

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Zoologie



Bc. Jaroslava Javůrková

Průtoková cytometrie v biosystematice hmyzu

Flow cytometry in insects biosystematics

diplomová práce

Školitel: Mgr. Petr Šípek, Ph.D.

Praha, 2023

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

V Praze 10.08.2023

Jaroslava Javůrková

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Mgr. Petru Šípkovi, Ph.D. za odborný dohled, zpětnou vazbu při realizaci této diplomové práce a za možnost rozšířit si obzory během setkání s nejnějším exotickým druhem. Velký dík patří Ing. Hance Šípkové, Ph.D. za pomoc s měřením vzorků a doufejme úspěšné snaze předat cytometrické know-how. Děkuji rovněž Mgr. Ondřeji Kouklíkovi za veškerou spolupráci a materiál získaný terénním sběrem. Za pomoc při získávání materiálu bych dále ráda poděkovala Mgr. Ing. Davidu Sommerovi, Tomáši Vajgarovi, Evě Volfové a Dr. Ondřeji Kauzálovi. Poděkování patří také Mgr. Tomáši Urfusovi, Ph.D. za cenné konzultace a podporu.

Poděkovat na tomto místě chci svým nejbližším, kteří celou tu dlouhou studijní cestu absolvovali společně se mnou, byli mi oporou a mohla jsem se na ně kdykoliv obrátit. Tento dík patří především svým rodičům a prarodičům, bez jejichž podpory bych jen těžko dosáhla svých cílů.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat všem blízkým kamarádům, jmenovitě zejména Mgr. Veronice Píchové, která mi věnovala hodiny svého času a pomohla mi překonat nejtěžší chvíle. Dále pak můj dík patří Bc. Martinu Davidkovi a Tomáši Chalupovi, kteří ochotně naslouchali mým mnohdy nekonečným biologickým příběhům a nenechali se odradit od následujících konverzací.

Závěrem ze srdce děkuji mému milému Tomášovi za obdivuhodnou trpělivost, motivaci a podporu, kterou jsem v posledních měsících potřebovala ze všeho nejvíce.

Výzkum byl podpořen Grantovou agenturou Univerzity Karlovy, projekt č. 1338120.

Abstrakt

Velikost genomu neboli obsah DNA v buňkách je vyjadřována pomocí tzv. C-hodnoty, tj. hmotnosti DNA v jednotkách *pg*, respektive jako 2C-hodnoty pro obsah DNA v somatických buňkách diploidních organismů. Jednoduchou metodou využívanou mimo jiné pro zjištění velikosti genomu je průtoková cytometrie. Tato metoda se již tradičně těší veliké oblibě zejména mezi botaniky, kde je využívána především při taxonomických a populačních studiích či pro zjišťování ploidie jednotlivých linií. Naopak velikost genomu u živočichů, respektive u hmyzu je relativně málo studována. Z více než milionu popsaných hmyzích druhů je velikost genomu známá u pouhých stovek z nich.

Tato práce poskytuje informace o velikosti genomu osmdesáti osmi druhů hmyzu z vybraných řádů skupiny Polyneoptera – čtyřech druhů škvorů (Dermaptera), čtyřech druhů snovatek (Embioptera), čtrnácti druhů kudlanek (Mantodea), sedmnácti druhů strašilek (Phasmatodea), čtyřiceti šesti druhů rovnokřídlých (Orthoptera), jednoho druhu termita (Isoptera, Blattodea) a dvou druhů pošvatek (Plecoptera). Zjištěné absolutní velikosti genomů a míry jejich rozsahů byly porovnány v rámci jednotlivých řádů, v rámci skupiny Polyneoptera a srovnány s velikostmi genomů dalších taxonů hmyzu. Výsledkem práce je mimo jiné i doposud největší změřený genom u hmyzu – saranče *Dictyophorus griseus* ($2C=149,33$ *pg*), jehož velikost genomu několikanásobně převyšuje doposud publikované výsledky a potvrzuje tak dosavadní hypotézu o velkých genomech rovnokřídlých (Orthoptera). Práce diskutuje rovněž faktory, které by mohly vést k výskytu nadměrných genomů, například možný vliv velikosti těla a metabolismus toxických látek u rovnokřídlých (Orthoptera) a možný vliv typu rozmnožování na velikosti genomů strašilek (Phasmatodea).

Klíčová slova: průtoková cytometrie, velikost genomu, C-hodnota, Polyneoptera

Abstract

The size of the genome, or DNA content in cells, is expressed using the so-called C-value, i.e. the weight of DNA in units of pg, or as 2C-values for the DNA content in somatic cells of diploid organisms. A simple method used, among other things, to determine the size of the genome is flow cytometry. This method has traditionally been very popular, especially among botanists, where it is mainly used in taxonomic and population studies or for determining the ploidy of individual lines. Conversely, genome size in animals and insects is relatively little studied. Of the more than a million described insect species, the genome size is known for only hundreds of them.

This work provides information on the genome size of eighty-eight species of insects from selected orders of the Polyneoptera group – four species of earwigs (Dermaptera), four species of weavers (Embioptera), fourteen species of mantises (Mantodea), seventeen species of stick insects (Phasmatodea), forty-six species of grasshoppers, locusts, and crickets (Orthoptera), one species of termite (Isoptera, Blattodea) and two species of stoneflies (Plecoptera).

The determined absolute genome sizes and variance rates were compared within individual orders, within the Polyneoptera group, and compared with the genome sizes of other insect taxa. The results showed the largest insect genome measured so far – the locust *Dictyophorus griseus* ($2C=149.33$ pg), whose genome size is several times larger than the results published so far and thus confirms the previous hypothesis about large genomes of Orthoptera. The results showed a possible effect of body size and the presence of toxic substances on the size of the genomes of Orthoptera and a possible effect of the type of reproduction on the size of the genomes of Phasmatodea.

Key words: flow cytometry, genome size, c-value, Polyneoptera

Obsah

Seznam obrázků, tabulek a grafů	9
1 Úvod.....	11
1.1 Velikost genomu.....	11
1.2 Metody měření velikosti genomu	13
1.2.1 Dříve používané metody	13
1.2.2 Celogenomové sekvenování a další současné metody	13
1.2.3 Průtoková cytometrie	13
1.2.3.1 Příprava vzorků	15
1.2.3.2 Standardy	15
1.2.3.3 Využití průtokové cytometrie	17
1.3 Animal Genome Size Database	18
1.4 Polyneoptera	19
1.4.1 Škvoři (Dermaptera).....	22
1.4.2 „Core Polyneoptera“	23
1.4.2.1 Snovatky (Embioptera)	23
1.4.2.2 Strašilky (Phasmatodea).....	24
1.4.2.3 Rovnokřídlí (Orthoptera)	26
1.4.2.4 Blattopteroidní komplex (Dictyoptera).....	29
1.4.3 Pošvatky (Plecoptera).....	31
2 Cíle práce	32
3 Metodika	33
3.1 Materiál a jeho příprava.....	33
3.2 Vyhodnocení analýz	34
4 Výsledky	36
4.1 Naměřené velikosti genomů (2C-hodnoty) u skupiny Polyneoptera.....	36
4.2 Velikosti genomů jednotlivých řádů Polyneoptera	46
4.2.1 Velikosti genomů zástupců řádu škvoři (Dermaptera)	46
4.2.2 Velikosti genomů zástupců řádu snovatky (Embioptera)	46
4.2.3 Velikosti genomů zástupců řádu kudlanky (Mantodea)	47
4.2.4 Velikosti genomů zástupců řádu strašilky (Phasmatodea).....	48
4.2.5 Velikosti genomů zástupců řádu rovnokřídlí (Orthoptera)	51
4.2.5.1 Kobylky (Ensifera).....	52

4.2.5.2	Saranče (Caelifera).....	52
4.2.5.3	Srovnání velikostí genomů v řádu rovnokřídlí (Orthoptera).....	55
4.2.6	Velikosti genomů podřádu termiti (Isoptera).....	58
4.2.7	Velikosti genomů v řádu pošvatky (Plecoptera).....	58
4.2.8	Srovnání rozsahu velikostí genomů jednotlivých řádů Polyneoptera.....	58
5	Diskuse.....	61
5.1	Velikosti genomů z hlediska evoluce a ekologie.....	61
5.1.1	Velké genomy zástupců řádu Orthoptera.....	61
5.1.1.1	Potravní strategie.....	63
5.1.1.2	Velikost těla.....	63
5.1.1.3	Chemická obrana.....	64
5.1.2	Rozdíly ve velikostech genomů zástupců řádu Phasmatodea.....	65
5.1.2.1	Pohlavní rozmnožování a partenogeneze.....	65
5.1.2.2	Křídla.....	66
5.1.3	Uniformita velikostí genomů termitů (Isoptera).....	67
5.2	Rozdíly mezi pohlavími a jejich determinace.....	68
5.3	Srovnání výsledků s AGSD a další literaturou.....	71
5.4	Negativa průtokové cytometrie.....	76
5.4.1	Názvosloví.....	76
5.4.2	Standardy.....	76
6	Závěr.....	78
	Seznam použité literatury.....	80

Seznam obrázků, tabulek a grafů

- Obrázek č. 1 – schéma průtokového cytometru
- Obrázek č. 2 – schéma artikulace křídel skupiny Neoptera
- Obrázek č. 3 – postavení drobnělek (Zoraptera) vůči ostatním taxonům Polyneoptera
- Obrázek č. 4 – kladogram příbuzenských vztahů v rámci skupiny Polyneoptera
- Obrázek č. 5 – zástupci řádu Dermaptera
- Obrázek č. 6 – zástupce řádu Embioptera
- Obrázek č. 7 – zástupci řádu Phasmatodea
- Obrázek č. 8 – příbuzenské vztahy v řádu Phasmatodea
- Obrázek č. 9 – příbuzenské vztahy v podřádu Ensifera
- Obrázek č. 10 – zástupci podřádu Ensifera
- Obrázek č. 11 – zástupci podřádu Caelifera
- Obrázek č. 12 – zástupci řádu Blattodea
- Obrázek č. 13 – zástupci řádu Mantodea
- Obrázek č. 14 – zástupce řádu Plecoptera
- Obrázek č. 15 – histogram z průtokového cytometru v programu Partec FloMax 2.4b (Partec GmbH, Münster): analýza velikosti genomu samce strašilky *Sungaya inexpectata*, standard *Pisum sativum*
- Obrázek č. 16 – zástupci čeledi Pyrgomorphidae
- Tabulka č. 1 – rostlinné standardy a jejich 2C-hodnoty
- Tabulka č. 2 – živočišné standardy a jejich 2C-hodnoty
- Tabulka č. 3 – 2C-hodnoty použitých standardů
- Tabulka č. 4 – přehled zjištěných velikostí genomů
- Tabulka č. 5 – velikost genomu *Heteropteryx dilatata*
- Tabulka č. 6 – velikost genomu *Medauroidea extradentata*
- Tabulka č. 7 – velikost genomu *Sungaya inexpectata*
- Tabulka č. 8 – velikost genomu *Locusta migratoria*
- Tabulka č. 9 – přehled vybraných druhů Orthoptera s největšími genomy datasetu
- Tabulka č. 10 – rozdíl ve velikostech genomů mezi pohlavími
- Graf č. 1 – velikosti genomů škvorů (Dermaptera)
- Graf č. 2 – velikosti genomů snovatek (Embioptera)
- Graf č. 3 – velikosti genomů kudlanek (Mantodea)
- Graf č. 4 – velikosti genomů strašilek (Phasmatodea)
- Graf č. 5 – velikosti genomů podřádu kobyly (Ensifera)
- Graf č. 6 – velikosti genomů podřádu saranče (Caelifera)
- Graf č. 7 – srovnání velikostí genomů mezi podčeledmi řádu rovnokřídli (Orthoptera)

- Graf č. 8 – velikosti genomů pošvatek (Plecoptera)
- Graf č. 9 – srovnání rozsahu velikostí genomů jednotlivých řádů Polyneoptera
- Graf č. 10 – vliv potravní strategie na velikosti genomů Orthoptera
- Graf č. 11 – závislost velikosti genomů Orthoptera na velikosti těla
- Graf č. 12 – závislost přítomnosti toxických látek na velikosti genomů Orthoptera
- Graf č. 13 – vliv typu rozmnožování na velikosti genomů Phasmatodea
- Graf č. 14 – typ okřídlení a velikosti genomů Phasmatodea
- Graf č. 15 – srovnání velikostí genomů v řádu Blattodea
- Graf č. 16 – srovnání rozsahu velikostí genomů jednotlivých řádů Polyneoptera na základě dat z literatury a našeho měření
- Graf č. 17 – srovnání rozsahu velikostí genomů skupiny Polyneoptera s „big four“ na základě dat z literatury a našeho měření

1 Úvod

1.1 Velikost genomu

Velikostí genomu rozumíme veškerou genetickou informaci, resp. DNA, jež obsahují buňky studovaného organismu, a to v nereplikované podobě. Termín „genome“ byl poprvé použit Hansem Winklerem roku 1920 jako kombinace slov „gene“ a „chromosome“. Hodnotu obsahu jaderné DNA je možno vyjádřit pomocí tzv. C-hodnoty, anglicky c-value (Swift, 1950). C-hodnota je používána pro vyjádření velikosti genomu haploidních buněk. Setkat se však můžeme běžně také s 2C-hodnotou, jež vyjadřuje obsah DNA v somatické buňce eukaryotického organismu, respektive v buňce diploidní. Tato hodnota je udávána v pikogramech (*pg*), kdy vyjadřuje hmotnost DNA, nebo jako počet párů nukleových bazí, resp. megapárů bazí (*Mbp*), kdy vyjadřuje délku sekvence. Vztah mezi udávanými jednotkami je vyjádřen rovnicí $1 \text{ pg} = 978 \text{ Mbp}$ (Doležel et al., 2003). V této práci bude používána výhradně jednotka *pg*.

Zajímavým fenoménem, jež se sestává z mnoha dílčích otázek, na něž nebylo doposud uspokojivě odpovězeno, je tzv. C-value paradox (Thomas, 1971, Gregory, 2001), později též C-value enigma (Gregory, 2001, Doležel et al., 2010). Tento jev spočívá v tom, že množství DNA obsažené v haploidním genomu neodpovídá komplexitě daného organismu (Thomas, 1971, Pagel et al., 1992). Například 2C-hodnota některých zástupců řádu Orthoptera je výrazně vyšší než u člověka, například druh *Stauroderus scalaris* s 2C-hodnotou 32,68 *pg* nebo *Podisma pedestris* s 2C-hodnotou 33,86 *pg* (Gregory, 2023) versus 6,50 *pg* u člověka (2C, Doležel et al., 2003). Jaderná DNA obsahuje množství repetitivních a nekódujících sekvencí s notnou variabilitou mezi jednotlivými organismy, což může mít za následek takto výrazně odlišné 2C-hodnoty. Otázkou však nadále zůstává, proč buňky některých organismů obsahují větší množství nekódující DNA a jaký má její přítomnost vliv na daný organismus (Gregory, 2001). Současné poznání rovněž ukazuje existenci pozitivní korelace mezi velikostí buňky a velikostí genomu, jak někteří autoři demonstrují ve svých výzkumech ať už na členovcích či jiných bezobratlých (Gregory et al., 2000), obratlovcích (Gregory, 2001), člověku (Gillooly et al., 2015) nebo rostlinách (Beaulieu et al., 2008).

Dle Tafta (2007) je zřejmě nejvýznamnější proměnnou určující velikost genomu stupeň ploidie, neboť polyploidizace může být jedním z důvodů zvětšení genomu. Buňky polyploidních jedinců obsahují jednotky až desítky kopií téhož chromozomu. Proces polyploidizace byl klíčový zejména v evoluci rostlin (Wendel, 2000, Suda, 2007), svou roli sehrál v evoluci také u obratlovců (Gregory, 2005). Zřídka nalezneme polyploidy mezi savci (Svartman, 2005), poměrně častá je pak polyploidie u obojživelníků (Gregory, 2005) či ryb (Beçak & Kobashi, 2004). Polyploidní jedince nacházíme rovněž mezi korýši či hmyzem (Lokki & Saura, 1980, Otto & Whitton, 2000). Polyploidie u hmyzu je obvykle spjata s partenogenezí, proto byl její výskyt zachycen u jepic (Ephemeroptera), zástupců polokřídých (Hemiptera, Coccidae), rovnokřídých (Orthoptera, Tettigoniidae) nebo například u některých druhů strašilek (Phasmatodea) (Lokki & Saura, 1980, Casellato et al., 2009). Znalost ploidní úrovně může pomoci objasnit taxonomickou příslušnost (Suda, 2007). Po polyploidizační události obvykle následně dochází k redukci a ztrátě některých genů (Wendel, 2000). Tato zpětná redukce může situaci zkomplikovat, takže u některých původně polyploidních druhů se díky redukčním může zdát, že se jedná o druhy diploidní. Takové druhy jsou často označovány jako paleoploidní (Wolfe, 2001).

Stav současného poznání ukazuje obrovské rozdíly ve velikostech genomů nejen mezi jednotlivými skupinami hmyzu, ale vysokou variabilitu vykazují i výsledky mezi druhy v rámci jedné linie či dokonce mezi pohlavími (Marescalchi et al., 1998, Stuchlíková, 2020, Hawlitschek et al., 2023). Pro ilustraci lze uvést například velikost genomu některých druhů z řádů Hymenoptera či Diptera, u kterých se v současnosti nejnižší naměřené 2C-hodnoty dostupné v Animal Genome Size Database (AGSD) pohybují v rozmezí 0,14 pg až 0,20 pg, největší pak do hodnoty 2,76 pg. Naopak největší hmyzí 2C-hodnota uvedena v databázi 33,86 pg byla naměřena u druhu *Podisma perestris*, nejnižší hodnota v řádu Orthoptera 0,91 pg byla zjištěna u druhu *Oecanthus sinensis* (Yuan et al., 2021). V nedávných studiích byla doposud největší známá velikost genomu u hmyzu překonána a zjištěny byly 2C-hodnoty 42,43 pg u druhu *Dericorys annulata* (Sun et al., 2023) a 43,92 pg u druhu *Bryodemella tuberculatum* (Hawlitschek et al., 2023).

1.2 Metody měření velikosti genomu

1.2.1 Dříve používané metody

V počátcích výzkumu velikosti genomu byla aplikována například fluorometrická analýza (Hinegardner, 1971) či principy reasociační kinetiky (Palmer, 1994), postupem času začala převažovat zejména denzitometrie. Principem denzitometrického měření velikosti genomu je roztěr tkáně studovaného organismu na sklíčko, za pomoci Feulgenovy reakce je vzorek pak připravován k mikroskopické analýze. Feulgenovo barvení zahrnuje fixaci vzorku, jeho hydrolyzaci kyselinou chlorovodíkovou a barvení Schiffovým činidlem. Následně je stanovena a porovnána optická hustota jader vzorku s optickou hustotou jader standardu, u něhož je velikost genomu známa (Hardie et al., 2002). Ve srovnání s průtokovou cytometrií je denzitometrické měření považováno za postup náchylnější k vzniku chyb, a to kvůli většímu množství kritických okamžiků při přípravě vzorků (Doležel et al., 2007, Greilhuber, 2008). Podrobnější popis principu průtokové cytometrie, její benefity a úskalí a využití v praxi či výzkumu následuje v další části kapitoly.

1.2.2 Celogenomové sekvenování a další současné metody

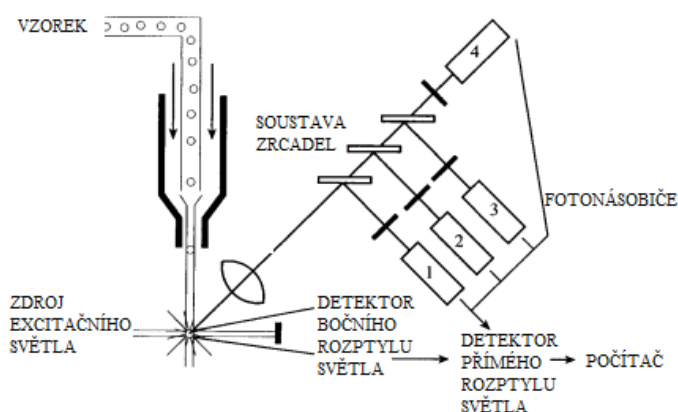
Cílem sekvenování je stanovení pořadí nukleotidů v sekvencích DNA, tedy stanovení primární struktury DNA. Moderní metody sekvenování nové generace (NGS) jsou ve srovnání s klasickými přístupy jako je Sangerovo sekvenování rychlejší a samotné analýzy jsou díky produkci velkého množství dat za krátký časový úsek méně nákladné a umožňují nám získat výrazně delší sekvence DNA. Celkové náklady jsou nicméně oproti metodě průtokové cytometrie stále řádově vyšší, a to především z důvodu náročného bioinformatického zpracování získaných dat. Mezi další metody stanovení velikosti genomu patří například kvantitativní polymerázová řetězová reakce neboli qPCR (Gregory et al., 2013) či mikrospektrofotometrie (Sessions, & Larson, 1987, Jimenez et al., 2010).

1.2.3 Průtoková cytometrie

Metoda průtokové cytometrie (anglicky flow cytometry či FCM) se pro svou metodickou nenáročnost, rychlost získání výsledků a nízké náklady těší stále vzrůstající popularitě. (Kron et al., 2007). Tato metoda umožňuje separovat jednotlivé částice jako jádra buněk, buňky či chromozomy a následně analyzovat jejich vlastnosti, respektive jsou

zaznamenávají optické vlastnosti těchto částic, nejčastěji fluorescence (Suda, 2005, Adan et al., 2017). Princip měření velikosti genomu za využití průtokové cytometrie je snadný a spočívá v homogenizaci studovaného vzorku s vhodným nejčastěji interním standardem, navázání specifického fluorescenčního barviva na DNA vzniklého homogenátu, respektive analyzovaných částic. Obarvené částice se díky takzvané hydrodynamické fokusaci v průtokové komůrce cytometru pohybují jedna za druhou v úzkém svazku (Suda, 2005, Doležel et al., 2007). Částice jsou do komůrky přiváděny kapilárou, kterou současně protéká unášecí kapalina (destilovaná voda či slabý solný roztok). Díky tomu, že unášecí kapalina je do kapiláry vpouštěna pod vyšším tlakem než suspenze analyzovaných částic, proud částic je tímto způsobem držen ve středu toku a z komůrky odchází jedna za druhou až ke zdroji excitačního záření, kterým jsou tyto částice ozářeny.

Typickým zdrojem záření jsou lasery, dříve to byly také vysokotlaké rtuťové výbojky nebo kombinace laserů a výbojek v podobě diod (Suda, 2005, Wilkerson, 2012). Fluorescenční barvivo při volbě světla o vhodné vlnové délce excituje, to znamená, že elektrony přejdou na vyšší energetickou hladinu. Vzhledem k nestabilitě excitovaného stavu dochází následně k přechodu zpět do stavu původního. Přechod do původního stavu způsobuje uvolnění světelné (fluorescenční) a tepelné energie. Po tomto procesu částice vyzařují světlo o jiné vlnové délce než záření, jímž byly ozářeny (Suda, 2005). Za užití vhodných filtrů a zrcadel jsou rozptýl světla a emitovaná fluorescence cytometrem zaznamenávány a následně přenášeny do grafické podoby (Wilkerson, 2012, Adan et al., 2017, Obrázek č. 1).



Obrázek č. 1 – schéma průtokového cytometru (Brown & Wittwer, 2000, upraveno).

1.2.3.1 Příprava vzorků

V ideálním případě by hmyzí vzorky měly být používány čerstvé (Doležel & Bartoš, 2005). V opačném případě může dojít k rozpadu tkání a degradace DNA. Takový vzorek pak nelze pro cytometrickou analýzu použít. Problematická však může být fáze transportu materiálu do laboratoře, pokud se jedná o materiál získaný terénním sběrem. V terénu může být často složitým až nemožným úkolem dopravit materiál v živém stavu, zvláště pokud jsou daní jedinci krátkověcí či nároční na podmínky prostředí. Z tohoto důvodu je v některých případech na místě materiál fixovat (Gregory, 2005). Materiál lze použít také mražený, ovšem nezbytná je pak příprava vzorku na ledu (Hanrahan & Johnston, 2011, Sadílek et al., 2019). V minulosti byly vzorek a standard připravovány a měřeny zvlášť. Vzhledem k možné chybovosti v důsledku přístrojové odchylky či odlišné barvitelnosti vzorku a standardu není tento způsob příliš vhodný a používány jsou nyní výhradně standardy interní (Suda, 2005, Doležel et al., 2007). Vzorek a standard jsou tak homogenizovány, barveny i měřeny současně (Doležel & Greilhuber, 2010).

1.2.3.2 Standardy

Vhodný standard by měl splňovat několik kritérií. Mezi stěžejní kritéria patří zejména znalost velikosti genomu (Doležel & Greilhuber, 2010) a jeho stabilita, dostupnost standardu, nenáročnost na pěstování či chov, snadná manipulace s daným jedincem. Standard by měl rovněž splňovat předpoklady pro použití s konkrétním vzorkem. Základním předpokladem pro úspěšně provedené měření s dobře analyzovatelným a spolehlivým výsledkem je podobná velikost genomů standardu a vzorku (Johnston et al., 1999, Roux et al., 2003). Výrazné nebo naopak velmi nepatrné rozdíly mezi velikostmi genomů standardu a studovaného vzorku mohou zapříčinit sníženou kvalitu analýzy, překryv peaků a v důsledku toho nemožnost analýzu vyhodnotit. Je tak nezbytné disponovat několika co do velikosti genomů rozlišnými standardy pro pokrytí co nejširší škály možných výsledků. V dosavadním výzkumu bylo vyzkoušeno mnoho variant standardů od lidských lymfocytů (Jakobsen, 1983) či kuřecích erytrocytů (Vindelov et al., 1983, Brown et al., 2005, Chen et al., 2015) přes standardy rostlinné (Temsch et al., 2022) či získané z rozličných druhů obratlovců jako jsou například ryby či myši (Jakobsen, 1983, Tiersch et al., 1989, Dallas et al., 1998, Hanrahan et al., 2011, Hubalek

et al., 2021, Yu et al., 2021) nebo z bezobratlých (Hanrahan et al., 2011, Guo et al., 2015, Pflug et al., 2020). Přehled nejčastěji používaných rostlinných a živočišných standardů je uveden v Tabulkách č. 1 a č. 2 (Jakobsen, 1983, Pellicer et al., 2019, Pflug et al., 2020, Tensch et al., 2022, Gregory, 2023).

Tabulka č. 1 – rostlinné standardy a jejich 2C-hodnoty

český název	latinský název	2C-hodnota (pg)
huseníček rolní	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,32
sporýš lékařský	<i>Verbena officinalis</i>	0,68
rýže setá	<i>Oryza sativa</i>	0,80
ostrice ostrá	<i>Carex acutiformis</i>	0,82
ředkev setá	<i>Raphannis sativus</i>	1,10
lilek rajče	<i>Solanum lycopersicum</i>	1,12
sója luštinatá	<i>Glycine max</i>	2,26
lilek višňový	<i>Solanum pseudocapsicum</i>	2,60
petúnie zahradní	<i>Petunia hybrida</i>	2,85
sedmikráska obecná	<i>Bellis perennis</i>	3,38
petržel zahradní	<i>Petroselinum crispum</i>	4,46
kukuřice setá	<i>Zea mays</i>	5,40
hrách setý	<i>Pisum sativum</i>	9,09
ječmen setý	<i>Hordeum vulgare</i>	10,43
agáve obecná	<i>Agave americana</i>	15,90
žito seté	<i>Secale cereale</i>	16,19
zelenec chocholatý	<i>Chlorophytum comosum</i>	24,14
bob obecný	<i>Vicia faba</i>	26,90
cibule kuchyňská	<i>Allium cepa</i>	34,89
bělokvět bělokvětý	<i>Haemanthus albiflos</i>	59,14

Tabulka č. 2 – živočišné standardy a jejich 2C-hodnoty

český název	latinský název	2C-hodnota (pg)
háďátka obecné	<i>Caenorhabditis elegans</i>	0,20
octomilka obecná	<i>Drosophila melanogaster</i>	0,36
včela medonosná	<i>Apis mellifera</i>	0,48
octomilka	<i>Drosophila virilis</i>	0,68
čtverzubec skvrnitý	<i>Tetraodon fluviatilis</i>	0,82
potemník moučný	<i>Tenebrio molitor</i>	1,04
lín obecný	<i>Tinca tinca</i>	2,04
kur domácí	<i>Gallus domesticus</i>	2,56
jeseter malý	<i>Acipenser ruthenus</i>	3,72
pstruh duhový	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	5,38
šváb americký	<i>Periplaneta americana</i>	5,44
myš domácí	<i>Mus musculus</i>	6,04
člověk moudrý	<i>Homo sapiens</i>	6,50

1.2.3.3 Využití průtokové cytometrie

Kromě měření velikosti genomu nachází průtoková cytometrie uplatnění ve studiu poměrně často se vyskytující polyploidie u rostlin (Brandizzi & Grilli Caiola 1998), detekce pohlaví živočichů (Aron et al., 2003) dále pak ve studiu poměru párů nukleových bází (Doležel et al., 2007) nebo při imunologických analýzách (McKinnon, 2018, Tian et al., 2022) či v klinické praxi (Barlogie et al., 1983, Kron et al., 2007). I přes dostupnost a jednoduchost této metody však výrazně převyšuje její využití zjišťování velikosti genomu v botanických bádáních nad zoologickými. V současnosti je u hmyzu známá velikost genomu pouze u 0,001344 % druhů. Metoda má proto na tomto poli velký potenciál.

Průtoková cytometrie byla poprvé využita pro identifikaci a charakteristiku rakovinných buněk (Barlogie et al., 1983, Kron et al., 2007). V posledních třiceti letech je stále častěji využívána v evolučních a ekologických studiích (Hawlitschek et al., 2023). Metody průtokové cytometrie se rovněž uplatňují při řešení taxonomických a populačně biologických otázek (Kron et al., 2007). Současná integrativní taxonomie, používá pro stanovení hranic druhů různých kritérií, včetně karyologických analýz, morfologických znaků či množství jaderné DNA (Stace, 2000). Průtoková cytometrie také dokáže odhalit kryptické druhy a pomoci tímto směrem zacílit výzkum (MacCulloch et al., 1996, Kron et al., 2007).

Ačkoliv studium ploidie u rostlin je poměrně časté (Brandizzi & Grilli Caiola 1998, Kron et al., 2007), v případě živočichů tomu tak není. Důvodem je relativně vzácný výskyt polyploidie ve srovnání s rostlinami a také bývají preferovány jiné metody výzkumu tohoto jevu (Kron et al., 2007). Příkladem lze uvést výzkum Matthiase Stöcka a kolektivu (Stöck et al., 2002) zabývající se komplexem *Bufo* *viridis*. Diploidní či tetraploidní jedinci nejsou u bezocasých obojživelníků či plazů překvapením (Bickham et al., 1993, Green & Sessions, 2012), triploidie však není zcela obvyklá (Stöck et al., 2002). Bisexuální rozmnožování triploidních jedinců bylo považováno za nemožné z důvodu problematické distribuce třech chromozomových sad v rámci meiózy. Výše zmínění autoři studie demonstrují existenci několika geograficky izolovaných triploidních populací ropuch zelených, jejichž rozmnožování není vázané na partenogenezi, gynogenezi či hybridogenezi a probíhá přirozeně bisexuálně (Stöck

et al., 2002). Tato studie tak přispěla k popisu nově objeveného taxonu *Bufoetes pseudoraddei baturae* (Stöck et al., 2002).

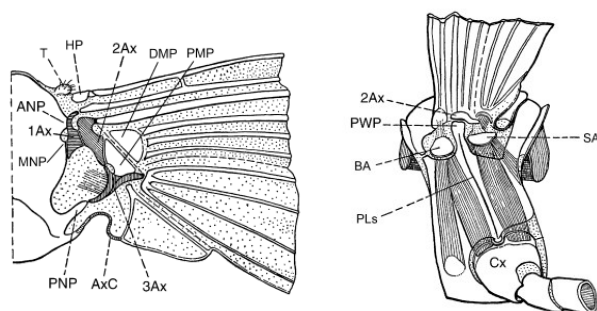
U homoploidních skupin je průtoková cytometrie využívána v taxonomických otázkách, a to za stanovením velikosti genomu či poměru AT a CG nukleových bází (Stöck et al., 2002, Vizintin et al., 2006). Rozdíly ve velikostech genomů byly pozorovány u rostlin i živočichů mezi jednotlivými druhy (Boulesteix et al., 2006), ale také vnitrodruhově (Litvinchuk et al., 2005). Opomenout nelze ani detekci pohlaví za pomoci průtokové cytometrie, kde je opět většinou využívána v případě rostlinného materiálu (Doležel & Göhde, 1995). V případě živočichů je průtoková cytometrie častěji využívána pro určení pohlaví u taxonů, kde je to na první pohled komplikované, například u ptáků (Canon et al., 2000, Aron et al., 2003, Aron et al., 2004). Rozdíly ve velikostech genomů mezi pohlavími demonstrují i studie sledující velikost genomu u hmyzu (Sadílek et al., 2019a, Sadílek et al., 2019b, Hawlitschek et al., 2023). Své využití nalézá průtoková cytometrie také při studiu interakcí mezi rostlinami a hmyzem (Thompson et al., 1997).

1.3 Animal Genome Size Database

Ve veřejně dostupné databázi AGSD (Gregory, 2023) nalezneme v době vydání této práce celkem 6222 záznamů, 3793 záznamů reprezentuje obratlovce, 2429 záznamů pak náleží bezobratlým živočichům. Šestinohé (Hexapoda) reprezentuje celkem 1345 záznamů, z toho 1344 záznamů připadá na hmyz sensu stricto (Insecta). Databáze obsahuje údaje získané pomocí starších a méně spolehlivých metod, z průtokové cytometrie bylo získáno pouze 687 záznamů. S přihlédnutím ke skutečnosti, že některé ze záznamů v AGSD (Gregory, 2023) jsou duplicitní a nejedná se tak o počet změřených druhů, skutečný počet jednotlivých druhů v této databázi je tak o něco nižší. Naproti tomu skupina Viridiplantae zaujímá v rámci Plant DNA C-value Database záznamů celkem 12273 (Leitch et al., 2019). V současnosti je popsán zhruba jeden milion druhů hmyzu (Stork, 2018, Bánki et al., 2023), což přináší ohromný potenciál pro další výzkum právě v této oblasti.

1.4 Polyneoptera

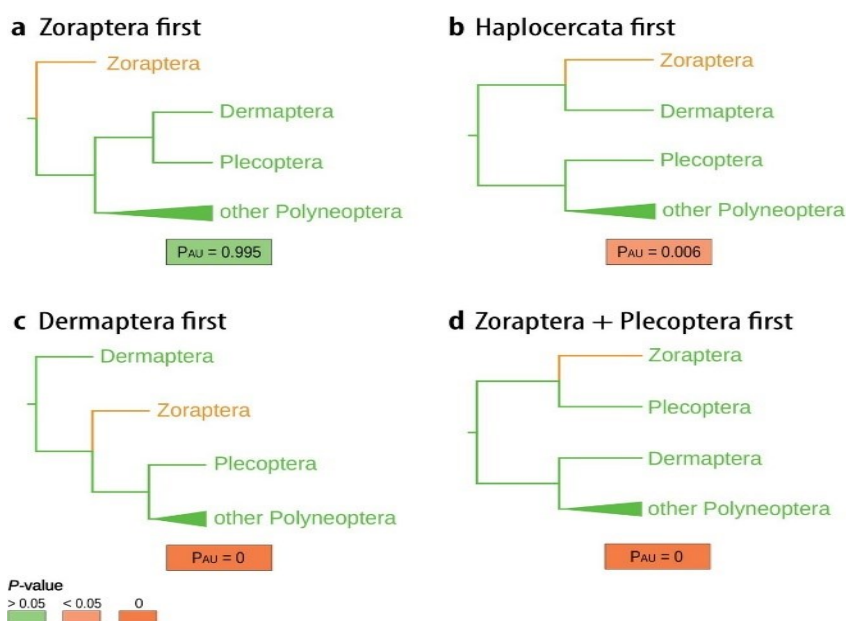
Zájmovou skupinou této diplomové práce je polyneopterní hmyz. Polyneoptera jsou řazeni v rámci křídlatého hmyzu do skupiny Neoptera. Celá skupina Neoptera zahrnuje celkem dvacet pět řádů, pro které jsou typickými znaky ovipositor tvořený třemi páry valvul a specifické uspořádání axilárních skleritů na bázi křídel (Snodgrass, 1935, Kukulova-Peck, 1978). Toto schéma artikulace křídel pomocí proximálně uložené teguly, anteriorně uložené humerální destičky a třech axilárních skleritů umožňuje neopternímu hmyzu složit křídla ploše na zadeček (Kukulova-Peck, 1978, Kristensen, 1981, Willkommen & Hörschemeyer, 2007). Schéma na Obrázku č. 2 níže zobrazuje artikulaci křídel Neoptera. Dalším typickým znakem Neoptera jsou nepřímé letové svaly, které jsou připojeny dorsoventrálně na stěnu hrudní kostry. Během letu dochází stahy svalů ke změně tvaru hrudi, díky čemuž je pohyb přenesen na křídlo. Tento mechanismus umožňuje velice efektivní let s vysokou frekvencí pohybu křídel (Willkommen & Hörschemeyer, 2007, Obrázek č. 2).



Obrázek č. 2 – schéma artikulace křídel skupiny Neoptera (Willkommen & Hörschemeyer, 2007, upraveno).

Neopterní hmyz se tradičně dělí na tři skupiny, Paraneoptera (Acercaria), Oligoneoptera (Endopterygota či Holometabola) a Polyneoptera, přičemž právě Polyneoptera je považována za nejstarobylější skupinu. Monofyletická skupina Polyneoptera zahrnuje zhruba čtyřicet tisíc druhů v rámci deseti tradičních řádů (Beutel et al., 2013, Wipfler et al., 2019). Vzájemné vztahy těchto řádů jsou dlouhodobě diskutovány a jedná se o jeden z nejpalčivějších a stále přetrvávajících taxonomických problémů neopterního hmyzu (Tihelka et al., 2021). Wipfler (2019) člení skupinu na „core Polyneoptera“ zahrnující snotatky (Embioptera), strašilky (Phasmatodea), rovnokřídlé (Orthoptera), švábi (Blattodea) a kudlanky (Mantodea), strašilkovce (Mantophasmatodea) a cvrčkovce

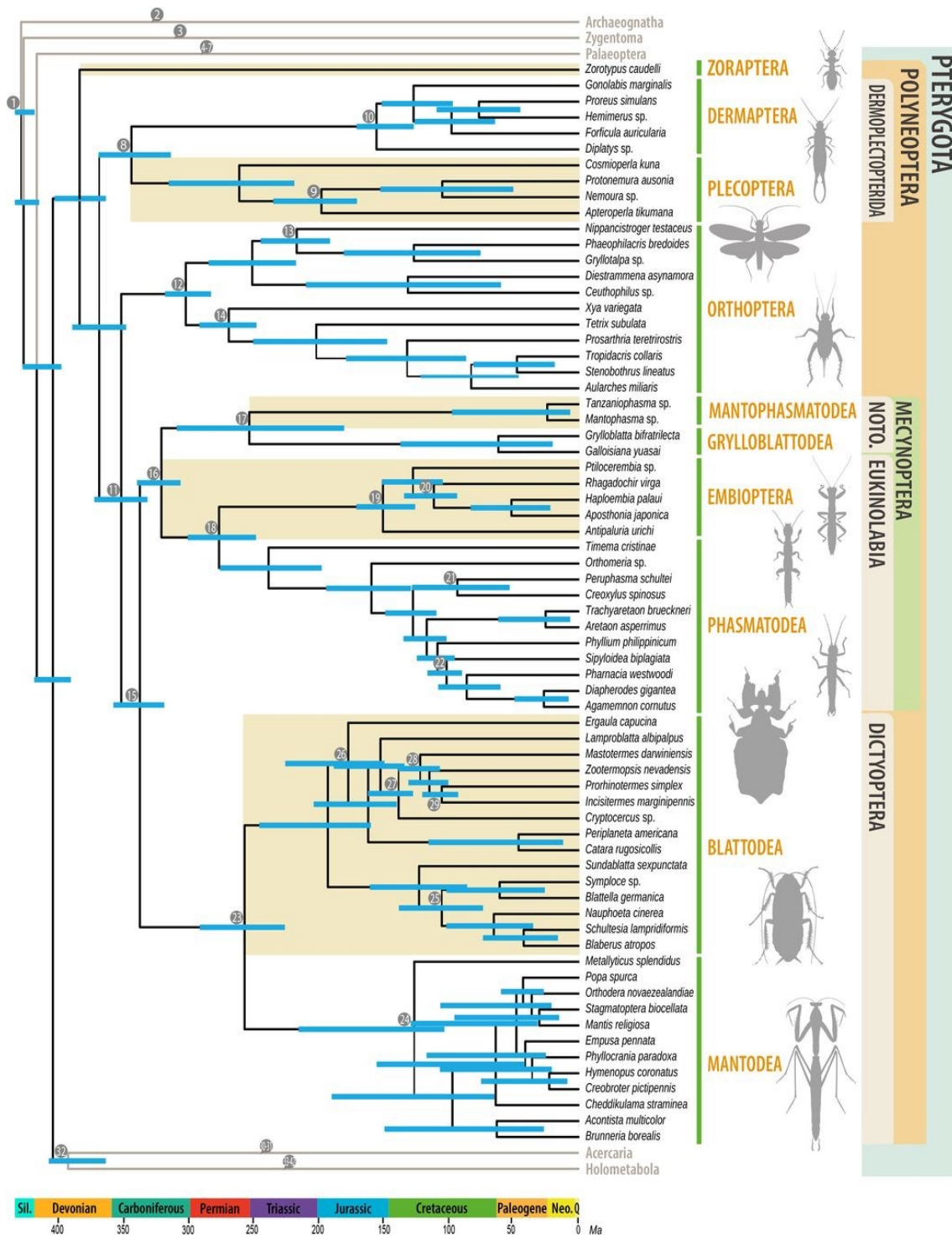
(Grylloblattodea). Vzájemné vztahy této skupiny vůči škvorům (Dermaptera), pošvatkám (Plecoptera) a drobnělkám (Zoraptera) doposud nejsou zcela vyjasněny. Zejména postavení drobnělek je stále kontroverzním tématem. Autoři se shodují, že pravděpodobná je hypotéza a) z Obrázku č. 3, kde jsou škvoři (Dermaptera) a pošvatky (Plecoptera) sesterskými k ostatním („core Polyneoptera“) a drobnělký (Zoraptera) jsou sesterskou skupinou ke všem ostatním Polyneoptera (Wipfler et al., 2019, Tihelka et al., 2021). Vzájemné vztahy jednotlivých řádů jsou zobrazeny na Obrázku č. 4 níže.



Obrázek č. 3 – postavení drobnělek (Zoraptera) vůči ostatním taxonům Polyneoptera (Tihelka et al., 2021)

Skupina Polyneoptera zahrnuje hmyz s rozmanitými způsoby života, s čímž se pojí odlišnosti morfologie těla nebo potravních preferencí a strategií. Mezi polyneopterní hmyz patří býložravé a všežravé druhy, rovněž pak dravci. Různorodost této skupiny lze demonstrovat na příkladu strašilek či kudlanek, které napodobují mnohdy velmi věrohodně části rostlin nebo na příkladu švábů, pro něž je typické dorsoventrálně zploštělé tělo často s nenápadným zbarvením. Zcela odlišný vzhled nalézáme v rámci řádu Orthoptera – ať už skákavé končetiny zadního páru kobylek a sarančí nebo modifikovaný první pár končetin krtonožek přizpůsobený k životu pod zemí a hrabání chodeb v substrát (Wipfler, et al., 2019). Naopak společnými znaky zástupců skupiny Polyneoptera jsou kousací ústní ústrojí s absencí možných modifikací, kožovitý první pár křídel tvořící krytky (tegminy), rozšířený anální lalok zadních křídel vyjma

snovatek, termitů a drobnělek, dlouhé segmentované cerky či pětičlánkové tarsi se specifickými adhezivními strukturami (tzv. euplantulae) (Beutel et al., 2013, Wipfler et al., 2019). V následujících kapitolách budou představeny vybrané řády Polyneoptera, jejichž zástupce práce studuje.



Obrázek č. 4 – kladogram příbuzenských vztahů v rámci skupiny Polyneoptera (Tihelka et al., 2021).

1.4.1 Škvoři (Dermaptera)

Ačkoliv postavení škvorů ve vztahu k ostatním skupinám hmyzu je poměrně kontroverzní téma (Jarvis et al., 2005, Beutel et al., 2013, Wipfler et al., 2019), zřejmě nejpříbuznějším řádem jsou drobnělky (Zoraptera) (Jarvis et al., 2005) a oba tyto řády byly považovány za sesterské s pošvatkami (Plecoptera) (Flook & Rowell, 1998). Recentněji je uvažováno postavení drobnělek (Zoraptera) a škvorů (Dermaptera) jako sesterské k ostatním Polyneoptera včetně pošvatek (Plecoptera) (Wipfler et al., 2019). Jasně však je, že se jedná o poměrně malý řád ležící na bázi skupiny Polyneoptera. Tento původně tropický taxon žijící v rozličných štěrbinách, detritu či pod kameny s hlavní aktivitou během noci je typický zploštělým podlouhlým tělem. Škvoři patří mezi dobré letce, jež jsou atrahováni světlem. Na konci abdomenu jsou přítomny jednočlánekové cerky sloužící k chytání kořisti, obraně a útoku, občas pro pomoc se skládáním druhého páru křídel (Rasplus & Roques, 2010). Většina druhů je vejcorodá, vajíčka jsou kladena ve snůškách, ačkoliv některé druhy jsou také viviparní (Haas, 2018, Mouret et al., 2023), často se vyskytuje péče o potomstvo (Mouret et al., 2023, School Earwig Genome Consortium, 2023). Známo je přes 2000 druhů (Beutel et al., 2013) v celkem 203 rodech zařazených do jedenácti čeledí (School Earwig Genome Consortium, 2023), v České republice žije celkem sedm původních a dva nepůvodní druhy v celkem šesti rodech (Kočárek et al., 1999, Kočárek et al., 2022, Obrázek č. 5).

AGSD (Gregory, 2023) obsahuje záznam o velikosti jednoho druhu *Labidura riparia* s 2C-hodnotou 1,06 pg.



Obrázek č. 5 – zástupci řádu Dermaptera. Zleva *Chelidura acanthopygia*, *Euborellia arcanum*, *Apterygida media*. Autorem fotografií je Petr Šípek.

1.4.2 „Core Polyneoptera“

Pojem „Core Polyneoptera“ je v této práci použit dle práce Wipflera a kolektivu (2019). Zahrnuje následující taxony: snovatky (Embioptera), strašilky (Phasmatodea), rovnokřídlé (Orthoptera), švábi (Blattodea) a kudlanky (Mantodea) dohromady tvořící monofyletický taxon Dictyoptera, strašilkovce (Mantophasmatodea) a cvrčkovce (Grylloblattodea). Vzájemné vztahy jednotlivých řádů nejsou zcela vyjasněny, nicméně jejich společnými znaky jsou nápadně velký anální lalok, specifická základní stavba ovipositoru a molekulární znaky (Flook & Rowell, 1998). Co do počtu popsanych druhů jsou nejmenšími řády v rámci této skupiny cvrčkovci (Grylloblattodea) a strašilkovci (Mantophasmatodea). Na základě morfologických podobností se předpokládalo, že řád Grylloblattodea popsany na počátku minulého století (Walker, 1914) je úzce příbuzná s taxony Blattodea nebo Grylloidea (Wipfler et al., 2011). Fylogenetické vztahy Grylloblattodea vůči ostatním skupinám byly dlouho nejasné až do roku 2002, kdy došlo k popisu Mantophasmatodea (Klass et al., 2002). Na rozdíl od Mantophasmatodea, jejichž první objevené druhy pochází ze subtropických a tropických oblastí Afriky (Klass et al., 2002), žijí Grylloblattodea v chladnějších oblastech severní polokoule (Kamp, 1973). V současnosti jsou tyto dva taxony jednoznačně považovány za monofylum a společně nazývány jako Xenonomia (Terry & Whiting, 2005, Kjer et al., 2006).

1.4.2.1 Snovatky (Embioptera)

Tito drobní živočichové se vyskytují především v tropických a subtropických oblastech, v Evropě jejich výskyt není příliš častý. Popsáno je nyní asi 400 druhů, přičemž jejich počet je odhadován až na pětinasobek (Szumik et al., 2008). Samice jsou vždy apterní, zatímco samci mohou být jak apterní, tak okřídlení. Život snovatek se odehrává pod kameny, půdním opadem či kůrou stromů, kde jsou díky tarsálním žlázám vytvářeny hedvábné chodby sloužící k úkrytu před predátory či pro úschovu potravy (Obrázek č. 6). Molekulární studie ukázaly, že nejbližšími příbuznými snovatek jsou zřejmě strašilky (Flook & Rowell, 1998, Miller et al, 2012).



AGSD (Gregory, 2023) obsahuje záznam o velikosti jednoho druhu *Oligotoma saundersii* s 2C-hodnotou 5,32 pg (Hanrahan et al., 2011).



Obrázek č. 6 – zástupce řádu Embioptera. *Embia savignyi*. Autorem fotografií je Petr Šípek.

1.4.2.2 Strašilky (Phasmatodea)

Obvykle krypticky žijící strašilky svým tělem věrně napodobují části rostlin, zejména listy či úzké větvičky (Obrázek č. 7). Být takřka neviditelnými je pro strašilky klíčovým aspektem pro přežití, jelikož většina z nich je apterní a okřídlení jedinci nejsou dobrými letci. Schopnost maskovat se je tak ochranou proti predaci. Tito fytofágové žijící v tropech či subtropích jsou velikostí svých těl rekordmany (Bradler & Buckley, 2018). Délka těla některých druhů dosahuje včetně tykadel až přes 50 cm (Bresseel & Constant, 2014). Popsáno je v současnosti přes 3000 druhů (Bradler & Buckley, 2018). Bohužel v současnosti autoři nachází ve složité taxonomii strašilek jedinou shodu, a to že navržený fylogenetický strom dle Günthera (1953), ve kterém byly Phasmatodea klasifikováni do jednotlivých čeledí a podčeledí, odmítají (Bradler & Buckley, 2018). V posledních letech proběhlo několik studií, které se taxonomií Phasmatodea zabývaly, nicméně získaná molekulární data se překrývají jen z části a otázka vzájemných vztahů jednotlivých taxonů strašilek tak nadále zůstává nezodpovězena (Tomita et al., 2011, Goldberg et al., 2015, Bradler & Buckley, 2018, Bank et al., 2021, Bank et al., 2022).

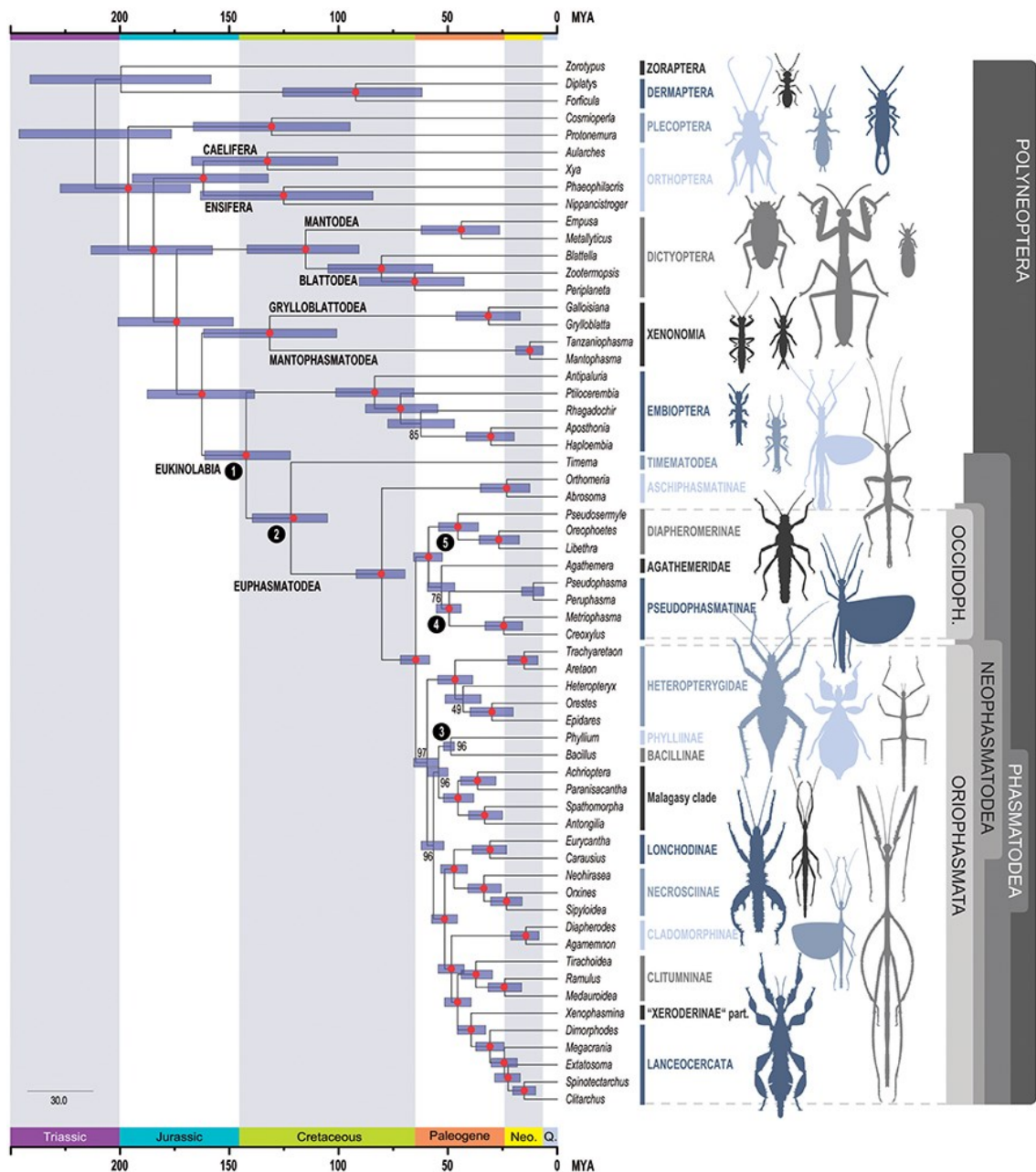
Pro účely této práce byla použita taxonomie dle studie Simon a kolektivu (Simon et al., 2019), ve které jsou rozlišovány dvě sesterské skupiny, Timematodea a Euphasmatodea. Druhově bohatší Euphasmatodea je dále dělena na Aschiphasmatodea, která je sesterská

k ostatním taxonům. V rámci taxonu Neophasmatodea patřícího do Euphasmatodea jsou pak rozlišovány dvě skupiny, Oriophasmata a Occidophasmata. Taxon Oriophasmata představuje „strašilky Starého světa“ a taxon Occidophasmata představuje „strašilky Nového světa“ (Simon et al., 2019). Tyto dva taxony jsou poté dále členěny na jednotlivé čeledi (Heteropterygidae, Bacillinae, Lonchodinae a další, Obrázek č. 8).

AGSD (Gregory, 2023) obsahuje celkem jedenáct záznamů o velikostech genomů strašilek. Devět z nich bylo získáno metodou průtokové cytometrie a jedná se o údaje o sedmi druzích. Rozsah velikostí genomů (2C-hodnoty) databáze udává od 3,90 pg do 5,88 pg, respektive 16,00 pg při zahrnutí údaje získaného pomocí metody Feulgenovy denzitometrie (Marescalchi et al., 1990, Marescalchi et al., 1998, Nagl & Schaffner, 1981).



Obrázek č. 7 – zástupci řádu Phasmatodea. Nahoře zleva *Mearnsiana bullosa*, *Heteropteryx dilatata*, dole zleva *Achrioptera manga*, *Dares philippinensis*. Autorem fotografií je Petr Šípek.



Obrázek č. 8 – příbuzenské vztahy v řádu Phasmatodea (Simon et al., 2021).

1.4.2.3 Rovnokřídlí (Orthoptera)

Monofyletický řád Orthoptera tvořený dvěma sesterskými podřády saranče (Caelifera) a kobytky (Ensifera) zahrnuje více než 20 000 druhů (Flook & Rowell, 1998, Fenn et al., 2008). Monofylie Orthoptera je podpořena jak morfologickými, tak molekulárními daty (Jost & Shaw, 2006, Fann et al., 2008, Zhang et al., 2013). Rovněž Caelifera jsou v současnosti akceptováni jako monofylum (Fenn et al., 2008, Sheffield et al., 2010, Zhang et al., 2013), ačkoliv tomu tak v minulosti nebylo a panovala nejasnost v postavení pacvrčků (Tridactyloidea) (Flook & Rowell, 1998). I přes skutečnost, že někteří autoři

považovali podřád Ensifera za parafyletický (Fenn et al., 2008), panuje v současnosti shoda a stejně jako jeho sesterská skupina je považován za monofylum (Zhang et al., 2013, Zhou et al., 2017).

Podřád kobyly (Ensifera) je v moderním pojetí členěn do šesti recentních nadčeledí: cvrčci (Grylloidea), koníci (Rhaphidophoroidea), kobyly sensu stricto (Tettigonioidae), Hagloidea, Schizodactyloidea a Stenopelmatoidea (Zhang et al., 2013). Někteří autoři však podřád kobyly (Ensifera) člení do dvou skupin, kde první z nich tvoří sesterské taxony Grylloidea a Gryllotalpoidea. Sesterským taxonem ke dvěma výše zmíněným jsou Schizodactyloidea, další sesterskou dvojici pak tvoří Hagloidea a Tettigonioidae, za jejichž sesterskou skupinu je považována nadčeleď Stenopelmatoidea. Nadčeleď Rhaphidophoroidea byla postavena na bázi „ne-grylloidní“ skupiny nadčeledí (Zhou et al., 2017). Postavení Schizodactyloidea považují autoři za nejasné (Zhou et al., 2017). Jiní autoři považují za sesterské nadčeledi Tettigonioidae a Rhaphidophoroidea, které jsou obě sesterskými pro Grylloidea (Fenn et al., 2008, Yuan et al., 2021, Obrázek č. 9).

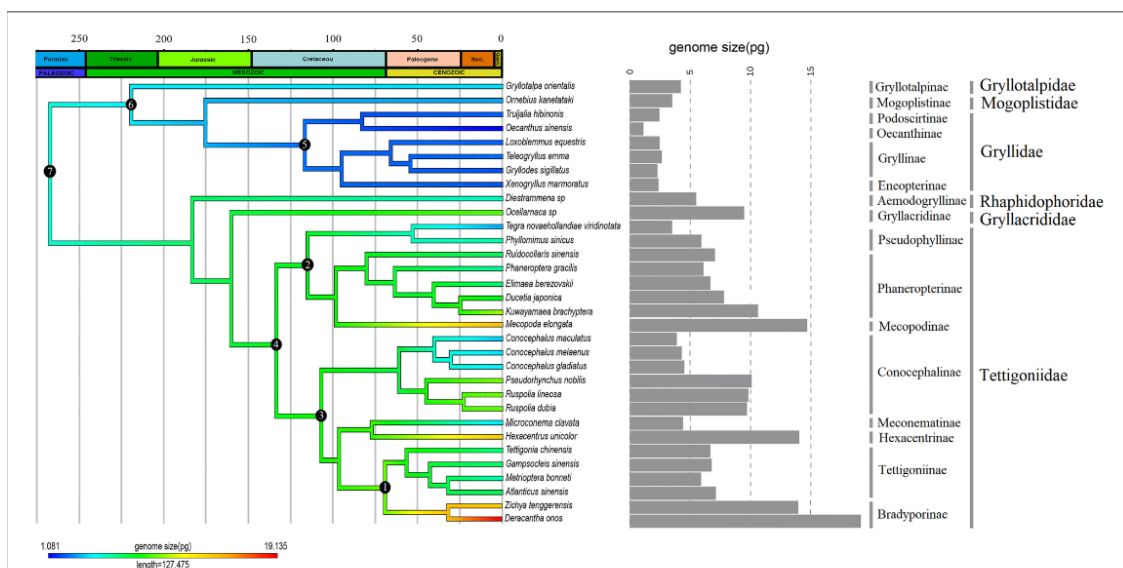


FIGURE 3 | Ancestral reconstruction of the genome size of (female) Ensifera based on a time-calibrated phylogenetic tree. The black circles with numbers on the nodes correspond to the estimated ancestral genome size using fastAnc, BayesTrait, and Mesquite in **Table 2**. The average genome size of each species is shown in a histogram on the right.

Obrázek č. 9 – příbuzenské vztahy v podřádu Ensifera (Yuan et al., 2021)

Autoři se shodují, že taxonem ležícím na bázi podřádu sarančí (Caelifera) jsou pacvrčci Tridactyloidea (Flook et al., 1999, Zhang et al., 2013). Celek pak dotváří nadčeledi marše (Tetrigoidea), Eumastacoidea, Tanaoceroidea, Trigonopterygoidea,

Pyrgomorphoidea, Pneumoroidea, saranče (Acridoidea) (Flook et al., 1998, Zhang et al., 2013).

Typickým morfologickým znakem rovnokřídlých jsou nápadné končetiny zadního páru uzpůsobené pro skákavý pohyb, pro podřád Ensifera (Obrázek č. 10) pak většinou dlouhá tykadla a výrazné kladélko, naopak zástupci Caelifera mívají zpravidla tykadla výrazně kratší (Obrázek č. 11), pro oba podřady je pak charakteristickým znakem stridulace. Ve volné přírodě na našem území bylo zaznamenáno 98 druhů rovnokřídlého hmyzu (Kočárek et al., 2013).

AGSD (Gregory, 2023) obsahuje sedmdesát šest záznamů o velikostech genomů rovnokřídlých. Deset z těchto záznamů bylo získáno metodou průtokové cytometrie, přičemž rozsah velikostí genomů je udáván v rozmezí 2C-hodnot od 3,42 pg do 15,22 pg, respektive od 3,10 pg do 32,68 pg při zahrnutí údajů získaných jinými metodami než průtokovou cytometrií (Rasch, 1986, Hanrahan & Johnston, 2011).



Obrázek č. 10 – zástupci podřadu Ensifera. Nahoře zleva *Cosmoderus femoralis*, *Decticus verrucivorus*, dole zleva *Myrmecophilus acervorum*, *Stilpnochlora coulouiana*. Autorem fotografií je Petr Šípek.



Obrázek č. 11 – zástupci podřádu Caelifera. Nahoře *Phymateus leprosus*, dole *Anacridium aegyptium*, vpravo *Pseudoprosopia latirostris*. Autorem fotografií je Petr Šípek.

1.4.2.4 Blattopteroidní komplex (Dictyoptera)

Jedná se o monofyletický taxon zahrnující kudlanky (Mantodea) a šváby (Blattodea) (Cameron et al., 2006, Fenn et al., 2008, Wang et al., 2017). Kudlanky jsou považovány za sesterskou skupinu švábů (Klass & Meier, 2006, Wang et al., 2017), ačkoliv v minulosti se na základě morfologických dat uvažovalo o jejich blízkému příbuzenskému vztahu se strašilkovci (Klass et al., 2002, Cameron et al., 2006). Dlouhodobě nejasná byla pozice termitů, kteří byli dlouhodobě klasifikováni jako samostatný řád hmyzu (Isoptera) v rámci Dictyoptera, nejpozději od roku je 2007 zřejmé, že termiti tvoří vnitřní skupinu švábů a pro celý taxon byl zaveden termín Blattodea (Inward et al., 2007).

Švábi (Blattodea, Obrázek č. 12) jsou někdy označováni jako „Blattaria“, avšak toto označení je používáno pro zástupce bez termitů a jedná se tak o parafylum. Celou skupinu Dictyoptera reprezentuje celkem asi 4 000 druhů švábů, 3 000 druhů termitů a 2 300 druhů kudlanek (Klass & Meier, 2006). V rámci taxonu Blattodea jsou rozlišovány tři nadčeledi Blaberoidea, Blattoidea a Corydioidea, jejichž vzájemné vztahy jsou stále předmětem diskuzí a prozatím nepanuje shoda (Inward et al., 2007, Wang et al., 2017,

Bourguignon et al., 2018, Evangelista et al., 2019). Termiti jsou zřejmě sesterskou skupinou s Cryptocercidae, avšak vztah tohoto uskupení k ostatním taxonům v rámci Blattodea není prozatím vyjasněn (Inward et al., 2007, Evangelista et al., 2019).

Nemalý význam mají kosmopolitně rozšíření švábi („Blattaria“) napříč rozmanitými habitaty jako jsou lesy, stepi, jeskyně či lidská obydlí. Významnou roli hrají nejenom jako „škůdci“, ale podílí se velkou měrou na rozkladu organické hmoty. Za zmínku rovněž stojí sociální chování švábů, které dostává svého vrcholu v podobě eusociality termitů (Isoptera, Obrázek č. 12). Tropy a subtropy obývají termiti v hnízdech označovaných jako termitišťe a představují významné saprofágy místních ekosystémů ale v globálním měřítku. Termiti patří mezi eusociální hmyz se striktním rozdělením jedinců v rámci kolonie do jednotlivých kast. Zajímavostí je, že královny některých druhů dožívají vyšších jednotek let (Engel et al., 2009, Tasaki et al., 2021). Narozdíl od termitů lze méně početně převážně v tropech žijící kudlanky (Mantodea, Obrázek č. 13) spatřit i v naší přírodě – kudlanka nábožná (*Mantis religiosa*) je dnes běžnou součástí teplejších oblastí České republiky (Hudec et al., 2007). Jejich klasifikace na úrovni čeledí je nejasná, přičemž mnohé z uznaných až patnácti čeledí jsou parafyletickými (Gullan & Cranston, 2014). AGSD (Gregory, 2023) obsahuje dvacet pět záznamů o velikostech genomů Blattodea. Pouze dva z nich byly získány metodou průtokové cytometrie, a to v podřádu Isoptera (Hanrahan & Johnston, 2011). Při zahrnutí údajů získaných za pomoci dalších metod je rozsah velikostí genomů (2C-hodnot) od 1,16 pg do 10,30 pg (Koshikawa et al., 2008). V databázi je zaneseno pět záznamů o velikostech genomů kudlanek.



Obrázek č. 12 – zástupci řádu Blattodea. Zleva *Cryptocercus punctulatus*, *Macrotermes convulsionarius*, (iNaturalist contributors, 2023).



Obrázek č. 13 – zástupci řádu Mantodea. Nahoře *Pseudempusa pinnapavonis*, dole *Ameles decolor*, vpravo *Mantis religiosa*. Autorem fotografií je Petr Šípek.

1.4.3 Pošvatky (Plecoptera)

Pošvatky jsou pravděpodobně sesterskou skupinou všech „core“ polyneopterních taxonů, mezi které patří rovnokřídlí, švábi, kudlanky, strašilky, snovatky, strašilkovci a cvrčkovci. (Wipfler et al., 2019, Tihelka et al., 2021). Jedná se o kosmopolitně rozšířený



monofyletický řád čítající přes 2 000 popsaných druhů, členěný do patnácti čeledí (Zwick, 2009). Vodní larvy žijí několik let, zatímco dospělci (Obrázek č. 14) se dožívají pouze několika týdnů. Aktivita dospělců je tak omezena na rozmnožování.

Obrázek č. 14 – zástupce řádu Plecoptera. Autorem fotografie je Petr Šípek.

2 Cíle práce

1. Rozšířit znalost velikosti genomů v rámci skupiny Polyneoptera metodou průtokové cytometrie.
2. Porovnat absolutní velikosti a rozsah velikostí genomů v rámci jednotlivých řádů Polyneoptera a srovnat je s hodnotami známými pro ostatní skupiny hmyzu.
3. Ověřit dosavadní předpoklady, že největší genomy v rámci skupiny Polyneoptera a potažmo i Insecta mají zástupci řádu Orthoptera.
4. Identifikovat v rámci skupiny druhy, které by se mohly uplatnit jako potenciální standardy pro využití v FCM studiích.

3 Metodika

3.1 Materiál a jeho příprava

Celkem bylo v rámci této diplomové práce analyzováno osmdesát osm druhů hmyzu ze skupiny Polyneoptera, z toho čtyři druhů z řádu Dermaptera, čtyři druhy z řádu Embioptera, čtrnáct druhů z řádu Mantodea, sedmnáct druhů z řádu Phasmatodea, čtyřicet šest druhů z řádu Orthoptera, jeden druh z podřádu Isoptera a dva druhy z řádu Plecoptera. Výčet jednotlivých druhů je zaznamenán v Tabulce č. 4 ve čtvrté kapitole této práce. Zástupci skupin Zoraptera, Grylloblattodea a Mantophasmatodea nebyli analyzováni pro jejich nesnadnou dostupnost. Ze skupiny Blattodea byl analyzován pouze jeden druh termita, neboť téma bylo zpracováno v rámci diplomové práce Magdaleny Stuchlíkové pod záštitou projektu č. 1338120 Grantové agentury Univerzity Karlovy v roce 2020 (Stuchlíková, 2020).

Většina použitého materiálu byla získána z amatérských chovů v rámci výstav a burz bezobratlých, část materiálu pochází z chovů Katedry zoologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy, řada druhů byla rovněž získána sběrem v terénu ať už v rámci českých lokalit nebo zahraničních výjezdů. Pokud to bylo možné, byli analyzováni jedinci obou pohlaví v rámci jednoho druhu. V některých případech se podařilo použít pro analýzu jedince z různých lokalit.

Hmyzí materiál byl použit živý nebo mražený. Při použití mraženého materiálu byly vzorky během přípravy po maximální dobu skladovány na ledu, aby nedošlo k degradaci DNA. Studovanému jedinci byla za pomoci nůžek odebrána tarsální část končetiny, případně celá končetina, pokud se jednalo o jedince menších rozměrů. V některých případech bylo dosaženo lepších výsledků analýz při použití čerstvě zamražených vzorků oproti vzorkům odebíraným ze živých exemplářů. Odebraná tkáň byla společně s adekvátním množstvím standardu umístěna do Petriho misky a pipetou doplněna o 800 μ l pufru Otto I uchovávaného v chladničce. Materiál byl následně homogenizován žiletkou a přefiltrován do zkumavky přes nylonový filtr. Pufr Otto I byl připravován rozpuštěním 4,2 g 0,1 M monohydrátu kyseliny citronové a 1 ml 0,5% Tween 20 v destilované vodě. Vzniklý roztok byl přelit do analytické baňky, doplněn o destilovanou vodu a přefiltrován (Doležel et al., 2007). Po přípravě byl roztok uchováván v chladničce při teplotě 4 °C. Otto I zajišťuje rozrušení cytoplazmy a uvolnění jader (Loureiro et al.,

2006). Vzorek byl poté obarven 1 ml roztoku složeného z pufru Otto II, fluorescenčního barviva propidia iodidu, RNázy A a antioxidantu β -mercaptoethanolu. Pufir Otto II byl připravován rozpuštěním 28,65 g 0,4 M dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného v destilované vodě. Roztok byl následně přelit do analytické baňky a doplněn o destilovanou vodu a přefiltrován (Doležel et al., 2007). Po jeho přípravě byl uchováván v tmavém místě za pokojové teploty (Doležel & Göhde, 1995).

K analýze vzorků bylo použito vzhledem k výraznému rozsahu naměřených hodnot velikostí genomů studovaných druhů několik rostlinných standardů: lilek višňový (*Solanum pseudocapsicum*), hrách setý (*Pisum sativum*), sedmikráska obecná (*Bellis perennis*), ostřice ostrá (*Carex acutiformis*) a bob obecný (*Vicia faba*). 2C-hodnoty použitých standardů jsou uvedeny v Tabulce č. 3. Rostlinné standardy nejsou u živočichů doporučovány, nicméně jsou celkem běžně používány (Sadílek et al., 2019, Stuchlíková, 2020, Hawlitschek et al., 2023)

Tabulka č. 3 – 2C-hodnoty použitých standardů

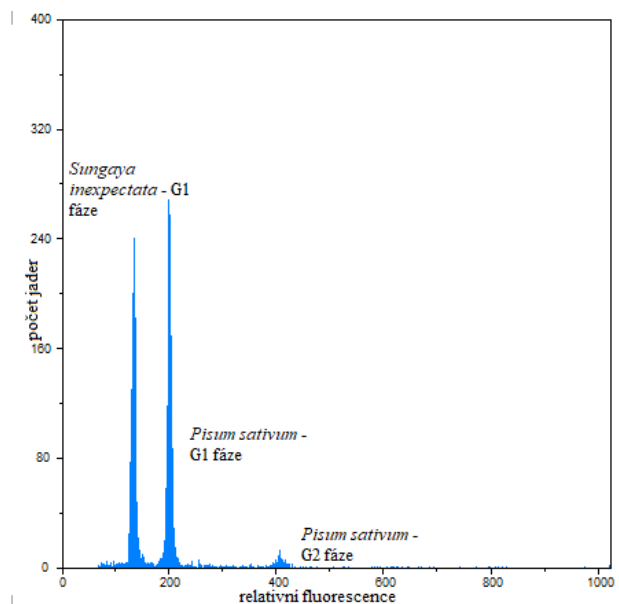
český název	latinský název	2C-hodnota (pg)
ostřice ostrá	<i>Carex acutiformis</i>	0,82
lilek višňový	<i>Solanum pseudocapsicum</i>	2,61
sedmikráska obecná	<i>Bellis perennis</i>	3,38
hrách setý	<i>Pisum sativum</i>	9,09
bob obecný	<i>Vicia faba</i>	26,9

Měření vzorků probíhalo v cytometrické laboratoři katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy. Každý ze vzorků (respektive každý jednotlivý druh) byl měřen alespoň dvakrát ve dvou po sobě jdoucích dnech z důvodu zajištění co nejvyšší možné přesnosti, přičemž u některých vybraných druhů hmyzu majících potenciál jako možné budoucí hmyzí standardy probíhalo měření opakovaně. Analýzy byly prováděny na průtokovém cytometru Partec CyFlow SL (Partec, Münster), zdrojem excitačního světla byl zelený (532 nm) solid state laser.

3.2 Vyhodnocení analýz

Výsledné analýzy získané převodem dat do počítače byly vyhodnocovány prostřednictvím programu Partec FloMax 2.4b (Partec GmbH, Münster). Velikost genomu daného druhu hmyzu byla vypočítána na základě vzdálenosti peaků standardu a vzorku na ose x histogramu (Obrázek č. 15) Tento poměr vzdáleností je násoben

2C-hodnotou standardu. Výsledkem je 2C-hodnota vzorku. Vzhledem k opakovaným měřením byly takto získané hodnoty následně průměrovány, čímž byla zajištěna vyšší přesnost. Variační koeficient analýz zahrnutých do této práce nepřesáhl 3 %.



Obrázek č. 15 – histogram z průtokového cytometru v programu Partec FloMax 2.4b (Partec GmbH, Münster): analýza velikosti genomu samce strašilky *Sungaya inexpectata*, standard *Pisum sativum*. Peak v levé části histogramu představuje jádra buněk jedince vzorku (*Sungaya inexpectata*), peak uprostřed patří jádrům buněk rostlinného standardu (*Pisum sativum*), nejmenší peak v pravé části histogramu náleží G2 fázi jader buněk standardu (*Pisum sativum*).

V průběhu G2 fáze buněčného dělení dochází replikací ke zdvojnásobení množství jaderné DNA, proto je i tento nejmenší peak v histogramu ve dvojnásobné vzdálenosti oproti peaku tvořenému jádry buněk v G1 fázi. Tento fakt je třeba brát v úvahu při vyhodnocování analýz. V případě měření polyploidního vzorku, u kterého je přítomna endopolyploidie, může histogram obsahovat i větší množství peaků. Vzdálenost jednotlivých peaků pocházejících z daného jedince bude opět v násobcích, a to v závislosti na počtu chromozomových sad, jež byly zmnoženy.

4 Výsledky

4.1 Naměřené velikosti genomů (2C-hodnoty) u skupiny Polyneoptera

V Tabulce č. 4 jsou uvedeny měřené druhy a jejich 2C-hodnoty vyjádřené v *pg*. 2C-hodnoty byly vypočteny jako prostý průměr hodnot všech analýz daného jedince. Každý z analyzovaných jedinců byl měřen alespoň dvakrát ve dvou po sobě jdoucích dnech. U každého z měřených jedinců je uveden variační koeficient (CV), přičemž do této práce byly zahrnuty pouze analýzy, jejichž hodnota CV nepřesáhla 3 %.

V této diplomové práci bylo analyzováno celkem osmdesát osm druhů hmyzu: čtyři druhy z řádu Dermaptera, čtyři druhy z řádu Embioptera, čtrnáct druhů z řádu Mantodea, čtyřicet šest druhů z řádu Orthoptera, sedmnáct druhů z řádu Phasmatodea, dva druhy z řádu Plecoptera a jeden druh z řádu Blattodea, respektive z podřádu Isoptera.

Tabulka č. 4 – přehled zjištěných velikostí genomů

řád	čeleď	druh	pohlaví	lokality/původ	standard	2C-hodnota (pg)	variální koeficient (%)
Dermoptera	Forficulidae	<i>Apterygida media</i>	NA	Lednice, ČR	X	2,78	2,56
		<i>Euborellia arcanum</i>	F	chovy PřF UK	S	1,79	2,80
			M			1,78	2,71
		<i>Forficula smyrnensis</i>	F	Pades, Řecko	S	1,83	2,76
			M			1,74	2,84
<i>Chelidura acanthopygia</i>	M	Myštice, ČR	S	1,42	2,99		
Embioptera	Embiidae	<i>Embia savignyi</i>	F	Fuerteventura, Španělsko	S	11,00	2,65
		gen. sp. 1	NA	Oskorušno, Pelješac, Chorvatsko	S	7,86	2,93
	NA		ex breed		S	8,15	2,72
	gen. sp. 2		F	Malawi	S	7,71	2,64
		M	S		6,81	2,71	
Mantodea	Empusidae	<i>Empusa fasciata</i>	F	Žuljana, Pelješac, Chorvatsko	S	6,32	2,71
		<i>Empusa pennata</i>	F	Fluminimagiore, Sardinie, Itálie	S	6,34	1,58

řád	čeleď	druh	pohlaví	lokality/původ	standard	2C-hodnota (pg)	variační koeficient (%)
Mantodea	Hymenopodidae	<i>Chlidonoptera lestoni</i>	F	ex breed Eva Volfová	S	10,40	1,88
		<i>Parablepharis kuhlii</i>	M	ex breed Jan Vaněk	S	14,67	2,27
		<i>Phyllocrania paradoxa</i>	F	chovy PřF UK	P	8,90	2,43
			M		P	7,87	2,47
	Mantidae	<i>Ameles decolor</i>	F	Žuljana, Pelješac, Chorvatsko	S	11,14	2,72
		<i>Ameles spallanzania</i>	F	Žuljana, Pelješac, Chorvatsko	S	6,20	2,97
		<i>Mantis religiosa</i>	F	Bulharsko	S	8,16	2,71
			F	Capo Pecora, Sardinie, Itálie	S	8,52	2,83
		<i>Parasphendale agrionina</i>	M	Tanzánie	S	9,26	2,37
		<i>Photina sp.</i>	M	ex breed Eva Volfová, Jižní Amerika	S	4,20	2,76
		<i>Popa spurca</i>	F	ex breed	S	14,42	2,69
			M		S	4,19	2,94
		<i>Pseudempusa pinnapavonis</i>	M	ex breed Eva Volfová, Tanzánie	S	8,64	2,40
		<i>Sphodromantis viridis</i>	F	Řecko	S	10,54	2,61
<i>Zoolea lobipes</i>	F	ex breed Eva Volfová	S	10,77	2,92		

řád	čeleď	druh	pohlaví	lokality/původ	standard	2C-hodnota (pg)	variační koeficient (%)
Phasmatodea	Occidophasmata	<i>Anisomorpha paromalus</i>	F	ex breed	V	5,94	2,41
			M	ex breed	V	5,75	2,47
	Oriophasmata	<i>Achrioptera manga</i>	F	ex breed	P	6,08	2,95
			M	ex breed	P	5,39	2,97
			F	ex breed	V	5,94	2,22
		<i>Dares philippinensis</i>	F	ex breed	P	12,62	2,68
			M	ex breed	P	7,26	2,75
		<i>Eurycantha calcarata</i>	F	ex breed, Nová Británie	V	4,65	2,19
			M	ex breed, Nová Británie	V	4,11	2,49
		<i>Eurycantha horrida</i>	F	ex breed	V	4,51	2,72
		<i>Heteropteryx dilatata</i>	F	ex breed	P, V	70,33	2,33
			M	ex breed	V	70,22	2,26
		<i>Lamachodes</i> sp. "Bokor"	F	Bokor, Kambodža	P	11,77	2,58
		<i>Lobofemora scheirei</i>	M	ex breed	V	6,82	2,33
		<i>Mearnsiana bullosa</i>	F	Mt Apo, Mindanao, Filipíny	P	6,82	2,44
			M		P	6,35	2,73
			F	ex breed	P	6,95	2,62
		<i>Medauroidea extradentata</i>	F	ex breed	V	8,06	2,54
		<i>Neohirasea maerens</i>	F	ex breed	P	12,84	2,67
			M	ex breed	P	12,00	2,91

řád	čeleď	druh	pohlaví	lokality/původ	standard	2C-hodnota (pg)	variační koeficient (%)
Phasmatodea	Oriophasmata	<i>Phasma gigas</i>	F, nymfa	ex breed	V	10,75	2,78
		<i>Pylaemenes guangxiensis</i>	NA	ex breed	P	29,20	2,66
		<i>Sungaya inexpectata</i>	F	ex breed	P	6,69	2,38
			M	ex breed	P	6,27	2,57
		<i>Tisamenus</i> sp. "Palaui"	F	Palaui, Filipíny	P	5,15	2,98
			M	Palaui, Filipíny	P	5,08	2,57
		<i>Trachyaretaon</i> sp. "North Luzon"	F	ex breed	V	6,91	2,35
			M	ex breed	V	6,85	2,72
<i>Trachythorax</i> sp. "Kon Chu Rang"	F	ex breed	P	5,38	2,60		
	M	ex breed	P	5,15	2,84		
Blattodea	Rhinotermitidae	<i>Reticulitermes</i> cf. <i>lucifugus</i>	NA	Oskorušno, Pelješac, Chorvatsko	X	2,18	2,99
Plecoptera	Chloroperlidae	gen.sp.	F	Závišín, ČR	P	1,55	2,98
			M		P	2,64	2,97
	NA	gen.sp.	M	Myštice, ČR	P	1,09	2,98

řád	podřád	nadčeleď	čeleď	druh	pohlaví	lokalita/původ	standard	2C-hodnota (pg)	variální koeficient (%)
Orthoptera	Ensifera	Grylloidea	Gryllidae	<i>Grylломorpha dalmatina</i>	F	Mt Nebrodi, Sicílie, Itálie	B	5,05	2,41
				<i>Gryllus campestris</i>	F	Milovice, ČR	S	4,45	2,54
				<i>Homoeogryllus xanthographus</i>	F	chovy PřF UK/Tanzánie	S	3,82	2,11
					NA	chovy PřF UK/Tanzánie	S	3,91	2,34
					NA		S	3,76	2,37
				<i>Nemobius sylvestris</i>	F	ČR	B	6,92	2,97
					M		P	4,76	2,13
				<i>Phaeophilacris bredoides</i>	F	ex breed T. Vajnar, burza Praha	P	5,17	2,65
					M		P	4,92	2,87
			Gryllotalpidae	<i>Gryllotalpa gryllotalpa</i>	M	Lednice, ČR	B	2,54	2,86
			Myrmecophilidae	<i>Myrmecophilus acervorum</i>	NA	Myštice, ČR	P	1,59	2,17

řád	podřád	nadčeleď	čeleď	druh	pohlaví	lokalita/původ	standard	2C-hodnota (pg)	variální koeficient (%)
Orthoptera	Ensifera	Stenopelmatoidea	Gryllacrididae	gen.sp.	F	Malawi	B	8,86	2,69
				<i>Bradyporus dasypus</i>	M	Pepeliště, Severní Makedonie	P	31,52	2,34
		<i>Cosmoderus femoralis</i>	F	import Kamerun	P	24,38	2,74		
		<i>Decticus verrucivorus</i>	NA	Rumunsko	P	11,33	2,65		
		<i>Ephippiger discoidalis</i>	F	Krk, Chorvatsko	P	24,47	2,37		
		<i>Pholidoptera griseoptera</i>	F	Myštice, ČR	P	14,24	2,25		
		<i>Platycleis albopunctata</i>	M	Milovice, ČR	P	13,04	2,38		
		<i>Conocephalus dorsalis</i>	NA	Myštice, ČR	P	7,00	2,62		
		<i>Rhacocleis cf. buchichii</i>	F	Žuljana, Pelješac, Chorvatsko	P	13,32	2,81		
		<i>Saga pedo</i>	F	Pálava, Děvín, ČR	V	52,59	2,98		
		<i>Stilpnochlora coulöniana</i>	F	ex breed Petr Šípek	V	18,67	2,35		
			M		V	15,23	2,46		
		<i>Tettigonia cantans</i>	F	Stráž nad Ohří-Osvinov, ČR	S	14,71	2,85		
		gen.sp.	F	Malta	P	17,08	2,74		

řád	podřád	nadčeleď	čeleď	druh	pohlaví	lokalita/původ	standard	2C-hodnota (pg)	variační koeficient (%)
Orthoptera	Caelifera	Acridoidea	Acrididae	<i>Acrida ungarica</i>	F	Žuljana, Pelješac, Chorvatsko	P	24,67	1,81
				<i>Anacridium aegyptium</i>	F	Menfi, Sicílie, Itálie	P	24,30	1,98
					M		P	22,83	1,92
					F	Žuljana, Pelješac, Chorvatsko	P	23,25	1,85
				<i>Calliptamus italicus</i>	F	Třebíč - Častotice, ČR	P	23,96	2,33
					M		P	22,29	2,56
				<i>Euthystira brachyptera</i>	NA	Slovensko	P	39,43	2,45
				<i>Chorthippus biguttulus</i>	NA	Blšany, ČR	P	24,72	2,31
					NA	Slovensko	P	24,01	2,09
				<i>Chorthippus dorsatus</i>	NA	Slovensko	P	26,49	2,23
				<i>Locusta migratoria</i>	F	chovy PřF UK	P	15,16	2,44
					M		P	14,06	2,65
				<i>Oedaleus decorus</i>	NA	Rumunsko	P	23,76	2,64
				<i>Stethophyma grossum</i>	M	Sokolov, ČR	S	34,79	2,27
				<i>Tetrataenia surinama</i>	F	chovy PřF UK	P	23,89	2,35
M	P	22,82	2,97						
gen. sp.	F	Malta	P	23,86	2,32				
	M		P	22,01	2,51				

řád	podřád	nadčeleď	čeleď	druh	pohlaví	lokalita/původ	standard	2C-hodnota (pg)	variální koeficient (%)
Orthoptera	Caelifera	Acridoidea	Romaleidae	<i>Romalea microptera</i>	F	chovy PřF UK	P	51,23	2,82
					M		P	46,67	2,79
			Romaleidae	<i>Tropidacris collaris</i>	F	chovy PřF UK	P	54,59	2,56
					M		P	52,03	2,47
		Eumastacoidea	Chortypidae	<i>Erianthus versicolor</i>	F	chovy PřF UK	P	6,38	2,96
					Proscopiidae	<i>Pseudoproscopia latirostris</i>	F	chovy PřF UK	P
		M	P	20,36			2,32		
		Tetragoidea	Tetrigidae	<i>Tetrix subulata</i>	F	Myštice, ČR	S	27,21	2,91
					M		S	25,75	2,87
		Pyrgomorphoidea	Pyrgomorphidae	<i>Poekilocerus bufonius</i>	F	Somaliland	P	43,08	2,63

řád	podřád	nadčeleď	čeleď	druh	pohlaví	lokalita/původ	standard	2C-hodnota (pg)	variální koeficient (%)
Orthoptera	Caelifera	Pyrgomorphaeidea	Pyrgomorphaeidae	<i>Dictyophorus griseus</i>	F	Malawi	P	149,33	2,78
				<i>Dictyophorus spumans</i>	F	JAR	V	139,91	2,67
				<i>Taphronota sp.</i>	F	JAR	V	64,56	2,56
				<i>Ochrophlebia cf. cafra</i>	F	JAR	V	33,40	2,74
				<i>Maura cf. bolivari</i>	M	Malawi	P	109,19	2,58
				<i>Phymateus leprosus</i>	F	JAR	P	70,74	2,61
				<i>Zonocerus elegans</i>	F	JAR	P	57,60	2,81
				<i>Zonocerus variegatus</i>	F	Ghana	P	68,51	2,61
		M	P		62,16		2,93		
		Tridactyloidea	Tridactylidae			<i>Xya pfaendleri</i>	F	Rupite, Bulharsko	B
M	B						5,53		2,09

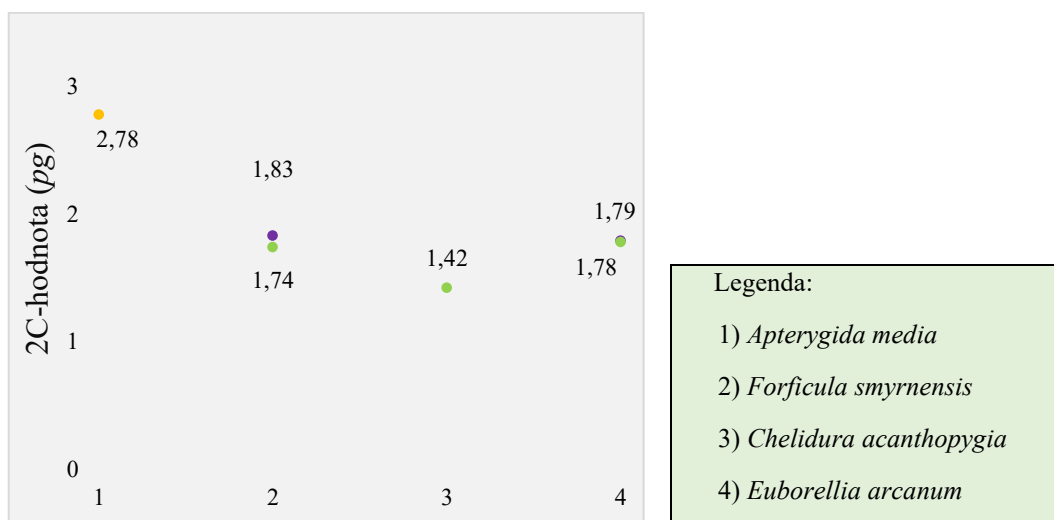
Vysvětlivky k tabulce: *Carex acutiformis* – X, *Solanum pseudocapsicum* – S, *Bellis perennis* – B, *Pisum sativum* – P, *Vicia faba* – V, samice – F, samec – M, nedostupný údaj – NA.

4.2 Velikosti genomů jednotlivých řádů Polyneoptera

V následujících částech budou prezentovány výsledky měření velikostí genomů (2C-hodnoty) pro jednotlivé řády.

4.2.1 Velikosti genomů zástupců řádu škvorů (Dermaptera)

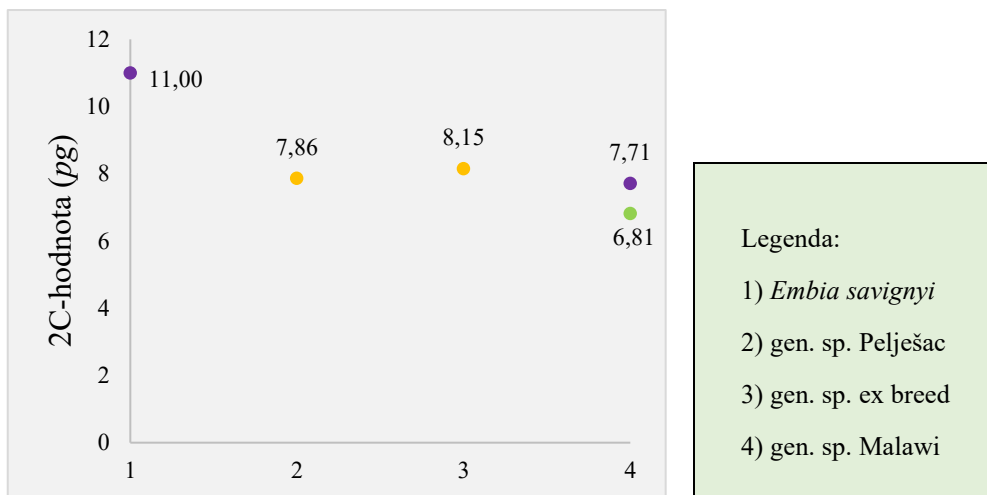
Celkem byly změřeny čtyři druhy škvorů (Dermaptera, Graf č. 1). Nejmenší 2C-hodnota byla zjištěna u samce druhu *Chelidurella acanthopygia* (1,42 pg), naopak největší genom byl zachycen u druhu *Apterygida media* (2,78 pg). Zajímavý je výsledek u druhu *Euborellia arcanum*, kde byla naměřena shodná 2C-hodnota 1,78 pg u obou pohlaví.



Graf č. 1 – velikosti genomů škvorů (Dermaptera). Průměrná 2C-hodnota je označena jedním bodem pro každý druh. Číselný údaj uvedený v grafu vyjadřuje průměrnou 2C-hodnotu daného druhu. Samice jsou vyznačeny fialovými body, samci zelenými body. Jedinci, jejichž pohlaví nebylo determinováno, jsou vyznačeni oranžovými body.

4.2.2 Velikosti genomů zástupců řádu snovatek (Embioptera)

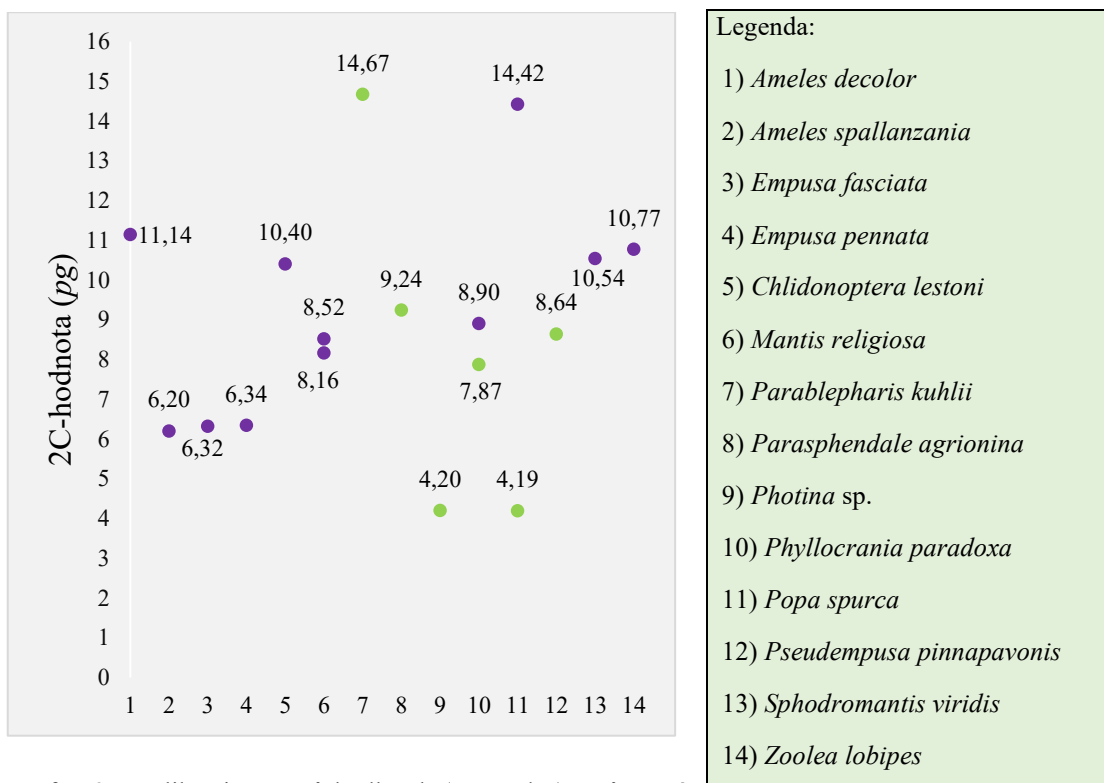
Byly měřeny čtyři druhy snovatek v rozsahu od 6,81 pg do 11,00 pg (2C-hodnoty, Graf č. 2). Nejmenší 2C-hodnota (6,81 pg) byla změřena u samce druhu pocházejícího z Malawi. Největší 2C-hodnota (11,00 pg) byla zachycena u samice druhu *Embia savignyi*.



Graf č. 2 – velikosti genomů snovatek (Embioptera). Průměrná 2C-hodnota je označena jedním bodem pro každý druh. Číselný údaj uvedený v grafu vyjadřuje průměrnou 2C-hodnotu daného druhu. Samice jsou vyznačeny fialovými body, samci zelenými body. Jedinci, jejichž pohlaví nebylo determinováno, jsou vyznačeni oranžovými body.

4.2.3 Velikosti genomů zástupců řádu kudlanky (Mantodea)

Bylo měřeno celkem čtrnáct druhů kudlanek (Mantodea, Graf č. 3). Nejmenší velikost genomu byla zjištěna u druhu *Photina* sp. ($2C=4,20$ pg), naopak největší genom byl zachycen u druhu *Parablepharis kuhli* ($2C=14,67$ pg).

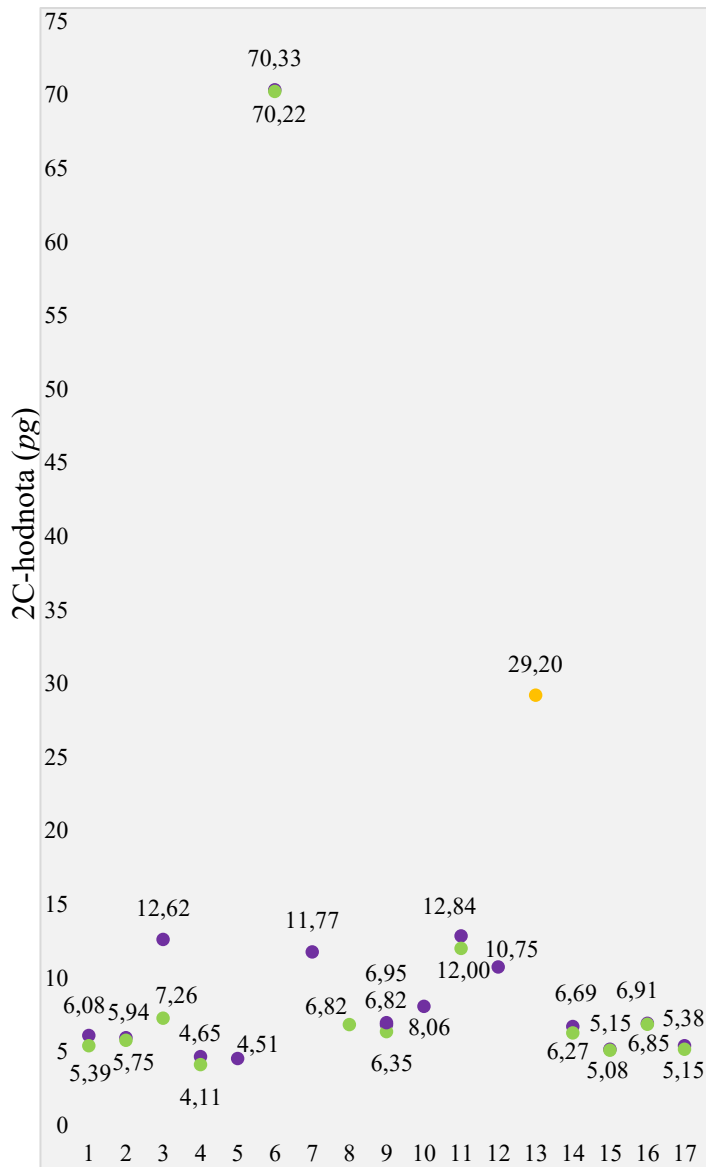


Graf č. 3 – velikosti genomů kudlanek (Mantodea). Průměrná 2C-hodnota je označena jedním bodem pro každý druh. Číselný údaj uvedený v grafu vyjadřuje průměrnou 2C-hodnotu daného druhu. Samice jsou vyznačeny fialovými body, samci zelenými body.

4.2.4 Velikosti genomů zástupců řádu strašilk (Phasmatodea)

Graf č. 4 obsahuje 2C-hodnoty všech měřených druhů řádu Phasmatodea. Nejmenší naměřená velikost genomu v rámci této práce 5,08 pg byla zjištěna u samce druhu *Tisamenus* sp. "Palau", samice téhož druhu měla o 1,38 % větší genom (5,15 pg). Naopak největší genomy byly zjištěny u obou pohlaví druhu *Heteropteryx dilatata*. Tento druh byl měřen ve více opakováních vzhledem k překvapivě velkému genomu ve srovnání s ostatními druhy tohoto řádu, vyloučení chyby měření a také by se mohlo jednat o kandidáta na nový živočišný standard s velkým genomem. Jak ukazuje Tabulka č. 5 níže, průměrná velikost genomu (2C-hodnota) měřených samců byla zjištěna v hodnotě 70,22 pg, zatímco u samic byl zjištěn průměrně genom větší, 70,33 pg. Jedná se tak o jeden z největších genomů doposud zjištěných u hmyzu.

Větší množství opakování bylo provedeno také u druhů *Medauroidea extradentata* (Tabulka č. 6) a *Sungaya inexpectata* (Tabulka č. 7), a to z důvodu možného zavedení těchto druhů jakožto nových hmyzích standardů. V případě druhu *Medauroidea extradentata* byly měření podrobeny pouze samice vzhledem ke skutečnosti, že se jedná o partenogenetický druh. Celkem u tohoto druhu proběhlo dvacet osm analýz. Průměrná velikost genomu byla zjištěna 8,06 pg, směrodatná odchylka byla pro všechny jedince vypočítána 0,25 pg. *Sungaya inexpectata* byla podrobena celkem dvačtyřiceti měřeními – jedenáct samic a samců po jedné analýze a pět samic a samců po dvou analýzách. Průměrná velikost genomu u samic byla zjištěna 6,69 pg, u samců pak 6,27 pg, směrodatná odchylka byla vypočítána u samic 0,16 pg, u samců 0,14 pg.



Legenda:

- 1) *Achrioptera manga*
- 2) *Anisomorpha paromalus*
- 3) *Dares philippinensis*
- 4) *Eurycantha calcarata*
- 5) *Eurycantha horrida*
- 6) *Heteropteryx dilatata*
- 7) *Lamachodes* sp. "Bokor"
- 8) *Lobofemora scheirei*
- 9) *Mearnsiana bullosa*
- 10) *Medauroidea extradentata*
- 11) *Neohirasea maerens*
- 12) *Phasma gigas*
- 13) *Pylaemenes guangxiensis*
- 14) *Sungaya inexpectata*
- 15) *Tisamenus* sp. "Palau"
- 16) *Trachyaretaon* sp. "North Luzon"
- 17) *Trachythorax* sp. "Kon Chu Rang"

Graf č. 4 – velikosti genomů strašilek (Phasmatodea). Průměrná 2C-hodnota je označena jedním bodem pro každý druh. Číselný údaj uvedený v grafu vyjadřuje průměrnou 2C-hodnotu daného druhu. Samice jsou vyznačeny fialovými body, samci zelenými body. Jedinci, jejichž pohlaví nebylo determinováno, jsou vyznačeni oranžovými body.

Tabulka č. 5 – velikost genomu *Heteropteryx dilatata*

číslo jedince	pohlaví	standard	počet analýz	2C-hodnota (pg)
1	F	V	1	70,59
2	F	V	1	72,01
3	F	V	1	73,22
4	F	V	1	69,03
5	F	V	1	66,79
6	M	V	1	67,06
7	M	V	1	69,51
8	M	V	1	74,57
9	M	V	1	70,94
10	M	V	1	67,44
11	M	V	1	75,43
12	M	V	1	68,22
13	M	V	1	68,62

Tabulka č. 6 – velikost genomu *Medauroidea extradentata*

číslo jedince	pohlaví	standard	počet analýz	2C-hodnota (pg)
1	F	V	2	8,39
2	F	V	2	8,55
3	F	V	2	7,78
4	F	V	2	7,99
5	F	V	2	7,98
6	F	V	2	7,70
7	F	V	2	7,72
8	F	V	2	7,72
9	F	V	2	7,80
10	F	V	1	8,06
11	F	V	1	8,35
12	F	V	1	8,40
13	F	V	1	8,12
14	F	V	1	8,21
15	F	V	1	8,18
16	F	V	1	8,07
17	F	V	1	8,03
18	F	V	2	8,00

Tabulka č. 7 – velikost genomu *Sungaya inexpectata*

číslo jedince	pohlaví	standard	počet analýz	2C- hodnota (pg)
1	F	P	1	6,26
2	F	P	1	6,53
3	F	P	1	6,86
4	F	P	1	6,69
5	F	P	1	6,57
6	F	P	1	6,78
7	F	P	1	6,90
8	F	P	1	6,73
9	F	P	1	6,80
10	F	P	1	6,54
11	F	P	1	6,57
12	F	P	2	6,85
13	F	P	2	6,86
14	F	P	2	6,70
15	F	P	2	6,70
16	F	P	2	6,64
17	M	P	1	6,47
18	M	P	1	6,13
19	M	P	1	6,29
20	M	P	1	6,49
21	M	P	1	6,46
22	M	P	1	6,25
23	M	P	1	6,26
24	M	P	1	6,19
25	M	P	1	6,31
26	M	P	1	6,13
27	M	P	1	6,22
28	M	P	2	6,09
29	M	P	2	6,15
30	M	P	2	6,40
31	M	P	2	6,44
32	M	P	2	6,09

4.2.5 Velikosti genomů zástupců řádu rovnokřídlí (Orthoptera)

Celkem bylo analyzováno padesát dva druhů řádu Orthoptera. Z podřádu Ensifera bylo vyhodnoceno dvacet druhů, z toho pět druhů čeledi Gryllidae, jeden druh čeledi Gryllotalpidae, jeden druh čeledi Myrmecophilidae, jeden druh čeledi Gryllacrididae a jedenáct druhů čeledi Tettigoniidae. Z podřádu Caelifera bylo vyhodnoceno dvacet šest druhů, z toho deset druhů čeledi Acrididae, dva druhy čeledi Romaleidae, jeden druh

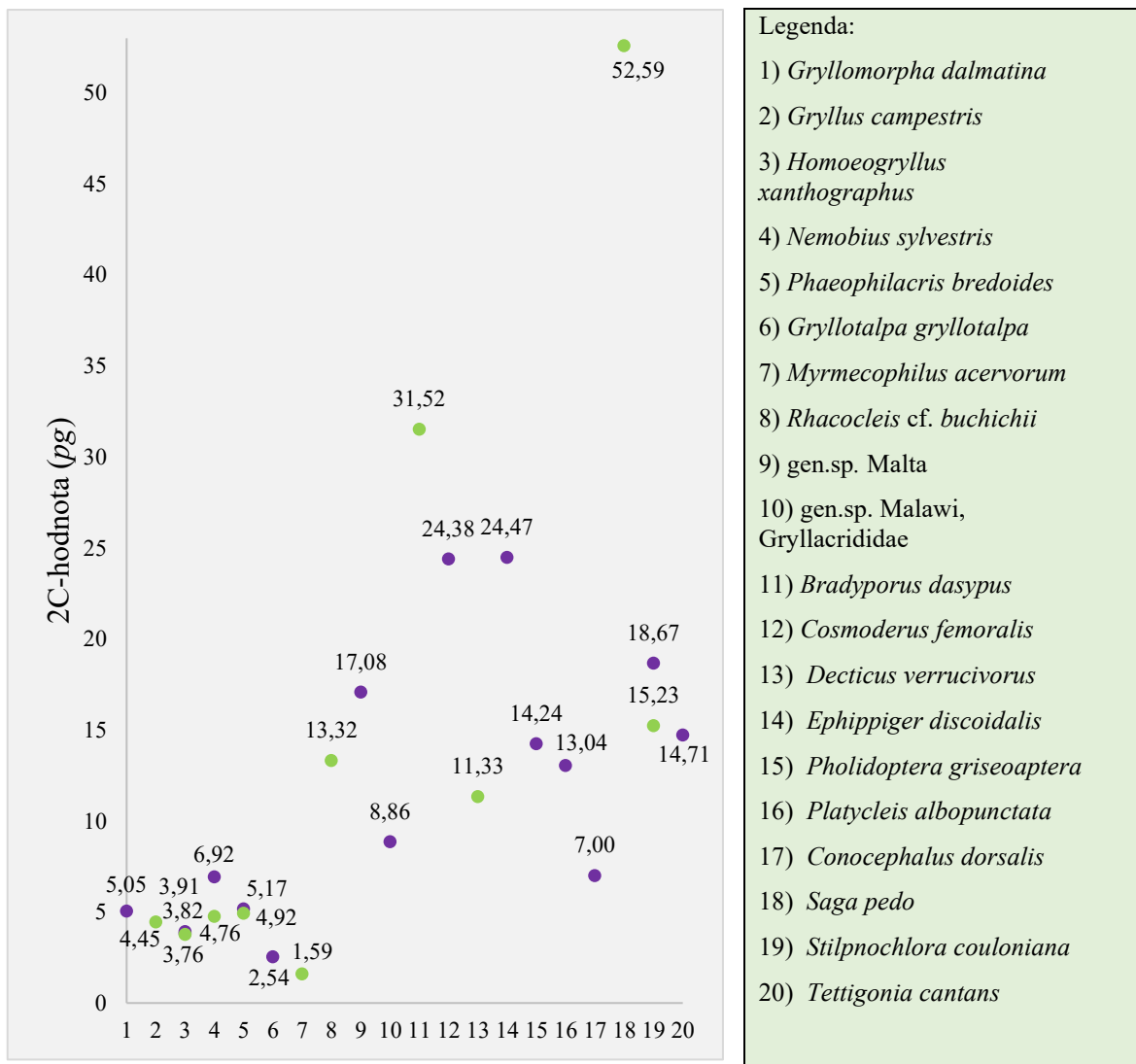
čeledi Chorotypidae, jeden druh čeledi Proscopiidae, devět druhů čeledi Pyrgomorphidae, jeden druh čeledi Tetrigidae a jeden druh čeledi Tridactylidae.

4.2.5.1 Kobylky (Ensifera)

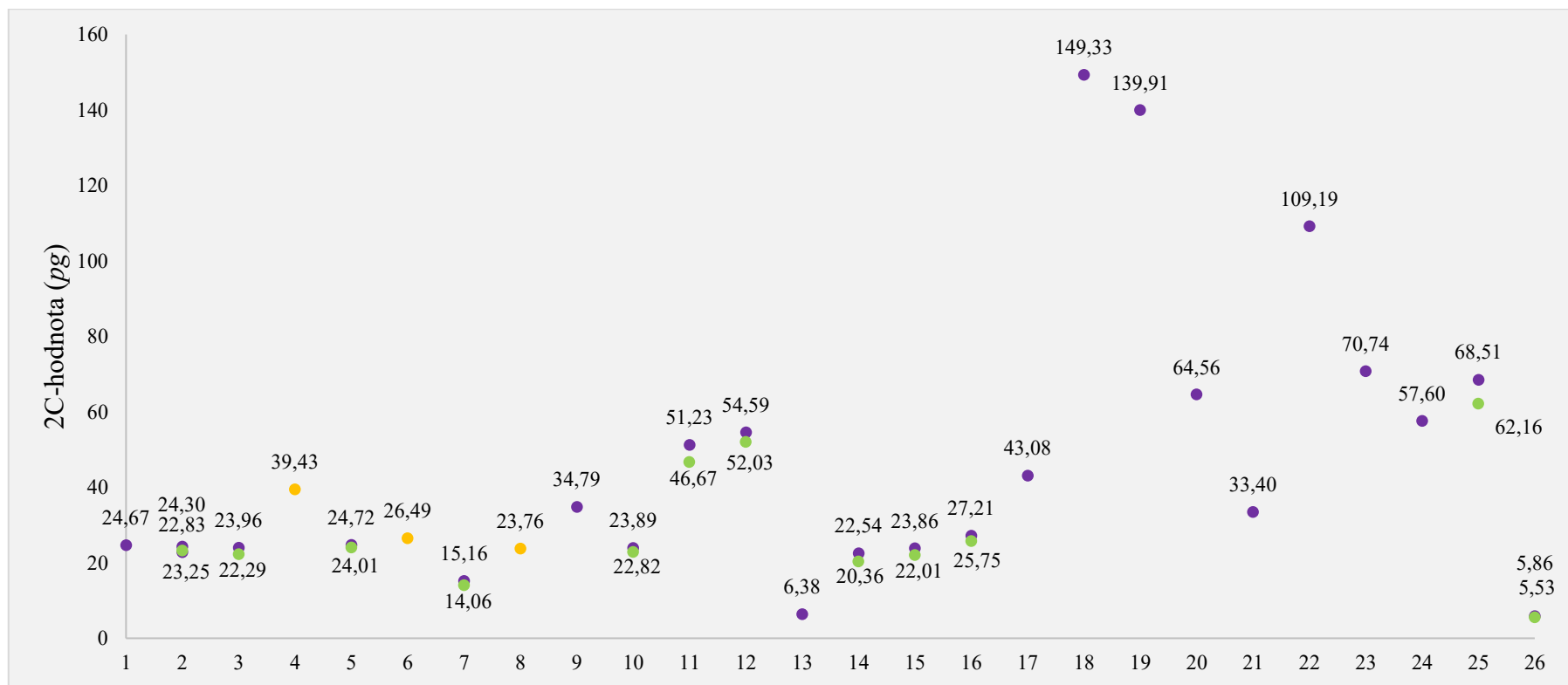
V jednotlivých čeledích byly zaznamenány velikosti genomů v následujících rozmezích 2C-hodnot (Graf č. 5): Gryllidae od 3,76 pg do 6,92 pg, Tettigoniidae od 4,70 pg do 52,59 pg. V čeledích Gryllotalpidae, Gryllacrididae a Myrmecophilidae bylo měřeno po jednom zástupci.

4.2.5.2 Saranče (Caelifera)

V jednotlivých čeledích byly zaznamenány velikosti genomů v následujících rozmezích 2C-hodnot (Graf č. 6): Acrididae od 14,09 pg do 39,43 pg (*Locusta migratoria*; *Euthystira brachyptera*), Romaleidae od 46,67 pg do 54,59 pg (*Romalea microptera*; *Tropidacris collaris*), Pyrgomorphidae od 33,40 pg do 149,33 pg (*Ochrophlebia* cf. *cafra*; *Dictyophorus griseus*). V čeledích Chorotypidae, Proscopiidae, Tetrigidae, Tridactylidae bylo měřeno po jednom zástupci. Druh *Locusta migratoria* byl podroben většímu množství opakování analýz, jelikož se jedná o možného kandidáta na nový hmyzí standard s potenciálem využití v budoucím výzkumu. Měřena byla obě pohlaví, a to v počtu osm samic a sedm samců. Dohromady proběhlo devatenáct analýz samic a sedmnáct analýz samců. Průměrná 2C-hodnota pro samice byla zjištěna 15,16 pg a pro samce 14,06 pg, směrodatná odchylka pro samice byla vypočítána 0,12 pg a pro samce 0,09 pg (Tabulka č. 8).



Graf č. 5 – velikosti genomů podřádu kobyly (Ensifera). Průměrná 2C-hodnota je označena jedním bodem pro každý druh. Číselný údaj uvedený v grafu vyjadřuje průměrnou 2C-hodnotu daného druhu. Samice jsou vyznačeny fialovými body, samci zelenými body. Jedinci, jejichž pohlaví nebylo determinováno, jsou vyznačeni oranžovými body.



Graf č. 6 – velikosti genomů podřádu Caelifera. Průměrná 2C-hodnota je označena jedním bodem pro každý druh. Číselný údaj uvedený v grafu vyjadřuje průměrnou 2C-hodnotu daného druhu. Samice jsou vyznačeny fialovými body, samci zelenými body. Jedinci, jejichž pohlaví nebylo determinováno, jsou vyznačeni oranžovými body.

Legenda:	13) <i>Erianthus versicolor</i>
1) <i>Acrida ungarica</i>	14) <i>Pseudoproscopia latirostris</i>
2) <i>Anacridium aegyptium</i>	15) gen.sp. Malta, Acrididae
3) <i>Calliptamus italicus</i>	16) <i>Tetrix subulata</i>
4) <i>Euthystira brachyptera</i>	17) <i>Poekilocerus bufonius</i>
5) <i>Chorthippus biguttulus</i>	18) <i>Dictyophorus griseus</i>
6) <i>Chorthippus dorsatus</i>	19) <i>Dictyophorus spumans</i>
7) <i>Locusta migratoria</i>	20) <i>Taphronota</i> sp.
8) <i>Oedaleus decorus</i>	21) <i>Ochrophlebia</i> cf. <i>cafra</i>
9) <i>Stethophyma grossum</i>	22) <i>Maura</i> cf. <i>bolivari</i>
10) <i>Tetrataenia surinama</i>	23) <i>Phymateus leprosus</i>
11) <i>Romalea microptera</i>	24) <i>Zonocerus elegans</i>
12) <i>Tropidacris collaris</i>	25) <i>Zonocerus variegatus</i>
	26) <i>Xya pfaendleri</i>

Tabulka č. 8 – velikost genomu *Locusta migratoria*

číslo jedince	pohlaví	standard	počet analýz	2C-hodnota (pg)
1	F	P	3	15,11
2	F	P	3	15,10
3	F	P	3	15,45
4	F	P	2	15,24
5	F	P	2	15,02
6	F	P	2	15,15
7	F	P	2	15,13
8	F	P	2	15,09
9	M	P	3	14,11
10	M	P	3	14,15
11	M	P	3	14,20
12	M	P	2	13,99
13	M	P	2	14,05
14	M	P	2	13,94
15	M	P	2	14,00

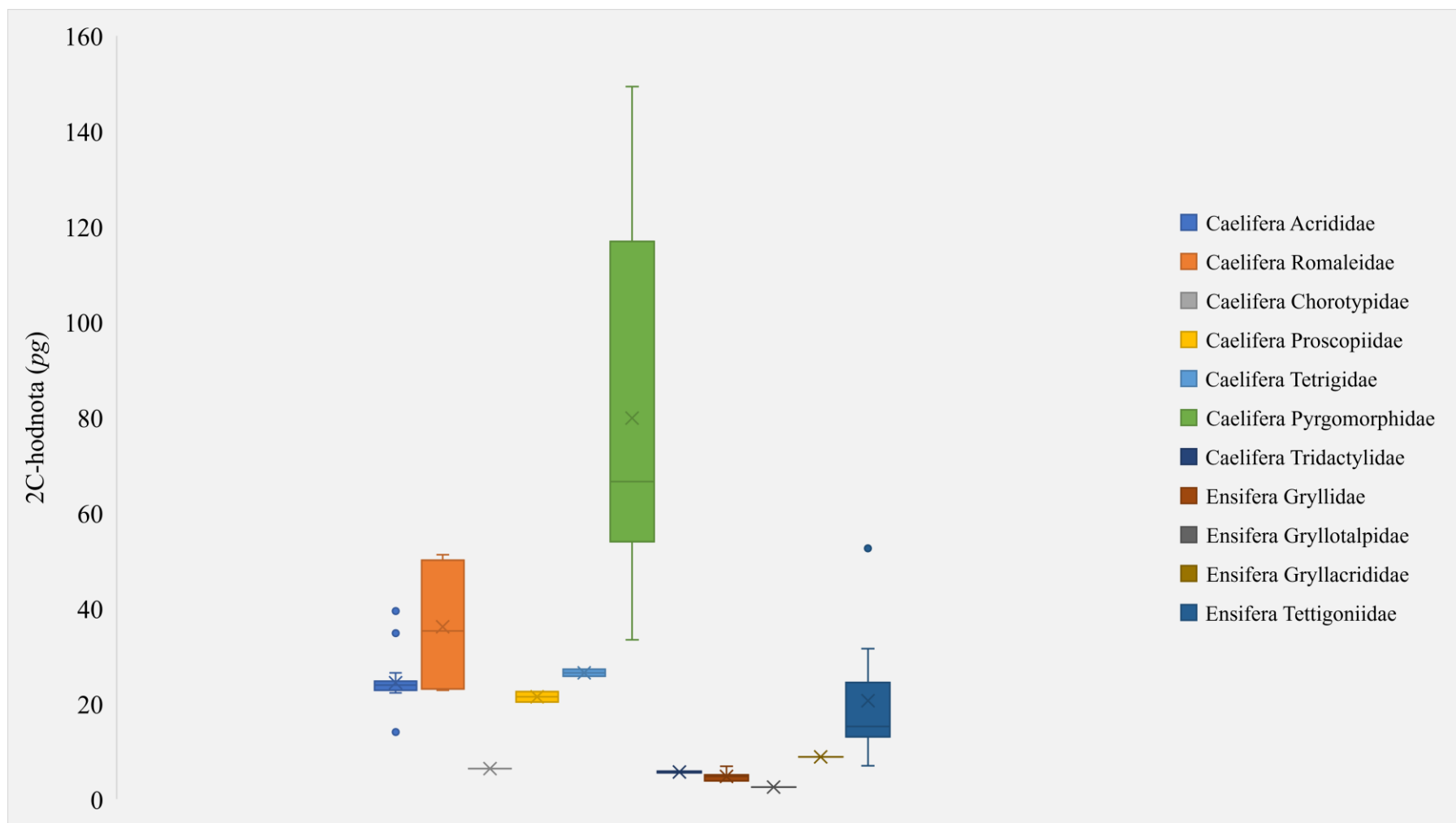
4.2.5.3 Srovnání velikostí genomů v řádu rovnokřídlí (Orthoptera)

Nejmenší naměřený genom $2C=1,59$ pg byl zjištěn u druhu *Myrmecophilus acervorum* (Myrmecophilidae), následovaný druhem *Gryllotalpa gryllotalpa* s hodnotou $2C=2,54$ pg (Gryllotalpidae).

Naopak velké genomy byly zjištěny u druhů *Bradyporus dasypus* (2C=31,52 pg, Tettigoniidae), *Stethophyma grossum* (2C=34,79 pg, Acrididae), *Euthystira brachyptera* (2C=39,43 pg, Acrididae), *Romalea microptera* (2C=51,23 pg F;46,67 pg M, Romaleidae), *Tropidacris collaris* (2C=54,59 pg F, 52,03 pg M, Romaleidae), *Zonocerus elegans* (2C=57,60 pg, Pyrgomorphidae, Obrázek č. 16), *Phymateus leprosus* (2C=70,74 pg, Pyrgomorphidae, Obrázek č. 16), dále pak u druhů *Ochrophlebia cf. cafra* (2C=33,40 pg, Pyrgomorphidae), *Poekilocerus bufonius* (2C=43,08 pg, Pyrgomorphidae) a *Maura cf. bolivari* (2C=109,19 pg, Pyrgomorphidae). Vůbec největší naměřené hodnoty se podařilo získat u druhů *Dictyophorus spumans* (2C=139,91 pg, Pyrgomorphidae, Obrázek č. 16) a *Dictyophorus griseus* (2C=149,33 pg, Pyrgomorphidae, Obrázek č. 16). Škála velikostí genomů řádu Orthoptera se pohybuje od 1,59 pg do 149,33 pg (Graf č. 7).



Obrázek č. 16 – zástupci čeledi Pyrgomorphidae. Nahoře zleva *Zonocerus elegans*, *Phymateus leprosus*, *Dictyophorus spumans*, *Dictyophorus griseus*. Autorem fotografií je Petr Šípek.



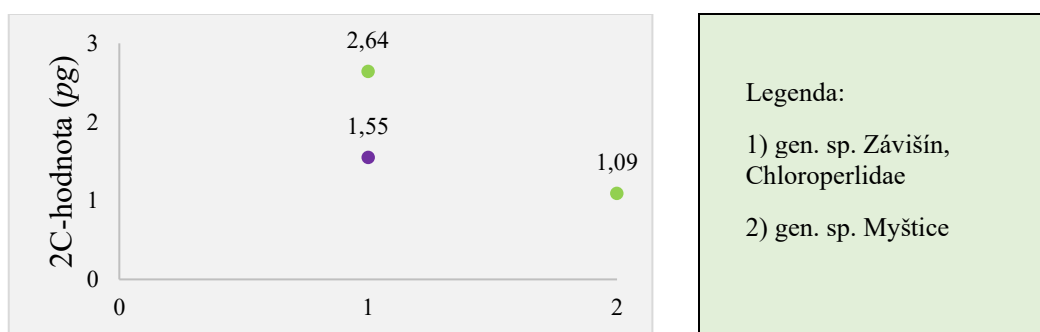
Graf č. 7 – srovnání velikostí genomů mezi čeledmi řádu rovnokřídlí (Orthoptera). Graf č. 7 vizualizuje rozsah zjištěných velikostí genomů pro jednotlivé čeledi v řádu Orthoptera. Každý box plot znázorňuje jednu čeleď. V případě, že byl k dispozici dostatek dat, zobrazuje graf medián, průměr, horní a dolní kvartily. Některé čeledi byly zastoupeny v tomto datasetu jedním či dvěma zástupci, proto v těchto případech nejsou zobrazeny všechny statistické hodnoty.

4.2.6 Velikosti genomů podřádu termiti (Isoptera)

Byl změřen jeden druh termita, *Reticulitermes cf. lucifugus* (Rossi, 1792). Měření byli pohlavní jedinci a dělníci tohoto druhu. Byla zjištěna 2C-hodnota 2,18 pg (Tabulka č. 4).

4.2.7 Velikosti genomů v řádu pošvatky (Plecoptera)

Byly měřeny dva druhy pošvatek ve třech exemplářích. Rozsah naměřených hodnot se pohyboval od 1,09 pg do 2,64 pg. Údaje byly zaneseny do Grafu č. 8.



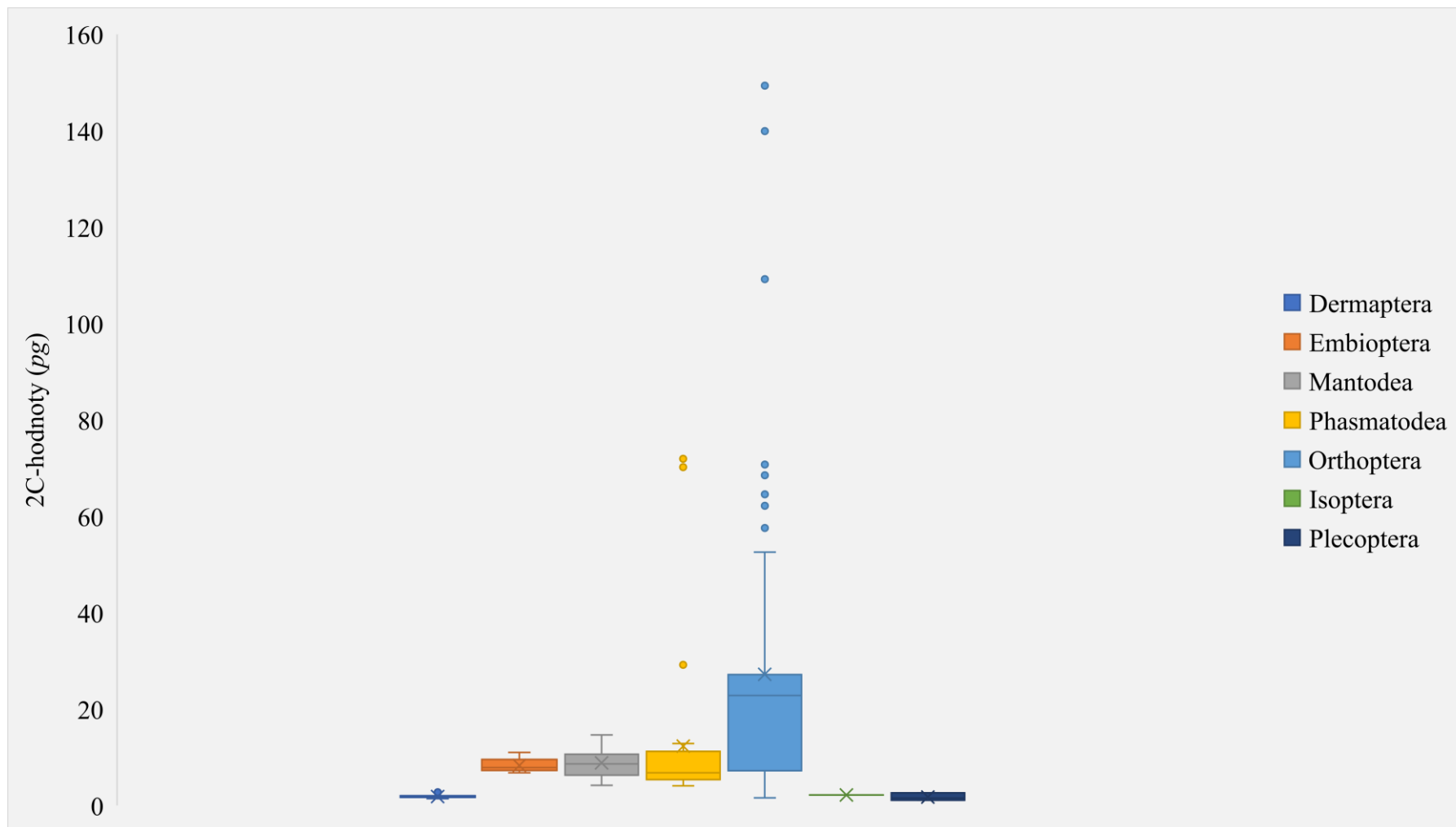
Graf č. 8 – velikosti genomů pošvatek (Plecoptera). Průměrná 2C-hodnota je označena jedním bodem pro každý druh. Číselný údaj uvedený v grafu vyjadřuje průměrnou 2C-hodnotu daného druhu. Samice je vyznačena fialovými body, samci zelenými body.

4.2.8 Srovnání rozsahu velikostí genomů jednotlivých řádů Polyneoptera

V rámci skupiny Polyneoptera byly nejmenší velikosti genomů zaznamenány v řádu Dermaptera, u termita *Reticulitermes cf. lucifugus*, zástupců nadčeledi Grylloidea a zástupců řádu Plecoptera. Taxony Dermaptera, Grylloidea a Plecoptera vykazovaly pouze malý rozsah 2C-hodnot a rozdíly mezi jednotlivými druhy jsou ve srovnání s ostatními řády skupiny Polyneoptera takřka minimální (v řádu jednotek pg). Jak již bylo zmíněno výše, rozsah velikostí v těchto skupinách byl zjištěn od 1,42 pg do 2,78 pg v případě škvorů, od 1,59 pg do 6,92 pg v případě nadčeledi Grylloidea. Nejmenší genomy uvnitř nadčeledi Grylloidea patřily zástupcům čeledi Myrmecophilidae (2C=1,59 pg) a Gryllotalpidae (2C=2,54 pg). Zástupci čeledi Gryllidae vykazovaly genomy o velikostech (2C-hodnotách) od 3,38 pg do 6,92 pg. Naproti tomu největší variabilita 2C-hodnot byla zachycena u zbývajících čeledí řádu Orthoptera následovaným řádem Phasmatodea. Řád Orthoptera, zahrnuje druhy s velikostmi genomu (2C=hodnotami) od 1,59 pg do 149,33 pg. Tento taxon zároveň pokrýval největší část datasetu. Největší genomy (2C-hodnoty) se vyskytovaly hlavně u podřádu Caelifera, u zástupců čeledí Romaleidae v rozsahu od 22,82 pg do 51,23 pg a Pyrgomorphidae v rozsahu od 33,40 pg do 149,33 pg, v čeledi Acrididae s rozsahem 2C-hodnot od 14,06 pg do 39,43 pg.

Jednotlivě pak byly u dvou druhů zachyceny velké genomy (2C-hodnoty) v čeledi Tettigoniidae, a sice 31,52 *pg* a 52,59 *pg*.

Graf č. 9 srovnává zjištěné rozsahy velikostí genomů mezi jednotlivými řády skupiny Polyneoptera. Každý box-plot znázorňuje jeden řád.



Graf č. 9 – srovnání rozsahu velikostí genomů jednotlivých řádů Polyneoptera. Graf č. 9 vizualizuje rozsah zjištěných velikostí genomů pro jednotlivé řády skupiny Polyneoptera. Každý box plot znázorňuje jeden řád. V případě, že byl k dispozici dostatek dat, zobrazuje graf medián, průměr, horní a dolní kvartily. Některé řády byly zastoupeny v tomto datasetu menším počtem zástupců, proto v těchto případech nejsou zobrazeny všechny statistické hodnoty.

5 Diskuse

5.1 Velikosti genomů z hlediska evoluce a ekologie

5.1.1 Velké genomy zástupců řádu Orthoptera

Během mé práce byly nalezeny doposud největší genomy hmyzu, které několikanásobně převyšují svou velikostí doposud publikovaná data. Dosavadním rekordem byla 2C-hodnota změřená u druhu *Bryodemella tuberculata* (2C=43,92 pg F, Hawlitschek et al., 2023). Větší genomy než výše uvedené maximum byly zjištěny u druhů *Dictyophorus griseus* (2C=149,33 pg F), *Dictyophorus spumans* (2C=139,91 pg F), *Phymateus leprosus* (2C=70,74 pg F), *Zonocerus variegatus* (2C=68,51 pg F; 62,16 pg M), *Zonocerus elegans* (2C=57,60 pg), *Tropidacris collaris* (2C=54,59 pg F; 52,03 pg M), *Saga pedo* (2C=52,59 pg F) a *Romalea microptera* (2C=51,23 pg F; 46,67 pg M).

V současné době bylo publikováno několik studií zabývajících se velikostmi genomů Orthoptera. Téměř ve všech skupinách kromě nadčeledí Grylloidea se vyskytují velké genomy (Mao et al., 2020, Yuan et al., 2021, Gregory, 2023, Sun et al., 2023, Hawlitschek et al., 2023). Někteří autoři se domnívají, že za velkými genomy rovnokřídlých stojí polyploidie (Yuan et al., 2021), jiným autorům se toto jeví jako málo pravděpodobné (Hawlitschek et al., 2023). Pro tuto teorii nicméně hovoří fakt, že námi naměřená velikost genomu u druhu *Saga pedo* (2C=52,59 pg) přesahuje doposud největší známé hmyzí genomy, *Saga pedo* je na rozdíl od ostatních evropských zástupců rodů tetraploid (Lokki & Saura, 1980, Dutrillaux et al., 2009). Dalším z uvažovaných důvodů jsou repetitivní sekvence, které byly objeveny u několika zástupců řádu Caelifera (Wang et al., 2014, Shah et al., 2020, Verlinden et al., 2021) nebo velký počet chromozomů, nicméně ani zde nebyla zachycena pozitivní korelace (Hawlitschek et al., 2023). Zvažována také byla korelace mezi velikostí těla a velikostí genomu, která ale nebyla prokázána v čeledích Tettigonidae (Yuan et al., 2021) a Acrididae (Sun et al., 2023). Nicméně jak upozorňují jiní autoři, pro testování této hypotézy bude třeba se zaměřit cíleně na další konkrétní skupiny v jemnějším měřítku (Hawlitschek et al., 2023).

V následujících podkapitolách budou ve třech grafech (č. 10, 11 a 12) znázorněny možné aspekty ovlivňující velikost genomů zástupců Orthoptera. Tabulka č. 9 obsahuje výběr 25 druhů z šesti čeledí, jejichž genomy dosahují největších 2C-hodnot v našem datasetu.

Největší genomy datasetu byly pro účely této práce definovány jako genomy, jejichž 2C-hodnota přesahovala 15 pg. Grafy č. 10, 11 a 12 pracují s daty z Tabulky č. 9. Velikost těla daných druhů uváděná v Tabulce č. 9 vychází z dostupné literatury.

Tabulka č. 9 – přehled vybraných druhů Orthoptera s největšími genomy datasetu

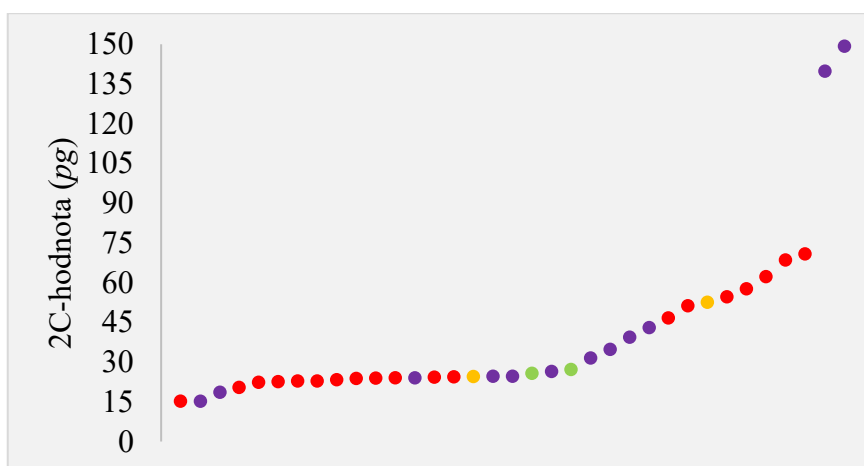
čeleď	druh	pohlaví	2C-hodnota (pg)	velikost těla (mm)
Acrididae	<i>Acrida ungarica</i>	F	24,67	46-56
Acrididae	<i>Anacridium aegyptium</i>	F1	23,25	F:46-70 M:30-56
		F2	24,30	
		M	22,83	
Acrididae	<i>Calliptamus italicus</i>	F	23,96	F:22-40
		M	22,29	M:14-25
Acrididae	<i>Euthystira brachyptera</i>	NA	39,43	F:19-22 M:14-17
Acrididae	<i>Chorthippus biguttulus</i>	NA	24,01	F:16-23
			24,72	M:13-16
Acrididae	<i>Chorthippus dorsatus</i>	NA	26,49	F:18-21 M:13-17
Acrididae	<i>Locusta migratoria</i>	F	15,16	30-60
Acrididae	<i>Oedaleus decorus</i>	NA	23,76	F:25-43 M:18-31
Acrididae	<i>Stethophyma grossum</i>	M	34,79	16-25
Acrididae	<i>Tetrataenia surinama</i>	F	23,89	18-23
		M	22,82	
Romaleidae	<i>Romalea microptera</i>	F	51,23	cca 50-70*
		M	46,67	
Romaleidae	<i>Tropidacris collaris</i>	F	54,59	100-110
		M	53,02	
Proscopiidae	<i>Pseudoproscopia latirostris</i>	F	22,54	F:140-150
		M	20,36	M:80-90
Pyrgomorphidae	<i>Dictyophorus griseus</i>	F	149,33	47-50
Pyrgomorphidae	<i>Dictyophorus spumans</i>	F	139,91	cca 80
Pyrgomorphidae	<i>Phymateus leprosus</i>	F	70,74	50-70
Pyrgomorphidae	<i>Poecillocerus bufonius</i>	F	43,08	55-65
Pyrgomorphidae	<i>Zonocerus elegans</i>	F	57,60	30-40
Pyrgomorphidae	<i>Zonocerus variegatus</i>	F	68,51	30-52
		M	62,16	
Tetrigidae	<i>Tetrix subulata</i>	F	27,21	F:11-15
		M	25,75	M:10-12
Tettigoniidae	<i>Bradyporus dasypus</i>	M	31,52	47-57
Tettigoniidae	<i>Cosmoderus femoralis</i>	F	24,38	cca 50
Tettigoniidae	<i>Ephippiger discoidalis</i>	F	24,47	cca 40
Tettigoniidae	<i>Saga pedo</i>	F	52,59	100-150
Tettigoniidae	<i>Stilpnochlora coulöniana</i>	F	18,67	40-70
		M	15,23	

*velikosti jsou v rámci populací variabilní (Huizenga et al., 2008)

5.1.1.1 Potravní strategie

Druhy uvedené v Tabulce č. 9 byly rozděleny do čtyřech kategorií dle potravní strategie, a to na výhradní fytofágy, polyfágy, detritofágy a dravce a jejich 2C-hodnoty byly zaneseny do Grafu č. 10.

Největší dvě skupiny, fytofágové a polyfágové, zaujímají pozice v celé škále grafu. Lze tedy vyvodit, že alespoň v tomto datasetu neexistuje přímá souvislost mezi zdrojem potravy a velikostí genomu.

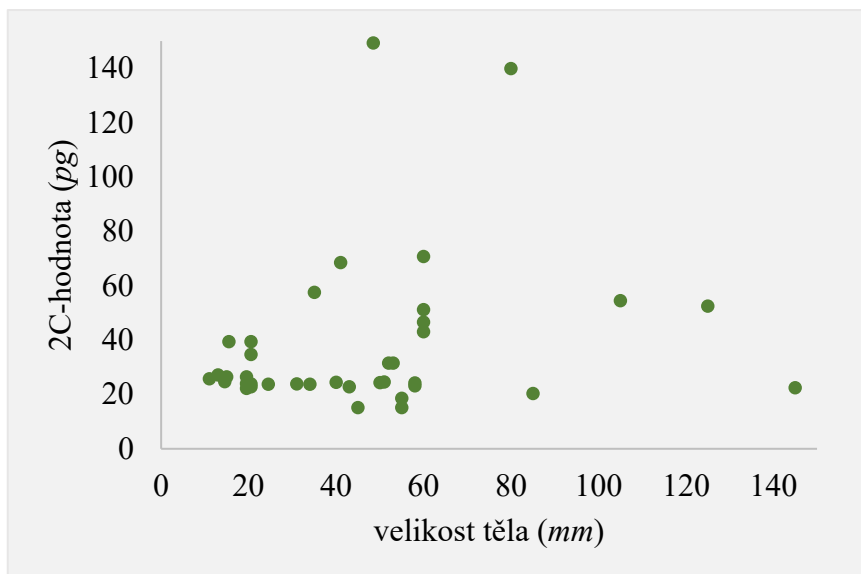


Graf č. 10 – vliv potravní strategie na velikosti genomů Orthoptera. Fytofágní druhy jsou označeny fialovou barvou, polyfágní druhy červenou barvou, detritofágové zelenou barvou a dravci oranžovou barvou.

5.1.1.2 Velikost těla

Do Grafu č. 11 byla zanesena 2C-hodnota druhů uvedených v Tabulce č. 9 v závislosti na velikosti těla daného druhu. Velikostí těla je myšlena délka těla jedince.

V extrémních hodnotách bylo pozorováno několik druhů, a sice *Dictyophorus griseus* (48,5 mm; 2C=149,33 pg), *Dictyophorus spumans* (80 mm; 2C=139,91 pg), *Stilpnochlora coulouiana* (145 mm; 2C=22,54 pg), *Saga pedo* (125 mm; 2C=52,59 pg), *Tropidacris collaris* (105 mm; 2C=54,59 pg) a *Pseudoproscopia latirostris* (85 mm; 2C=20,36 pg). Získaná data naznačují, že velikost (délka) těla nebude pravděpodobně rozhodujícím faktorem pro zvětšení genomu. V dalším výzkumu je tak potenciál srovnat zjištěné velikosti genomů s objemem (robustností) těla vyjádřenou například hmotností měřeného jedince nebo s délkou životního cyklu.



Graf č. 11 – závislost velikosti genomů Orthoptera na velikost těla.

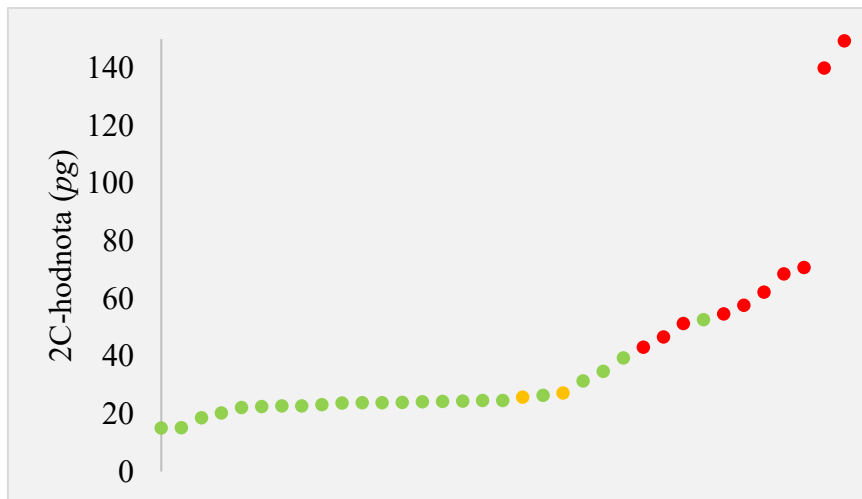
5.1.1.3 Chemická obrana

Do Grafu č. 12 byla zanesena 2C-hodnota druhů uvedených v Tabulce č. 9 v závislosti na přítomnosti toxických látek. Druhy byly rozděleny do třech kategorií:

1. druhy, v jejichž těle se toxické látky nevyskytují
2. druhy, které konzumují rostliny obsahující toxické látky
3. druhy, které konzumují rostliny obsahující toxické látky a zároveň vylučují obranné toxické látky.

Jednotlivé kategorie jsou v Grafu č. 12 znázorněny barevnými body. Zelenými body jsou označeny druhy zařazené do první kategorie, oranžovými body jsou označeny druhy z druhé kategorie, červenými body jsou označeny druhy ze třetí kategorie.

Druhy, v jejichž těle se nevyskytují toxické látky měly zpravidla menší genomy než druhy, které alespoň konzumují rostliny obsahující toxiny. Druhy, které žerou toxické rostliny a zároveň produkují toxické sekrety, měly v našem datasetu největší genomy. Druh *Saga pedo* (2C=52,59 pg) byl zařazen do první kategorie druhů, nicméně jedná se o hmyz, který loví jiné rovnokřídlé či kudlanky. Mohlo by tedy dojít k „sekundární“ konzumaci toxických látek prostřednictvím jiného hmyzího druhu, který se živí rostlinami obsahujícími toxické látky.



Graf č. 12 – závislost přítomnosti toxických látek na velikosti genomů Orthoptera.

5.1.2 Rozdíly ve velikostech genomů zástupců řádu Phasmatodea

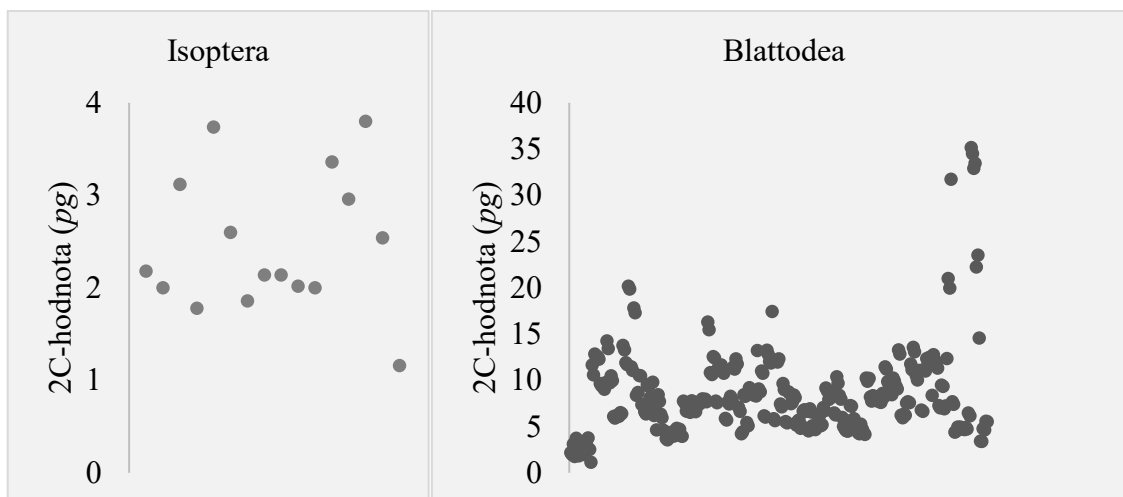
Během mé práce byly zachyceny velikosti genomů (2C-hodnoty) v rozmezí od 5,08 *pg* do 70,33 *pg*. Rozsah 2C-hodnot stejně jako tomu bylo u řádu Orthoptera výrazně převyšuje doposud publikovaná data. Dosavadním rekordem byla 2C-hodnota 16 *pg* naměřená u druhu *Extatosoma tiaratum* (Nagl & Schaffner, 1981).

V následujících podkapitolách budou ve dvou grafech (č. 13 a 14) znázorněny možné aspekty ovlivňující velikost genomů zástupců Phasmatodea.

5.1.2.1 Pohlavní rozmnožování a partenogeneze

V řádu Phasmatodea se vyskytuje značné množství druhů, jež se rozmnožují výhradně nebo za určitých okolností partenogeneticky. U některých druhů se samci vůbec nevyskytují, některé druhy volí tento způsob rozmnožování například pokud není v příhodnou dobu samec přítomen nebo v závislosti na podnebí. Vliv partenogeneze na velikost genomu znázorňuje Graf č. 13 níže. 2C-hodnoty sexuálně se rozmnožujících druhů se pohybují od 4,11 *pg* do 7 *pg*, zatímco velikosti genomů druhů, které se rozmnožují výhradně partenogeneticky, jsou v rozsahu od 3,90 *pg* do 5,88 *pg*. Druhy, které jsou schopné se rozmnožovat oběma způsoby, měly středně velké až velké genomy, a to v rozmezí 2C-hodnot od 6,27 *pg* do 16 *pg*. Dataset doposud známých hodnot by tak mohl poukazovat na souvislost sexuálního rozmnožování a nadprůměrně velkých genomů.

zástupců řádu Blattodea zveřejněné v AGSD, publikované v diplomové práci M. Stuchlíkové (2020) a doplněné o nově změřený druh termita. Jednotlivé body znázorňují průměrnou 2C-hodnotu daného druhu, respektive 2C-hodnotu jednoho pohlaví. Pohlaví jedinců nejsou v tomto grafu rozlišována.



Graf č. 15 – srovnání velikostí genomů v řádu Blattodea. Jednotlivé body znázorňují průměrnou 2C-hodnotu daného druhu, respektive 2C-hodnotu jednoho pohlaví. Pohlaví jedinců nejsou v tomto grafu rozlišována.

5.2 Rozdíly mezi pohlavími a jejich determinace

V souladu s výsledky jiných autorů ukazuje tato práce na více či méně výrazné rozdíly mezi velikostmi genomů u jednotlivých pohlaví stejného druhu (Hanrahan & Johnston, 2011, Picard et al., 2012, Rodrigues et al., 2016, Stuchlíková, 2020, Hawlitschek et al., 2023, Tabulka č. 10). V některých případech se jednalo takřka o zanedbatelný rozdíl, který se dá připsat na vrub odchylce mezi měřeními (tj. je potřeba jej dále testovat). Například u strašilky *Trachyaretaon* sp. "North Luzon" činí rozdíl pouhých 0,90 %, podobně například u strašilky *Tisamenus* sp. "Palau" (1,38 %). Rozdíl mezi samicemi a samci je ovlivněn systémem determinace pohlaví, respektive přítomností heteromorfních pohlavních chromozomů, případně odlišností v počtu chromozomů (Sharaf et al., 2010, He et al., 2016, Hawlitschek et al., 2023). U hmyzu je rovněž známo určení pohlaví na základě ploidní úrovně (např. Hymenoptera, kde samci jsou haploidní, samice diploidní). Pohlavní dimorfismus ve velikosti genomu není přítomen našem datasetu ani v pracích jiných autorů u všech druhů, nicméně pro relevanci získaných výsledků je vhodné vliv pohlaví brát v úvahu (Hanrahan & Johnston, 2011, Yuan et al., 2021, Hawlitschek et al., 2023). Bohužel mnohé studie údaj o pohlaví analyzovaných

jedinců neobsahují a pohlavní dimorfismus ve velikosti genomu pak ztěžuje srovnání výsledků. Zároveň se domnívám, že v některých případech může průtoková cytometrie dopomoci při determinaci pohlaví – například u uniformních druhů u nedospělých stádií, kde tyto znaky nejsou plně vyvinuty. V případě druhů, u kterých je pohlaví determinováno systémem XX/X0 nebo haplo-diploidním systémem lze očekávat výraznější rozdíly mezi samicemi a samci (Aron et al., 2003). Nicméně u švábů, u nichž je pro většinu druhů předpokládán systém determinace pohlaví XX/X0 (Blackmon et al., 2017), byl zaznamenán u druhu *Hyporhichnoda* sp. relativní rozdíl 0,10 %. Některé studie také demonstrují, že systém determinace pohlaví XX/X0 nemusí vždy znamenat větší genom u samic. Příkladem lze uvést druhy *Myrmeleotettix maculatus* a *Chorthippus dorsatus* (Hawlitšček et al., 2023). Pokud se však jedná o druh, kde samec nese chromozomy XY, tedy je heterogametický, pak při uvážení velikosti Y chromozomu dojdeme k závěru, že samičí genom bude vždy větší (Sadílek, 2023). Vzhledem k možným odchylkám měření způsobeným vnějšími podmínkami (Suda, 2005), k možné vnitrodruhové variabilitě (Marescalchi et al., 1998) nebo například užití odlišných standardů, bych se osobně přikláběla k využití této metody pro detekci pohlaví pouze u druhů, kde lze předpokládat výrazný rozdíl ve velikostech genomu samic a samců. U druhů, jejichž genomy nevykazují odlišnosti výrazných rozměrů bych spíše považovala tento způsob determinace pohlaví za doplňkový.

Tabulka č. 10 vyjadřuje relativní rozdíly v procentech mezi zjištěnými 2C-hodnotami samců a samic. Oba tyto údaje ukazují, o kolik % mají jedinci s vyšší hodnotou větší genom (v tomto datasetu měla samice vždy větší genom než samec). Tabulka obsahuje celkem dvacet pět druhů ze třech řádů. Nejvýraznější relativní rozdíly byly zachyceny u druhů *Dares philippinensis* (73,83 %, Phasmatodea), *Nemobius sylvestris* (45,38 %, Orthoptera), *Stilpnochlora coulöniana* (22,59 %, Orthoptera), *Eurycantha calcarata* (13,14 %, Phasmatodea), *Phyllocrania paradoxa* (13,01 %, Mantodea), *Achrioptera manga* (12,80 %, Mantodea), *Pseudoproscopia latirostris* (10,71 %), *Zonocerus variegatus* (10,22 %, Orthoptera), *Romalea microptera* (9,77 %, Orthoptera) a *Mearnsiana bullosa* (8,43 %, Phasmatodea). V dostupné literatuře se rozdíl mezi jedinci opačného pohlaví stejného druhu běžně pohybuje v rozsahu zhruba od 6 % do 20 %.

Samice druhu *Nemobius sylvestris* byla analyzována také v práci Hawlitščka a kolektivu (2023), kde byla stanovena velikost genomu 5,12 pg. Relativní rozdíl mezi samičí

z tohoto a z našeho datasetu činí 35,16 %. V této studii byly vzorky připravovány obdobným způsobem, lišilo se však množství přidaného pufru Otto I (500 μ l) a použitý standard (*Pisum sativum*). Samice z našeho datasetu byla analyzována se standardem *Bellis perennis*, zatímco samec se standardem *Pisum sativum*. Získané výsledky lze interpretovat jako možnou vnitrodruhovou variabilitu nebo výskyt siblings species. Pro testování takových hypotéz ale bude nezbytné proměřit mnohem více jedinců z různých populací, opakovat měření jedinců v rámci jedné populace, vyloučit možnou záměnu při determinaci druhu a provádět analýzy na základě jednotných metodických postupů tak, aby bylo možné data jednoduše porovnávat.

V případě druhů *Popa spurca*, *Stilpnochlora coulouiana* a *Dares philippinensis* byly u obou pohlaví použity stejné standardy. Struktura a počet pohlavních chromozomů těchto druhů nejsou známy. Pokud by pohlaví *Stilpnochlora coulouiana* bylo determinováno systémem XX/X0 tak, jako u mnohých dalších druhů Orthoptera, mohl by být takto velký relativní rozdíl reálným. Neobvyklé rozdíly mezi jedinci různého pohlaví druhů *Popa spurca* a *Dares philippinensis* byly zjištěny bohužel až při finalizaci práce, kdy již nebyla možnost provést opakování analýz. U těchto druhů bude potřeba prověřit, co je příčinou takto výrazných rozdílů.

Tabulka č. 10 – rozdíl ve velikostech genomů mezi pohlavími

řád	druh	relativní rozdíl mezi pohlavími (%)
Dermaptera	<i>Forficula smyrnensis</i>	5,17
Dermaptera	<i>Euborellia arcanum</i>	3,32
Embioptera	gen. sp. 3	13,22
Mantodea	<i>Phyllocrania paradoxa</i>	13,01
Mantodea	<i>Popa spurca</i>	344,15*
Phasmatodea	<i>Achrioptera manga</i>	12,80
Phasmatodea	<i>Anisomorpha paromalus</i>	3,30
Phasmatodea	<i>Dares philippinensis</i>	73,83*
Phasmatodea	<i>Eurycantha calcarata</i>	13,14
Phasmatodea	<i>Heteropteryx dilatata</i>	2,42
Phasmatodea	<i>Mearnsiana bullosa</i>	8,43
Phasmatodea	<i>Neohirasea maerens</i>	7,00
Phasmatodea	<i>Sungaya inexpectata</i>	6,70
Phasmatodea	<i>Tisamenus</i> sp. "Palaui"	1,38
Phasmatodea	<i>Trachyaretaon</i> sp. "North Luzon"	0,90
Phasmatodea	<i>Trachythorax</i> sp. "Kon Chu Rang"	4,47
Orthoptera	<i>Anacridium aegyptium</i>	4,14
Orthoptera	<i>Calliptamus italicus</i>	7,49
Orthoptera	<i>Locusta migratoria</i>	7,82

řád	druh	relativní rozdíl mezi pohlavími (%)
Orthoptera	<i>Nemobius sylvestris</i>	45,38*
Orthoptera	<i>Phaeophilacris bredoides</i>	5,08
Orthoptera	<i>Pseudoproscopia latirostris</i>	10,71
Orthoptera	<i>Tetrix subulata</i>	5,67
Orthoptera	<i>Romalea microptera</i>	9,77
Orthoptera	<i>Stilpnochlora coulouana</i>	22,59
Orthoptera	<i>Tetrataenia surinama</i>	4,69
Orthoptera	<i>Tropidacris collaris</i>	4,92
Orthoptera	<i>Xya pfaendleri</i>	5,97
Orthoptera	<i>Zonocerus variegatus</i>	10,22

*hodnoty je potřeba ověřit.

5.3 Srovnání výsledků s AGSD a další literaturou

V dostupné literatuře je v současnosti k dispozici pouze jediný záznam o velikosti genomu zástupce řádu Dermaptera, a to konkrétně u druhu *Labidura riparia* ($2C=1,06$ pg, Hanrahan & Johnston, 2011). Rovněž u řádu Embioptera je znám pouze záznam o jediném druhu, a to *Oligotoma saundersii* ($2C=2,66$ pg, Hanrahan & Johnston, 2011). Oba tyto druhy byly analyzovány metodou průtokové cytometrie, nicméně byla použita nervová tkáň z mozku a jako standard byla použita octomilka *Drosophila virilis* (Hanrahan & Johnston, 2011).

Databáze AGSD obsahuje údaje o pěti zástupcích řádu Mantodea. Dva druhy, *Litaneuria* sp. ($2C=6,64$ pg) a *Stagmomantis carolina* ($2C=7,90$ pg), byly analyzovány ve výše zmíněné studii Hanrahan & Johnston, 2011. Data byla získána pomocí průtokové cytometrie, ale z jiného typu tkáně a za použití jiných standardů. Údaje o zbylých třech zástupcích řádu Mantodea byly zjištěny za pomoci Feulgenovy denzitometrie (Koshikawa et al., 2008), která je dnes již považována za zastaralou a nepřesnou.

Řád Phasmatodea je v AGSD reprezentován devíti druhy (Gregory, 2023). Velikosti genomů dvou druhů byly zjištěny pomocí Feulgenovy denzitometrie, ostatní druhy byly analyzovány pomocí průtokové cytometrie (Gregory, 2023). Data získaná pomocí průtokové cytometrie pochází ze dvou studií (Marescalchi et al., 1990, Marescalchi et al., 1998), kde byly analyzovaným jedincům odebírány části střev a jako standard byly použity myší thymocyty. Velikosti genomu ($2C$ -hodnoty) byly v těchto studiích zachyceny v rozmezí od 3,9 pg (*Bacillus rossius redtenbacheri*) do 5,88 pg (*Bacillus atticus carius*).

AGSD obsahuje v současnosti sedmdesát šest záznamů s informací o velikostech genomů zástupců řádu Orthoptera. Pouze deset z nich bylo získáno pomocí průtokové cytometrie a mnohé ze záznamů jsou duplicitní. Databáze při odečtení duplicit poskytuje informace o padesáti druzích z řádu Orthoptera. Velikost genomů se v databázi pohybuje v rozmezí od 3,42 pg (*Oecanthus niveus*, Hanrahan & Johnston, 2011) do 33,96 pg (*Podisma pedestris*, Westerman et al., 1987). Údaj o druhu *Podisma pedestris* byl získán pomocí Feulgenovy denzitometrie (Westerman et al., 1987). Recentně bylo publikováno několik studií zabývajících se velikostmi genomů rovnokřídlých (Yuan et al., 2021, Sun et al., 2023, Hawlitschek et al., 2023). V těchto studiích byly postupně objevovány rekordně velké genomy u druhů *Bryodemella holdereri* (2C=37,28 pg, Mao et al., 2020), *Dericorys annulata* (2C=42,43 pg, Sun et al., 2023), *Bryodemella tuberculata* (2C=43,92 pg, Hawlitschek et al., 2023).

V poslední ze zmiňovaných studií bylo měřeno celkem padesát druhů rovnokřídlých (Orthoptera) v čeledích Acrididae, Tetrigidae, Gryllidae a Tettigoniidae, z čehož třicet osm druhů bylo změřeno poprvé. Jedincům byla odebírána svalová tkáň z femuru, vzorky byly analyzovány taktéž s rostlinným standardem (*Pisum sativum*), lišilo se množství přidávaného pufru a přístroj, v němž byly vzorky měřeny. Rozsah velikostí genomů se v této studii pohyboval od 2,74 pg (2C, *Oecanthus pellucens*) do 43,92 pg (2C, *Bryodemella tuberculata*). V této (Hawlitschek et al., 2023) a naší studii bylo analyzováno několik stejných druhů. Rozdíly mezi jedinci stejného pohlaví činily 2,57 % a 2,15 % (*Calliptamus italicus*, samice, samec), 13,59 % (*Platycleis albopunctata*, samec), 35,15 % (*Nemobius sylvestris*, samice). Rozdíl mezi velikostmi genomů samic druhu *Nemobius sylvestris* v našem datasetu a v datasetu této studie (Hawlitschek et al., 2023) naznačuje možnou skrytou diverzitu. Druhým vysvětlením by mohla být chybná determinace, což bude s největší pravděpodobností důvodem více než pětinasobného rozdílu mezi samci druhu *Tetrix subulata* v naší studii a studii Hawlitschka a kolektivu (2023).

V další ze studií publikovaných v letošním roce bylo analyzováno celkem šedesát dva druhů rovnokřídlých (Orthoptera) v čeledích Acrididae, Pyrgomorphidae, Dericorythidae a Pamphagidae (Sun et al., 2023). Jako standard byly použity druhy *Locusta migratoria* a *Periplaneta americana*. Pro analýzu byla použita hlavová část jedince nebo končetina. Rozsah velikostí genomů se pohyboval od 14,37 pg

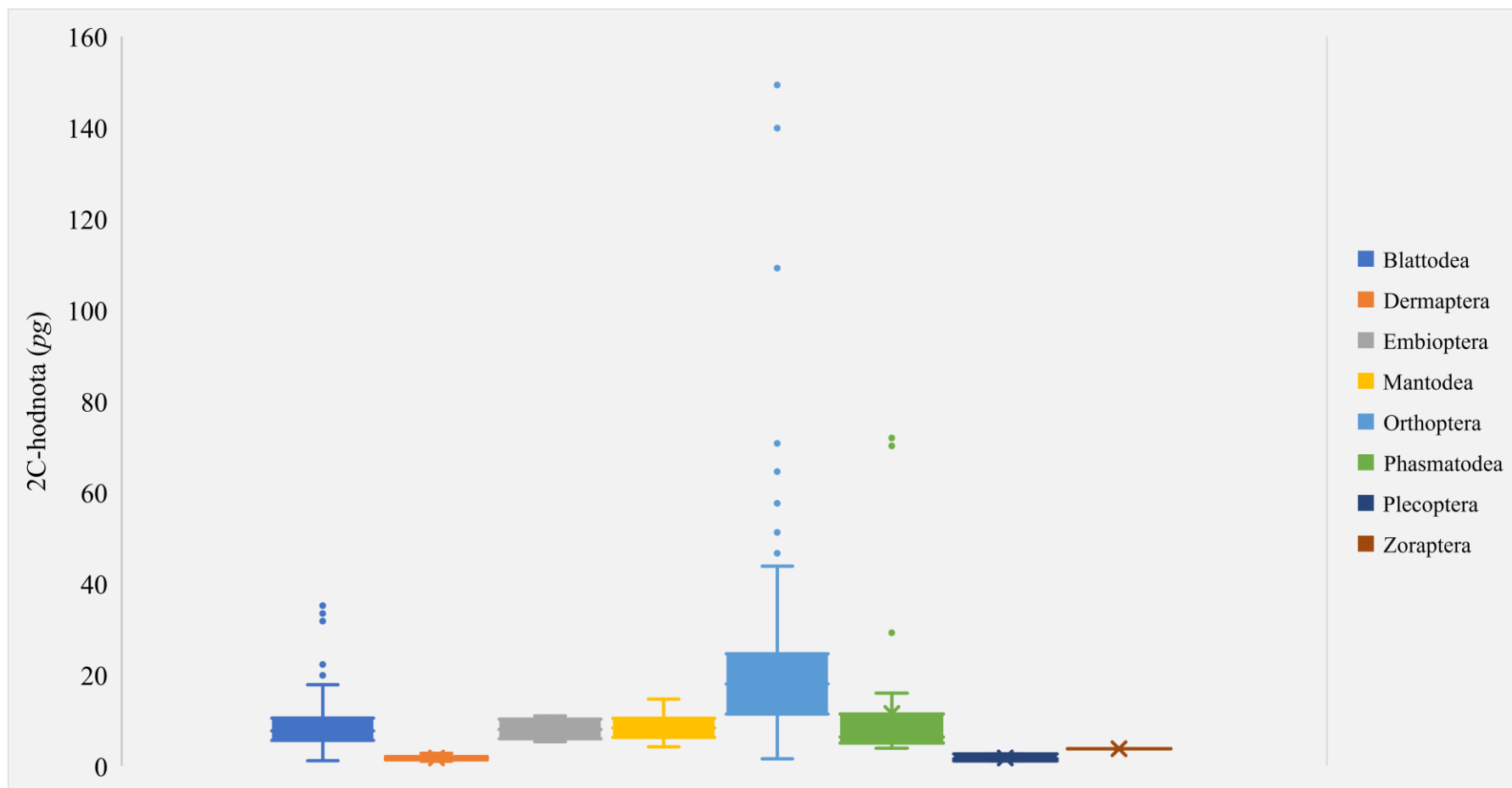
(2C, *Shirakiacris shirakii*) do 42,43 pg (2C, *Dericorys annulata*). V naší a této studii (Sun et al., 2023) byl rovněž měřen jeden stejný druh, a sice *Calliptamus italicus*. V této studii (Sun et al., 2023) byly zjištěny 2C-hodnoty 20,89 pg, 18,40 pg a 21,51 pg (16,90 % mezi nejmenší a největší hodnotou), zatímco naší samici byla naměřena 2C-hodnota 23,96 pg (rozdíl 30,22 %). Velikost genomu (2C-hodnota) druhu *Bryodemella tuberculata* byla naměřena 35,17 pg a 41,55 pg (Sun et al., 2023), což činí rozdíl 18,14 % mezi jedinci v této jedné studii a 24,88 %, respektive 5,70 % mezi jednotlivými samicemi ve studii Sun

a kolektivu (2023) a Hawlitschka a kolektivu (2023). Opět se tak otevírá otázka, zda se jedná o možnou vnitrodruhovou variabilitu, chybu měření či determinace, možný výskyt siblings species či jednoduše nesrovnatelnost dat získaných za pomoci jiného metodického postupu. Zajímavé také je, že v čeledi Pyrgomorphidae, ve které byly v případě našich dat zachyceny největší velikosti genomů, se rozsah velikostí v této studii (Sun et al., 2023) pohyboval u dvou měřených druhů pouze v rozmezí od 14,99 pg do 18,12 pg.

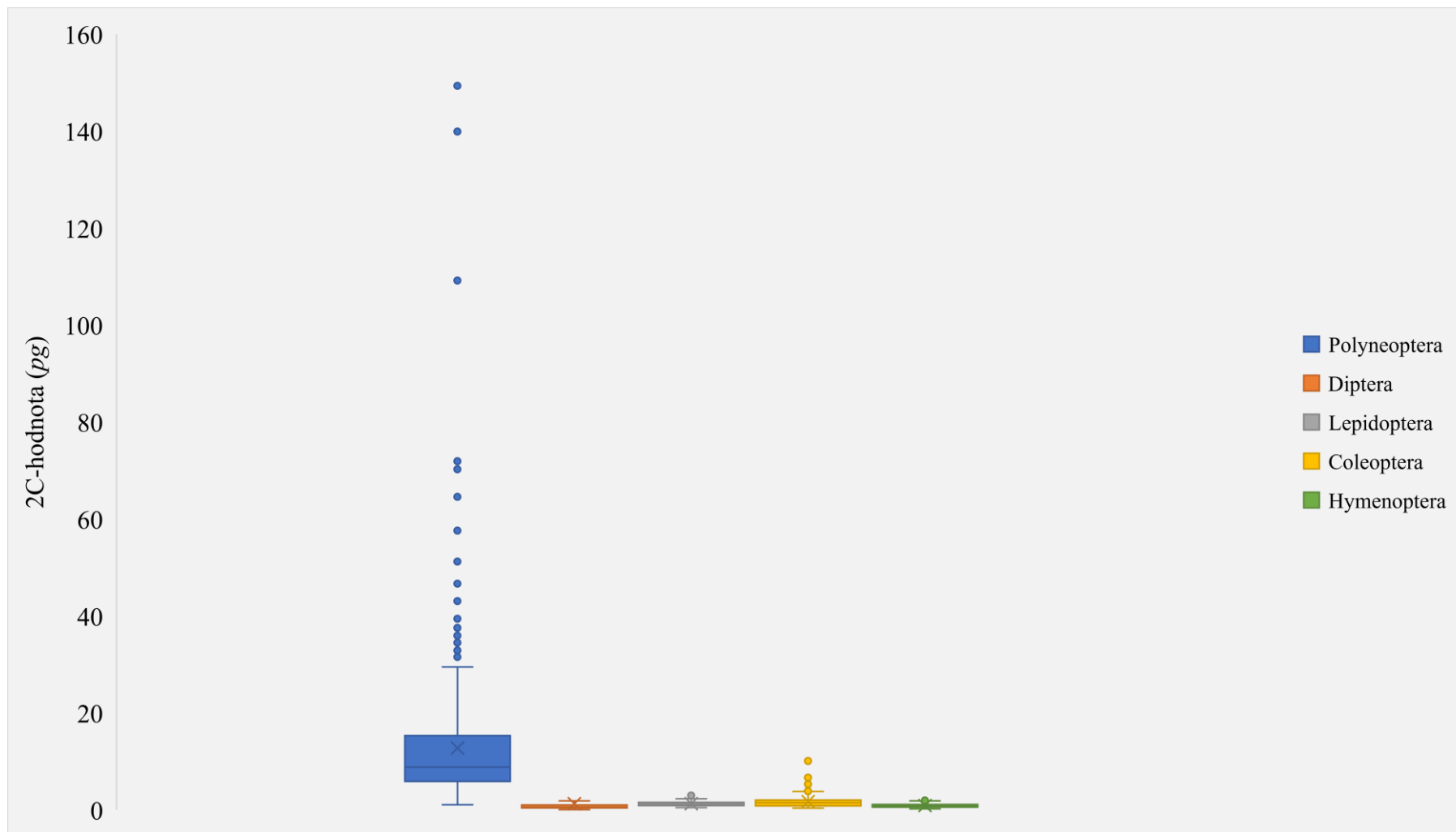
Ve studii Yuana a kolektivu (2021) bylo měřeno dvacet dva druhů z čeledi Tettigoniidae. Zjištěny byly velikosti genomů v rozsahu od 0,91 pg (*Oecanthus sinensis*) do 19,59 pg (*Deracantha onos*). Pro měření byla použita s ohledem na velikost jedince celá hlava nebo její polovina (Yuan et al., 2021) a jako standard byl použit šváb *Periplaneta americana* nebo červené krvinky kura domácího (*Gallus domesticus*). V další ze studií, jejíž data nebyla do AGSD zanesena, byly pomocí průtokové cytometrie zjišťovány velikosti genomů sedmnácti druhů rovnokřídlých (Mao et al., 2020). Velikosti genomů (2C-hodnoty) se pohybovaly v rozsahu od 13,14 pg (*Shirakiacris shirakii*) do 37,28 pg (*Bryodemella holdereri*).

Celkem byla publikována velikost genomů u cca 250 druhů Polyneoptera, které jsme doplnili o dalších 67 nově změřených druhů.

Data zjištěná v rámci naší studie byla doplněna o doposud publikované údaje a srovnání rozsahu velikostí genomů v jednotlivých řádech skupiny Polyneoptera vizualizuje Graf č. 16. Graf č. 17 vizualizuje srovnání rozsahu velikostí genomů skupiny Polyneoptera s dalšími skupinami hmyzu.



Graf č. 16 – srovnání rozsahu velikostí genomů jednotlivých řádů Polyneoptera na základě dat z literatury a našeho měření. Graf č. 16 vizualizuje rozsah velikostí genomů pro jednotlivé řády skupiny Polyneoptera. Každý box plot znázorňuje jeden řád. V případě, že byl k dispozici dostatek dat, zobrazuje graf medián, průměr, horní a dolní kvartily. Některé řády byly zastoupeny v tomto datasetu menším počtem zástupců, proto v těchto případech nejsou zobrazeny všechny statistické hodnoty.



Graf č. 17 – srovnání rozsahu velikostí genomů skupiny Polyneoptera s „big four“ na základě dat z literatury a našeho měření. Graf č. 17 vizualizuje rozsah velikostí genomů pro jednotlivé řády skupiny „big four“ ve srovnání se skupinou Polyneoptera. Každý box plot znázorňuje jeden taxon.

5.4 Negativa průtokové cytometrie

5.4.1 Názvosloví

V této části bych ráda poukázala na některé problematické aspekty průtokové cytometrie. Jedním z prvních úskalí, se kterým jsem se v průběhu zpracovávání této diplomové práce setkala, bylo nejednotné užívání názvosloví napříč studii. Autory je často uváděna velikost genomu (=obsah jaderné DNA) pomocí C-hodnoty. Ta ovšem, jak již bylo uvedeno v úvodních kapitolách, vyjadřuje obsah DNA gametických buněk. Při měření se však nejčastěji používá somatická tkáň a histogram získaný měřením vzorků a vyhodnocovaný například v programu Partec FloMax 2.4b (Partec GmbH, Münster) tak zobrazuje 2C-hodnoty standardu. Na základě výpočtu vzdáleností peaků je pak odvozena 2C-hodnota vzorku. Pokud by takto získané 2C-hodnoty byly dělena dvěma u heterogametického pohlaví, výsledné C-hodnoty budou zatíženy značnou nepřesností (Sadílek et al., 2019). Bohužel mnozí autoři vliv pohlaví zanedbávají a nerozlišují ve svých studiích hodnoty pro samice a samce. AGSD údaje o pohlaví ve většině případů také neobsahuje, ačkoliv původní publikaci byla tato data zanesena (např. Hanrahan & Johnston, 2011). Dalším z negativ AGSD je absence nově publikovaných dat (například Mao et al., 2020, Yuan et al., 2021, Hawlitschek et al., 2023, Sun et al., 2023).

5.4.2 Standardy

Tato diplomová práce byla součástí projektu č. 1338120 Grantové agentury Univerzity Karlovy. Ačkoliv v průběhu let probíhalo v rámci tohoto projektu extenzivní vzorkování napříč taxony, tato práce obsahuje pouze část analýz ze skupiny Polyneoptera. Laboratorní část práce a získané výsledky však ukázaly potřebu nadesignování nových ideálně živočišných standardů s ohledem na množství doposud neprobádaného hmyzu a s ohledem na rozsah velikostí genomů. Volba vhodného standardu je v současnosti poměrně komplikovaná vzhledem k tomu, že neexistuje jednotný soubor standardů a jejich 2C-hodnot a data jednotlivých autorů jsou tak obtížně srovnatelná.

Obecně je doporučováno používat živočišné standardy pro měření živočišných vzorků (Greilhuber et al., 2007), nicméně rozsah velikostí genomů aktuálně používaných standardů (vč. člověka) je bohužel pro analýzy Orthoptera a dalších taxonů s velkými genomy nedostačující. Z tohoto důvodu byly v této práci použity ověřené rostlinné

standards, které se ukázaly být pro studium hmyzu vhodnými (Sadílek et al., 2019, Stuchlíková, 2020, Hawlitschek et al., 2023).

Potenciálně vhodnými druhy pro budoucí standardizaci se dle předběžných výsledků jeví *Heteropteryx dilatata*, *Medauroidea extradentata*, *Sungaya inexpectata* a *Locusta migratoria*. Jak již bylo zmíněno v úvodní části práce, ideální standard by měl splňovat několik kritérií – podobná velikost genomu vzorku a standardu, dobrá dostupnost, stabilní genom, snadná manipulace s dotyčným jedincem. V tuto chvíli by bylo unáhlené hodnotit, zda po absolvování dalších analýz budou tyto druhy vyhovující, nicméně první tři kritéria se prozatím kromě druhu *Heteropteryx dilatata* jeví nadějně. Tento druh se jeví ne zcela vyhovujícím jednak vzhledem ostnům na končetinách, kterými může druh způsobit drobná, byť nepříjemná zranění. Větším problémem je ale příliš velký rozptyl naměřených hodnot, směrodatná odchylka měření pro samice činila 2,26 pg, pro samce 2,92 pg. Za výše popsaných okolností by užití tohoto druhu jakožto standardu působilo značné nepřesnosti v měřeních. Není však v tuto chvíli jasné, co je příčinou natolik odlišných hodnot a bude nutné se této problematice dále hlouběji věnovat.

6 Závěr

Tato práce si kladla za cíl na základě základního screeningu 1) rozšířit znalost velikosti genomů u skupiny Polyneoptera metodou průtokové cytometrie, 2) porovnat absolutní velikosti a rozsah velikostí genomů v rámci jednotlivých řádů Polyneoptera a srovnat je s hodnotami známými pro ostatní skupiny hmyzu, 3) testovat dosavadní předpoklady, že největší genomy v rámci skupiny Polyneoptera a potažmo i Insecta mají zástupci řádu Orthoptera a 4) identifikovat v rámci skupiny druhy, které by se mohly uplatnit jako potenciální standardy pro využití v FCM studiích.

Podařilo se zjistit velikost genomu celkem u osmdesáti osmi druhů hmyzu v rámci skupiny Polyneoptera, z nichž většina nebyla dosud publikována. Dataset známých genomů byl díky této práci rozšířen o šedesát sedm nově změřených druhů, z toho čtyři zástupce Dermaptera, čtyři zástupce Embioptera, sedmnáct druhů z řádu Phasmatodea, čtrnáct druhů z řádu Mantodea, jednoho zástupce z podřádu Isoptera a dvacet sedm druhů Orthoptera. Zjištěné velikosti genomu byly porovnávány se známými údaji zanesenými v AGSD a údaji publikovanými v nejnovějších studiích. Bylo ověřeno, že největší genomy se v rámci skupiny Polyneoptera, respektive Insecta vyskytují mezi zástupci řádu Orthoptera. Nadprůměrně velké genomy byly zaznamenány ojedinele také u strašilek (Phasmatodea). Mezi měřenými jedinci bylo zaznamenáno několik druhů, jejichž 2C-hodnoty výrazně přesahovaly doposud publikované údaje – *Heteropteryx dilatata* (2C=70,33 pg F; 70,22 pg M), (*Tropidacris collaris* (2C=54,59 pg F; 52,03 pg M), *Dictyophorus spumans* (2C=139,91 pg F) či *Dictyophorus griseus* (2C=149,33 pg F), jedná se u hmyzu o vůbec největší zjištěnou velikost genomu. V těchto řádech byly testovány různé aspekty s možným vlivem na velikosti genomů. V řádu Orthoptera jsme nenašli podporu pro hypotézu přímého vlivu potravní strategie na velikost genomu, naopak výsledky ukazují na možný vliv velikosti či robustnosti a délky životního cyklu na velikost genomu či přítomnosti toxických látek. V řádu Phasmatodea jsme nenašli souvislost mezi velikostí genomu a typem okřídlení. Naopak sexuálně se rozmnožující druhy vykazovali často nadprůměrnou velikost genomu ve srovnání s partenogenetickými druhy.

Byly natipovány čtyři možné budoucí hmyzí standardy – strašilka *Heteropteryx dilatata* (2C=70,33 pg F; 70,22 pg M), pakobylka *Medauroidea extradentata* (2C=8,06 pg F),

strašilka *Sungaya inexpectata* ($2C=6,69$ pg F, $6,27$ pg M) a saranče *Locusta migratoria* ($2C=15,16$ pg F, $14,06$ pg M). Tyto druhy (vyjma *Heteropteryx dilatata*) vykazují relativně stabilní genom, jsou nenáročné na chov a pokrývají širokou škálu velikostí genomů ve srovnání s doposud testovanými standardy. Nutná je však další rozsáhlejší studie, ve které budou tyto druhy opakovaně a důsledně analyzovány.

Seznam použité literatury

- 1) *Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical reviews in biotechnology*, 37(2), 163-176.
- 2) Aron, S., De Menten L., Van Bockstaele D. "Brood sex ratio determination by flow cytometry in ants." *Molecular Ecology Notes* 3.3 (2003): 471-475.
- 3) Aron, S., Passera, L., Keller, L. (2004). Evolution of miniaturisation in inquiline parasitic ants: timing of male elimination in *Plagiolepis pygmaea*, the host of *Plagiolepis xene*. *Insectes sociaux*, 51, 395-399.
- 4) Bank, S., Cumming, R. T., Li, Y., Henze, K., Le Tirant, S., et al. (2021). A tree of leaves: Phylogeny and historical biogeography of the leaf insects (Phasmatodea: Phylliidae). *Communications Biology*, 4(1), 932.
- 5) Bank, S., Bradler, S. (2022). A second view on the evolution of flight in stick and leaf insects (Phasmatodea). *BMC ecology and evolution*, 22(1), 62.
- 6) Bánki, O., Roskov, Y., Döring, M., Ower, G., Vandepitte, L., et al. (2023). Catalogue of Life Checklist (Version 2023-01-12). Catalogue of Life.
- 7) Barlogie, B., Raber, M. N., Schumann, J., Johnson, T. S., Drewinko, B., et al. (1983). Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer research*, 43(9), 3982-3997.
- 8) Beaulieu, J. M., Leitch, I. J., Patel, S., Pendharkar, A., Knight, C. A. (2008). Genome size is a strong predictor of cell size and stomatal density in angiosperms. *New Phytologist*, 179(4), 975-986.
- 9) Beçak, M. L., Kobashi, L. S. (2004). Evolution by polyploidy and gene regulation in Anura. *Genet. Mol. Res*, 3(2), 195-212.
- 10) Beutel, R. G., Wipfler, B., Gottardo, M., Dallai, R. (2013). Polyneoptera or "lower Neoptera"-new light on old and difficult phylogenetic problems. *Atti Accademia nazionale italiana di entomologia*, 61, 113-142.
- 11) Bickham, J. W., Hanks, B. G., Hale, D. W., Martin, J. E. (1993). Ploidy diversity and the production of balanced gametes in male twist-necked turtles (*Platemys platycephala*). *Copeia*, 723-727.
- 12) Blackmon, H., Ross, L., Bachtrog, D. (2017). Sex determination, sex chromosomes, and karyotype evolution in insects. *J. Hered.* 108, 78–93.

- 13) Boulesteix, M., Weiss, M., Biéumont, C. (2006). Differences in genome size between closely related species: the *Drosophila melanogaster* species subgroup. *Molecular biology and evolution*, 23(1), 162-167.
- 14) Bourguignon, T., Tang, Q., Ho, S. Y., Juna, F., Wang, Z., et al. (2018). Transoceanic dispersal and plate tectonics shaped global cockroach distributions: evidence from mitochondrial phylogenomics. *Molecular Biology and Evolution*, 35(4), 970-983.
- 15) Brandizzi, F., Grilli Caiola, M. (1998). Flow cytometric analysis of nuclear DNA in *Crocus sativus* and allies (Iridaceae). *Plant systematics and evolution*, 211(3), 149-154.
- 16) Bradler, S., Buckley, T. R. (2018). Biodiversity of phasmatodea. *Insect biodiversity: science and society*, 2, 281-313.
- 17) Bresseel, J., Constant, J. (2014). Giant Sticks from Vietnam and China, with three new taxa including the second longest insect known to date (Phasmatodea, Phasmatidae, Clitumninae, Pharnaciini). *European Journal of Taxonomy*, (104).
- 18) Brown, M., Wittwer, C. (2000). Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clinical chemistry*, 46(8), 1221-1229.
- 19) Brown, J. K., Lambert, G. M., Ghanim, M., Czosnek, H., Galbraith, D. W. (2005). Nuclear DNA content of the whitefly *Bemisia tabaci* (Aleyrodidae: Hemiptera) estimated by flow cytometry. *Bulletin of entomological research*, 95(4), 309-312.
- 20) Cameron, S. L., Barker, S. C., Whiting, M. F. (2006). Mitochondrial genomics and the new insect order Mantophasmatodea. *Molecular phylogenetics and evolution*, 38(1), 274-279.
- 21) Casellato, S., Burighel, P., Minelli, A. Stick insects: parthenogenesis, polyploidy and beyond.
- 22) Dallas, C. E., Lingenfelser, S. F., Lingenfelser, J. T., Holloman, K., Jagoe, C. H., et al. (1998). Flow cytometric analysis of erythrocyte and leukocyte DNA in fish from Chernobyl-contaminated ponds in the Ukraine. *Ecotoxicology*, 7, 211-219.
- 23) Davey, H. M., Kell, D. B. (1996). Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiological reviews*, 60(4), 641-696.
- 24) Doležal, J., Göhde, W. (1995). Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 19(2), 103-106.

- 25) Doležel, J. (2003). Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry Part A*, 51, 127-128.
- 26) *Doležel, J., Bartoš, J. (2005). Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of botany*, 95(1), 99-110.
- 27) Doležel, J., Greilhuber, J., Suda, J. (Eds.). (2007a). *Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes*. John Wiley & Sons.
- 28) Doležel, J., Greilhuber, J., Suda, J. (2007b). Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature protocols*, 2(9), 2233-2244.
- 29) *Doležel, J., Greilhuber, J. (2010). Nuclear genome size: are we getting closer? *Cytometry Part A*, 77(7), 635-642.
- 30) Dubelaar, G. B., Casotti, R., Tarran, G. A., Biegala, I. C. (2007). Phytoplankton and their analysis by flow cytometry. *Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes*, 287-322.
- 31) Dutrillaux, A. M., Lemonnier-Darcemont, M., Darcemont, C., Krpač, V., Fouchet, P., et al. (2009). Origin of the complex karyotype of the polyploid parthenogenetic grasshopper *Saga pedo* (Orthoptera: Tettigoniidae). *European Journal of Entomology*, 106(4).
- 32) Dvořák, L. (2013). Škvoři – mýtičtí tvorové. *Časopis Arnika* [online]. Dostupné z: [http://www.casopis-arnika.cz/pdf_clanky/arnika_2013_01\[38-39\].pdf](http://www.casopis-arnika.cz/pdf_clanky/arnika_2013_01[38-39].pdf)
- 33) Engel, M. S., Grimaldi, D. A., Krishna, K. (2009). Termites (Isoptera): their phylogeny, classification, and rise to ecological dominance. *American Museum Novitates*, 2009(3650), 1-27.
- 34) Evangelista, D. A., Wipfler, B., Béthoux, O., Donath, A., Fujita, M., et al. (2019). An integrative phylogenomic approach illuminates the evolutionary history of cockroaches and termites (Blattodea). *Proceedings of the Royal Society B*, 286(1895), 20182076.
- 35) Fenn, J. D., Song, H., Cameron, S. L., Whiting, M. F. (2008). A preliminary mitochondrial genome phylogeny of Orthoptera (Insecta) and approaches to maximizing phylogenetic signal found within mitochondrial genome data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49(1), 59-68.
- 36) Flook, P. K., Rowell, C. H. F. (1998). Inferences about orthopteroid phylogeny and molecular evolution from small subunit nuclear ribosomal DNA sequences. *Insect Molecular Biology*, 7(2), 163-178.

- 37) Flook, P. K., Klee, S., Rowell, C. H. F. (1999). Combined molecular phylogenetic analysis of the Orthoptera (Arthropoda, Insecta) and implications for their higher systematics. *Systematic biology*, 48(2), 233-253.
- 38) Gillooly, J. F., Hein, A., Damiani, R. (2015). Nuclear DNA content varies with cell size across human cell types. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(7), a019091.
- 39) Goldberg, J., Bresseel, J., Constant, J., Kneubühler, B., Leubner, F., et al. (2015). Extreme convergence in egg-laying strategy across insect orders. *Scientific Reports*, 5(1), 7825.
- 40) Green, D. M., Sessions, S. K. (Eds.). (2012). *Amphibian cytogenetics and evolution*. Academic Press.
- 41) Gregory, T. R., Hebert, P. D., Kolasa, J. (2000). Evolutionary implications of the relationship between genome size and body size in flatworms and copepods. *Heredity*, 84(2), 201-208.
- 42) Gregory, T. R. (2001a). Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma. *Biological reviews*, 76(1), 65-101.
- 43) Gregory, T. R. (2001b). The bigger the C-value, the larger the cell: genome size and red blood cell size in vertebrates. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 27(5), 830-843.
- 44) Gregory, T. R., Mable, B. K. (2005). Polyploidy in animals. In *The evolution of the genome* (pp. 427-517). Academic Press.
- 45) Gregory, T. R., Nathwani, P., Bonnett, T. R., Huber, D. P. (2013). Sizing up arthropod genomes: an evaluation of the impact of environmental variation on genome size estimates by flow cytometry and the use of qPCR as a method of estimation. *Genome*, 56(9), 505-510.
- 46) Gregory, T.R. (2023). Animal Genome Size Database. <http://www.genomesize.com>.
- 47) Greilhuber, J., Tensch, E. M., Loureiro, J. (2007). Flow cytometry with plant cells: Analysis of genes, chromosomes and genomes. Nuclear DNA content measurement.
- 48) Greilhuber, J. (2008). Cytochemistry and C-values: the less-well-known world of nuclear DNA amounts. *Annals of Botany*, 101(6), 791-804.
- 49) Guo, L. T., Wang, S. L., Wu, Q. J., Zhou, X. G., Xie, W., et al. (2015). Flow cytometry and K-mer analysis estimates of the genome sizes of *Bemisia tabaci* B and Q (Hemiptera: Aleyrodidae). *Frontiers in physiology*, 6, 144.

- 50) Gullan, P. J., Cranston, P. S. (2014). *The insects: an outline of entomology*. John Wiley & Sons.
- 51) Haas, F. (2018). Biodiversity of Dermaptera. *Insect biodiversity: science and society*, 2, 315-334.
- 52) Hanrahan, S. J., Johnston, J. S. (2011). New genome size estimates of 134 species of arthropods. *Chromosome Research*, 19(6), 809-823.
- 53) Hardie, D. C., Gregory, T. R., Hebert, P. D. (2002). From pixels to picograms: a beginners' guide to genome quantification by Feulgen image analysis densitometry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 50(6), 735-749.
- 54) Hawlitschek, O., Sadílek, D., Dey, L. S., Buchholz, K., Noori, S., et al. (2023). New estimates of genome size in Orthoptera and their evolutionary implications. *Plos one*, 18(3), e0275551.
- 55) He, K., Lin, K., Wang, G., Li, F. (2016). Genome sizes of nine insect species determined by flow cytometry and k-mer analysis. *Frontiers in physiology*, 7, 569.
- 56) Hinegardner, R. T. (1971). An improved fluorometric assay for DNA. *Analytical biochemistry*, 39(1), 197-201.
- 57) Hubálek, M., Flajshans, M. (2021). Simple field storage of fish samples for measurement of DNA content by flow cytometry. *Cytometry Part A*, 99(7), 743-752.
- 58) Hudec, K., Kolibáč, J., Laštůvka, Z., Peňáz, M. (2007). *Příroda České republiky. Průvodce faunou*. Academia, Praha.
- 59) Huizenga, K. M., Shaidle, M. D., Brinton, J. S., Gore, L. N. A., Ebo, M. A., et al. (2008). Geographic differences in the body sizes of adult *Romalea microptera*. *Journal of Orthoptera Research*, 17(2), 135-139.
- 60) Husemann, M., Sadílek, D., Dey, L. S., Hawlitschek, O., Seidel, M. (2020). New genome size estimates for band-winged and slant-faced grasshoppers (Orthoptera: Acrididae: Oedipodinae, Gomphocerinae) reveal the so far largest measured insect genome. *Caryologia*, 73(4), 111-120.
- 61) Chen, W., Hasegawa, D. K., Arumuganathan, K., Simmons, A. M., Wintermantel, W., et al. (2015). Estimation of the whitefly *Bemisia tabaci* genome size based on k-mer and flow cytometric analyses. *Insects*, 6(3), 704-715.
- 62) Idowu, A. B., Edema, M. O., Oyedepo, M. T. (2009). Extracellular enzyme production by microflora from the gut region of the variegated grasshopper *Zonocerus*

- variegatus (Orthoptera: Pyrgomorphidae). *International Journal of Tropical Insect Science*, 29(4), 229-235.
- 63) iNaturalist contributors, iNaturalist (2023). iNaturalist Research-grade Observations. iNaturalist.org. Occurrence dataset <https://doi.org/10.15468/ab3s5x> accessed via GBIF.org on 2023-08-07. <https://www.gbif.org/occurrence/3109186065>
- 64) Inward, D., Beccaloni, G., Eggleton, P. (2007). Death of an order: a comprehensive molecular phylogenetic study confirms that termites are eusocial cockroaches. *Biology letters*, 3(3), 331-335.
- 65) Jakobsen, A. "The use of trout erythrocytes and human lymphocytes for standardization in flow cytometry." *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology* 4.2 (1983): 161-165.
- 66) Jarvis, K. J., Haas, F., Whiting, M. F. (2005). Phylogeny of earwigs (Insecta: Dermaptera) based on molecular and morphological evidence: reconsidering the classification of Dermaptera. *Systematic Entomology*, 30(3), 442-453.
- 67) Johnston, J. S., Bennett, M. D., Rayburn, A. L., Galbraith, D. W., Price, H. J. (1999). Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. *American Journal of Botany*, 86(5), 609-613.
- 68) Jost, M. C., Shaw, K. L. (2006). Phylogeny of Ensifera (Hexapoda: Orthoptera) using three ribosomal loci, with implications for the evolution of acoustic communication. *Molecular phylogenetics and evolution*, 38(2), 510-530.
- 69) Kamp, J. W. (1973). *Biosystematics of the Grylloblattodea* (Doctoral dissertation, University of British Columbia).
- 70) Kjer, K. M., Carle, F. L., Litman, J., Ware, J. (2006). A molecular phylogeny of Hexapoda. *Arthropod Syst Phylogeny*, 64(1), 35-44.
- 71) Klass, K. D., Zompro, O., Kristensen, N. P., Adis, J. (2002). Mantophasmatodea: a new insect order with extant members in the Afrotropics. *Science*, 296(5572), 1456-1459.
- 72) Klass, K. D., Meier, R. (2006). A phylogenetic analysis of Dictyoptera (Insecta) based on morphological characters. *Entomologische Abhandlungen*, 63(1-2), 3-50.
- 73) Kočárek P., Holuša J., Vidlička L. (1999): Check-list of Blattaria, Mantodea, Orthoptera and Dermaptera of the Czech and Slovak Republics. – *Articulata* 14: 177-184.

- 74) Kočárek, P., Holuša, J., Vlk, R., Marhoul, P. (2013). Rovnokřídli (Insecta: Orthoptera) České republiky. Academia.
- 75) Kočárek, P., Doležal, A. (2022). *Forficula smyrnensis* Audinet-Serville, 1838 found in the Czech Republic: the inconspicuous spread of a conspicuous alien earwig. *BioInvasions Records*, 11(3), 642-651.
- 76) Koshikawa, S., Miyazaki, S., Cornette, R., Matsumoto, T., Miura, T. (2008). Genome size of termites (Insecta, Dictyoptera, Isoptera) and wood roaches (Insecta, Dictyoptera, Cryptocercidae). *Naturwissenschaften*, 95, 859-867.
- 77) *Kristensen, N. P. (1981). Phylogeny of insect orders. *Annual review of entomology*, 26(1), 135-157.
- 78) *Kron, P., Suda, J., Husband, B. C. (2007). Applications of flow cytometry to evolutionary and population biology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 847-876.
- 79) Kukalova-Peck, J. (1978). Origin and evolution of insect wings and their relation to metamorphosis, as documented by the fossil record. *Journal of Morphology*, 156(1), 53-125.
- 80) Leitch I.J., Johnston E., Pellicer J., Hidalgo O., Bennett M.D. (2019). Plant DNA C-values Database (release 7.1, April 2019)
- 81) Li, Z., Tiley, G. P., Galuska, S. R., Reardon, C. R., Kidder, et al. (2018). Multiple large-scale gene and genome duplications during the evolution of hexapods. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(18), 4713-4718.
- 82) Litvinchuk, S. N., Zuiderwijk, A., Borkin, L. J., Rosanov, J. M. (2005). Taxonomic status of *Triturus vittatus* (Amphibia: Salamandridae) in western Turkey: trunk vertebrae count, genome size and allozyme data. *Amphibia Reptilia*, 26(3), 305-324.
- 83) Lokki, J., Saura, A. (1980). Polyploidy in insect evolution. In *Polyploidy* (pp. 277-312). Springer, Boston, MA.
- 84) Loureiro, J., Rodriguez, E., Doležal, J., Santos, C. (2006). Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. *Annals of Botany*, 98(3), 679-689.
- 85) MacCulloch, R. D., Upton, D. E., Murphy, R. W. (1996). Trends in nuclear DNA content among amphibians and reptiles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 113(3), 601-605.

- 86) Mao, Y., Zhang, N., Nie, Y., Zhang, X., Li, X., et al. (2020). Genome size of 17 species from Caelifera (Orthoptera) and determination of internal standards with very large genome size in insecta. *Frontiers in physiology*, 11, 567125.
- 87) Marescalchi, O., Scali, V., Zuccotti, M. (1990). Genome size in parental and hybrid species of *Bacillus* (Insecta, Phasmatodea) from southeastern Sicily: a flow cytometric analysis. *Genome*, 33(6), 789-793.
- 88) Marescalchi, O., Scali, V., Zuccotti, M. (1998). Flow-cytometric analyses of intraspecific genome size variations in *Bacillus atticus* (Insecta, Phasmatodea). *Genome*, 41(5), 629-635.
- 89) *McKinnon, K. M. (2018). Flow cytometry: an overview. *Current protocols in immunology*, 120(1), 5-1.
- 90) Miller, K. B., Hayashi, C., Whiting, M. F., Svenson, G. J., Edgerly, J. S. (2012). The phylogeny and classification of Embioptera (Insecta). *Systematic Entomology*, 37(3), 550-570.
- 91) Mouret, N., Lécureuil, C., Meunier, J. (2023). The costs and benefits of maternal egg care in the earwig *Forficula pubescens*. *Insectes Sociaux*, 70(1), 69-79.
- 92) Müller, S., Nebe-von-Caron, G. (2010). Functional single-cell analyses: flow cytometry and cell sorting of microbial populations and communities. *FEMS microbiology reviews*, 34(4), 554-587.
- 93) Nagl, W., Schaffner, K. H. (1981). High 2C DNA content and endopolyploidy of ganglia in the leaf insect, *Extatosoma tiaratum* (Phasmida). *Cell and chromosome newsletter*.
- 94) Otto, S. P., Whitton, J. (2000). Polyploid incidence and evolution. *Annual review of genetics*, 34(1), 401-437.
- 95) Pagel, M., Johnstone, R. A. (1992). Variation across species in the size of the nuclear genome supports the junk-DNA explanation for the C-value paradox. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 249(1325), 119-124.
- 96) Palmer, M. J., Bantle, J. A., Guo, X., Fargoxy1, W. S. (1994). Genome size and organization in the ixodid tick *Amblyomma americanum* (L.). *Insect molecular biology*, 3(1), 57-62.
- 97) Pellicer, J., Leitch, I. J. (2019). The Plant DNA C-values database (release 7.1): an updated online repository of plant genome size data for comparative studies. ["New Phytologist"].

- 98) Picard, C. J., Johnston, J. S., Tarone, A. M. (2012). Genome sizes of forensically relevant Diptera. *Journal of medical entomology*, 49(1), 192-197.
- 99) Pflug, J. M., Holmes, V. R., Burrus, C., Johnston, J. S., Maddison, D. R. (2020). Measuring genome sizes using read-depth, k-mers, and flow cytometry: methodological comparisons in beetles (Coleoptera). *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 10(9), 3047-3060.
- 100) Rasch, E. M. (1986). Cytophotometric determination of genome size for two species of grasshoppers (Orthoptera). *Acta histochemica et cytochemica*, 19(3), 403.
- 101) Rasplus, J. Y., Roques, A. (2010). Dictyoptera (Blattodea, Isoptera), Orthoptera, Phasmatodea and Dermaptera. Chapter 13.3. *BioRisk*, 4, 807-831.
- 102) Rodrigues, A. S., Silva, S. E., Pina-Martins, F., Loureiro, J., Castro, M., et al. (2016). Assessing genotype-phenotype associations in three dorsal colour morphs in the meadow spittlebug *Philaenus spumarius* (L.) (Hemiptera: Aphrophoridae) using genomic and transcriptomic resources. *BMC genetics*, 17, 1-16.
- 103) Roux, N., Toloza, A., Radecki, Z., Zapata-Arias, F. J., Doležel, J. (2003). Rapid detection of aneuploidy in *Musa* using flow cytometry. *Plant Cell Reports*, 21, 483-490.
- 104) Sadílek, D., Výzkumný a vývojový pracovník – Centrum nádorové cytogenomiky [ústní sdělení]. Praha, 13.07.2023.
- 105) Sadílek, D., Urfus, T., Vilímová, J. (2019a). Genome size and sex chromosome variability of bed bugs feeding on animal hosts compared to *Cimex lectularius* parasitizing human (Heteroptera: Cimicidae). *Cytometry Part A*, 95(11), 1158-1166.
- 106) Sadílek, D., Urfus, T., Vilímová, J., Hadrava, J., Suda, J. (2019b). Nuclear genome size in contrast to sex chromosome number variability in the human bed bug, *Cimex lectularius* (Heteroptera: Cimicidae). *Cytometry Part A*, 95(7), 746-756.
- 107) Sessions, S. K., Larson, A. (1987). Developmental correlates of genome size in plethodontid salamanders and their implications for genome evolution. *Evolution*, 41(6), 1239-1251.
- 108) Shah, A., Hoffman, J. I., Schielzeth, H. (2020). Comparative analysis of genomic repeat content in gomphocerine grasshoppers reveals expansion of satellite DNA and helitrons in species with unusually large genomes. *Genome biology and evolution*, 12(7), 1180-1193.

- 109) Sharaf, K., Horová, L., Pavlíček, T., Nevo, E., Bureš, P. (2010). Genome size and base composition in *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Sylvanidae) and differences between native (feral) and silo pest populations in Israel. *Journal of Stored Products Research*, 46(1), 34-37.
- 110) Sheffield, N. C., Hiatt, K. D., Valentine, M. C., Song, H., Whiting, M. F. (2010). Mitochondrial genomics in Orthoptera using MOSAS. *Mitochondrial DNA*, 21(3-4), 87-104.
- 111) School Earwig Genome Consortium. (2023). DNA sequencing in the classroom: complete genome sequence of two earwig (Dermaptera; Insecta) species. *Biological Research*, 56.
- 112) Simon, S., Letsch, H., Bank, S., Buckley, T. R., Donath, A., et al. (2019). Old World and New World Phasmatodea: phylogenomics resolve the evolutionary history of stick and leaf insects. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7, 345.
- 113) Snodgrass, R. E. (1935). *Principles of Insect Morphology* McGraw Hill Book Co. Inc. New York. p, 510-549.
- 114) Stace, C. A. (2000). Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20th and 21st centuries. *Taxon*, 49(3), 451-477.
- 115) Stöck M., Lamatsch D.K., Steinlein C., Epplen J.T., Grosse W.R., et al. (2002). A bisexually reproducing all-triploid vertebrate. *Nat. Genet.* 30:325–28
- 116) Stork, N. E. (2018). How many species of insects and other terrestrial arthropods are there on Earth? *Annual review of entomology*, 63, 31-45.
- 117) Stuchlíková, M. Velikost genomu v evoluci švábů. Praha, 2020. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra zoologie. Vedoucí práce Janšta, Petr.
- 118) Suda, J. (2005). Co se skrývá za rostlinnou průtokovou cytometrií. *Živa*, 53(1), 46-48.
- 119) Suda, J., Kron, P., Husband, B. C., Trávníček, P. (2007). Flow cytometry and ploidy: applications in plant systematics, ecology and evolutionary biology. *Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes*, 103-130.
- 120) Sun, K., Lu, Y., Huang, Y., Huang, H. (2023). Genome size evolution in grasshoppers (Orthoptera: Caelifera: Acrididae). *Systematic Entomology*.
- 121) Svartman, M., Stone, G., Stanyon, R. (2005). Molecular cytogenetics discards polyploidy in mammals. *Genomics*, 85(4), 425-430.

- 122) Swift, H. (1950). The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 36(11), 643-654.
- 123) Swift, H., Kleinfeld, R. (1953). DNA in grasshopper spermatogenesis, oögenesis, and cleavage. *Physiological Zoology*, 26(4), 301-311.
- 124) Szumik, C., Edgerly, J. S., Hayashi, C. Y. (2008). Phylogeny of embiopterans (Insecta). *Cladistics*, 24(6), 993-1005.
- 125) Taft, R. J., Pheasant, M., Mattick, J. S. (2007). The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. *Bioessays*, 29(3), 288-299.
- 126) Tasaki, E., Takata, M., Matsuura, K. (2021). Why and how do termite kings and queens live so long? *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 376(1823), 20190740.
- 127) Tensch, E., Greilhuber, J., Krisai, R. (2010). Genome size in liverworts. *Preslia* 82, 63–80.
- 128) Tensch, E. M., Koutecký, P., Urfus, T., Šmarda, P., Doležel, J. (2022). Reference standards for flow cytometric estimation of absolute nuclear DNA content in plants. *Cytometry Part A*, 101(9), 710-724.
- 129) Terry, M. D., Whiting, M. F. (2005). Mantophasmatodea and phylogeny of the lower neopterous insects. *Cladistics*, 21(3), 240-257.
- 130) Tihelka, E., Engel, M. S., Lozano-Fernandez, J., Giacomelli, M., Yin, Z., et al. (2021). Compositional phylogenomic modelling resolves the ‘Zoraptera problem’: Zoraptera are sister to all other polyneopteran insects. *bioRxiv*, 2021-09
- 131) Thomas Jr, C. A. (1971). The genetic organization of chromosomes. *Annual review of genetics*, 5(1), 237-256.
- 132) Thompson, J. N., Cunningham, B. M., Seagraves, K. A., Althoff, D. M., Wagner, D. (1997). Plant polyploidy and insect/plant interactions. *The American Naturalist*, 150(6), 730-743.
- 133) Tian, Y., Carpp, L. N., Miller, H. E., Zager, M., Newell, E. W., et al. (2022). Single-cell immunology of SARS-CoV-2 infection. *Nature Biotechnology*, 40(1), 30-41.
- 134) Tiersch, T.R., et al. (1989) "Reference standards for flow cytometry and application in comparative studies of nuclear DNA content." *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology* 10.6: 706-710.

- 135) Tomita, S., Yukuhiro, K., Kômoto, N. (2011). The mitochondrial genome of a stick insect *Extatosoma tiaratum* (Phasmatodea) and the phylogeny of polyneopteran insects. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, 80(3), 3_079-3_088.
- 136) Tree of Life Web Project. 2002. Hexapoda. Insects, springtails, diplurans, and proturans. Version 01 January 2002 (under construction). <http://tolweb.org/Hexapoda/2528/2002.01.01> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>
- 137) Verlinden, H., Sterck, L., Li, J., Li, Z., Yssel, A., et al. (2021). First draft genome assembly of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *F1000Research*, 9, 775.
- 138) Vindelov, L.L., Christensen I.J., Nissen, N.I. (1983) Standardization of high-resolution flow cytometric DNA analysis by the simultaneous use of chicken and trout red blood cells as internal reference standards. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology* 3.5: 328-331.
- 139) Vižintin, L., Javornik, B., Bohanec, B. (2006). Genetic characterization of selected *Trifolium* species as revealed by nuclear DNA content and ITS rDNA region analysis. *Plant Science*, 170(4), 859-866.
- 140) Wang, X., Fang, X., Yang, P., Jiang, X., Jiang, F., et al. (2014). The locust genome provides insight into swarm formation and long-distance flight. *Nature communications*, 5(1), 2957.
- 141) Wang, Z., Shi, Y., Qiu, Z., Che, Y., Lo, N. (2017). Reconstructing the phylogeny of Blattodea: robust support for interfamilial relationships and major clades. *Scientific Reports*, 7(1), 1-8.
- 142) Wendel, J. F. (2000). Genome evolution in polyploids. *Plant molecular evolution*, 225-249.
- 143) Westerman, M., Barton, N. H., Hewitt, G. M. (1987). Differences in DNA content between two chromosomal races of the grasshopper *Podisma pedestris*. *Heredity*, 58(2), 221-228.
- 144) Whitman, D. W., Jones, C. G., Blum, M. S. (1992). Defensive secretion production in lubber grasshoppers (Orthoptera: Romaleidae): influence of age, sex, diet, and discharge frequency. *Annals of the Entomological Society of America*, 85(1), 96-102.
- 145) Whitman, D. W. (2008). The significance of body size in the Orthoptera: a review. *Journal of Orthoptera research*, 17(2), 117-134.

- 146) Wilkerson, M. J. (2012). Principles and applications of flow cytometry and cell sorting in companion animal medicine. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 42(1), 53-71.
- 147) Willkommen, J., Hörnschemeyer, T. (2007). The homology of wing base sclerites and flight muscles in Ephemeroptera and Neoptera and the morphology of the pterothorax of *Habroleptoides confusa* (Insecta: Ephemeroptera: Leptophlebiidae). *Arthropod Structure & Development*, 36(2), 253-269.
- 148) Wipfler, B., Machida, R., Mueller, B., Beutel, R. G. (2011). On the head morphology of Grylloblattodea (Insecta) and the systematic position of the order, with a new nomenclature for the head muscles of Dicondylia. *Systematic Entomology*, 36(2), 241-266.
- 149) Wipfler, B., Letsch, H., Frandsen, P. B., Kapli, P., Mayer, C., et al. (2019). Evolutionary history of Polyneoptera and its implications for our understanding of early winged insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(8), 3024-3029.
- 150) Wolfe, K. H. (2001). Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. *Nature Reviews Genetics*, 2(5), 333-341.
- 151) Yu, Y. S., Jin, S., Cho, N., Lim, J., Kim, C. H., et al. (2021). Genome Size Estimation of *Callipogon relictus* Semenov (Coleoptera: Cerambycidae), an Endangered Species and a Korea Natural Monument. *Insects* 2021, 12, 111.
- 152) Yuan, H., Huang, Y., Mao, Y., Zhang, N., Nie, Y., et al. (2021). The evolutionary patterns of genome size in Ensifera (Insecta: Orthoptera). *Frontiers in Genetics*, 12, 693541.
- 153) Zhang, H. L., Huang, Y., Lin, L. L., Wang, X. Y., Zheng, Z. M. (2013). The phylogeny of the Orthoptera (Insecta) as deduced from mitogenomic gene sequences. *Zoological Studies*, 52(1), 1-13.
- 154) Zhou, Z., Zhao, L., Liu, N., Guo, H., Guan, B., et al. (2017). Towards a higher-level Ensifera phylogeny inferred from mitogenome sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 108, 22-33.
- 155) Zwick, P. (2000). Phylogenetic system and zoogeography of the Plecoptera. *Annual review of entomology*, 45(1), 709-746.