

Biologický korespondenční seminář



Biozvěst

Ročník 9

Série 4

Milé řešitelky, milí řešitelé,

před sebou máte poslední sérii letošního ročníku. Zaměříme se v ní podrobněji na kleptoparazity, hibernaci i problematiku sekvenace DNA a její význam pro moderní taxonomii a fylogenetiku. Praktická úloha Vás tentokrát zavede do přírody za našimi obojživelníky a v poslední dílu letošního smrtelného seriálu se seznámíme blíže s posmrtnými procesy.

Ráda bych Vás za celý tým Biozvěstu pozvala na expedici 9. ročníku, která se uskuteční na skautské základně ve Zlaté Koruně a to v termínu 27. – 31. 5. 2022. Těšit se můžete na poznávání krás české přírody během vycházek po okolí, demonstraci mnoha organismů, menší i větší přednášky a především osobní setkání s ostatními řešiteli a organizátory. Budou zde vyhlášeny též finální výsledky celého letošního ročníku. Expedici budete mít jako odměnu za aktivní řešení Biozvěstu zadarmo. Přihlašování na expedici probíhá pomocí tohoto formuláře <https://forms.gle/bozX6EASw23rAEPG7>.

Kapacita objektu je omezená, a tak s přihlášením neváhejte. Přihlásit se na expedici lze do 17. 4. 2022 do 22:00. Pokud to bude potřeba, budou upřednostněni řešitelé podle jejich bodových výsledků. Potvrzení účasti od nás obdržíte 18. 4. 2022.

Jak řešit

Veškeré pokyny k řešení semináře získáte na [internetové stránce Biozvěstu](#) (nebo zadejte „Biozvěst“ do Google). Na stránce také naleznete přihlášku, kterou vyplíte (pouze v případě, že je tato série vaše první řešení v rámci aktuálního ročníku; **přidat se můžete kdykoli v průběhu roku**). Úlohy vám budeme zasílat automaticky na e-mailovou adresu uvedenou v přihlášce. Pokud budete chtít ukončit odběr novinek o Biozvěstu, napište nám e-mail.

Dále se k nám můžete připojit prostřednictvím [Facebooku](#), [skupina „Biozvěst“](#), kde lze probírat aktuality a diskutovat dle libosti. Nově nás můžete sledovat též na Instagramu (<https://www.instagram.com/biozvest/>).

Vaše řešení nám posílejte na adresu biozvest@gmail.com

Nejpraktičtější formou řešení bude prostý text v e-mailu, ale přijímáme veškeré formáty příloh. Každou úlohu pište do samostatného e-mailu a v předmětu uveďte **Ročník-Série-Úloha-Jméno_Příjmení**, např. **9-4-1-Bioslav_Biomilný** v případě první úlohy čtvrté série aktuálního ročníku. Moc nám pomůže, když uvedený zápis dodržíte (na jeho základě si došla řešení filtrujeme).

Uzávěrka 4. série: 9. 5. 2022 ve 23:59.

Po oficiální uzávěrce necháváme pro opozdilce tzv. „**penalizační týden**“, kdy ještě můžete zasílat svá řešení, budou Vám bodově ohodnocena, ale musíte již počítat s bodovou penalizací. Strhávat se bude 1 bod za každý den v každé úloze, která v tomto období přijde. Maximální ztráta za úlohu je tedy - 7 bodů, pošlete-li úlohu v nejpозdějši možný termín a zároveň minimální počet bodů za řádně řešenou úlohu po penalizaci nebude nikdy nižší než 1 bod. **Penalizační týden končí 16. 5. 2022 ve 23:59, po této době již nelze přimnout žádná řešení.** Další den bude vydáno autorské řešení pro 4. sérii.

Hodnocení Vašich řešení i finální výsledkovou listinu dostanete e-mailem po expedici, kde bude ročník slavnostně vyhlášen a zakončen.

Nelekejte se, když Vám přijdou úlohy na první pohled příliš těžké, ponořte se do informačních zdrojů a uvidíte, že na

vše lze někde nalézt odpověď. Dobré tipy k řešení naleznete také na stránce Biozvěstu v sekci „Návody“. **Není nutné, abyste kompletně vyřešili všechny úlohy a asi se to ani nikomu nepodaří, stačí odeslat libovolně velký fragment. Vždy ale odpovídejte svými slovy;** překopírování textu odjindy je velmi ošemetné. Když už se k němu uchýlíte, vždy uveďte zdroj.

Oceníme, pokud připišete jakékoliv nápady či připomínky (např. úloha byla příliš lehká/těžká, nesrozumitelná, nudná), úlohy se pokusíme tvořit k Vaší maximální spokojenosti.

Veškeré dotazy či připomínky směrujte na adresy biozvest@gmail.com či ell.psenickova@seznam.cz (na druhé adrese máte větší šanci na rychlé zodpovězení otázky), nebo na e-mailové adresy autorů konkrétních úloh. Kontakty naleznete na webu Biozvěstu.

Biodiverzité a řešení Biozvěstu zdar!

za celý kolektiv autorů Biozvěstu

Eliška Pšeničková

Úloha 1: Přelet nad kukaččím hnízdem

Autor: Kateřina Bezányiová

Počet bodů: 25

Parazitovat lze různými způsoby. Když se řekne parazit, většina lidí si vybaví tasemnici ve střevě nebo komára a další krevsající členovce, ti více humanitně zaměřeni si pak možná představí nějakého svého oblíbence z řad *Homo sapiens*. (Komáří a většina podobných trapičů se dnes správně řadí spíše mezi mikropredátory, ale to teď nechme stranou.) Běžný parazit dle učebnicové definice sedí na hostiteli nebo v hostiteli, konzumuje nějakou jeho část a většinou nebývá v jeho zájmu, aby hostitel zemřel, alespoň tedy ne hostitel definitivní, ve kterém se pohlavně rozmnožuje. Některé organismy však neparazitují na organismech jako takových, ale na něčem trochu jiném. Takové organismy označujeme jako kleptoparazity a těm se budeme v této úloze věnovat.

1. Co přesně tedy kleptoparaziti svým hostitelům mohou dělat? Tvoří kleptoparaziti monofyletickou skupinu?
2. Při hledání odpovědí na předchozí otázku jste už jistě narazili na příklady některých kleptoparazitů, možná včetně hyen či pavouků, kteří kradou čerstvě ulovenou kořist jiným druhům. Známý je tento potravní parazitismus u mořských ptáků. Jmenujte alespoň 3 takové ptáky v různých rodech. (Pokud používáte české či slovenské rodové a druhové názvy organismů, nezapomeňte uvést i vědecký název daného organismu. Připomínám, že rodová a druhová jména ve vědeckých názvech se píšou *kurzívou*. Rodové jméno také vždy začíná velkým písmenem, druhové s malým. Nad úrovní rodu se pak tato pravidla mírně liší dle konkrétní nomenklatury. Česká rodová jména naopak velkým písmenem nezačínají.)
3. S kleptoparazitismem se můžeme setkat i na úrovni jednotlivých buněk. Jaké buněčné komponenty jsou obvykle součástí tohoto typu parazitismu a jací živočichové se tohoto parazitismu často účastní (jmenujte ideálně 2 rody i jeden vyšší taxon, do kterého oba tyto rody patří a pro který je tento typ kleptoparazitismu charakteristický)?
4. Kleptoparazitismu z předchozí otázky se věnuje i jeden z nálevníků (Ciliata). O jakého nálevníka jde a co a komu z

buněk krade (a proč)? Na tohoto nálevníka je pak vázán ještě jeden rod protist, který si dané orgány nedokáže z původního hostitele obstarat sám, ale umí je získat právě z tohoto nálevníka. O koho jde?

Nyní postupně přejdeme k jedné specifické skupině kleptoparazitů – konkrétně kleptoparazitickým blanokřídlým a zejména tzv. kukaččím včelám. Název odkazuje ke kukačce obecné (*Cuculus canorus*) a jejímu typickému chování, kdy samice odkládá vejce do hnízd jiných ptáků. Vejce dokonce napodobují vejce hostitele, u kterého se samice vylíhla – to je pravděpodobně zařízeno tak, že barva vajec je kódována geny vázanými na W chromosom, který je přítomen pouze u samic, jež jsou u ptáků heterogametickým pohlavím. Náhodné páření se samci tedy nemá na barvu vajec vliv a samice kukaček tvoří tzv. gentes (kmeny) specializované na určitého hostitele. Přídomek “kukaččí” si tak vysloužili i další organismy, které praktikují podobnou strategii, mimo jiné i jedna paprskoploutvá ryba.

5. Která ryba to je a na kom a jak parazituje?
6. Zdaleka ne všechny kukačky jsou však tímto způsobem kukaččí. Jak to má s péčí o mláďata kukačka ani (*Crotophaga ani*) nebo kukačka kohoutí (*Geococcyx californianus*)?
7. A nyní již ke kukaččím včelám. Jde o ekologickou skupinu, nejde tedy o přirozený (monofyletický) taxon. Ke vzniku kukaččího chování došlo několikrát nezávisle na sobě. Pokuste se vyjmenovat co nejvíce skupin včel, u kterých se tato strategie vyvinula. (Pokud je tato strategie u celého taxonu, tak nemusíte vyjmenovávat jednotlivé rody nebo druhy.) Pokud narazíte na něco, u čeho si nejste jistí, že jde přímo o kukaččí chování, uveďte tuto skupinu také a jen její chování popište.
8. Možná jste při hledání odpovědi na předchozí otázku narazili na debaty o tom, zda pět druhů jedné včely z čeledi, která jinak není parazitická, může být parazitických. Dnes se ví, že kukaččí chování je u tohoto rodu opravdu přítomné. Napovím, že jde o pětici druhů na souostroví, které je známé také evoluční radiací příbuzných jednoho modelového organismu. O jaký rod z jaké čeledi jde, na jakém se vyskytuje souostrovím a kdo je oním modelovým organismem?
9. Pokud by vám někdo ukázal kukačku obecnou (*Cuculus canorus*) a vy byste nevěděli, že jde o tento druh, připadala by vám nejspíše jako obyčejný pták. Někteří z vás by si možná povšimli, že svým zbarvením lehce připomíná krahujce, ale to by bylo všechno. Typickou kukaččí včelou si však s jinou “obyčejnou” včelou nespletete. Popište, jak se morfologicky kukačky odlišují od svých kukaččích příbuzných a proč to tak nejspíše je.
10. Předchozímu se vymyká včela rodu *Osiris* z čeledi včelovitých (Apidae). Jak je na tom morfologicky a s čím si vystačí při parazitování?
11. Nyní se blíže podíváme na dvě vybrané kukaččí včely, které patří mezi ty nejznámější: nomádu (*Nomada*) z čeledi včelovitých (Apidae) a ruděnku (*Sphecodes*) z čeledi ploskočelkovitých (Halictidae). Vyberte si jeden konkrétní druh nomády a jeden druh ruděnky, napište, u koho parazitují, popište, co jim pomáhá proniknout do hnízda hostitele, jak se v hníždě chovají a pokud je to známo, jak se jim hostitel brání.

12. Jako kukaččí včely se někdy označují i parazitičtí čmeláci, v češtině označovaní též jako pačmeláci. Jaká je jejich strategie? K jaké změně jejich rodového jména a proč nedávno došlo?
13. Podobnou strategii jako kukaččí včely aplikuje také skupina blanokřídlých, jež je v některých jazycích, jako je angličtina či francouzština, přezdívaná „kukaččí vosy“. Některé druhy této skupiny jsou parazitoidi, skupina je však známá zejména jako kleptoparazit. O kterém taxonu je řeč?
14. Taxon z předchozí otázky je jednou z bazálnějších skupin žahadlových blanokřídlých (Aculeata). Nicméně žihadla se u nich bát nemusíte, z velké části ho mají redukované. Z čeho se žihadlo u blanokřídlých původně vyvinulo, co tuto strukturu nahradilo u hledaného taxonu z předchozí otázky a jak se tato změna projevuje na vnější morfologii samic?
15. Daný taxon se dělí na více skupin, z nichž se u nás vyskytují dvě. Jedna z nich, zastoupená v ČR jen jedním rodem, zahrnuje výhradně parazity “širopasých” blanokřídlých („Symphyta“, uvozovky označují parafyletický taxon). Druhá skupina zahrnuje kleptoparazity a parazitoidy ostatních žahadlových a na rozdíl od předchozí skupiny je schopná tzv. volvace. O jaké dvě skupiny se jedná a co je to volvace? Napište alespoň 4 další živočichy mimo tuto skupinu, jež volvací provádějí. (Mělo by jít o různé živočichy. Pokud dospějete k názoru, že tento mechanismus využívá zebra, nevypisujte všechny různé zebry.)



Obr. 1: Domestikované kukačky. – <https://www.euronova-shop.cz/kukackove-hodiny-hneda-575064>

Úloha 2: Zimní

Autor: Anna-Marie Buková

Počet bodů: 20

Letos to vypadá, že snad konečně přichází jaro, a tak si spousta našich živočichů může konečně vydechnout. Zima je pro živočichy docela velkou výzvou. Pomineme-li, že se většina z nich musí vypořádat s nedostatkem potravy, je pro ně nutné vyřešit i problém s klesající teplotou a zpomalením metabolismu. V živočišné říši se setkáme se dvěma základními skupinami adaptací na změny v teplotě prostředí. Vývojově starší jsou adaptace na kolísání vlastní tělesné teploty, těmi vývojově pokročilejšími pak adaptace pomocí mechanismů, které kolísání tělesné teploty zabrání. Během fylogeneze docházelo postupně k vývoji aktivní regulace vedoucí k lepší schopnosti udržení homeostázy. Živočichové, u kterých došlo v průběhu evoluce k vytvoření pokročilejších termoregulačních mechanismů, jsou schopni udržovat relativně stálou tělesnou teplotu, naproti tomu pak teplota živočichů, u kterých k vývoji těchto mechanismů nedošlo, do značné míry závisí na teplotě okolí.

1. Jak se nazývají živočichové, kterým teplota těla kolísá? A jak ti, kteří si ji udržují relativně stálou?
2. V souvislosti s tělesnou teplotou se objevují ještě další dva termíny, kterými popisujeme, zda je daný druh schopen si sám generovat teplo, nebo jestli pouze přejímá teplo z okolního prostředí. Které termíny to jsou? A jak byste popsali rozdíl mezi nimi a termíny z otázky 1.? Zkuste vytvořit dvojice, které ve většině případů popisují stejného živočicha. Zároveň zkuste vymyslet, kdy většinová shoda neplatí, a kdy živočich neschopný sám vytvářet teplo udržuje stálou teplotu svého těla.

Teploty okolo bodu mrazu nejsou pro většinu zástupců živočišné říše stavem teplotního optima. Živočichové s nedostatečnou aktivní regulací tělesné teploty pochopitelně snášejí toto období roku hůře než ti, kteří jsou jí schopni. Krátkodobě a při nižším a pozvolném poklesu teploty je možné udržet teplotu i jinými způsoby, při delším trvání nepříznivých podmínek ale jedinec s nedostatečně regulovanou teplotou upadá to tzv. diapauzy, ve které dojde ke zpomalení životních pochodů a poklesu tělesné teploty i metabolismu. Teplota, kterou není daný druh schopen dlouhodobě akceptovat a hyne se nazývá tzv. spodním limitem přežití organismu.

3. Zkuste vymyslet alespoň tři mechanismy pasivní regulace.
4. Jaký byste očekávali rozdíl mezi metabolismem živočicha s vyvinutou aktivní termoregulací a tím, který jí postrádá, při teplotách blízkých se ke spodnímu limitu přežití daného jedince?
5. Jakým způsobem je možné zjistit aktuální hodnotu metabolismu např. myši? Zkuste obecně popsat, jak byste při měření postupovali (stačí myšlenková úvaha). V souvislosti s měřením metabolismu se setkáme s tzv. respiračním koeficientem (RQ), který získáme jako poměr objemů vydýchaného CO_2 a přijatého O_2 . Normální RQ se pohybuje kolem hodnoty 0,82, ale závisí na poměrném zastoupení sacharidů, proteinů a lipidů v potravě. Proč tomu tak je? Zkuste odvodit RQ v případě, kdy dochází k oxidaci glukózy a v případě, kdy je oxidovanou látkou lipid, který vznikl z kyseliny stearové a glycerolu a na jeho vzniku se podíleli 3 molekuly této mastné kyseliny (bude třeba potřebovat vyčíslené rovnice obou reakcí, nezapomeňte je uvést i ve svém řešení).

6. Bude hodnota RQ myši s cukrovkou vyšší, nebo nižší, než u zdravé myši? Vysvětlete proč.

U živočichů se setkáváme se dvěma základními typy termoregulačních mechanismů – s mechanismy fyzikálními, které buď zabraňují tepelným ztrátám, nebo je naopak umožňují, a s mechanismy chemickými, které se uplatňují v případě, kdy je nutné teplo vytvářet.

7. Co byste zařadili mezi fyzikální termoregulační mechanismy a co mezi ty chemické? Uveďte od každého alespoň dva příklady.
8. Chemické termoregulační mechanismy fungují na základě změn v metabolismu. Jak nazýváme hodnotu metabolismu organismu, který se nachází v klidu a ve svém teplotním optimu? A jak označujeme hodnotu metabolismu, při které už živočich není dále schopen pokrýt svou tepelnou ztrátu? Poměrem obou hodnot získáme tzv. metabolický kvocient. Zkuste odhadnout, jaký tento poměr řádově bude.
9. Mezi chemické termoregulační mechanismy patří třesová a netřesová termogeneze. Z čeho vzniká teplo v případě třesové termogeneze?
10. Netřesová termogeneze je většinou primárním způsobem vytváření tepla v organismu. Jaký hormon se při jejím zahájení uplatňuje?
11. Jednou ze tkání, ve které dochází k netřesové termogenezi je tzv. hnědý tuk. U jakých živočichů byste ho hledali? Jaký protein se nachází na membránách mitochondrií buněk hnědé tukové tkáně? A jakým mechanismem působí?

Za vysoký stupeň adaptability je považována tzv. hibernace. Hibernující živočichové jsou schopni za nízkých teplot snížit svoji jinak stálou tělesnou teplotu za současného udržení homeostázy. Dochází při ní nejen ke snížení teploty těla, ale i k výraznému zpomalení metabolismu, poklesu srdeční frekvence a zpomalení dýchání. Naproti tomu u tzv. nepravé hibernace živočichovi sice klesne tělesná teplota a zpomalí se některé fyziologické funkce, ale hodnota metabolismu se výrazněji nemění.

12. Kterí zástupci středoevropské fauny patří mezi pravé hibernanty a kteří mezi nepravé? Uveďte od každého alespoň dva příklady.
13. Co může být výhodou nepravé hibernace proti té klasické? A co naopak může být nevýhodou?
14. Letošní únor byl mimořádně teplý. Bude to mít vliv na naše hibernanty, nebo i teplejší zimu v klidu zaspi? A co se může stát, pokud by po teplejší zimě znovu začalo mrznout? Diskutujte tuto možnost pro pravou i nepravou hibernaci.
15. Seřadte následující živočichy podle toho, jak moc jsou ohroženi mírnou zimou s následným výrazným ochlazením. Živočichy řaďte podle klesajícího rizika. Vysvětlete, jak jste ke svým závěrům došli.
jezevec – ježek – svišť – veverka

Úloha 3: Sekvence DNA a její význam pro moderní taxonomii a fylogenetiku

Autor: Albert František Damaška

Počet bodů: 25

K poznání světa byla vždy velmi významná znalost organismů, které ho obývají. Abychom mohli organismy zkou-

mat a přemýšlet o nich v kontextu, je třeba vědět, které vlastně existují – a tušit, jaké jsou mezi nimi příbuzenské vztahy. Druhý fenomén, tedy příbuzenské vztahy mezi jednotlivými druhy a vyššími systematickými skupinami organismů, zkoumá **fylogenetika**, a jako taková mohla vzniknout až v druhé polovině 19. století. Právě tehdy totiž první myslitelé (v čele s Charlesem Darwinem a Russellem Wallacem) přišli s myšlenkou, že všechny organismy na světě pochází z jednoho společného předka, a jsou si tedy všechny nějak příbuzné. Naopak popis organismů a jejich pojmenování, tedy **taxonomie**, je disciplínou daleko starší. V současné podobě existuje už od poloviny 18. století, kdy švédský botanik Carl Linné vymyslel přehledný způsob rozřazení druhů organismů do taxonomických kategorií (druh, rod, čeleď, řád, třída, kmen a podobně) a pro každý druh pak zavedl jednoduché označení pomocí dvou jmen, kdy jedno je vlastní rodu (vyšší systematické jednotce než druh), do kterého organismus náleží, zatímco druh je v rámci daného rodu vlastní pouze příslušnému druhu.

1. I před Linnéem měly samozřejmě organismy svá jména, přestože v jejich pojmenování byl značný nepořádek. Pojmenování živých jsoucenců je totiž potřeba nejen pro vědce, kteří je studují, ale do značné míry i pro všechny ostatní lidi. Pojmenování organismů mohli vnímat lidé jako součást lidského poslání už dávno před naším letopočtem. Pokuste se ve vám dobře známých literárních pramenech najít co nejstarší text, který vyzývá lidi k pojmenování a klasifikaci organismů.

Poté, co se do světa výzkumu biodiverzity vkradly myšlenky evoluční biologie, začali systematictí biologové pátrat po tom, jak jsou si organismy příbuzné. Cílem jejich snažení postupně začalo být vysvětlení jejich evoluce, nalezení jejich předků ve fosilním záznamu, i vysvětlení, jak se vyvíjely určité znaky. V současné době se snažíme, aby systematické kategorie, do kterých organismy zařazujeme, odpovídaly jejich příbuznosti a odrážely jejich evoluční původ – proto se snažíme jména přiřazovat pouze celým evolučním liniím, které obsahují hypotetického společného předka a všechny jeho potomky. Takovým skupinám říkáme **monofyletické** a pátrání po tom, co do které z nich patří, je důvodem toho, proč v poslední době došlo k tolika změnám v systematice organismů. Současní vědci mají totiž vzhledem k technologickému pokroku posledních let při výzkumu organismů k dispozici nástroje, o kterých se předchozím generacím ani nesnilo. Při zkoumání evolučního původu druhů mohou čerpat data nejen z morfologie (jak organismy vypadají), ale i z genomu (tedy přímo ze sekvencí DNA).

2. Přestože sekvenace DNA není pro systematiku organismů nikterak všespásná, a bylo by chybou úplně zapomenout na morfologii, mají genetické znaky oproti morfologickým několik značných výhod. Jmenujte alespoň dvě výhody molekulárních znaků oproti morfologickým a svůj názor vysvětlete.

Genetické metody v systematické biologii umožňují v současnosti nejen fylogenetickou analýzu, ale používají se i pro identifikaci druhů. K tomu slouží tzv. **DNA barcoding**. Při něm se ze zkoumaného organismu sekvenuje vždy jeden konkrétní lokus (úsek genetické informace), a následně je srovnán se sekvencemi stejného lokusu od známých organismů v genetických databázích. Tímto způsobem můžeme zjistit nejen to, zda je náš organismus novým, dosud neznámým

druhem, ale také například, z kterého organismu pochází vzorek tkáně, který jsme odebrali.

3. Jaké lokusy se obvykle používají pro DNA barcoding u živočichů, a jaké u rostlin? Zjistěte nejen, o které konkrétní geny se jedná, ale uveďte také, zda se jedná o geny jaderné, mitochondriální či plastidové.

Práci s genetickými databázemi, která je denním chlebem molekulárního systematika, si můžete velmi snadno vyzkoušet sami, protože veškerá genetická data, která jsou publikována v odborných časopisech, musí být do těchto databází zařazena. Mezi významné databáze barcodingových dat tak patří například evropská databáze BOLD (<https://www.bold-systems.org/index.php>) nebo americká databáze GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), která je rozsáhlejší, a na rozdíl od BOLDu slouží k uchování všech, tedy nejen barcodingových genetických dat. Vyhledávání v databázi není těžké – chcete-li získat sekvenci barcodu nějakého organismu, stačí napsat do vyhledávacího pole v záhlaví GenBanku latinský název organismu a klíčové slovo „barcode“ – a získáme výsledky. Pokud jsme naopak již získali sekvenci neznámého původu a chceme ji srovnat s daty v databázi, použijeme k tomu nástroj, který se nazývá BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Protože GenBank je rozsáhlá databáze a obsahuje i data o sekvencích proteinů, musíme nejprve zvolit možnost Nucleotide BLAST. Následně se nám objeví následující screen:

Obr. 2: Webové rozhraní NCBI Blast.

„Zlaté bioinformatické pravidlo“ nám říká, že ať už použijeme jakýkoli webový nástroj, do největšího pole se vkládá sekvence. Proto právě do něj vložíme znění naší neznámé sekvence, případně ho načteme jako soubor ve formátu FASTA (viz dále). Pak už stačí jen vydat se do terénu, získat vzorky, sekvenovat DNA a následně bádát – podobně, jako to udělal Bioslav.

Ihned poté, co byly otevřeny zahrádky restaurací, opustil Bioslav po karanténě laboratoř a vydal se do města poohlédnout se po svačině. Pojednou ho u jednoho z okének

překvapila vcelku nezvyklá chuť párků. Nenápadně odebral do připravené lahvičky s čistým ethanolem vzorek a po návratu do laboratoře z něj extrahoval DNA. Následně provedl dvě PCR, přičemž jednou použil primery pro barcoding živočišné a jednou pro barcoding rostlinné DNA. Obě reakce PCR byly úspěšné a na jejich konci se Bioslavovi podařilo amplifikovat úseky DNA potřebné pro barcoding. Oba vzorky proto poslal do sekvenační laboratoře a získal následující sekvence.

```
>BiomilnyB_seq1.fasta
AGTGTGGGGTTCAAAGCTGGTGTAAAGATTATAAAATTGAC
TTATTATACTCCTGACTATGAAACCAAAGATACTGATATCT
TGGCAGCATTCCGAGTAACTCCTCAACCAGGAGTTCCGCCT
GAAGAAGCAGGTGCCGCGGTAGCCGCCGAATCTTCTACTGG
TACATGGACAACCTGTGTGGACCGATGGGCTTACCAGTCTTG
ATCGTTACAAAGGGCGATGCTACGGCCTTGAACCTGTTGCT
GGGGAAGAAAATCAATATATTGCTTATGTAGCTTATCCCTT
AGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTT
CCATTGTCGGTAATGTATTTGGGTTCAAGGCCCTGCGTGCT
CTACGTCTGGAGGATTTGCGAATCCCTACTGCTTATATTTAA
AACTTTCCAAGGTCCGCCTCATGGCATCCAAGTTGAGAGAG
ATAAATTGAACAAGTATGGTTCGCCCTATTAGGATGTACT
ATTAACCTAAATTGGGGTTATCCGCTAAGAATTATGGTAG
AGCTGTTTATGAATGTCTT
```

```
>BiomilnyB_seq2.fasta
ACCCNNNNNTACTATTTGGAGCCTGAGCGGGAATAGTAGG
CACCGCACTAAGTATTTAATTCGAGCAGAATTAGGTC AAC
CAGGTGCACTTTTAGGAGATGACCAAAATTTACAATGTTATC
GTAAGTCCCATGCTTTTGTATATAATTTTCTTCATAGTAAT
ACCAATAATAATTGGAGGCTTTGGAAACTGACTTGTCCCAC
TAATAATTGGAGCCCCAGATATAGCATTCCCACGAATAAAT
AATATAAGTTTTGACTTCTACCACCATCATTTCTCCTTCT
CCTAGCATCATCAATAGTAGAAGCAGGAGCAGGAACAGGAT
GAACAGTCTACCCACCTCTAGCCGAAATCTAGCCCATGCA
GGAGCATCAGTAGACCTAACAATTTTCTCCCTTCATTTAGC
TGGGGTGTCGTCTATTTTAGGTGCAATTAATTTTATTACCA
CCATTATCAACATGAAACCCCCAGCCATAACACAATATCAA
ACTCCACTATTTGTCTGATCCGTAATTTTACAGCCGTGCT
ACTCCTATTACTACTACCAGTACTAGCCGAGGCATTACTA
TACTACTAACAGACCGCAACCTAAACACAACCTTTCTTTGAC
CCCCTGGAGGAGGAGACCCAATTTCTTACCAACACCTATT
C
```

- Proč Bioslav nepoužil k PCR rovnou kousek párků? Vysvětlete, v čem je lepší DNA izolovat ze vzorku přímo namísto použití kousku materiálu (přestože i to může fungovat).
- Jakým způsobem zjistil Bioslav, že PCR proběhla úspěšně a podařilo se amplifikovat produkt? Jakou metodu sekvenace DNA použili v sekvenační laboratoři pro zpracování vzorků, které Bioslav poslal? Stručně vysvětlete, jak obě metody fungují.
- Hned na začátku druhé sekvence vypadá na první pohled několik pozic zvláště – místo písmen označujících baze DNA zde máme několikrát písmeno N. Co to znamená?

Sekvence, které zde vidíte, jsou předloženy ve formátu FASTA. Jedná se o nejjednodušší formát elektronického uložení sekvenčních dat. FASTA je jednoduchý textový soubor s textem sekvence, kde každá sekvence je vždy opatřena prvním řádkem s hlavičkou. Hlavička začíná symbolem >, za

kterým je uveden název sekvence. Žádné jiné informace, než hlavičku a samotný text sekvence, soubor FASTA nenabízí.

- Pomocí nástroje BLAST vyhledejte v databázi GenBank, z jakých organismů byl vyroben párek, jehož neobvyklá chuť přiměla Bioslava k analýze DNA.

Na předchozí krátké úloze jste si vyzkoušeli, jak může vypadat jednoduchá taxonomická práce s genetickými daty. V praxi je ale samozřejmě využití molekulárních dat v systematické organismů mnohem složitější a širší možnosti, kde nám mohou pomoci, je mnohem větší. Na základě genetických dat můžeme například, jak jsme již naznali výše, provést fylogenetickou analýzu. V takovém případě použijeme jednotlivé pozice v genomu jako znaky, a na základě toho, jak se od sebe v sadě genetických znaků organismy liší, se následně pomocí sofistikovaných analýz pokusíme odvodit jejich evoluční historii.

- Abychom mohli vůbec sekvence srovnávat, je nutné nejprve ze všech sekvencí, které máme pro analýzu k dispozici, provést tzv. **alignment**. Zjistíte, co to je, a proč je to tak nesmírně důležité. U kterých úseků DNA bude nejspíš alignment jednoduchý, a u kterých naopak složitý?

Ani poté, co jsme provedli alignment, ale nemáme vyhráno. Pokud z našich genetických dat chceme zjistit fylogenezi organismů, ze kterých jsme je získali, čeká nás ještě dlouhá cesta, vždy navíc s nejistým cílem. Nejprve musíme mít důvod myslet si, že geny, které jsme pro analýzu vybrali, **ponesou fylogenetický signál**, tedy, že jejich analýzou skutečně můžeme fylogenezi zjistit. Dále je třeba pro analýzu zvolit vhodnou metodu. Ani u těch nejlepších dat totiž ke kvalitním výsledkům zpravidla nepovede prosté srovnání toho, jak jsou si jednotlivé sekvence podobné. Na některých pozicích totiž mohlo dojít k více záměnám (substitucím – tedy mutacím, při kterých se jedna báze změní v jinou). My však vidíme jen stav po poslední z těchto záměn – přestože se nám tedy zdá, že došlo k jedné (či žádné) záměně, ve skutečnosti může daná pozice mít za sebou bouřlivou evoluci.

- Popište, jaké vlastnosti by například měl mít gen, který ponese fylogenetický signál. Při rozhodování pomněte veličiny, jako je mutační rychlost, samotný vzhled sekvence (z jakých je bází) či třeba selekční tlak, pod kterým gen je.
- Vzhledem ke struktuře a funkci DNA nejsou všechny záměny stejně pravděpodobné – k některým dochází zkrátka mnohem snáze a častěji, než k jiným. Před sebou vidíte alignment dvou sekvencí, ve kterém je vyznačeno několik záměn, ke kterým během evoluce obou organismů došlo. Sekvence jsou protein-kodující, první pozice v alignmentu je zároveň první pozicí v kodonu. Seřadte záměny od nejpravděpodobnější po nejméně pravděpodobnou a své rozhodnutí vysvětlete. Při rozhodování nezapomeňte použít tabulku genetického kódu.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
A	C	C	G	T	A	G	T	C	T	T	G	A	G	G
A	C	T	G	T	T	C	T	C	T	A	G	A	G	C

Metody, kterými se pokoušíme dopátrat se fylogenetických stromů, jsou často velmi složité a jejich vysvětlení je rozhodně nad rámec této úlohy. Podívejme se tu však alespoň na některé problémy, se kterými se molekulární fylogenetik při své práci potýká. Jeden z nich jsme si zde již představili – jde o nesprávný výběr genů pro analýzu, přesněji výběr genů

s nedostatečným fylogenetickým signálem. V současné době překotného technického rozvoje se tak stává stále jednodušším tento problém částečně obejít použitím extrémně velkého množství genů, případně rovnou celých genomů. Takové analýze pak říkáme **fylogenomika**. Problémem v analýze ale může být i nedostatečný či nevhodný sampling, tedy výběr druhů, které jsme do analýzy zařadili. Když už pak fylogenetický strom konečně získáme, je vždy **nezakořeněný**, to znamená, že v něm nevidíme, jakým směrem se evoluce ubírala. Proto jej musíme zakořenit, a to tak, že do analýzy zahrneme také genetická data z organismů, které nepatří do skupiny, kterou zkoumáme. Linie, které nepatří do naší zkoumané skupiny, ale vně, pak označíme jako **outgroup** a místo, kde je outgroup umístěn ve fylogenetickém stromě, pak budeme považovat za jeho kořen.

11. Sekvence celých genomů probíhá výrazně jiným způsobem než sekvence jednotlivých lokusů DNA. Jmenujte 2 z metod sekvenace DNA, které se v současnosti používají k sekvenaci celých genomů. Která z těch, které jste jmenovali, je v současnosti nejlépejší?
12. Pokud zkoumáme fylogenezi skupiny s malým počtem druhů (jako jsou například medvědi), je nejlepší sampling takový, kdy do analýzy zahrneme data ze všech známých druhů. Pokud však zkoumáme skupinu komplikovanější, s větším až obřím počtem druhů (jako jsou například mandelinkovití brouci, motýli, cévnaté rostliny či eukaryota) zařadit všechny známé druhy je nejen technicky nemožné, ale mohlo by to do analýzy dokonce vnést šum. Představte si, že jste od školitele dostali za úkol ve své diplomové práci rámcově zjistit fylogenezi tesaříkovitých brouků (Cerambycidae). Klasická systematika této skupiny je velmi dobře zpracována a na základě dostupných informací se zdá, že všechny hlavní skupiny tesaříků by mohly být monofyletické. Protože jste ale dostali za úkol provést analýzu fylogeneze na základě sekvencí celých genomů (což je velmi drahé) a máte jen omezený rozpočet, můžete do své analýzy zařadit jen 10 druhů. Pokuste se navrhnout, které druhy tesaříků do analýzy zařadíte. Nebojte se, pokud neznáte systematiku tesaříků – její přehled najdete například zde <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id10991/>. Vysvětlete, proč jste zvolili právě ty druhy, které jste zvolili.
13. Bioslav získal v letošním roce mnoho výzkumných grantů, ale nemožnost během koronavirové krize vycestovat do tropů způsobila, že bude mít problém rozpočet utratit. Jelikož neutracený rozpočet vadí grantové agentuře mnohem více než rozpočet utracený na něco jiného než původní výzkumný cíl, rozhodl se Bioslav v rámci karantenní prokrastinace zjistit fylogenezi pásnic (Nemertea), jejichž vzorky měl ze svých zámořských cest již dlouho v mrazáku. Když Bioslav z pásnic získal potřebná genetická data, začal se rozhodovat, jakými outgroupy skupinu zakořenit. V nabídce měl genetická data z následujících organismů: háďátka (*Caenorhabditis elegans*), hlemýžď zahradní (*Helix pomatia*), lípa srdčitá (*Tilia cordata*), bakterie *Escherichia coli*, žížala obecná (*Lumbricus terrestris*), mandelinka bramborová (*Leptinotarsa decemlineata*), člověk (*Homo sapiens*), koronavirus SARS-CoV-2, treпка velká (*Paramecium caudatum*). Z těchto organismů si vybral dva. Které z nabízených organismů si Bioslav pro zakořenění fylogeneze pásnic zvolil a proč

jsou ostatní organismy nevhodné? Co by se mohlo stát, kdyby Bioslav zvolil pro zakořenění své fylogeneze některý z nich?

V předchozích úkolech jsme si ukázali některá úskalí molekulární fylogenetiky a mnohé možnosti, které nám přináší. Řadu dalších problémů, se kterými se molekulární fylogeneze potýká, tu již prostudovat nestihneme – je to nad rámec této úlohy. Zároveň z této úlohy vidíte, že cesta za vysvětlením evoluce organismů není nikdy u konce, protože jsme zatím velmi daleko od toho, abychom získali všechna dostupná data od všech organismů. Ani pak ale hotovi nebudeme – i možnosti současných analýz jsou jen omezené a fylogenezi některých skupin organismů možná nedokážeme řádně rozklíčovat nikdy.

14. Najděte a vysvětlete nějaký evoluční fenomén, který v historii nějaké linie mohl vést k tomu, že molekulární systematika nepovede k plnému rozřešení fylogeneze.

Úloha 4 (experimentální): Tam za vodou v rákosí

Autor: Tereza Štochlová

Počet bodů: 20

Nedílnou součástí biologické práce je i pobyt v terénu. Všechny ty zajímavé druhy a biologické procesy se totiž vyskytují tam venku, v přírodě. Je tedy na čase obléknout terénní oblečení a zamazat se od bláta. Doslova, protože v této úloze se zaměříme na obojživelníky. Na jejich příkladu si ukážeme, jak může vypadat práce terénního biologa, ekologa nebo ochránce přírody při mapování zájmových druhů, a ukážeme si některé užitečné nástroje, které se při záznamech rozšíření druhů používají.

V České republice se v současnosti vyskytuje 21 druhů obojživelníků. To se může zdát jako málo, přesto však obojživelníci mají velký ekologický význam. Jsou dobrými bioindikátory, zároveň mají také velký význam pro člověka.

1. Proč? Uveďte jeden důvod, proč jsou obojživelníci vhodnými bioindikátory, a jeden způsob, kterým jsou prospěšní člověku.

I přesto, že jich není mnoho, je složité od sebe některé druhy poznat – a to zejména takové druhy, které se mezi sebou kříží. Jde především o zelené druhy skokanů (rod *Pelophylax*) s úzkou vazbou na vodu i v dospělosti – skokana zeleného (*P. esculentus*), skokana skřehotavého (*P. ridibundus*) a skokana krátkonohého (*P. lessonae*).

2. Jak konkrétně se mezi sebou výše zmíněné druhy skokanů kříží? Které z nich jsou rodičovské druhy? Jak je možné, že se populace vzniknuvšího hybridu jsou schopny udržovat i při zpětném zkřížení s rodičovským druhem (nápořád: souvisí s gametogenezí)?

Většina druhů se však dá určit poměrně dobře, existuje několik určovacích klíčů, jejichž přehled naleznete např. zde: <https://obojzivelnici.wbs.cz/Urcovani.html>. Jednotlivé druhy se také dají určit podle tvaru snůšek: <https://obojzivelnici.wbs.cz/Klic-snusek-obojzivelniku.html>, žáby se pak dají dobře rozlišit na základě hlasu: https://www.agrinostra.cz/Hlasy-zab---poznejte_-kdo-kunka.html.

Druh	Autor	Datum	Lokalita	Souřadnice	Počet	Stádium	Metoda
kuňka obecná (<i>Bombina bombina</i>)	T. Štochlová	10.5.2022	EVL Rokycany – vojenské cvičiště	N 49.725806° E 13.582472°	8	jedinci	pozorování
skokan sp. (<i>Pelophylax</i> spp.)	T. Štochlová	12.5.2022	rybník Labutinka, Osek	N 49.780278° E 13.58825°	10 + 5	jedinci + snůšky	poslech + pozorování

Tabulka 1: Příklad vyplněné tabulky pozorování. Pokud nebudete schopni určit druh, vyplňte alespoň rod, tak jako je zde u druhého pozorování. Pokud nebudete schopni určit přesný počet jedinců, zapíšte alespoň odhad. Sloupec se souřadnicemi je nepovinný – přesná poloha je důležitá, ale budete ji již zanášet do aplikace BioLog.

POZOR, některé starší klíče k porovnávání některých druhů mezi sebou doporučují porovnávat délku zadní končetiny. Nejen, že je tato metoda nespolehlivá, ale při neopatrné manipulaci můžeme takto daného jedince i poranit! Většina našich obojživelníků je navíc zvláště chráněná zákonem, k manipulaci s nimi je tedy potřeba výjimka ze zákona. Na jedince tedy bez této výjimky nesaháme – a pokud je to nutné (např. z důvodu přenosu do bezpečí), tak vždy pouze rukou navlhčenou vodou! Tak zabráníme poranění kůže, která je u obojživelníků velmi citlivá.

Při určování konkrétních druhů (nejen obojživelníků) v terénu je také dobré myslet i na jejich geografické rozšíření. Je tedy například nesmysl zamýšlet se nad tím, zda jsme právě neviděli čolka karpatského, pokud se nacházíme v západních Čechách. Pro naši představu můžeme rozšíření jednotlivých druhů nalézt v Nálezové databázi ochrany přírody (NDOP, <https://portal.nature.cz/kartydruhu/>).

3. Který z našich druhů obojživelníků tráví v dospělosti celý rok na souši a do vody pouze klade?

Obojživelníci z naší krajiny v posledních desetiletích hojně ubývají. Jedním z důvodů ohrožení jsou i překážky v migraci. V době, kdy se obojživelníci hromadně přesouvají na místa rozmnožování, jich mnoho skončí pod koly aut v místech, kde silnice protínají jejich migrační trasy. Ve snaze tento dopad zmírnit se proto na pro obojživelníky nebezpečných úsecích staví buď trvalé podchody, nebo dočasné bariéry a obojživelníci se pak na druhou stranu silnice přenáší. Prosím, pokud víte o nějakém takovém úseku silnice, nahlaste ho nejlépe Českému svazu ochránců přírody prostřednictvím formuláře zde: http://www.csop.cz/index.php?cis_menu=1&m1_id=1002&m2_id=1026&m3_id=m3_id&m4_id=1115&m_id_old=1026.

4. Jaké další vlivy ohrožují obojživelníky? Uveďte dva.

K tomu, abychom mohli určit, kde všude jsou zájmové druhy rozšířeny, slouží mapování. Mapování bývá většinou krátkodobější a jde spíše o jednorázová pozorování. Naproti tomu více do hloubky jde monitoring, při kterém se dané druhy sledují dlouhodobě, lokality jsou navštěvovány opakovaně a důraz je kladen i na početnost jednotlivých populací.

5. K čemu jsou data získaná mapováním a monitoringem vhodná? Zamyslete se a napište jeden praktický výstup toho, k čemu tato data mohou být využita.

A jak takové mapování obojživelníků vlastně probíhá? Můžeme použít buď invazivní, nebo neinvazivní metody sledování. Při invazivních metodách jsou jedinci přímo odchytáváni, naopak při použití neinvazivních metod jsou jedinci ponecháni v klidu a mapovatelé fungují pouze jako nerušiví pozorovatelé. Neinvazivní metody jsou méně přesné, zato ale během nich nedochází k narušení života jedinců zájmových druhů.

Hlavní neinvazivní metodou mapování je vizuální sledování. Jednou z možností je na navštívené lokalitě spočítat všechny snůšky od jednoho druhu, které vidíme při procházení podél břehu. Jedna snůška přitom s jistotou znamená jednu samici od daného druhu. Pro sledování dospělců je také možné jít podél břehu a zaznamenávat všechny viditelné jedince. U vodních druhů skokanů pak lze za teplého počasí jít podél břehu a počítat, kolikrát vidíme jedince skočit do vody, případně slyšíme šplouchnutí.

Tím už se dostáváme k mapování pomocí sluchu, které můžeme použít u většiny druhů žab. Při této metodě znovu obcházíme kolem břehu, ale tak, že uděláme cca 5 min. zastávku pro poslech, pak poodejdeme dostatečně daleko, abychom neslyšeli stejné jedince, znovu uděláme zastávku, a takto pokračujeme dál. Největší úspěch s touto metodou budeme mít při návštěvě lokality během večera. Většinou však takto není možné určit přesný počet jedinců, získáme spíše odhad počtu vokalizujících samců. Tato metoda lze samozřejmě použít pouze v období páření, kdy se samci takto projevují.

Poněkud náročnější metodou je pak tvorba úkrytů, které na lokalitu umístíme alespoň 24 hodin předem. Může jít o úkryty na vodě i na souši, a mohou to být například dřevěné desky, gumové matrace apod. Po odkrytí úkrytu zaznamenáme všechny druhy, které se zde nashromáždily. V úkrytech nesmí být žádné malé otvory, ve kterých by obojživelníci mohli uvíznout. Po provedení mapování je nutné všechny umělé úkryty z lokality odstranit.

Invazivní metody pak zahrnují prolovování lokality sítkou nebo podběrákem, volný sběr do ruky a tvorbu padacích pastí a různých zábran. Vzhledem k výše zmíněné potřebě výjimky ze zákona budeme pro potřeby této úlohy používat pouze neinvazivní metody mapování.

6. Ne všechny druhy obojživelníků však lze bezpečně určit pouze neinvazivními metodami mapování (ať už pozorováním, nebo po hlase). U které skupiny obojživelníků je potřeba s živočichy blíže manipulovat, aby bylo možné jednoznačně určit druh?

7. Co je nutné při mapování dodržet, abychom mezi sebou mohli navštívené lokality porovnávat z hlediska početnosti místních populací jednotlivých druhů? Uveďte alespoň dvě takové zásady.

8. Nyní tedy již k praktickému aspektu této úlohy. Navštivte pět mokřadních lokalit ve vašem okolí (např. tůň, rybníky), na kterých se vyskytují obojživelníci, a zaznamenejte, jaké druhy obojživelníků a v jaké početnosti jste zde pozorovali. Všechna pozorování zanepte do aplikace BioLog (<https://biolog.nature.cz/biolog/cz/>), spravovanou Agenturou ochrany přírody a krajiny ČR. Aplikace bohužel není dostupná pro iOS, ale pozorování jdou vložit i zpětně přes počítač. Jako výsledek odevzdejte standardní laboratorní protokol, který bude obsahovat hlavičku (ná-

zev úlohy, vaše jméno, datum vypracování protokolu), teoretický úvod (tedy krátké shrnutí povídání z této úlohy), pomůcky, postup práce (stačí velmi stručně, v bodech), samotné vypracování (tedy odpovědi na teoretické otázky a zpracování praktické části úlohy, viz dále) a závěr (stručné shrnutí výsledků).

Vypracování praktické části úlohy bude obsahovat:

1) tabulku, ve které bude uvedeno místo a datum nálezu, druh (případně alespoň rod), stádium a počet jedinců/snůšek (případně odhad), metoda (pozorování/poslech), autor – viz Tabulka 1, případně můžete doplnit i další relevantní informace, např. počasí, denní dobu;

2) fotodokumentaci – z každého navštíveného místa alespoň jednu fotografii, buď přímo daných jedinců obojživelníků, pokud se nepodaří, tak alespoň fotografii dané lokality, všechny fotografie budou řádně označené (co je na fotografii, kde bylo foceno, autor);

3) mapu se zanesenými body pozorování – screenshot z aplikace BioLog, nebo můžete také využít schopnosti nabytých v úloze 8-2-4 a pozorování zanést do QGISu, případně použít Moje mapy na Google nebo mapy.cz.

9. Určitě narazíte i na nějakou lokalitu, kde žádné obojživelníky nenaleznete. Zamyslete se nad možnými důvody, proč místo pro obojživelníky není vhodné, a krátce to v odpovědi vysvětlíte. V případě, že jste objevili pouze lokality, kde se obojživelníci vyskytovali, zamyslete se obecně nad tím, proč mohou být některé vodní plochy pro obojživelníky nevhodné.

10. To, že nalezneme jedince obojživelníků v nějakém vodním tělese ještě nutně neznamená, že je tato lokalita pro obojživelníky vhodná. Kdy můžeme mluvit o tom, že se zde obojživelníků dobře daří – respektive, jak to můžeme potvrdit?

11. To, že jste některé druhy na vámi navštívených lokalitách nezastihli, ještě nemusí znamenat, že se zde vůbec nevyskytují. Je pravděpodobné, že některé druhy pouze unikly vašemu pozorování. Uveďte dva nedostatky této praktické úlohy, které to mohly zapříčinit.

Úloha 5 (seriálová): Smrt člověka

Autor: Kristýna Minářová

Počet bodů: 21

Smrt člověka fascinovala od nepaměti. Jednak proto, že čeká každého bez rozdílu, jednak proto, že nikdo neví, co bude potom, až se dostane „na druhý břeh“. A proto si různé kultury napříč věky vymýšlely různé scénáře, které mohly duši po smrti potkat, ať už se jedná o vikingskou Valhalu, egyptskou zemi mrtvých či křesťanské nebe. Nicméně i procesy, které se dějí s tělem po smrti, vyvolávaly v lidské mysli odjakživa značné znepokojení a zároveň fascinaci. Již od pravěku bylo známo, že se tělo po smrti do značné míry mění a to do ne zrovna pěkné podoby. To vedlo k vytvoření neméně zajímavých historek o upírech, zombiích, čarodějnicích a vlkodlacích. Autor této úlohy samozřejmě netuší, kam se odebere dušička zemřelého člověka, ale pokusí se objasnit alespoň to, jaké procesy se dějí s tělem poté, co dojde k tzv. reverzibilní smrti.

Schopnost určení přesné doby smrti trápila lidi odedávna. Zatímco narození je poměrně jasně dané, se smrtí to bylo vždy

mnohem komplikovanější. Dle tradiční definice je smrt reverzibilní zástava dechu a srdeční činnosti. Tato definice stačila po celá staletí. Situace se změnila s rozvojem intenzivní a především transplantační medicíny, kde vznikla akutní potřeba vitálních orgánů z již mrtvého těla. Proto začala být smrt definována smrtí mozku. Po smrti dochází totiž ještě k tzv. supravitálním reakcím, tedy situaci, při které je celý organismus mrtvý- nastala u něj smrt mozku, ale zároveň jsou některé buňky ještě živé. V běžné klinické praxi se ovšem k diagnostice smrti stále využívá průkazu zástavy srdce a dechu. Toto může být v některých specifických situacích poměrně obtížně hodnotitelné a nastává tzv. zdánlivá smrt. Při té je srdeční a dechová aktivita sice zachována, ale je tak slabá, že může být obtížně rozeznatelná. Umírání je totiž různě dlouhý proces, odborně nazývaný agonií. U některých lidí nastává smrt rychle, a poté je diagnosa smrti poměrně jednoduchá. Někdy ovšem dochází k, několik hodin trvajícím, procesu, při kterém se postupně zpomaluje srdeční tep, zpomaluje se dýchání, někdy dochází v rámci centralizace oběhu ke chladnutí končetin, občas i trupu. V takovém případě je diagnosa smrti náročnější.



Obr. 3: Centralizace oběhu s rozvojem nafialovělých skvrn imitující posmrtné skvrny při refrakterním septickém šoku. Foto z archivu autora.

Pro rozeznání smrti se určují tzv. jisté a nejisté známky smrti. Mezi nejisté známky smrti patří bledost kůže, nevybavnost reflexů, pokles tělesné teploty, zvláště na končetinách, nerozpoznatelné dýchání, nehmatný puls a neslyšitelná srdeční činnost. Dokonce ani při kombinaci všech nejistých známek smrti současně nelze jednoznačně stanovit smrt, zvláště nastaly-li před srdeční zástavou z jiných příčin. Pokud není smrt jistá, je nutné bezodkladně zahájit kardiopulmonální resuscitaci.

Mezi jisté známky smrti patří posmrtné skvrny, posmrtná ztuhlost a hnilobné změny. Samozřejmě, existují i nápadnější změny, které opravňují diagnostikovat smrt- traumatické oddělení hlavy od těla, oddělení trupu od zbytku těla nebo chybění části hrudníku. Posmrtné skvrny vznikají tak, že se v kapilárách začne hromadit krev a hypostasou klesá ve směru gravitace. Zároveň nevznikají v místech otlaku. Začínají vznikat asi 20-45 minut po smrti, zcela vyjádřené jsou za 6 hodin. Jejich vzhled závisí na okolnostech smrti. Jejich barva je obvykle fialová, v případě různých otrav může mít červenou nebo šedo zelenou barvu. Velikost a rozsah skvrn závisí na množství krve, která je v oběhu. Ve vzácných případech, které jsou na jednotkách intenzivní péče ovšem poměrně časté, dochází k výskytu nafialovělých skvrn ještě před

smrti. Posmrtné skvrny lze zpočátku velmi snadno vymizet tlakem, ale jak čas od smrti plyne, krev se zahušťuje a vytlačení skvrn je stále obtížnější. Po 10-12 hodinách od smrti lze skvrny vytlačit pouze velkým tlakem a po 2-3 dnech již vytlačení není možné, protože hemolýza, tedy rozklad krve, dospěla do takové fáze, při které hemoglobin difunduje do okolních tkání. Tohoto jevu lze využít ke stanovení postmortální manipulace s tělem.

Posmrtná ztuhlost nastává asi 1 hodinu po smrti, kdy střídá ochabnutí svalstva. Jedná se o jev, při kterém se nedostává ATP do svalů, které nemohou relaxovat. Ztuhlost začíná nejdříve na drobných obličejových svalech a pokračuje dolů směrem na dolní končetiny. Zcela vyjádřená ztuhlost nastává asi za 6-12 hodin od smrti. Pokud dojde k rozrušení ztuhlosti 6-8 hodin po smrti, tedy pokud je s tělem v této době manipulováno, ztuhlost se již neobnoví. Pokud dojde k manipulaci do 6 hodin, dojde k obnově ztuhlosti, ale již ne v původní míře. Zhruba za 2 dny začne ustupovat, za 3-4 dny zmizí úplně. Rychlost změny je ovšem velmi závislá jednak na okolní teplotě, jednak na celkovém množství svalové hmoty zemřelého a také může být ovlivněna příčinou smrti, případně užitých léků či drogách. Zvláštním druhem posmrtné ztuhlosti je kataleptická ztuhlost, při které dochází k okamžitému ztuhnutí veškerého svalstva v okamžiku smrti.

Další známkou smrti je chladnutí těla. Jedná se ovšem o znak velmi nestálý a závislý na příliš mnoha faktorech, než aby jej šlo použít pro stanovení doby smrti. Samozřejmě nejvíce záleží na okolní teplotě, ale také na okolním prostředí – jestli došlo k úmrtí v místnosti nebo venku, zda-li se jedná o souš nebo o vodní prostředí. Dále závisí také na oblečení zemřelého i na jeho vlastních zásobách tuku. Rovněž je důležité, jaké oblečení měl zemřelý v okamžiku smrti na sobě a jestli byl zabalen v příkrývcu. Je známo, že ve vodě dochází k ochlazení těla vedením asi 26x rychleji než na vzduchu sáláním. Rovněž u hubených lidí dochází ke chladnutí těla o 20-30 % rychleji, zatímco u otlých lidí asi o 15-20 % pomaleji, než u normálně rostlých lidí. Navíc ke chladnutí těla nedochází rovnoměrně. Jednak akrální části těla chladnou rychleji, než jádro. Dokonce ani v čase nechladne rovnoměrně, nejprve chladne pomaleji, potom rychleji a nakonec, jak se vyrovnává teplota těla s okolím, tak opět pomaleji. Pocit teplého těla je při teplotě vyšší, než 25 °C. Za standardních podmínek, které ovšem jak vidno téměř nenastávají-lehce oděná mrtvola normální hmotnosti v místnosti o teplotě 18 °C, dochází ke chladnutí těla asi o 1 °C za hodinu.

Dalším procesem, který nastává poměrně časně po smrti je zasychání sliznic a kůže. Je způsobené odpařováním vody z povrchu těla. Nejvíce k tomu dochází na místech, kde je stratum corneum (rohovějící vrstva pokožky) buď velmi oslabené, nebo zcela chybí. Nejlépe je vidět na rtech, spojivkách, genitálu a na kůži, jejíž povrch byl před smrtí porušen. Projeví se temně fialovým až hnědým zbarvením, které může imitovat poleptání, zakalením rohovky a zaschnutím oděrek. U mužů je pozorován posmrtný růst vousů. Nejedná se ovšem o skutečný růst, ale o pasivní proces při snížení turgoru kůže.

Nakonec dochází k autolýze, následně hnilobě a tlení. Autolýza je proces, při kterém se uvolňují enzymy, které se za živa podílely na rozkladu látek přijímaných z potravy a při katabolismu v rámci stresu. Proto po smrti dochází nejdříve k autolýze slinivky břišní, žaludku, střev a dřeně nadledvin.

Vzácně může dojít k takové destrukci, že se proděraví stěna žaludku, někdy dokonce i bránice a žaludeční obsah volně vytéká do dutiny břišní. Poté, co dojde k autolýze, dochází k poměrně rychlému rozkladu tkání pomocí hnilobných bakterií. Částečně se na rozkladu podílí bakterie kožní a v dutině ústní, nicméně převážná část hnilobného procesu pochází ze střevních bakterií. Bakterie se posléze z oblasti střev šíří pomocí cév do zbytku těla. Hniloba se projeví zeleným zbarvením kůže a cév, které jsou dány vznikajícím sulfhemoglobinem. Zelené zbarvení kůže je nejprve patrné na břiše, odkud se šíří na hrudník, končetiny a krk. Proces předchází zelené zbarvení cév, které se posléze rozšiřuje na kůži. Barva kůže se s pokračující hnilobou mění ze zelené na tmavě zelenou až zelenočernou nebo hnědočervenou. Postupně dochází k rozvoji podkožního emfysemu, tedy přítomnosti plynu v podkožním tuku, což se projeví nafknutím celého těla, především obličeje, břicha, genitálu a u žen prsů. Z úst nejprve vyčnívá zduřelý jazyk. Emfysem je výrazně více patrný v okolí krevních výronů, v okolí porušené kůže a utopených. Vnitřní orgány se roztékají a jsou mazlavé.

Druhý týden po smrti se začnou tvořit na kůži puchýře naplněné zelenou tekutinou, které snadno praskají. Z úst vytéká hnědočervená tekutina, u vnitřních orgánů se plyn hromadí uvnitř, označující se jako tzv. voštinovité orgány a nedaří mikroskopicky určit jejich strukturu. Za 2-3 týdny po smrti se kůže olupuje v čárech a vypadávají vlasy. Po 2-3 měsících již nejsou přítomny tělesné tekutiny, kůže se propadá hluboko do mezižebních prostor a na břiše, tělesné orgány se scvrkávají. V této fázi již převládají procesy tlení, tedy rozklad aerobními bakteriemi. Za 6-12 měsíců dochází k rozpadu kůže a orgánů především v přední části těla. Za 1-2 roky se začínají odhalovat přední části těla. Rozpadají se mezižební chrupavky a široce se odhaluje hrudní dutina. Zbytky kůže jsou patrné pouze podél páteře v oblasti zadní části těla. Jsou patrné pouze zbytky orgánů a svalstva. V našich podmínkách je proces sekeletizace dokončen ve vhodné půdě asi za 10 let.

Hnilobný proces je výrazně urychlen v teplém prostředí, nebo v případě přítomnosti bakteriální infekce, zvláště pak v případě úmrtí na sepsi. Udává se že hnilobné změny, ke kterým dojde za 1 týden na vzduchu odpovídají 2 týdnům ve vodě a 8 týdnům v zemi. Proces hniloby je samozřejmě velmi modifikován i jinými biologickými činiteli, jak megafaunou, tak především hmyzem, ale vzhledem k tomu, že těmto procesům je věnována samostatná kapitola semináře, tak se jím zabývat nebudu.

Za zvláštních podmínek může být proces skeletizace přerušen a dojde ke konzervaci těla buď procesem mumifikace nebo adipocire. Mumifikaci proslavili starověcí Egypťané, ale pravdou je, že by k ní v jejich podmínkách došlo i bez jejich přičinění. To se ostatně chudším vrstvám obyvatel k nemalé radosti archeologů skutečně dělo. K mumifikaci dochází za předpokladu, že je tělo po smrti uchováno v teplém prostředí s proudícím vzduchem. Takové prostředí se kromě Údolí Králů nachází také v katakombách, ale také na půdách, vytápěných místnostech a podkroví. Dojde k vysušení orgánů a kůže, která pevně přilne na kosti a získá temně šedou barvu. V případě mumifikovaného těla nelze provést pitvu. K mumifikaci dochází během několika let, u dětí ale i do jednoho roku, vzhledem k tomu, že mají tenčí kůži, než dospělý. Hmotnost plně mumifikovaného dospělého zemřelého je 5-7 kg.

Adipocire vzniká přesně v opačných podmínkách, než mumifikace. Dochází k ní ve vlhkém prostředí za absence vzduchu. Takové prostředí se nachází v rašelinistích a jiných močálech. Proto také v podstatě každá vesnice v severní Evropě má svého „muže z močálu“. Při adipocire dochází k tzv. „zmýdelnatění“. Tedy náhradou sodného iontu v triglyceridech za iont vápenatý nebo hořečnatý. Díky tomu je veškerý tuk v těle nahrazen kyselinou palmitovou a stearovou a jejich nerozpustnými solemi. Na pohled se jedná o mazlavou šedobílou, silně páchnoucí hmotu. Nejprve dochází k maceraci kůže, která je patrná několik hodin po smrti a začíná na prstech. Posléze se proces rozšíří na celou ruku, přičemž kůži lze stáhnout jako rukavici, jedná se o cca 14 dní. Analogický proces je na nohou, za několik týdnů i na obličejích a u žen na prsou. Poté proces pokračuje na vnitřní orgány a celý proces je dokončen asi za 2-3 roky.

1. V teplovodní rouře bylo v listopadu nalezeno tělo 50letého neznámého muže. Tělo silně zapáchalo, mělo tmavě zelenou barvu, přičemž z dutiny ústní čněl jazyk a odcházela hnědočervená tekutina. Obličej muže byl výrazně oteklý, černý, genitál byl silně oteklý, kůže na břicho byla napjatá a tvořily se na ní puchýře.
 - a. Zkuste odhadnout, jak dlouho je muž po smrti.
 - b. Jaké zevní faktory se budou podílet na rozkladu těla v dané době nejvíce?
 - c. Dá se určit příčina smrti? Jaké příčiny by mohly být i v tomto stavu patrné. Jaké naopak zjistit nelze?
2. Na lovecké chatě bylo objeveno tělo 60letého muže. Muž byl v době smrti oblečen v myslivecké kamizole, seděl na posteli, v ruce držel brokovnici, kterou měl vsunutou do úst. Z nosu a z pravého ucha vytékala krev. Kaluž krve byla rovněž na koberci u postele, pod tělem.
 - a. Jak se nazývá posmrtná ztrnulost, ve které bylo nalezeno tělo.
 - b. Proč tělo zůstalo v této pozici?
 - c. Tento typ posmrtné ztuhlosti nejvíce proslavila jedna historická událost, při které došlo ke katastrofě obrovských rozměrů s velkými ztrátami na životech. Oběti této události byly o mnoho set let později konzervovány sádrou, což vedlo k uchování jejich těl v pozici, při které zemřely. O jakou událost se jedná. Proč se vyvinul tento typ strnulosti?
3. 80letá žena byla nalezena ve svém podkrovním bytě mrtvá. Identifikaci těla se podařilo provést pouze na základě občanského průkazu. Tělo bylo nalezeno vedle postele, na břicho, obličejem dolů, se zapřenými horními končetinami. Pravá dolní končetina byla jasně defigurována v nefyziologickém postavení a zkrácena proti levé. Kůže zemřelé byla suchá, temně šedá a pevně lpěla na kostech pánve a žeber. Kontura těla byla zachovalá, ale tělo bylo celkově vyschlé, vážilo 5 kg.
 - a. K jakému procesu u mrtvé po smrti došlo?
 - b. Dá se provést pitva?
 - c. Kde byste hledali vnitřní orgány u této zemřelé?
 - d. Jak dlouho řádově je žena pravděpodobně po smrti?
 - e. Na základě uvedených skutečností zkuste zrekonstruovat, co se před smrtí ženě stalo. Proč nakonec zemřela?
4. Na standardním oddělení nemocnice byla nalezena 75 letá pacientka v 8 hodin ráno jinou pacientkou na toaletě mrtvá. Tělo bylo zapleteno do radiátoru, vzhledem k již vyjá-

dřené posmrtné ztuhlosti bylo nutné topení odinstalovat instalatérem. Přivolaný ošetřující lékař pouze zkonstatoval smrt a snažil se zjistit, kdy k události došlo. Sesterská směna se střídá na pracovišti v hodin ráno, proto kontaktoval noční sestru. Ta tvrdila, že s pacientkou mluvila v 6 hodin ráno, když jí dávala ranní medikaci.

- a. Věřili byste sestře, že s pacientkou v 6 ráno mluvila? Kdy si myslíte, že pacientka zemřela. Jak byste si ověřili pravdivost jejích slov na místě nálezů.
- b. Pokud mluví sestra pravdu, jaký nález byste předpokládali při nařízené pitvě?
- c. Jaké faktory mohou hrát roli v akceleraci posmrtné ztuhlosti.

