

**Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Magdalena Stuchlíková**

Průtoková cytometrie a její využití ke studiu hmyzu

Flow cytometry and its use for study of insects

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Petr Janšta, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Tomáš Urfus, Ph.D.

Praha, 2017



**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15. 5. 2017

Podpis

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala především svému školiteli Petru Janšovi a konzultantovi Tomáši Urfusovi za jejich trpělivost, a hlavně za cenné připomínky. Dík si zaslouží i David Novák za časté povzbuzování při psaní.

**Abstrakt:**

Průtoková cytometrie je moderní metoda, která hraje nepopiratelnou roli zejména v biomedicíně a botanickém výzkumu. Přes všechny své výhody (rychlost, jednoduchost, nízká finanční náročnost) není dosud hromadně využívána ke studiu hmyzu. Tato práce poskytuje základní vhled do problematiky použití průtokové cytometrie u hmyzu a shrnuje entomologické poznatky získané na základě této metody. Jedná se především o výzkum velikosti genomu a jeho souvislostí s dalšími znaky. Méně zastoupené je pak například studium ploidní úrovně nebo poměru párů bází.

Klíčová slova: průtoková cytometrie, využití ke studiu hmyzu, velikost genomu

**Abstract:**

Flow cytometry is a modern technique in research, playing a significant role in biomedicine and botanics. Despite its benefits (speed, simplicity, low costs), flow cytometry is currently not used in the study of insects on a large scale. This thesis gives an overview as to how flow cytometry is used in research on insects and summarises the results of such study. This pertains to genome size and its connections to other phenomena. Other focal points of research, such as ploidy and base pair ratios, are addressed to a lesser extent.

Key words: flow cytometry, use in study of insects, genome size, ploidy, invertebrates

## Obsah

1	Úvod.....	7
2	Průtoková cytometrie – popis metody .....	8
2.1	Příprava hmyzího materiálu.....	8
2.2	Barviva.....	9
2.3	Standardy .....	10
2.4	Výhody a nevýhody metody.....	11
3	Využití průtokové cytometrie .....	12
3.1	Ploidie.....	12
3.2	Velikost genomu.....	13
3.3	Poměr párů bází.....	14
3.4	Další využití.....	15
4	Výsledky entomologických výzkumů.....	16
4.1	Velikost genomu.....	16
4.1.1	Studované taxony .....	16
4.1.1.1	„Ametabola“ .....	16
4.1.1.2	„Hemimetabola“.....	16
4.1.1.3	„Holometabola“ .....	17
4.1.2	Holometabola vs. hemimetabola .....	20
4.1.3	Samci vs. samice .....	20
4.1.4	Velikost genomu a parazitismus .....	20
4.1.5	Další souvislosti .....	21
4.2	Ostatní aplikace .....	22
4.2.1	Ploidie.....	22
4.2.2	Počet spermií .....	23
4.2.3	Detekce přítomnosti viru.....	23
4.2.4	Poměr párů bází.....	23
5	Závěr .....	24
6	Literatura.....	25

# 1 Úvod

Průtoková cytometrie (*flow cytometry*) je vědecká metoda, která od svého vzniku v 50. letech 20. století našla uplatnění v široké škále oborů. Využívá se pro třídění částic (typicky buňky, buněčná jádra, chromosomy) a analýzu jejich vlastností. Moderní průtokové cytometry poskytují možnost analýzy několika parametrů najednou a pracují na principu detekce fluorescence (Adan et al., 2016).

Nejčastěji je tato metoda používána v biomedicínském výzkumu (zejména v imunologii) a velké oblibě se těší i v botanice (určování druhů, studium ploidní úrovně, evoluce genomu, detekce hybridizace apod. /Kron et al., 2007/). Ke studiu bezobratlých živočichů, konkrétně hmyzu, však tato technika není dosud hromadně využívána. Existuje jen omezený počet studií, které se zabývají hlavně velikostí genomu u vybraných taxonů. To je poměrně překvapivé, vzhledem k tomu, že průtoková cytometrie skýtá oproti jiným metodám mnohé výhody, mezi které patří zejména rychlost a přesnost měření a také poměrně nízká finanční náročnost (Suda, 2011).

Cílem mé práce je shromáždit a zhodnotit publikované výsledky týkající se hmyzu, které byly získané na základě této metody. Jde především o výzkum související s velikostí genomu a jejím vztahem k dalším měřitelným parametrům. Méně zastoupené je pak studium polyploidizace, určování pohlaví, determinace nových druhů a další aplikace. Dále je mým cílem zjistit, jak byly tyto výsledky uplatněny v dalším výzkumu a nakonec nastínit, jakým směrem by se v budoucnu mohl ubírat výzkum hmyzu právě za využití průtokové cytometrie.

## 2 Průtoková cytometrie – popis metody

Princip této metody je poměrně jednoduchý. Při přípravě je zásadním krokem použití fluorescenčního barviva, jež se naváže na DNA studovaného vzorku (Kron et al., 2007).

Samotný cytometr se skládá z průtokové komůrky, zdroje excitačního záření, optické soustavy, souboru fotonásobičů a zesilovačů a z počítačové části (Suda, 2011). V průtokové komůrce jsou částice studovaného vzorku seřazeny tak, že se v úzkém svazku pohybují jedna za druhou – takzvaná hydrodynamická fokusace (Doležel et al., 2007a). Částice proudí ke zdroji excitačního záření, kterým mohou být zejména lasery, rtuťové výbojky nebo diody. Výhodou laserů je vysoký výkon a monochromatické světlo, čemuž ovšem odpovídá i jejich vysoká cena. Rtuťové výbojky jsou oproti tomu mnohem levnější, avšak nevýhodou je nízká životnost a nutnost použití regulačních optických prvků. Kompromisem mohou být diody, které kombinují výhody obou výše zmíněných zdrojů. V současnosti proto byly výbojky již téměř nahrazeny diodami (Sysmex CZ, 2017). Nízký výkon jednotlivých diod se dá kompenzovat sdružováním do skupin (Suda, 2011).

Po excitaci fluorochromu je fluorescence částic sbírána sadou filtrů a zrcadel, díky měničům a fotonásobičům ji lze převést na elektrické pulsy a informaci následně digitalizovat a uložit do počítače (Suda, 2011). Od osmdesátých let minulého století jsou data ve většině případů ukládána ve formátu fcs (*flow cytometry standard*, Doležel et al., 2007b).

Výsledky měření jsou prezentovány nejčastěji ve formě histogramu, cytogramu nebo graficky náročnějšího 3D-grafu (Doležel et al., 2007a).

### 2.1 Příprava hmyzího materiálu

Zejména při transportu vzorků například při sběru v terénu může být problémem způsob jejich uchovávání, aby nedošlo k poškození tkáně, které by mohlo vést k chybám v měření. Ideální je samozřejmě použití čerstvého materiálu (Doležel a Bartoš, 2005), ovšem přeprava živého hmyzu do cílové laboratoře není vždy možná. V botanické praxi se pro některé účely osvědčilo i použití sušených vzorků (Suda, 2011). Při práci s hmyzem poskytuje výborné výsledky zmrazený materiál, jak prokázali Hanrahan a Johnston (2011). Při tomto způsobu uchovávání je ale důležité, aby další manipulace se vzorky probíhala na ledu. Živočišný materiál bývá na rozdíl od rostlinného také běžně fixován (Gregory, 2005). Používá se k tomu například směs ethanolu a kyseliny octové (Panzera et al., 2006), směs methanolu, formalinu a kyseliny octové (Hardie et al., 2002) a podobně.



Způsob přípravy materiálu se samozřejmě odvíjí i od cílů daného výzkumu. Pro účely určování absolutní velikosti genomu bývají nejčastěji použity celé hlavy zkoumaných jedinců (Gregory et al., 2013), případně pouze nervová tkáň (Hanrahan a Johnston, 2011) a v některých případech jsou jedinci (např. larvy) využiti i celí (Aron et al., 2003). V konkrétněji zaměřených studiích se setkáme i s analýzou jen určitých typů buněk, například spermií (Cournault a Aron, 2008) nebo buněk tukového tělíska (Nozaki a Matsuura, 2016).

Záměrem je obvykle získání suspenze neporušených buněčných jader (Loureiro et al., 2006). Buňky musíme nejprve homogenizovat, k čemuž je často využíváno tkáňového hmoždíře (Gregory et al., 2013), případně je materiál nasekán pomocí ostré žiletky (Suda, 2011), přičemž homogenizace probíhá ve vhodném izolačním roztoku (např. Galbraithův, Ottův, LB01 a další /Loureiro et al., 2006/). Jádra jsou posléze obarvena fluorochromem, je přidáno dostatečné množství ribonukleázy (Suda, 2011) a suspenze je přefiltrována například přes nylonovou síťku (Loureiro et al., 2006).

## **2.2 Barviva**

V cytometrii se používá celá řada fluorescenčních barviv (neboli fluorochromů), která se naváží na DNA studovaného objektu, a to buď neselektivně nebo přednostně k oblastem bohatým na A-T (případně G-C) báze (Suda, 2011).

Mezi neselektivně se vmezeující (interkalační) barviva patří například propidium jodid nebo ethidium bromid. Propidium jodid (často zmiňován pod zkratkou PI) je vzhledem ke své menší toxicitě používán více a při zjišťování velikosti genomu u hmyzu je zdaleka nejčastější volbou. Tato barviva jsou ovšem schopná vázat se i na RNA, kterou je třeba předem naštěpit pomocí ribonukleázy (Adan et al., 2016).

Oproti tomu DAPI, DIPI nebo Hoechst barvení můžeme použít v případě, že vyžadujeme, aby se fluorochrom preferenčně vázal na A-T bohaté úseky (Suda, 2011). Nejoblíbenější z těchto barviv je DAPI, jehož použití ovšem není doporučováno pro stanovování množství DNA (Johnston et al., 1999). Nicméně výsledné histogramy mají vysokou rozlišovací schopnost a jsou užitečné pro zjišťování dalších podrobností ohledně struktury genomu (Doležel et al., 1998).

Poslední a zřejmě nejméně používaný typ barviv (například olivomycin, chromomycin) se přednostně váže na G-C bohaté úseky (Suda, 2011).

## 2.3 Standardy

Hodnocení výsledků není možné bez porovnání se standardem – vzorkem, jehož parametry (počet chromozomů, velikost genomu) už předem známe (Doležel et al., 2007a).

Rozlišujeme standardizaci interní a externí. Při externí standardizaci probíhá příprava a měření vzorku a standardu nezávisle na sobě. Tento postup však není většinou autorů doporučován (Doležel et al., 2007, Suda, 2011). Za jediný vhodný postup je dnes považována standardizace interní, při které jsou vzorky ve vhodném poměru smíchány a jejich příprava i měření se odehrává současně (Doležel a Greilhuber, 2010).

Velikost genomu standardu a zkoumaného vzorku by měla být podobná, ovšem ne až natolik, aby se překrývaly vrcholy (neboli píky, z anglického *peak*) histogramů (Johnston et al., 1999). Doporučuje se minimální rozdíl 20 %, přičemž ideální se jeví rozdíl dvojnásobný (Suda, 2011, Doležel et al., 2007b). Kromě celkového množství DNA by se standard a vzorek měly navzájem podobat, i co se týče organizace chromatinu (Praça-Fontes et al., 2011). Ideální je vybrat si standard, který nám bude snadno dostupný v dostatečném množství.

Mezi nejčastěji používané nerostlinné standardy patří lidské leukocyty, erytrocyty pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) nebo kuřecí erytrocyty (Vindelov et al., 1983). Ve studiích týkajících se hmyzu můžeme kromě výše jmenovaných narazit na další různorodé standardy, nejhojněji používaným standardem je zde zřejmě *Drosophila melanogaster* (1C=175 Mb /Bennett et al., 2003/), ale své zastoupení má také *Drosophila virilis* (1C=328 Mb /Ellis et al., 2014/), šváb *Periplaneta americana* (1C=3338 Mb /Hanrahan a Johnston, 2011/) nebo i další standardy ze skupiny ryb, například čtverzubci (*Tetraodon fluviatilis* /Gregory a Johnston, 2008/, *Tetraodon nigroviridis* /Nardon et al., 2003/).

Mezi jednotlivými studii bohužel nepanuje shoda v použití těch kterých standardů a často ani v jejich C-hodnotách (Doležel et al., 1998, Johnston et al., 1999) což je zásadní problém, který komplikuje porovnávání jednotlivých výsledků (Doležel a Bartoš, 2005). Doležel a Greilhuber (2010) zastávají názor, že by se při výzkumu živočichů měl používat jako primární standard člověk (2C-hodnota u muže = 7,0 pg). Tato hodnota je sice nejspíš o něco vyšší, než odpovídá skutečnosti, nicméně jakmile bude velikost lidského genomu přesně známa, bude snadné výsledky založené na této standardizaci upravit.

Dostatečně přesně je ze sekvenačních projektů známa velikost genomu háďátka *Caenorhabditis elegans* (C-hodnota = 0,1 pg podle Equence et al., 1998). Ve srovnání s mnoha druhy je ovšem tato hodnota příliš nízká, než aby bylo možné háďátko využívat jako

standard (Doležel a Greilhuber, 2010). Lze však podle něj kalibrovat další standardy, jak bylo demonstrováno na příkladu huseníčku *Arabidopsis thaliana* (Bennett et al., 2003).

## **2.4 Výhody a nevýhody metody**

Mezi nesporné výhody průtokové cytometrie patří zejména snadná a rychlá příprava vzorků i rychlost samotné analýzy, což umožňuje měření desítek vzorků během jediného dne (Suda et al., 2007). Příprava a změření jednoho vzorku může dokonce trvat i méně než pět minut (Cournault a Aron, 2008). Díky analýze velkého množství částic ve vysoké rychlosti je navíc možné získat statisticky vysoce relevantní výsledky (Ciudad et al., 2002).

Při použití vhodných interních standardů, správné manipulaci se vzorky a s dobře seřízeným přístrojem můžeme dojít k velmi přesným výsledkům. Variační koeficient (neboli CV, podíl směrodatné odchylky a střední pozice píku /Watson, 1991/) při současných měřeních obvykle nepřesahuje hodnotu 3 % (Suda, 2011).

V neposlední řadě je předností této metody i její relativně nízká cena (pokud odhlédneme od pořizovací ceny samotného přístroje) (Suda, 2011).

Při použití cytometrie ke studiu hmyzu bohužel přicházíme o velkou výhodu botaniků – ohleduplnost ke studovaným objektům. Při použití části listového pletiva je poškození jedince (rostliny) většinou zanedbatelné, tudíž je metoda vhodná i ke zkoumání ohrožených druhů rostlin (Suda et al., 2007). Totéž se bohužel nedá říci o hmyzu, vzhledem ke skutečnosti, že většinou je k cytometrickému měření zapotřebí celá hlava daného jedince. Avšak v mnoha případech postačí i jedna končetina (Urfus, 2017, pers. comm.).

Nevýhodou průtokové cytometrie je nutnost uchování materiálu ve stavu přijatelném k měření, což do jisté míry ztěžuje práci v terénu (Doležel a Bartoš, 2005).

Průtoková cytometrie navíc neumožňuje přímo pozorovat studovaný objekt (Kron et al., 2007), což znesnadňuje například odlišení jedné větší částice od shluku několika menších částic (Suda, 2011).

Samotný přístroj je třeba pravidelně kalibrovat, aby se zajistila správnost měření (Macey, 2007). Kromě toho obsluha cytometru a interpretace získaných výsledků není zcela triviální a vyžaduje zkušenost (Suda, 2011).

### 3 Využití průtokové cytometrie

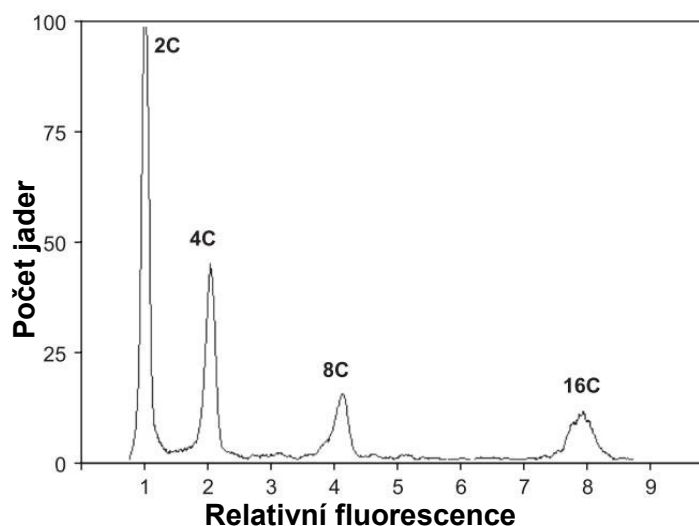
#### 3.1 Ploidie

Jednou z nejčastějších aplikací průtokové cytometrie je stanovení stupně ploidie, a to zejména u rostlin, u nichž běžně dochází k polyploidizaci, čili zmnožení sad chromozomů na více než dvě (Suda, 2011). U živočichů je tento jev mnohem méně častý, nicméně polyploidizace zřejmě i tak hrála významnou roli v evoluci některých hmyzích taxonů (Ghiselli et al., 2007). U hmyzu je polyploidie také často spojena s partenogenezí (Otto a Whitton, 2000), jak je tomu zřejmě například u strašilek (Phasmida) (Scali, 2009). Průtoková cytometrie může být skvělým nástrojem pro detailnější výzkum polyploidie, jejího vzniku a jejích souvislostí s dalšími vlastnostmi živých organismů (Mable et al., 2004). Získané údaje však musí být kalibrovány podle karyologicky ověřených standardů (Suda et al., 2006).

Průtoková cytometrie se uplatňuje například ve výzkumu hmyzu s haplo-diploidním určením pohlaví (Jacobson et al., 2013, Schrempf et al., 2006), u něhož jsme díky odhalení stupně ploidie schopni určit i pohlaví daného jedince (samice jsou typicky diploidní a samci haploidní /Butcher et al., 2000/).

Významnou oblastí výzkumu, ve které lze využít tuto metodu, je i studium endopolyploidie (pro příklad histogramu viz Obrázek 1) (Léry et al., 1999, Kathirithamby, 2004) tedy případu, kdy k reduplikaci sady chromozomů dochází jen v některých tkáních živočicha (Doležel et al., 2007a).

**Obrázek 1:** Příklad histogramu - detekce endopolyploidie v tkáních dělnice mravence *Atta texana*. Jednotlivé píky znázorňují jádra s 2C, 4C, 8C a 16C obsahem DNA. Převzato ze Scholes et al., (2013) a upraveno.



### 3.2 Velikost genomu

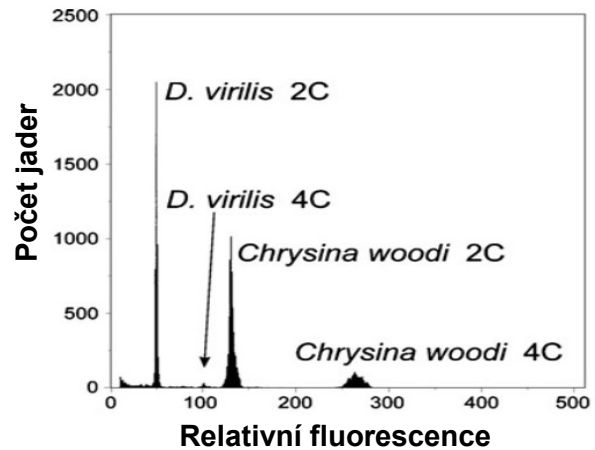
Zjištění absolutní velikosti genomu je nezbytné zejména v případě plánovaného celogenomového sekvenování, jelikož mnohé parametry včetně ceny závisí právě na množství DNA (Doležel a Greilhuber, 2010).

Velikost genomu obvykle popisuje tzv. C-hodnota (*C-value*), která je definována jako množství jaderné DNA nereplikované gametické buňky, nezávisle na stupni ploidie. Dále je používán termín C<sub>x</sub>-hodnota pro množství jaderné DNA monoploidní chromozomové sádky (Greilhuber et al., 2005). Vyjádřit se dá buď jako počet párů bází nebo jako hmotnost DNA v pikogramech, přičemž 1 pg odpovídá 978 megapárům bází (Doležel et al., 2003).

C-hodnota vykazuje mezi různými druhy obrovskou variabilitu, přičemž velikost genomu nesouvisí s komplexitou organismu. Tato takzvaná „*C-value enigma*“ (dříve známo také jako „*C-value paradox*“ /Thomas, 1971/) představuje problém, který se vědcům zatím nedaří uspokojivě vyřešit (Gregory, 2001). Ukázalo se, že existuje pozitivní vztah mezi velikostí genomu a velikostí buněk i buněčných jader a negativní vztah mezi velikostí genomu a rychlostí buněčného dělení (Gregory, 2002). V minulosti byly a stále jsou zkoumány možné korelace mezi velikostí genomu a dalšími vlastnostmi organismů (např. odolnost vůči podmínkám prostředí u rostlin /Suda, 2011/, velikost těla /Gregory, 2001/, rychlost vývoje /Gregory, 2005/ apod.). Významná část výzkumu se věnuje studiu vztahů mezi C-hodnotou a vlastnostmi samotného genomu, jako je například obsah genů a transpozonů, poměr párů bází nebo počet chromozomů (Gregory a Elliott, 2015).

Dříve se k měření obsahu DNA využívala například (mikro)denzitometrie s pomocí Feulgenova barvení, později také s přispěním obrazové analýzy (Gregory a Elliott, 2015). Nevýhodou této metody je především časová náročnost a složitější příprava vzorků (Hardie et al., 2002). Dnes se ukazuje, že průtoková cytometrie je nástrojem o poznání vhodnějším (Doležel et al., 2007b, Picard et al., 2012) (pro příklad histogramu viz Obrázek 2). Je nasnadě, že pro zjištění absolutní velikosti genomu je nejvhodnější použít neselektivně se vmezeřující fluorescenční barvivo.

**Obrázek 2:** Příklad histogramu - Zjištění velikosti genomu *Chrysina woodi* (čeleď vrubounovití) proti standardu *Drosophila virilis* (1C=328 Mb). Píky znázorňují počet jader v G1 fázi buněčného cyklu a 4C píky jádra v G2 fázi. Převzato z Hanrahan a Johnston, (2011) a upraveno.



V současnosti známé velikosti hmyzích genomů se pohybují od 0,07 pg (pakomár *Clunio tsushimensis* /Cornette et al., 2015/) do 16,93 pg (saranče *Podisma pedestris* /Westerman et al., 1987/). Animal Genome Size Database obsahuje v současné době 1345 naměřených hodnot pro organismy ze třídy hmyzu, z toho jen asi polovina byla zjištěna pomocí průtokové cytometrie (Gregory, 2017). Z přibližně 1 milionu známých hmyzích druhů se jedná jen o nepatrný zlomek. Vzhledem k tomu že skutečná diverzita je navíc odhadována na 2,6 až 7,8 milionů druhů (Stork et al., 2015), je zde skutečně velký prostor pro další výzkum.

### 3.3 Poměr párů bází

Při použití fluorescenčních barviv, které se preferenčně váží k A-T a G-C párům bází (viz výše), lze pomocí průtokové cytometrie zkoumat složení genomu co se týče poměru párů bází (Watson, 1991). Intenzita fluorescence ovšem v těchto případech není přímo úměrná obsahu bází (Doležel et al., 1992), proto je k získání konečného výsledku třeba použít vzorec pro přepočítání (podle Godelle et al., 1993). Tato analýza je na provedení také o něco náročnější než například stanovení velikosti genomu (Doležel et al., 2007a)

Genomy s neobvykle vysokým zastoupením A-T bází mohou být pozorovány u druhů odolnějších vůči vnějším podmínkám (Šmarda et al., 2008) a mohou mít souvislost se schopností kolonizovat nové prostředí (Sharaf et al., 2010). Je možné, že v některých případech může genom bohatý na A-T báze souviset i s přítomností intracelulárních bakterií rodu *Wolbachia* (Sharaf et al., 2010), které byly nalezeny u široké škály bezobratlých živočichů včetně hmyzu (Wu et al., 2004).

### **3.4 Další využití**

Kromě výše uvedených způsobů využití nachází průtoková cytometrie uplatnění i v celé řadě dalších oblastí výzkumu. Ty však nejsou v porovnání například s určováním velikosti genomu v entomologických studiích zdaleka tolik zastoupeny.

Tato metoda se dá využít pro zjištění míry kondenzace DNA například v odpovědi na teplotu (Jalal et al., 2015).

Cournault a Aron (2008) použili průtokovou cytometrii ke stanovení počtu spermií ve spermatékách mravenčích královen.

Další z možností je detekce virové infekce u studovaných buněk (Léry et al., 1999) nebo použití ke studiu kinetiky buněčného cyklu (Fertig et al., 1990).

## 4 Výsledky entomologických výzkumů

Nyní se budu zabývat konkrétními studiiemi z oblasti entomologie, které využily průtokovou cytometrii jako metodu pro výzkum hmyzu.

### 4.1 Velikost genomu

Jak už bylo řečeno, zdaleka nejčastější aplikací je stanovení absolutní velikosti genomu, přičemž tento způsob je přitažlivý zejména pro svou jednoduchost, rychlost a relativně nízké náklady.

#### 4.1.1 Studované taxony

##### 4.1.1.1 „Ametabola“

Pro apterygotní (ametabolní) hmyz dosud existuje jen několik málo záznamů. Z řádu rybenky (*Zygentoma*) je velikost genomu známa pouze u druhu *Thermobia domestica* (1C=3,09 pg /French a Manning, 1980/). Ze skupiny chvostnatky (*Archaeognatha*) jsou známy C-hodnoty u osmi druhů rodu *Machilis*, které se pohybují od 2,93 do 3,89 pg (Gassner et al., 2014).

##### 4.1.1.2 „Hemimetabola“

Hemimetabolní hmyz (neboli hmyz s proměnou nedokonalou) prochází při metamorfóze stádiem larvy nebo nymfy a dospělce, chybí stádium kukly.

Poměrně velká část publikovaných cytometrických výsledků se týká skupiny Hemiptera, a to zejména mšic a ploštic z podčeledi Triatominae, které fungují jako přenašeči prvoka (*Trypanosoma cruzi*), jenž je původcem Chagasovy choroby. Údaje z několika studií (Panzera et al., 2006, Bargues et al., 2006, Panzera et al., 2007) ukazují, že C-hodnoty ve skupině Triatominae kolísají zhruba od 0,66 pg do 2,7 pg, přičemž zatím největší naměřený genom patří druhu *Triatoma delpontei* (2,67 pg podle /Panzera et al., 2007/). Dále jsou známy hodnoty pro několik druhů ploštic čeledi klopukovití (*Miridae*) (He et al., 2016, Hanrahan a Johnston, 2011). Podřád mšicosaví (*Sternorrhynch*) je v cytometrických analýzách zastoupen poměrně hojně, například Wenger et al. (2017) publikovali velikosti genomu pro 19 druhů mšic, jejichž genomy jsou obecně poměrně malé (od 0,32 pg do 0,73 pg). Ostatní skupiny jako mery (Nakabachi et al., 2010), molice (Guo et al., 2015) nebo křísi (He et al., 2016) byly zkoumány spíše výjimečně. Výrazně z řady hemipterních genomů vybočují pouze cikády, u



kterých byly naměřeny C-hodnoty zhruba od 5 do 7 pg (Hanrahan a Johnston, 2011). Celkem vysokou (2,64 pg podle /Rodrigues et al., 2016/) C-hodnotu vykazuje také pěnodějka obecná (*Philaneus spumarius*).

Větší pozornost byla věnována také řádu rovnokřídlí (Orthoptera), z níž pochází i dosud největší změřený hmyzí genom (toto prvenství patří druhu *Podisma pedestris*, 16,93 pg /Westerman et al., 1987/). Rovnokřídlý hmyz má genomy signifikantně větší (často přesahující 6 pg) než jiné hmyzí skupiny (Hanrahan a Johnston, 2011). Menší hodnoty najdeme zejména u čeledi cvrčkovití (Gryllidae) (Gregory, 2017).

Velikostí genomu u švábů (Blattodea) se zabývalo několik studií (Koshikawa et al., 2008, Hanrahan a Johnston, 2011), přičemž Hanrahan a Johnston (2011) navrhli druh *Periplaneta americana* jako dobrý standard pro měření druhů s obsahem DNA nad 2000 Mb.

U termitů (Isoptera) položili dobrý základ budoucímu výzkumu Koshikawa et al. (2008) ve studii čítající 14 druhů termitů.

Řád strašilky (Phasmatodea) je reprezentován hlavně studií zkoumající vnitrodruhové rozdíly ve velikosti genomu u druhu *Bacillus atticus* (Marescalchi et al., 1998).

Několik druhů bylo studováno i v řádu kudlanky (Mantodea) (Hanrahan a Johnston, 2011, Koshikawa et al., 2008) a trásněnky (Thysanoptera /Jacobson et al., 2013/).

Nejmenší doposud studované genomy hemimetabolního hmyzu patří lidským parazitům – vším (*Pediculus humanus humanus* a *Pediculus humanus capitis* z řádu Phthiraptera s C-hodnotou odpovídající 0,11 pg /Johnston et al., 2007/).

Mnohé řády jsou z tohoto hlediska dosud téměř úplně nebo i zcela ignorovány, například u jepic (Ephemeroptera) byla publikována pouze jediná hodnota (Hanrahan a Johnston, 2011), navíc aniž by byl přesně identifikován druh. Situace s jedním analyzovaným druhem se opakuje i ve skupinách snovatek (Embioptera), drobnělek (Zoraptera) a škvorů (Dermaptera) (Hanrahan a Johnston, 2011). Žádné výsledky zřejmě neexistují ze skupin pošvatek (Plecoptera), strašilkovců (Mantophasmatodea), cvčkovců (Grylloblattodea) ani pisivek (Psocoptera). A konečně pro řád vážky (Odonata) existuje na Animal Genome Size Database poměrně hodně záznamů, nicméně žádný nebyl získán za přispění průtokové cytometrie (Gregory, 2017).

#### **4.1.1.3 „Holometabola“**

Poslední velkou skupinou je holometabolní hmyz, čili hmyz s proměnou dokonalou, při které jedinec prochází stádiem larvy, kukly a dospělého.

Do tohoto okamžiku byla průtoková cytometrie nejčastěji použita ke studiu důležitého a početného řádu dvoukřídlí (Diptera). Animal Genome Size Database čítá v současnosti téměř 300 výsledků získaných tímto způsobem (Gregory, 2017). Do tohoto řádu patří zatím nejmenší známé hmyzí genomy s C-hodnotou nedosahující ani 0,1 pg (Gregory, 2017). Prvenství v tuto chvíli drží druh *Clunio tsushimensis*, jehož C-hodnota odpovídá 0,07 pg (Cornette et al., 2015). I ostatní druhy z čeledi pakomárovití (Chironomidae) vykazují velmi malé velikosti genomů (maximálně 0,2 pg /Cornette et al., 2015/). Větší počet studií byl zaměřen na čeleď octomilkovití (Drosophilidae) (např. Nardon et al., 2005, Boulesteix et al., 2006, Gregory a Johnston, 2008, Ellis et al., 2014, Jalal et al., 2015). Výsledky těchto výzkumů nyní tvoří většinu informací z Animal Genome Size Database pro dipterní hmyz (Gregory, 2017). Octomilkovití se pohybují v rozmezí C-hodnot od 0,13 pg (*Drosophila buzzatii* /Guillén et al., 2014/ nebo *D. mercatorum* /Bosco et al., 2007/) do 0,41 pg (*D. cyrtoloma* /Craddock et al., 2016/). V této čeledi byly navíc pozorovány i významné vnitrodruhové rozdíly ve velikostech genomu (Bosco et al., 2007, Ellis et al., 2014, Jalal et al., 2015). Kromě octomilek a jejich příbuzných byly zkoumány i další dipterní skupiny, například kmitalkovití (Sepsidae /Su et al., 2016/), moučkovití (Muscidae /Picard et al., 2012/), hrbilkovití (Phoridae /Hanrahan a Johnston, 2011/) nebo bzučivkovití (Calliphoridae /Picard et al., 2012/), z nichž mnohé zahrnují druhy důležité ve forenzní entomologii (Picard et al., 2012). Měření velikosti genomu proběhlo i pro několik druhů bodalek rodu *Glossina* (Aksoy et al., 2005), což jsou přenašeči trypanosom způsobujících například spavou nemoc. Existuje poměrně velké množství záznamů pro čeleď komárovití (Culicidae), avšak nikoli na základě průtokové cytometrie (Gregory, 2017).

Řád blanokřídlých (Hymenoptera) se jako jedna z nejvýznamnějších a druhově bohatých skupin hmyzu pochopitelně těší velké pozornosti vědců. Výjimkou není ani výzkum velikosti genomu za použití průtokové cytometrie. Při nahlédnutí do Animal Genome Size Database můžeme nalézt 187 výsledků získaných touto metodou a je dobře patrné, že C-hodnota u blanokřídlého hmyzu jen málokdy přesahuje 1 pg (Gregory, 2017). V dosud největší studii na toto téma byly publikovány velikosti genomů 89 druhů blanokřídlého hmyzu ze 17 různých čeledí včel, chalcidek, lumků a vos, včetně 29 druhů mravenců (Ardila-Garcia et al., 2010), přičemž se autoři zároveň věnovali i možné souvislosti velikosti genomu s parazitickým způsobem života, případně s eusocialitou. Hanrahan a Johnston (2011) doplnili dalších několik druhů z různých čeledí. Další výzkumné projekty (Lopes et al., 2009, Tavares et al., 2010, Tavares et al., 2012) se týkaly konkrétně včel tribu Meliponini, z podstatné části

přímo rodu *Melipona*. C-hodnoty se pohybovaly od 0,26 pg u druhu *Paratigona subnuda* (Tavares et al., 2010) do 1,38 pg u *Melipona capixaba* (Tavares et al., 2012). Ve studii zkoumající 40 druhů mravenců (Tsutsui et al., 2008) byly prezentovány C-hodnoty mezi 0,22 pg (*Dorymyrmex bicolor*) a 0,7 pg (*Ectatomma tuberculatum*). Do tohoto rozmezí spadají i 3 druhy rodu *Mycetophylax* (Cardoso et al., 2012). Další výzkum byl zaměřen na skupiny blanokřídlých parazitoidů, jmenovitě na rod *Aphelinus* (parazitoidi mšic, C-hodnoty mezi 0,34 pg a 0,5 pg /Ashman et al., 2014/) a rody *Ganaspis* (0,98 pg) a *Leptopilina* (0,37 až 0,53 pg)(Gokhman et al., 2011), což jsou parazitoidi octomilek.

Druhově nejbohatším řádem hmyzu jsou brouci (Coleoptera /Stork et al., 2015/) a zájem o ně tomu odpovídá. Podle Animal Genome Size Database bylo dosud pomocí průtokové cytometrie získáno celkem 100 velikostí broučích genomů (Gregory, 2017). Velké zásluhy na tom opět nesou Hanrahan a Johnston (2011), kteří změřili C-hodnoty u více než šedesáti druhů. Nejmenší z nich dosahovala 0,16 pg a patřila druhu *Oryzaephilus surinamensis*, tento výsledek se shoduje i s dřívějšími měřeními (Sharaf et al., 2010). Nejvyšší hodnotou se pyšní druh *Cybister fimbriolatus* s 2,64 pg, přičemž není bez zajímavosti, že je tak jedním z mála druhů holometabolního hmyzu s velikostí genomu přesahující 2 pg. Mezi tyto hodnoty dobře zapadají i výsledky dalších studií (Gregory et al., 2013, Sota et al., 2013, Arnqvist et al., 2015, Matsubayashi a Ohshima, 2015, He et al., 2016).

Motýli (Lepidoptera), se i přes své druhové bohatství nemohou pochlubit tak velkým množstvím dat, jaké máme k dispozici pro dvoukřídlé, brouky nebo blanokřídlé. Naměřené C-hodnoty v této skupině také jen zřídka přesahují 1 pg (Gregory, 2017). Hanrahan a Johnston (2011) poskytli ve své studii údaje pro 21 druhů, z nichž nejmenší byl genom druhu *Jalmenus evagoras* (C-hodnota=0,23 pg) a největší patřil druhu *Acrobasis nuxvorella* (C-hodnota=0,73 pg). O další druhy rozšířili škálu výsledků také Calatayud et al. (2016).

Z řádu blech (Siphonaptera) zatím existuje jediný údaj – C-hodnota rovna 0,47 pg pro druh *Ctenocephalides felis* (Hanrahan a Johnston, 2011). Ze stejné studie pochází i výsledky pro jediný dosud zastoupený druh řádu srpice (Mecoptera) - *Panorpa nuptialis* (2,18 pg u samice a 1,93 pg u samce). Velmi malé genomy (0,11-0,13 pg) patří v tomto směru dosud málo prozkoumanému řádu Strepsiptera (Kathirithamby, 2004).

A nakonec pro řády chrostíků (Trichoptera), střechatek (Megaloptera), dlouhošíjek (Raphidioptera) a síťokřídlých (Neuroptera) neposkytuje Animal Genome Size Database v současné době žádné údaje (Gregory, 2017).

### 4.1.2 Holometabola vs. hemimetabola

Z dosavadních výsledků vyplývá určitý trend ve velikosti hmyzích genomů, a sice že hemimetabolní hmyz má obecně větší genomy než hmyz holometabolní. Na základě toho byla navržena hypotéza, že u hmyzu s proměnou dokonalou může existovat určité omezení velikosti genomu (zhruba na maximální 2 pg), které má zřejmě souvislost právě s metamorfózou, při níž hmyz prochází stádiem kukly (Gregory, 2002, 2005). Jedná se ovšem o trend, nikoli o pravidlo (Hanrahan a Johnston, 2011) a ne všechna data do tohoto trendu zapadají. Výjimky tvoří například potápník druhu *Cybister fimbriolatus* (C-hodnota=2,64 pg) nebo srpice *Panorpa nuptialis* (C-hodnota=2,18 pg u samice)(Hanrahan a Johnston, 2011).

Samozřejmě dosud existují i celé taxonomické skupiny hmyzu bez jakýchkoli záznamů o velikosti genomu (Gregory, 2017) a bez dalšího výzkumu by bylo předčasné dospět v tomto směru k obecným závěrům. Bude třeba uskutečnit další studie velikostí genomů, které pokryjí dosud neprozkoumané taxony, aby bylo možné tomuto fenoménu plně porozumět.

### 4.1.3 Samci vs. samice

U celé řady druhů byly ve velikostech genomů pozorovány rozdíly mezi pohlavími (Hanrahan a Johnston, 2011, Picard et al., 2012), které pramení z přítomnosti heteromorfních pohlavních chromosomů (Sharaf et al., 2010) nebo z rozdílu počtu chromosomů (He et al., 2016). Ještě výraznější jsou samozřejmě rozdíly mezi samci a samicemi u hmyzu s haplo-diploidním systémem určení pohlaví. Arnqvist et al. (2015) testovali hypotézu, že dimorfismus ve velikosti genomu souvisí s pohlavním dimorfismem ve velikosti těla, nicméně jejich data tuto hypotézu nepotvrdila.

Znalost těchto rozdílů může být užitečná při určování pohlaví jedinců, zejména u larev, u nichž je často obtížné až nemožné určit pohlaví na základě morfologických znaků (Picard et al., 2012). U haplo-diploidního hmyzu může být průtoková cytometrie dobrým nástrojem při výzkumu tzv. *sex allocation*, čili poměru investic do jednotlivých pohlaví při reprodukci. Právě za tímto účelem využili cytometrii Aron et al. (2003) pro zjištění poměru pohlaví ve snůšce mravenců a mezi mravenčími larvami různého stáří.

### 4.1.4 Velikost genomu a parazitismus

Menší velikost genomu koreluje s menšími buňkami, které jsou schopny se rychleji dělit (Gregory, 2005). Tyto vlastnosti mohou být výhodné pro parazitické organismy

(Gregory, 2002) a u parazitů a parazitoidů byly skutečně často zaznamenány malé genomy (Johnston et al., 2007).

Ardila-Garcia et al. (2010) testovali vztah mezi velikostí genomu a parazitickým způsobem života na parazitoidech z řádu Hymenoptera. Ukázalo se, že ne u všech parazitoidů lze nalézt malé genomy (u chalcidek se hodnoty vyšplhaly až na 0,75 pg /Ardila-Garcia et al., 2010/ a poměrně vysokých hodnot dosahují například i žlabatky rodu *Leptopilina* /Gokhman et al., 2011/), a tudíž parazitismus zřejmě není jediným faktorem, který může působit na omezení velikosti genomu.

Výzkum parazitických druhů je významný zejména proto, že poznatky v něm získané mohou být v praxi využity například pro boj se škůdci či vektory významných onemocnění (Panzera et al., 2007).

#### **4.1.5 Další souvislosti**

Podobně jako v případě parazitismu se spekulovalo i o možnosti, že malé genomy některých druhů hmyzu mohou mít souvislost s eusocialitou (Koshikawa et al., 2008). Tento vztah však zatím zůstává nepotvrzen (Ardila-Garcia et al., 2010) a může tak být předmětem případných budoucích studií, které mohou osvětlit mechanismy, jež vedly ke vzniku eusociálního způsobu života u hmyzu.

Obsah DNA může mít i zajímavé ekologické souvislosti. Například Sharaf et al. (2010) se věnovali velikostem genomu u druhu *Oryzaephilus surinamensis* (lesák skladištní). Populace těchto škůdců v sýpkách vykazovaly signifikantně menší velikosti genomů než populace volně žijící.

Lynch a Conery (2003) pozorovali negativní korelaci mezi velikostí genomu a efektivní velikostí populace.

Výsledky výzkumu také naznačují vztah mezi větší velikostí genomu a polyfágií u motýlů (Lepidoptera)(Calatayud et al., 2016).

Studována byla i souvislost mezi velikostí genomu a atraktivitou samčí stridulace u sarančat druhu *Chorthippus biguttulus*, přičemž bylo zjištěno, že atraktivnější samci mají menší genomy (Schielzeth et al., 2014). To naznačuje, že pohlavní výběr může působit na velikost genomu. Výsledky této studie byly ale později zpochybněny a autorům byly vytknuty technické nedostatky v postupu a chybná interpretace naměřených dat (Camacho, 2016).

U brouků z čeledi zrnokazovitých (Bruchidae) byla pozorována korelace mezi velikostí genomu a reprodukční fitness samců i samic (Arnqvist et al., 2015).

Další studie naznačuje třeba i možný pozitivní vztah mezi velikostí genomu a velikostí těla a délkou spermie u octomilek (Gregory a Johnston, 2008). Kromě toho z výsledků vyplývá i skutečnost, že druhy s menším genomem se za konstantní teploty vyvíjejí rychleji (Gregory a Johnston, 2008).

## **4.2 Ostatní aplikace**

Přestože se většina publikovaných výsledků týká především velikosti genomu, nebylo by správné opomíjet ostatní oblasti studia hmyzu, ve kterých průtoková cytometrie také nachází uplatnění.

### **4.2.1 Ploidie**

Jak již bylo zmíněno, u hmyzu s haplo-diploidním určením pohlaví můžeme díky poměrně prostému zjištění stupně ploidie rozlišit pohlaví jedinců. Tato metoda byla s úspěchem aplikována na larvy mravenců (Aron et al., 2003, Aron et al., 2004) a hodí se i k výzkumu dalších sociálních i solitérních blanokřídlých (Aron et al., 2003). Ačkoli i u velmi mladých larev fungovala tato metoda dobře, ploidiu vajíček se změřit nepodařilo (Aron et al., 2003). Nicméně tento problém se v pozdějším výzkumu podařilo překonat (Schrempf et al., 2006).

Haplo-diploidní způsob určení pohlaví byl díky průtokové cytometrii potvrzen u tří druhů ze skupiny Thysanoptera a u druhu *Thrips tabaci* byla zdokumentována polyploidie (Jacobson et al., 2013).

Cournault a Aron (2008) využili této metody pro detekci diploidních spermií ve spermatékách královen pěti druhů mravenců. Otázka, zda diploidní samci u těchto druhů vždy produkují diploidní spermie, zůstává zatím nezodpovězená.

Polyploidie bývá často spojena s partenogenezí (Otto a Whitton, 2000), což je případ například mnohých strašilek (Ghiselli et al., 2007), ale partenogenetické druhy nemusí být polyploidní vždy, jak ukázal například výzkum chvostnatek rodu *Machilis*.

Výskyt endopolyploidie byl za přispění průtokové cytometrie dosud zkoumán u některých motýlů, brouků, dvoukřídlých, mravenců a čmeláků (Léry et al., 1999, Jalal et al., 2015, Scholes et al., 2013, Aron et al., 2005). Polyploidní buňky tukového tělíska jsou přítomny u královen některých termitů (Nozaki a Matsuura, 2016), přičemž polyploidizace zde může mít adaptivní funkci ve smyslu navýšení produkce vajíček.

#### **4.2.2 Počet spermií**

Kromě zjištění ploidie využili Cournault a Aron (2008) průtokovou cytometrii i ke stanovení počtu spermií uložených ve spermatékách královen pěti druhů mravenců, přičemž pozorovali signifikantně vyšší počty u královen monogynních druhů (*Lasius niger*, *Crematogaster scutellaris*). Je pravděpodobné, že existuje souvislost mezi vyšším množstvím spermií a skutečností, že se jedná o druhy, které vytvářejí velké kolonie a jejich královny žijí dlouho.

#### **4.2.3 Detekce přítomnosti viru**

Ukázalo se, že tato metoda může být vhodná i pro prokázání virové infekce u hmyzích buněk. Léry et al. (1999) vyzkoušeli tuto aplikaci při detekci nukleopolyhedroviru pocházejícího z můry druhu *Autographa californica*.

#### **4.2.4 Poměr párů bází**

Průtoková cytometrie nabízí zajímavý způsob, jak zkoumat složení genomu z hlediska poměru párů bází. Z enomologických studií však tento směr výzkumu představuje jen malý zlomek. Genom neobvykle bohatý na A-T báze byl nalezen u lesáka skladištního (*Oryzaephilus surinamensis*) (Sharaf et al., 2010).

## 5 Závěr

Průtoková cytometrie je elegantní výzkumná metoda, která poskytuje mnohé výhody, a je pravděpodobné, že ve studiu hmyzu bude v budoucnu hrát čím dál větší roli.

Ve své práci jsem se snažila vytvořit především přehled způsobů, jakými průtoková cytometrie přispěla a může dále přispívat k rozšiřování poznatků na poli vědy. Zdaleka nejzásadněji se dosud promítla do oblasti výzkumu velikostí hmyzích genomů. Výsledky zde zmíněných výzkumných projektů významně navýšily počty známých C-hodnot pro mnoho skupin hmyzu. Ačkoli je vzhledem k obrovské hmyzí diverzitě stále velký prostor pro další práci, můžeme současný stav považovat za dobrý začátek. Čím více hodnot budeme mít v tomto směru k dispozici, tím snazší bude i výzkum vztahů velikosti genomu s ekologickými, morfologickými a dalšími znaky hmyzu.

Mezi méně zastoupené aplikace této metody patří například stanovení ploidního stupně či určení poměru párů bází. Nadějnou budoucnost v tomto směru vidím například ve výzkumu evoluce eusociality, parazitismu a haplo-diploidního určení pohlaví.

Cytometrické údaje mohou být užitečné při výběru druhů vhodných k sekvenaci genomu a dále v praxi také pro boj se škůdci, parazity a přenašeči nemocí. Kromě toho nám podrobnější znalosti o velikostech a struktuře genomů mohou pomoci lépe osvětlit fenomén tzv. „*C-value enigmy*“.

V budoucnu bych se v rámci své diplomové práce ráda věnovala průtokové cytometrii, přičemž bych chtěla přispět k rozšíření souboru velikostí genomu organismů ze třídy hmyzu, a to buď napříč skupinami, nebo detailněji v rámci některého konkrétního taxonu.



## 6 Literatura

Sekundární citace jsou označeny hvězdičkou \*

- \*Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., a Nalbant, A. (2016). Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 8551, 1–14.
- Aksoy, S., Berriman, M., Hall, N., Hattori, M., Hide, W., a Lehane, M.J. (2005). A case for a *Glossina* genome project. *Trends Parasitol.* 21, 107–111.
- Ardila-Garcia, A.M., Umphrey, G.J., a Gregory, T.R. (2010). An expansion of the genome size dataset for the insect order Hymenoptera, with a first test of parasitism and eusociality as possible constraints. *Insect Mol. Biol.* 19, 337–346.
- Arnqvist, G., Sayadi, A., Immonen, E., Hotzy, C., Rankin, D., Tuda, M., Hjelmen, C.E., a Johnston, J.S. (2015). Genome size correlates with reproductive fitness in seed beetles. *Proc. Biol. Sci.* 282.
- Aron, S., De Menten, L., a Van Bockstaele, D. (2003). Brood sex ratio determination by flow cytometry in ants. *Mol. Ecol. Notes* 3, 471–475.
- Aron, S., Passera, L., a Keller, L. (2004). Evolution of miniaturisation in inquiline parasitic ants: Timing of male elimination in *Plagiolepis pygmaea*, the host of *Plagiolepis xene*. *Insectes Soc.* 51, 395–399.
- Aron, S., De Menten, L., Van Bockstaele, D.R., Blank, S.M., a Roisin, Y. (2005). When hymenopteran males reinvented diploidy. *Curr. Biol.* 15, 824–827.
- Ashman, T.-L., Bachtrog, D., Blackmon, H., Goldberg, E.E., Hahn, M.W., Kirkpatrick, M., Kitano, J., Mank, J.E., Mayrose, I., Ming, R., et al. (2014). Variation in genome size and karyotype among closely related aphid parasitoids (Hymenoptera, Aphelinidae). *Comp. Cytogenet.* 1, 1–8.
- Bargues, M.D., Klisiowicz, D.R., Panzera, F., Noireau, F., Marcilla, A., Perez, R., Rojas, M.G., O'Connor, J.E., Gonzalez-Candelas, F., Galvão, C., et al. (2006). Origin and phylogeography of the Chagas disease main vector *Triatoma infestans* based on nuclear rDNA sequences and genome size. *Infect. Genet. Evol.* 6, 46–62.
- Bennett, M.D., Leitch, I.J., Price, H.J., a 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. *Ann. Bot.* 5, 547–557.
- Bosco, G., Campbell, P., Leiva-Neto, J.T., a Markow, T.A. (2007). Analysis of *Drosophila* species genome size and satellite DNA content reveals significant differences among strains as well as between species. *Genetics* 177, 1277–1290.
- Boulesteix, M., Weiss, M., a Biéumont, C. (2006). Differences in genome size between closely related species: The *Drosophila melanogaster* species subgroup. *Mol. Biol. Evol.* 162–167.
- Butcher, R.D.J., Whitfield, W.G.F., a Hubbard, S.F. (2000). Complementary sex determination in the genus *Diadegma* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *J. Evol. Biol.* 13, 593–606.

- Calatayud, P.A., Petit, C., Burlet, N., Dupas, S., Glaser, N., Capdevielle-Dulac, C., Le Ru, B., Jacquin-Joly, E., Kaiser-Arnauld, L., Harry, M., et al. (2016). Is genome size of Lepidoptera linked to host plant range? *Entomol. Exp. Appl.* *159*, 354–361.
- Camacho, J.P.M. (2016). Comment on Schielzeth et al. (2014): “Genome size variation affects song attractiveness in grasshoppers: Evidence for sexual selection against large genomes”. *Evolution* (N. Y.). *70*, 1428–1430.
- Cardoso, D.C., Carvalho, C.R., Cristiano, M.P., Soares, F.A.F., a Tavares, M.G. (2012). Estimation of nuclear genome size of the genus *Mycetophylax* Emery, 1913: Evidence of no whole-genome duplication in Neoattini. *Comptes Rendus - Biol.* *335*, 619–624.
- Ciudad, J., Cid, E., Velasco, A., Lara, J.M., a Orfao, A. (2002). Flow Cytometry Measurement of the DNA Contents of G0 / G1 Diploid Cells From Three Different Teleost Fish Species. *Cytometry* *25*, 20–25.
- Cornette, R., Gusev, O., Nakahara, Y., Shimura, S., Kikawada, T., a Okuda, T. (2015). Chironomid Midges (Diptera, Chironomidae) Show Extremely Small Genome Sizes. *Zool. Sci.* *32*, 248–254.
- Cournault, L., a Aron, S. (2008). Rapid determination of sperm number in ant queens by flow cytometry. *Insectes Soc.* 283–287.
- Craddock, E.M., Gall, J.G., a Jonas, M. (2016). Hawaiian *Drosophila* genomes: size variation and evolutionary expansions. *Genetica* *144*, 107–124.
- \*Doležel, J., a Bartoš, J. (2005). Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Ann. Bot.* *95*, 99–110.
- \*Doležel, J., a Greilhuber, J. (2010). Nuclear genome size: Are we getting closer? *Cytom. Part A* *77*, 635–642.
- Doležel, J., Sgorbati, S., a Lucretti, S. (1992). Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiol. Plant.* *85*, 625–631.
- Doležel, J., Greilhuber, J., Meister, A., Lysák, M.A., Nardi, L., Obermayer, R., a Lucretti, S. (1998). Plant Genome Size Estimation by Flow Cytometry: Inter-laboratory Comparison. *Ann. Bot.* *82*, 17–26.
- Doležel, J., Bartoš, J., Voglmayr, H., a Greilhuber, J. (2003). Nuclear DNA Content and Genome Size of Trout and Human. *Cytom. Part A* *51A*, 127–128.
- \*Doležel, J., Greilhuber, J., a Suda, J. (2007a). *Flow Cytometry with Plant Cells* (Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH).
- Doležel, J., Greilhuber, J., a Suda, J. (2007b). Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nat. Protoc.* *2*, 2233–2244.
- Ellis, L.L., Huang, W., Quinn, A.M., Ahuja, A., Alfrejd, B., Gomez, F.E., Hjelman, C.E., Moore, K.L., Mackay, T.F.C., Johnston, J.S., et al. (2014). Intrapopulation Genome Size Variation in *D. melanogaster* Reflects Life History Variation and Plasticity. *PLoS Genet.* *10*.
- Equence, C.E.S., Iology, T.O.B., The, C., Consortium, S., a Consortium, T.C. elegans S. (1998). Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*: A Platform for Investigating Biology. *Science* *282*, 2012–2018.

- Fertig, G., Klöppinger, M., a Miltenburger, H.G. (1990). Cell cycle kinetics of insect cell cultures compared to mammalian cell cultures. *Exp. Cell Res.* 189, 208–212.
- French, C.K., a Manning, J.E. (1980). DNA sequence organization in the *Thysanura Thermobia domestica*. *J. Mol. Evol.* 15, 277–289.
- Gassner, M., Dejaco, T., Schoenswetter, P., Marec, F., Arthofer, W., Schlick-Steiner, B.C., a Steiner, F.M. (2014). Extensive variation in chromosome number and genome size in sexual and parthenogenetic species of the jumping-bristletail genus *Machilis* (Archaeognatha). *Ecol. Evol.* 4, 4093–4105.
- Ghiselli, F., Milani, L., Scali, V., a Passamonti, M. (2007). The *Leptynia hispanica* species complex (Insecta Phasmida): Polyploidy, parthenogenesis, hybridization and more. *Mol. Ecol.* 16, 4256–4268.
- Godelle, B., Cartier, D., Marie, D., Brown, S.C., a Siljak-Yakovlev, S. (1993). Heterochromatin study demonstrating the nonlinearity of fluorometry useful for calculating genomic base composition. *Cytometry* 14, 618–626.
- Gokhman, V.E., Johnston, J.S., Small, C., Rajwani, R., Hanrahan, S.J., a Govind, S. (2011). Genomic and karyotypic variation in *Drosophila* parasitoids (Hymenoptera, Cynipoidea, Figitidae). *Comp. Cytogenet.* 5, 211–221.
- \*Gregory, T.R. (2001). Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cellsize, and the C-value enigma. *Biol. Rev.* 76, 65–101.
- \*Gregory, T.R. (2002). Genome size and developmental complexity. *Genetica* 115, 131–146.
- \*Gregory, T.R. (2005). The C-value enigma in plants and animals: A review of parallels and an appeal for partnership. *Ann. Bot.* 133–146.
- Gregory, T.R., a Elliott, T.A. (2015). What's in a genome? The C-value enigma and the evolution of eukaryotic genome content. *Philos. Trans. R. Soc. B* 370.
- Gregory, T.R., a Johnston, J.S. (2008). Genome size diversity in the family *Drosophilidae*. *Heredity* (Edinb). 101, 228–238.
- Gregory, T.R., Nathwani, P., Bonnett, T.R., a Huber, D.P.W. (2013). Sizing up arthropod genomes: an evaluation of the impact of environmental variation on genome size estimates by flow cytometry and the use of qPCR as a method of estimation. *Genome* 505–510.
- \*Greilhuber, J., Doležel, J., Lysák, M.A., a Bennett, M.D. (2005). The origin, evolution and proposed stabilization of the terms „genome size" and „C-value" to describe nuclear DNA contents. *Ann. Bot.* 255–260.
- Guillén, Y., Rius, N., Delprat, A., Williford, A., Muyas, F., Puig, M., Casillas, S., Ràmia, M., Egea, R., Negre, B., et al. (2014). Genomics of ecological adaptation in cactophilic *Drosophila*. *Genome Biol. Evol.* 7, 349–366.
- Guo, L.T., Wang, S.L., Wu, Q.J., Zhou, X.G., Xie, W., a Zhang, Y.J. (2015). Flow cytometry and K-mer analysis estimates of the genome sizes of *Bemisia tabaci* B and Q (Hemiptera: Aleyrodidae). *Front. Physiol.* 6, 1–7.
- Hanrahan, S.J., a Johnston, J.S. (2011). New genome size estimates of 134 species of arthropods. *Chromosom. Res.* 19, 809–823.
- \*Hardie, D.C., Gregory, T.R., a Hebert, P.D.N. (2002). From Pixels to Picograms: A

- Beginners' Guide to Genome Quantification by Feulgen Image Analysis Densitometry. *J. Histochem. Cytochem.* 50, 735–749.
- He, K., Lin, K., Wang, G., a Li, F. (2016). Genome Sizes of Nine Insect Species Determined by Flow Cytometry and k-mer Analysis. *Front. Physiol.* 7, 1–7.
- Jacobson, A.L., Johnston, J.S., Rotenberg, D., Whitfield, A.E., Booth, W., Vargo, E.L., a Kennedy, G.G. (2013). Genome size and ploidy of Thysanoptera. *Insect Mol. Biol.* 22, 12–17.
- Jalal, M., Andersen, T., a Hessen, D.O. (2015). Temperature and developmental responses of body and cell size in *Drosophila*; effects of polyploidy and genome configuration. *J. Therm. Biol.* 51, 1–14.
- Johnston, J.S., Bennett, M.D., Rayburn, A.L., Galbraith, D.W., a Price, H.J. (1999). Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei - flow cytometry. *Am. J. Bot.* 86, 609–613.
- Johnston, J.S., Yoon, K.S., Strycharz, J.P., Pittendrigh, B.R., a Clark, J.M. (2007). Body lice and head lice (Anoplura: Pediculidae) have the smallest genomes of any hemimetabolous insect reported to date. *J. Med. Entomol.* 44, 1009–1012.
- Kathirithamby, J. (2004). Tiny genomes and endoreduplication in Strepsiptera. *Insect Mol. Biol.* 13, 581–585.
- Koshikawa, S., Miyazaki, S., Cornette, R., Matsumoto, T., a Miura, T. (2008). Genome size of termites (Insecta, Dictyoptera, Isoptera) and wood roaches (Insecta, Dictyoptera, Cryptocercidae). *Naturwissenschaften* 95, 859–867.
- \*Kron, P., Suda, J., a Husband, B.C. (2007). Applications of Flow Cytometry to Evolutionary and Population Biology. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 38, 847–876.
- Léry, X., Charpentier, G., a Belloncik, S. (1999). DNA content analysis of insect cell lines by flow cytometry. *Cytotechnology* 29, 103–113.
- Lopes, D.M., de Carvalho, C.R., Clarindo, W.R., Praça, M.M., a Tavares, M.G. (2009). Genome size estimation of three stingless bee species (Hymenoptera, Meliponinae) by flow cytometry. *Apidologie* 40, 517–523.
- Loureiro, J., Rodriguez, E., Doležel, J., a Santos, C. (2006). Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. *Ann. Bot.* 98, 679–689.
- Lynch, M., a Conery, J.S. (2003). The Origins of Genome Complexity. *Science* (80- ). 302, 1401–1404.
- \*Mable, B.K., Leitch, a R., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Leitch, I.J., a Pires, J.C. (2004). Biological relevance of polyploidy: ecology to genomics Edited „Why polyploidy is rarer in animals than in plants": myths and mechanisms. *Biol. J. Linn. Soc. Biol. J. Linn. Soc. Blackwell Sci.* 82, 453–466.
- \*Macey, M.G. (2007). *Flow Cytometry - Principles and Applications* (Totowa, N.J.: Humana Press).
- Marescalchi, O., Scali, V., a Zuccotti, M. (1998). Flow-cytometric analyses of intraspecific genome size variations in *Bacillus atticus* (Insecta, Phasmatodea). *Genome* 41, 629–635.
- Matsubayashi, K.W., a Ohshima, I. (2015). Genome size increase in the phytophagous

- ladybird beetle *Henosepilachna vigintioctomaculata* species complex (Coleoptera: Coccinellidae). *Entomol. Sci.* 18, 134–137.
- Nakabachi, A., Koshikawa, S., Miura, T., a Miyagishima, S. (2010). Genome size of *Pachypsylla venusta* (Hemiptera: Psyllidae) and the ploidy of its bacteriocyte, the symbiotic host cell that harbors intracellular mutualistic bacteria with the smallest cellular genome. *Bull. Entomol. Res.* 100, 27–33.
- Nardon, C., Weiss, M., Vieira, C., a Biémont, C. (2003). Variation of the genome size estimate with environmental conditions in *Drosophila melanogaster*. *Cytometry. A* 55, 43–49.
- Nardon, C., Deceliere, G., Lœvenbruck, C., Weiss, M., Vieira, C., a Biémont, C. (2005). Is genome size influenced by colonization of new environments in dipteran species? *Mol. Ecol.* 869–878.
- Nozaki, T., a Matsuura, K. (2016). Termite queens have disproportionately more DNA in their fat body cells: Reproductive division of labor and endoreduplication. *Entomol. Sci.* 67–71.
- \*Otto, S.P., a Whitton, J. (2000). Polyploid Incidence and Evolution. *Annu. Rev. Genet.* 34, 401–437.
- Panzer, F., Ferrandis, I., Ramsey, J., Ordóñez, R., Salazar-Schettino, P.M., Cabrera, M., Monroy, M.C., Barges, M.D., Mas-Coma, S., O'Connor, J.E., et al. (2006). Chromosomal variation and genome size support existence of cryptic species of *Triatoma dimidiata* with different epidemiological importance as Chagas disease vectors. *Trop. Med. Int. Heal.* 2, 1092–1103.
- Panzer, F., Ferrandis, I., Ramsey, J., Salazar-Schettino, P.M., Cabrera, M., Monroy, C., Barges, M.D., Mas-Coma, S., O'Connor, J.E., Angulo, V.M., et al. (2007). Genome size determination in Chagas disease transmitting bugs (hemiptera-triatominae) by flow cytometry. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76, 516–521.
- Picard, C.J., Johnston, J.S., a Tarone, a. M. (2012). Genome Sizes of Forensically Relevant Diptera. *J. Med. Entomol.* 49, 192–197.
- Praça-Fontes, M.M., Carvalho, C.R., Clarindo, W.R., a Cruz, C.D. (2011). Revisiting the DNA C-values of the genome size-standards used in plant flow cytometry to choose the „best primary standards“. *Plant Cell Rep.* 30, 1183–1191.
- Rodrigues, A.S.B., Silva, S.E., Pina-Martins, F., Loureiro, J., Castro, M., Gharbi, K., Johnson, K.P., Dietrich, C.H., Borges, P.A. V., Quartau, J.A., et al. (2016). Assessing genotype-phenotype associations in three dorsal colour morphs in the meadow spittlebug *Philaenus spumarius* (L.) (Hemiptera: Aphrophoridae) using genomic and transcriptomic resources. *BMC Genet.* 17, 144.
- \*Scali, V. (2009). Stick insects: parthenogenesis, polyploidy and beyond. *Life Time Evol. Life its Hist.* 171–192.
- Sharaf, K., Horová, L., Pavlíček, T., Nevo, E., a Bureš, P. (2010). Genome size and base composition in *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Sylvanidae) and differences between native (feral) and silo pest populations in Israel. *J. Stored Prod. Res.* 46, 34–37.
- Schielzeth, H., Streitner, C., Lampe, U., Franzke, A., a Reinhold, K. (2014). Genome size

- variation affects song attractiveness in grasshoppers: Evidence for sexual selection against large genomes. *Evolution* (N. Y). *68*, 3629–3635.
- Scholes, D.R., Suarez, A. V., a Paige, K.N. (2013). Can endopolyploidy explain body size variation within and between castes in ants? *Ecol. Evol.* *3*, 2128–2137.
- Schrempf, A., Aron, S., a Heinze, J. (2006). Sex determination and inbreeding depression in an ant with regular sib-mating. *Heredity* (Edinb). *97*, 75–80.
- Sota, T., Konuma, J., Fujiwara, M., a Shoguchi, E. (2013). Genome sizes of three species in the subtribe Carabina (Coleoptera: Carabidae). *Entomol. Sci.* *16*, 122–124.
- Stork, N.E., McBroom, J., Gely, C., a Hamilton, A.J. (2015). New approaches narrow global species estimates for beetles, insects, and terrestrial arthropods. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 7519–7523.
- Su, K.F.Y., Puniamoorthy, J., Oezsu, N., Srivathsan, A., a Meier, R. (2016). Evolutionary analysis identifies multiple genome expansions and contractions in Sepsidae (Diptera) and suggests targets for future genomic research. *Cladistics* *32*, 308–316.
- \*Suda, J. (2011). Průtoková cytometrie a její využití v botanice. *Zprávy České Bot. Společnosti* 21–42.
- Suda, J., Krahulcov, A., Travnicek, P., a Krahulec, F. (2006). Ploidy Level versus DNA Ploidy Level : An Appeal for Consistent Terminology Author ( s ): Jan Suda , Anna Krahulcová , Pavel Trávníček and František Krahulec Published by : International Association for Plant Taxonomy ( IAPT ) Stable URL : <http://www.jsto>. *Taxon* *55*, 447–450.
- \*Suda, J., Kron, P., Husband, B.C., a Tra, P. (2007). Flow Cytometry and Ploidy : Applications in Plant Systematics , Ecology and Evolutionary Biology. In *Flow Cytometry with Plant Cells: Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes*, J. Doležel, J. Greilhuber, a J. Suda, ed. (Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH), s. 103–130.
- Sysmex CZ, 2017: Průtoková cytometrie – Sysmex. Online: <https://www.sysmex.cz/produkty/vyzkum-a-prumysl/prutokova-cytometrie.html>, (zprístupněno 12. 5 2017).
- Šmarda, P., Bureš, P., Horová, L., Foggi, B., a Rossi, G. (2008). Genome size and GC content evolution of *Festuca*: Ancestral expansion and subsequent reduction. *Ann. Bot.* *101*, 421–433.
- Tavares, M.G., Carvalho, C.R., a Ferrari Soares, F. a. (2010). Genome size variation in *Melipona* species (Hymenoptera: Apidae) and sub-grouping by their DNA content. *Apidologie* *41*, 636–642.
- Tavares, M.G., Carvalho, C.R., Soares, F.A.F., a De Oliveira Campos, L.A. (2012). Genome size diversity in stingless bees (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). *Apidologie* *43*, 731–736.
- Thomas, C. (1971). The genetic organization of chromosomes. *Annu. Rev. Genet.* *5*, 237–256.
- Tsutsui, N.D., Suarez, A. V, Spagna, J.C., a Johnston, J.S. (2008). The evolution of genome size in ants. *BMC Evol. Biol.* *8*.

- Vindelov, L.L., Christensen, I.J., a Nissen, N.I. (1983). Standardization of high-resolution flow cytometric DNA analysis by the simultaneous use of chicken and trout red blood cells as internal reference standards. *Cytometry* 3, 328–331.
- \*Watson, J. v. (1991). *Introduction to Flow Cytometry* (Cambridge: Cambridge University Press).
- Wenger, J.A., Cassone, B.J., Legeai, F., Johnston, J.S., Yates, A.D., Coates, B.S., Pavinato, V.A.C., a Michel, A. (2017). Whole genome sequence of the soybean aphid, *Aphis glycines* Jacob. *Insect Biochem. Mol. Biol.*
- Westerman, M., Barton, N.H., a Hewitt, G.M. (1987). Differences in DNA content between two chromosomal races of the grasshopper *Podisma pedestris*. *Heredity* (Edinb). 58, 221–228.
- Wu, M., Sun, L. V., Vamathevan, J., Riegler, M., Deboy, R., Brownlie, J.C., McGraw, E.A., Martin, W., Esser, C., Ahmadinejad, N., et al. (2004). Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipientis* wMel: A streamlined genome overrun by mobile genetic elements. *PLoS Biol.* 2, 327–341.

#### Citované databáze

- Gregory, T. R. (2017). Animal Genome Size Database. Online: <http://www.genomesize.com> (zprístupněno 6. května 2017).