

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra zoologie

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Zoologie



Bc. David Sadílek

Srovnávací cytogenetika štěnce *Cimex lectularius* (Heteroptera: Cimicidae)

Comparative cytogenetics of the bed bug *Cimex lectularius*
(Heteroptera: Cimicidae)

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Jitka Vilímová, CSc.
Odborný konzultant: Mgr. František Šťáhlavský, PhD.

Praha, 2012

Prohlášení:

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

V Praze, 20.8.2012

David Sadílek

Poděkování

Zde bych rád poděkoval Doc. RNDr. Jitce Vilímové, CSc. za vedení a pomoc s formální organizací a plánováním práce. Dále bych rád poděkoval Mgr. Ondřeji Balvínovi za pomoc při shánění materiálu a za rady při statistickém hodnocení výsledků, Mgr. Františkovi Šťáhlavskému, Ph.D. za poskytnutí vybaveného zázemí v laboratoři, za pomoc s optimalizací metodiky a za rady při hodnocení chromosomových figur, dále děkuji Prof. RNDr. Janu Zimovi, DrSc. za metodické rady během práce. Všichni jmenovaní jsou z Katedry zoologie PřF UK v Praze.

Dále bych rád poděkoval také kolegům z Katedry genetiky a mikrobiologie PřF UK v Praze, RNDr. Jiřímu Královi, Ph.D. za hodnotné rady zejména při interpretaci fotografií chromosomů a Mgr. Martinovi Formanovi za instruktáž k metodě C-pruhování. Za pomoc při shánění obtížně dostupné literatury děkuji Mgr. Vlastě Pachtové z Biologické knihovny PřF UK v Praze.

Velký dík patří všem zúčastněným ochotným specializovaným deratizačním firmám a jejich pracovníkům (z České republiky a zahraničí) za sběr živého materiálu *Cimex lectularius* z lidských obydlí, bez nichž by se celý projekt nemohl nikdy realizovat ve stávající míře. Za zaslání sběrů zástupců *C. lectularius* děkuji Antonínu Drozdovi, Petru Dvořákovi, Pavlu Foltánovi, Stanislavu Kováčovi, Martinu Kučerovi, Vladimíru Měřínskému, Michalu Novotnému, Lubomíru Pěčkovi, Vladislavu Prchalovi, Soně Ritterové, Petru Sodomkovi, Romanu Šimákovi, Martinu Tomanovi, Jaroslavě Vondráčkové a Jitce Zelené. Zahraniční specialisté Stefano Boscolo, Łukasz Brożek, Lilian Duplantier, Tony Hutson, Anne Larson, Håkan Kjellberg, Emanuel Krug, Kadej M., Marcus Schmidt, Piotr Szewczyk a Manuel Wegman poskytli materiál z dalších evropských států. Nakonec bych rád za materiál poděkoval i deratizačním firmám Biotech Salzburg, DDD servis, Ekolas, Pelias Norsk Skadedyrkontroll a Verminex.

Projekt byl finančně podpořen grantem Grantové agentury Univerzity Karlovy č. 267111/2011 a částečně grantem MŠMT ČR MSM 0021620828.



Cimex lectularius

1mm

OBSAH

1. ÚVOD A CÍLE	1
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	2
2.1. Holokinetické chromosomy	2
2.2. Pohlavní chromosomy	5
2.3. Průběh meiosis u řádu Heteroptera	6
2.3.1. Achiasmatická meiosa	7
2.3.2. Redukce a párování	9
2.4. Čeledi s vyššími počty pohlavních chromosomů	11
2.5. Cytogenetika čeledi infrařádu Cimicomorpha	15
2.6. Základní charakteristika studovaného taxonu	18
2.7. Cytogenetika druhu <i>Cimex lectularius</i>	20
3. MATERIÁL A METODY	22
3.1. Materiál	22
3.2. Metody	24
3.2.1. Výběr a zpracování materiálu.....	25
3.2.2. Zhotovení chromosomových preparátů	25
3.2.3. C-pruhování	27
3.2.4. Grafická analýza figur	29
3.2.5. Měření gonád	30
4. VÝSLEDKY	30
4.1. Hodnocení konvenčních preparátů	31
4.1.1. Počty chromosomů v jednotlivých populacích	33
4.1.2. Karyogramy	45
4.2. C-pruhování	48
4.3. Velikost gonád a stav mesenteronu	50
5. DISKUZE	53
5.1. Srovnání cytogenetických metod	53
5.2. Hodnocení figur mitosy a meiosis	54
5.3. Zjištěné karyotypy	56
5.3.1. Varianty karyotypu	57
5.3.2. Rozšíření studovaných populací	58
5.4. Nadpočetné pohlavní chromosomy	59
5.4.1. Původ zmnožených pohlavních chromosomů	62
5.4.2. Mechanismus vzniku a šíření X fragmentu	64
5.5. Karyogramy	66

5.6. C-pruhování	67
5.7. Velikost gonád a stav mesenteronu	67
5.8. <i>Cimex pipistrelli</i>	68
6. ZÁVĚRY	69
7. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	71
8. PŘÍLOHY	79

1. ÚVOD A CÍLE

Štěnice domácí (*Cimex lectularius* Linnaeus, 1758) patří do čeledi Cimicidae (Heteroptera: Cimicomorpha). Čeleď Cimicidae (90 druhů zařazených do 22 rodů) je nejpříbuznější čeledi Polycytenidae a obě čeledi zahrnují obligatorní hematofágní ektoparazity (krví se živí obě pohlaví). Hostitelé štěnic z čeledi Cimicidae jsou především savci (netopýři, člověk) a ptáci (vlaštovky, holubi), zástupci čeledi Polycytenidae jsou permanentní ektoparazité netopýřů v jihovýchodní Asii (Usinger 1966, Schuh & Slater 1995, Szalanski et al. 2008, Schuh et al. 2009).

Štěnice domácí, jako jeden z nejvýznamnějších hmyzích parazitů člověka v mírném pásu, se v posledních deseti letech dostává do popředí zájmu díky opětovné rozsáhlé expanzi po celém světě. Růst populací tohoto temporálního hematofágního parazita člověka je spojen zejména se zákazem užívání insekticidu DDT v 70. letech 20. století, následovaném rozvojem dopravy spojeným se zvýšeným pohybem osob a nakonec s častou zvýšenou rezistencí na recentní konvenční chemické přípravky (Hwang et al. 2005, Reinhardt & Siva-Jothy 2007, Romero et al. 2007, Szalanski et al. 2008, Weeks et al. 2010, Balvín et al. 2012). V současnosti navíc jen velmi málo lidí infestaci štěnicemi rozpozná dříve, než dojde k masivnímu pomnožení a disperzi do okolí svého refugia (Reinhardt et al. 2008).

Díky vztahu k člověku a díky výše zmíněným aspektům recentního šíření se *Cimex lectularius* stala široce studovaným druhem. Získané výsledky mohou, mimo lepších znalostí o konkrétním parazitu, zodpovědět i některé z obecnějších evolučních otázek, diverzifikaci parazita, strukturu jeho populací a jejich přizpůsobení se možnému novému hostiteli (Balvín 2008, Balvín et al. 2012). Štěnice, včetně *C. lectularius*, byly v minulém století důkladně detailně zpracovány z morfologického hlediska (Usinger 1966). V poslední době jsou předmětem i různě detailně zaměřených molekulárně genetických studií (včetně studií probíhajících na katedře zoologie PřF UK) (Balvín 2008, Szalanski et al. 2008, Balvín et al. 2012).

Dalším zajímavým cílem studia je cytogenetika. *Cimex lectularius* se z cytogenetického hlediska vyznačuje, ve srovnání s ostatním hmyzem, řadou méně či více unikátních charakteristik. Chromosomy jsou holokinetické povahy (absence lokalizované centromery a obzvláště kinetochoru), vyskytuje se zde achiasmatická meiosa všech chromosomů (absence chiasmát v meiotické profázi), invertovaná meiosa pohlavních chromosomů (pro gonosomy je redukční až druhé meiotické dělení) u heterogametického (samčího) pohlaví a častým vyšším počtem pohlavních chromosomů. Nejnápadnější je

výrazná intraspecifická variabilita počtu pohlavních chromosomů (Manna 1984, Grozeva & Nokkala 2002). Tento jev studoval u *C. lectularius* již v šedesátých letech minulého století Ueshima (1966).

Vzhledem k expanzi populací štěnice domácí a jejich probíhajícímu detailnímu studiu bylo zadáno jako téma diplomové práce zmapování karyotypů synantropních populací štěnice vyskytujících se na území České republiky a některých dalších evropských států za použití moderních cytogenetických metod.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

Velká část literatury týkající se cytogenetiky druhu *Cimex lectularius* je shrnuta v bakalářské práci (Sadílek 2010). Studie Usinger (1966), Ueshima (1979), Manna (1984), Papeschi & Bressa (2006) a Kuznetsova et al. (2011) představují nejdůležitější souhrnné cytogenetické práce o zástupcích řádu Heteroptera a obsahují základní cytogenetické charakteristiky čeledi Cimicidae, případně i druhu *Cimex lectularius*.

Následující přehled je zaměřen zejména na porovnání a zdůraznění specifických cytogenetických charakteristik zástupců druhu *Cimex lectularius* (případně příbuzných druhů řádu Heteroptera) s obecně častějším stavem a chováním chromosomů, které se vyskytují u většiny cytogeneticky zkoumaných organismů.

Zápis karyotypu je v celém textu zvolen podle celosvětově platné nomenklatury, např. $2n = 29, X_1X_2Y$, což znamená, že diploidní počet chromosomů je 29, z toho 26 autosomů a tři pohlavní chromosomy, dva X a jeden Y (alozom = nepárový pohlavní chromosom). U zástupců s vyšším počtem X chromosomů byl pro přehlednost zvolen zkrácený zápis např. $2n = 47, 20XY$. V cytogenetických pracích se objevují i další varianty zápisu, např. $26A+XXY$.

2.1. Holokinetické chromosomy

Holokinetické chromosomy postrádají lokalizovanou centromeru (primární konstriktce) a kinetochor se rozprostírá kontinuálně po celé délce chromosomu (typické pro taxon Hemiptera) nebo se skládá z mnoha izolovaných destiček roztroušených po celém chromosomu např. u Nematoda (hlístice), někdy se nazývá polycentrický chromosom. Kinetochor je proteinová struktura, která se u centrických chromosomů pevně spojuje s centromerou, umožňuje navázání mikrotubulů dělicího vřetenka a rozdělení chromosomu (Král 1993, Pérez et al. 1997, Jacobs & Liebenberg 2001, Mola & Papeschi 2006, Viera et al.

2009, Guerra et al. 2010, Kuznetsova et al. 2011). Mikrotubuly se na kinetochor holokinetických chromosomů navazují rozptýleně po celé délce, nikoli ve svazcích, proto mluvíme o difúzním kinetochoru (Král 1993). Mikrotubuly dělicího vřeténka mohou asociovat i přímo s heterochromatinem či dokonce euchromatinem (Guerra et al. 2010).

Někdy jsou holokinetické chromosomy synonymně nazývány jako holocentrické nebo chromosomy s difúzní centromerou. Vzhledem k tomu, že žádnou centromeru nemají, jsou označovány přednostně jako holokinetické chromosomy, což podle některých autorů přesněji vystihuje jejich vlastnosti (Král 1993, Mola & Papeschi 2006, Guerra et al. 2010). V dalším textu je použit termín holokinetické chromosomy.

Holokinetické chromosomy se vyskytují u různých skupin rostlin a bezobratlých živočichů, zejména u hmyzu. Je známo přes půl milionu druhů různých nepříbuzných organismů s tímto typem chromosomů např. někteří zástupci Ciliophora (nálevníci), Viridiplantae (zelené rostliny), Nematoda, Araneae (pavouci), Acari (roztoči), Chilopoda (stonožky), Crustacea (korýši) a Insecta (hmyz). Z opakovaného výskytu holokinetických chromosomů v rámci různých organismů vyplývá jejich několikanásobný nezávislý vznik během evoluce. U hmyzu se holokinetické chromosomy vyskytují u zástupců řádů Odonata (vážky), Dermaptera (škvorci), Zoraptera (drobnělky), Psocoptera (pisivky) včetně Pthiraptera, Thysanoptera (třásněnky), Sternorrhyncha (mšicosaví), Auchenorrhyncha (křísi), Heteroptera (ploštice), Trichoptera (chrostíci) a Lepidoptera (motýli) (White 1973, Král 1993, Kuznetsova et al. 2004, Rebagliati et al. 2005, Mola & Papeschi 2006, Viera et al. 2009, Guerra et al. 2010, Schvarzstein et al. 2010). Výskyt holokinetických chromosomů je patrně omezen jen na bezobratlé živočichy a některé rostliny, protože dosud nebyl popsán výskyt těchto chromosomů u obecně více prostudovaných obratlovců (obratlovci mají monocentrické chromosomy) (Guerra et al. 2010).

Velká oblast kinetochoru teoreticky umožnila rychlejší evoluci karyotypu zástupců řádu Heteroptera, neboť významně usnadňuje neletální fúze (symploidie) a fragmentace (agmatoploidie) chromosomů (Bardella et al. 2012). Fúzované holokinetické chromosomy nedávají vznik dicentrickým chromosomům, které mají kvůli dvěma centromerám problémy při dalším dělení. Chromosomové fragmenty stále obsahují část kinetochoru a mohou se proto normálně připojit k mikrotubulům dělicího vřeténka. Pro tyto vlastnosti jsou akceptovány fúze (snížení počtu) a fragmentace (zvýšení počtu) jako hlavní mechanismy vývoje karyotypu taxonů s holokinetickými chromosomy. Předpokládá se, že proces fúze je obecně mnohem častější než fragmentace, protože monocentrické i holokinetické chromosomy musí mít funkční telomery. Fúzovaný chromosom má telomerické oblasti často funkční, ale

fragmentované chromosomy si musí nějakým způsobem vytvořit funkční telomery *de novo* (Král 1993, Jacobs 2004, Mola & Papeschi 2006, Nokkala et al. 2007, Kuznetsova et al. 2011).

Telomery se vyskytují na koncových oblastech chromosomů, chrání je před poškozením (fúze, degradace exonukleázami) a stabilizují jejich strukturu. DNA telomerické oblasti se skládá z krátké repetitivní sekvence nukleotidů. Nejběžnější, a také asi ancestrální, motiv hmyzu a zřejmě také celého taxonu Panarthropoda je (TTAGG)_n, který je evolučně stabilní pro vyšší taxony a je udržován vysoce konzervativní reverzní transkriptázou, telomerázou (Vítková et al. 2005, Traut et al. 2007, Kuznetsova et al. 2011).

Telomerickou sekvenci se z hmyzu nepodařilo prokázat metodou FISH za použití TTAGG sondy u zástupců řádů Odonata, Ephemeroptera (jepice), Dermaptera, Heteroptera, Mecoptera (srpice) včetně Siphonaptera (blechy) a Diptera (dvoukřídli) (Frydrychová et al. 2004). Tento motiv byl také pravděpodobně sekundárně ztracen či nahrazen už v časně evoluci řádu Heteroptera, protože se vyskytuje u blízkých příbuzných hemipteroidních taxonů, u mšic (Sternorrhyncha: Aphidomorpha) a kříšů (Auchenorrhyncha). Telomerická sekvence pro Heteroptera není zatím známa, protože je odlišná od všech doposud známých sekvencí napříč různými organismy, (Ciliophora (TTTTGGGG)_n a (TTGGGG)_n, Nematoda (TTAGGC)_n, Crustacea (TAACC)_n, Vertebrata (obratlovci) (TTAGGG)_n a Plantae (rostliny) (TTTAGGG)_n) (Traut et al. 2007, The International Aphid Genomics Consortium 2010, Grozeva et al. 2011, Kuznetsova et al. 2011, Monti et al. 2011).

Na základě současných znalostí byla u ploštic navržena existence alternativního, dosud neznámého mechanismu prodlužování telomer nezávislém na telomeráze. Alternativní mechanismy se vyskytují např. v řádu Diptera. U *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 se telomerické oblasti prodlužují transpozicí satelitních retrotransposonů, u pakomárů rodu *Chironomus* Meigen, 1803 je mechanismus prodlužování telomer založen na nerovnoměrné rekombinaci dlouhých tandemových repetit (Frydrychová et al. 2004, Monti et al. 2011).

Kinetická aktivita (zabezpečení pohybu) holokinetických chromosomů je v meiose často omezena na subtelomerické oblasti či přímo telomery, mluvíme pak tedy o telokinetické aktivitě. Pokud jsou aktivní obě telomery chromosomu současně, jedná se o tzv. dikinetické chromosomy. Tento jev je suprimován přítomností chiasmata a kinetická aktivita se přesune z telomerické oblasti do místa chiasmata (Nokkala & Nokkala 1986a, Pérez et al. 1997, Viera et al. 2009, Poggio et al. 2011). Podle Nokkaly (1985) je za kinetickou aktivitu zodpovědná chromosomová dřev (axial core, scaffold) uložená uvnitř chromatidy, která na určitých místech vystupuje na povrch chromosomu. Tato hypotéza je podpořena zachovalou

kinetickou aktivitou fragmentů chromosomů indikovaných radioaktivním zářením, protože zlomy chromosomů vždy odhalí kineticky aktivní sekvence DNA.

Holokinetické chromosomy vykazují známky zvýšené kondenzace (jsou nejčastěji kulovité či oválné) během celého meiotického dělení. Superspiralizace chromosomů začíná v metafázi I a trvá dokonce i během metafáze II, kdy by tvar chromosomů měl odpovídat spíše chromosomům v mitotické metafázi (Guerra et al. 2010).

2.2. Pohlavní chromosomy

Determinace pohlaví zástupců řádu Heteroptera je typu *Drosophila* (savčí), heterogametičtí samci a homogametické samice. Nejčastěji se v rámci Heteroptera vyskytuje jednoduchý systém pohlavních chromosomů, typ *Lygaeus* XY/XX (71,4%), v menší míře typ *Protenor* X0/XX (14,7%) a systémy se zmnoženým počtem pohlavních chromosomů (X_n0 , X_nY , XY_n) (13,5%). Vzácně se zde objevují i karyotypy s odvozenými neo-X, neo-Y systémy (0,4%), kdy pohlavní chromosom fúzoval s autosomem (Ueshima 1979, Franco et al. 2006, Mola & Papeschi 2006, Bressa et al. 2009, Kuznetsova et al. 2011).

Všeobecně jsou diskutovány dvě hypotézy, zda se u samců společného předka Heteroptera vyskytoval systém pohlavních chromosomů X0 nebo XY. Ueshima (1979) zastával hypotézu plesiomorfního X0 systému a z něj odvozeného systému XY. Samci ostatních řádů taxonu Hemiptera jsou většinou X0, tento systém je považován za plesiomorfní i pro celý hmyz (Kuznetsova et al. 2011). Nokkala & Nokkala (1984a) navrhovali alternativní hypotézu: Systém XY je plesiomorfní a druhy se sestavou gonosomů X0 vznikaly opakovanou ztrátou Y chromosomu (konvergence). Hypotéza je podpořena přítomností několika druhů s XY určením pohlaví uvnitř zástupců rodu *Saldula* Van Duzee, 1914 (Leptopodomorpha: Saldidae) s určením pohlaví X0. Podobné případy variability byly zaznamenány i uvnitř rodů v infrařádu Gerromorpha. Infrařády Cimicomorpha a Pentatomomorpha vykazují zvýšenou tendenci ke ztrátě Y chromosomu (Rebagliati et al. 2005, Kuznetsova et al. 2011).

Zmnožený počet pohlavních chromosomů se v rámci hmyzu vyskytuje u několika druhů z taxonů Plecoptera (pošvatky), Isoptera (termity), Mantodea (kudlanky), Dermaptera, Orthoptera (rovnokřídli), Hemiptera, Coleoptera (brouci), Lepidoptera, Mecoptera včetně Siphonaptera a Diptera. U těchto skupin zmnožený počet vznikl nezávisle mechanismy fúze, fragmentace a reciproké translokace mezi autosomy a pohlavními chromosomy (White 1973, Traut 1999).

Ve srovnání s ostatními zástupci řádu Heteroptera se v infrařádu Cimicomorpha relativně často objevují druhy se zmnoženými X chromosomy, např. zástupci čeledi Reduviidae (nejčastěji u podčeledí Harpactorinae a Stenopodinae) s maximálním počtem pět X chromosomů a až 15 X chromosomů u zástupců čeledi Cimicidae (Ueshima 1966, 1979; Poggio et al. 2007, 2011; Grozeva et al. 2010). V čeledi Cimicidae se tento fenomén objevuje u podčeledí Cimicinae a Haemosiphoninae (Ueshima 1979, Poggio et al. 2009, Kuznetsova et al. 2011).

Původ systémů se zmnoženými X chromosomy je u zástupců Heteroptera nejčastěji interpretován jako příčné štěpení původního X chromosomu, proces fragmentace je usnadněn holokinetickou povahou chromosomů ploštic (Ueshima 1966, 1979; Kuznetsova et al. 2011). Výsledky použití C-pruhování při studiu několika zástupců podčeledi Triatominae (Reduviidae) vedou k závěru, že se u zástupců řádu Heteroptera vyskytují mimo fragmentace vlastních gonosomů i jiné např. autosomové chromozomové přestavby vedoucí ke zvýšení počtu celých pohlavních chromosomů (např. nondisjunkce gonosomů) (Panzera et al. 2010, Kuznetsova et al. 2011, Poggio et al. 2011).

Papeschi (1994) navrla teorii, že by fragmentace X chromosomů mohla být založena na intersticiální přítomnosti telomerické sekvence uvnitř chromosomu. V případě zlomu blízko této vnitřní telomerické sekvence by se mohla stát funkční telomerou a zajistit funkční dělení v novém chromosomu. Y chromosom se tímto mechanismem nefragmentuje v důsledku nepřítomnosti vmezeřených telomerických sekvencí (Grozeva & Nokkala 1996).

2.3. Průběh meiosy u řádu Heteroptera

Meiosa je obecně typ dělení germinálních buněk, při kterém vznikají haploidní gamety po replikaci řetězce DNA a dvou po sobě jdoucích chromosomálních segregacích (Schwarzstein et al. 2010). Prodloužená profáze I se odehrává v jádře buňky a obvykle se rozděluje na více fází: Leptotene (postupná spiralizace chromosomů), zygotene (párování homologických chromosomů - tvorba bivalentů), pachytene (silně spárované chromosomy, rekombinace chromatid, tzv. crossing-over), diplotene (oddalování homologních chromosomů, tvorba chiasmat v místech rekombinace) a diakinezi (spiralizace bivalentů, terminalizace chiasmat). Následuje metafáze I (rozpad jaderné membrány, maximální spiralizace chromosomů a tvorba metafázní destičky navázáním mikrotubulů na kinetochor), anafáze I (rozchod homologických chromosomů k opačným pólům) a telofáze I (obnovení jaderné membrány a částečná despiralizace). Mezi prvním a druhým meiotickým dělením je

krátká klidová fáze interkinese, která při spermatogenezi Heteroptera chybí a vřeténko je ihned transformováno z anafáze I do druhého meiotického dělení (Ueshima 1979, Kuznetsova & Maryańska-Nadahowska 2000, Viera et al. 2009, Kuznetsova et al. 2011). Ve druhém meiotickém dělení se vyskytují fáze s obdobným průběhem jako u mitotického dělení, profáze II, metafáze II, anafáze II a telofáze II (Griffiths et al. 2005, Schvarzstein et al. 2010).

U některých zástupců Heteroptera se vyskytuje speciální fáze meiotického dělení, difuzní stádium. Difuzní stádium přímo následuje po pachytene, během něho se buňka zvětšuje, autosomální bivalenty se téměř zcela rozvolňují, zatímco pohlavní chromosomy zůstávají kondensované a tvoří pozitivně heteropyknotické (výrazné, tmavě barvitelné) útvary. Během difuzního stadia jádro vypadá obdobně jako během interfáze. Po difuzním stadiu chromosomy opět kondenzují, chromosomy vypadají jako jednolitě útvary a jednotlivé chromatidy nejsou pozorovatelné. Dále buňka přechází přímo do diakineze a na autosomálních bivalentech se objevují chiasmata (Nokkala & Nokkala 1986b, Kuznetsova & Maryańska-Nadahowska 2000, Jacobs & Liebenberg 2001, Rebagliati et al. 2005, Viera et al. 2009).

2.3.1. Achiasmatická meiosa

Při konvenční meiose se chiasmata (překřížení řetězců DNA v místě rekombinace během crossing-overu) utvářejí v profázi I mezi homologickými chromosomy před jejich rozdělením (Griffiths et al. 2005). U některých zástupců hmyzu např. samic Lepidoptera a Trichoptera a dále pak samců některých druhů Orthoptera, blattopteroidního komplexu, Hemiptera, Coleoptera, Mecoptera a Diptera byla tvorba chiasmat nahrazena jinými achiasmatickými mechanismy rozdělení chromosomů (White 1973, Nokkala & Nokkala 1983, Nokkala & Grozeva 2000, Ituarte & Papeschi 2004). Obvykle je achiasmatická meiosa holokinetických chromosomů omezena na heterogametické pohlaví. U tohoto typu meiosy jsou v profázi I pozorovatelné jen iniciální fáze: Leptotene, zygotene a pachytene. Následně nedojde k vytvoření chiasmat (nedochází ke crossing-overu) a závěrečné fáze profáze I (diplotene a diakineze) proto nejsou rozpoznatelné. Proto se část profáze I po pachytene někdy souhrnně nazývá postpachytene (Král 1993, Kuznetsova & Grozeva 2008, Kuznetsova et al. 2011).

U samců většiny Heteroptera se vyskytují chiasmata jen na autosomálních bivalentech, zatímco pohlavní chromosomy a m-chromosomy (podrobně viz Diskuze) jsou achiasmatické. U zástupců několika čeledí ploštic je však meiosa samců kompletně achiasmatická, např. u: Micronectidae (Nepomorpha), Saldidae (Leptopodomorpha), dále čeledí Anthocoridae,

Cimicidae, Microphysidae, Miridae a Nabidae (Cimicomorpha) (Nokkala & Nokkala 1984b, 1986a, b; Mola & Papeschi 1993; Kuznetsova & Maryańska-Nadahowska 2000; Nokkala & Grozeva 2000; Grozeva & Nokkala 2002; Kuznetsova et al. 2004, 2011; Poggio et al. 2009, 2011; Grozeva et al. 2008, 2009, 2010, 2011). Podle autorů Ituarte & Papeschi (2004) je úplná achiasmatická meiosa zástupců čeledi Micronectidae unikátní svým pravděpodobně konvergentním vznikem paralelně s kompletní achiasmatickou meiosou u druhů z infrařádu Cimicomorpha. Naproti tomu, samci z čeledí Reduviidae a Tingidae (Cimicomorpha) se vyznačují návratem k ortodoxní kompletně chiasmatické meiose, nebo může jít o zachovalou plesiomorfii (Nokkala & Nokkala 1984a, Kuznetsova et al. 2011). Achiasmatická meiosa se zdá být velmi stabilní na úrovni čeledi a vyskytuje se vždy u všech studovaných zástupců dané čeledi (Grozeva et al. 2008).

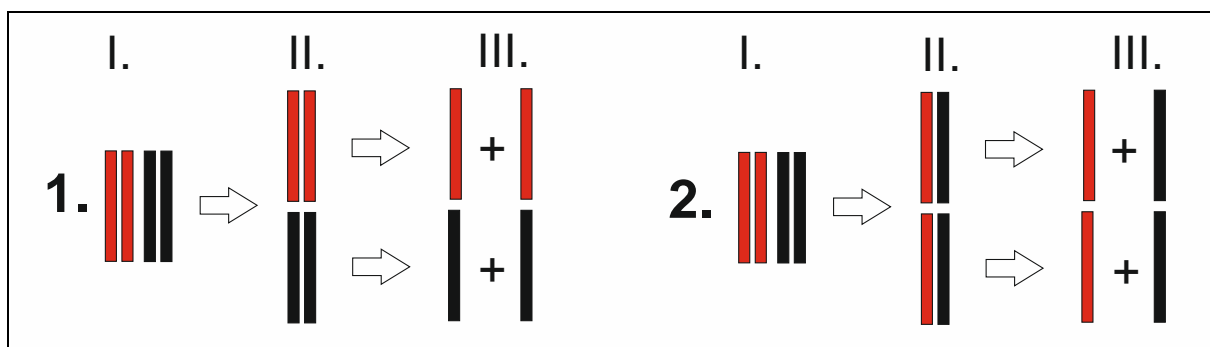
Rozlišují se dva hlavní typy párování chromosomů během achiasmatické meiosis holokinetických chromosomů. Nejčastěji se vyskytuje párování takzvaného „alignmentového“ typu, chromosomové bivalenty jsou spojeny po celé své délce během pozdní profáze I (tj. po pachytene) až do metafáze I (Nokkala & Nokkala 1983, Grozeva & Simov 2008a). Z infrařádu Cimicomorpha se tento typ meiosis vyskytuje u zástupců čeledi Anthocoridae (Nokkala & Nokkala 1986b), Microphysidae (Nokkala & Grozeva 2000) a Nabidae (Nokkala & Nokkala 1984b, Kuznetsova & Maryańska-Nadachowska 2000); dále u Saldidae (Nokkala & Nokkala 1983) a Micronectidae (Ituarte & Papeschi 2004, Grozeva et al. 2008, Kuznetsova et al. 2011).

Druhý, patrně odvozenější typ achiasmatického párování v meiose je tzv. „kolochorového“ typu. Za nepřítomnosti chiasmát jsou homologické chromosomy v profázi I navzájem drženy jedním nebo dvěma pevnými specifickými chromatinovými vlákny, kolochory. Párování tohoto typu je známo u zástupců čeledi Miridae a Cimicidae (Nokkala & Nokkala 1986a; Nokkala & Grozeva 2000; Grozeva & Nokkala 2002; Poggio et al. 2009; Grozeva & Simov 2008a, b; Grozeva et al. 2008, 2010, 2011; Guerra et al. 2010; Kuznetsova et al. 2011). V čeledi Cimicidae byla meiosa „kolochorového“ typu popsána u tří druhů rodu *Cimex* Linnaeus, 1758 (podčeleď Cimicinae) a dále byl její výskyt zaznamenán vždy u jednoho druhu rodu *Acanthocrios* Del Ponte a Riesel, 1945, *Ornithocoris* Pinto, 1927 a *Psitticimex* Usinger, 1966 z podčeledi Haematosiphoninae (Kuznetsova et al. 2011).

2.3.2. Redukce a párování

Meiosa standardně probíhá u všech chromosomů preredukčním způsobem. Na konci metafáze prvního meiotického dělení se od sebe oddělí dvouchromatidové homologické chromosomy (redukční dělení = heterotypické) a v metafázi druhého meiotického dělení se rozcházejí sesterské chromatidy jednoho chromosomu (ekvační dělení = homeotypické) (White 1973, Král 1993, Mola & Papeschi 2006, Viera et al. 2009, Guerra et al. 2010, Kuznetsova et al. 2011) (Obrázek 1).

Unikátním cytogenetickým znakem zástupců Heteroptera je postredukční dělení (invertovaná meiosa) pohlavních chromosomů. Sesterské chromatidy gonosomů se rozcházejí už na konci metafáze I (ekvační dělení) zatímco ve druhém meiotickém dělení se oddělují už jednochromatidové homologické pohlavní chromosomy (redukční dělení) (Král 1993, Pérez et al. 1997, Mola & Papeschi 2006, Viera et al. 2009, Guerra et al. 2010) (Obrázek 1). Autosomy se během meiosy vždy dělí preredukčním mechanismem (Kuznetsova et al. 2011).



Obrázek 1. Schematické srovnání preredukční meiosy autosomů a postredukční meiosy gonosomů

1. Preredukční meiosa autosomů, 2. Postredukční meiosa gonosomů; I. sesterské chromosomy tvoří bivalent, II. distribuce sesterských chromosomů po prvním meiotickém dělení, III. rozdělení chromatid po druhém meiotickém dělení.

Invertovaná meiosa se vyskytuje relativně vzácně u několika čeledí rostlin, u některých Chilopoda, z hmyzu u taxonů Odonata, Hemiptera a Lepidoptera. Může se vyskytovat třeba i jen u jednoho pohlaví, nebo jen v části karyotypu (gonosomy či autosomy) (Král 1993, Mola & Papeschi 2006).

Jediná čeleď Tingidae ze všech studovaných ploštic se vyznačuje preredukční meiosou pohlavních chromosomů u všech svých studovaných druhů, u společného předka této čeledi došlo patrně k reverzi postredukční meiosy (Ueshima 1979; Král 1993; Nokkala & Nokkala 1984a, 1986b; Kuznetsova et al. 2011). Tato čeleď se navíc vyznačuje neobvykle stabilním

karyotypem a chiasmatickou meiosou samců. Dále bylo v rámci infrařádu Cimicomorpha zjištěno několik dalších jednotlivých druhů s preredukční meiosou gonosomů. Všichni tři studovaní zástupci rodu *Macrolophus* Fieber, 1858 (Miridae) (Grozeva et al. 2006, 2007), čtyři druhy z čeledi Coreidae a dva zástupci rodu *Ectrychotes* Burmeister, 1835 (Reduviidae). Preredukční dělení gonosomů bylo zaznamenáno i u zástupců rodu *Anisops* Spinola, 1837 (Notonectidae) (Ueshima 1979, Kuznetsova et al. 2011).

Samci většiny druhů Heteroptera mají pohlavní chromosomy, které v metafázi II vykazují párování tzv. „touch-and-go“ způsobem. Vzájemně se přiblíží, utvoří charakteristický stejně orientovaný pseudo-pár a v anafázi II odcházejí na opačné póly dělicího vřeténka. Jedinou známou výjimkou jsou samci podčeledi Nabinae (Nabidae), u nichž se vyskytuje jiný způsob párování tzv. „distance pairing“. Pohlavní chromosomy v tomto případě neasociují během metafáze II jako autosomy, ale rovnou se orientují k opačným pólům, přičemž tvoří tzv. „distance bivalent“ a segregují se v anafázi II (Nokkala & Nokkala 1984b; Kuznetsova & Maryańska-Nadachowska 2000; Nokkala & Grozeva 2000; Kuznetsova & Grozeva 2008; Kuznetsova et al. 2004, 2011).

Další charakteristikou meiosis samců je uspořádání metafázní destičky v prvním a druhém meiotickém dělení. V metafázi I tvoří autosomální bivalenty kruh okolo univalentů (X a Y chromosomy, m-chromosomy, B chromosomy), během metafáze II autosomy opět tvoří kruh s gonosomy ve svém středu. Tato konformace chromosomů se nazývá radiální, při neradiálním uspořádání jsou autosomy a gonosomy na metafázní destičce uspořádány náhodně (Ueshima 1979, Nokkala 1986). Radiální může být také jen jedna metafáze (I nebo II), uspořádání chromosomů se může lišit i u blízké příbuzných druhů. U čeledi Anthocoridae, Microphysidae, Miridae a Nabidae je radiální jen metafáze II, autosomy jsou uspořádány radiálně v kruhu s gonosomy ve svém středu (Nokkala & Nokkala 1984b; 1986a, b; Nokkala 1986; Nokkala & Grozeva 2000; Kuznetsova et al. 2004, 2011; Grozeva et al. 2011). U čeledi Cimicidae má tento stejný vzor organizace chromosomů *Cimex lectularius* (Grozeva et al. 2010), zatímco *Psiticimex uritui* Lent & Abalos, 1946 má zřejmě radiální obě metafáze (Poggio et al. 2009, Kuznetsova et al. 2011). Metafázi I i II mají radiální například zástupci čeledi Aradiade (Pentatomomorpha) (Jacobs & Liebenberg 2001).

Z technických důvodů se většina studií chromosomů zástupců řádu Heteroptera provádí na samcích (obtížné získání meiotických figur samic), z toho důvodu existuje o meiose samic jen minimum informací (Kuznetsova et al. 2011).

2.4. Čeledi s vyššími počty pohlavních chromosomů

Nejvíce cytogeneticky prostudovanými taxony Heteroptera jsou zástupci čeledí z infrařádů Cimicomorpha (Cimicidae, Miridae, Reduviidae) a Pentatomomorpha (Coreidae, Lygaeidae, Pentatomidae). Druhy těchto čeledí jsou často běžné ve větších populačních hustotách a stávají se dobře dostupným materiálem pro širší podrobné studie. Do popředí zájmu člověka se dostávají také proto, že se často jedná o ekonomicky významné herbivorní škůdce či hematofágní parazity přenášející nebezpečné parazitární onemocnění (Papeschi & Bressa 2006). V následujícím přehledu jsou stručně zmíněny jen čeledi s prokázaným vyšším počtem pohlavních chromosomů (Tabulka 1).

Tabulka 1. Přehled čeledí Heteroptera s vyššími počty pohlavních chromosomů podle Papeschi & Bressa (2006)

2n: rozsah diploidních počtů chromosomů.

Gonosomy: systémy pohlavních chromosomů.

Další zdroje: B&P = Bressa & Papeschi 2007, Bea = Bressa et al. 2009, Fea = Franco et al. 2006, G = Grozeva 1997, G&N = Grozeva & Nokkala 1996, Gea = Grozeva et al. 2009, J = Jacobs 2004, J&L = Jacobs & Liebenberg 2001, Kea = Kuznetsova et al. 2011, M = Manna 1984, M&P = Mola & Papeschi 1993, P&Bi = Papeschi & Bidau 1985, Poe = Poggio et al. 2011, Rea = Rebagliati et al. 2005, Sea = Souza et al. 2009, U = Ueshima 1979.

)¹: není uvedeno v Papeschi & Bressa (2006)

Infrařád	Nadčeď	Čeď	2n	Gonosomy	Další zdroje
Dipsocoromorpha		Dipsocoridae	21-22	X0, XY, XnY, XYn	G&N
Gerromorpha	Mesoveloidea	Mesoveliidae	35	XnY	Gea
Nepomorpha	Nepoidea	Belostomatidae	4-30	XY, XnY, neo	P&Bi
		Nepidae	22-46	X0, XY, XnY	M, U
	Notonectoidea	Notonectidae	24-26	XY, Xn0	M, U
	Ochterioidea	Gelastocoridae	35	XnY	B&P, U
Cimicomorpha	Cimicoidea	Cimicidae	10-50	XY, XnY	Kea, U
	Miroidea	Miridae	14-80	X0, XY, Xn0, XnY	M, U
	Reduivioidea	Reduviidae	10-34	X0, XY, XnY	Poe
Pentatomomorpha	Aradoidea	Aradidae	7-48	XY, XnY, neo	G, J, J&L
	Coreoidea	Alydidae	10-17	X0, Xn0	Sea
		Coreidae	13-28	X0, XY, Xn0	Fea
		Stenocephalidae	14	XY, Xn0	M, U
		Lygaeoidea	Lygaeidae	10-30	X0, XY, XnY, XYn
	Pentatomoidea	Cydnidae	12-31	XY, XnY	Rea, U
		Dinidoridae	14-21	XY, XnY	Rea, U
		Pentatomidae	6-27	XY, XnY, neo	Rea
		Thaumastellidae	17-20	XY, XnY	Rea) ¹
		Pyrrhocoroidea	Largidae	11-17	X0, XnY
	Pyrrhocoridae	12-33	X0, Xn0, neo	Bea	

Dipsocoromorpha

Z taxonů tohoto infrařádu, který je nejbazálnějším taxonem (Štys & Kerzhner 1975), u kterého byl zjištěn karyotyp, se zvýšený počet pohlavních chromosomů vyskytuje v rámci čeledi **Dipsocoridae** (Grozeva & Nokkala 1996). Její zástupci mají 16 či 18 autosomů, dva m-chromosomy a převážně jednoduchý XY systém gonosomů. *Cryptostemma pusillimum* (J. Sahlberg, 1870) se vyznačuje dvěma Y chromosomy $2n = 21, XY_1Y_2$, kde X gonosom je výrazně větší než ostatní chromosomy a Y chromosomy jsou naopak menší, negativně heteropyknotické. Druhý Y vznikl fragmentací z prvního chromosomu Y, k čemuž obecně dochází velmi vzácně v porovnání s fragmentací chromosomu X. Chromosomy Y jsou nejčastěji postiženy ztrátou informace delecí než zmnožením fragmentací (Grozeva & Nokkala 1996).

Zástupci druhé studované čeledi **Schizopteridae** mají systém určení pohlaví X0, dva m-chromosomy a celkově přibližně dvakrát vyšší počet autosomů ($2n = 33, X0$). Téměř dvojnásobný počet autosomů mohl vzniknout polyploidizací z původně polovičního počtu a následnou ztrátou několika chromosomů (např. fúzí), nebo jak navrhl Grozeva & Nokkala (1996) několika následujícími fragmentacemi původních autosomů.

U všech studovaných jedinců infrařádu Dipsocoromorpha je metafáze I radiální a meiosa heterogametického pohlaví (samců) pro autosomy chiasmatická, pro gonosomy achiasmatická (Grozeva & Nokkala 1996). Pro porovnání u mnohem odvozenějšího druhu *Cimex lectularius* se vyskytuje metafáze II radiální a meiosa samců pro všechny chromosomy achiasmatická

Gerromorpha

U většiny zástupců infrařádu byl zatím zjištěn jen X0 či XY systém určení pohlaví s $2n = 19-31$ chromosomy (Papeschi & Bressa 2006). Pouze u druhu *Mesovelina furcata* Mulsant, Ray, 1852, (**Mesoveliidae**) byl popsán zvýšený počet čtyř X chromosomů ($2n = 35, X_1X_2X_3X_4Y$) (Grozeva et al. 2009).

Nepomorpha

V rámci rodu *Belostoma* Latreille, 1807 (**Belostomatidae**) je známo několik druhů s 26 autosomy a dvěma X chromosomy ($2n = 29, X_1X_2Y$) spolu s druhy s výrazně redukováným počtem šesti velkých autosomů a jednoduchým systémem gonosomů XY ($2n = 8, XY$). U druhů se dvěma X chromosomy mají tyto chromosomy podobnou velikost a Y je výrazně menší (Papeschi & Bidau 1985). Bardella et al. (2012) zjistili u samců *Belostoma*

dilatatum (Dufour, 1863) karyotyp $2n = 30, X_1X_2X_3Y$, což je zatím nejvyšší počet gonosomů v rámci čeledi Belostomatidae. U zástupců rodu *Belostoma* byl popsán polymorfismus v počtu X chromosomů (Papeschi 1996). Existují dvě odlišné karyomorfy s $2n = 16, XY$ nebo $2n = 17, X_1X_2Y$. Vyšší počet chromosomů X byl zjištěn jen asi u 25% studovaných jedinců a je připisován fragmentování původního X na dvě nestejně velké části.

Diploidní počet chromosomů druhů čeledi **Nepidae** je v rozpětí $2n = 22-46$ (s modálním počtem 43) a pohlavními systémy většinou s vyššími počty pohlavních chromosomů, od X_1X_2Y do $X_1X_2X_3X_4Y$. V této čeledi se zřídka vyskytují druhy i s jednoduchým stavem $X0$ či XY (Ueshima 1979, Manna 1984).

Z nadčeledi Ochteroidea byl zatím cytogeneticky analyzován jen jeden druh, *Gelastocoris oculatus* (Fabricius, 1798) (**Gelastocoridae**), s diploidním počtem $2n = 35, X_1X_2X_3X_4Y$ (Ueshima 1979, Manna 1984, Bressa & Papeschi 2007)

U zástupců čeledi **Notonectidae** s přibližně stejným počtem autosomů $2n = 24-26$, se vyskytují dva systémy gonosomů, rod *Anisops* (Anisopinae) s určením pohlaví X_1X_20 a rod *Notonecta* Linnaeus, 1758 (Notonectinae) s jednoduchým systémem XY . Všechny druhy mají pár m-chromosomů (Ueshima 1979, Manna 1984).

Pentatomomorpha

U většiny studovaných druhů čeledi **Aradidae** byl zjištěn jednoduchý systém určení pohlaví XY , u několika druhů i vyšší počet, dvou až čtyř X chromosomů. U zástupců této čeledi existuje velká variabilita v počtu chromosomů, i v rámci rodů, $2n = 12, XY$ až $2n = 48, XY$. Meiosa probíhá pro Heteroptera běžným způsobem (postredukčně pro gonosomy s radiální metafází I i II). U druhů s více gonosomy vznikly X chromosomy fragmentací z původních X chromosomů, karyotypy s nižšími počty vznikly pravděpodobně fúzí autosomů (Grozova 1997, Jacobs & Liebenberg 2001, Jacobs 2004). Druh *Dundocoris nodulicarinus* Jacobs, 2006 se spolu s několika autosomálními fúzemi vyznačuje neo-pohlavním Y chromosomem ($2n = 7, XY_1Y_2$) (Jacobs 2004).

Zástupci nadčeledi **Pentatomoidea** mají modální počet chromosomů $2n = 12-14, XY$ (rozpětí 6-27) (Papeschi & Bressa 2006). Druhy se zmnoženým počtem X chromosomů (X_1X_2Y) se vyskytují izolovaně napříč celou nadčeledí, což odkazuje na nezávislý vznik druhého X chromosomu. Druhy se dvěma X gonosomy byly popsány v čeledích Cydnidae, Dinidoridae, Thaumastellidae a Pentatomidae (Ueshima 1979, Rebagliati et al. 2001, Rebagliati & Mola 2010). Druh *Thaumastella managuensis* Schaefer & Wilcox, 1971 (Thaumastellidae) je dokonce evidován ve dvou karyomorfách pro různé populace $2n = 18,$

XY a $2n = 17, X_1X_2Y$ (Rebagliati et al. 2005). U několika druhů čeledi Pentatomidae se vyskytuje abnormální testikulární lalok „harlequin lobe“, kde vznikají spermatocyty s vysoce variabilním počtem chromosomů (2-200). Takto vzniklé spermie jsou sterilní a trofické, poskytují aditivní výživu embryím (Ueshima 1979; Rebagliati et al. 2001, 2005).

Cytogeneticky nejstudovanější čeleď z celého řádu Heteroptera je čeleď **Lygaeidae** s více než 400 prozkoumanými druhy. Rozpětí počtu chromosomů je $2n = 10-30$ s XY systémem určení pohlaví u většiny analyzovaných druhů. Vyskytuje se i jednoduchý systém X0 a zmnožené systémy. Zmnožené systémy se vyskytují vzácně v rámci různých rodů, jsou známy typy od X_1X_2Y do $X_1X_2X_3X_4Y$, i skladba gonosomů XY_1Y_2 . Většina druhů má pár m-chromosomů (Ueshima 1979, Manna 1984, Papeschi & Bressa 2006).

Zástupci čeledi **Largidae** se vyznačují diploidním počtem $2n = 11-17$ chromosomů a systémem určení pohlaví X0 nebo X_1X_2Y . Některé druhy mají v karyotypu i dva m-chromosomy (Ueshima 1979, Mola & Papeschi 1993). Všichni studovaní zástupci čeledi **Pyrrhocoridae** se vyznačují postredukční meiosou gonosomů s chiasmata na autosomech. Samci druhů rodu *Dysdercus* Guérin-Méneville, 1831 ze Starého světa mají shodný karyotyp, $2n = 16, X_1X_20$, mezi druhy z Nového světa se však vyskytuje výrazná variabilita, $2n = 12$, neo-XY; $2n = 13, X0$; $2n = 15, X0$ a $2n = 16, X_1X_20$ (Ueshima 1979; Bressa et al. 1999, 2002, 2009).

Zástupci čeledi **Alydidae** mají obvykle počet $2n = 13, X0$ nebo $2n = 10, X0$, ale vyskytují se i druhy s $2n = 17, X0$ chromosomy, u většiny druhů se vyskytují m-chromosomy. Vyšší počet gonosomů, $2n = 14, X_1X_20$, je znám pouze u druhu *Akbaratus fasciatus* (Distant, 1918), jeho karyotyp ale naopak neobsahuje charakteristický pár m-chromosomů (Ueshima 1979, Manna 1984, Souza et al. 2009). U zástupců čeledi **Coreidae** se počet chromosomů pohybuje od $2n = 13$ do $2n = 28$ s modálním počtem 21 (u 44% zkoumaných druhů). Čeleď je také charakteristická výskytem páru m-chromosomů (u 80% druhů). Nejběžnější systémy určení pohlaví jsou X0 (63%) a zmnožený systém X_1X_20 (33%). (Ueshima 1979, Bressa et al. 2005, Franco et al. 2006, Souza et al. 2009). Jsou známy tři druhy rodu *Acanthocephala* Laporte, 1833 se systémem XY a i jedna populace *Coreus marginatus* (Xavier, 1945) se zmnoženým systémem $2n = 23, X_1X_2X_30$ (obvyklý systém je X_1X_20) (Nokkala 1986, Franco et al. 2006). Zástupci velmi málo cytogeneticky prozkoumané čeledi **Stenocephalidae** se shodují v počtu $2n = 14$ chromosomů, mají pár m-chromosomů, ale výrazně se liší v systémech pohlavních chromosomů, XY nebo X_1X_20 (Ueshima 1979, Manna 1984).

2.5. Cytogenetika čeledí infrařádu Cimicomorpha

Infrařád Cimicomorpha je odvozenějším taxonem s nejvyšší diverzitou (19.400 druhů) v řádu Heteroptera (Forero 2008) a stejně tak je velmi rozmanitý v cytogenetických charakteristikách. Obdobně jako u všech ploštic se zde objevují holokinetické chromosomy, dále velmi vzácně m-chromosomy (pouze dva druhy čeledi Reduviidae), různé systémy pohlavních chromosomů, invertovaná meiosa pohlavních chromosomů a různé typy chiasmatické i achiasmatické meiosy (Grozeva et al. 2009, Kuznetsova et al. 2011).

V současné době jsou nejvíce studovány druhy z čeledí Miridae, Reduviidae a Cimicidae. Miridae jsou ekonomicky významnou fytofágní čeledí, v případě Reduviidae se jedná zejména o parazitické druhy podílející se na přenosu např. Chagasovi nemoci a mezi Cimicidae patří také významní hematofágní ektoparazitě člověka (Schuh et al. 2009, Kuznetsova et al. 2011).

Z infrařádu Cimicomorpha jsou známy karyotypy přibližně 465 druhů (v 180 rodech) s velmi heterogenními počty chromosomů. Od $2n = 6$ u *Hesperoctenes fumarius* (Westwood, 1874) z čeledi Polyctenidae (Ueshima 1979) až do $2n = 80$ u několika druhů rodu *Lopidea* Uhler, 1872 z čeledi Miridae. Několik čeledí se vyznačuje vysokou variabilitou počtu chromosomů u svých zástupců: čeleď Miridae (od 14 do 80) a čeleď Cimicidae (od 10 do 50). Naproti tomu u zástupců čeledi Tingidae je variabilita počtu chromosomů minimální, všech 28 studovaných druhů má 12 autosomů a liší se jen v počtu gonosomů, XY nebo X0 (Nokkala & Nokkala 1984a, Kuznetsova et al. 2011).

Dále je uveden přehled cytogeneticky analyzovaných čeledí z infrařádu Cimicomorpha (Tabulka 2) jako nejbližších příbuzných taxonů čeledi Cimicidae včetně druhu *Cimex lectularius*. Čeledi Reduviidae, Cimicidae a Miridae, jako jediné z celého infrařádu obsahují druhy se zmnoženým stavem gonosomů. Z ostatních čeledí je cytogeneticky prozkoumáno velmi málo zástupců s jednoduchým stavem gonosomů XY (případně X0) (Papeschi & Bressa 2006). Naopak karyotyp zástupců čeledí Curaliidae, Lasiophilidae, Lyctocoridae, Medocostidae, Pachynomidae, Plokiophilidae, Thaumastocoridae a Velocipedidae zatím nebyl vůbec analyzován a počty chromosomů ani systémy gonosomů nejsou známy (Kuznetsova et al. 2011).

Tabulka 2. **Přehled čeledí infrařádu Cimicomorpha se známými karyotypy**

2n: rozsah diploidních počtů chromosomů.

Gonosomy: systémy pohlavních chromosomů.

Zdroje: G&N = Grozeva & Nokkala 2001, Kea = Kuznetsova et al. 2011, M = Manna 1984, N&G = Nokkala & Grozeva 2000, Nea = Nokkala et al. 2007, P&B = Papeschi & Bressa 2006, Poe = Poggio et al. 2011, U = Ueshima 1979.

	Nadčeleď	Čeleď	2n	Gonosomy	Zdroje
	Reduvisoidea	Reduviidae	10-34	X0, XY, XnY	P&B, Poe
Cimiciformes	Cimicoidea	Anthocoridae	24-32	XY	P&B, Kea, U
		Cimicidae	10-50	XY, XnY	P&B, Kea, U
		Polyctenidae	6-12	XY	P&B, M, U
	Microphysoidea	Microphysidae	14	XY	P&B, N&G
Miriformes	Joppeicoidea	Joppeicidae	24	XY	P&B, Kea, M
	Naboidea	Nabidae	12-40	XY	P&B, Nea, Kea
	Miroidea	Miridae	14-80	X0, XY, Xn0, XnY	P&B, U
		Tingidae	13-14	X0, XY	P&B, Kea, G&N

Zástupci čeledi **Reduviidae** jsou významnou bazální skupinou infrařádu Cimicomorpha s modálním počtem $2n = 20$ chromosomů (rozsah 10-34), vyskytují se u nich často jak jednoduché systémy pohlavních chromosomů tak zmnožené. Ze 153 analyzovaných druhů má XY 46%, X_nY 51,2% a X0 se vyskytuje jen u tří druhů. Cytogeneticky analyzovaní zástupci podčeledi Stenopodainae se vyznačují stabilním diploidním počtem $2n = 20-22$ autosomů, zmnoženým počtem X chromosomů (dva až čtyři) a alozomem Y. Zástupci podčeledi Harpactorinae mají proti tomu konstituci chromosomů mnohem víc heterogenní, $2n = 12-32$ chromosomů (modální počet 28) s XY až $X_1X_2X_3X_4X_5Y$ systémy gonosomů. Vyšší počty chromosomů byly dále popsány u podčeledi Triatominae, kde většina zástupců má 20 autosomů (v rozsahu 18-23) a jednoduchý systém XY (52,5%) nebo X_1X_2Y (44,7%), ale u několika druhů se vyskytují až čtyři X chromosomy či dokonce $X_1X_2Y_1Y_2$ u *Mepraia spinolai* Porter, 1934. Zástupci podčeledí Reduviinae a Peiratinae jsou charakterističtí XY a X_1X_2Y konstitucí gonosomů (Ueshima 1979; Pérez et al. 2004; Costa et al. 2008; Panzera et al. 2010; Poggio et al. 2007, 2011). U dvou zástupců podčeledi Hammacerinae byly objeveny m-chromosomy, které jsou v rámci Reduviidae unikátní. Tyto dva druhy se vyznačují 28 autosomy, XY a X_1X_2Y systémem pohlavních chromosomů (Poggio et al. 2011).

V celé čeledi Reduviidae se setkáváme se dvěma trendy evoluce karyotypu, redukce počtu autosomů fúzí a zmnožení pohlavních chromosomů fragmentacemi. Přičemž jsou fragmentace běžnější u podčeledí Stenopodainae a Harpactorinae (Poggio et al. 2007, 2011).

U pěti zástupců čeledi **Anthocoridae** bylo potvrzeno $2n$ od 24 do 32 chromosomů s jednoduchým XY systémem určení pohlaví. Svým vyšším počtem chromosomů ($2n = 32$) se blíží čeleď Anthocoridae modálnímu počtu blízce příbuzné čeledi Cimicidae (modální počet $2n = 31$), ale odlišuje se jednoduchým systémem gonosomů (Ueshima 1979, Kuznetsova et al. 2011).

V čeledi **Cimicidae**, s 53 cytogeneticky analyzovanými druhy, byl určen ancestrální systém určení pohlaví XY a velké množství druhů s odvozeným zmnoženým systémem gonosomů. Počet chromosomů se pohybuje v rozpětí $2n = 10-50$ (modální počet 31) a mezi systémy s více X chromosomy převládá X_1X_2Y , ale v celé čeledi se vyskytuje několik druhů se třemi a čtyřmi X chromosomy. Zástupci čeledi Cimicidae mají achiasmatickou meiosis, postredukční pro gonosomy (Ueshima 1966, 1979; Manna 1984; Grozeva & Nokkala 2002; Poggio et al. 2009; Grozeva et al. 2010; Kuznetsova et al. 2011). Stejně tendence k variabilitě počtu chromosomů a systémech určení pohlaví mají i zástupci rodu *Cimex* se 14 prostudovanými druhy (Grozeva et al. 2010). V čeledi Cimicidae se vyskytuje hned několik druhů s variabilním počtem gonosomů v rámci druhu. Vnitrodruhové variability v počtu X chromosomů existují u druhů *Cimex lectularius* (2-15X), *Paracimex borneensis* Usinger, 1959 (7-9X) a *P. capitatus* Usinger, 1959 (2; 4-6X). Nejvýraznější variabilitu v počtu X chromosomů v čeledi Cimicidae vykazuje *Cimex lectularius* (Ueshima 1979, Kuznetsova et al. 2011). Čeledi Reduviidae a Cimicidae představují ploštice, u kterých zmnožené systémy pohlavních chromosomů dosáhly své nejširší distribuce a variability (Poggio et al. 2007).

Zástupci čeledi **Polyctenidae** jsou nejbližší příbuzní čeledi Cimicidae s obdobným parazitickým způsobem života na netopýrech. Cytogeneticky se ovšem od zástupců čeledi Cimicidae dost liší výrazně nižším počtem chromosomů. Data jsou známa jen pro tři druhy ze dvou rodů a diploidní počet chromosomů je od pouhých šesti do 12 chromosomů s jednoduchým XY systémem gonosomů (Ueshima 1979, Manna 1984, Papeschi & Bressa 2006).

Tři zkoumaní zástupci malé čeledi **Microphysidae** se vyznačují shodným počtem $2n = 14$, XY chromosomů s jednoduchým stavem gonosomů a kompletně achiasmatickou meiosou s radiálním uspořádáním metafáze II (Nokkala & Grozeva 2000, Papeschi & Bressa 2006).

Nabidae je dobře cytogeneticky prozkoumaná čeleď s jednoduchým systémem určení pohlaví XY. Vyskytují se v ní druhy s nízkým počtem chromosomů $2n = 12$, XY i druhy s vyšším počtem chromosomů až $2n = 38$, XY. Ancestrální počet byl stanoven na $2n = 34$, XY a hlavní evoluční trend čeledi Nabidae je snižování počtu chromosomů fúzemi (Kuznetsova et al. 2004, 2011; Nokkala et al. 2007).

Studovaný zástupce monotypické čeledi **Joppecidae**, *Joppeicus paradoxus* Putton, 1881, má karyotyp s diploidním počtem $2n = 24$, XY (Ueshima 1979, Manna 1984, Kuznetsova et al. 2011).

Zástupci čeledi **Miridae** mají velmi variabilní počet chromosomů $2n = 14-80$ se čtyřmi systémy určení pohlaví (X0, XY, Xn0, XnY). Modální stav čeledi je $2n = 34$, XY, vyskytuje se zde i několik zástupců se třemi gonosomy X_1X_2Y a jeden druh s určením pohlaví X_1X_20 (Ueshima 1979, Manna 1984, Papeschi & Bressa 2006, Grozeva & Simov 2008a). U zástupců čeledi Miridae se vyskytuje běžně postredukční dělení gonosomů, avšak u druhu *Macrolophus costalis* Fieber, 1858 ($2n = 28$, $X_1X_2X_3Y$) byla popsána preredukční meiosa autosomů i gonosomů (Grozeva et al. 2006, 2007). Tento druh sdílí s několika recentně cytogeneticky zkoumanými druhy z rodu *Dicyphus* Fieber, 1858 nejvyšší počet tří X chromosomů (Grozeva & Simov 2008b).

Zástupci čeledi **Tingidae** se vyznačují velmi stabilním karyotypem, všech 28 cytogeneticky studovaných druhů má 12 autosomů a většina druhů má jednoduchý systém gonosomů XY. Liší se jen několik druhů, které mají systém určení pohlaví X0. Tingidae je také jediná čeleď v rámci Heteroptera s výskytem preredukční meiosy pohlavních chromosomů. Velikost chromosomů a jejich stabilní počty podporují hypotézu, že evoluce čeledi Tingidae neprobíhala mechanismem fúze či fragmentace chromosomů (Ueshima 1979, Grozeva & Nokkala 2001, Kuznetsova et al. 2011).

2.6. Základní charakteristika studovaného taxonu

Čeleď Cimicidae obsahuje kolem 90 druhů zařazených do 22 rodů. Nejvíce studovaným a pro člověka významným rodem je rod *Cimex* (štěnice), ve kterém se vyskytují dva druhy běžně parazitující na člověku i netopýrech, *Cimex lectularius* a *Cimex hemipterus* Fabricius, 1803 (štěnice tropická). Na člověku také parazituje africký druh *Leptocimex boueti* (Brumpt, 1910). Ostatní zástupci čeledi Cimicidae se vyskytují pouze na ptácích nebo jiných savcích (zejména na netopýrech). Při nedostatku potravy mohou na člověku omezenou dobu sát i další druhy vázané původně na jiné hostitele (Usinger 1966, Péricart 1996, Balvín 2008, Balvín et al. 2012).

Existuje několik hypotéz týkajících se přechodu štěnice domácí z netopýra na člověka (Panagiotakopulu & Buckland 1999).

- 1) Podle recentně akceptované hypotézy předek *C. lectularius* původně parazitoval jen na netopýrech, s pravěkým osídlením jeskyní lidmi se živil příležitostně i sáním lidské krve.

Postupnou specializací se zástupci *C. lectularius* adaptovali na pozdější lidská obydlí (Usinger 1966, Balvín 2008, Balvín et al. 2012).

- 2) Druhá hypotéza předpokládá, že specializace *C. lectularius* na člověka proběhla až později během holocénu, kdy na jihu Evropy panovalo v jeskynních aridní klima a štěnice preferenčně osidlovaly vlhčí prostředí lidských obydlí (Simov et al. 2006).
- 3) Nejméně pravděpodobná hypotéza je podle Weidnera (1958), kde popisuje vznik synantropního druhu *C. lectularius* odštěpením z holubího druhu *Cimex columbarius* Jenyns, 1839, který je v současnosti považován za sesterský druh k *C. lectularius* (Ueshima 1964, Usinger 1966).

Druhy rodu *Cimex* byly podle morfologických znaků rozděleny Usingerem (1966) do čtyř komplexů:

- 1) Skupina *Cimex pilosellus* (Horváth, 1910) z netopýrů Střední a Severní Ameriky (karyotyp od $2n = 22, XY$ do $2n = 33, X_1X_2X_3X_4Y$),
- 2) Skupina *Cimex pipistrelli* Jenyns, 1839 výhradně z netopýrů Evropy a Asie (karyotyp $2n = 31, X_1X_2Y$),
- 3) Skupina *Cimex lectularius* z člověka, netopýrů a dalších synantropních obratlovců a *Cimex columbarius* z holubů a drůbeže (karyotyp $2n = 29, X_1X_2Y$ základní stav),
- 4) Skupina *Cimex hemipterus*, pouze s jedním tropickým, parazitologicky významným druhem z člověka, netopýrů a drůbeže (karyotyp $2n = 31, X_1X_2Y$) (Ueshima 1966, 1979).

Zástupci druhu *Cimex lectularius* jsou negativně fototaktičtí, mikropterní - přední křídla jsou šupinkovitá, zadní redukována; mají morušovité oči s redukováným počtem omatidií a dosahují délky těla 4-7mm. Žijí od 6 do 9 měsíců až po dobu delší než rok (Usinger 1966, Hwang et al. 2005, Balvín 2008). *C. lectularius*, stejně jako ostatní Heteroptera, prodělává larvální vývoj hemimetabolní paurometabolií s pěti larválními instary. V každém instaru musí dojít k příjmu potravy (Reinhardt & Siva-Jothy 2007).

U všech zástupců čeledi Cimicidae dochází k rozmnožování traumatickou inseminací. Samec asymetrickým kopulačním orgánem (levá paramera) perforuje při páření v daném místě vnější část paragenitálního systému (ectospermalege), lokalizovanou laterálně na abdominu samice (Carayon 1966, Schuh & Slater 1995). Tento nebo obdobný typ kopulace se vyskytuje i u všech blízce příbuzných zástupců čeledi Polycytenidae a některých Anthocoridae (Schuh & Štys 1991).

Bodavě savé ústní ústrojí tvořené styletovitým párem maxil a mandibul chráněných pochvou z žlábkovitého labia (synapmorfie taxonu Hemiptera) (Schuh & Slater 1995, Grimaldi & Engel 2005, Krenn & Aspöck 2012) je dobrou predispozicí k hematofágii. Díky

takto adaptovanému odvozenému ústnímu ústrojí mohou štěnice přijímat vysoce energeticky výhodnou tekutou potravu, krev. Evoluční výhody bodavě savého ústního ústrojí jsou zrychlení příjmu potravy spojené s nižší expozicí predátorům a možnost zpracovávání mnohonásobně větší kořisti (Forero 2008).

Ačkoli se zástupci *Cimex lectularius* vyskytují často ve velkých abundancích, kromě podráždění kůže hostitelů mají jen malý medicínský význam a nepůsobí stabilně jako vektor žádného určitého onemocnění (Hwang et al. 2005, Romero et al. 2007). Byl testován přenos mnoha patogenních organismů, ale teoreticky je možný jen přenos viru hepatitidy B, pokud se infekční částice z výkalů štěnic dostanou do rány po sání (Burton 1963, Blow et al. 2001, Krenn & Aspöck 2012). Recentně byly ve Vancouveru zaznamenány štěnice domácí infikované bakteriálními kmeny *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecium* v komunitě sociálně slabých lidí (bezdomovců a drogově závislých). V tomto případě mohly slinné žlázy štěnic působit jako skrytý rezervoár těchto bakterií a mohly mít podíl na jejich šíření mezi lidmi (Lowe & Romney 2011).

V dnešní době se ke kontrole *Cimex lectularius* v domácnostech používají residuální insekticidy, pyrethroidy a karbamáty. Jsou testovány alternativní ekologické způsoby kontroly pastmi s agregačními semiochemikáliemi (Romero et al. 2007, Weeks et al. 2010), nebo kontaktní za použití kapalného CO₂. Některé firmy, převážně v USA, hubí štěnice vysokými teplotami, kdy vytopí místnost na 45°C. Někdy se brání štěnicím v sání na člověku mechanicky, použitím speciálních přehozů přes postel (Fox news).

2.7. Cytogenetika druhu *Cimex lectularius*

Jednou z prvních prací zabývajících se cytogenetikou štěnice *Cimex lectularius* je studie Slacka (1938) a následně Darlingtona (1939). Nejdůležitější a nejobsáhlejší komplexní práce o cytogenetice *C. lectularius* byly publikovány v 60. letech Ueshimou (1964, 1966, 1967). Mezi recentně důležité studie patří práce Grozevy & Nokkaly (2002) a Grozevy et al. (2010).

Mezi mnoha cytogenetickými zvláštnostmi zástupců rodu *Cimex* vyniká zejména existence systémů zmnožených pohlavních chromosomů. Nejvýraznější variabilita v počtu X chromosomů se vyskytuje intraspecificky u zástupců *Cimex lectularius*, počty X chromosomů se liší mezi jednotlivými populacemi, dokonce mezi samci v rámci jednotlivých populací či v různých buňkách daného jedince. Autosomů je stabilně 26, ale X chromosomů může být od dvou X₁X₂Y až do 15X chromosomů (Ueshima 1966, 1979; Grozeva et al. 2010; Kuznetsova et al. 2011).

Ueshima (1966) zkoumal samce *Cimex lectularius* z několika populací z celého světa: České republiky (Morava), Egypta (Káhira), Francie (Durtal), Japonska (Nagasaki), Mexika (Monterey - La Piedad) a USA (Berkeley - Kalifornie, Columbus - Ohio). Počty pohlavních chromosomů byly v rámci každé populace stabilní, dva X chromosomy z Kalifornie, Monterey, Nagasaki a Durtalu, šest X chromosomů z Káhiry a Moravy. Výjimku tvořila populace z Ohia, kde našel samce jak se sedmi tak s devíti X chromosomy. Dále studoval počet chromosomů u DDT rezistentní populace z Pitsburku kde samci vykazovali $2n = 35$ chromosomů a samice $2n = 40$ chromosomů.

Zatím nejdetailnější studií karyotypu *C. lectularius* se základním počtem $2n = 29$, X_1X_2Y je recentní práce Grozeva et al. (2010). Chromosomy nevykazují během mitotického dělení žádné konstriktce a jejich velikost kontinuálně klesá (obdobně indiferentní jsou i v meiose). Z tohoto důvodu není možné jednotlivé autosomy ani gonosomy jednoznačně rozlišit za použití konvenčního Giemsova barvení. X_1 a Y chromosomy mohou být jednoduše identifikovány v prometafázi či metafázi pomocí FISH za použití 18S rDNA sondy (Grozeva et al. 2010).

Během profáze I chromosomy postupně kondenzují a přecházejí z leptotene do pachytene, ale nenásleduje žádná diplotene nebo diakineze a nejsou přítomny žádné známky chiasmat. Během další spiralizace se bivalenty rozvolňují, ale stále zůstávají spojeny pevnými vláknitými strukturami, kolochoy. V metafázi I jsou bivalenty zcela spiralizované a skládají se z podélně spojených chromosomů, někdy se jeden nebo oba konce chromosomů mírně rozcházejí (Grozeva & Nokkala 2002, Pogio et al. 2009, Grozeva et al. 2010).

V metafázi I jsou pozorovatelné tři pohlavní chromosomy a 13 autosomálních párů, metafázní destička není radiální a gonosomy X_1X_2Y jsou rozprostřeny mezi autosomy. Ačkoli jsou univalenty gonosomů v metafázi I složeny jen ze 2 chromatid, dají se jen velmi těžko odlišit od autosomálních bivalentů, které mají čtyři chromatidy. Autosomální bivalenty vykazují pro Heteroptera normální prereduční meiosu, v prvním meiotickém dělení se rozdělí homologní chromosomy a ve druhém dělení se rozejdou sesterské chromatidy. Gonosomy se dělí v opačném pořadí, postredukčně, bez problémů dokonce i ve zmnoženém počtu s 15 X chromosomy (Ueshima 1966, 1979; Grozeva et al. 2010).

V metafázi II jádro obsahuje 13 dvouchromatidových autosomů a tři jednochromatidové gonosomy X_1X_2Y , které se párují způsobem „touch-and-go“. Metafázní destička v metafázi II je radiální, gonosomy se sdružují uprostřed kruhu autosomů a tvoří pseudotrivalent (Grozeva et al. 2010).

3. MATERIÁL A METODY

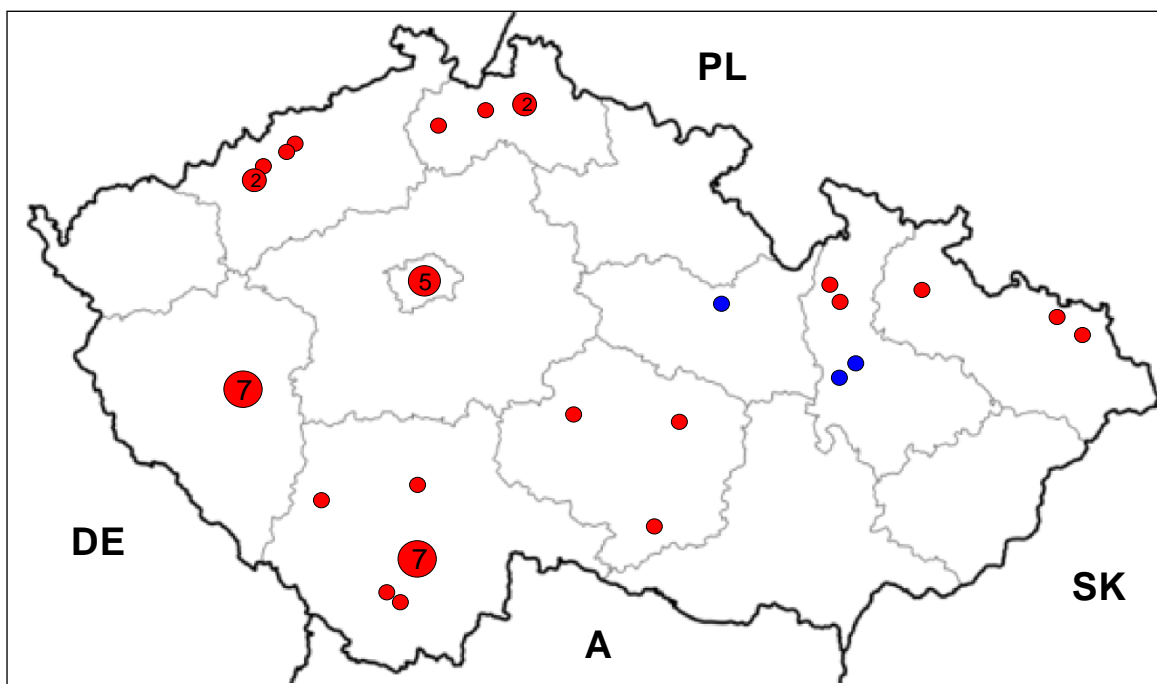
3.1. Materiál

Materiál byl získáván po celou dobu projektu v letech 2010-2012 a to z několika zdrojů. Byl úspěšně navázán kontakt s 16 specializovanými deratizačními firmami z celé České republiky, jejichž pracovníci souhlasili se zasláním živého vzorku z jejich terénních zásahů v domácnostech, hotelích a ubytovnách. Kontaktování firem i celé získávání materiálu bylo prováděno v koordinaci s Mgr. Ondřejem Balvínem. Byl také převzat jeho zavedený propracovaný systém značení vzorků.

Vzorky zástupců *Cimex lectularius* ze synantropních stanovišť jsou obtížně získatelné, zejména kvůli nerovnoměrnému, nepredikovatelnému a relativně vzácnému výskytu těchto parazitů. Materiál byl maximálně komplexně využit tím, že mrtvé exempláře byly zasílány v etanolu a zbytky po odebrání tkáně potřebné pro chromosomový preparát byly ukládány do 96% etanolu. Dále byl tento materiál zpracován metodami molekulární genetiky (studia Mgr. Ondřeje Balvína v rámci PGS na katedře zoologie PřF UK v Praze).

Projekt byl původně zaměřen na stanovení a srovnání karyotypových charakteristik v populacích *Cimex lectularius* vyskytujících se v České republice, ale posléze byl rozšířen o populace z dalších devíti evropských států (Anglie, Francie, Itálie, Norsko, Polsko, Rakousko, Slovensko, Švédsko a Švýcarsko). Materiál synantropních štěnic byl zaslán i patnácti zahraničními deratizačními specialisty, kteří poskytli sběry *C. lectularius* ze svých terénních zásahů.

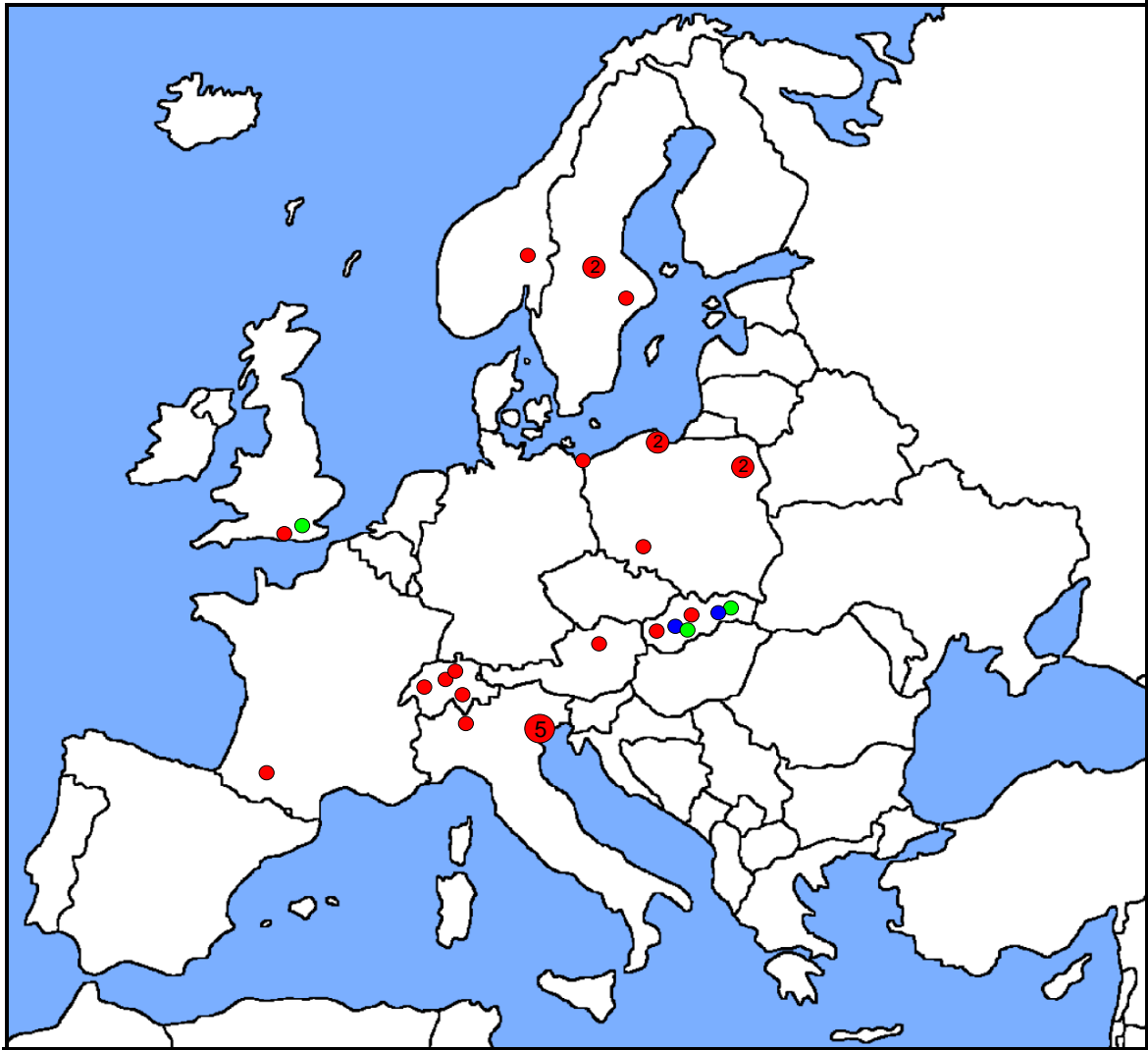
Dále bylo získáno několik sběrů (= populací) zástupců *C. lectularius* z jejich předpokládaných původních netopýřích hostitelů a zástupci dalšího druhu parazitujícího striktně na netopýrech, *Cimex pipistrelli*. *Cimex lectularius* se na netopýrech nevyskytuje příliš hojně a její materiál je relativně vzácný. Materiál *C. pipistrelli* byl využit jen pro srovnání s *C. lectularius* a proto nebyl záměrně selektivně sbírán ve větším množství. Vzorky obou druhů štěnic z netopýřů byly poskytnuty českými a slovenskými chiropterology.



Obrázek 2. **Mapa sběrů *Cimex lectularius* v rámci České republiky**
Červená = hostitel člověk. Modrá = hostitel netopýři. Číslo = počet sběrů ze stejného města.
A = Rakousko, DE = Německo, PL = Polsko, SK = Slovensko.

Celkem byly shromážděny vzorky ze 73 populací, ze 43 sběrů z České republiky (Obrázek 2) a 30 sběrů ze zahraničních lokalit (Obrázek 3). Z lidských obydlí v České republice pocházelo 40 sběrů *C. lectularius*, ze zahraničí bylo zasláno 25 sběrů synantropních *C. lectularius*. Z netopýřů byly získány vzorky pěti populací *C. lectularius* a tři sběry *C. pipistrelli*. Seznam všech sběrů podle hostitelů a lokalit je uveden v Příloze 1.

Ze všech sběrů bylo celkem zpracováno 241 jedinců a bylo zhotoveno 863 chromosomových preparátů, z nichž bylo 272 opticky podrobena důkladné analýze na mikroskopu. Podrobný seznam získaného materiálu je uveden v Příloze 2. Zpracovaný materiál je uložen na Katedře zoologie PřF UK v Praze.



Obrázek 3. **Mapa sběrů *Cimex lectularius* a *Cimex pipistrelli* v rámci Evropy**
 Červená = *C. lectularius*, hostitel člověk. Modrá = *C. lectularius*, hostitel netopýři. Zelená = *C. pipistrelli*. Číslo = počet sběrů ze stejného města

3.2. Metody

Chromosomové preparáty se zhotovují z tkání, které se vyznačují nejvyšším mitotickým indexem, který vyjadřuje množství dělících se buněk. Proto byla zvolena pro cytogenetickou analýzu primárně tkáň gonád (přednostně testes, eventuálně ovaria), analýza tkáně středního střeva, mesenteronu, byla přidána až dodatečně a vajíčka byla kvůli nepredikovatelnému výskytu zpracována jen příležitostně. Samčí gonády slouží zejména pro získání různých meiotických a mitotických figur. Samičí gonády, vajíčka a tkáň střeva obsahují menší počet mitoticky se dělících buněk.

3.2.1. Výběr a zpracování materiálu

Pro cytogenetickou analýzu byla vybrána především imaga samců a samic, byla vyzkoušena i tkáň z pátého (subadultního) larválního instaru. Pohlaví adultních jedinců je snadno rozpoznatelné podle vnějších morfologických znaků. Zjištění pohlaví larev pátého instaru je obtížnější, někdy není jisté ani podle vypitvaných gonád (často jsou miniaturní a tvarově velice podobné). K cytogenetické analýze byla vyzkoušena i tkáň jednoho jedince čtvrtého larválního instaru, mladší larvální instary nebyly cytogeneticky analyzovány.

Ze začátku byla snaha o zpracování co nejvíce získaných jedinců, později se ukázalo, že stoprocentní zpracování všech kusů ze sběrů je časově nerealizovatelné. Jedinci byli zpracováni co nejdříve po obdržení sběru. Z objemnějších vzorků bylo později zpracováno maximálně 5 jedinců, z méně početných sběrů vždy všichni dospělí jedinci a larvy pátého instaru. Preparace, vlastní příprava preparátů a barvení materiálu probíhalo v zavedené cytogenetické laboratoři katedry zoologie PřF UK v Praze pod vedením Dr. Františka Šťáhlavského.

Pro vizualizaci chromosomů byla extrahovaná tkáň zpracována cytogenetickou metodou „hotplate spreading“ modifikovanou podle Šťáhlavského & Krále (2004), která je na cytogenetických pracovištích PřF UK standardně používána při studiu pavoukovic (Arachnida). Pro použití na štěnice byla tato metoda delší dobu optimalizována. Byly vyzkoušeny různé kombinace časů působení hypotonika, fixáže a barvicího roztoku. Metoda spočívá v převedení tkáně do suspenze a adhezi chromosomů na podložní sklíčko za zvýšené teploty. Hotové trvalé preparáty nejsou překryté krycím sklem, ale i tak se vyznačují dlouhou trvanlivostí. Vzhledem k tomu, že výsledná modifikovaná metodika byla poprvé zavedena pro studium chromosomů zástupců *Cimex lectularius* a ostatní zástupci řádu Heteroptera jsou studováni převážně jinou metodikou, je dále použita metodika uvedena podrobně.

3.2.2. Zhotovení chromosomových preparátů

K přípravě chromosomových preparátů byla použita předčištěná podložní sklíčka kvality Superfrost, která byla ještě pro jistotu odmaštěna v čistém 96% ethanolu. Před použitím byla skla osušena a případný drobný prach ofouknut balonkem. Každé sklo bylo po odmaštění označeno unikátním kódem, podle zvoleného systému např. 795m01b (číslo sběru, pohlaví, pořadí jedince daného pohlaví a pořadí sklíčka z daného jedince). Všechny získané informace o každém studovaném jedinci a každém preparátu jsou uvedeny v Příloze 2. Z každého jedince bylo zhotoveno více preparátů (dva až pět) podle množství materiálu. Tkáň

střeva poskytla materiál na jedno sklo, testes podle velikosti na dvě až čtyři skla, ovarií na dvě skla a případných několik vajíček na jedno sklo. Tkáň nesmí být v preparátu moc, jinak je málo přehledný a potenciální použitelné figury se mohou překrývat.

Všech roztoků byl obecně připravován větší objem než bylo opravdu zapotřebí, příprava je snadnější a minimalizuje se riziko případné chyby při navážení či odměření přísad. Fixáž se musí míchat každý den (nebo i několikrát denně) čerstvá, oproti tomu hypotonický roztok teoreticky vydrží použitelný i do druhého dne (pro jistotu byl každý den míchán vždy čerstvý), Sörensenův pufr vydrží v lednici i delší dobu (kolem tří měsíců). Hypotonický roztok ani fixáž nebyly používány opakovaně a vždy byly aplikovány čisté pro každý nový vzorek.

Pitvy štěnic probíhaly v Petriho misce (lze použít i misku s voskovou vrstvou na přichycení pitvaného jedince) s hypotonickým roztokem (směs 500ml deionizované vody = čistější destilovaná voda a 2,8g KCl (chlorid sodný)) = 75mM roztok KCl, aby v gonádách nedocházelo k vysušování, degradaci chromosomů a v neposlední řadě byly odplaveny nečistoty. Vyjmutá tkáň byla přenesena do pitevních misek s hypotonickým roztokem kde zůstala 15-30 minut (ideální délku působení hypotonika bylo u prvních preparátů nutno odzkoušet).

Osmotickým působením hypotonického roztoku buňky přijímají vodu, dochází k uvolnění buněčného obsahu, nabobtnání a individualizaci chromosomů (Zima et al. 2004). Při přílišné hypotonizaci se chromosomy poškozuji a také mohou být některé při závěrečné disociaci z chromosomové figury odplaveny.

Hypotonizovaná tkáň byla dále fixována v roztoku ledové kyseliny octové a jednosytného alkoholu (je možno použít čistý 99,9% ethanol, nebo jemnější 99,9% methanol) v poměru 1:3. Alkohol způsobí okamžité usmrcení buněk, kyselina octová umožňuje penetraci membrán rychlé prostoupení buňky fixativem. Tak dojde k zachování všech vnitřních struktur, především chromosomů (Zima et al. 2004). Fixace probíhala ve dvou stupních. Z hypotonického roztoku byla tkáň přenesena do fixativa na 5 minut, poté byla tkáň přenesena do čistého fixativa na dalších 10 minut. Tím se omezilo naředění bezvodého fixativa vodným hypotonickým roztokem při přenášení tkáně a došlo k dokonalejšímu odvodnění tkáně. Fixace vzorků z několika prvních sběrů probíhala jednostupňově, tkáň se před vložením do misky s fixativem jen opláchla v jiné misce s fixativem.

Po fixaci byla tkáň převedena do suspenze. Byla přenesena z fixáže na podložní sklo pod stereolupu a byly přidány jedna až dvě kapky (podle velikosti tkáně) disociačního roztoku, 60% kyseliny octové (ledová kyselina octová a deionizovaná voda 3:2). Vlastní

mechanická disociace byla provedena wolframovými drátky zatavenými ve skleněných tyčinkách (wolfram se vyznačuje minimální adhezí buněk na svůj povrch). Drátky byla kompaktní tkáň rozrušena a tím zpřístupněna kyselině octové, která následně uvolní jádra buněk s chromosomy. Nerozpustné větší kousky (tracheje, shluky buněk) byly odsunuty na stranu a odstraněny z preparátu (mohly by překrýt některé kvalitní figury a tím je zcela znehodnotit).

Po vytvoření suspenze jader bylo sklíčko přeneseno na vyhřátou histologickou ploténku (na 45°C) a ihned se začala drátkem kapka se suspenzí buněk posunovat po celém sklíčku (při absenci pohybu suspenze po sklíčku se adherující buňky shlukují a vytvářejí při odpařování disociačního roztoku lemy, které jsou někdy dále velice těžko diagnostikovatelné, případné figury jsou nahloučené s ostatními a mohou se překrývat). Vedením kapky se suspenzí se snažíme dosáhnout ideálního rozprostření buněk po celém povrchu sklíčka tak, aby se minimalizoval překryv jednotlivých figur. Když se kapka z většiny odpařila a již se obtížně vedla, byl její zbytek odklepnut. Hotová sklíčka uložená v zásobních kazetách byla skladována v lednici a byla barvena nejdříve druhý den, aby dobře zaschla a nedošlo k odplavení chromosomů.

Preparáty byly barveny 5% roztokem Giemsova barviva v Sørensenově pufru. Na přípravu Sørensenova pufru byl použit jeden litr deionizované vody a 4,75g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát) a 4,54g KH_2PO_4 (dihydrogenfosforečnan draselný). pH pufru bylo upraveno vždy čtyřmi kapkami NaOH (hydroxid sodný) na 6,8.

Na barvení byla použita směs 100ml Sørensenova pufru s 5ml Giemsova barviva. Z povrchové blanky barviva byly ubrouskem odstraněny nečistoty (mastnota, sraženiny), preparáty byly barveny (po předešlé optimalizaci) vždy přibližně 30 minut. Po skončení barvení byla kyveta se sklíčky několikrát propláchnuta proudem vodovodní vody, aby se sraženiny barvy z hladiny vyplavily a nenalepily se na sklíčka při vyndávání. Nakonec byla do kyvety na několik sekund nalita destilovaná voda, aby se ze sklíček opláchly nečistoty z vodovodní vody a nezaschly na nich. Po osušení byla sklíčka uskladněna v kazetách.

3.2.3. C-pruhování

Mimo klasického cytogenetického zpracování tkáně metodou „hotplate spreading“ a následné vizualizace chromosomů Giemsou byla vyzkoušena i metoda C-pruhování (Sumner 1972), zavedená a běžně používaná na PřF UK při studiu pavoukoců.

C-pruhování je barvicí metoda, při které dochází k vizualizaci oblastí konstitutivního heterochromatinu. Je založena na denaturačním působení HCl (kyseliny chlorovodíkové), Ba(OH)₂ (hydroxidu barnatého) a zpětné renaturaci DNA v solném roztoku citrátu sodného (SSC pufr). Za zvýšené teploty jsou při této proceduře odstraněny segmenty euchromatinu a dále se intenzivně barví Giemsovým barvivem jen úseky konstitutivního heterochromatinu (Zima et al. 2004). C-pruhování se standardně používá např. při studiu chromosomů obratlovců, v případě chromosomů bezobratlých živočichů (navíc s holokinetickými chromosomy) je jeho účinnost výrazně nižší.

Příprava preparátů probíhala stejně jako při metodě „hotplate spreading“, rozdíl byl pouze v teplotě, při které buňky adherovaly k povrchu podložního skla. Teplota histologické ploténky byla snížena na 30°C, aby se omezila destrukce chromatinu. Preparáty by optimálně měly být několik dní staré. Při pilotním barvení pro zjištění ideálního stáří preparátů pro použití metody C-pruhování byla použita tři skla stará 93 dní, jedno 80 dní, jedno 10 dní, dvě osm dní a dvě skla stará tři dny (Tabulka 4 na straně 50). Celkem bylo C-pruhování vyzkoušeno na devíti preparátech, postup při jejich přípravě se lišil jen teplotou roztoku Ba(OH)₂ při konstantním čase čtyři minuty.

Nejprve bylo provedeno tzv. stárnutí skel. Skla byla jednu hodinu v sušárně při 60°C, aby se chromosomy pevně přichytily ke sklu a při působení HCl neuplavaly. Po vyjmutí ze sušárny se skla ochladila na pokojovou teplotu umístěním na sucho do chladnější kyvety přibližně na 10 minut. Dále byla struktura chromatinu rozvolněna působením 0,2M HCl (500ml deionizované H₂O a 8,1ml 35% HCl) po dobu 45 minut, tzv. předpůsobení. Skla byla následně důkladně dvakrát opláchnuta ve velkých kádinkách s destilovanou vodou a nechala se schnout. Po opláchnutí skel byly dány kyvety určené na Ba(OH)₂ a kádinky s destilovanou vodou na opláchnutí do lázně předehřáté na 50°C. Hodinu po začátku sušení byl připraven roztok Ba(OH)₂ z 500ml deionizované vody a 5g krystalického Ba(OH)₂. Směs byla promíchávána na elektromagnetické míchačce v digestoři při 65°C pět až deset minut. Dále byl roztok zahřán na 98°C (více se ohřát nesmí, protože by začal bouřlivě vřít), ploténka byla nastavena na vyšší teplotu a teplota roztoku byla kontrolována teploměrem. Nakonec byl hotový roztok Ba(OH)₂ přefiltrován přes filtrační papír do Erlenmayerovy baňky.

Horký roztok Ba(OH)₂ se po přelítí v předehřátých kyvetách ochladil na standardní teplotu 50°C (podle původního protokolu). Dále byla provedena čtyřminutová inkubace čtyř preparátů (při ponořování skel byl buničinou odstraňován z roztoku povrchový film ze sraženiny BaCO₃ (uhličitanu barnatého), aby se nepřichytil na sklíčka a nevytvořil nerozpustný povlak). Poté byla teplota roztoku Ba(OH)₂ zvýšena na 60°C a proběhla pokusná

inkubace tří dalších skel, nakonec byla další pokusná inkubace dvou skel provedena i po ochlazení na teplotu 40°C (Tabulka 4 na straně 50). Po inkubaci skel v Ba(OH)₂ byl roztok s povrchovým filmem z kyvety vyplaven destilovanou vodou (obdobně jako u barvení Giemsovým barvivem). Pak byla skla ihned důkladně oplachována v destilované vodě o teplotě přibližně 40°C, protože vyšší teplota vody pomáhá lepšímu odmytí Ba(OH)₂ z povrchu skla (kádinka s destilovanou vodou byla temperována také na 50°C, ale před inkubací preparátů byla z lázně vyjmuta, aby se ochladila). Poté bylo každé sklo ještě jednou opláchnuto ve studené destilované vodě. Nakonec byla skla opláchnuta ještě jednou v teplé a studené čisté destilované vodě.

Po dvou hodinách, kdy byla skla úplně suchá, byla provedena renaturace chromatinu v 2x SSC pufru o teplotě 60°C po dobu 75 minut. 2x SSC pufr byl připraven z 500ml deionizované vody, 8,76g NaCl a 4,41g citrátu sodného, pH bylo upraveno na 7,0 pomocí HCl. Po inkubaci v 2x SSC pufru byla skla opět opláchnuta v destilované vodě. Preparáty byly uloženy v lednici a po čtyřech dnech barveny 5% roztokem Giemsova barviva v Sørensenově pufru 60 minut. Všechna sušení po opláchnutí probíhala při pokojové teplotě, kyvety s roztoky a skly byly vždy přikryty víčky.

3.2.4. Grafická analýza figur

Hotové obarvené a suché chromosomové klasické i C-pruhované preparáty byly prohlíženy a vyhodnoceny mikroskopem Olympus Provis AX 70. Vyhledávání figur na skle probíhalo při použití imerzního objektivu se zvětšením 40x a 20x, dobré použitelné chromosomové figury byly dokumentovány pomocí digitální kamery Olympus DP 72 a programu QuickPHOTO CAMERA 2.3 za použití imerzního objektivu se zvětšením 100x.

Skla byla prohlížena s důrazem na vyhledávání kvalitních figur s největší průkazností počtu chromosomů a možností získat jednoznačný karyotyp. Při získání kvalitních fotografií figur meiosis u daného jedince, které s vysokou pravděpodobností jednoznačně reprezentovaly základní karyotyp $2n=29, X_1X_2Y$, byl tento počet vztažen pro celou populaci daného sběru. V případě získání nejednoznačných figur nebo nejasností okolo zjištění přesného počtu chromosomů bylo přistoupeno k prohlédnutí více jedinců z populace nebo více preparátů daného jedince. Stejný postup byl zachován u jedinců s prvním preparátem negativním bez počítatelných figur a také při zjištění jedince s odlišným vyšším počtem chromosomů. Aby se abnormální vyšší počet potvrdil, bylo prohlédnuto více preparátů daného jedince a také preparáty dalších zástupců stejného sběru. Figury s vyššími počty chromosomů často nebyly

zcela jednoznačné a v některých případech musel být počet chromosomů určen až podle nejčastěji zaznamenaného počtu, hrubým odhadem či dokonce průměrem. Opakované prohlížení dalších preparátů u původně negativních jedinců bylo použito zejména v případech, kdy byl celý sběr zastoupen jen jedním jedincem, nebo byl počet chromosomů u více jedinců v populaci variabilní.

Na detailní zpracování fotografií a výsledné sestavování karyogramů a obrazových tabulí byl používán grafický editor Corel DRAW X5. Počty chromosomů jednotlivých jedinců *Cimex lectularius* jsou uvedeny v Příloze 2. Popis velikosti chromosomů v karyogramech je podle práce Bardelly et al. (2010).

3.2.5. Měření gonád

Pro zjištění případné závislosti kvality chromosomových preparátů na velikosti gonád byly vypitvané gonády obou pohlaví na začátku hypotonizace vyfotografovány digitální kamerou Olympus DP70 se stereolupou Olympus SZX12. Gonády byly změřeny v programu Corel DRAW (Příloha 2). Měřena byla vždy jen jedna gonáda, upřednostněny byly větší či nepoškozené z páru. Měřena byla délka od vývodu gonoduktů na bázi gonády podél mediální osy k apexu a dále maximální šířka gonády. Zdokumentovány byly gonády jen u 101 jedinců, protože tato metoda byla zařazena jako doplňková až v průběhu studia. Závislost kvality preparátů na naměřených velikostech gonád byla testována statisticky analýzou rozptylu (Analysis of variance) ANOVA. Délka, šířka a relativní plocha (součin délky šířky) byly závislé a kategorie kvality byly „categorical predictor“.

4. VÝSLEDKY

Z celkového počtu 70 získaných sběrů *Cimex lectularius* (pět populací z netopýrů a 65 synantropních populací z člověka) a tří sběrů netopýřích *Cimex pipistrelli* bylo zpracováno celkem 241 jedinců a zhotoveno 863 chromosomových preparátů, z nichž bylo podrobně analyzováno 272 (Příloha 2). Z celkového počtu 272 preparátů bylo 52 vyhodnoceno jako kvalitních s jednoznačnými dobře počítatelnými figurami v meiose i mitose, 78 preparátů bylo vyhodnoceno jako průměrných pouze s fázemi mitotického dělení a na 142 preparátech nebyly nalezeny počítatelné chromosomální figury. Karyotyp byl určen celkem u 119 jedinců z 63 populací, seznam všech hodnocených chromosomových preparátů je uveden v Příloze 2.

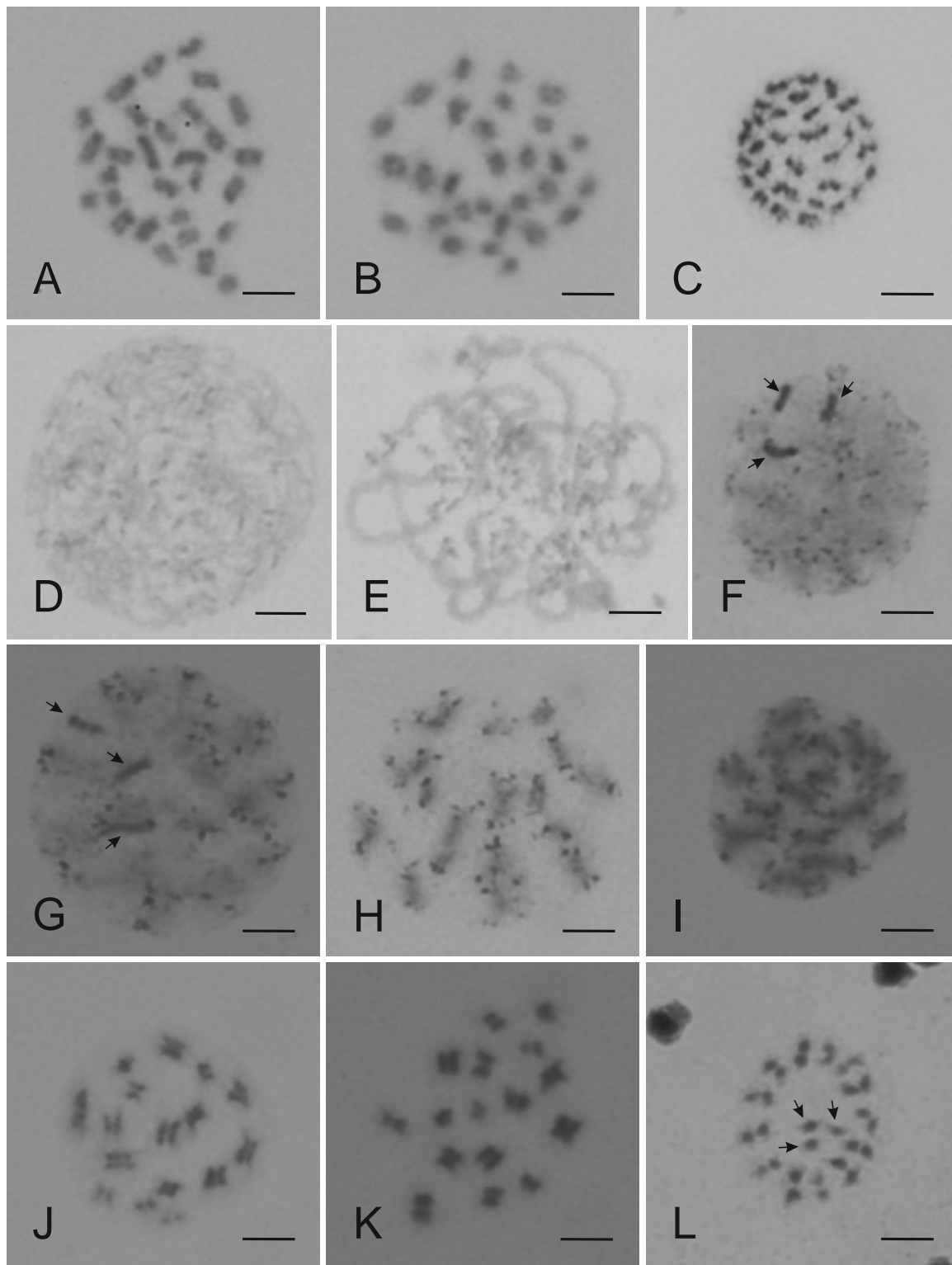
Bylo analyzováno 20 chromosomových preparátů z tkáně mesenteronu, sedm preparátů z vajíček, 20 z larev 5. instaru a jeden z larvy 4. instaru. U dospělých jedinců bylo hodnoceno 79 preparátů ovárií ze 73 jedinců a 146 preparátů tkáně testes ze 111 jedinců. Celkem bylo pořízeno okolo 1900 fotografií figur různých fází mitosy a meiosy.

4.1. Hodnocení konvenčních preparátů

Nejčastěji byly u samců pozorovány a fotograficky dokumentovány figury pozdější meiotické profáze: Hojné difuzní stadium a u některých jedinců postpachytene, dále pak figury metafáze I, metafáze II a mitotické metafáze. U několika zástupců byly zachyceny meiotické figury různých stupňů prometafáze I či prometafáze II. Z mitosy byla zaznamenána profáze, prometafáze a zejména pak velké množství figur spadajících do stupňů mitotické metafáze a několikrát i chromosomy v anafázi. U preparátů ze samičích ovárií byly dokumentovány výhradně počitatelné figury mitotické metafáze, z meiosy byly přítomny nejčastěji pouze nepočitatelné figury rané profáze tj. leptotene a pachytene (Obrázek 4).

Tmavě barvitelné oblasti jsou viditelné pouze v meiotické profázi, raných stupních mitotické prometafáze a gonosomy tvoří heteropyknotické útvary také během difuzního stadia před začátkem vlastního meiotického dělení. Z difuzního stadia jádro přechází do postpachytene. Gonosomy při přechodu postupně ztrácejí schopnost se tmavě barvit a během postpachytene jsou opět neodlišitelné od autosomů. Postpachytene je fáze funkčně nahrazující diplotene a diakinezi z důvodu nepřítomnosti chiasmát, která definují právě tyto dva závěrečné stupně profáze. Během postpachytene probíhá opětovná kondenzace a párování homologních chromosomů. V této fázi výrazně prominují tmavě zbarvené telomerické oblasti na koncích každé chromatidy, které na konci postpachytene mizí a v prometafázi I se již objevují isochromatické páry chromosomů, které dále kondenzují, až do metafáze I (Obrázek 4). Chromosomy v metafázích jsou většinou homogenně zbarvené a neobsahují žádné pozitivně ani negativně heteropyknotické části.

V meiotické metafázi I tvoří autosomy bivalenty a nepárující gonosomy univalenty, v případě základního počtu $2n = 29$, X_1X_2Y figura vykazuje 16 elementů: 13 párů autosomů a 3 gonosomy. V metafázi II jsou autosomy dvouchromatidové a gonosomy jednochromatidové, figury metafáze II jsou jediné, kde lze jednoznačně odlišit páry autosomů od jednotlivých pohlavních chromosomů (Obrázek 4 K, L).



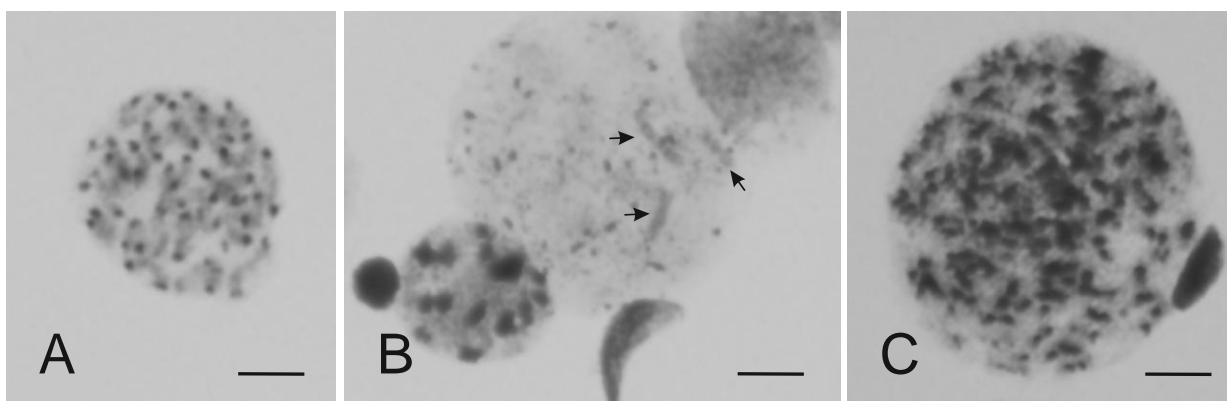
Obrázek 4. Dokumentované základní fáze mitosy a meiosy v populacích *Cimex lectularius* s počtem chromosomů $2n = 29, X_1X_2Y$

A-C, F-L: samec. D, E: samice.

A: Mitotická prometáze, populace 667. B: Mitotická metafáze, 667. C: Mitotická anafáze, 610. D: Leptotene, 610. E: Pachytene, 644. F: Difuzní stadium, 418. G: Přejchod z difuzního stadia do postpachytene, 623. H: Postpachytene, 624. I: Pozdní postpachytene, 623. J: Prometáze I, 617. K: Metafáze I, 751. L: Metafáze II, 615.

Šipka = pohlavní chromosom. Měřítka = $5\mu\text{m}$.

Na negativní preparátech nebyly nalezeny jednoznačně počitatelné figury, preparáty obsahovaly zejména kompaktní mitotické figury v prometafázi, kde jednotlivé chromosomy nebyly dostatečně individualizovány, a proto se nedal stanovit jejich počet. Často se na těchto preparátech vyskytovaly u samců jádra v určité fázi difuzního stadia s dobře rozpoznatelnými heteropyknotickými gonosomy a u samic někdy i rané stupně meiotické prometafáze: Leptotene a pachytene. Dále negativní preparáty obsahovaly nejčastěji granulární jádra v syntetickém stadium interfáze, která byla vyplněná velkým množstvím partikulí nechromosomální povahy (Obrázek 5).

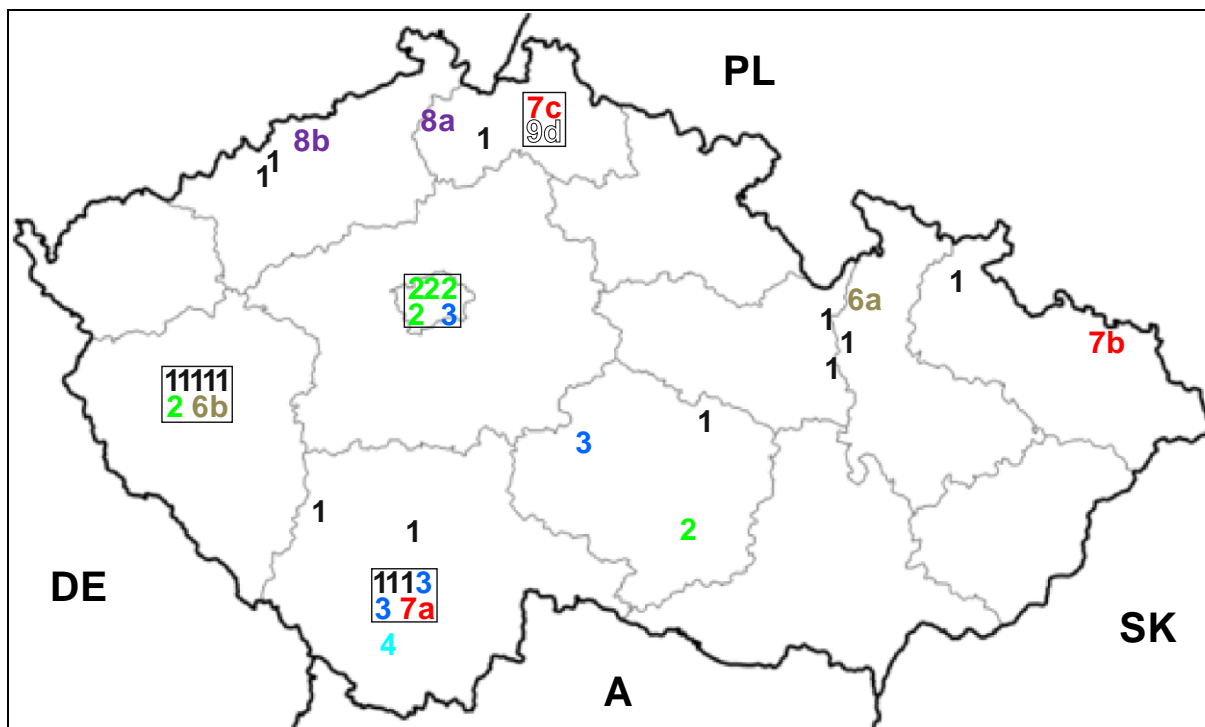


Obrázek 5. Příklady nepočitatelných figur u samce *Cimex lectularius* z populace 609
 A: Mitotická prometafáze. B: Difuzní stadium. C: Granulární jádro během syntézy v interfázi.
 Šipka = pohlavní chromosom. Měřítka = 5 μ m.

4.1.1. Počty chromosomů v jednotlivých populacích

Celkem bylo zjištěno 10 odlišných počtů chromosomů u samců $2n = 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 37, 42$ a 47 . Samice ve většině případů vykazovaly komplementární počet chromosomů k samcům, ale vyskytlo se i 11 karyotypově heterogenních populací, kde počty chromosomů samců a samic byly navzájem odlišné. Vyskytly se dokonce i dva případy populací, kde samice svým počtem chromosomů nebyla komplementární k žádnému dokumentovanému samci, tyto samice měly abnormální karyotyp s lichým počtem chromosomů $2n = 33$ (kód 840) a $2n = 43$ (kód 708). Sedmnáct sběrů obsahovalo jen samice, ale jen u devíti sběrů samic byly nalezeny počitatelné figury chromosomů. Samice má obecně vždy vyšší počet chromosomů než komplementární samec z důvodu více gonosomů, např.: Samec $2n = 29, X_1X_2Y$, samice $2n = 30, X_1X_1X_2X_2$. Čím vyšší počet X chromosomů se v dané populaci vyskytuje, tím větší je rozdíl v počtu chromosomů mezi pohlavími. Na území České

republiky se vyskytuje na základě analyzovaného materiálu z 37 sběrů 12 typů populací, které se liší karyotypem svých jedinců (Obrázek 6). Dvacet dva sběrů z ostatních evropských zemí obsahovalo celkem 10 variant populací (Obrázek 7).



Obrázek 6. Orientační mapa rozložení karyotypových ras *Cimex lectularius* na území České republiky

1: $2n = 29$. 2: $2n = 30$. 3: $2n = 31$. 4: $2n = 32$. 6a: $2n = 29, 30$. 6b: $2n = 29, 32$. 7a: $2n = 30$. 7b: $2n = 30, 31$. 7c: $2n = 31, 34$. 8a: $2n = 29, 33, 34$. 8b: $2n = 30, 32, 33, 34$. 9d: $2n = 35, 42, 47$.

7a: ** = samice s nejasným počtem chromosomů $2n = 36-40$.

Číslo = skupina s obdobným počtem chromosomů.

Písmeno = podskupina s určitým heterogenním karyotypem.

Barva = podle jednotlivých skupin, pro rychlejší orientaci.

Rámeček = sběry ze stejného města.

A = Rakousko, DE = Německo, PL = Polsko, SK = Slovensko.



Obrázek 7. **Orientační mapa rozložení karyotypových ras *Cimex lectularius* v Evropě**

1: $2n = 29$. 2: $2n = 30$. 5: $2n = 33$. 6a: $2n = 29, 30$. 6b: $2n = 29, 32$. 7a: $2n = 30$. 8c: $2n = 31, 32$. 9a: $2n = 31, 34, 35, 37$. 9b: $2n = 33, 37$. 9c: $2n = 34, 37$.

7a: * = samice s nepřevoditelným karyotypem $2n = 33$.

9a: *** = samice s nepřevoditelným karyotypem $2n = 43$.

Číslo = skupina s obdobným počtem chromosomů.

Písmeno = podskupina s určitým heterogenním karyotypem.

Barva = podle jednotlivých skupin, pro rychlejší orientaci.

Rámeček = sběry ze stejného města.

Následujících devět kategorií bylo pracovním stanoveno na základě obdobných charakteristik v počtech chromosomů zaznamenaných v karyotypech studovaných populací (Tabulka 3). Orientační dělení populací do skupin se primárně řídí vždy podle určených karyotypů pozorovaných samců, karyotyp samic byl u heterogenních populací převeden na karyotyp hypotetického odpovídajícího komplementárního samce, aby bylo možné jedince

opačného pohlaví porovnat s odlišným počtem X chromosomů. Skupina 1. obsahuje populace s homogenním karyotypem $2n = 29$, podobně skupina 2. homogenní populace s $2n = 30$ a 3. homogenní populace s $2n = 31$. Skupina 4. a 5. obsahují jen po jedné homogenní populaci, 4. s $2n = 32$ a 5. s $2n = 33$. Skupina 6. obsahuje heterogenní populace kde se vyskytuje samec s $2n = 29$ a další jedinci s jiným počtem chromosomů, skupina 7. jsou heterogenní populace kde samec vykazuje $2n = 30$ nebo $2n = 31$ a samice odlišný počet. Osmá skupina obsahuje

Tabulka 3. Přehled populací *Cimex lectularius* podle počtu chromosomů

Skup. = skupina, Pskup. = podskupina. 1.-5. populace s homogenním karyotypem. 6.-9. populace s heterogenním karyotypem.

2n: všechny diploidní počty chromosomů ve skupině/podskupině.

* = samice 840f01 s lichým nepřevoditelným karyotypem $2n = 33$.

** = samice 662f01 s nepřevoditelným karyotypem $2n = 36-40$.

*** = samice 708f01 s lichým nepřevoditelným karyotypem $2n = 43$.

)¹ = karyotyp samce nebo karyotyp samice převedený na odpovídajícího samce.

Gonosomy: všechny stavy pohlavních chromosomů.

Počet = počet populací ve skupině/podskupině.

Státy: původ populací. A = Rakousko, CZ = Česká republika, F = Francie, GB = Velká

Británie, CH = Švýcarsko, I = Itálie, N = Norsko, PL = Polsko, S = Švédsko, SK = Slovensko.

Kód sběru: podtržení = *C. lectularius* z netopýřů.

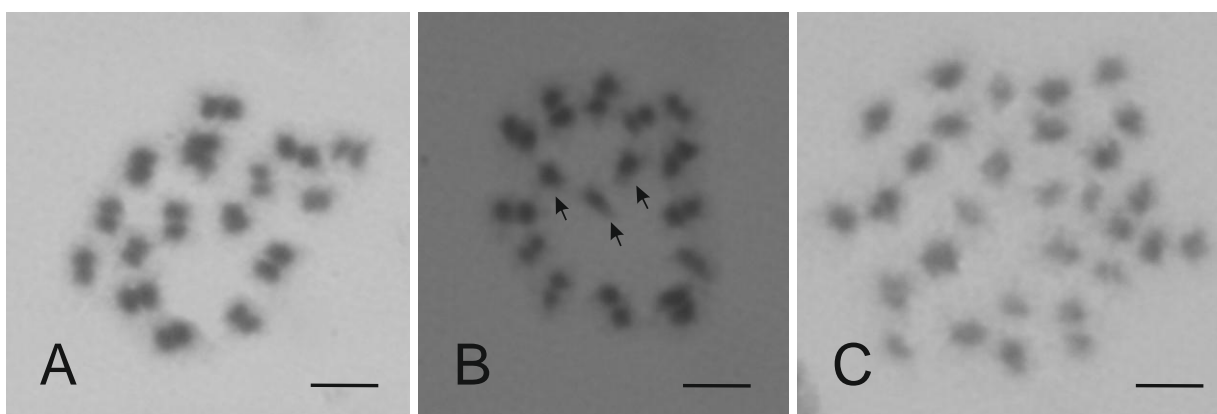
Skup.	Pskup.	2n	Gonosomy	Počet	Státy	Kód sběru
1.		29	XXY	31	CZ, GB, CH, I, N, PL, SK	417, 418, 421, 423, 609, 610, 612, 615, 618, 621, 623, 624, 625, 640, 644, 667, 668, 669, 670, 671, 707, 719, 732, 737, 745, 751, 789, 831, 843, 844, 845
2.		30	XXXXY	9	CZ, F, I, PL	633, 634, 642, 647, 648, 659, 750, 817, 838
3.		31	4XY	4	CZ	629, 643, 645, 658
4.		32	5XY	1	CZ	665
5.		33	6XY	1	S	795
6.	6.a	29, 30) ¹	XXY, XXXXY	2	CZ, I	617, 752
	6.b	29, 32	XXY, 5XY	2	CZ, I	657, 753
7.	7.a	30, *, **	XXXXY	2	CZ, PL	662, 840
	7.b	30, 31	XXXXY, 4XY	1	CZ	619
	7.c	31, 34) ¹	4XY, 7XY	1	CZ	613
8.	8.a	29) ¹ , 33, 34	XXY, 6XY, 7XY	1	CZ	661
	8.b	30) ¹ , 32) ¹ , 33, 34	XXXXY, 5XY, 6XY, 7XY	1	CZ	632
	8.c	31) ¹ , 32	4XY, 5XY	1	S	798
9.	9.a	31, 34) ¹ , 35, 37, ***	4XY, 7XY, 8XY, 10XY	1	SK	708
	9.b	33) ¹ , 37	6XY, 10XY	1	S	796
	9.c	34) ¹ , 37	7XY, 10XY	1	A	720
	9.d	35, 42, 47	8XY, 15XY, 20XY	1	CZ	614

populace s vyššími počty chromosomů, ve kterých samci mají $2n = 32, 33$ nebo 34 a 9. skupina sdružuje populace s nejvyššími počty chromosomů samců, $2n = 33, 34, 35, 37, 42$ nebo 47 a je doplněna přepočtenými karyotypy samic. Podskupiny transparentně prezentují stav konkrétního heterogenního karyotypu v jednotlivých populacích, které vykazují shodnou variabilitu počtu chromosomů.

1. V první skupině bylo zaznamenáno 31 populací se základním počtem $2n = 29$, $X_1X_2Y/30, 4X$ (samec/samice) chromosomů (Obrázek 4, 6). Jedinci v těchto populacích měli stabilní karyotyp a vždy stejný počet chromosomů, sedm sběrů bylo tvořeno pouze samicemi. Distribuce populací se základním počtem $2n = 29/30$ chromosomů se v rámci České republiky koncentrovala v okolí Českých Budějovic (kód 644, 667, 668 a 670), Chomutova (612 a 615), Olomouce a Šumperku (609 a 623) a v okolí Plzně (610, 621, 624, 625 a 640). Dále se populace se základním počtem vyskytovaly v okolí Liberce (618), ve Strakonici (669) a ve Žďáru nad Sázavou (671).

V ostatních evropských státech (Obrázek 7, 8) se zástupci *Cimex lectularius* se základním počtem vyskytovali v populacích z Itálie (kód 751), Norska (789), Polska (831, 843, 844 a 845), Slovenska (707), Švýcarska (732, 737 a 745) a Velké Británie (719).

Do skupiny populací se základním počtem $2n = 29/30$ patří i všechny studované populace *C. lectularius* sebrané z netopýřích hostitelů, dvě z České republiky v okolí Olomouce (kód 417 a 418) a dvě ze Slovenska (421 a 423) (Obrázek 6, 7, 8).



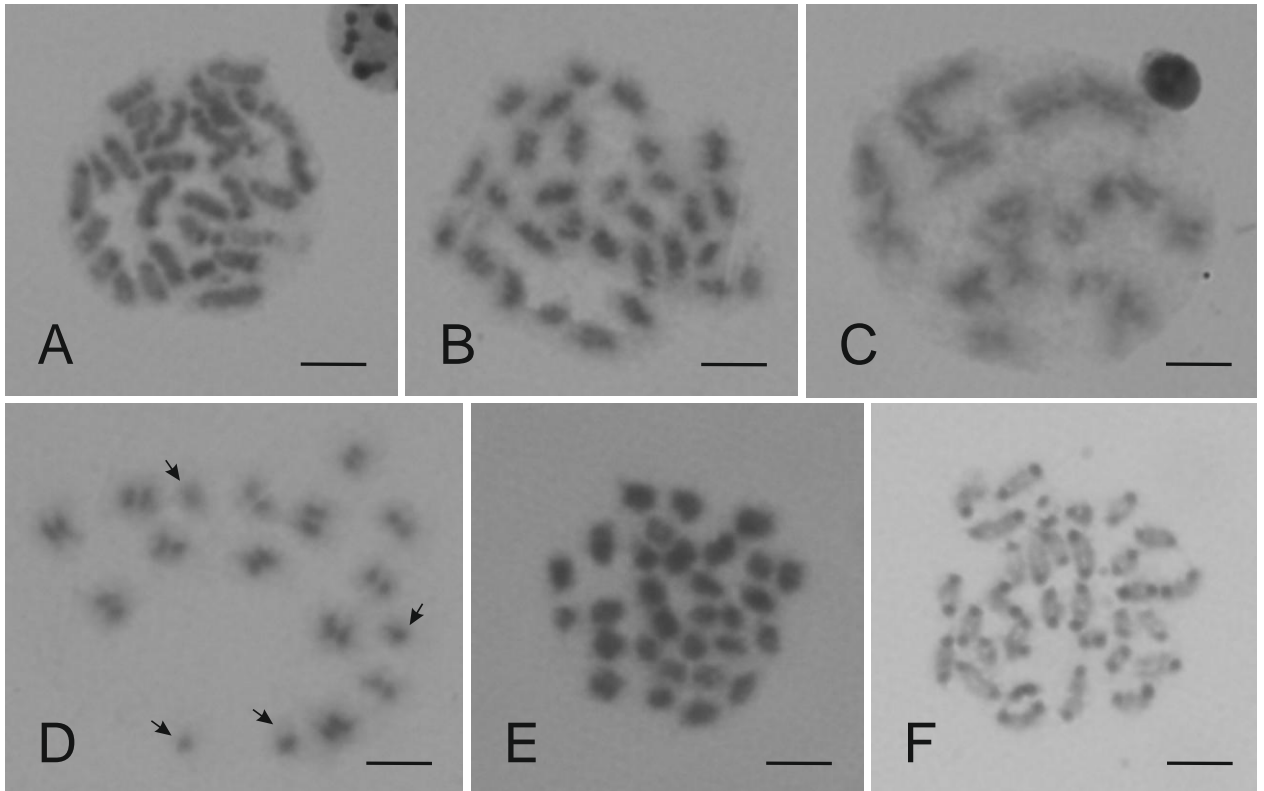
Obrázek 8. Příklady figur *Cimex lectularius* s karyotypem $2n = 29, X_1X_2Y/30, 4X$

A, B: samec, C: samice.

A: Metafáze I, populace 707. B: Metafáze II, populace 751. C: Mitotická metafáze, populace 417.

Šipka = pohlavní chromosom. Měřítka = $5\mu\text{m}$.

2. Druhou kategorií tvoří devět homogenních populací složených ze samců s karyotypem $2n = 30, X_1X_2X_3Y$ a samicemi s komplementárním počtem chromosomů $2n = 32, 6X$. V pěti populacích byli zdokumentováni jen samci s karyotypem $2n = 30$ z Plzně (kód 634), Prahy (642 a 648), okolí Třebíče (633) a Polska (838), v jedné populaci z Itálie (750) jsou záznamy samců i odpovídajících samic a dále tři populace z Francie (817) a Prahy (647 a 659) se záznamy pouze ze samic $2n = 32$ (Obrázek 6, 7, 9).



Obrázek 9. Příklady figur *Cimex lectularius* s karyotypem $2n = 30, X_1X_2X_3Y/32, 6X$

A-E: samec $2n = 30$. F: samice $2n = 32$.

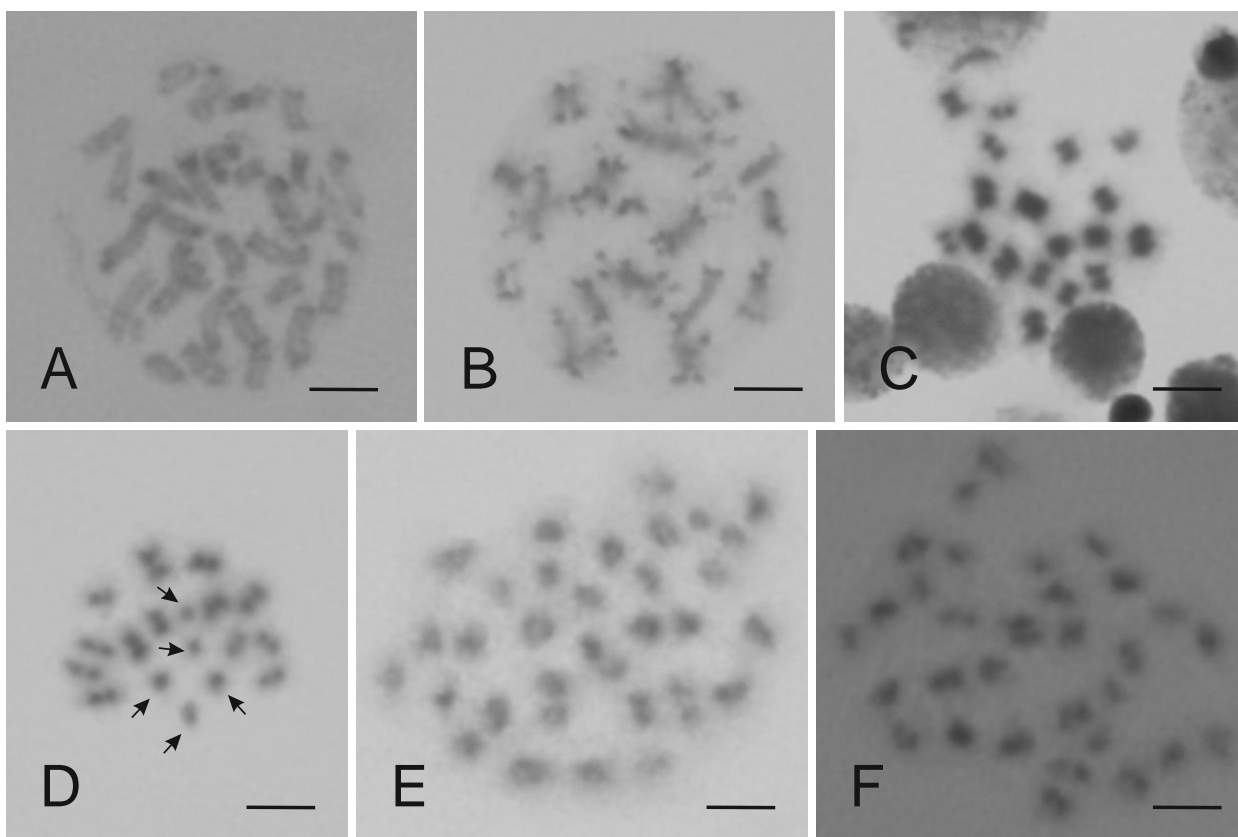
A-D: populace 750. E: populace 648. F: populace 659.

A, F: Mitotická prometáfáze. B, E: Mitotická metafáze. C: Prometáfáze I. D: Metafáze II.

Šipka = pohlavní chromosom. Měřítko = $5\mu\text{m}$.

3. Homogenní populace, ve které se vyskytovali samci s $2n = 31, X_1X_2X_3X_4Y$ a komplementární samice s $2n = 34, 8X$ byly nalezeny ve čtyřech případech. Dva sběry z Českých Budějovic (kód 629 a 645) obsahovaly pouze jednu samici. U populace z Prahy (643) byl určen karyotyp jen jednoho samce, ale v populaci z Humpolce (658) byly zachyceny karyotypy samců $2n = 31$ i samic $2n = 34$ (Obrázek 6, 10).

Do třetí skupiny by patřili i zástupci dvou populací *Cimex pipistrelli* (190 a 191) ze Slovenska, kteří měli karyotyp $2n = 31, X_1X_2Y$ (Obrázek 10 F). Jediná samice *C. pipistrelli* z populace 190 vykazovala na třech mitotických figurách přibližný vyšší počet $2n = 36, 8X$.



Obrázek 10. Příklady figur *Cimex lectularius* s karyotypem $2n = 31, X_1X_2X_3X_4Y/34, 8X$ a karyotypu *Cimex pipistrelli* $2n = 31, X_1X_2Y$

A-E: *C. lectularius*, populace 658. F: *C. pipistrelli* populace 191.

A-D, F: samec. E: samice

A, E: Mitotická prometafáze. B: Postpachytene. C: Metafáze I. D: Metafáze II. F: Mitotická metafáze.

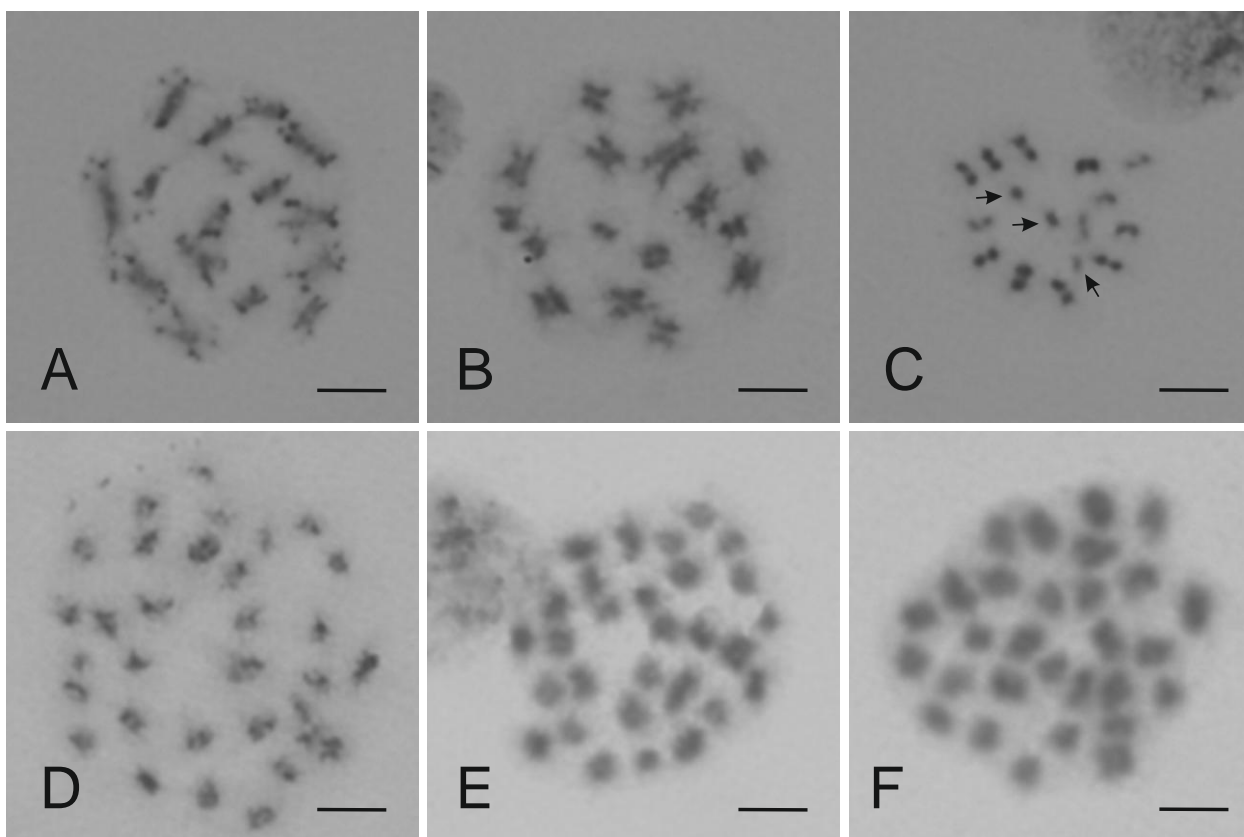
Šipka = pohlavní chromosom. Měřítko = $5\mu\text{m}$.

4. Čtvrtá skupina je také homogenním a je tvořena jediným sběrem z okolí Českých Budějovic (kód 665), ve kterém byly pouze dvě samice se shodným karyotypem $2n = 36, 10X$ (Obrázek 6, 13 F).

5. Do této skupiny patří jediná homogenní populace ze Švédska (kód 795), kde byl počet chromosomů stanoven shodně u dvou samců na $2n = 33, 6XY$ (Obrázek 7, 13 G).

6. Do šesté skupiny patří čtyři populace s heterogenním karyotypem. Samci vykazují základní stav $2n = 29, X_1X_2Y$ nebo vyšší $2n = 30, X_1X_2X_3Y$ a $2n = 32, 5XY$, samice jsou vždy s nekomplementárním vyšším počtem chromosomů. Výskyt těchto populací odpovídá

výskytu populací se základním stavem chromosomů, z Olomouce, Plzně a Itálie. V populaci z Plzně (kód 657) byly zjištěny rozdílné karyotypy dvou samců, základní počet $2n = 29$, X_1X_2Y a vyšší $2n = 32$. V populaci z okolí Olomouce (617) se vyskytoval samec se základním stavem $2n = 29$ a samice s vyšším počtem $2n = 32$. V populaci z Itálie (753) byl určen karyotyp jediného samce $2n = 29$ nebo 32 chromosomů na základě tří nejednoznačných figur. Zástupci druhé italské populace (752) tvoří heterogenní populaci s jedinci o vyšším počtu chromosomů, samec $2n = 30$, $X_1X_2X_3Y$ a odpovídající samice $2n = 32$, $6X$, u této populace byl popsán i samec se základním počtem $2n = 29$, X_1X_2Y (Obrázek 6, 7, 11).



Obrázek 11. Příklady figur samců *Cimex lectularius* s karyotypem $2n = 29$, X_1X_2Y a samice s karyotypem $2n = 32$, $X_1X_1X_2X_2X_3X_3$

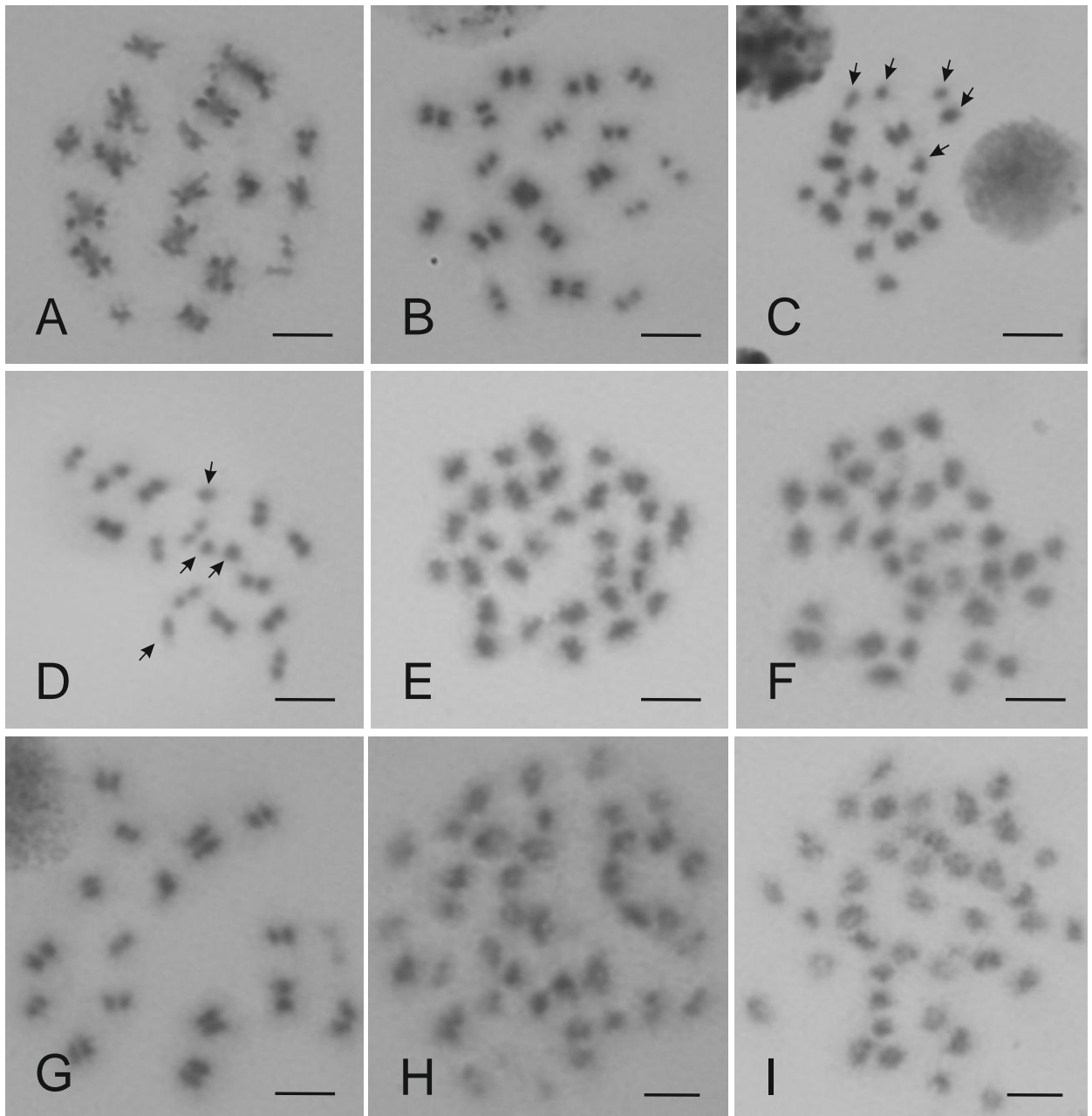
A-C, E, F: samec. D: samice.

A-D: populace 617. E: populace 657. F: populace 752.

A: Postpachytene. B: Prometafáze I. C: Metafáze II. D-F: Mitotická metafáze.

Šipka = pohlavní chromosom. Měřítko = $5\mu\text{m}$.

7. Sedmou skupinu tvoří populace s nejednotným počtem chromosomů, u samců se vyskytuje karyotyp $2n = 30$, $X_1X_2X_3Y$ nebo $2n = 31$, $X_1X_2X_3X_4Y$ a samice vykazují různé nekomplementární karyotypy. V populaci z okolí Ostravy (kód 619) byl u jednoho samce



Obrázek 12. Příklady figur *Cimex lectularius* z heterogenních populací

A-E, G: samec. F, H, I: samice.

A-D: populace 619. E, F: populace 840. G, H: populace 662. I: populace 613.

A-C: $2n = 31$. D, E, G: $2n = 30$. F: $2n = 33$. H: $2n =$ přibližně 40. I: $2n = 40$.

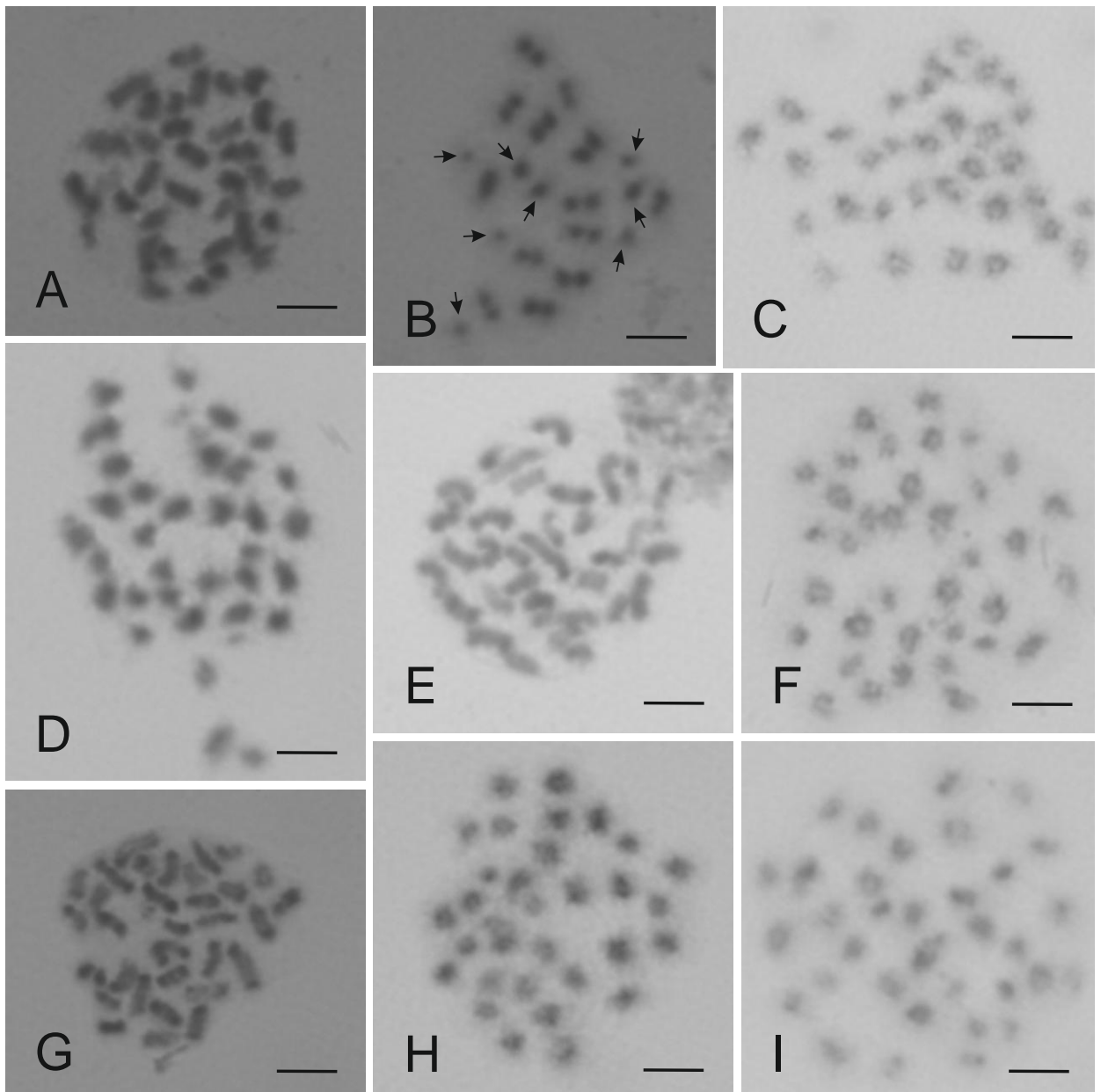
A: Postpachytene. B, G: Metafáze I. C, D: Metafáze II. E, F, H, I: Mitotická metafáze.

Šipka = pohlavní chromosom. Měřítko = $5\mu\text{m}$.

zjištěn karyotyp $2n = 30$ a u dvou samců karyotyp $2n = 31$. U dvou samců polské populace (840) byl karyotyp určen na $2n = 30$, ale samice vykazovala vyšší, a navíc lichý, počet chromosomů $2n = 33$, 7X. V populaci z Českých Budějovic (662) byl samec s karyotypem $2n = 30$, ale u samice byl počet chromosomů nejednoznačný a byl odhadnut na $2n = 36-40$. V

populaci z Liberce (613) měli dva samci počet chromosomů $2n = 31$ a jediná samice měla karyotyp $2n = 40, 14X$ (Obrázek 6, 7, 12).

8. Ve třech heterogenních populacích se vyskytovali samci s počtem $2n = 32-34$ a nekomplementární samice s počtem $2n = 30-36$ chromosomů. Populace z České Lípy (kód 661) obsahovala variabilní počet chromosomů u třech samců $2n = 33, 6XY$ nebo $2n = 34,$



Obrázek 13. Příklady figur *Cimex lectularius* s vyššími počty chromosomů

A, B, E, G, H: samec. C, D, F, I: samice

A-D: populace 632. E: populace 661. F: populace 665. G: populace 795. H, I: populace 798.

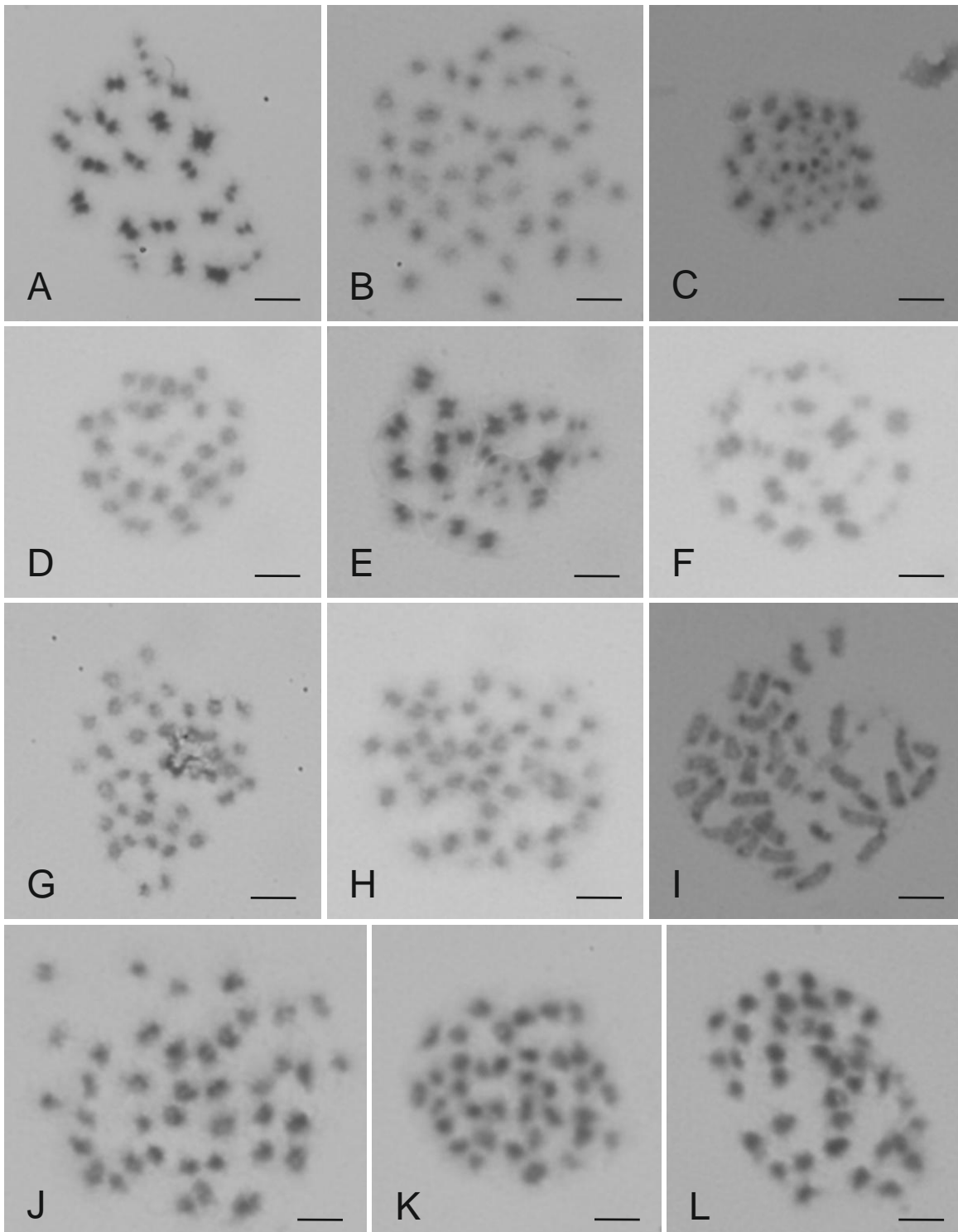
A, E, G: Mitotická prometáfaze. B: Metafáza II. C, D, F, H, I: Mitotické metafáze.

A, B, E: $2n = 34, 7XY$. C: $2n = 32$. D, F: $2n = 36$. G: $2n = 33$. H: $2n = 31$. I: $2n = 34, 8X$.

Šipka = pohlavní chromosom. Měřítka = $5\mu\text{m}$.

7XY a nekomplementární základní počet $2n = 30$, 4X u jedné samice. V populaci z okolí Chomutova (632) karyotyp jednoho samce vykazoval figury $2n = 33$ i $2n = 34$ a karyotyp dvou nekomplementárních samic byl $2n = 32$ a $2n = 36$. V populaci ze Švédska (798) byl určen karyotyp jen jednoho samce na $2n = 32$, 5XY a dvou samic se shodným, nekomplementárním počtem chromosomů $2n = 34$, 8X (Obrázek 6, 7, 13).

9. Devátou skupinu tvoří čtyři populace s nejvyššími zjištěnými počty chromosomů. V populaci z Liberce (kód 614) byly získány tři různé karyotypy ze tří samců $2n = 35$, 8XY; $2n = 42$, 15XY a nejvyšší zjištěný počet chromosomů vůbec $2n = 47$, 20XY. Populace ze Slovenska (708) obsahovala tři samce vykazující rozdílné karyotypy $2n = 31$, 4XY; $2n = 35$, 8XY a $2n = 37$, 10XY. Ve stejné populaci byly u jedné samice nalezeny figury dvou typů, $2n = 40$, 14X a $2n = 43$, 17X. V populaci z Rakouska (720) byl u jednoho samce zaznamenán karyotyp $2n = 37$, 10XY a dále byl počet určen u dvou samic $2n = 40$, 14X a $2n = 38-40$ chromosomů. V populaci ze Švédska (796) byl karyotyp stanoven u jediného samce $2n = 37$, 10XY a jediné nekomplementární samice $2n = 38$, 12X (Obrázek 6, 7, 14).



Obrázek 14. Příklady figur *Cimex lectularius* s nejvyššími počty chromosomů

A-F, I, K: samec. G, H, J, L: samice.

A-C: populace 614. D-H: populace 708. I, J: populace 720. K, L: populace 796.

A, E: $2n = 35$. B: $2n = 42$. C: $2n = 47$. D: $2n = 31$. F, I, K: $2n = 37$. G, J: $2n = 40$. H: $2n = 43$. L: $2n = 38$.

A, E, F: Metafáze I. B, D, G, H, J-L: Mitotická metafáze. C: Metafáze II. I: Mitotická prometáfáze.

C: 21 gonosomů v kruhu 13 párů autosomů.

Měřítko = $5\mu\text{m}$.

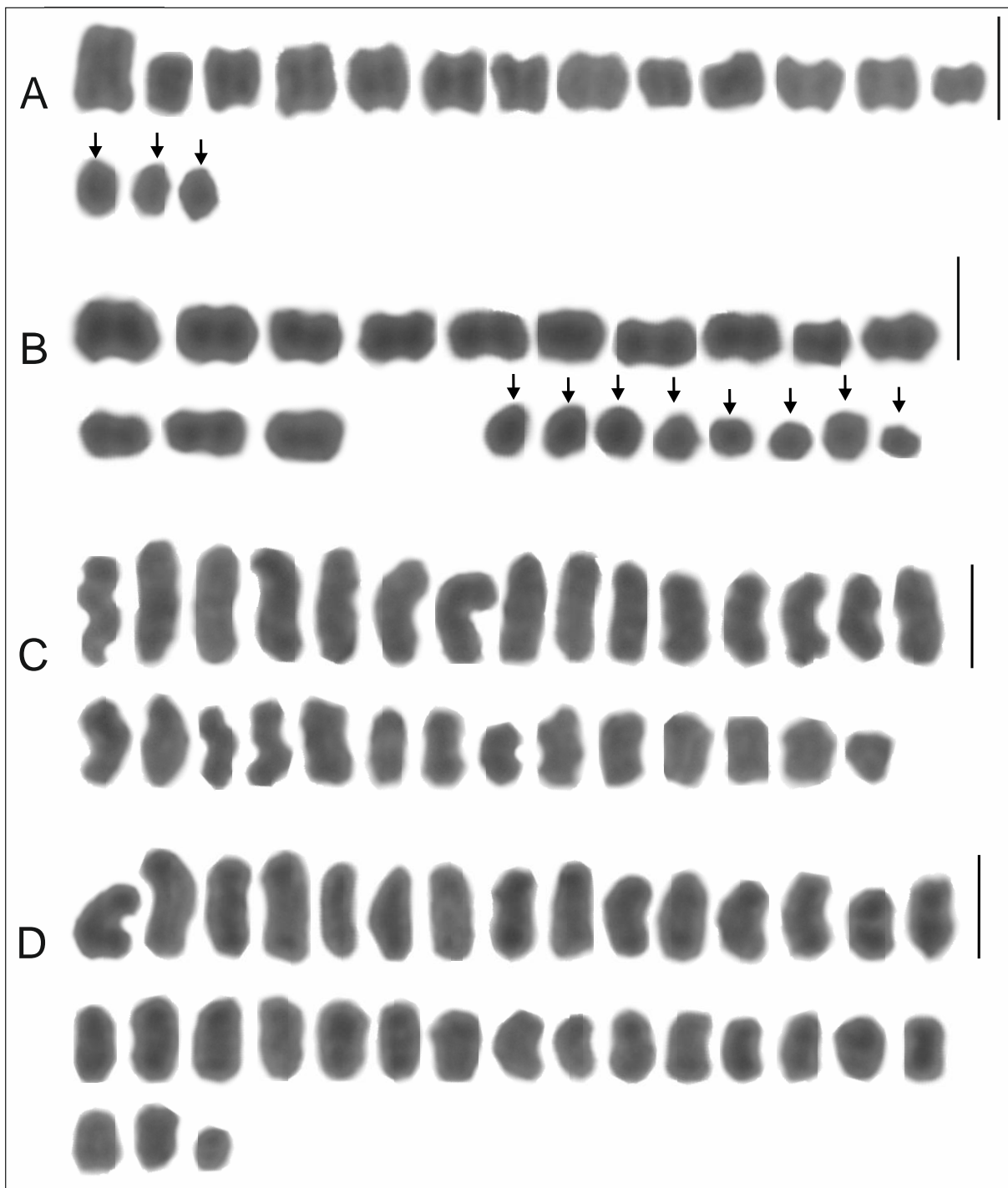
4.1.2 Karyogramy

Jednotlivé mitotické chromosomy jsou od sebe navzájem strukturálně nerozlišitelné, liší se pouze velikostí, odlišit se dají jen pohlavní chromosomy během stupňů metafáze II (Obrázek 15 A, B). Celkem byly sestaveny čtyři karyogramy z chromosomů, které byly vyřezány z chromosomálních figur, změřeny a seřazeny podle velikosti.

Dva karyogramy byly složeny ($2n = 29$, X_1X_2Y , kód 732m01 a $2n = 33$, $6XY$, kód 795m01) z optimálně rozložených figur chromosomů v mitotické prometafázi, u kterých nedošlo k překřížení jednotlivých chromosomů a ty byly jednoznačně individualizovány. Jejich spiralizace je mírnější než v mitotické metafázi, kde vystupují jako superspiralizované globulární útvary o přibližně stejné velikosti. Dále byl sestaven karyogram prometafáze II ($2n = 29$, X_1X_2Y , kód 623m03) a metafáze II ($2n = 34$, $7XY$, kód 632m01) pro porovnání velikostí autosomů a zmnožených gonosomů. V prometafázi II se vyskytuje jeden výrazně větší pár autosomů a dále jednochromatidové gonosomy podobné velikosti. V karyogramu metafáze II jsou již všechny autosomové páry srovnatelné velikosti kvůli vyšší spiralizaci celé figury, tři pohlavní chromosomy jsou větší než dalších pět, které jsou výrazně menší a světleji barvené.

V následujícím textu jsou rozměry chromosomů pro snazší porovnání uvedeny v procentech, délka každého chromosomu je vyjádření části, kterou zabírá z celkové délky karyotypu (součtu délek všech chromosomů, tj. 100%). Bylo provedeno jen jedno orientační měření dané fáze dělení, rozměry nejsou nijak průměrovány. Absolutní velikosti chromosomů mezi jednotlivými figurami se mohou výrazně lišit kvůli různému stupni spiralizace.

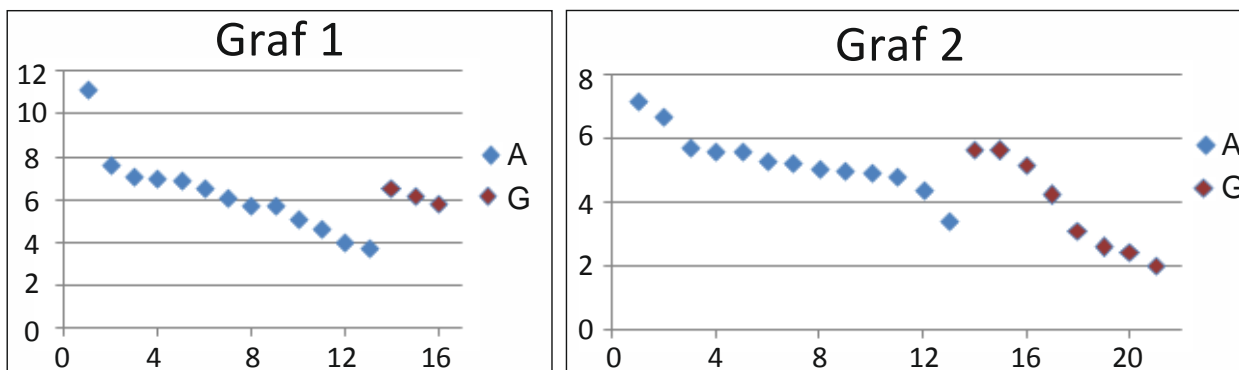
V karyogramu prometafáze II $n = 16$, X_1X_2Y (Obrázek 15 A, 16 Graf 1) promínuje první největší autosom a tvoří 11,16% velikosti karyotypu, ostatních 12 autosomů se kontinuálně zmenšuje od 7,66% do 3,78% a dohromady tvoří 70,35% velikosti karyotypu. Gonosomy jsou téměř stejné velikosti a přibližné rozměry jsou 6,52%, 6,4% a 5,58% (celkem 18,5%).



Obrázek 15. **Karyogramy samic *C. lectularius* z mitotické prometafáze a metafáze II**
 A: Prometafáze II, 623m03, $n = 16$. B: Metafáze II, 632m01, $n = 21$. C: Mitotická prometafáze, 732m01, $2n = 29$. D: Mitotická prometafáze, 795m01, $2n = 33$.
 Šipka = pohlavní chromosom. Měřítko = $5\mu\text{m}$.

V karyogramu metafáze II $n = 21$, 7XY (Obrázek 15 B, 16 Graf 2) byly zaznamenány dva výrazně větší autosomy, které dohromady tvoří 13,86%, 10 postupně se zmenšujících autosomů od 5,77% do 4,39% (dohromady 51,77%) a jeden výrazně menší autosom s

velikostí 3,45%. Zde se gonosomy rozdělily do tří velikostních skupin, první tvořily tři větší gonosomy obdobné velikosti 5,67%, 5,63% a 5,19% (celkem 16,49%), dále jeden menší gonosom s velikostí 4,23% a třetí skupinu tvořily 4 malé se gonosomy od 3,13% do 2,02% (celkem 10,20%). Jeden z nadpočetných gonosomů je větší než nejmenší autosom, ale další 4 fragmenty jsou výrazně menší než nejmenší autosom. V tomto karyogramu autosomy tvořily celkem 69,08% a gonosomy 30,92% velikosti karyotypu.



Obrázek 16. **Graf porovnání velikosti autosomů a gonosomů v metafázi II**

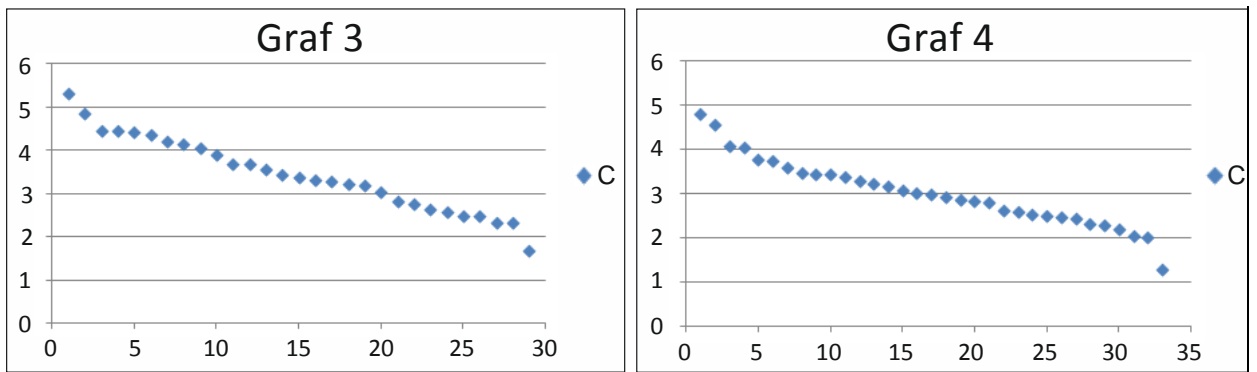
Graf 1: prometafáze II, $n = 16$, X_1X_2Y . Graf 2: metafáze II, $n = 21$, $7XY$.

A = autosom. B = gonosom.

Osa x = počet chromosomů. Osa y = poměrná velikost chromosomu v procentech.

V karyogramu mitotické prometafáze se základním stavem $2n = 29$, X_1X_2Y (Obrázek 17 Graf 3) jsou výrazně větší první dva chromosomy a dohromady tvoří 10,16% velikosti celého karyotypu, dále se 26 chromosomů pozvolna kontinuálně zmenšuje od 4,45% do 2,32% a dohromady tvoří 88,15% velikosti karyotypu, poslední chromosom je výrazně menší a tvoří jen 1,69% karyotypu.

V karyogramu mitotické prometafáze s vyšším počtem $2n = 33$, $6XY$ (Obrázek 17 Graf 4) se opět vyskytují dva výrazně větší chromosomy a tvoří 9,38% karyotypu, dále dva stejně velké menší chromosomy, které tvoří 8,13% karyotypu a 28 kontinuálně se zmenšujících chromosomů s velikostmi od 3,77% do 2,03% velikosti karyotypu a opět jeden výrazně menší chromosom s 1,3 %.



Obrázek 17. **Graf rozložení velikosti chromosomů v mitotické prometáfazi**

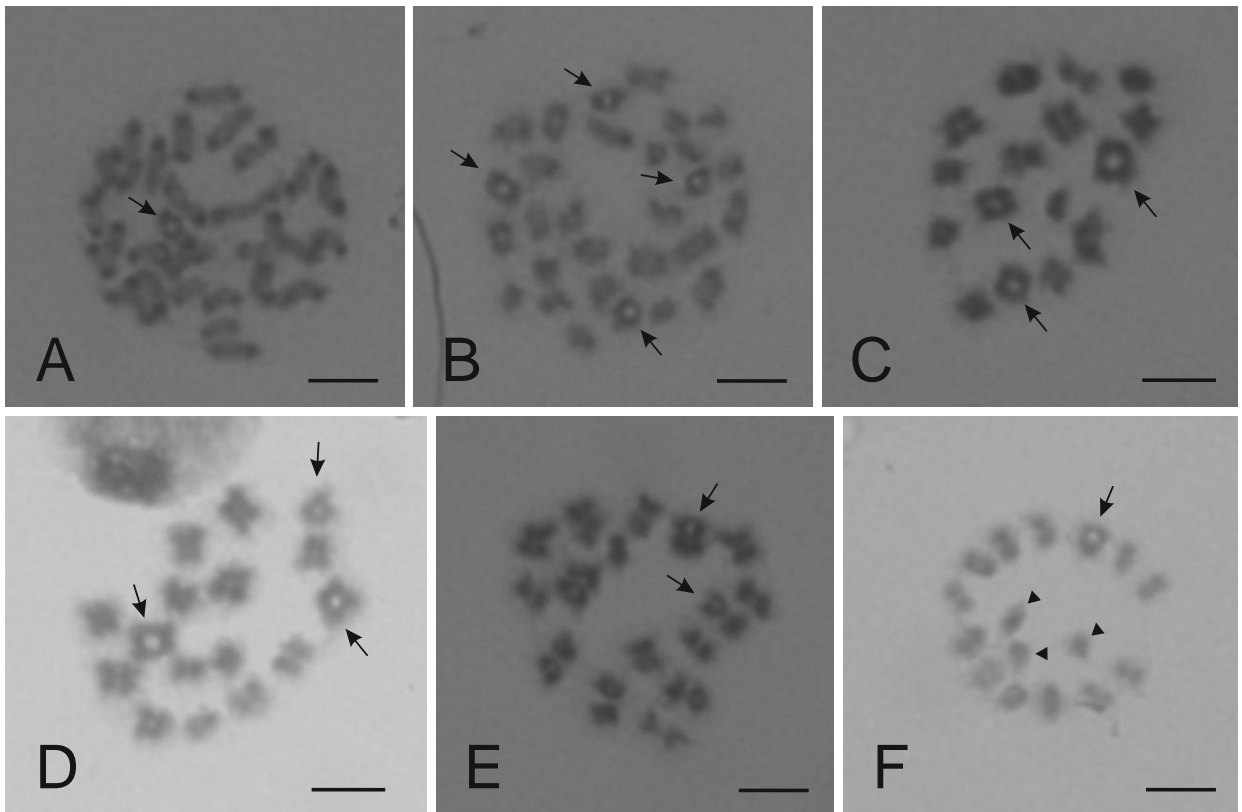
Graf 3: $2n = 29, X_1X_2Y$. Graf 4: $2n = 33, 6XY$.

C = chromosom.

Osa x = počet chromosomů. Osa y = poměrná velikost chromosomu v procentech.

4.2. C-pruhování

Na všech devíti preparátech zhotovených metodou C-pruhování nebylo dosaženo optimálních výsledků, pruhy se na meiotických ani mitotických chromosomech vůbec neindukovaly a po obarvení Giemsovým barvivem byly srovnatelné s chromosomy na preparátech, které metodou C-pruhování vůbec nebyly upravovány. K indukci pruhů nedošlo ani na chromosomech v mitotické prometáfazi, které běžně přinášejí nejlepší výsledky. Jedinými výraznými změnami pozorovatelnými na preparátech s počítatelnými figurami po aplikaci C-pruhování jsou jen různě rozsáhlé strukturní změny na chromosomech. S nejvyšší pravděpodobností jde o poškození chromosomů neoptimálním působením horkého hydroxidu barnatého, poškození jsou ve tvaru dutých čtverců či kroužků utvořených uprostřed některých párů chromosomů v mitotické nebo meiotické metafázi (Obrázek 18).



Obrázek 18. Meiotické a mitotické figury samců *Cimex lectularius* s karyotypem $2n = 29$, X_1X_2Y po C-pruhování

A-C, E: preparát 640m02d. D: preparát 640m01d. F: preparát 418m01e.

A: Mitotická prometafáze. B: Mitotická metafáze. C, D: Metafáze I. E: Pozdní metafáze I. F: Metafáze II.

Šipka = strukturální poškození chromosomu. Trojúhelník = pohlavní chromosom. Měřítko = $5\mu\text{m}$.

Z Tabulky 4 vyplývá, že pro studium chromosomů *C. lectularius* pomocí metody C-pruhování je vhodnější zvolit starší preparáty a nižší teplotu $\text{Ba}(\text{OH})_2$, protože pro metodu C-pruhování byly pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem selektovány pouze pozitivní preparáty s počítatelnými figurami. Preparáty, na kterých zůstaly počítatelné figury byly staré zhruba tři měsíce, byly inkubovány v roztoku $\text{Ba}(\text{OH})_2$ na 40°C a 50°C . Týdenní, třídní a preparáty inkubované za vyšší teploty 60°C obsahovaly pouze velice světlé a nekvalitní chromosomy, nebo dokonce nebyly detekovány vůbec žádné počítatelné figury.

Tabulka 4. **Přehled C-pruhovaných chromosomových preparátů *Cimex lectularius***
 Preparát - kód: první číslo = číslo sběru, m= samec, druhé číslo = pořadí zpracovaného jedince, písmeno na konci = pořadí preparátu z daného jedince.

Stáří: interval mezi zhotovením preparátu a aplikací C-pruhování.

Počet chromosomů: diploidní počet na daném preparátu. X = negativní preparát.

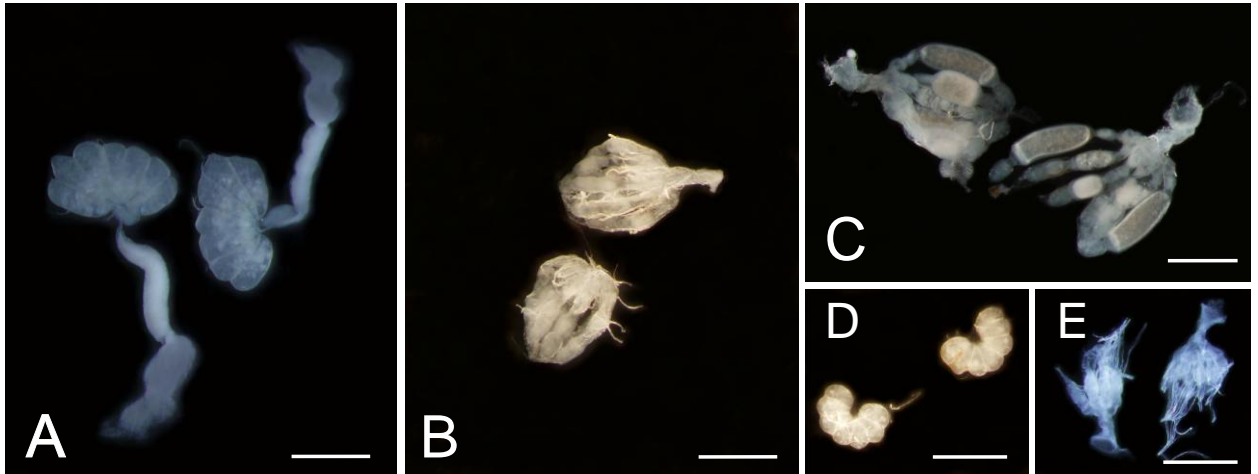
Kvalita: kvalita figur na výsledném chromosomovém preparátu po C-pruhování. 1 = jednoznačný počet chromosomů, 2 = jednotlivé figury nejednoznačné, 3 = žádné počítatelné figury.

Preparát	Stáří (dny)	Teplota (°C)	Počet chromosomů	Kvalita
640m01d	93	40	29	1
421m02d	8	40	X	3
418m01e	80	50	29	1
640m02d	93	50	29	1
648m03c	10	50	X	3
657m01d	3	50	X	3
421m03d	8	60	X	3
657m02d	3	60	X	3
633m03c	93	60	X	3

4.3. Velikost gonád a stav mesenteronu

Zjištění závislosti kvality preparátů na velikosti gonád není v cytogenetice běžně používaná metoda, jednalo se pouze o podpůrnou okrajovou studii s omezenými vstupními daty. Měření gonád bylo zavedeno pro ověření, zda je pro praktické zpracování tkáně *C. lectularius* využitelná velmi zajímavá závislosti kvality preparátu na velikosti gonád. Pozitivní závislost by mohla sloužit k orientační rychlé selekci vhodných jedinců, ze kterých by byly připraveny kvalitní preparáty, při dalších budoucích studiích chromosomů.

Celkem byly rozměry gonád změřeny jen u 101 jedinců, protože tato metoda byla zařazena jen jako doplňková až v průběhu studia. Chromosomové preparáty byly cytogeneticky analyzovány u 93 štěnic s měřenými gonádami, z nich byl u 55 určen i karyotyp z počítatelných figur (Příloha 2). U samců se jako rozhodující rozměr pro celkovou velikost gonád ukázala šířka testes, u samic byla důležitější délka ovariol (Obrázek 19). Rozpětí šířky testes u všech 56 cytogeneticky analyzovaných samců bylo od 0,5mm do 2,21mm (průměr 1,48mm; standardní odchylka 0,34mm) a rozpětí délky ovarii u 37 zkoumaných samic bylo od 0,29mm do 3,26mm (průměr 1,47mm; st. od. 0,52mm).



Obrázek 19. Příklady testes a ovárií subadultních larev a dospělců *Cimex lectularius*

A: testes adultního samce kód 667m02 (délka 0,87mm x šířka 1,75mm), z vývodů unikají zralé pohlavní buňky. B: ovaria adultní samice 754f01 (1,6x1,25mm), bez vajíček. C: ovaria adultní samice 708f01 (2,43x1,95mm), velmi dobře vyvinutá vajíčka. D: testes larvy 5. instaru 732m02 (0,59x1,01mm). E: ovaria larvy 5. instaru 644f02 (0,91x0,79mm).

Kvalita získaných preparátů: 1 = jednoznačný počet chromosomů. 2 = jednotlivé figury nejednoznačné. 3 = absence počitatelných figur.

A, C = 1. B = 3. D = neanalyzováno. E = 2.

Měřítka = 1mm.

Měřeny byly i gonády subadultních larev 5. instaru, pěti samců a tří samic. Gonády larev 5. instaru byly výrazně menší než gonády dospělců (Obrázek 19). Larvy samců 5. instaru s šířkou testes 0,5-1,1mm jsou až dvakrát užší než nejširší testes imaga 0,54-2,21mm a podobný trend byl sledován i u délky testes (5. instary 0,4-0,61mm proti 0,42-1,16mm dospělců). U larev 5. instaru samičího pohlaví byla délka ovárií změřena na 0,29-0,91mm, což je až třikrát méně než nejdelší ovária u dospělých samic 0,89-3,26mm, ale šířka byla u larev (0,35-0,79mm) jen dvaapůlkrát menší než nejdelší rozměr u dospělých samic (0,49-1,95mm).

Pozitivní závislost kvality chromosomových preparátů byla průkazná pouze na vyšší velikosti samčích gonád. Závislost kvality preparátů na délce testes byla neprůkazná (F hodnota = 2,534; p hodnota = 0,089). Naopak byla velmi dobře prokázána pozitivní závislost kvality preparátů na rostoucí šířce testes (F = 9,084; p = 0,000) a také na celkové teoretické ploše testes (F = 6,038; p = 0,004).

U samic žádná pozitivní závislost kvality preparátu na velikosti ovárií prokázána nebyla. Pro délku ovárií byly hodnoty silně neprůkazné (F hodnota = 0,394; p hodnota = 0,678), obdobně tomu bylo u délky ovárií (F = 0,338; p = 0,716) a celkové teoretické plochy gonád (F = 0,259; p = 0,774).

Míra naplnění mesenteronu byla hodnocena zcela subjektivně při extrakci gonád. Celkově se jednalo o orientační pozorování, které mělo potvrdit závislost kvality preparátů na množství potravy ve střevě. Statistika nebyla použita z důvodu nulové variability v získaných datech, byly stanoveny tři a tři subjektivně hodnocené kategorie. Naplnění mesenteronu potravou bylo zaznamenáno u 180 zkoumaných jedinců ve třech stupních, A = velké množství potravy ve střevě, B = menší objem tráveniny ve střevě a C = střevo je prázdné (Příloha 2). Třicet jedinců patří do skupiny A, 39 jedinců do skupiny B a 111 jedinců bylo s prázdným střevem ve skupině C. Bylo pozorováno procentuálně více jedinců s kvalitními preparáty ve skupině A, plně nasátých, než ve skupině B a ve skupině C s prázdným střevem bylo jedinců s kvalitními preparáty nejméně (Tabulka 5).

Tabulka 5. Srovnání míry nasátí jedince a kvality chromosomálních figur

Nasátí = míra naplnění mesenteronu: A = hodně nasátá, stěny střeva napnuté, B = nasátá, stěny střeva relaxované s obsahem, C = nenasátá, střevo prázdné.

Jedinci: celkový počet štěnic v dané skupině určující množství tráveniny ve střevě.

1. = počet jedinců s výbornými preparáty s jednoznačným počtem chromosomů. 2. = počet jedinců s průměrnými preparáty, samostatné jednotlivé figury často nejednoznačné. 3. = počet jedinců s negativními preparáty.

% = procentuální podíl jedinců z celkového počtu v dané skupině určující míru nasátí.

Nasátí	Jedinci	1. (%)	2. (%)	3. (%)
A	30	13 (43%)	12 (40%)	5 (17%)
B	39	13 (33,3%)	13 (33,3%)	13 (33,3%)
C	111	14 (12,6%)	40 (36%)	57 (51,4%)

Počet jedinců s nejkvalitnějšími chromosomovými preparáty stoupá s množstvím potravy ve střevě, u jedinců s prázdným střevem tvoří orientačně jen 12%, ve skupině s menším množstvím potravy ve střevě už ale tvoří celou třetinu jedinců (33,3%) a ve skupině plně nasátých jedinců tvoří až 43% štěnic. Opačný trend byl sledován mezi zástupci s negativními preparáty, u jedinců s prázdným střevem jsou negativní preparáty až u 51%, ve skupině s malým množstvím potravy se vyskytuje už jen 33,3% negativních jedinců a ve skupině plně nasátých štěnic je jen 17% jedinců s preparáty bez počítatelných figur (Tabulka 5).

5. DISKUZE

5.1. Srovnání cytogenetických metod

Postup přípravy konvenčních chromosomových preparátů metodou „hotplate spreading“ byl zvolen na základě kladných výsledků s použitím této metodiky na specializovaných cytogenetických pracovištích v České republice (AV ČR v Českých Budějovicích, PřF UK v Praze), kde je tato metoda dobře zavedená na studium hmyzu i dalších taxonů členovců. Tato metodika byla optimalizována na studium karyotypu zástupců *Cimex lectularius*, ale stále jsou možnosti jak výstupy stávající metodiky zlepšit. Postup dalšího zkvalitnění chromosomových preparátů bude konzultována v rámci PGS na pracovišti AV ČR v Českých Budějovicích.

Ostatní kolektivy autorů z Evropy a Jižní Ameriky používají k cytogenetickým analýzám převážně metodu roztlaku tzv. squashing. Metoda spočívá ve fixaci živého materiálu v ethanol octové fixáži a rozmačkání vpytvané tkáně mezi podložním a krycím sklem na kostce suchého ledu (pevný CO₂).

Obě metody mají své výhody i nevýhody. Nesporná výhoda metody roztlaku je možnost fixování materiálu přímo v terénu a snadné skladování fixovaného materiálu v chladu po dlouhou dobu. Při spreadingu je důležité, aby byly studované organismy před použitím udržovány živé a v dobré kondici, protože u mrtvých členovců dochází ve tkáních velmi rychle k rozkladu chromosomů. U parazitických štěnic je sběr a převoz živých jedinců často etickým nebo právním problémem, zejména při získávání materiálu ze zahraničí. Výhodou spreadingu je nezávislost na suchém ledu, který se musí uchovávat ve speciálních podmínkách. U spreadingu je rozhodující zvládnutí obratné manipulace s jehlami při disociaci tkáně na podložním skle a posléze i manipulace s kapkou suspenze buněk. Nevhodnou manipulací s tkání při disociaci mohou být některé chromosomy z figury ztraceny, nebo být překryty shlukem dalších buněk. Metodou roztlaku může snáze dojít k nedostatečnému rozprostření rozmačkané tkáně či překryvu jednotlivých figur při jejich vyšší koncentraci.

U vzorků štěnic získaných z terénu se nedá zjistit stáří ani kondice jedince, proto negativní výsledky mohou být důsledkem zpracování jedince, který byl delší dobu bez potravy či byl mimo rozmnožovací cyklus a nedocházelo u něj k spermatogoniálnímu dělení. V některých případech se podařilo najít počítatelné figury i u jedinců, jejichž první preparát z gonád byl negativní. Z čehož vyplývá, že dělicí aktivita spermatogoniálních buněk je v lalocích gonád rozprostřena nerovnoměrně. Většina týmů cytogenetiků v České republice využívají vzorky zkoumaných druhů z vlastních laboratorních chovů, u kterých znají přesné

stáří a kondici. Využití chovů *Cimex lectularius* je plánováno v PGS. Datum sběru a zpracování bylo vždy zaznamenáno hlavně kvůli zařazení vzorku, z důvodu soužití s člověkem se *C. lectularius* rozmnožuje acyklicky a doba sběru nevyovídá o fyziologickém stavu jedinců.

5.2. Hodnocení figur mitosy a meiosis

Hodnocení metafáze I a II je relativně snadnější než u mitotických figur, ale tyto fáze meiotického dělení byly zastoupeny v nepoměrně menším počtu k jinak hojnějším fázím mitosy. Obě meiotické metafáze jsou u *Cimex lectularius* obecně mnohem lépe hodnotitelné, díky transparentnímu párování chromosomů a „vyšší uspořádanosti“ superspiralizovaných bivalentů. Hodnocení mitotických figur bylo často velmi složité či dokonce nemožné, protože v nich jsou chromosomy běžně různě překříženy a nejednoznačně individualizovány. Jednotlivé chromosomy jsou si navzájem velmi podobné velikostně i obdobným rozložením tmavých oblastí heterochromatinu po obarvení, odlišování jednotlivých chromosomů je obtížné také kvůli absenci primárních i sekundárních konstrikcí.

Existují dvě fáze meiotického dělení *Cimex lectularius* kdy mohou být jednoznačně odlišeny pohlavní chromosomy od autosomů. Jistá identifikace gonosomů a zjištění jejich přesného počtu je možná jen ve stupních metafáze II, kdy se všechny autosomy vyskytují jako dvouchromatidové páry a gonosomy jsou jednochromatidové univalenty. Druhý případ kdy mohou být pohlavní chromosomy dobře odlišitelné je během zvláštní fáze difuzního stadia. Tato fáze navazuje na pachytene a byla pozorována jen u samců, všechny chromosomy téměř dekonduzují až na pohlavní chromosomy, které se naopak spiralizují a vyskytují se jako pozitivně heteropyknotické útvary (Obrázek 4). U samců s karyotypem $2n = 29, X_1X_2Y$ jsou pozorovatelné tři velké, silně barvitelné pohlavní chromosomy, ale u jedinců s vyšším počtem chromosomů jejich přesný počet není přesně určitelný. Ačkoli z počátku se zdály figury difuzního stadia jako snadný způsob zjištění počtu pohlavních chromosomů, po prohlédnutí stejné fáze z preparátů jedinců s nadpočetnými chromosomy, byla průkaznost určení počtu zavržena. Figury difuzního stadia slouží pouze pro orientační zjištění přítomnosti vyššího počtu pohlavních chromosomů, který musí být potvrzen nejlépe při analýze metafáze II.

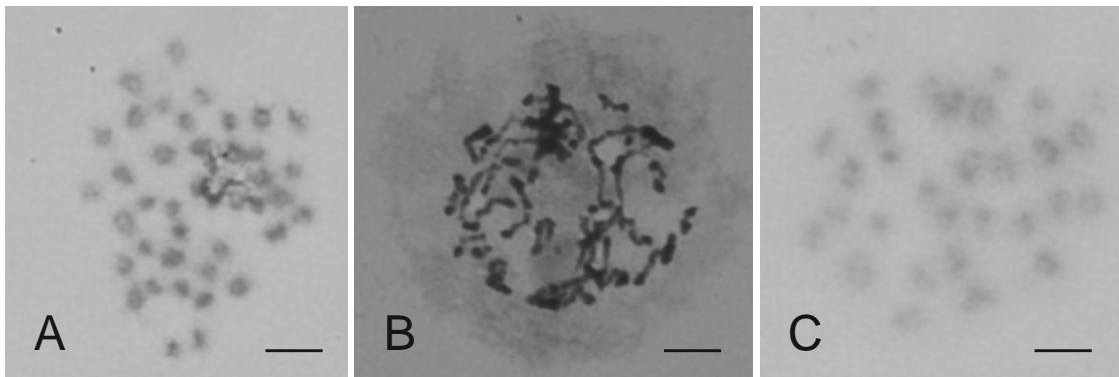
Figury podobných stádií jako je leptotene a pachytene na Obrázku 4 D, E se u samců *C. lectularius* vůbec nepodařilo zdokumentovat a byly nacházeny pouze na preparátech samic, proto existují na základě výsledků pochybnosti o správnosti určení těchto figur. U samic se meiotické figury zachytí jen výjimečně (během této studie nebyla taková figura

zaznamenána), a proto je nepravděpodobné, že by byla nacházena jen samá stadia meiotické profáze v takovém množství. Je možné, že se jedná o stupně mitotické profáze s podobným průběhem.

Analýza množství zmnožených nadpočetných chromosomů byla často ztížena miniaturními rozměry předpokládaných fragmentů pohlavních chromosomů, které měly silnou tendenci vizuálně splývat s jinými chromosomy, nebo mohly s velkou pravděpodobností být často ztraceny při přípravě preparátu.

Problematické může být i hodnocení karyotypů získaných z ovárií, při disociaci vaječnicků se zárodky vajíček může dojít ke smíchání buněk samice a zárodků samců. K oplození vajíček dochází již v ováriích v důsledku traumatické inseminace, migrací spermií hemocoelem do vaječnicků (Carayon 1966, Schuh & Slater 1995, Volf & Votýpka 2007). Vznikne tak sekundárně směs karyotypů, která může falešně vykazovat variabilitu počtu chromosomů u dané samice. Prohlížení preparátů samic bylo obecně složitější a méně úspěšné kvůli menšímu počtu a řídkému výskytu opravdu kvalitních, kompletních počítatelných chromosomálních figur. Podle výsledků prohlížení bylo z celkového počtu 142 negativních preparátů 45 (38%) ze samic, ale v rámci pouze samičích preparátů, kterých bylo 101, činil podíl negativních už 53%. Naproti tomu ze všech negativních preparátů tvořily samčí preparáty zbylých 62%, ale v rámci všech 182 samčích preparátů bylo negativních také 53%. Počty mohou být ovlivněny faktem, že příprava i prohlížení preparátů byly orientovány k samčímu pohlaví a bylo analyzováno téměř dvakrát více samčích preparátů než preparátů ze samic. Procenta jsou uvedena pouze pro snadnější orientaci.

Původně se předpokládalo, že tkáň střeva bude vhodná pro analýzu chromosomů, protože u ní dochází k rychlému opotřebení a následnému intenzivnímu dělení regenerativních kmenových buněk. Ty se stále mitoticky dělí, diferencují a nahrazují opotřebené buňky celého střevního epitelu (Azevedo et al. 2009). Navzdory předpokladu preparáty připravené z tkáně mesenteronu neobsahovaly prakticky žádné počítatelné mitotické figury (jedna figura na 20 analyzovaných preparátů) (Obrázek 20 A). Žádné počítatelné figury nebyly nalezeny ani na preparátech z mesenteronu jedinců bohatých na dobře počítatelné meiotické či mitotické figury z gonád. Zajímavé je, že nerozhodovalo ani naplnění mesenteronu potravou, negativní preparáty poskytovali jedinci jak s plným střevem, tak se zcela prázdným. Proto byly preparáty střeva připravované stávající metodikou vyhodnoceny jako nevhodné k další cytogenetické analýze. Preparáty mesenteronu byly zkušebně prohlédnuty jen v případech, kdy nebyly nalezeny žádné počítatelné figury z tkáně gonád a z daného jedince či populace nebyla žádná data.



Obrázek 20. **Mitotické figury chromosomů *Cimex lectularius* z mesenteronu a vajíček**
 A: preparát 708f01a, mitotická metafáze z tkáně mesenteronu, $2n =$ přibližně 40, 14X. B: preparát 614f02e, mitotická profáze z vajíčka, počet chromosomů nepočitatelný. C: preparát 624f01d, mitotická prometáfáze z vajíčka, $2n = 30, X_1X_1X_2X_2$ (pravděpodobně samice, podpořeno karyotypem samce ze stejné populace $2n = 29, X_1X_2Y$).
 Měřítko = $5\mu\text{m}$.

Vajíčka obsahují velké množství mitoticky se dělících buněk z různých tkání rychle rostoucího zárodka, ale tyto buňky se z neobjasněného důvodu nepodařilo zachytit a preparáty neobsahovaly téměř žádné počitatelné mitotické figury. Pozitivní byl pouze jediný preparát se třemi, relativně dobrými mitotickými figurami ze sedmi prohlížených preparátů vajíček (Obrázek 20). Použití vajíček je problematické také v tom, že je jejich výskyt v samicích nepredikovatelný a je téměř nemožné dopředu morfologicky rozlišit pohlaví vyvíjejícího se zárodka. Rozlišení pohlaví podle počtu chromosomů je jisté jen v případech, kdy zárodek vykazuje základní stav $2n = 29$ chromosomů, v tomto případě jde jistě o samce (samci se základním stavem gonosomů mají nejnížší, se samicemi nezaměnitelný, počet chromosomů). U vyšších počtů není možné určit pohlaví podle karyotypu, protože gonosomy v mitotickém dělení nejsou standardním Giemsovým barvením odlišitelné od autosomů a meiosa se u vajíček ani vyvíjejících se larev prvního instaru vůbec nevyskytuje.

5.3. Zjištěné karyotypy

U zástupců *Cimex lectularius* je intradruhovú variabilita počtu chromosomů velmi výrazná a byl zaznamenán výskyt 10 početních variant karyotypu (od tří do 21 gonosomů). Křížení rozdílných jedinců *C. lectularius* a potenciální vznik nových početních variant karyotypu je usnadněno tím, že se jedná o synantropní druh, který vykazuje silné agregační chování a vyskytuje se většinou lokalizovaně ve velkých denzitách.

Byly získány jen dva sběry, které jsou díky poskytnutým údajům s vysokou pravděpodobností vzniklé aktivní disperzí jedinců z jedné populace. Jde o sběry z Liberce s

kódem 613 a 614, oba sběry byly odebrány na stejné adrese, ale v jiných bytech. Obě subpopulace také vykazují několik rozdílných vyšších počtů chromosomů s širokým rozsahem, samci s karyotypy $2n = 31, 35, 42$ a 47 a jedna samice s $2n = 40$ chromosomy. Jedná se tedy asi o heterogenní populaci s velkou denzitou jedinců, kteří aktivně migrují kolonizovat další volná stanoviště s dostatkem potravy, ale je možné, že k rozšíření došlo i pasivním přenosem např. při návštěvě.

Jednou z možností vysvětlení přítomnosti různých počtů chromosomů u jednoho jedince je hypotéza popsaná již Slackem (1939) a Ueshimou (1964,1967). V těchto studiích je zmínka o polymorfismu počtu chromosomů v zárodečných buňkách v rámci daného jedince. Tato popsaná hypotéza nebyla potvrzena, u některých zástupců byl počet vždy stejný, u zástupců s nejednoznačně počítatelnými figurami se vlastní počet určoval jen velmi obtížně a bylo zaznamenáno jen šest jedinců kde byly nalezeny variabilní počítatelné figury. Na základě fotografií se bohužel nedá určit, zda je tento typ variability opravdu primárním znakem druhu *Cimex lectularius* nebo jen sekundárním artefaktem nevhodné přípravy preparátu.

5.3.1. Varianty karyotypu

Základní, celkově nejběžnější karyotyp *Cimex lectularius* se dvěma X chromosomy je také nejrozšířenější mezi zástupci celého rodu *Cimex* (Ueshima 1966). Vyskytoval se ve 31 homogenních populacích a dále byl zaznamenán u třech heterogenních populací. Druhým nejrozšířenějším počtem chromosomů je $2n = 30, X_1X_2X_3Y$ zjištěný v devíti homogenních a dalších čtyřech heterogenních populacích. Populace s $2n = 31, 4XY$ se vyskytovaly čtyřikrát jako homogenní a čtyřikrát se vyskytl tento karyotyp i v heterogenní populaci. Poslední dvě homogenní populace byly s $2n = 32, 5XY$ a $33, 6XY$ chromosomy, dále byly ale tyto karyotypy poměrně hojně zastoupeny v heterogenních populacích, $2n = 32$ ve třech populacích a $2n = 33$ také ve třech populacích.

Další vyšší počty byly zastoupeny výhradně v populacích heterogenních. Karyotyp $2n = 34$ se vyskytoval v pěti populacích, $2n = 35$ ve dvou a $2n = 37$ ve třech populacích. Dále byla zaznamenána jediná populace, ve které se vyskytovaly extrémní počty $2n = 42, 15XY$ a $2n = 47, 20XY$. Možné $2n$ počty $36, 38-41$ a $42-46$ nebyly v této studii zaznamenány, ale počet $2n = 36$ byl zaznamenán už Ueshimou (1966) v populaci z Ohia. Celkově jsou nižší počty $2n = 29-31$ asi dvaapůlkrát běžnější než tomu je u karyotypů s vyšším počtem chromosomů. Tato distribuce je pravděpodobně dána složitostí nakumulování většího

množství fragmentů. Zástupci dané populace musí přežít dostatečně dlouho na to, aby se zkřížili s jinou populací a mohli svoje nadpočetné fragmenty předat a šířit dál. K tomuto účelu jsou nejvhodnějším habitatem ubytovny či podobná zařízení, kde dochází k rychlému střídání lidí a pravděpodobnost styku dvou rozdílných populací je vyšší než v domácnostech. Je nepravděpodobné, že by se vyšší počet chromosomů vyvinul fragmentacemi v jediné izolované populaci, protože po větším namnožení jsou štěnice zpravidla rychle odhaleny a eliminovány. Druhou možností je nepravděpodobná rychlá mnohonásobná fragmentace X chromosomu, muselo by se jednat o zcela náhodný proces, kvůli zaznamenané vysoké variabilitě v počtu X chromosomálních fragmentů v některých populacích. Takováto rapidní náhodná fragmentace pohlavních chromosomů X by nutně musela vést k poklesu fitness jedinců či populací, ve kterých by se odehrávala.

Karyotyp se podařilo zjistit u 13 sběrů tvořených výhradně samicemi, u 27 sběrů složených výhradně ze samců a 20 sběrů, kde byl zjištěn karyotyp u obou pohlaví. Ve sběrech zastoupených jedinci obou pohlaví se vyskytlo 10 populací homogenních, z heterogenních populací mělo šest vyšší počet chromosomů u samců a pět vyšší počet chromosomů u samic. Každý zachycený nekomplementární počet chromosomů v populaci signalizuje přítomnost další karyotypové varianty. Aby se daný karyotyp udržoval v populaci musí se vyskytovat u obou pohlaví.

5.3.2. Rozšíření studovaných populací

Rozložení populací s obdobným počtem chromosomů v rámci České republiky je dobře patrné na Obrázku 6. V České republice bylo zaznamenáno 12 typů populací s unikátní skladbou jedinců, od homogenních populací $2n = 29$, X_1X_2Y až po silně heterogenní s $2n = 35-47$. Nejvíce sběrů pocházelo z Plzně, Prahy a Českých Budějovic, v každém z těchto měst se vyskytovaly populace s několika počty chromosomů. Nejnižší variabilita byla zaznamenána v Praze, kde byly získány dva typy homogenních populací s mírně zvýšeným počtem chromosomů, čtyři s $2n = 30$, $X_1X_2X_3Y$ a jedna s $2n = 31$, $4XY$. Z Plzně se vyskytlo pět sběrů se základním počtem $2n = 29$, jeden s $2n = 30$ a jeden heterogenní $2n = 29$ a 32 . Vyšší počty byly zaznamenány v Českých Budějovicích, tři populace s $2n = 29$, dvě $2n = 31$ a jedna populace kde samice vykazovala nejednoznačný vyšší počet $5-7X$. Nejvyšší počty chromosomů byly ze dvou sběrů ze stejné lokality v Liberci (viz výše). Ostatní populace se vyskytovaly jednotlivě a jejich příbuznost je silně nepravděpodobná. Ze získaných dat je pozorovatelný vyšší počet populací s více X chromosomy či heterogenními počty

chromosomů zejména na severu Čech. Populace s homogenními počty se vyskytují, kromě Prahy, roztroušeně po celé České republice. Jedná se samozřejmě jen o předběžné závěry na základě získaného materiálu a je nutné doplnit vzorky dalších populací.

V populacích *Cimex lectularius* získaných ze zahraničí se vyskytovaly také různé karyotypové rasy, ale vzorky byly mnohem řidší než tomu bylo u vzorků z České republiky. Proto se vztahy mezi populacemi s charakteristickým počtem z dané oblasti (státu) určovaly jen orientačně a pouze ze států se dvěma a více sběry. Ve všech populacích ze Švýcarska byl zjištěn homogenní základní stav $2n = 29$, X_1X_2Y , naproti ze dvou slovenských populací byly určeny úplně rozdílné počty, jedna měla základní počet $2n = 29$ a druhá obsahovala jedince s velmi variabilními počty gonosomů $2n = 4XY$, $7XY$, $8XY$ a $10XY$. Populace z Polska a Itálie vykazovaly obecně jen málo zvýšený počet chromosomů $2n = 30$, $X_1X_2X_3Y$ často smíchaný s jedinci se základním počtem $2n = 29$. Na druhou stranu byly zajímavé populace pocházející ze Švédska, které vykazovaly většinou vyšší počty chromosomů (nejčastěji $2n = 33$, $6XY$). Bohužel se podařilo získat jen jedinou populaci z rakouského Melku s vysokým počtem chromosomů samců $2n = 37$, $10XY$ a nebylo možné ji porovnat s jinou populací v rámci stejné lokality. Vzhledem k pasivnímu šíření lze se současným dílčím objemem dat pouze pozorovat jednotlivé výskyty rozdílných karyotypů a nelze vyvodit žádný obecný závěr o jejich distribuci či šíření.

5.4. Nadpočetné pohlavní chromosomy

Vznik a existence zmnožených systémů pohlavních chromosomů jsou běžné napříč celým řádem Heteroptera, ale nejčastěji se jedná jen o minoritní mezidruhovou variabilitu v rámci vyššího taxonu (rozdíl v jednom až dvou gonosomech). Několikrát se u ploštic objevuje i výskyt vnitrodruhové variability v počtu pohlavních chromosomů, ale opět tuto variabilitu vykazují poměrně nízkou, vždy se liší maximálně o jeden až dva gonosomy. Oproti tomu štěnice *Cimex lectularius* je jediný doposud studovaný druh v rámci Heteroptera, který vykazuje unikátní variabilitu počtu 3-21 pohlavních chromosomů v takovémto širokém rozsahu.

Záznamy o výskytu zcela volně žijících druhů s intradruhovou variabilitou mohou být vzácnější z důvodu nižší koncentrace těchto jedinců, například v rodu *Belostoma* byla variabilita u dvou druhů zjištěna u 27% (2 kusy) a 16% (3 kusy) zkoumaných jedinců (Papeschi 1996). Naproti tomu v současné studii bylo získáno 49% populací *Cimex*

lectularius s odlišným počtem chromosomů z celkových 61 analyzovaných sběrů, 51% populací vykazovalo základní stav karyotypu $2n = 29, X_1X_2Y$.

Zástupci *Cimex lectularius* se vyznačují unikátní, velmi zajímavou vnitrodruhovou variabilitou v počtu chromosomů. Zejména na základě chování nadpočetných chromosomů v meiose bylo navrženo, že se jedná o fragmenty původních dvou chromosomů X (Ueshima 1966, 1979; Grozeva et al. 2010). V metafázi II tyto fragmenty kopírují chování svých pravděpodobně mateřských chromosomů a jsou velmi dobře rozpoznatelné. Bohužel kvůli jejich superspiralizaci během metafáze II je jen velmi obtížné pouhým změřením určit zda se jedná opravdu o fragmenty původních X chromosomů. Při vzniku až 20 fragmentů X chromosomů je jisté, že jeden či oba pohlavní chromosomy X musí mít nějakou predispozici ke snadnější fragmentaci, kterou musí postrádat ostatních 26 autosomů i alozom Y. Predispozicí k udržení fragmentů v karyotypu je holokinetická povaha chromosomů a meiosa bez potřeby párování gonosomů.

Hypotézu původu nadpočetných chromosomů fragmentací původních X chromosomů podporuje na základě dosažených výsledků shoda teoretického a zjištěného komplementárního počtu gonosomů u samců a samic v populacích s vyšším počtem chromosomů, pro samce $2n = 30, X_1X_2X_3Y$ a $2n = 31, X_1X_2X_3X_4Y$. V populacích s vyššími počty k této shodě docházelo méně často, ale to bylo způsobeno pravděpodobně nižším počtem zkoumaných jedinců, nekvalitními preparáty či vyšším stupněm variability počtu chromosomů (vyskytovalo se více karyotypů v populaci).

V této studii synantropních populací lidského parazita *Cimex lectularius* byly k dispozici záznamy karyotypů z největšího souboru sběrů od studie publikované Ueshimou (1966). V této studii se podařila ověřit pozorování z 60. let a prokázat variabilitu počtu chromosomů i v současné evropské populaci *C. lectularius*. Recentní práce o štěnici domácí vždy citují zmnožený počet chromosomů pozorovaný Ueshimou (1966), ale v žádné takovéto práci (např. Grozeva et al. 2010, 2011) nebyl publikován vyšší stav u současných expandovaných populací.

Vzhledem k tomu, že populace *Cimex lectularius* byly po celém světě vystavovány účinkům mnoha různých insekticidů (DDT, pyrethroidy, organofosfáty, karbamáty) (Romero et al. 2007, Weeks et al. 2010) po dlouhá desetiletí, je možné, že vznik vyššího počtu pohlavních chromosomů může souviset s expozicí těmto látkám. V tomto případě by byla fragmentce indukována uměle a vzniklé fragmenty X chromosomů by měly recentní původ. Teoreticky by se vznikem zmnožených chromosomů mohla být spojena resistance k některým insekticidům. Příbuzné druhy z netopýrů nemusely být přímo exponovány působením DDT v

dobách jeho masového používání od poloviny 40. let do poloviny 70. let kdy byl tento kontaktní širokospektrální insekticid zakázán (Hodgson & Kuhr 1990). To je možná důvod, proč se chromosomální fragmenty objevily právě v synantropních populacích *C. lectularius* a ne u žádných jiných volně žijících zástupců čeledi Cimicidae. Indukce fragmentace chromosomů u organismů s centrickými chromosomy by vedla k výraznému snížení jejich fitness, ale organismy s holokinetickými chromosomy tento radikální zásah mohou úspěšně přežívat.

Ve své studii Ueshima (1966) popisuje karyotyp osmi světových populací *Cimex lectularius* s rozdílným počtem X chromosomů, stabilních v rámci každé populace. V populacích z Francie, Japonska, Mexika a Kalifornie zaznamenal jedince se základním karyotypem samců $2n = 29, X_1X_2Y$, v Egyptě a České republice zaznamenal pravděpodobně homogenní populace se zvýšeným počtem X chromosomů $2n = 33, 6XY$. V Pittsburghu zaznamenal v DDT rezistentní heterogenní populaci karyotyp samců s $2n = 35, 8XY$ a karyotyp nekomplementárních samic $2n = 40, 14X$. Druhá smíšená populace z Ohia obsahovala ještě vyšší variabilitu mezi jedinci, u samců $2n = 34, 7XY$ a $2n = 36, 9XY$, u samic se vyskytovaly počty $2n = 39, 13X$ (zde patrně zaznamenal samici vzniklou křížením jedinců s nekomplementárním počtem X chromosomů) a $2n = 42, 8X$. Již v práci před 56 lety bylo tedy zaznamenáno 5 karyotypových variant ($2n = 29, 33, 34, 35, 36$) zástupců *Cimex lectularius*, bohužel Ueshima (1966) už neuvádí kolik bylo studováno jedinců či kolik populací z daných lokalit.

V této studii byly zachyceny štěnice se čtyřmi počty uvedenými Ueshimou (1966), ale nebyl zaznamenán počet $2n = 36, 9XY$ ani u samce ani u odpovídající komplementární samice. Skupiny s $2n = 29, X_1X_2Y$ chromosomy byly nacházeny ve vzorcích z celé Evropy, $2n = 33, 6XY$ se vyskytovalo v populacích z Čech (stejně jako u výsledků Ueshimy) a dále v populacích ze Švédska. Populace s vyššími počty X chromosomů $2n = 34-36$ byly recentně zaznamenány z Rakouska, Slovenska, Švédska a zejména z pěti populací v České republice.

V České republice se vyskytuje minimálně devět variant karyotypu $2n = 29-35, 42$ a 47 , což neodpovídá výsledkům Ueshimy (1966), ale patrně to je ovlivněno tím, že autor analyzoval jen jednu či jen několik velmi málo patrně příbuzných populací. Druhou možností může být v tu dobu homogenní populace *Cimex lectularius* v České republice a její pozdější smísení s mnoha dalšími zavlečenými populacemi s uvolněním pohybu osob, hybridizací by vznikaly další početní varianty karyotypů.

Je zajímavé, že se Ueshimovi (1966) podařilo zachytit populace s vysokými počty, ale žádnou populaci s počty $2n = 30-32$. Bohužel nejsou k dispozici data o tom, zda byly

populace s vyššími počty tak hojně, nebo analyzoval jen menší množství populací a náhodou získal zrovna tyto. Na základě současných znalostí je zatím prakticky nemožné rekonstruovat šíření štěnic v rámci Evropy pomocí zjištěných počtů chromosomů. Mohou se šířit zcela náhodně v závislosti jen na pohybech lidských populací. Je možné pouze sledovat distribuci jednotlivých podobných populací.

5.4.1. Původ zmnožených pohlavních chromosomů

Kromě možnosti vzniku nadpočetných chromosomů fragmentací pohlavních chromosomů X by bylo možné jejich vznik vysvětlit i pomocí dalšího specifického typu chromosomů charakteristických pro některé zástupce řádu Heteroptera, m-chromosomy. Dalším obecnějším typem chromosomů, které způsobují vyšší počty chromosomů v karyotypu a vyskytují se u mnoha druhů organismů jsou B chromosomy.

K velkému zvýšení počtu chromosomů může dojít i jednorázově mechanismem autosomální polyploidizace jak tomu je například u několika druhů čeledi Nabidae, vyskytují se zde druhy s $2n = 16, XY$ i $2n = 32 XY$. Jednoduchý systém pohlavních chromosomů XY byl zachován nejspíše kvůli odlišnému chování gonosomů v průběhu meiotického dělení (ke zmnožení gonosomů nedošlo asi kvůli postredukční segregaci chromosomů) (Kuznetsova & Maryańska-Nadachowska 2000, Kuznetsova et al. 2004).

M-chromosomy

U některých zástupců 14 čeledí řádu Heteroptera se vyskytuje speciální pár tzv. m-chromosomů, které jsou většinou výrazně menší než všechny ostatní chromosomy a vykazují i zcela odlišné chování při samčím buněčném dělení. Během meiosis se barví charakteristicky negativně heteropyknoticky (světleji), v meiotické profázi nepárují, neutvářejí chiasmata a dělí se stejně preredukčně jako autosomy (Ueshima 1979, Ituarte & Papeschi 2004, Rebagliati et al. 2005, Kuznetsova et al. 2011). Recentně byly m-chromosomy popsány u dvou druhů z čeledi Reduviidae, jinak se u ostatních zkoumaných druhů infrařádu Cimicomorpha nevyskytují (Poggio et al. 2011). Současná dostupná data poukazují na stabilitu přítomnosti či absence m-chromosomů na úrovni vyšších taxonů řádu Heteroptera.

Ačkoli jejich původ a význam stále není známý (Kuznetsova et al. 2011), je jen velmi málo pravděpodobné, že by vyšší počty chromosomů v rámci čeledi Cimicidae včetně druhu *Cimex lectularius*, způsobovaly právě m-chromosomy. Zejména kvůli odlišnému chování během meiosis, kdy se nechovají zcela jako autosomy ani jako gonosomy. Element, který by

nejvíce vyhovoval popisu negativní heteropyknózy a malé velikosti během meiosis byl opakovaně zaznamenán na preparátu samce s kódem 662m01 $2n = 30$ (Obrázek 12 G). Z tohoto jedince jsou dokumentovány různé meiotické stupně metafáze I, kde se daný objekt vyskytuje. S největší pravděpodobností se bude však jednat o fragment X chromosomu, který je také velmi malý a negativně heteropyknotický. Další důvod proč se v případě *C. lectularius* nejedná o nadpočetné m-chromosomy je, že všechny malé nadpočetné chromosomy nejsou vždy negativně heteropyknotické a redukčně se dělí až v metafázi II.

B chromosomy

Chromosomy se obecně dělí na A chromosomy (tj. všechny standardně se vyskytující chromosomy v karyotypu) a další skupinu nadpočetných B chromosomů. Ty se šíří v populaci nerovnoměrně, během meiosis se rozcházejí nepravidelně do spermatocytů, nerekombinují s ostatními A chromosomy a negativně ovlivňují normální dělení A chromosomů, kde výsledkem může být snížení fertility či ovlivnění pohlaví potomstva. B chromosomy nenesou zpravidla žádnou genetickou informaci a jsou nejčastěji heterochromatinizovány (Kráľ 1993). Mohou být variabilní z mnoha dalších aspektů: Velikostně, početně, v objemu, v distribuci heterochromatinu a chování během meiosis (Pérez et al. 2004, Kuznetsova et al. 2011). Mezi jedinci ze stejné populace se vyskytují v různých počtech a někdy se jejich počet liší i v jádrech jednoho jedince (mozaicismus). Mnoha autory jsou považovány za genomové parazity, protože svému nositeli nepřinášejí žádný užitek (White 1973, Panzera et al. 2010).

B chromosomy se vyskytují i u populací, které vykazují intraspecifickou variabilitu v počtu chromosomů např. v infrařádu Cimicomorpha byly popsány u několika druhů z čeledi Miridae, Nabidae, Reduviidae (Pérez et al. 2004, Panzera et al. 2010) a Tingidae (Grozeva & Nokkala 2001). Z čeledi Cimicidae je výskyt B chromosomů dokumentován u dvou druhů s vyšším variabilním počtem chromosomů *Paracimex borneensis* a *P. capitatus* (Ueshima 1966). U zástupců čeledi Reduviidae jsou B chromosomy vedlejšími produkty strukturálních přestaveb autosomů (Pérez et al. 2004). Musí mít nějaký evoluční význam, protože se vyskytují u mnoha rostlinných a živočišných taxonů, ačkoli původ, struktura a vývoj těchto „záhadných“ chromosomů je stále neznámý (Kuznetsova et al. 2011).

B chromosomy by mohly být potencionálně přítomny v karyotypu *Cimex lectularius* se zmnoženými chromosomy, ale počty fragmentů štěnice nejsou zcela náhodné a v rámci jedince vykazují v naprosté většině případů relativní stabilitu. Variabilita nadpočetných fragmentů je v rozpětí od jednoho do maximálně tří fragmentů, u dobře počitatelných figur se počet jeví zcela stabilní ve všech buňkách. Případná variabilita v rámci jedince je dána

nejistým počtem chromosomů plynoucím z nekvalitních figur, nikoli z počítatelných figur s různými počty chromosomů. Důležitým znakem nadpočetných fragmentů vyskytujících se u *C. lectularius* je také to, že nenesou známky zvýšené heterochromatinizace v žádném stupni mitosy ani meiosy a nejčastěji jsou isochromatické nebo naopak negativně heteropyknotické.

5.4.2. Mechanismus vzniku a šíření X fragmentu

Možné vysvětlení původu nadpočetných pohlavních chromosomů v heterogenních populacích může být na základě zjištěných výsledků následující. V současné studii bylo zaznamenáno 15 heterogenních populací štěnic s různými počty chromosomů odlišných zástupců. Ueshima (1966) zjistil, že se jedinci *Cimex lectularius* s rozdílným počtem chromosomů dále plodně kříží a jejich potomstvo má odlišný počet chromosomů než oba rodiče. Vzhledem k tomuto faktu, je možné, že populace s výskytem vyššího počtu chromosomů se často skládají z karyotypově heterogenního společenství jedinců. Takováto populace mohla pravděpodobně vzniknout po postupné hybridizaci jedinců (populací) s odlišnými počty chromosomů a jejich dalším křížením.

Například po hypotetickém křížení samice se základním počtem $2n = 30$, $X_1X_1X_2X_2$ a samce se zvýšeným počtem tří X chromosomů $2n = 30$, $X_1X_2X_3Y$ získáme potomstvo v první generaci F1: Samice $2n = 31$, $X_1X_1X_2X_2X_3$ a samce $2n = 29$, X_1X_2Y (Tabulka 6). Chromosomální fragment X_3 u samice v F1 nemusí párovat s žádným jiným chromosomem, protože gonosomy *Cimex lectularius* v buněčném dělení vystupují jako univalenty a párují se jen vzdáleně způsobem „touch and go“. V tomto případě by, ale samice musela vystupovala také jako heterogametické pohlaví, protože by docházelo k vytváření dvou typů vajíček $n = 15$, X_1X_2 a $n = 16$, $X_1X_2X_3$. Ve druhé generaci F2 mohou po křížení vznikat samice $2n = 32$, $X_1X_1X_2X_2X_3X_3$, $2n = 31$, $X_1X_1X_2X_2X_3$ a $2n = 30$, $X_1X_1X_2X_2$, samci F2 mají jen dva možné karyotypy $2n = 30$, $X_1X_2X_3Y$ a $2n = 29$, X_1X_2Y . Vznikne tedy smíšená populace se dvěma systémy karyotypů samců a k nim komplementárním samic a navíc vzniknou hypotetické heterogametické samice s intermediálním počtem pěti X chromosomů. V tomto případě je zřejmé, že po křížení dvou jedinců s minimálně odlišným počtem chromosomů vzniká heterogenní populace. Daný fragment má tendenci se u samic stabilizovat ve dvou kopiích a uchovat v karyotypu.

Tabulka 6. Příklad hypotetického křížení jedinců *Cimex lectularius* s různými počty chromosomů

2n: diploidní počet chromosomů.

Gamety (n): haploidní pohlavní buňky produkované daným jedincem.

F1: první generace křížením rodičů.

F2: druhá generace křížením rodičů a první generace.

	Pohlaví	2n počet	Gamety (n)	
Rodiče	samice	30, $X_1X_1X_2X_2$	$13+X_1X_2$	
	samec	30, $X_1X_2X_3Y$	$13+X_1X_2X_3$	$13+Y$
F1	samice	31, $X_1X_1X_2X_2X_3$	$13+X_1X_2$	$13+X_1X_2X_3$
	samec	29, X_1X_2Y	$13+X_1X_2$	$13+Y$
F2	samice	32, $X_1X_1X_2X_2X_3X_3$	$13+X_1X_2X_3$	
	samice	31, $X_1X_1X_2X_2X_3$	$13+X_1X_2$	$13+X_1X_2X_3$
	samice	30, $X_1X_1X_2X_2$	$13+X_1X_2$	
	samec	30, $X_1X_2X_3Y$	$13+X_1X_2X_3$	$13+Y$
	samec	29, X_1X_2Y	$13+X_1X_2$	$13+Y$

Mísení populací a křížení jedinců s dalšími, vyššími počty chromosomů celý systém komplikuje, dává vznik mnoha početním variantám karyotypu a počet X chromosomů může do určité míry růst. Pokaždé je ale nutná iniciální fragmentace, která se dále stabilizuje a fixuje v populaci. Během studia byli v populaci z Liberce (kód 614) nalezeni tři samci s počtem $2n = 35, 42$ až 47 chromosomů, což by odpovídalo extrémnímu počtu $20X$ chromosomů a hypotetická samice s komplementárním počtem chromosomů by musela mít karyotyp $2n = 66, 40X$. Bohužel u žádné samice z dané populace nebyla nalezena figura s počitatelným počtem chromosomů. Pokud jsou všechny nadpočetné chromosomy opravdu pohlavní chromosomy X, jednalo by se patrně o záznam nejvyšší variability počtu pohlavních chromosomů u volně žijících zástupců v rámci Heteroptera či hmyzu jako takového.

V případě křížení jedinců s různými počty chromosomů jako v hypotetickém příkladu výše, by došlo k expanzi jediného chromosomového fragmentu X_3 . Díky holokinetické povaze chromosomů a absenci nutnosti párování by tento chromosomální fragment persistoval v karyotypu i v dalších generacích. Není zcela jasné jak by docházelo k regulaci exprese genetické informace z tohoto fragmentu, protože geny na tomto nadbytečném chromosomu by byly u samce $2n = 30, X_1X_2X_3Y$ z F2 generace ve dvou kopiích (na původním nefragmentovaném chromosomu původně od samice a na fragmentu od samce - rodiče) a u samic dokonce ve třech až čtyřech kopiích. Není známo jak by docházelo k omezení efektu dávky, kdy by byla balance mezi genovými produkty narušena a až čtyřnásobně navýšena ve prospěch genů vyskytujících se na fragmentu X_3 . Nadpočetné

chromosomy jsou obvykle heterochromatinizovány (např. B chromosomy) a tím je exprese genů umlčena, ale tento jev nebyl v této studii pozorován a také by negativně ovlivnil samce u kterých došlo k fragmentaci (nese jen jedinou kopii genu). Pro srovnání u člověka má narušení efektu dávky za následek mírné či vážné postižení organismu, například při trisomii 21. chromosomu a dalších početních chromosomálních aberacích (např. FitzPatrick 2005).

Ueshima (1966) uvedl výsledky svých pokusů s křížením jedinců *Cimex lectularius* s různým počtem chromosomů, ale většina dostupných dat je jen pro samce. Studium karyotypu samic je obecně problematické kvůli velmi malému počtu meioticky se dělících buněk, buňky v mitotickém dělení se vyskytují v ovariích častěji, ale stále ve zlomkové koncentraci oproti spermatogoniálnímu dělení v samčích testes. Obecně se cytogenetické studie provádí většinou na samcích, ale v případě nadpočetných fragmentů X chromosomů studium samic skýtá skrytý potenciál příležitostných heterogametických jedinců samičího pohlaví. Několik samic analyzovaných v této studii mělo nejednoznačný počet chromosomů a nebylo jisté, zda se v karyotypu objevuje opravdu lichý počet chromosomů, nebo jde o chybu při zpracování. Ve dvou populacích se vyskytovaly samice s relativně transparentním lichým počtem chromosomů, v populaci s kódem 840 $2n = 33, 7X$ (Obrázek 12 F) a v populaci s kódem 708 $2n = 43, 17X$ (Obrázek 14 H). V těchto případech by se mohlo jednat právě o mezičlánky vzniklé křížením jedinců s různými počty chromosomů.

5.5. Karyogramy

V případě vyššího počtu spiralizovaných chromosomů se karyogramy obtížně sestavují, ale vždy je dobře prokázána orientační velikost autosomů proti gonosomům. Tři pravděpodobné mateřské gonosomy jsou vždy střední velikosti, nadpočetné fragmenty jsou spolu s posledním autosomem nejmenšími chromosomy karyotypu.

Rozměry chromosomů v každém ze čtyř karyogramů s různým počtem chromosomů byly zjišťovány jen jednou z jediné figury pro získání hrubé obecné představy o velikosti jednotlivých chromosomů, rozměry nebyly nijak průměrovány. Záměrem bylo zejména porovnat procentuální velikosti chromosomů v základním počtu $2n = 29, X_1X_2Y$ s procentuální velikostí chromosomů z karyotypu s vyšším počtem X chromosomů. Procentuální délka každého chromosomu byla určena součtem délek všech chromosomů a poměrném rozdělení podle absolutních zjištěných velikostí. Absolutní rozměry nemohou být použity ke srovnání, protože lze jen velmi obtížně získat dvě optimální figury s přesně stejnou mírou spiralizace chromosomů. Procentuální počty se ale také příliš neosvědčily, protože v

karyotypu s vyšším počtem chromosomů mohou být zkráceny z důvodu rozložení procentuální velikosti mezi více chromosomů. Navzdory neprůkaznosti přinesla tato metoda alespoň orientační rozložení velikosti chromosomů.

Není jisté, zda bude možné po analýze dalších figur stupňů metafáze II identifikovat určité fragmenty jen na základě poměrné délky. Pokud fragmenty vznikají nezávisle v různých populacích tak nemohou být zcela totožné, musí se lišit svojí velikostí a obsahem.

5.6. C-pruhování

C-pruhování popsané v této práci je klasická metoda hojně využívaná zejména při studiu chromosomů obratlovců. Při vizualizaci heterochromatinu hmyzu se dnes již používají spíše moderní fluorescenční metodiky barvení DAPI/CMA₃ (např. Grozeva et al. 2010). Klasický postup C-pruhování je úspěšně používán na PřF UK ke studiu chromosomů pavoukoců, a proto byla tato technika vyzkoušena i na chromosomy *Cimex lectularius*.

Chromosomy zůstaly pozorovatelné jen na starších preparátech a navíc inkubovaných za nižší teploty. Za vyšší teploty 60°C mohlo dojít k úplnému rozrušení a odmytí počítatelných figur. U starých preparátů pravděpodobně došlo k dokonalejší adhezi chromosomů na povrch skla, ale teplota 60°C je pravděpodobně tak vysoká, že ani vysoké stáří preparátu nezabránilo destrukci chromosomů. Na začátku metody C-pruhování se běžně provádí umělé stárnutí skel v sušičce právě kvůli lepší přilnavosti chromosomů k preparátu.

Popisovaná metoda C-pruhování se obecně ke studiu chromosomů bezobratlých živočichů nepoužívá z důvodu nízké úspěšnosti. Vzhledem k tomu, že se na preparátech, které obsahovaly chromosomy indukovalo strukturální poškození, je možné, že by po delší optimalizaci a zdokonalení metodiky bylo pruhování úspěšné.

5.7. Velikost gonád a stav mesenteronu

Nebyl potvrzen původní předpoklad, že vlastní reálnou velikost gonády nejlépe vyjadřuje rozměr, který dosahuje větších rozdílů mezi maximem a minimem (u samců šířka testes, u samic délka ovárií). U samců byla pozitivní závislost kvality preparátů na velikosti gonád zaznamenána u rozměrů šířky testes a relativní plochy. U rozměrů délky testes byla průkaznost těsně pod hraniční hodnotou $p = 0,089$. Naopak kvalita preparátů samic nevykazovala žádnou závislost na jakémkoli rozměru ovárií. V případě rozměrů ovárií byla neprůkaznost mnohem silnější než v případě délky samčích testes (p hodnota délky ovárií = 0,678; p šířky = 0,716 a p relativní plochy = 0,774).

Většina samců měla větší rozměry gonád 0,71-1mm na délku a 1,19-1,86mm na šířku, ale většina samic vykazovala nižší rozměry gonád 1,03-1,86mm na délku a 0,68-1,32mm na šířku. U samic nebyla závislost kvality na šířce průkazná, možná také z důvodu ne zcela přesného měření. Při měření ovárií ve většině případů záleželo na rozvolněnosti jednotlivých ovariol, pak se naměřená velikost mohla výrazně lišit. Délka ovárií nebyla rozvolněností nijak ovlivněna a zůstávala stálá, přes to nebyla závislost prokázána. U samice může být závislost mírně zkreslená také menším počtem měřených jedinců.

Příjem potravy přímo iniciuje start rozmnožovacího chování a buněčné dělení v gonádách (Usinger 1966), proto se gonády po příjmu potravy zvětšují a začínají produkovat meiotickým dělením gamety. Po prokázání pozitivní závislosti kvality chromosomových preparátů z jedinců s většími gonádami, bylo vysoce pravděpodobné, že bude obdobná pozitivní závislost objevena i pro míru naplnění mesenteronu potravou. V některých případech se ale stalo, že byl analyzován recentně nasátý jedinec, který nestačil potravu natrávit a začít produkci gamet, v těchto případech byly gonády malé a preparáty negativní i když bylo střevo zcela plné. Při držení štěnic v lednici při teplotě 4°C bez přístupu k potravě bylo během této studie zaznamenáno přežívání některých jedinců až 15 měsíců.

Nejvíce bylo zaznamenáno jedinců se střevem bez obsahu (111) a nejméně bylo analyzováno jedinců s plným mesenteronem (30), ale procentuální počet jedinců poskytujících kvalitní chromosomové preparáty byl nejvyšší právě v nejméně zastoupené kategorii s plným střevem 43% a dále klesal až na 17% v kategorii s prázdným střevem. Je zajímavé, že v prostřední kategorii naplnění mesenteronu se vyskytovalo 39 jedinců, kteří se rovnoměrně rozdělili po 13 (33,3%) do kategorií popisujících kvalitu jejich chromosomálních preparátů.

5.8. *Cimex pipistrelli*

U zástupců obou karyotypovaných netopýřích populací *Cimex pipistrelli* byl v této studii potvrzen dříve popsán stabilní počet chromosomů samců $2n = 31, X_1X_2Y$ (např. Ueshima 1966) (Obrázek 10 F). Populace by mohly být teoreticky volně přiřazeny ke skupině *Cimex lectularius* s $2n = 31$ chromosomy, ale významně se liší 28 autosomy oproti 26 autosomům vyskytujícím se u *C. lectularius*.

Na jediné samici druhu *Cimex pipistrelli* s kódem 190f02 byl na třech ne zcela jednoznačných preparátech zjištěn vyšší počet chromosomů, okolo $2n = 36, 8X$, než je u tohoto druhu standartní $2n = 32, X_1X_1X_2X_2$. Zástupci *C. pipistrelli* byli bráni jen jako

outgroup a sběr živých zástupců byl prováděn pouze příležitostně. Pokud by se prokázala variabilita v počtu pohlavních chromosomů i u tohoto druhu fixně vázaném na netopýry, jednalo by se o první takový záznam. Vzhledem k tomu, že taxonomie štěnic žijících na netopýrech ve Střední Evropě zatím není dořešena, mohou existovat i další možná vysvětlení.

6. ZÁVĚRY

Ze 70 získaných sběrů populací štěnice domácí bylo zjištěno 10 rozdílných karyotypů $2n = 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 37, 42$ a 47 s rozpětím počtu X chromosomů od dvou do 20. Karyotyp samic byl obvykle komplementární k počtu chromosomů samce, u dvou samic byl zjištěn lichý počet vzniklý pravděpodobně křížením dvou nekomplementárních jedinců.

Celkem bylo zjištěno 18 variant populací s charakteristickými počty svých zástupců. Nejvíce heterogenních populací bylo zjištěno u populací na severu České republiky. Homogenní populace se vyskytovaly zejména v Českých Budějovicích, Plzni, Praze a dále jednotlivě na zbývajícím území České republiky.

Výsledky této studie podporují hypotézu vzniku nadpočetných chromosomů mechanismem fragmentace pohlavních chromosomů X. Tuto hypotézu podporují zejména shody v počtech gonosomů u samců a samic v populacích s vyšším než základním počtem chromosomů např. $2n = 31, 4XY$. Dále také zaznamenané figury samčí metafáze II, kde jsou prokazatelně pozorovatelné jednochromatidové nadpočetné gonosomy proti dvouchromatidovým autosomům.

V této studii byl také rozšířen rozsah počtu X chromosomů a jejich fragmentů z původně publikovaných dvou až 15 na dva až 20, což potvrzuje *Cimex lectularius* jako druh s nejvyšším známým počtem gonosomů v rámci ploštic. Byl potvrzen dříve publikovaný výskyt různého počtu chromosomů u jednoho jedince, ale zatím není známo vysvětlení tohoto jevu.

Původní počet chromosomů druhu *Cimex lectularius* je s největší pravděpodobností v současnosti nejhojněji se vyskytující základní počet $2n = 29, X_1X_2Y$ bez nadpočetných chromosomových fragmentů. V současné studii byl základní počet chromosomů zjištěn u 51% populací, zbylých 49% populací vykazovalo devět karyotypů s vyšším počtem X chromosomů.

Byl potvrzen dříve publikovaný stabilní počet chromosomů $2n = 31, X_1X_2Y$ u zástupců štěnic *Cimex pipistrelli* parazitujících na netopýrech, ale byl dokumentován i případ jedné samice vykazující zřejmě unikátní počet $2n = 36, 8X$.

Použitou metodikou byly získány počitatelné mitotické a meiotické figury pouze z tkáně testes, v menší míře již z ovárií a zcela negativní byly preparáty vyrobené z vajíček a tkáně mesenteronu. V testes je jednoznačně nejvyšší frekvence dělení buněk a navíc poskytují meiotickou metafázi II, která je velmi důležitá při identifikaci gonosomů.

Metodika C-pruhování byla vyhodnocena jako neúspěšná, kvůli neoptimálnímu působení hydroxidu barnatého a pravděpodobně i nízkému stáří některých preparátů.

Byla prokázána závislost kvality figur chromosomových preparátů na šířce a relativní ploše testes u samců. S rostoucí šířkou samčích gonád se objevuje signifikantně více jedinců s kvalitními preparáty. Závislost na délce samčích gonád byla mírně neprůkazná. U všech rozměrů pro samičí gonády byla zjištěna silná neprůkaznost závislosti kvality preparátů na velikosti gonád.

Při srovnání míry naplnění mesenteronu jedince a kvality chromosomových preparátů byl zjištěn vyšší procentuální výskyt jedinců s kvalitními preparáty v kategorii jedinců s plným střevem. Naopak procentuálně nejméně jedinců s kvalitními preparáty bylo s prázdným střevem. Tento výsledek byl ale očekávaný, protože s větším množstvím potravy ve střevě začíná jedinec aktivovat rozmnožovací procesy a tím se zvýší koncentrace meioticky se dělících buněk.

Ze sestavených karyogramů byly zjištěny orientační poměrné rozměry jednotlivých chromosomů z různě početných karyotypů dvou mitotických prometafází a dvou metafází II. Ve všech figurách byl zjištěn jeden až dva výrazně větší chromosomy, v metafázi se jedná s jistotou o autosomy, a dále byl ve třech případech zjištěn výrazně menší chromosom. Pravděpodobné mateřské gonosomy jsou střední velikosti, jejich fragmenty jsou dohromady s jedním autosomem nejmenší chromosomy karyotypu.

Byl zpracován zatím nejrozsáhlejší materiál populací *Cimex lectularius* z Evropy. O jedincích jsou zároveň známa cytogenetická i molekulárně biologická data, jedná se o první takovéto zpracování materiálu štěnice. Karyotypy tak mohou být poprvé porovnány s haplotypy. Vyřešení původu nadpočetných pohlavních chromosomů bude pokračovat v navazujícím studiu, za použití sofistikovaných cytogenetických metod.

7. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- AZEVEDO D.O., NEVES C.A., MALLET J.R.D.S., GONÇALVES T.C.M., ZANUNCIO J.C. & SERRÃO J.E. 2009: Notes on Midgut Ultrastructure of *Cimex hemipterus* (Hemiptera: Cimicidae). *Journal of Medical Entomology* 46 (3): 435-441.
- BALVÍN O. 2008: *Revize druhů rodu Cimex (Heteroptera: Cimicidae) ve střední Evropě*. Diplomová práce, Katedra zoologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha, 94 pp.
- BALVÍN O., MUNCLINGER P., KRATOCHVÍL L. & VILÍMOVÁ J. 2012: Mitochondrial DNA and morphology show independent evolutionary histories of bedbug *Cimex lectularius* (Heteroptera: Cimicidae) on bats and humans. *Parasitology Research* 111: 457-469.
- BARDELLA V.B., DIAS A.L., GIULIANO-CAETANO L., RIBEIRO J.R.I. & DA ROSA R. 2012: Sex chromosome differentiation in *Belostoma* (Insecta: Heteroptera: Belostomatidae). *Genetics and Molecular Research* 11: DOI: 10.4238/2012.May.21.2.
- BARDELLA V.B., GAETA M.L., VANZELA A.L.L. & AZEREDO-OLIVIERA M.T.V. 2010: Chromosomal location of heterochromatin and 45S rDNA sites in four South American triatomines (Heteroptera: Reduviidae). *Comparative Cytogenetics* 4 (2): 141-149.
- BLOW A.J., TURELL J.M., SILVERMAN L.A. & WALKER D.E. 2001: Stercorarial shedding and transtadial transmission of hepatitis B virus by common bed bugs (Hemiptera: Cimicidae). *Journal of Medical Entomology* 38: 694-700.
- BRESSA M.J., FUMAGALLI E., ITUARTE S., FRASSA M.V. & LARRAMENDY M.L. 2002: Meiotic studies in *Dysdercus* Guérin Méneville, 1831 (Heteroptera: Pyrrhocoridae). II. Evidence on variations of the diffuse stage between wild and laboratory-inbred populations of *Dysdercus chaquensis* Freiberg, 1948. *Hereditas* 137: 125-131.
- BRESSA M.J., LARRAMENDY M.L. & PAPESCHI A.G. 2005: Heterochromatin characterization in five species of Heteroptera. *Genetica* 124: 307-317.
- BRESSA M.J. & PAPESCHI A.G. 2007: New contributions to the study of Corixoidea: cytogenetic characterization of three species of *Sigara* from Argentina and the plausible mechanisms of karyotype evolution within Nepomorpha. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 66 (3-4): 81-89.
- BRESSA M.J., PAPESCHI A.G., MOLA L.M. & LARRAMENDY M.L. 1999: Meiotic studies in *Dysdercus* Guérin Méneville 1831 (Heteroptera: Pyrrhocoridae). I. Neo-XY in *Dysdercus albofasciatus* Berg 1878, a new sex chromosome determining system in Heteroptera. *Chromosome Research* 7: 503-508.
- BRESSA M.J., PAPESCHI A.G., VÍTKOVÁ M., KUBÍČKOVÁ S., FUKOVÁ I., PIGOZZI M.I. & MAREC F. 2009: Sex Chromosome Evolution in Cotton Stainers of the Genus *Dysdercus* (Heteroptera: Pyrrhocoridae). *Cytogenetic and Genome Research* 125: 292-305.

- BURTON G.J. 1963: Bedbugs in relation to transmission of human diseases. *Public Health Reports* **78**: 513-524.
- CARAYON J. 1966: Traumatic insemination and the paragenital system, pp.81-166. In: USINGER R.B.: *Monograph of Cimicidae (Hemiptera – Heteroptera)*. Entomological Society of America, Maryland, College Park, XI+585 pp.
- COSTA L.C., AZEREDO-OLIVEIRA M.T.V. & TARTAROTTI E. 2008: Spermatogenesis and Nucleolar Activity in *Triatoma klugi* (Triatominae, Heteroptera). *Genetics and Molecular Biology* **31** (2): 438-444.
- DARLINGTON C.D. 1939: The genetical and mechanical properties of the sex chromosomes. V. *Cimex* and the Heteroptera. *Journal of Genetics* **39**: 100-137.
- FITZPATRICK D.R. 2005: Transcriptional consequences of autosomal trisomy: primary gene dosage with complex downstream effects. *TRENDS in Genetics* **21** (5): 249-253.
- FORERO D. 2008: The systematics of the Hemiptera. *Revista Colombiana de Entomología* **34**: 1-21.
- FOX NEWS 5. listopadu 2010: <http://video.foxbusiness.com/v/4406220/how-to-bust-bed-bugs>
- FRANCO M.J., BRESSA M.J. & PAPESCHI A.G. 2006: Karyotype and male meiosis in *Spartocera batatas* and meiotic behaviour of multiple sex chromosomes in Coreidae (Heteroptera). *European Journal of Entomology* **103**: 9-16.
- FRYDRYCHOVÁ R., GROSSMANN P., TRUBAČ P., VÍTKOVÁ M. & MAREC F. 2004: Phylogenetic distribution of TTAGG telomeric repeats in insects. *Genome* **47**: 163-178.
- GRIFFITHS A.J.F., WESSLER S.R., LEWONTIN R.C., GELBART W.M., SUZUKI D.T. & MILLER J.H. 2005: *Introduction to Genetic Analysis*. W.H. Freeman and Company, New York, XI+782 pp.
- GRIMALDI D. & ENGEL S.M. 2005: *Evolution of the insects*. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Melbourne, Madrid, Cape Town, Singapore, São Paulo, XV+755 pp.
- GROZEVA S. 1997: Cytogenetic analysis of some aradid species (Heteroptera: Aradidae). *European Journal of Entomology* **94**: 421-424.
- GROZEVA S., KUZNETSOVA V. & ANOKHIN B. 2010: Bed bug cytogenetics: karyotype, sex chromosome system, FISH mapping of 18S rDNA, and male meiosis in *Cimex lectularius* Linnaeus, 1758 (Heteroptera: Cimicidae). *Comparative Cytogenetics* **4** (2): 151-160.
- GROZEVA S., KUZNETSOVA V. & ANOKHIN B. 2011: Karyotypes, male meiosis and comparative FISH mapping of 18S ribosomal DNA and telomeric (TTAGG)_n repeat in eight species of true bugs (Hemiptera, Heteroptera). *Comparative Cytogenetics* **5** (4): 355-374.

- GROZEVA S. & NOKKALA S. 1996: Chromosomes and their meiotic behavior in two families of the primitive infraorder Dipsocoromorpha (Heteroptera). *Hereditas* **125**: 31-36.
- GROZEVA S. & NOKKALA S. 2001: Chromosome Numbers, Sex Determining Systems, and Patterns of the C-heterochromatin Distribution in 13 Species of Lace Bugs (Heteroptera, Tingidae). *Folia Biologica (Kraków)* **49** (1-2): 29-41.
- GROZEVA S. & NOKKALA S. 2002: Achiasmatic male meiosis in *Cimex* sp. (Heteroptera, Cimicidae). *Caryologia* **55**: 189-192.
- GROZEVA S., NOKKALA S. & SIMOV N. 2006: First Evidence of Sex Chromosome Pre-reduction in Male Meiosis in the Miridae Bugs (Heteroptera). *Folia Biologica (Kraków)* **54**: 9-12.
- GROZEVA S., NOKKALA S. & SIMOV N. 2009: Chiasmatic male meiosis in six species of water bugs from infraorders Nepomorpha and Gerromorpha (Insecta: Heteroptera). *Comparative Cytogenetics* **3** (2): 125-130.
- GROZEVA S. & SIMOV N. 2008a: *Cytotaxonomy of two Cremnocephalus species (Heteroptera, Miridae)*, pp. 171-179. In: GROZEVA S. & SIMOV N. (eds): Advances in Heteroptera research. Festschrift in Honour of 80th Anniversary of Michail Josifov.
- GROZEVA S. & SIMOV N. 2008b: Cytogenetic studies of Bryocorinae Baerensprung, 1860 true bugs (Heteroptera: Miridae). *Acta Zoologica Bulgarica* **2**: 61-70.
- GROZEVA S., SIMOV N. & JOSIFOV M. 2007: Karyotaxonomy of some European *Macrolophus* species (Heteroptera: Miridae). *Mainzer Naturwissenschaftliche Archiv, Beiheft* **31**: 81-87.
- GROZEVA S., SIMOV N. & NOKKALA S. 2008: Achiasmatic male meiosis in three Micronecta species (Heteroptera: Nepomorpha: Micronectidae). *Comparative Cytogenetics* **2** (1): 73-78.
- GUERRA M., CABRAL G., CUACOS M., GONZÁLEZ-GARCÍA M., GONZÁLEZ-SÁNCHEZ M., VEGA J. & PUERTAS M.J. 2010: Neocentrics and Holokinetics (Holocentrics): Chromosomes out of the Centromeric Rules. *Cytogenetic and Genome Research* **129**: 82-96.
- HODGSON E. & KUHR R.J. 1990: *Safer Insecticides: Development and Use*. Marcel Dekker, United States, New York and Basel. XI+593 pp.
- HWANG S.W., SVOBODA T.J., DE JONG I.J., KABASELE K.J. & GOSIS E. 2005: Bed Bug Infestations in an Urban Environment. *Emerging Infectious Diseases* **11** (4): 533-538.
- ITUARTE S. & PAPESCHI A.G. 2004: Achiasmatic male meiosis in *Tenagobia (Fuscagobia) fuscata* (Stål) (Heteroptera, Corixoidea, Micronectidae). *Genetica* **122**: 199-206.
- JACOBS D.H. 2004: The evolution of a neo-XY₁Y₂ sex chromosome system by autosome-sex chromosome fusion in *Dundocoris nodulicarinus* Jacobs (Heteroptera: Aradidae: Carventinae). *Chromosome Research* **12**: 175-191.

- JACOBS D.H. & LIEBENBERG H. 2001: Cytogenetics of *Adamanotus uncotibialis* Jacobs (Heteroptera: Aradidae). *Caryologia* **54** (1): 83-96.
- KRÁL 1993: Holokinetické chromosomy. *Biologické listy* **59** (3): 191-217.
- KRENN H.W. & ASPÖCK H. 2012: Form, function and evolution of the mouthparts of blood-feeding Arthropoda. *Arthropod Structure & Development* **41** (2): 101-118.
- KUZNETSOVA V.G. & GROZEVA S. 2008: Cytogenetic characters of *Arachnocoris trinitatus* Bergroth, 1916 (Insecta: Heteroptera: Nabidae) from nests of the spider *Coryssocnemis simla* Huber, 2000 (Araneae: Pholcidae). *Comparative Cytogenetics* **2** (2): 139-142.
- KUZNETSOVA V.G., GROZEVA S. & NOKKALA S. 2004: New cytogenetic data on Nabidae (Heteroptera: Cimicomorpha), with a discussion of karyotype variation and meiotic patterns, and their taxonomic significance. *European Journal of Entomology* **101**: 205-210.
- KUZNETSOVA V. G., GROZEVA S.M., NOKKALA S. & NOKKALA CH. 2011: Cytogenetics of the true bug infraorder Cimicomorpha (Hemiptera, Heteroptera): a review. *ZooKeys* **154**: 31-70.
- KUZNETSOVA V.G. & MARYAŃSKA-NADACHOWSKA A. 2000: Autosomal polyploidy and male meiotic pattern in the bug family Nabidae (Heteroptera). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **38**: 87-94.
- LOWE C.F. & ROMNEY M.G. 2011: Bedbugs as Vectors for Drug-Resistant Bacteria. *Emerging Infectious Diseases* **17** (6): 1132-1134.
- MANNA G.K. 1984: Chromosomes in evolution in Heteroptera, pp.189-225. In: SHARMA A.K. & SHARMA A. (eds): *Chromosomes in evolution of eukaryotic groups*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- MOLA L.M. & PAPESCHI A.G. 1993: Meiotic studies in *Largus rufipennis* (Castelnau) (Largidae, Heteroptera): frequency and behaviour of ring bivalents, univalents and B chromosomes. *Heredity* **71**: 33-40.
- MOLA L.M. & PAPESCHI A.G. 2006: Holokinetic chromosomes at glance. *Journal of Basic & Applied Genetics* **17** (1): 17-33.
- MONTI V., GIUSTI M., BIZZARO D., MANICARDI G.C. & MANDRIOLI M. 2011: Presence of a functional (TTAGG)_n telomere-telomerase system in aphids. *Chromosome Research* **19** (5): 625-633.
- NOKKALA CH., KUZNETSOVA V., GROZEVA S. & NOKKALA S. 2007: Direction of karyotype evolution in the bug family Nabidae (Heteroptera): New evidence from 18S rDNA analysis. *European Journal of Entomology* **104**: 661-665.
- NOKKALA S. 1985: Restriction of kinetic activity of holokinetic chromosomes in meiotic cells and its structural basis. *Hereditas* **102**: 85-88.

- NOKKALA S. 1986: The mechanism behind the regular segregation of the m-chromosomes in *Coreus marginatus* L. (Coreidae, Hemiptera). *Hereditas* **105**: 73-85.
- NOKKALA S. & GROZEVA S. 2000: Achiasmatic male meiosis in *Myrmedobia coleoptrata* (Fn.) (Heteroptera, Microphysidae). *Caryologia* **53** (1): 5-8.
- NOKKALA S. & NOKKALA CH. 1983: Achiasmatic male meiosis in two species of *Saldula* (Saldidae, Hemiptera). *Hereditas* **99**: 131-134.
- NOKKALA S. & NOKKALA CH. 1984a: The occurrence of the X0 sex chromosome system in *Dictyonota tricornis* (Schr.) (Tingidae, Hemiptera) and its significance for concepts of sex chromosome system evolution in Heteroptera. *Hereditas* **100**: 299-301.
- NOKKALA S. & NOKKALA CH. 1984b: Achiasmatic male meiosis in the Heteropteran genus *Nabis* (Nabidae, Hemiptera). *Hereditas* **101**: 31-35.
- NOKKALA S. & NOKKALA CH. 1986a: Achiasmatic male meiosis of collochore type in the heteropteran family Miridae. *Hereditas* **105**: 193-197.
- NOKKALA S. & NOKKALA CH. 1986b: Achiasmatic male meiosis in *Anthocoris nemorum* (L.) (Anthocoridae, Hemiptera). *Hereditas* **105**: 287-289.
- PANAGIOTAKOPULU E. & BUCKLAND P.C. 1999: *Cimex lectularius* L., the common bed bug from Pharaonic Egypt. *Antiquity* **73**: 908-911.
- PANZERA F., PÉREZ R., PANZERA Y., FERRANDIS I., FERREIRO M.J., & CALLEROS L. 2010: Cytogenetics and Genome Evolution in the Subfamily Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). *Cytogenetic and Genome Research* **128**: 77-87.
- PAPESCHI A.G. 1994: Chromosome rearrangements in *Belostoma plebejum* (Stål) (Belostomatidae, Heteroptera). *Caryologia* **47** (3-4): 223-231.
- PAPESCHI A.G. 1996: Sex chromosome polymorphism in a species of *Belostoma* (Belostomatidae, Heteroptera). *Hereditas* **124**: 269-274.
- PAPESCHI A.G. & BIDAU C.J. 1985: Chromosome complement and male meiosis in four species of *Belostoma* Latreille (Heteroptera-Belostomatidae). *Revista Brasileira de Genética* **8** (2): 249-261.
- PAPESCHI A.G. & BRESSA M.J. 2006: Evolutionary cytogenetics in Heteroptera. *Journal of Biological Research* **5**: 3-21.
- PÉREZ R., CALLEROS L., ROSE V., LORCA M. & PANZERA F. 2004: Cytogenetic studies on *Mepraia gajardoi* (Heteroptera: Reduviidae). Chromosome behaviour in a spontaneous translocation mutant. *European Journal of Entomology* **101**: 211-218.
- PÉREZ R., PANZERA F., PAGE J., SUJA J.A. & RUFAS J.S. 1997: Meiotic behaviour of holocentric chromosomes: orientation and segregation of autosomes in *Triatoma infestans* (Heteroptera). *Chromosome Research* **5**: 47-56.

- PÉRICART J. 1996: Family Cimicidae Latreille, 1802 - bed-bugs, pp. 141-144. In: AUKEMA B. & RIEGER C. (eds): *Catalogue of the Heteroptera of the Palearctic region, Vol. 2*. Netherlands Entomological Society, Wageningen, Netherland, XIV+361pp.
- POGGIO M.G., BRESSA M.J. & PAPESCHI A.G. 2007: Karyotype evolution in Reduviidae (Insecta: Heteroptera) with special reference to Stenopodainae and Harpactorinae. *Comparative Cytogenetics* **1** (2): 159-168.
- POGGIO M.G., BRESSA M.J. & PAPESCHI A.G. 2011: Male meiosis, heterochromatin characterization and chromosomal location of rDNA in *Microtomus lunifer* (Berg, 1900) (Hemiptera: Reduviidae: Hammacerinae). *Comparative Cytogenetics* **5** (1): 1-22.
- POGGIO M.G., BRESSA M.J., PAPESCHI A.G., DI IORIO O. & TURIENZO P. 2009: Insects found in birds' nests from Argentina: cytogenetic studies in Cimicidae (Hemiptera) and its taxonomical and phylogenetic implications. *Zootaxa* 2315: 39-46.
- REBAGLIATI P.J. & MOLA L.M. 2010: Meiotic behavior and karyotypic variation in *Acliedra* (Pentatomidae, Heteroptera). *Genetics and Molecular Research* **9** (2): 739-749.
- REBAGLIATI P.J., MOLA L.M. & PAPESCHI A.G. 2001: Karyotype and meiotic behaviour of the holokinetic chromosomes of six Argentine species of Pentatomidae (Heteroptera). *Caryologia* **54** (4): 339-347.
- REBAGLIATI P.J., MOLA L.M., PAPESCHI A.G. & GRAZIA J. 2005: Cytogenetic studies in Pentatomidae (Heteroptera): A review. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **43** (3): 199-213.
- REINHARDT K., HARDER A., HOLLAND S., HOOPER J. & LEAKE-LYALL C. 2008: Who Knows the bed Bug? Knowledge of Adult Bed Bug Appearance Increases with People's Age in Three Counties of Great Britain. *Journal of Medical Entomology* **45** (5): 956-958.
- REINHARDT K. & SIVA-JOTHY M.T. 2007: Biology of the bed bugs (Cimicidae). *Annual Review of Entomology* **52**: 351-374.
- ROMERO A., POTTER M.F., POTTER D.A. & HAYNES K.F. 2007: Insecticide Resistance in the Bed Bug: A Factor in the Pest's Sudden Resurgence? *Journal of medical Entomology* **44** (2): 175-178.
- SADÍLEK D. 2010: Cytogenetika štěnic (Cimicidae) jako modelových ploštic (Insecta: Heteroptera). Bakalářská práce, Katedra Zoologie, Přírodovědecká fakulta, Karlova univerzita v Praze, 40 pp.
- SCHUH R.T. & SLATER J.A. 1995: *True bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera)*. Cornell University Press, Ithaca, XII+336 pp.
- SCHUH R.T. & ŠTYS P. 1991: Phylogenetic analysis of cimicomorphan family relationships (Heteroptera). *Journal of the New York Entomological Society* **99**: 298-350.

- SCHUH R.T., WEIRAUCH CH. & WHEELER W.C. 2009: Phylogenetic relationships within the Cimicomorpha (Hemiptera: Heteroptera): a total-evidence analysis. *Systematic Entomology* **34**: 15-48.
- SCHVARZSTEIN M., WIGNALL S.M. & VILLENEUVE A.M. 2010: Coordinating cohesion, co-orientation, and congression during meiosis: lessons from holocentric chromosomes. *Genes & Development* **24**: 219-228.
- SIMOV N., IVANOVA T. & SCHUNGER I. 2006: Bat-parasitic *Cimex* species (Hemiptera: Cimicidae) on the Balkan Peninsula, with zoogeographical remarks on *Cimex lectularius* Linnaeus. *Zootaxa* **1190**: 59-68.
- SLACK H.D. 1938: Chromosome numbers in *Cimex*. *Nature* **142**: 358.
- SLACK H.D. 1939: Structural hybridity in *Cimex l.* *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie. Abteilung B, Chromosoma* **1**: 104-118.
- SOUZA H.V., SOUZA F.B, MARUYAMA S.R.C., CASTANHOLE M.M.U. & ITOYAMA M.M. 2009: Meiosis, spermatogenesis and nucleolar behavior in the seminiferous tubules of Alydidae, Coreidae and Rhopalidae (Heteroptera) species. *Genetics and Molecular Research* **8** (4): 1383-1396.
- SUMNER A.T. (1972): A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* **75**: 304-306.
- SZALANSKI A.L., AUSTIN J.W., MCKERN J.A., STEELMAN C.D. & GOLD R.E. 2008: Mitochondrial and Ribosomal Internal Transcribed Spacer 1 Diversity of *Cimex lectularius* (Hemiptera: Cimicidae). *Journal of Medical Entomology* **45** (2): 229-236.
- ŠTYS P. & KERZHNER I.M. 1975: The rank and nomenclature of higher taxa in recent Heteroptera. *Acta Entomologica Bohemoslovaca* **72**: 64-79.
- ŠŤÁHLAVSKÝ F. & KRÁL J. 2004: Karyotype analysis and achiasmatic meiosis in pseudoscorpions of the family Chthoniidae (Arachnida: Pseudoscorpiones). *Hereditas* **140**: 49-60.
- THE INTERNATIONAL APHID GENOMICS CONSORTIUM 2010: Genome Sequence of the Pea Aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Public Library of Science Biology* **8** (2): 1-24.
- TRAUT W. 1999: The evolution of sex chromosomes in insects: Differentiation of sex chromosomes in flies and moths*. *European Journal of Entomology* **96**: 227-235.
- TRAUT W., SZCZEPANOWSKI M., VÍTKOVÁ M., OPITZ CH., MAREC F. & ZRZAVÝ J. 2007: The telomere repeat motif of basal Metazoa. *Chromosome Research* **15**: 371-382.
- UESHIMA N. 1964: Experiments on reproductive isolation in *Cimex lectularius* and *Cimex columbarius* (Hemiptera: Cimicidae). *The Pan-Pacific Entomologist* **40**: 47-53.

- UESHIMA N. 1966: Cytology and cytogenetics, pp. 183-237. In: USINGER R.B.: *Monograph of Cimicidae (Hemiptera – Heteroptera)*. Entomological Society of America, Maryland, College Park, XI+585 pp.
- UESHIMA N. 1967: Supernumerary chromosomes in the human bed bug *Cimex lectularius* Linn. (Cimicidae: Hemiptera). *Chromosoma (Berlin)* **20**: 311-331.
- UESHIMA N. 1979: *Hemiptera II: Heteroptera*, pp. V+117. John B. (ed.): *Animal Cytogenetics*. Vol. 3: Insecta 6. Gebrüder Borntraeger, Berlin-Stuttgart.
- USINGER R.B. 1966: *Monograph of Cimicidae (Hemiptera – Heteroptera)*. Entomological Society of America, Maryland, College Park, XI+585 pp.
- VIERA A., PAGE J., & RUFAS J.S. 2009: *Inverted meiosis: The True Bugs as a Model to Study*, pp.137-156. In: BENAVENTE R. & VOLFF J.-N. (eds): *Genome Dynamics*. Vol. 5. *Meiosis*. Karger, Switzerland, Basel, VI+159 pp.
- VÍTKOVÁ M., KRÁL J., TRAUT W., ZRZAVÝ J. & MAREC F. 2005: The evolutionary origin of insect telomeric repeats, (TTAGG)_n. *Chromosome Research* **13**: 145-156.
- VOLF P. & VOTÝPKA J. 2007: Parazitičtí členovci (lékařská entomologie), pp.232-299. In: VOLF P., HORÁK P. A KOLEKTIV: *Paraziti a jejich biologie*. Triton, Praha/Kroměříž, 318 pp.
- WEEKS E.N.I., LOGAN J.G., GEZAN S.A., WOODCOCK C.M., BIRKETT M.A., PICKETT J.A. & CAMERON M.M. 2010: A bioassay for studying behavioural responses of the common bed bug, *Cimex lectularius* (Hemiptera: Cimicidae) to bed bug-derived volatiles. *Bulletin of Entomological Research* **101** (1): 1-8.
- WEIDNER H. 1958: Die Entstehung der Hausinsekten. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* **42**: 429–447.
- WHITE M.J.D. 1973: *Animal cytology and evolution*. Cambridge University Press, London, VIII+961 pp.
- ZIMA J., MACHOLÁN M., MUNCLINGER P. & PIÁLEK J. 2004: *Genetické metody v zoologii*. Nakladatelství Karolinum, Univerzita Karlova v Praze, 239 pp.