsem se snažil odhalit variabilitu v počtu chromosomů u dalších studovaných druhů z čeledi Cimicidae – *C. hemipterus*, *C. hirundinis*, *C. pipistrelli* a *Paracimex* cf. *chaeturus*. Hlavním cílem disertační práce bylo objasnění původu nadpočetných chromosomů u *C. lectularius*, protože výsledky předcházejících prací založené pouze na pozorování Giemsovu barvených chromosomů nebyly dostačující. Za zdroj těchto chromosomů byla považována fragmentace chromosomů X a tato teorie potřebovala být ověřena.

Výzkum byl později obohacen o měření velikosti genomu lidské *C. lectularius*, aby se zjistilo, co se děje s množstvím jaderné DNA u jedinců s odlišným počtem chromosomů. Byly analyzovány velikosti genomu několika dalších druhů čeledi Cimicidae za účelem srovnání cytogenetických a cytometrických rozdílů lidské *C. lectularius*, netopýří *C. lectularius* a ostatních druhů z této čeledi.

Dále byly podobným kombinovaným přístupem analyzovány, štěnicím blíže příbuzné, druhy čeledi Nabidae za účelem srovnání mechanismů variability počtu chromosomů těchto dvou čeledí. Taktéž se očekávalo, že by analýza velikosti genomu zástupců čeledi Nabidae mohla přinést další podklady pro konkurenční cytogenetické teorie o vzniku rodů *Nabis* a *Himmacerus*, který stále nebyl zcela jasný. Navíc techniky měření velikosti genomu a 18S rDNA FISH byly použity ve výzkumu čeledi Nabidae úplně poprvé a ukázalo se, že mohou významně přispět i k determinaci studovaných druhů.

Materiál a metodika

Sběr materiálu *C. lectularius* z lidských obydlí byl koordinován s mnoha deratizátory z České republiky a dalších evropských zemí, kteří zasílali živé jedince v zabezpečených lahvičkách. Ostatní zkoumané druhy z čeledí Cimicidae či Nabidae byly získány od kolegů, nebo jsem je sbíral přímo já.

Základní metoda výzkumu je příprava chromosomových preparátů a klasické barvení Giemsou, aby se zjistil počet chromosomů a jejich morfologie u každého zkoumaného jedince. Ve výzkumu druhů čeledi Nabidae byla použita i pokročilejší cytogenetická metoda FISH s 18S rDNA sondou a měření délky chromosomů. Genová sonda 18S rDNA byla připravena z celogenomové DNA *C. lectularius*. 18S rDNA je velmi efektivní nástroj ke studiu holokinetických chromosomů s absencí morfologických znaků jako jsou centromery.

Velikost genomu všech druhů čeledí Cimicidae a Nabidae byla analyzována stejným průtokovým cytometrem. Připravené vzorky byly rozděleny na dvě části, jedna část byla obarvena PI a druhá DAPI. To umožnilo vypočtení poměru AT/GC, jakožto dalšího znaku charakterizující daný druh. Byla to právě kombinace cytogenetického a cytometrického přístupu, která poskytla unikátní soubor dat a nových informací. Zejména pak pomohla objasnit teorii vzniku nadpočetných chromosomů *C. lectularius*.

Výsledky a diskuze

Během mého výzkumu se podařilo shrnout několik metodických poznatků, které by měly usnadnit práci budoucím výzkumníkům využívajícím stejné metody. Porovnal jsem naši techniku přípravy chromosomových preparátů na teplé histologické plotýnce s roztakovou technikou, kterou používají jiné výzkumné týmy. Také jsem otestoval vhodnost různých typů tkání pro cytogenetický a cytometrický výzkum. U zástupců čeledi Cimicidae jsou pro přípravu chromosomových preparátů nejvhodnější testes, ale dospělí samci čeledi Nabidae vykazovali nedostatečný počet dělicích se buněk. Místo toho byly nalezeny velmi kvalitní mitosy na chromosomových preparátech z ovárií dospělých samic. Pro FCM studie se ukázaly

stejně dobře analyzovatelné tkáň hlavy, hrudi i zadečku, ale tkáň střeva neposkytla žádné údaje. Velmi úspěšné bylo použití spermatických buněk, při jejich FCM analýze bylo možné rozlišit hodnoty pro oba typy spermií $n = 13+X_1X_2$ a $n = 13+Y$. Také bylo testováno různé uchovávání FCM vzorků. Vysušené vzorky či vzorky fixované v ethanolu není možné průtokovou cytometrií analyzovat, ale dlouho zmrazené vzorky byly v pořádku měřitelné.

Výzkum chromosomů lidské *Cimex lectularius* ukázal 12 různých cytotypů od základního $2n = 26+X_1X_2Y$ až k nejodvozenějšímu $2n = 26+X_{1-20}+Y$, což je podobné výsledkům předcházejících studií z poloviny 20. století. Ale proporce jednotlivých cytotypů jsou zcela odlišné. Můj výzkum zaznamenal okolo 45% jedinců se základním cytotypem, ale ve starších studiích prezentovali téměř všechny jedince s vyšším počtem chromosomů. Ostatní druhy zkoumaných zástupců čeledi Cimicidae vykazovaly variabilitu v počtu chromosomů pouze u netopýří *C. lectularius* s $2n = 26+X_1X_2(X_3)Y$ a *C. pipistrelli* s $2n = 28+X_1X_2(X_3)Y$. *Cimex hemipterus* a *C. hirundinis* s $2n = 28+X_1X_2Y$ a *Paracimex* cf. *chaeturus* s $2n = 41$ vykazovaly pouze základní počty chromosomů.

Technika průtokové cytometrie byla velmi efektivní nástroj pro výzkum variability počtu chromosomů lidské štěnice *C. lectularius*. Analýza velikosti genomu různých cytotypů (s více chromosomy než $2n = 26+X_1X_2Y$) indikovala směs adičních a delečních chromosomových přestaveb spolu s prostou fragmentací chromosomů. Různé cytotypy zahrnovaly jedince s výrazným poklesem či zvýšeným obsahem jaderné DNA společně s jedinci o průměrném obsahu DNA. Pokud by byla přítomna pouze fragmentace, jak bylo předpokládáno v předchozích studiích, byla by velikost genomu ve všech cytotypech stejná, či alespoň velmi podobná bez ohledu na počet chromosomů. Velikost genomu zkoumaných zástupců čeledi Cimicidae byly změřeny vůbec poprvé (s výjimkou lidské *C. lectularius*, ale mně se podařilo naměřit lehce odlišné hodnoty). Průměr samce se základním cytotypem: lidská *C. lectularius* $2C = 1,94$ pg, netopýří *C. lectularius* $2C = 1,80$ pg, lidská *C. hemipterus* $2C = 1,47$ pg, netopýří *C. pipistrelli* $2C = 1,68$ pg, vlaštovčí *C. hirundinis* $2C = 1,60$ pg a rorýsí *Paracimex* cf. *chaeturus* $2C = 1,20$ pg.

Výzkum zástupců čeledi Nabidae přinesl nový záznam karyotypu $2n = 16+XY$ pro druhy *Nabis biformis* a *N. maoricus* a $2n = 26+XY$ u *Prostemma aeneicolle*. Také výsledky FISH analýz, měření chromosomů a velikosti genomu všech analyzovaných druhů čeledi Nabidae byly prezentovány vůbec poprvé. Na rozdíl od zástupců z čeledi Cimicidae, je zdroj variability v počtu chromosomů v čeledi Nabidae většinou přisuzován fragmentaci autosomů či B chromosomům. Na druhou stranu se mi podařilo zaznamenat i jednoho samce *N. rugosus* s jedním nadpočetným pohlavním chromosomem ve všech buňkách, $2n = 19$. Velmi zajímavé výsledky poskytla FISH analýza s 18S rDNA sondou. *Cimex lectularius* nese dva signály, jeden na X a druhý na Y chromosomu, a zcela stejný systém mají také zástupci čeledi Nabidae. Nicméně se mezi nimi vyskytly i druhy se zdvojeným signálem na X či Y chromosomu, ba co víc, 18S rDNA signál zcela chyběl na Y chromosomu u *N. maoricus*. Analýza velikosti genomu nabídla nové řešení mezi dvěma konkurenčními hypotézami. První hypotéza považuje karyotyp $2n = 32+XY$ jako odvozený z původního $2n = 16+XY$ polyploidizací autosomů. Druhá hypotéza považuje karyotyp $2n = 32+XY$ za původní a $2n =$

16+XY jako odvozený fúzí všech autosomů. Můj výzkum ukázal, že dva druhy rodu *Himacerus* ($2n = 32-36+XY$) mají dvojnásobnou velikost genomu $2C = 9-10$ pg než pět druhů rodu *Nabis* ($2n = 16+XY$) s pouze $2C = 4-6$ pg. Proto byla polyploidie autosomů navržena jako nejpravděpodobnější nástroj karyotypové evoluce těchto dvou rodů čeledi Nabidae.

Závěry

Během mého výzkumu jsem odhalil velmi vysokou variabilitu počtu chromosomů pouze u lidské *C. lectularius*, další dva druhy z čeledi Cimicidae ukázaly jen minimální variabilitu v rozpětí jednoho chromosomu. Společné výsledky analýzy velikosti genomu a počtu chromosomů ukázaly jako nejpravděpodobnější scénář několika typů chromosomálních přestaveb vedoucích k různým cytotypům *C. lectularius*, což byl hlavní cíl předkládané práce. Navíc studium volně žijících druhů z čeledi Cimicidae ukázalo odlišný způsob vzniku nadpočetných chromosomů – pouze fragmentaci.

Analyzované druhy z čeledi Nabidae ukázaly zcela odlišné mechanismy variability počtu chromosomů. Ty zahrnovaly především autosomy, ale příležitostně i pohlavní chromosomy. Výsledky měření velikosti genomu jsou zcela unikátní a přiklánějí se k teorii o polyploidizaci autosomů. Analýza chromosomů metodou FISH ukázala u studovaných druhů výraznou variabilitu v počtu 18S rDNA signálů.

Životopis

Mgr. David Sadílek

Narozen: 4. listopadu 1987, Praha

Researcher ID: S-1797-2017; ORCID ID: 0000-0001-6877-887X

Vzdělání

Od 2012: doktorské studium Zoologie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha

Disertační práce: Cytogenetická charakteristika štěnic rodu Cimex (Heteroptera: Cimicidae)

2010-2012: magisterské studium Zoologie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha

Diplomová práce: Srovnávací cytogenetika štěnice Cimex lectularius (Heteroptera: Cimicidae)

2007-2010: bakalářské studium Biologie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha

Bakalářská práce: Cytogenetika štěnic (Cimicidae) jako modelových ploštic (Insecta: Heteroptera)

Konferenční příspěvky

Mezinárodní konference: 10 příspěvků (European Hemiptera Congress, International Chromosome Conference, Dresden Meeting on Insect Phylogeny, International Conference Analytical Cytometry, International Colloquium on Animal Cytogenetics and Genomics)

České konference: 7 příspěvků (Zoologické dny)

Grantové projekty

Hlavní řešitel

2015-2017: Původ a evoluce zmnožených chromosomů u štěnice domácí (*Cimex lectularius*). Grantová agentura Univerzity Karlovy, č. 277815/2015.

2011-2013: Srovnávací cytogenetika štěnice domácí (*Cimex lectularius* Linnaeus, 1758) (Heteroptera: Cimicidae). Grantová agentura Univerzity Karlovy, č. 267111/2011.

Spoluřešitel

2019: Mechanizmy diverzifikace karyotypu křížákovitých (Araneae: Araneidae). Grantová agentura Univerzity Karlovy, č. 1000119/2019.

2019: Evoluce nukleolárních organizátorů jaderka u pavouků (Araneae). Grantová agentura Univerzity Karlovy, č. 92218/2018.

2017-2019: Chromozomální mapování a dynamika karyotypů štirů čeledi Buthidae. Grantová agentura Univerzity Karlovy, č. 1324217/2017.

Zaměstnání

- Od 2019: Vědecký a vývojový pracovník v Centru nádorové cytogenomiky, Všeobecná fakultní nemocnice v Praze
- 2017-2019: Odborný editor 4 učebnic přírodopisu pro ZŠ, nakladatelství Taktik International
- 2016-2018: Výzkumný pracovník - Vznik a evoluce pohlavních chromozomů u pavouků.
Grantová agentura České republiky, č. 16-10298S.
- 2014-2015: Rekonstrukce a organizace sbírek hmyzu, Národní muzeum, Praha

Pedagogická činnost

- 2012-2016: podílení se na výuce entomologie na praktických cvičeních předmětů:
Zoologie bezobratlých a Terestrické ekosystémy

Jiné dovednosti a úspěchy

- Klasická cytogenetika – příprava chromosomových preparátů, FISH – příprava a aplikace základních genových sond, PCR, vyhodnocování klasických i fluorescenčních fotografií chromosomů, FCM – příprava vzorků, měření a analýza dat
- 2020: Certifikát o absolvování kurzu Odborné zdravotnické laboratorní metody (AKK)
- 2018: Cena České společnosti entomologické za nejlepší studentský poster v oboru entomologie + Vědecky nejhodnotnější studentský poster (3. místo).
Am I really so smashed? Zoologické dny Praha 2018.
- 2017: Oponentura bakalářské práce: Průtoková cytometrie a její využití ke studiu hmyzu.
(STUHLÍKOVÁ M)
- 2015: Certifikát o absolvování Kurzu základů vědecké práce

Seznam publikací

Publikace zahrnuté do disertace

SADÍLEK D, ŠTÁHLAVSKÝ F, VILÍMOVÁ J & ZIMA J 2013: Extensive fragmentation of the X chromosome in the bed bug *Cimex lectularius* Linnaeus, 1758 (Heteroptera: Cimicidae): a survey across Europe. *Comparative Cytogenetics* 7(4): 253–269. (IF₂₀₁₃ = 1,101)

SADÍLEK D, NGUYEN P, KOÇ H, KOVAŘÍK F, YAĞMUR EA & ŠTÁHLAVSKÝ F 2015: Molecular cytogenetics of the *Androctonus* scorpions: Oasis of calm in turbulent karyotype evolution of the diverse family Buthidae. *Biological Journal of the Linnean Society* 115: 69–76. (IF₂₀₁₅ = 2,210)

SADÍLEK D, ANGUS R, ŠTÁHLAVSKÝ F & VILÍMOVÁ J 2016: Comparison of different cytogenetic methods and tissue suitability for the study of chromosomes in *Cimex lectularius* (Heteroptera: Cimicidae). *Comparative Cytogenetics* 10(4): 731–752. (IF₂₀₁₆ = 1,485)

ROST-ROZSKOWSKA MM, VILIMOVA J, WŁODARCZYK A, SONAKOWSKA L, KAMIŃSKAK, KASZUBA F, MARCHEWKA A & SADÍLEK D 2017: Investigation of the midgut structure and ultrastructure in *Cimex lectularius* and *Cimex pipistrelli* (Hemiptera: Cimicidae). *Neotropical Entomology* 46: 45–57. (IF₂₀₁₇ = 0,931)

SADÍLEK D, URFUS T, HADRAVA J, VILÍMOVÁ J & SUDA J 2019: Nuclear Genome size in contrast to chromosome number variability in human bed bug, *Cimex lectularius* (Heteroptera: Cimicidae). *Cytometry Part A* 95A: 746–756. (IF₂₀₁₉ = 3,465)

SADÍLEK D, URFUS T & VILÍMOVÁ J 2019: Genome size and sex chromosome variability of bed bugs feeding on animal hosts compared to *Cimex lectularius* parasitizing human (Heteroptera: Cimicidae). *Cytometry Part A* 95A: 1158–1166. (IF₂₀₁₉ = 3,465)

SADÍLEK D, VILÍMOVÁ J & URFUS T: Peaceful revolution in genome size: Polyploidy in Nabidae (Heteroptera), autosomes and nuclear DNA content doubling. *Zoological journal of the Linnean Society* (Accepted manuscript). (IF₂₀₁₉ = 2,842)

Ostatní publikace

JINDROVÁ H, HIŘMAN M, SADÍLEK D, BEZDĚČKA P & ŠTÁHLAVSKÝ F 2020: Distribution of 18S rDNA clusters in Central European harvestmen of the Suborder Eupnoi (Arachnida: Opiliones). *European Journal of Entomology* 117: 282–288. (IF₂₀₁₉ = 1,182)

SEMBER A, PAPPOVÁ M, FORMAN M, NGUYEN P, MAREC F, DALÍKOVÁ M, DIVIŠOVÁ K, DOLEŽÁLKOVÁ-KAŠTÁNKOVÁ M, ZRZAVÁ M, SADÍLEK D, HRUBÁ B & KRÁL J 2020: Patterns of sex chromosome differentiation in spiders: Insights from comparative genomic hybridization. *Genes* 11: 849. (IF₂₀₁₉ = 3,868)

ANGUS RB, SADÍLEK D, SHRAARAWI F, DOLLIMORE H, LIU H-C, SEIDEL M, SÝKORA V & FIKÁČEK M: Karyotypes of the water scavenger beetles (Coleoptera: Hydrophilidae):

new data and review of published records. *Zoological journal of the Linnean Society* (Accepted manuscript). (IF₂₀₁₉ = 2,842)

HUSEMANN M, SADÍLEK D, DEY L-S, HAWLITSCHKE O & SEIDEL M: New genome size estimates for band-winged and slant-faced grasshoppers (Orthoptera: Acrididae: Oedipodinae, Gomphocerinae) reveal the so far largest measured insect genome. *Caryologia* (Accepted manuscript). (IF₂₀₁₉ = 0,602)

ŠTÁHLAVSKÝ F, NGUYEN P, SADÍLEK D, ŠTUNDLOVÁ J, JUST P, HADDAD CR, KOÇ H, RANAWANA KB, STOCKMANN M, YAĞMUR EA & KOVAŘÍK F 2020: Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of buthid scorpions (Chelicerata: Arachnida). *Biological journal of the Linnean Society* (Accepted manuscript). (IF₂₀₁₉ = 1,937)

Neimpaktované publikace

SADÍLEK D, FORMAN M & VILÍMOVÁ J 2016: Tajemství chromozomů našeho spolunocležníka – štěnice domácí. *Živa* 2/2016: 77–80.

SADÍLEK D 2019: Štěnice “na paprice” aneb Jak se vaří obsah jaderné DNA. *Živa* 6/2019: 320–322.

Introduction

The Heteroptera is one of the largest hemimetabolous taxa consist of more than 42,000 species with many diverse feeding strategies. There are herbivores, predators, and also blood-feeding ectoparasites of vertebrates, very important are two families: Reduviidae (subfamily Triatominae) and Cimicidae. Most of the members of these groups are parasitizing wild animals, but especially in Cimicidae, evolved three species which are specialised for human as the only host – temperate *Cimex lectularius*, tropical *C. hemipterus*, and African *Leptocimex boueti*.

Cimex lectularius probably originally parasitized bats and distinct strain shifted to the humans inhabiting caves - now we can distinguish two strains of *C. lectularius*: from bats and from human. Bed bugs do not transmit any human pathogen (in contrast to the Chagas disease from Triatominae), however, they cause a large economic damage for their eradication cost and distinct psychological discomfort for inhabitants of infested dwellings.

Nevertheless, they are very interesting from many points of scientific research. Focused on cytogenetics they share with all other Heteroptera holokinetic type of chromosomes – without localized centromere (kinetochore/s is spread along a whole chromosome). This feature enables “surviving” of chromosome fragments or fused chromosomes. The basic chromosome number of *C. lectularius* male is $2n = 26+X_1X_2Y$, however, specimens with up to 13 additional chromosomes were recorded. Based on the observation of these chromosomes behaviour during meiosis (sex chromosomes divides differently from autosomes) it was suggested they are fragments of the sex chromosomes X.

Flow cytometry method (FCM), mostly used in botany, can be also used for genome size determination of insects. Unfortunately, genome sizes in Heteroptera species are greatly understudied, only 40 species in total. From whole infraorder Cimicomorpha 25 analysed species belong to the Reduviidae, four species to Miridae, and also *C. lectularius* was analysed. Therefore, any large comparison is not possible.

Aims of the study

At first, my research tried to map current *C. lectularius* chromosome number variability from random European samples. Another part of my research tried to unveil the chromosome number variability of other studied cimicid species – *C. hemipterus*, *C. hirundinis*, *C. pipistrelli* and *Paracimex* cf. *chaeturus*. The main aim of the dissertation thesis was to clarify the origin of additional chromosomes in *C. lectularius*, because the former results based on observation of Giemsa-stained chromosomes only were not sufficient. Their source was reported to be a fragmentation of X chromosomes and it needed to be verified.

The research was later enriched with genome size measurement of *C. lectularius* from human to show what happened to nuclear DNA volume in specimens with different chromosome number. More cimicid taxa genome size was analysed for comparative purposes to show differences in cytogenetic and cytometric features of *C. lectularius* from human and other cimicid species and *C. lectularius* from bats.

Then the species of closely relative family Nabidae was analysed with a similar combined approach to compare mechanisms of chromosome number variability in Cimicidae and Nabidae. Also, it was expected, that genome size analysis should add additional arguments to *Nabis* and *Himacerus* species origin which was still quite unclear. Moreover, genome size measurement and 18S rDNA FISH techniques were used for the first time in Nabidae research and also add some important features for the species determination.

Material and methods

Collection of the material of *C. lectularius* from human dwellings was coordinated with many extermination specialists from the Czech Republic and other European countries who send me the living specimens in secured vials. Other analysed cimicid species or nabids were acquired from colleagues or I collected them myself in the field.

The basic research method is the preparation of chromosome slides and classical Giemsa staining to find out the number of chromosomes and their morphology of each analysed cimicid and nabid specimen. In Nabidae research was involved also more advanced cytogenetic method of FISH with 18S rDNA probe and chromosome length measurement. Gene probe of 18S rDNA was prepared from *C. lectularius* genomic DNA. 18S rDNA is a very efficient tool for the study of holokinetic chromosomes which lack of other morphological features as the centromere.

The genome size of all Cimicidae and Nabidae specimens was analysed by the identical flow cytometer instrument. Prepared sample was divided into two parts, one part was stained with PI and another with DAPI which enabled the AT/GC ratio calculation as another feature characterising the species. It was the combination of cytogenetic and cytometric approaches that provided a unique data set which brought much new information, especially to the theory of *C. lectularius* additional chromosomes origin.

Results and discussion

During my research efforts, I manage to put together several methodical findings which should help future researchers to follow the methods I used. The comparison of our hot plate spreading chromosome slides preparation technique to the squashing method used by other research teams. I also tested different tissues suitable for cytogenetical and FCM study. For chromosomes of Cimicidae are the most suitable testes, however, Nabidae adult males did not show a sufficient amount of dividing cells, instead of it females exhibited very useful mitosis on slides from ovaries. For FCM analysis was the tissue of head, thorax, or abdomen sufficient equally, but the tissue of midgut provided no data. Very successful was the use of sperm cells where could be distinguished values for both types of sperm $n = 13+X_1X_2$ and $n = 13+Y$. Also, FCM sample treatment was tested. Dried or ethanol fixed samples are not analysable, but long-frozen samples worked.

The screening for *Cimex lectularius* from human cytotype variants brought 12 different cytotypes from basic $2n = 26+X_1X_2Y$ to the most derived $2n = 26+X_{1-20}+Y$ which is

similar to findings of former studies in the half of the 20th century, but the proportions of cytotypes within the dataset is completely different. My research recorded about 45% of specimens with basic cytotype but older studies had almost all specimens with a higher number of chromosomes. Other species of analysed Cimicidae showed variability in chromosome number only in *C. lectularius* from bats and *C. pipistrelli*, $2n = 26+X_1X_2(X_3)Y$, and $2n = 28+X_1X_2(X_3)Y$ respectively. *Cimex hemipterus*, *C. hirundinis*, and *Paracimex cf. chaeturus* exhibited only basic chromosome numbers, $2n = 28+X_1X_2Y$ and $2n = 41$ respectively.

FCM technique was found as a very efficient tool for research of chromosome number variability in *C. lectularius* from human. The genome size analysis in various cytotypes (especially with more chromosomes than basic $2n = 26+X_1X_2Y$) indicated the mix of additive and deleterious chromosome rearrangements besides sole chromosome fragmentation. Various cytotypes showed specimens with a distinct decrease or increase of nuclear DNA content together with specimens of average DNA content. If only fragmentation would be present, as supposed in former studies, the genome size would be in all cytotypes the same or at least very similar regardless of the number of chromosomes. Cimicid genome sizes were recorded for the first time (except *C. lectularius* from human, but I reached a slightly different values). Average male with basic cytotype: *C. lectularius* from human $2C = 1.94$ pg, *C. lectularius* from bats $2C = 1.80$ pg, *C. hemipterus* from human $2C = 1.47$ pg, *C. pipistrelli* from bats $2C = 1.68$ pg, *C. hirundinis* from swallows $2C = 1.60$ pg and *Paracimex cf. chaeturus* from swifts $2C = 1.20$ pg.

In research of Nabidae was the male karyotype $2n = 16+XY$ for *Nabis biformis* and *N. maoricus* and $2n = 26+XY$ for *Prostemma aeneicolle* recorded for the first time. Also, data from FISH, chromosome measurements, and genome sizes were recorded for the first time. In contrast to cimicid species, the source of nabid variability is mostly proposed as autosomal fragmentation or B chromosomes. However, a single *N. rugosus* male with stable additional sex chromosome in all cells $2n = 19$ was recorded. A very interesting feature showed the FISH analyses with the 18S rDNA probe. *Cimex lectularius* possess two signals, on the X and Y chromosome, the very same pattern had also Nabidae species. However, Nabidae showed also species with a doubled signal on the X or Y chromosome, moreover, the 18S rDNA signal was completely absent on the Y chromosome in *N. maoricus*. Genome size analysis suggested the solution between two competing hypotheses. The first hypothesis considers the karyotype of $2n = 32+XY$ as derived from ancestral $2n = 16+XY$ by polyploidy of autosomes, and the second hypothesis suggests the karyotype of $2n = 32+XY$ as ancestral and $2n = 16+XY$ as derived by fusions of all autosomes. My research showed two *Himacerus* species ($2n = 32-36+XY$) with twice as large genome size as $2C = 9-10$ pg in contrast to five *Nabis* species ($2n = 16+XY$) which showed only $2C = 4-6$ pg. Therefore, the autosomal polyploidy event was suggested as the most probable tool of differentiation in the karyotype evolution of these two genera of Nabidae.

Conclusions

Within my research I found very high variability in chromosome number only in *C. lectularius* from human, another two cimicid species exhibited only minor variability of one sex chromosome. Genome size data together with chromosome number analysis suggested the most probable scenario of multiple chromosomal rearrangements leading to various cytotypes of *C. lectularius*, which was the main aim of the study. Moreover, the study of free-living cimicids suggested different mechanism of additional chromosomes origin – fragmentation only.

Nabidae species revealed a completely different mechanisms of chromosome number variability which involve mainly autosomes, but occasionally sex chromosomes are involved. Genome size analysis data are completely unique and suggesting the theory of autosomal polyploidy to be correct. The FISH analysis showed distinct 18S rDNA signal number variability among analysed species.

Curriculum vitae

Mgr. David Sadilek

Born: 4th November 1987, Prague

Researcher ID: S-1797-2017; ORCID ID: 0000-0001-6877-887X

Education

Since 2012: Ph.D. study of Zoology, Faculty of Science, Charles University, Prague
Dissertation thesis: Cytogenetic characteristic of Cimex bed bugs (Heteroptera: Cimicidae)

2010-2012: Master's degree study of Zoology, Faculty of Science, Charles University, Prague
Master thesis: Comparative cytogenetics of the bed bug Cimex lectularius (Heteroptera: Cimicidae)

2007-2010: Bachelor's degree study of Biology, Faculty of Science, Charles University, Prague
Bachelor thesis: Cytogenetics of bed bugs (Cimicidae) as a model true bugs (Insecta: Heteroptera)

Conference contributions

International meetings: 10 contributions (European Hemiptera Congress, International Chromosome Conference, Dresden Meeting on Insect Phylogeny, International Conference Analytical Cytometry, International Colloquium on Animal Cytogenetics and Genomics)

National (Czech) meetings: 7 contributions (Zoological days)

Grant projects

The principal researcher

2015-2017: Origin and evolution of human bed bug additional chromosomes (*Cimex lectularius*). The Charles University Grant Agency, no. 277815/2015.

2011-2013: Comparative cytogenetics of human bed bug (*Cimex lectularius* Linnaeus, 1758) (Heteroptera: Cimicidae). The Charles University Grant Agency, no. 267111/2011.

Co-investigator

2019: Karyotype diversification mechanisms of orb-weaver spiders (Araneae: Araneidae). The Charles University Grant Agency, no. 1000119/2019.

2019: Evolution of spider nucleolar organiser region (Araneae). The Charles University Grant Agency, no. 92218/2018.

2017-2019: Chromosome mapping and karyotype dynamics of Buthidae scorpions. The Charles University Grant Agency, no. 1324217/2017.

Employment history

od 2019: Research worker in Center of Oncocytogenomics, General University Hospital in Prague

2017-2019: Editor of 4 textbooks of natural history for basic school, publisher Taktik International

2016-2018: Research worker - Origin and evolution of sex chromosomes in spiders. The Czech Science Foundation, no. 16-10298S.

2014-2015: Reconstruction and organization of the entomological collection, National Museum, Prague

Pedagogical experiences

2012-2016: Participating on teaching of entomology at the Charles University - practical trainings to subjects: Zoology of invertebrates and Terrestrial ecosystems

Other skills and achievements

Classical cytogenetics – chromosome slides preparation, FISH – preparation and application of basic gene probes, PCR, classical and fluorescent photography of chromosomes evaluation, FCM – sample preparation, measurement and data analysis

2020: Certificate - Professional Medical Laboratory Methods

2018: Award of the Czech entomological society for the best student entomological poster + Scientifically the most valuable student poster (3rd place).
Am I really so smashed? Zoological days Praha 2018.

2017: Opponent of the bachelor thesis: Flow cytometry and its use for study of insects.
(STUHLÍKOVÁ M)

2015: Certificate – Basics of Scientific Work Course

Selected publications

Papers involved to the dissertation

SADÍLEK D, ŠTÁHLAVSKÝ F, VILÍMOVÁ J & ZIMA J 2013: Extensive fragmentation of the X chromosome in the bed bug *Cimex lectularius* Linnaeus, 1758 (Heteroptera: Cimicidae): a survey across Europe. *Comparative Cytogenetics* **7**(4): 253–269. (IF₂₀₁₃ = **1.101**)

SADÍLEK D, NGUYEN P, KOÇ H, KOVAŘÍK F, YAĞMUR EA & ŠTÁHLAVSKÝ F 2015: Molecular cytogenetics of the *Androctonus* scorpions: Oasis of calm in turbulent karyotype evolution of the diverse family Buthidae. *Biological Journal of the Linnean Society* **115**: 69–76. (IF₂₀₁₅ = **2.210**)

SADÍLEK D, ANGUS R, ŠTÁHLAVSKÝ F & VILÍMOVÁ J 2016: Comparison of different cytogenetic methods and tissue suitability for the study of chromosomes in *Cimex lectularius* (Heteroptera: Cimicidae). *Comparative Cytogenetics* **10**(4): 731–752. (IF₂₀₁₆ = **1.485**)

ROST-ROSKOWSKA MM, VILIMOVA J, WŁODARCZYK A, SONAKOWSKA L, KAMIŃSKAK, KASZUBA F, MARCHEWKA A & SADÍLEK D 2017: Investigation of the midgut structure and ultrastructure in *Cimex lectularius* and *Cimex pipistrelli* (Hemiptera: Cimicidae). *Neotropical Entomology* **46**: 45–57. (IF₂₀₁₇ = **0.931**)

SADÍLEK D, URFUS T, HADRAVA J, VILÍMOVÁ J & SUDA J 2019: Nuclear Genome size in contrast to chromosome number variability in human bed bug, *Cimex lectularius* (Heteroptera: Cimicidae). *Cytometry Part A* **95A**: 746–756. (IF₂₀₁₉ = **3.465**)

SADÍLEK D, URFUS T & VILÍMOVÁ J 2019: Genome size and sex chromosome variability of bed bugs feeding on animal hosts compared to *Cimex lectularius* parasitizing human (Heteroptera: Cimicidae). *Cytometry Part A* **95A**: 1158–1166. (IF₂₀₁₉ = **3.465**)

SADÍLEK D, VILÍMOVÁ J & URFUS T: Peaceful revolution in genome size: Polyploidy in Nabidae (Heteroptera), autosomes and nuclear DNA content doubling. *Zoological journal of the Linnean Society* (Accepted manuscript). (IF₂₀₁₉ = **2.842**)

Other papers

JINDROVÁ H, HIŘMAN M, SADÍLEK D, BEZDĚČKA P & ŠTÁHLAVSKÝ F 2020: Distribution of 18S rDNA clusters in Central European harvestmen of the Suborder Eupnoi (Arachnida: Opiliones). *European Journal of Entomology* **117**: 282–288. (IF₂₀₁₉ = **1.182**)

SEMBER A, PAPPOVÁ M, FORMAN M, NGUYEN P, MAREC F, DALÍKOVÁ M, DIVIŠOVÁ K, DOLEŽÁLKOVÁ-KAŠTÁNKOVÁ M, ZRZAVÁ M, SADÍLEK D, HRUBÁ B & KRÁL J 2020: Patterns of sex chromosome differentiation in spiders: Insights from comparative genomic hybridization. *Genes* **11**: 849. (IF₂₀₁₉ = **3.868**)

ANGUS RB, SADÍLEK D, SHRAARAWI F, DOLLIMORE H, LIU H-C, SEIDEL M, SÝKORA V & FIKÁČEK M: Karyotypes of the water scavenger beetles (Coleoptera: Hydrophilidae):

new data and review of published records. *Zoological journal of the Linnean Society* (Accepted manuscript). (IF₂₀₁₉ = 2.842)

HUSEMANN M, SADÍLEK D, DEY L-S, HAWLITSCHKE O & SEIDEL M: New genome size estimates for band-winged and slant-faced grasshoppers (Orthoptera: Acrididae: Oedipodinae, Gomphocerinae) reveal the so far largest measured insect genome. *Caryologia* (Accepted manuscript). (IF₂₀₁₉ = 0.602)

ŠTÁHLAVSKÝ F, NGUYEN P, SADÍLEK D, ŠTUNDLOVÁ J, JUST P, HADDAD CR, KOÇ H, RANAWANA KB, STOCKMANN M, YAĞMUR EA & KOVAŘÍK F 2020: Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of buthid scorpions (Chelicerata: Arachnida). *Biological journal of the Linnean Society* (Accepted manuscript). (IF₂₀₁₉ = 1.937)

Publications without impact factor (in Czech)

SADÍLEK D, FORMAN M & VILÍMOVÁ J 2016: Tajemství chromozomů našeho spolunocležníka – štěnice domácí (*The mystery of chromosomes in our bedfellow – the domestic bed bug*). *Živa* 2/2016: 77–80.

SADÍLEK D 2019: Štěnice “na paprice” aneb Jak se vaří obsah jaderné DNA (*Bed bug “in paprika sauce”*: *How to cook the contents of nuclear DNA*). *Živa* 6/2019: 320–322.