

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Zoologie



**Bc. Marek Jankásek**

Karyotypová evoluce švábů podčeledi Oxyhaloinae  
Karyotype evolution of Oxyhaloinae cockroaches

Typ závěrečné práce:

Diplomová práce

Vedoucí práce/Školitel:

RNDr. František Št'áhlavský Ph.D.

Praha, 2019

## Prohlášení

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

V Praze 12. 8. 2019

Podpis:

## Poděkování

Velice rád bych poděkoval mému školiteli RNDr. Františku Šťáhlavskému, Ph.D. a konzultantce Mgr. Zuzaně Kotykové Varadínové za trpělivou pomoc a rady při tvorbě této práce. Velké poděkování patří také těm, kteří ochotně poskytli živí nebo lihový materiál pro účely této práce, zejména Františku Jůnovi, Jiřímu Hromádkovi, Miloši Markovi, Janu Šobotníkovi, Michaelovi Kotykovi a opět mé konzultantce Zuzaně Kotykové Varadínové. Za cenné rady a trpělivou pomoc zejména v oblasti cytogenetické metodiky nadále děkuji kolegyni Janě Štundlové. Mnohokrát děkuji mé rodině, bez jíž podpory by pro mě nebylo studium možné. Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury Univerzity Karlovy (GAUK 722119).

## Abstrakt

Švábi afrotropické podčeledi Oxyhaloinae (Blattodea: Blaberidae) jsou známi především díky chovatelsky populárním madagaskarským syčivým švábům. Evoluční vztahy a cytogenetické charakteristiky vnitřních linií této skupiny však nebyly doposud detailně studovány. Součástí práce je doposud nejrozsáhlejší (29 vzorků, 24 druhů) molekulárně-fylogenetická analýza zaměřená na podčeď Oxyhaloinae. Karyotypová charakteristika byla provedena u celkem 16 druhů; z toho u 12 vůbec poprvé. U 4 dalších druhů s již dříve určenými počty chromosomů byly získány doplňující informace o karyotypu. Překvapující bylo zjištění vnitrodruhové variability v počtu chromosomů u 2 druhů způsobené chromosomovou fúzí. Vůbec poprvé byla u řádu Blattodea užita molekulárně-cytogenetická metoda, a to fluorescenční *in situ* hybridizace za užití sond pro lokalizaci 18S rDNA klastrů u 16 druhů. U 4 studovaných druhů byla pozorována vnitrodruhová variabilita v počtu 18S rDNA klastrů. Všechny cytogenetické charakteristiky jsou diskutovány v kontextu získané fylogenetické hypotézy a dány do souvislostí s výsledky doposud publikované literatury.

## Klíčová slova:

Blattodea, Oxyhaloinae, chromosomy, 18S rDNA, vnitrodruhový polymorfismus, fylogeneze, chromosomové fúze, chromosomové rozpady

## Abstract

Cockroaches of Afrotropical subfamily Oxyhaloinae (Blattodea: Blaberidae) are widely known due to the popularity of Madagascar hissing cockroaches as pet species. It is thus surprising that evolutionary relationships and cytogenetical characteristics of this group haven't been studied in detail yet. The first molecular-phylogenetic analysis focused exclusively on Oxyhaloinae and based on 29 samples representing 24 species is provided herein. Karyotypes of 12 species that have never been cytogenetically studied before are described and additional karyotype information for 4 species with known chromosome number is provided. Moreover, intraspecific chromosome number polymorphism was observed in two species. The first application of molecular-cytogenetic methods within Blattodea in form of fluorescent in situ hybridization using 18S rDNA probe is performed in 16 species. Intraspecific 18S rDNA loci number variation was observed in four species. All cytogenetic characteristics are discussed in the context of obtained phylogenetic hypothesis and put in a frame of recent knowledge.

## Key words:

Blattodea, Oxyhaloinae, chromosomes, 18S rDNA, intraspecific polymorphism, phylogeny, chromosome fusion, chromosome fission

# Obsah

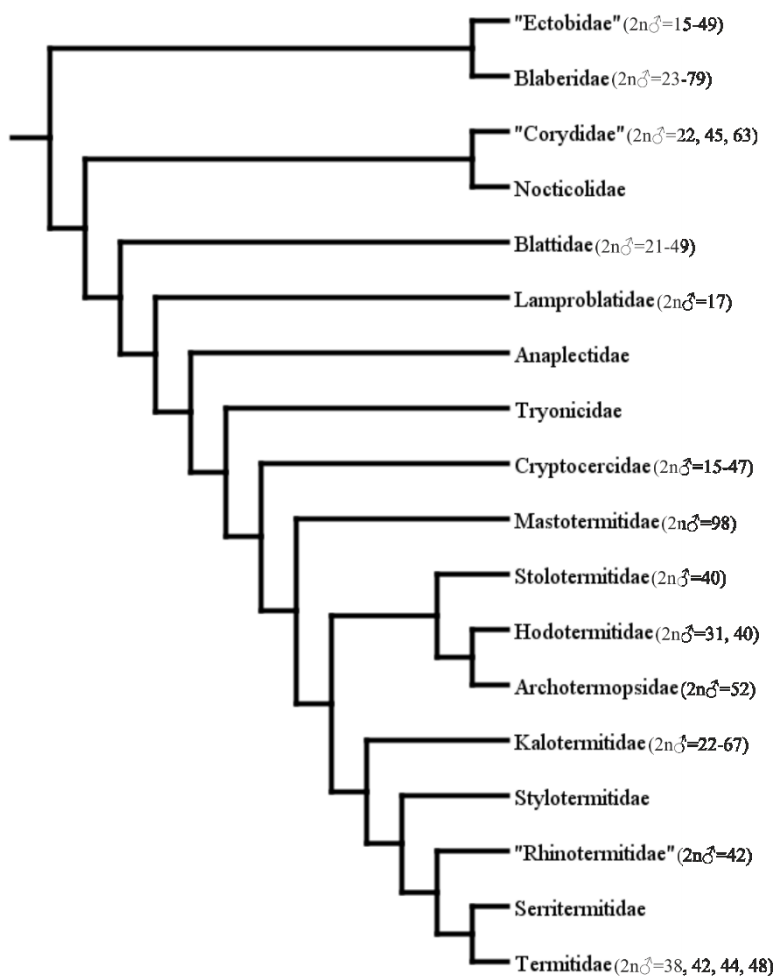
Úvod.....	1
Cytogenetika Blattodea .....	1
Charakteristika podčeledi Oxyhaloinae.....	5
Cíle diplomové práce .....	8
Materiál .....	8
Metodika .....	12
Příprava chromosomových preparátů a Giemsovo barvení.....	12
Příprava nepřímo značených sond pro klastry 18S rDNA a 28S rDNA .....	12
Příprava nepřímo značených sond pro klastry 18S rDNA a 28S rDNA určených pro detekci na jednom preparátu.....	13
Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH).....	14
C pruhování.....	15
Fylogenetická data .....	16
Izolace DNA.....	16
PCR reakce a purifikace.....	16
Sekvence a editace sekvencí.....	19
Výsledky .....	20
Karyotyp Oxyhaloini.....	20
<i>Oxyhaloa deusta</i> (Thunberg, 1784).....	20
Karyotypy Nauphoetini .....	22
<i>Henschoutedenia flexivitta</i> (Walker, 1868).....	22
<i>Nauphoeta cinerea</i> (Olivier, 1789) .....	23
<i>Rhyarobia maderae</i> (Fabricius, 1781).....	24
<i>Rhyarobia puerilis</i> (Rehn, 1937).....	25
<i>Simaoa conserfariam</i> Roth & Naskrecki, 2004.....	27
Karyotypy Gromphadorhini .....	28
<i>Aeluropda insignis</i> Butler, 1882.....	28
<i>Elliptorhina coquereliana</i> (Saussure, 1863) .....	29
<i>Elliptorhina davidi</i> van Herrewege, 1973 .....	31
<i>Elliptorhina chopardi</i> Lefebvre, 1966.....	33
<i>Elliptorhina javanica</i> (Hanitsch, 1930).....	34
<i>Elliptorhina cf. lefeuvri</i> van Herrewege, 1973 .....	36
<i>Elliptorhina laevigata</i> (Saussure & Zehntner, 1895) .....	37
<i>Gromphadorhina portentosa</i> (Schaum, 1853) .....	38
<i>Gromphadorhina oblongonota</i> van Herrewege, 1973 .....	42

<i>Princisia vanwaerebeki</i> van Herrewege, 1973 .....	46
Fylogenetické výsledky .....	47
Diskuse .....	50
Vnitrodruhová variabilita počtů chromosomů .....	50
Vnitrodruhová dynamika klastrů 18S rDNA.....	56
Fylogeneze Oxyhaloinae .....	59
Karyotypy v kontextu fylogeneze .....	62
Průběh meiotického dělení .....	67
Závěr .....	68
Bibliografie: .....	69

# Úvod

## Cytogenetika Blattodea

Představitelé řádu Blattodea, tedy švábi a termiti, mají značný globální ekonomický a ekologický dopad a množství aspektů jejich biologie podléhá intenzivnímu vědeckému výzkumu. Proto je překvapující, že z cytogenetického hlediska jsou švábi a termiti značně neprobádaní. Doposud bylo karyotypováno 213 druhů (z toho 127 druhů švábů, 86 termitů), což představuje pouze přibližně 2,8 % druhové diverzity. Diploidní počty chromozomů se pohybují v rozmezí 15 až 98 (revidováno v Jankásek, 2017) (viz obr. 1). Přitom nebyly pro popis karyotypu tohoto hmyzího řádu doposud aplikovány jakékoliv



Obrázek 1 – Kladogram Blattodea (podle Bourguignon et al. 2015; Djernæs et al. 2015; Wu et al. 2018) s rozpětími diploidních počtů chromozomů u jednotlivých čeledí (podle Jankásek, 2017; Martins et Mesa, 1995).

molekulárně-cytogenetické metody. Z důvodu značné odlišnosti karyotypů termitů (Isoptera) a ostatních netermitích švábů (dále jen „švábi“) která je dána především extenzivním rozvojem neopohlavních chromozomů u termitů, budou v tomto textu popisovány odděleně.

Nejvíce karyotypů Blattodea bylo popsáno u švábů čeledi Blaberidae (43) a termitů čeledi Termitidae (42). V rámci čeledě Blaberidae se diploidní počty chromozomů značně liší a celkové spektrum je  $2n\♂ = 23-79$  (Cohen a Roth, 1970). Většina karyotypů druhů této čeledi se skládá z metacentrických a submetacentrických chromozomů. Nicméně, u podčeledí Diplopterinae, Panchlorinae a tribu Gromphadorhini (Oxyhaloinae) byly zjištěny akrocentrické chromosomy (Cohen a Roth, 1970). Se zvýšeným počtem akrocentrických chromozomů se setkáváme také například u švábů čeledi Corydiidae.



Samotná evoluce karyotypu byla v kontextu fylogenetických hypotéz studována u švábů pouze v čeledi Cryptocercidae, která tvoří sesterskou linii k termitům (Djernaes et al., 2012; Inward et al., 2007). Po dosažení karyotypů pěti amerických druhů ( $2n♂=37-47$ ) rodu *Cryptocercus* do kontextu fylogenetické hypotézy, vyvstal pravděpodobný scénář jejich karyotypové evoluce skrze fúze akrocentrických chromosomů (Burnside et al., 1999; Luykx, 1983). Asijské druhy rodu *Cryptocercus*, kterých je celkem známo 25, tvoří sesterskou skupinu 5 americkým druhům (Bai et al., 2018; Che et al., 2016). Jejich diploidní počty se pohybují v rozmezí:  $2n♂=15-43$  (Bai et al., 2018; Che et al., 2016). Velká variabilita počtu chromosomů v rámci tohoto rodu je přisuzována chromosomovým fúzím a rozpadům, nicméně na základě fylogenetických hypotéz (viz Bai et al., 2018; Che et al., 2016) nelze jednoduše říci, že by se evoluce udávala pouze jedním z těchto směrů. Jednotlivé druhy rodu *Cryptocercus* žijí v oddělených vysokohorských údolích a mají malou schopnost disperze, což může u takových populací zapříčinit pozorovanou vyšší karyotypovou variabilitu (White a Webb, 1976). U dalších skupin Blattodea lze dle publikovaných počtů chromosomů (pro přehled viz Jankásek, 2017) a recentních fylogenetických studií (Bourguignon et al., 2018; Inward et al., 2007; Legendre et al., 2017) vysledovat trend v narůstání počtu chromosomů. Tento jev sledujeme u několika druhů podčeledi Blaberinae. U druhů *Blaberus atropos* (Stoll, 1813), *B. craniifer* Burmeister, 1832 a *B. giganteus* (Linnaeus, 1758) byl zjištěn diploidní počet chromosomů u samců 73 zatímco u dalších dvou druhů *B. discoidalis* (Audinet-Serville, 1839) a *B. parabolicus* Walker, 1868 37, respektive 35 (Cohen a Roth, 1970). Jak karyotypy s nízkými počty chromosomů, tak i ty s počtem 73 obsahovaly jeden velký pár submetacentrických nebo metacentrických chromosomů a zbytek chromosomů byl také submetacentrický či metacentrický (Cohen a Roth, 1970). Z přiložených fotografií v článku Cohen a Roth (1970) je zřejmé že chromosomy zmíněných druhů s početnějším karyotypem jsou mnohem menší v porovnání se zbylými dvěma karyotypy, autoři však tyto rozdíly nijak nekomentují.

Dále lze trend ke zvyšování počtu chromosomů vysledovat u druhu *Macropanesthia rhinoceros* Saussure, 1895, což byl jediný karyotypovaný druh ( $2n♂=79$ ) tohoto rodu. *Macropanesthia* patří společně s několika dalšími rody v substrátu žijících švábů do podčeledi Geoscapheinae (Blaberidae), která je nejspíše skupinou několika paralelních linií vnořených v podčeledi Panesthinae (Blaberidae) (Legendre et al., 2017; Lo et al., 2016), jejíž karyotypované druhy (2) měly výrazně menší chromosomový počet ( $2n♂=37$ ) (Cohen a Roth, 1970). Další linie, u kterých pozorujeme vysoké chromosomové počty ( $2n♂=65$ ) jsou druhy *Phortioeca phorasoides* (Walker, 1871) a *Lanxoblatta emarginata* (Burmeister, 1838) (Cohen a Roth, 1970). Oba tyto druhy patří do podčeledi Zetoborinae, jež ovšem není monofyletická a některé její evoluční linie jsou vnořené do podčeledi Blaberinae, která tedy také není monofyletickou (Legendre et al., 2017). Nejbližší příbuzný rod těmto dvěma zmíněným druhům se známým alespoň jedním karyotypem je dle Legendre et al. (2017) rod *Phoetalia* (*Phoetalia circumavagans*,  $2n♂=53$ ) (Cohen a Roth, 1970), což opět nasvědčuje trendu

navyšování chromosomů. Výrazný kontrast vysokých a nízkých počtů chromosomů je zřejmý i u podčeledi Oxyhaloinae (Blaberidae), které se tato práce věnuje v samostatné podkapitole: Charakteristika podčeledi Oxyhaloinae.

U většiny známých karyotypů netermitích švábů byly u samců zjištěny liché diploidní počty chromosomů. Z tohoto důvodu je u mnoha druhů pouze předpokládán chromosomový systém určení pohlaví XX/X0. Nicméně, nelze vyloučit ani jiné systémy s lichým počtem pohlavních chromosomů u samců, jelikož u řady druhů nebyla popsána meiosa, a není tudíž známé párování potenciálních zmnožených pohlavních chromosomů (White a Webb, 1976). Konzervativnost systému pohlavních chromosomů u netermitích švábů může být z těchto důvodů pouze zdánlivá. Pokud byl nepárový pohlavní chromosom X detekován, byl většinou metacentrický. Metacentrický pohlavní chromosom nebude často a stabilně fúzovat s autosomy, a to je možný důvod absence pozorování větší variability chromosomových pohlavních systémů u netermitích švábů (White a Webb, 1976). Jedinou známou výjimkou tohoto schématu je patrně rod *Latindia* (Corydiidae). U blíže neurčeného tohoto rodu byl u samců pozorován sudý diploidní počet chromosomů ( $2n♂=22$ ) (Cohen a Roth, 1970). Nicméně autoři sami apelují na přezkoumání karyotypů vícero jedinců tohoto rodu.

Studium buněčného dělení v rámci švábů odhalilo u některých druhů jevy odchylující se od staardního schématu meiosy. Zkoumané inbrední populace druhů *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1759) a *Blaberus discoidalis* (Audinet-Serville, 1839) vykazovaly formace autosomálních multivalentů vzniklých v důsledku reciprokových translokací v heterozygotním stavu (John a Lewis, 1959; Lewis a John, 1957). Lewis a John (1957) studovaly tři inbrední populace *P. americana*, z nichž dvě byly z uhelných dolů a jedna laboratorní. Všechny zkoumané populace byly tedy silně reprodukčně izolovány. U důlních populací byly pozorovány kombinace multivalentů: R.IV (prstencový tetraivalent), 2R.IV, 3R.IV, C.IV (lineární tetraivalent), R.IV + C.IV, 2R.IV + C.IV. Jedinci bez multivalentů u důlních populací vůbec pozorováni nebyli a v rámci jedné populace se vždy vyskytovalo vícero různých kombinací tetraivalentů. V laboratorní populaci (založené z jedné z modelových důlních populací) se u vybraných jedinců multivalenty buďto neobjevily nebo se u nich vyskytovala kombinace: R.VI + R.IV. Autoři nezaznamenali sníženou fertilitu jedinců s translokacemi a rozchod chromosomů multivalentů během anafáze probíhal správně. U inbrední laboratorní populace druhu *Blaberus discoidalis* detekovali John a Lewis (1959) ve 23 jedincích z 25 jednu až čtyři reciprokové translokace v heterozygotním stavu, jejichž projevem byla formace prstencových multivalentů. Ani u tohoto druhu nebyl zaznamenán pokles fertility a disjunkce chromosomů multivalentu probíhala během anafáze normálně (John a Lewis, 1959). Frekventovaná přítomnost chromosomových multivalentů souvisí s mírou inbreedingu daných populací. Se zvyšujícím se inbreedingem roste pozitivní selekce heterozygotních reciprokových translokací. Důvodem je zamezení crossing-overu v oblasti translokovaného segmentu mezi homologickými chromosomy, a tím pádem vznik nových vazebných skupin alel (John a Lewis, 1959; Lewis a John,

1957). Z tohoto důvodu mohou setrvávat tyto translokace v inbrední populaci, kde je obecně silnější trend k homozygotnosti, delší dobu, vytvářet stabilní polymorfismus či se v populaci úplně fixovat (Charlesworth a Wall, 1999; Husseneder et al., 1999; John a Lewis, 1959; Lewis a John, 1957).

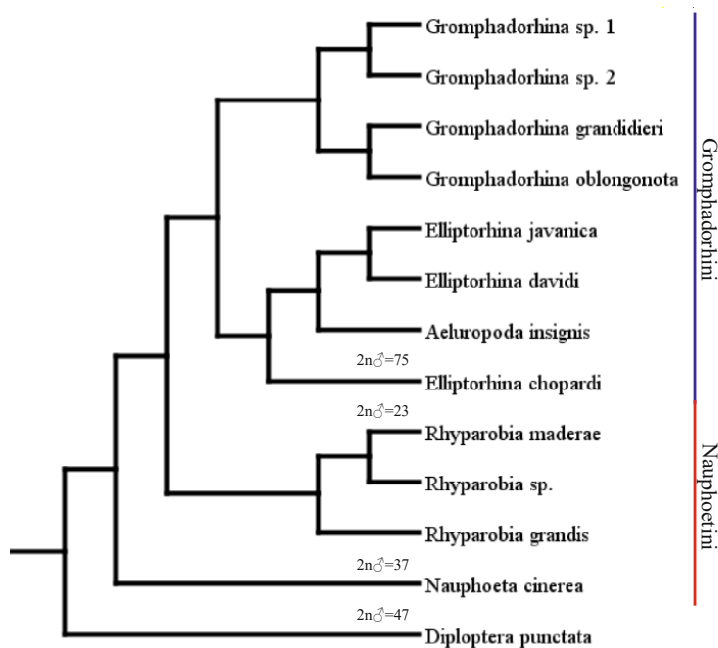
Termiti jsou značně odlišnou skupinou v mnoha ohledech od zbytku švábů a z hlediska jejich karyotypů tomu často nebývá jinak. Na rozdíl od netermitích švábů, jejichž karyotypy jsou většinou složeny z dvouramenných chromosomů (Cohen a Roth, 1970), jsou u termitů zdaleka nejzastoupenější akrocentrické a telocentrické chromosomy (Bergamaschi et al., 2007; Luykx, 1990). Největší z odlišností termitů od zbytku Blattodea je široká rozrůzněnost chromosomových systémů určení pohlaví, kterou u jiných švábů vůbec nepozorujeme. Cytogeneticky nejstudovanější čeleď Termitidae je karyotypově velice konzervativní a většina studovaných druhů vykazovala  $2n=42$  a chromosomový mechanismus určení pohlaví  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y_1Y_2$ , jenž je odvozen od původního  $XX/XY$  mechanismu a vznikl jednou reciprokou translokací mezi Y chromosomem a autosomem (Bergamaschi et al., 2007; Vincke, 1974; Vincke a Tilquin, 1978). U 10 druhů evolučně blízké čeledi Rhinotermitidae byl pozorován velice podobný karyotyp, jenž se také skládá ze 42 chromosomů. Na rozdíl od Termitidae zde však pozorujeme chromosomové systémy určení pohlaví jak  $XX/XY$  tak i  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y_1Y_2$ , a to v některých případech i v rámci jednoho druhu (Bergamaschi et al., 2007). U zbývajících termitích čeledí již pozorujeme vyšší karyotypovou rozrůzněnost. Čeleď Kalotermitidae je v tomto směru vůbec nejvariabilnější s rozpětím diploidních počtů chromosomů  $2n=22$  (Martins a Mesa, 1995) až 67 (Fontana, 1982) a mnoha chromosomovými systémy určení pohlaví. Ancestrální karyotyp této čeledi měl nejspíše 42 akrocentrických a telocentrických chromosomů a byl tedy podobný karyotypům Rhinotermitidae a Termitidae. Skrze chromosomové fúze a Robertsonovské translokace týkajících se jednoramenných chromosomů či chromosomové rozpady následně došlo u řady druhů k odchýlení od tohoto výchozího stavu a celé čeleď nabyla výraznou karyotypovou variabilitu (Martins a Mesa, 1995). Reciproké translokace a chromosomové fúze sehráli hlavní roli ve tvorbě rozličných chromosomových systémů determinujících pohlaví a došlo tak k odchýlení se od původního systému  $XX/XY$  (Luykx, 1990; Martins a Mesa, 1995) (pro detailnější souhrn popisů karyotypů Kalotermitidae viz Jankásek, 2017). Čeledi Rhinotermitidae a Termitidae tvoří společně s čeleděmi Serritermitidae a Stylotermitidae (o kterých žádné cytogenetické informace dostupné nejsou) monofylum s názvem Neoisoptera (Engel et al., 2009). Celé této skupině je dále sesterská čeleď Kalotermitidae a tvoří spolu tedy monofyletické uskupení (Engel et al., 2009). Dle dosavadních cytogenetických dat lze tedy usuzovat, že karyotyp o 42 převážně telocentrických a akrocentrických chromosomech je ancestrálním pro celou tuto skupinu (Kalotermitidae + Neoisoptera) a během evoluce docházelo k jeho rozrůznění často skrze fúze chromosomů, Robertsonovské translokace, pericentrické inverze a chromosomové rozpady (Martins a Mesa, 1995). Méně odvozené termití čeledi, tzv. „lower termites“, vykazují také různě diferencované karyotypy i pohlavní chromosomy. Studium jejich karyotypů se nicméně týkalo

pouze pěti druhů. Samci druhu *Mastotermes darwiniensis*, kterýžto je jediným zástupcem čeledi Mastotermitidae, mají v diploidním počtu 98 chromosomů (Bedo, 1987), což je vůbec nejvyšší počet uvnitř řádu Blattodea. V rámci čeledi Stolotermitidae byly studovány druhy *Porotermes adamsoni*,  $2n♂ = 40$ , jehož karyotyp obsahuje 2 metacentrické chromosomy a nastiňuje tak možnost odvození skrze chromosomové fúze od původnějšího karyotypu s 42 chromosomy bez metacentrických chromosomů (Luykx, 1990), a druh *Stolotermes victoriensis*,  $2n♂ = 31$  a  $2n♀ = 32$ , který má chromosomový systém určení pohlaví XX/X0 (Luykx, 1990). Nejedná se však o homologický znak společný se šváby, jelikož X chromosom tohoto druhu vznikl pravděpodobně sekundárně fúzí dvou akrocentrických chromosomů. V rámci čeledi Archotermopsidae byl určen diploidní počet chromosomů u druhů *Zootermopsis angusticollis* Hagen, 1858,  $2n♂ = 2n♀ = 52$  (Stevens, 1905; Light, 1938), a *Zootermopsis nevadensis* Hagen, 1858,  $2n♀ = 52$  (Light, 1938).

### Charakteristika podčeledi Oxyhaloinae

Podčeleď Oxyhaloinae (Blaberidae) je skupinou čítající 78 druhů v 17 rodech (<http://Cockroach.SpeciesFile.org>).

Monofyletičnost Oxyhaloinae je konzistentně podpořena jak morfologicky (Princis, 1960; Roth, 1971), tak molekulárně-geneticky (např. Bourguignon et al., 2018). Naproti tomu je stále nedorěšena její pozice a příbuznost v rámci Blaberidae. Nicméně, dle recentních studií se ukazuje, že je sesterská podčeleď Diplopterinae (viz obr. 2) (Bourguignon et al., 2018; Djernaes et al., 2012; Evangelista et al., 2019).



Obrázek 2 - Kladogram podčeledi Oxyhaloinae s značenými známými diploidními počty chromosomů nad větvemi. Sesterská podčeleď Diplopterinae je zastoupena druhem *Diploptera punctata* (Eschscholtz, 1822). Upraveno a převzato z Bourguignon et al. (2019)

Samotná podčeleď Oxyhaloinae se na základě struktury L2d a R2 skleritů samčích genitálií a tvaru samčí subgenitální destičky dělí na tři triby (Princis, 1960; Roth, 1971): Oxyhaloini (1 rod, 10 druhů), Nauphoetini (6 rodů, 35 druhů) a Gromphadorhini (6 rodů, 20 druhů). Další 4 rody se 13 druhy jsou řazeny jako Oxyhaloinae incertae sedis. Mimo morfologické rozdíly se tyto triby liší i areálem rozšíření. Oxyhaloini se vyskytují od subsaharaské Afriky po Jihoafrickou republiku. Nauphoetini mají podobně subsaharský areál rozšíření, ale několik druhů rodu *Jagrehnia* zasahuje i na Madagaskar a přilehlé ostrovy. Tribus Gromphadorhini je endemický pro Madagaskar a přilehlé

ostrovy (<http://Cockroach.SpeciesFile.org>). Dosavadní členění do tří tribů je založeno především na morfologických znacích a detailní molekulárně fylogenetická studie zaměřená pouze na tuto skupinu zatím nebyla publikována. Legendre et al (2017) zahrnuli do své multilocusové studie fylogeneze čeledi Blaberidae až 13 taxonů Oxyhaloinae. Jejich výsledky podporují Nauphoetini a Gromphadorhini jako monofyletické skupiny. Bourguignon et al. (2019) zahrnuli do své mitogenomické studie, zaměřené na celý řád Blattodea, taktéž 13 taxonů patřící mezi Oxyhaloinae (Obr. 2). Tribus Nauphoetini je však dle výsledků této studie parafyletický k tribu Gromphadorhini. V rámci Gromphadorhini je parafyletický rod *Elliptorhina*, v němž je vnořen rod *Aeluropoda*, jehož přesné postavení ale není z důvodu nízkých podpor spolehlivě určené (<50% posteriorní pravděpodobnost). Tribus Oxyhaloini nebyl zahrnut do těchto studií.

Vzhledem k udané topologii kladogramu (obr. 2) a známé biogeografii Oxyhaloinae je zřejmé, že v geologické historii muselo dojít k osídlení Madagaskaru. K úplnému oddělení Madagaskaru od kontinentální Afriky došlo přibližně před 136 miliony lety (Phethean et al., 2016). K oddělení evoluční linie tribu Gromphadorhini, žijícího pouze na Madagaskaru, od linie rodu *Rhyparobia* došlo dle molekulárních hodin přibližně před 55 až 83 miliony let (Bourguignon et al., 2018). Z těchto výsledků je zřejmé že Madagaskar byl osídlen skrze trans-oceánickou disperzi přes již zformovaný Mosambický průliv (Bourguignon et al., 2018). Konkrétní průběh či doba, kdy k této disperzi došlo, není známa. Lepší vhléd do průběhu kolonizace Madagaskaru podčeledí Oxyhaloinae může poskytnout studium rodu *Jagrehnia* (Nauphoetini) vyskytujícího se jak na pevninské Africe, tak na Madagaskaru. V tomto ohledu jsou potenciálně zajímavé i rody *Heminauphoeta* a *Brachynauphoeta*, které se s výjimkou druhu *Brachynauphoeta mayottensis* (Bruijning, 1947), jenž je endemitem ostrova Mayotte (Komorské ostrovy), vyskytují rovněž pouze na Madagaskaru a jsou v rámci celé podčeledi Oxyhaloinae nejasného postavení (<http://Cockroach.SpeciesFile.org>). Na rozdíl od rodu *Jagrehnia* již byly dva poslední zmíněné rody zastoupeny ve fylogeneticko-molekulárních studiích a odvětvují se jako separované linie před vznikem tribu Gromphadorhini (tak jak je v současné chvíli definován) (Inward et al., 2007; Legendre et al., 2017). Vzhledem k jejich fylogenetické a biogeografické pozici mohou tedy představovat jakési přechodné fenotypové a genotypové formy mezi Nauphoetini a Gromphadorhini.

Co se týče cytogenetických poznatků, celkem bylo karyotypováno 5 druhů Oxyhaloinae: *Elliptorhina brunneri* (Butler, 1882)  $2n^{\text{♀}}=63$  (Cohen a Roth, 1970), *Elliptorhina chopardi* (Lefebvre, 1966)  $2n^{\text{♀}}=75$  (Cohen a Roth, 1970), *Gromphadorhina portentosa* (Schaum, 1853)  $2n^{\text{♀}}=63$  (Cohen a Roth, 1970), *Nauphoeta cinerea* (Olivier, 1789)  $2n^{\text{♀}}=37$  (Cohen a Roth, 1970), *Rhyparobia maderae* (Fabricius, 1781)  $2n^{\text{♀}}=23$  (Morse, 1909). Jedná se o jednu z karyotypově nejrozličnějších podčeledí švábů. Rody *Elliptorhina* a *Gromphadorhina* vykazující vysoké počty chromozomů patří do tribu Gromphadorhini. Naproti tomu, rody *Rhyparobia* a *Nauphoeta*, mající

nižší počty chromozomů do tribu Naupheotini. Již z těchto dat je zjevné, že karyotyp této podčeledi prodělal rozsáhlé změny a vzhledem ke zvýšenému počtu akrocentrických chromosomů u Gromphadorhini je pravděpodobné že k navýšení počtu jejich chromosomů došlo rozpadem či naopak u ostatních linií došlo k fúzím. V rámci Blattodea se setkáváme s oběma případy těchto chromosomových přestaveb. Zajímavosti této problematice také dodává fakt, že Gromphadorhini jsou čistě ostrovní skupinou a kolonizace a následný život v ostrovních podmínkách mohl mít unikátní vliv na jejich karyotyp. K zodpovězení této otázky je potřeba molekulárně fylogenetická analýza s větším druhovým zastoupením a více dat o karyotypech dalších druhů.

## Cíle diplomové práce

Základním cílem této diplomové práce je vytvořit fylogenetickou hypotézu na základě analýzy fragmentů 6 genů (histon 3 (H3), dlouhý fragment COI (LCO), 28S rRNA, 18S rRNA, 16S rRNA a 12S rRNA) od 22 druhů podčeledi Oxyhaloinae.

Do kontextu této fylogenetické studie budou následně namapovány výsledky cytogenetické analýzy 16 druhů z nichž dva jsou zastoupeny dvěma populacemi a jeden třemi populacemi, zbytek druhů je zastoupen jednou populací.

Cytogenetické analýzy budou zahrnovat určení počtu chromosomů a jejich morfologie, popisu buněčného dělení dle dostupných figur. Dále budou u všech druhů lokalizovány a určeny počty klastrů 18S rDNA metodou FISH. Dále je cílem optimalizovat metodu C-pruhování za účelem lokalizace bloků konstitutivního heterochromatinu a také optimalizace FISH za použití dvou sond k simultánní lokalizaci klastrů 18S a 28S rDNA na jednom preparátu. Výsledky těchto cytogenetických analýz poskytnou cenné informace o znacích karyotypů jednotlivých linií v rámci Oxyhaloinae.

## Materiál

V rámci této práce bylo cytogeneticky analyzováno 19 taxonů/populací řadících se do 16 druhů. Všichni analyzovaní jedinci pocházeli z dlouhodobých chovů Katedry zoologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy anebo byly pro tento účel získány od soukromých chovatelů. Pro účely molekulárně-fylogenetické analýzy byly použity sekvence 30 taxonů řadících se do 25 druhů. Materiál 20 analyzovaných taxonů/populací byl dostupný z chovů Katedry zoologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy anebo byly poskytnuty soukromými chovateli. Sekvence 5 dalších druhů byly získány z lihových sbírek. Sekvence posledních 5 druhů taxonů byly získány z databáze Genbank.

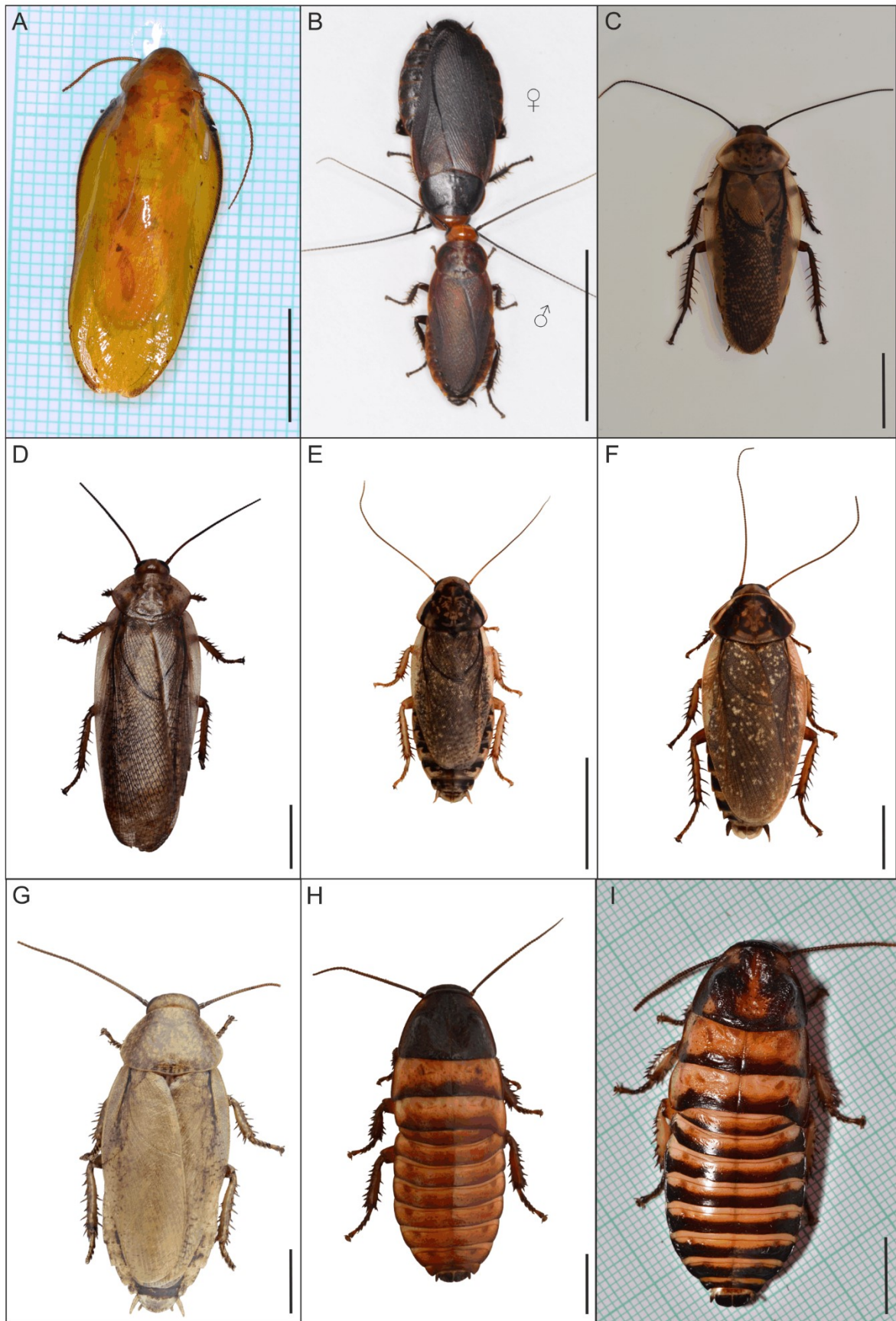
Pro přehled a lokality analyzovaných jedinců jak cytogenetickými metodami, tak i metodami molekulární fylogeneze viz tab. 1.

Pro obrazovou dokumentaci vybraných některých modelových druhů viz obr. 3 a 4.

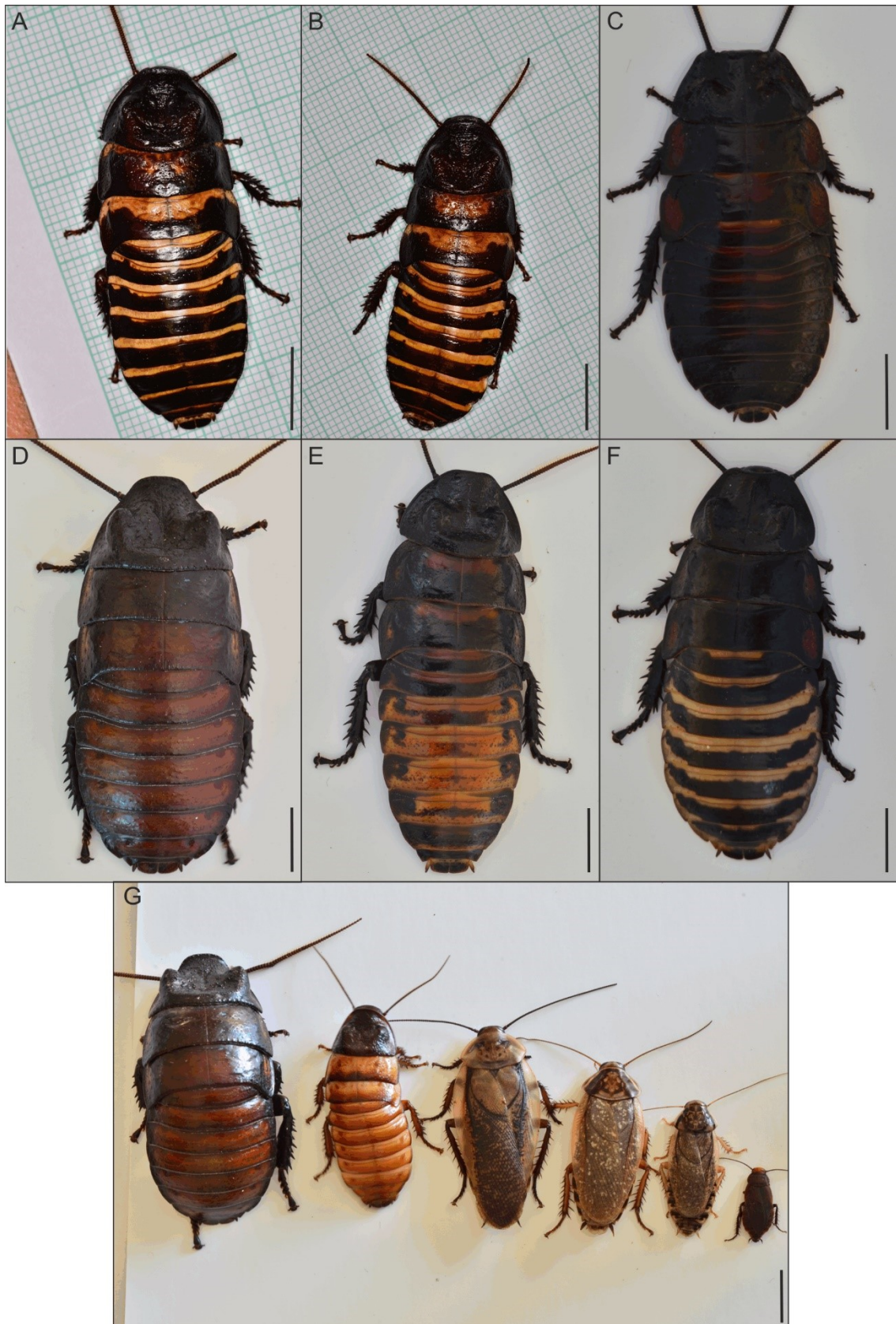
Tabulka 1 - Přehled druhů a jejich lokalit (lab=laboratorní kolonie) s identifikačními kódy použitých při molekulárně-fylogenetické analýze. V případě analýzy vícera populací stejného druhu, jsou označeni těchto populací za lomítkem ("/"). \*Druhy/populace použité zároveň pro cytogenetické analýzy. \*\*Lihové vzorky. + Druhy jejichž genové sekvence byly získány z databáze Genbank. Pro jednotlivé sekvenované genové fragmenty jsou uvedeny jejich délky v počtu párů nukleotidů. U sekvencí získaných z databáze Genbank jsou uvedeny vyhledávací kódy.

druh/populace	Rozšíření druhu	Původ	ID	12S	16S	18S	28S	H8	LCO
<i>Actinoptoda insignis</i> *	Madagaskar	lab (Madagaskar)	BIA 46	385	428	1873	523	328	NA
<i>Braconaphoeta foupoini</i> teensis +	Madagaskar (východ)	NA	-	DQ874054	NA	DQ874141	DQ874221	DQ873975	NA
<i>Diploptera punctata</i> +	Indomalajzia	lab	-	MF286807	MF286878	EF363237	MF286938	MF286990	MF479146
<i>Elipptorhina coquerelliana</i> /MIDG1*	Madagaskar (sever)	Madagaskar, S13.20773 E049.67115	BIA 137	384	429	1852	523	328	NA
<i>Elipptorhina coquerelliana</i> /MIDG32*	Madagaskar (sever)	Madagaskar S16.30164 E046.81203	BIA176	385	430	1873	523	328	658
<i>Elipptorhina dravid*</i>	Madagaskar	lab	BIA 131	387	432	1873	523	328	658
<i>Elipptorhina chopardi*</i>	Madagaskar	lab	BIA 27	385	431	1873	523	328	658
<i>Elipptorhina jvannica*</i>	Madagaskar (jih)	lab	BIA 127	374	432	1873	523	328	658
<i>Elipptorhina brevipata*</i>	Madagaskar (jihzápad)	lab	BIA 184	386	430	1873	523	328	658
<i>Elipptorhina cf. lefeuvri*</i>	ostrov Evropa	Madagaskar, S20.25155 E044.41929	BIA 155	385	430	1873	523	328	658
<i>Gronphodorhina oblongonota*</i>	Madagaskar (jih)	lab	BIA 107	384	429	1873	523	328	658
<i>Gronphodorhina portentosa</i> /populace 1*	Madagaskar (jihzápad)	lab	BIA 157	384	428	1873	523	328	658
<i>Gronphodorhina portentosa</i> /populace 2*	Madagaskar (jihzápad)	lab	BIA 185	384	428	1873	523	328	658
<i>Gronphodorhina portentosa</i> /populace 3**	Madagaskar (jihzápad)	lab	BIA 227	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Heminaaphoeta</i> sp.+	Madagaskar	NA	-	DQ874053	NA	DQ874140	DQ874220	DQ873974	NA
<i>Hensshoutedenia cf. frenata</i> **	Afrika	Kamerun, Ebogo, 3°22'50.2"N 11°27'47.4"E	KAM18	387	431	1873	523	328	658
<i>Hensshoutedenia flexivitta</i> /001*	Afrika (rovníkové)	Kamerun, Littoral, Mamba, N04°07.311' E10°11.615'	BIA 178	389	432	1874	523	328	658
<i>Hensshoutedenia flexivitta</i> /006*	Afrika (rovníkové)	Kamerun, Southwest, Nyassoso, N04°49.388'; E09°41.308'	BIA 161	388	432	1874	523	328	658
<i>Hensshoutedenia</i> sp.+	Afrika	NA	-	KF372469	KF372483	KF372500	KF372448	NA	KF372521
<i>Jugrethnia medecassa</i> **	Madagaskar	Madagaskar (sever), S13.20773 E049.67115	Z196IM	386	432	1874	523	328	658
<i>Ninaphoeta cinerea</i> *	Afrika	lab	BIA 160	387	431	1874	523	328	658
<i>Oxyhaloba deusta</i> *	Afrika (jih)	lab	BIA 98	382	430	1876	524	328	658
<i>Oxyhaloba</i> sp.**	Afrika	Kamerun, Ebogo, 3°22'50.2"N 11°27'47.4"E	KAM19	382	435	NA	425	NA	658
<i>Prinzasia vanwazerbeke*</i>	Madagaskar (jihzápad)	lab	110	384	428	1873	523	328	658
<i>Pronaphoeta cf. viridula</i> +	Afrika (rovníkové)	NA	-	KV497583	KV497615	KV497708	KV497727	NA	NA
<i>Pronaphoeta viridula</i> **	Afrika (rovníkové)	Kamerun, Ebogo, 3°22'50.2"N 11°27'47.4"E	KAM15	387	NA	1874	523	328	NA
<i>Rhypanobia grandis</i> **	Afrika (rovníkové)	Kamerun, Ebogo, 3°22'50.2"N 11°27'47.4"E	KAM20	361	432	1873	523	313	658
<i>Rhypanobia moderna*</i>	Afrika	lab	BIA 119	385	436	1872	523	328	658
<i>Rhypanobia puerilis*</i>	Afrika (rovníkové)	Kamerun, Ebogo, 3°22'50.2"N 11°27'47.4"E	BIA 122	386	431	1873	523	328	658
<i>Rhypanobia</i> sp. GOLD	NA	lab	BIA 180	387	436	1872	523	328	658
<i>Sirandoa conserfarii*</i>	Afrika (Guinea, Simandou Mts.)	lab	BIA 183	386	430	1873	523	328	658





Obrázek 3 – Obrazový přehled vybraných druhů Oxyhaloinae I. A: *Pronauphoeta viridula*, B: *Oxyhaloa deusta* (samec ♂ a samice ♀), C: *Rhyparobia maderae*, D: *Rhyparobia puerilis*, E: *Nauphoeta cinerea*, F: *Henschoutedenia flexivitta*, G: *Jagrehmia madecassa*, H: *Elliptorhina chopardi*, I: *E. cf. lefeuvri*. Měřítko = 1 cm. Foto: Zuzana Kotyková Varadínová



Obrázek 4 - Obrazový přehled vybraných druhů Oxyhaloinae II. A: *E. coquereliana* MDG1, B: *Elliptorhina coquereliana* MDG32, C: *Aeluropoda insignis*, D: *Gromphadorhina oblongonota*, E: *G. portentosa*, F: *Princisia vanwaerebeki*, G: zleva: *G. oblongonota*, *E. chopardi*, *R. maderae*, *H. flexivitta*, *N. cinerea*, *O. deusta*. Měřítko = 1 cm  
Foto: Zuzana Kotyková Varadinová



## Metodika

### Příprava chromosomových preparátů a Giemsovo barvení

Jedincům byly vypitvány gonády a ponechány 25 minut v hypotonickém 0,075M roztoku KCl. Hypotonický roztok způsobí nasátí vody buňkou a rozestoupení sledovaných chromosomů. Dále byly gonády ponechány minimálně 15 minut ve fixačním roztoku metanolu a kyseliny octové (3:1). Následně byla malá část tkáně gonády (cca 1 mm) přenesena na podložní sklo a zakápnuta a rozpuštěna 60% kyselinou octovou. Rozpuštění bylo urychleno mechanickou macerací tkáně wolframovými drátky přímo na podložním skle. Samotná tvorba preparátů byla provedena metodou „plate spreading“ (Traut, 1976). Suché preparáty byly nadále barveny 25 minut v 5% roztoku barviva Giemsa v Sørensenově pufru (pH = 6,8). Po nabarvení byly preparáty připravené k prohlížení, které probíhalo na mikroskopech Olympus Provis AX 70 a Olympus IX81. Analýza počtu chromosomů, jejich délek a morfologických typů ze zhotovených fotografií probíhala v programu ImageJ v1.52a (<https://imagej.nih.gov/ij/>) s pluginem Levan (Sakamoto & Zacaro, 2009).

### Příprava nepřímo značených sond pro klastry 18S rDNA a 28S rDNA

U všech zkoumaných druhů byly mapovány metodou FISH klastry genu pro 18S rRNA a u druhu *Gromphadorhina portentosa* (Schaum, 1853) klastř genu pro 28S rRNA. DNA templát pro výrobu sond byl získán ze štíra druhu *Tityus smithii* Pocock, 1893 (pro popis izolace DNA viz podkapitulu Izolace DNA). V laboratoři cytogenetiky Katedry zoologie Univerzity Karlovy se jedná o zavedený a funkční protokol. Evoluční vzdálenost štírů od řádu Blattodea nezpůsobuje špatnou aplikaci takto vytvořené sondy, jelikož samotné sekvence genů 18S rRNA a 28S rRNA jsou značně konzervativní. Potřebný úsek genomu (cca 1800 bp, resp. 1100 bp) pro výrobu sond byl amplifikován pomocí PCR (polymerase chain reaction). Na jednu PCR reakci byly použity 3 µl pufru, 2,4 µl dNTP's (volných nukleotidů), 1,5 µl + 1,5 µl primeru (forward + reverse) a 0,3 µl ExTaq polymerázy. Dále byl přidán objem DNA templátu odpovídajícího 150 ng a doředěn vodou do objemu 21,3 µl. Pro jednotlivé kroky PCR reakce a popis primerů viz tab. 2, 3 a 4.

Tabulka 2- primery použité pro PCR amplifikaci fragmentu 18S rDNA (1800 bp) a 28S rDNA (1100 bp) pro výrobu FISH sondy

fragment	primer	směr	sekvence 5' - 3'
18S rDNA	18S-Gal forward	forward	CGAGCGCTTTTATTAGACCA
18S rDNA	18S-Gal reverse	reverse	GGTTCACCTACGGAAACCTT
28S rDNA	28SpsF1	forward	ATTACCCGCCGAATTTAAGC
28S rDNA	28SpsR1	reverse	TCGGAGGGAACCAGCTAC

Tabulka 3 – použitý PCR program pro amplifikaci fragmentu 18S rDNA na výrobu FISH sondy

PCR program pro přípravu sondy pro 18S rDNA klastr			
Fáze	Teplota	Čas	Opakování
denaturace	95°C	3 min	34x
nasedání primeru	94°C	30 s	
	55°C	30 s	
polymerace	72°C	2 min	
	72°C	3 min	

Tabulka 4 – použitý PCR program pro amplifikaci fragmentu 28S rDNA na výrobu FISH sondy

PCR program pro přípravu sondy pro 28S rDNA klastr			
Fáze	Teplota	Čas	Opakování
denaturace	95°C	3 min	34x
nasedání primeru	95°C	30 s	
	56°C	30 s	
polymerace	72°C	1 min	
	72°C	10 min	

Po PCR reakci byla pomocí elektroforézy zkontrolována délka a čistota získaných fragmentů. Reakce probíhala 30 min za elektrického napětí 100 V a elektrického proudu 400 mA. Dle koncentrace PCR produktu, jež byla stanovena na fluorimetru Qubit<sup>TM</sup>4 Flurometer (Invitrogen<sup>TM</sup>), byl odebrán příslušný objem k získání 500 ng templátu. Získaný templát byl značený metodou „nick“ translace za použití Nick Translation Kitu (Abbott Molecular). Nejprve byl namíchán mix volných degenerovaných nukleotidů (značených biotinem): 2,5mM A 2 µl, 2,5mM C 2 µl, 2,5mM G 2 µl, 2,5mM T 0,75 µl a 10,08 µl H<sub>2</sub>O. Do nick translační směsi bylo dáno 2,5 µl dNTP's mixu, 2,5 µl bufferu, 5 µl enzyme mixu a již zmíněný objem přečištěného (viz část PCR reakce a purifikace) PCR produktu odpovídajícího 500 ng doplněného vodou do 15 µl. Značení poté probíhalo v termobloku při 15°C po dobu 2h. Po fragmentaci PCR produktu enzymy detekujeme na 1% agarózovém gelu po elektroforéze fragmenty o délce mezi 500 až 100 bp. Reakce byla po působení enzymů zastavena v lázni při 70°C po dobu 10 min a dále byl produkt s připravenou sondou zchlazen na ledu a následně zamražen.

#### Příprava nepřímě značených sond pro klastry 18S rDNA a 28S rDNA určených pro detekci na jednom preparátu

Pro značení a přípravu obou sond byl použit opět Nick Translation Kit (Abbott Molecular). Jako templát pro obě sondy byla opět použita DNA druhu *Tityus smithii*. Sondy pro 18S rDNA a 28S rDNA byly značeny konjugovanými nukleotidy s biotinem, respektive digoxigeninem a jejich příprava probíhala stejně, jak je popsáno výše (viz podkapitolu Příprava nepřímě značených sond pro klastry 18S rDNA a 28S rDNA). Jelikož se jednalo o optimalizaci nové metodiky v laboratoři

cytogenetiky bezobratlých Katedry Zoologie Univerzity Karlovy, fáze přípravy hybridizační směsi se lišila od FISH s pouze jednou sondou pro 18S rDNA. Za účelem optimalizace bylo potřeba vyrobit 4 hybridizační směsi s rozdílnými koncentracemi obou typů sond: 2 ng/μl, 4 ng/μl, 10 ng/μl a 20 ng/μl. Mimo sondy bylo do hybridizačních směsí vždy přidáno 2,5 μl „Salmon sperm“, octan sodný o objemu 1/10 společného objemu zbylých komponent a ethanol o objemu 2,5 násobku objemu zbylých komponent (společně s octanem sodným). Protilátky streptavidin-Cy3 (Jackson ImmunoResearch) a Anti-Digoxigenin Fluorescein Fab fragments (Roche diagnostics) byly centrifugovány po dobu 5 minut při 8000 otáčkách za minutu. Streptavidin-Cy3 byl míchán s blokujícím roztokem 10% GNS/PBS v poměru 1:100. Ve stejném poměru byl smíchán také Antidigoxigenin-FITC s blokujícím roztokem 0,5% BSA/PBS. Hybridizace a detekce sond probíhala dle popisu v kapitole Fluorescenční *in situ* hybridizace.

### Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

Metoda FISH spočívá ve schopnosti oligonukleotidového řetězce (sondy) navázat se na komplementární úsek genomu. Sonda je značena protilátkou s fluorochromem, a je tak možné s pomocí fluorescenčního mikroskopu opticky lokalizovat pozici sledovaného úseku a počet jeho lokusů přímo na chromosomech. Staardní metodou FISH je možné většinou spolehlivě detekovat klastry genů o délce 3 Kbp až 5 Mbp .

Za účelem odstranění možného nespecifického pozadí po detekci navázané sondy, bylo každé sklo nejprve zakápnuto 10 μl roztoku 20x SSC pufru (3 M chlorid sodný, 0,3 M citrát sodný, pH=7), destilované vody (88 μl) a RNázy A (2 μl), překryto krycím sklíčkem a inkubováno v 37°C po dobu 1 hodiny. Po ukončení inkubace byla skla opláchnuta 2x5 minut v 2xSSC při 37°C v třepací vodní lázni. Následně byla skla opět v lázni za neustálého třepání inkubována v 5xDenhardtově reagens při 37°C po dobu 30 minut. Dále proběhla denaturace DNA na preparátech působením 70% formamidu při 68°C po dobu 3 minut 30 sekund. Opětovná renaturace DNA byla zamezena okamžitým ponořením do 70% ethanolu vychlazeného na -20°C.

Paralelně s výše popsanou přípravou preparátů na hybridizaci probíhala příprava hybridizační směsi. Zde je popsána příprava hybridizační směsi pro detekci pouze 18S rDNA klastrů za užití jednoho typu sondy. Pro popis přípravy sond pro aplikaci dvou typů sond (18S rDNA a 18S rDNA) viz výše. Dle složení hybridizační směsi připadá na jeden preparát (mikroskopické sklo) 1 μl sondy (c = 20 ng/μl) 2,5 μl kompetitorové DNA (v tomto případě komerčně dodávané „Salmon sperm“) pro snížení frekvence nespecifické hybridizace sondy na cílový genom, 3,5 μl octanu sodného a 100 μl 96% ethanolu vychlazeného na -20°C. Připravená směs byla krátce vortexována a ponechána k precipitaci DNA v -20°C po dobu 80 minut. Po ukončení precipitace byla směs centrifugována po dobu 20 minut při 5°C a při 13 tis. otáčkách za minutu. Následně byl odsát supernatant a přidáno 160 μl 70% ethanolu vychlazeného na -20°C. Dále opět proběhla centrifugace při 13 tis. otáčkách za minutu a

5°C po dobu 15 minut a opětovnému odsátí supernatantu. Vysrážená peleta (DNA) byla dále rozpouštěna po dobu 30 minut ve 100% deionizovaném formamidu temperovaném na 37°C (5,2 µl formamidu na preparát). Za účelem zrychlení hybridizační reakce byl dále k sondě a kompetitorové DNA přidán dextransulfát temperovaný na 37°C. Za účelem denaturace kompetitorové DNA a sondy byla celá směs ponechána 5 minut v lázni temperované na 90°C. Následná renaturace byla zamezena ochlazením směsi na ledu po dobu 3 minut. Směs byla dále krátce vortexována a centrifugována. Na připravené preparáty bylo nanášeno 10,2 µl této směsi se sondou a samotná hybridizační reakce probíhala přibližně 16 hodin.

Po ukončení hybridizace následovalo několik cyklů stringentního mytí za účelem odstranění nespecificky navázané sondy. První série mytí byla 3x5 minut v 50% formamidu v 2xSSC při teplotě 46°C. Dále byly preparáty promývány 5x2 minuty ve 2xSSC při 46°C a 3x5 minut v 0,1xSSC při 62°C. Následně byly preparáty ponechány 7 minut v roztoku 4xSSC a 0,1% Tween 20 (funguje jako mycí a blokující pufr) při pokojové teplotě. Po vyjmutí preparátů bylo na každý nanášeno 500 µl 2,5% BSA („Bovine serum albumin“) k zablokování reakce a ponecháno 20 minut v pokojové teplotě. Roztok fluorochromu Cy3 konjugovaného se streptavidinem (protilátka k biotinu) byl ředěn blokujícím roztokem 2,5% BSA 1:1000 (0,1 µl streptavidin-Cy3 a 100 µl BSA). Na každé sklo bylo nanášeno 100 µl této detekční směsi a ponecháno ve tmě při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Po ukončení detekční reakce byla skla promývána 3x3 minut 4xSSC/Tween 20. Po ukončení mytí byly preparáty zakápnuty „Fluoroshield with DAPI“, komerčně dodávanou chemikálií obsahující fluorochrom DAPI který se s vyšší afinitou váže na AT bohaté oblasti, a tak dostatečně označit celé chromosomy. Detekce emisního světla z fluorochromů DAPI ( $\lambda=457$  nm) a Cy3 ( $\lambda=600$  nm) proběhla na fluoresnečních mikroskopech Olympus Provis AX 70 a Olympus IX81 s monochromatickou CCD kamerou ORCAAAGA (Hamamatsu) za použití excitačního světla o vlnové délce 350 nm respektive 540 nm.

Vyhodnocování pořízených snímků a skládání barevných kanálů proběhlo v programu ImageJ Dd

## C pruhování

Vizualizace konstitutivního heterochromatinu pomocí C-pruhování bylo provedeno dle Sumnera (1972). Chromosomové preparáty určené k této metodě byly ponechány 1 hodinu v 60°C pro zvýšení přilnavosti materiálu rozpuštěné tkáně ke sklům. Následovalo chladnutí skel po 15 minut. V dalším kroku následovalo rozvolnění struktury chromosomu v 0,2M kyselině chlorovodíkové po dobu 45 minut. Skla byla dále opláchnuta v destilované vodě a ponechána 3 hodiny k úplnému uschnutí. Poté byla inkubována 7 minut v hydroxidu barnatém temperovaném na 50°C. Následovalo opláchnutí skel v destilované vodě o teplotě 30 až 40°C a úplné zaschnutí skel opět po dobu 3 hodin. Dále proběhla inkubace skel v 2x SSC pufru temperovaném na 60°C a konečné opláchnutí skel

destilovanou vodou pokojové teploty. Následně byla skla barvena fluorochromem DAPI, který zvýraznil bloky konstitutivního heterochromatinu.

### Fylogenetická data

Dataset pro fylogenezi zahrnoval 29 taxonů z podčeledi Oxyhaloinae a 1 outgroup (*Diploptera punctata*). Sekvence 25 taxonů byla získána v rámci této práce, sekvence pro outgroup a další 4 taxony, jež jsme neměli k dispozici, byly staženy z databáze GenBank. Seznam taxonů a sekvenovaných markerů v tab. 1.

### Izolace DNA

DNA byla izolována ze svalové tkáně femuru 3. páru končetin. Tkáň byla odebrána při pitvě, během které byly odebrány zároveň gonády pro cytogenetické analýzy a byla skladována při -20 °C v 96% ethanolu. Po vyjmutí byla svalovina vystavena 3 hodiny působení proteinázy K (Geneaid). Samotná izolace DNA probíhala pomocí Tissue Genomic DNA Mini Kit (Geneaid) a dle ke kitu přiloženému protokolu.

### PCR reakce a purifikace

K molekulárně fylogenetickým analýzám byly použity fragmenty 6 genů: mitochondriální 12S rRNA (ca 385 bp), 16S rRNA (ca 430 bp), a COI (658 bp), nukleární 18S rRNA (ca 1873 bp), 28S rRNA (ca 523 bp), a H3 (328 bp). Analyzovaná sekvence genu 18S rRNA byla složena ze 3 fragmentů (18SI rRNA, 18SII rRNA, 18SIII rRNA), u ostatních genů byl vždy použit pouze jeden fragment. PCR reakční směs byla složena stejně jako v případě výroby sondy pro FISH z 12,5 µl PPP Master Mix (Taq DNA polymeráza, reakční pufr, dNTPs) (Top-Bio), 8,5 µl miliQ H<sub>2</sub>O, 2 µl genomové DNA a 1+1 µl 10µM primeru (forward + reverse). Pro přehled jednotlivých primerů a kroků reakcí PCR viz tab. 5 a 6. Čistota a velikost PCR produktů byla ověřena elektroforézou při el. napětí 100 V, el. proudu 400 mA po dobu 30 minut na 1% agarózovém gelu. Fragmenty byly značeny interkalačním klastogenem ethidium bromidem. Purifikace PCR produktů byla zhotovena dle přiloženého protokolu kitu: Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid Biotech Ltd.).

Tabulka 5 – Přehled primerů použitých v PCR pro amplifikaci požadovaných genových fragmentů

fragment	primer	směr	sekvence 5' - 3'
12S rRNA	12S MD-F1	forward	ACTATGTTACGACTTATCTC
12S rRNA	12S reverse	reverse	AAACTAGGATTAGATACCC
16S rRNA	16S F	forward	CGCCTGTTTAACAAAAACAT
16S rRNA	16S R	reverse	TTAATCCAACATCGAGG
18SI rRNA	18S 1F	forward	TACCTGGTTGATCCTGCCAGTAG
18SI rRNA	18S b3.9	reverse	TGCTTTRAGCACTCTAA
18SII rRNA	18S a0.7	forward	ATTAAAGTTGTTGCGGTT
18SII rRNA	18S bi	reverse	GAGTCTCGTTCGTTATCGGA
18SIII rRNA	18S a2.0	forward	ATGGTTGCAAAGCTGAAAC
18SIII rRNA	18S 9R	reverse	GATCCTCCGCAGGTTACCTAC
28S rRNA	28S MD-F1	forward	GGAGTCTAACATGTGCGCG
28S rRNA	28S MD-R1	reverse	GGCGCCTTAACCCGGCGTTTGG
H3	H3 AF	forward	ATGGCTCGTACCAAGCAGACVGC
H3	H3 AR	reverse	ATATCCTTRGGCATRATRGTGAC
LCO	LCO	forward	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG
LCO	HCO	reverse	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA



Tabulka 6 – PCR programy pro amplifikaci jednotlivých genových fragmentů

PCR program I: 12S rRNA, 16S rRNA, 18SI rRNA, LCO			
Fáze	Teplota	Čas	Opakování
denaturace	95°C	5 min	35x
	95°C	1 min	
nasedání primeru	48°C	1 min	
polymerace	72°C	1 min 30 s	
	72°C	7 min	
chlazení	4°C	-	
PCR program II: H3, 18SII rRNA, 18SIII rRNA			
Fáze	Teplota	Čas	Opakování
denaturace	95°C	5 min	35x
	95°C	1 min	
nasedání primeru	52°C	1 min	
polymerace	72°C	1 min 30 s	
	72°C	7 min	
chlazení	4°C	-	
PCR program III: 28S			
Fáze	Teplota	Čas	Opakování
denaturace	95°C	5 min	35x
	95°C	1 min	
nasedání primeru	48°C	1 min	
polymerace	72°C	1 min 30 s	
	72°C	7 min	
chlazení	4°C	-	

## Sekvenace a editace sekvencí

Sekvenace fragmentů DNA Sangerovou metodou byla zajištěna pobočkou firmy Macrogen s.r.o. v Amsterdamu. Všechny fragmenty byly sekvenovány z obou směrů pomocí amplifikačních primerů. Získané sekvence byly editovány v programu Geneious 11.1.5. Sekvence z obou směrů pro každý genový fragment byly složeny do contigů na základě komplementarity za použití implementovaného assembleru Geneious a nejvyšší senzitivity. Dále byly u contigů prohlédnuty získané chromatogramy a opraveny pozice se slabým signálem v jednom směru, ovšem dostatečně silným v komplementární pozici směru opačného. Na nejasné pozice s podobně silným signálem chromatogramu pro rozdílné nukleotidy byl vepsán příslušný IUPAC kód. Ze získaných sekvencí byly odstraněny okrajové části sekvencí primerů. Následně byly vytvořené konsenzuální sekvence. Protein kódující sekvence (COI, H3) byly přeloženy příslušným genetickým kódem a zkontrolovány pro přítomnost stop kodonů, které by mohli naznačovat, že se jedná o sekvenovaný pseudogen. Takové sekvence byly odhaleny ve dvou případech u COI a byly vyloučeny z datasetu. Sekvence pro jednotlivé markery byly alignovány v programu MAFFT 7 (Kato et al., 2017) za pomoci G-INS-i (H3, COI) a Q-INS-i (12S, 16S, 28S, 18S) algoritmů. Konkatenací alignmentů jednotlivých markerů byl získán výsledný alignment o délce 4251 bp.

Optimální evoluční modely pro jednotlivé partice (subsets) konkatenátu všech genů byly vypočteny v programu Partition finder (Lanfear et al. 2012) za pomoci AICc kritéria. U protein-kódujících genů (H3, COI) byla ponechána samostatná partice pro každou pozici v kodonu (tedy 3 partice). Pro každý ribozomální gen byl generován evoluční model bez rozdělení na jednotlivé pozice v kodonu. Celkem byl tedy konkatenát rozdělen do 10 particí. Pro jednotlivé partice byly vygenerovány následné modely: GTR+G+I (12S, 16S, COI/3), GTR+I (COI/1, COI/2, 18S, 28S), GTR (H3/3, H3/1) a JC+I (H3/2).

Fylogenetický strom metodou Maximum Likelihood byl vypočten v programu RAxML (Stamatakis, 2014) s grafickým rozhraním raxmlGUI 1.5b2 (Silvestro a Michalak, 2012). Vzhledem k omezenému výběru evolučních modelů v RAxML byl zvolen model GTRGAMMA pro všech deset particí. Bootstrap podpory byly stanoveny thorough bootstrap algoritmem, 100 běhů a 1000 pseudoreplikací.

Metodou Bayesovské Analýzy byl výsledný fylogenetický strom vytvořen v programu MrBayes 3.2.6 (Ronquist et al., 2012). K analýze byly použity evoluční modely vygentované programem PartitionFinder. Analýza byla nastavena na 6 mil. generací a prvních 25 % bylo odstříhnuo. Byly ukládány fylogenetické stromy pro každou 500. generaci. Hodnota average staard deviation of split frequencies byla zkontrolována pro ověření dosáhnutí plata analýzy. Jako podpořené jsou považovány nody s podporou: bootstrap>70 a posteriorní pravděpodobnost>95.

Fylogenetické stormy byly vizualizovány a upravovány v programu FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

## Výsledky

U všech cytogeneticky analyzovaných druhů byl určen diploidní počet chromosomů, jejich morfologie a počet a lokalizace klastrů 18S rDNA. U karyotypů všech studovaných druhů, kromě *Rhyparobia puerilis* (Fabricius, 1781) byla pozorována fáze meiotického dělení známá jako „pre-metaphase stretch“ (neboli „pre-metafázní protažení“), která byla poprvé pozorována u kudlanky druhu *Callimantis antillarum* (Saussure, 1859) a následně u řady dalších druhů kudlanek (např. Hughes-Schrader, 1953a, 1953b, 1943a, 1943b), strašilek (Hughes-Schrader, 1950) a u švábích druhů *Blaberus discoidalis* a *Periplaneta americana* (John a Lewis, 1959; Lewis a John, 1957). Jedná se o fázi, kdy dochází ke mnohdy až silnému rozestupu chromosomů v rámci bivalentů (popřípadě multivalentů) aniž by došlo k jejich rozpojení. Následně dojde ke zpětné kontrakci bivalentů (popřípadě multivalentů), pokročilejší spiralizaci a nástupu metafáze I (Hughes-Schrader, 1943b). Většina studovaných druhů zároveň vykazovala pozitivní heteropyknózu pohlavního chromosomu X. Téměř všichni analyzovaní jedinci byli samci a byl u nich chromosom X během meiosis pozorován ve formě univalentu naznačující přítomnosti chromosomového systému určení pohlaví XX/X0, jenž je u švábů velice stálý (viz podkapitola Cytogenetika Blattodea).

Nepárový samčí chromosom X je ve fotodokumentaci označen trojúhelníkovou šipkou, ostatní zvýrazněné elementy standardními šipkami.

### Karyotyp Oxyhaloini

#### *Oxyhaloa deusta* (Thunberg, 1784)

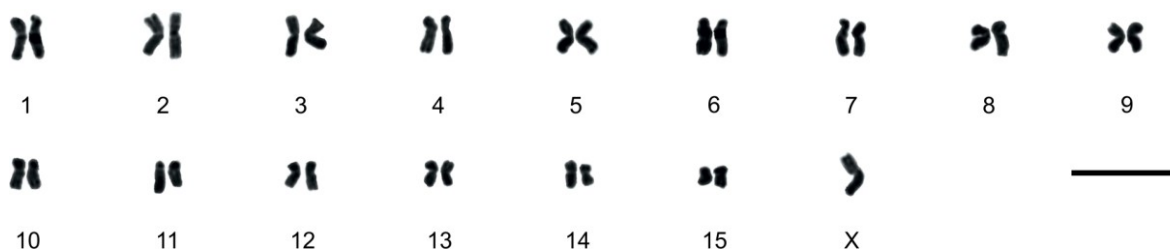
Karyotyp samců druhu *Oxyhaloa deusta* je tvořen 31 chromosomy (viz obr. 5). Karyotyp samic má o jeden chromosom více ( $2n_{\text{♀}}=32$ ) (cytogeneticky bylo analyzováno 5 samců a 2 samice). Karyogram byl sestaven ze samčí mitotické metafáze (viz obr. 6A). Chromosomové páry 1, 2, 3, 5, 7, 9, 10, 12, 13, 14 jsou metacentrické. Chromosomové páry 8 a 15 jsou submetacentrické a chromosomový pár 11 je submetacentrický až subteloцентриcký. Chromosomové páry 4 a 6 jsou subteloцентриcké. Relativní délka autosomů kontinuálně klesá od 4,24 % do 1,79 % diploidní sady.

Chromosom X je největším chromosomem karyotypu s relativní délkou 4,87 % diploidní sady. Dle předpokladu je tento pohlavní chromosom dobře viditelný během samčí metafáze I jakožto jediný univalent (viz obr. 6G). Navíc byla během pachytene pozorována jeho pozitivní heteropyknóza (viz obr. 6D).

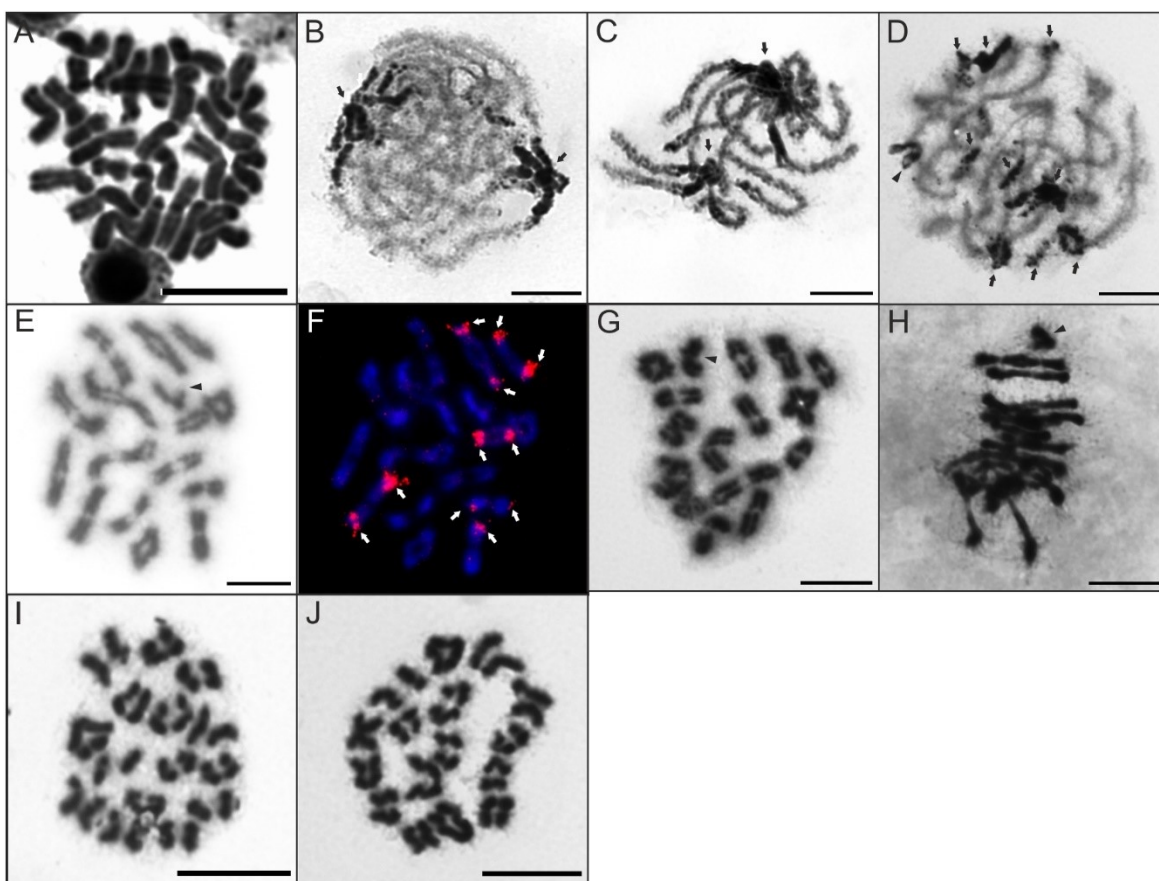
Během časně pachytene pozorujeme dvě velká chromocentra (obr. 6B), která jsou tvořena koncovými oblastmi ramének chromosomů, jenž jsou již v bivalentech, s pozitivní heteropyknózou, tato chromocentra se později rozptýlí a konce ramének jsou viditelné jako jednotlivé bloky

heterochromatinu (viz obr. 6D). Během tohoto rozptýlení začíná být patrný pozitivně heteropyknotický chromosom X (viz obr. 6D).

Metodou FISH bylo lokalizováno 11 klastrů 18S rDNA lokusů. Detekce proběhla na figurách metafáze I. Signály byly v pěti párech (na pěti bivalentech) a jeden byl pouze v heterozygotním stavu. Vždy byly lokalizovány v pericentrické oblasti (viz obr. 6F).



Obrázek 5 – Karyogram druhu *Oxyhaloa deusta* vytvořený na základě mitotické metafáze



Obrázek 6 – Chromosomy samice druhu *Oxyhaloa deusta*. ( $2n\text{♂} = 31, X0$ ) barvené Giemsovou (A-E, G-J) a po aplikaci FISH se sondou pro 18S rDNA klastř (červený kanál) (F) A: mitotická metafáze, B: pachytene s vyznačenými dvěma centry spiralizace na koncích chromosomových ramének soustředících se na periferii jádra (šípky), C: pachytene s postupující spiralizací (šípky), D: pozdní pachytene s pozitivně heteropyknotickými koncovými úseky ramének chromosomů již bez centralizace na periferii jádra a pozitivně heteropyknotickým chromosomem X v levé části (šípky), E: samčí metafáze I s 15 bivalenty a vyznačeným chromosomem X tvořícím univalent (šípka), F: metafáze I s vyznačenými klastry 18S rDNA (bílé šípky), G: metafáze I s 15 bivalenty a nepárovým chromosomem X (šípka), H: pozdní metafáze I přecházející do anafáze I s vyznačeným nepárovým chromosomem X (šípka), I: samčí metafáze II přecházející do anafáze II ( $n=15$ ) spermatocytu 2. řádu, J: metafáze II přecházející do anafáze II ( $n=16$ ) spermatocytu 2. řádu. Měřítka = 10  $\mu\text{m}$

## Karyotypy Nauphoetini

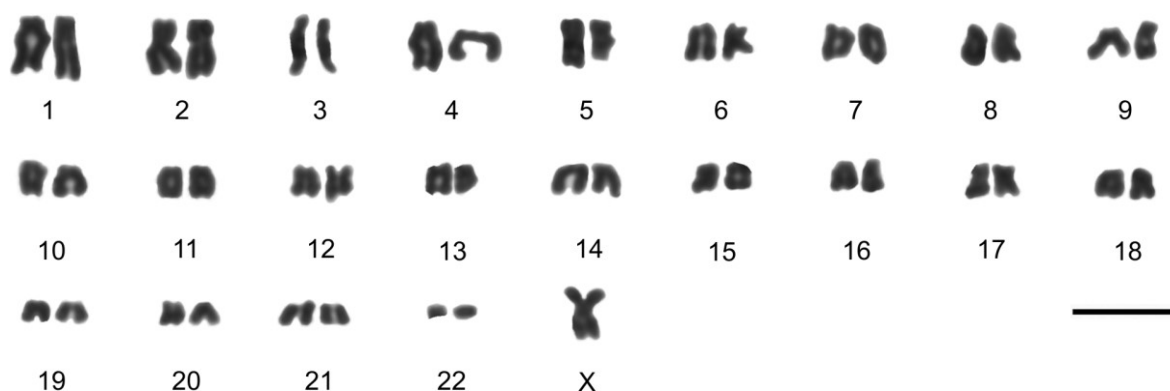
### *Henschoutedenia flexivitta* (Walker, 1868)

Karyotyp druhu *Henschoutedenia flexivitta* čítá 45 chromosomů v diploidním počtu (viz obr. 7 a 8A) (cytogeneticky bylo analyzováno 5 samců, 4 – populace 006, 1 – populace 001). Metacentrické jsou chromosomové páry: 2, 5, 6, 12, 15, 21. Submetacentrický je pár 7 a subtelocentrické jsou páry: 1, 3, 4, 8–11, 13, 14, 16, 18, 20. Chromosomový pár 17 je submetacentrický až subtelocentrický. Vzhledem k malé velikosti chromosomového páru 22 nebylo možné určit jeho morfologii. Relativní velikost chromosomů kontinuálně klesá od 4,06 % do 0,61 %.

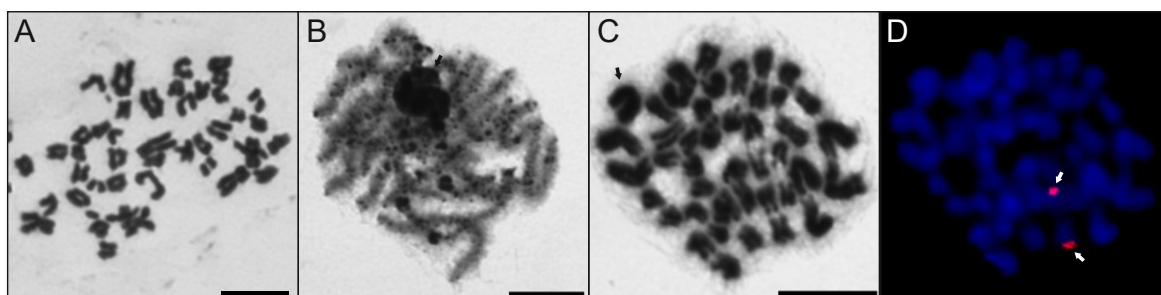
Pohlavní chromosom X je metacentrický s relativní velikostí 3,76 % a během metafáze I vytváří univalent (viz obr. 8C).

Během pachytene byla pozorována formace velkého chromocentra, nejspíše pozůstatku jádřerka (viz obr. 8B).

Metodou FISH byl lokalizován jeden pár klastrů 18S rDNA na krátkých raménkách bivalentu subtelocentrických chromosomů během metafáze I. Dle velikosti se pravděpodobně jedná o chromosomy 10 až 18 (viz obr. 8D).



Obrázek 7 – Karyogram druhu *Henschoutedenia flexivitta* vytvořený na základě dvou metafází II dvou sesterských spermatocytů 2. řádu. Měřítko=10  $\mu$ m



Obrázek 8 – Chromosomy samce druhu *Henschoutedenia flexivitta* barvené Giemsou (A-C) a po aplikaci FISH se sondou pro 18S rDNA klastr (červený kanál) (D). A: 2 metafáze II dvou sesterských spermatocytů, B: chromocentrum na periferii jádra během pachytenu (šipka), C: samčí metafáze I s vyznačeným nepárovým chromosomem X (šipka), D: samčí metafáze I s dvěma vyznačenými klustry 18S rDNA. Měřítko=10  $\mu$ m

### *Nauphoeta cinerea* (Olivier, 1789)

Karyotyp samců druhu *Nauphoeta cinerea* čítá 37 chromosomů (viz obr. 9A a 10A) (cytogeneticky bylo analyzováno 9 samců). Mezi metacentrické patří chromosomové páry číslo: 1, 3, 8, 9, 10, 11, 13–16. Chromosomové páry 2, 5, 6, 7, 12 a 18 jsou submetacentrické a pár číslo 4 je telocentrický. Relativní velikost chromosomů se kontinuálně snižuje od 5,09 % do 1,24 %.

Pohlavní chromosom X je metacentrický s relativní délkou 3,10 %. Jakožto univalent je velice dobře viditelný během „pre-metafázního protažení“ (viz obr. 10B).

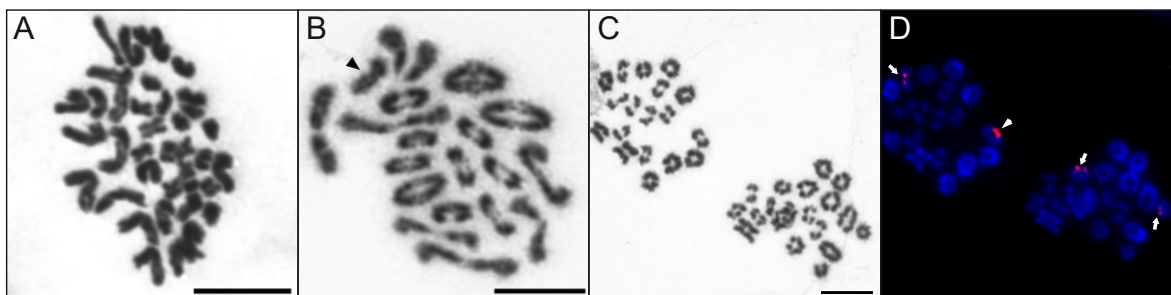
Metoda C-pruhování odhalila pozice konstitutivního heterochromatinu v terminálních oblastech delších ramének chromosomových párů: 2, 4, 5, 7. U 1. chromosomového páru se konstitutivní heterochromatin vyskytuje v terminálních oblastech obou ramének. U 3. a 8. metacentrického chromosomového páru se konstitutivní heterochromatin vyskytuje pouze v terminálních oblastech jednoho z ramének. Konstitutivní heterochromatin se nepodařilo úspěšně detekovat na malých chromosomech pod 2,52 % relativní délky (viz obr. 9B).

Během „pre-metafázního protažení“ je viditelných 18 bivalentů, z nichž 6-8 vytváří kruhové bivalenty indukující tvorbu dvou chiasmat (zbytek patrně vytváří chiasma jen jedno), a chromosom X jako univalent (viz obr. 10B). Dle předpokladu byly pozorovány metafáze spermatocytů 2. řádu s haploidními počty chromosomů  $n=18$ , resp.  $n=19$  (viz obr. 10C).

Metodou FISH byly na dvou dceřiných jádrech při metafázi II detekovány dva páry klastrů 18S rDNA v koncových oblastech ramének dvou metacentrických chromosomů (viz obr. 10D).



Obrázek 9 – A: Karyogram samce druhu *Nauphoeta cinerea* vytvořený na základě mitotické metafáze, B: karyogram druhu *Nauphoeta cinerea* s vyznačenými úseky konstitutivního heterochromatinu pomocí metody C pruhování. Měřítko=10  $\mu$ m



Obrázek 10 – Chromosomy samce druhu *Nauphoeta cinerea* barvené Giemsou (A-C) a po aplikaci FISH se sondou pro 18S rDNA klastr (červený kanál) (D) A: mitotická metafáze, B: pozdní „pre-metafázní protažení“ s vyznačeným nepárovým X chromosomem (šipka) C: dvě metafáze II dceřiných buněk přecházející do anafáze II, D: klastry 18S rDNA (bílé šipky) na dvou párech metacentrických chromosomů. Měřítko=10  $\mu$ m

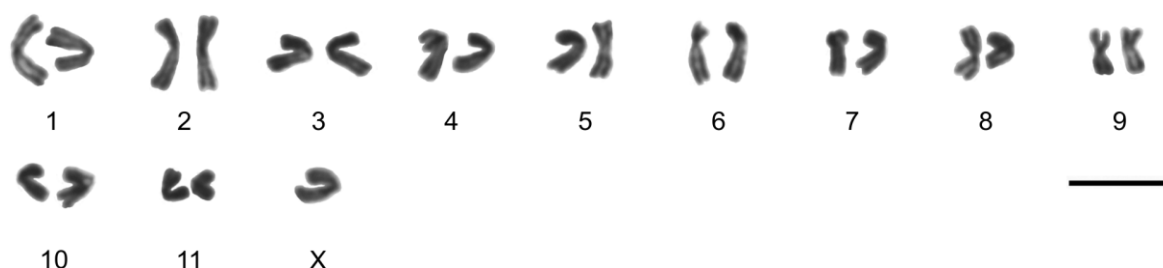
### *Rhyparobia maderae* (Fabricius, 1781)

U druhu *Rhyparobia maderae* byl u samců zjištěn karyotyp čítající 23 chromosomů (obr. 11 a 12A) (cytogeneticky byli analyzováni 2 samci). Jedná se většinou o metacentrické (páry: 1–5, 8, 10, 11) a submetacentrické chromosomy (páry: 6, 7), Pár 9 je složen z metacentrického a submetacentrického chromosomu a je tedy heteromorfní. Detekci tohoto páru jakožto homologického zajistila metoda FISH. Na obou těchto chromosomech byl v pericentrické oblasti detekován klastr 18S rDNA jak na

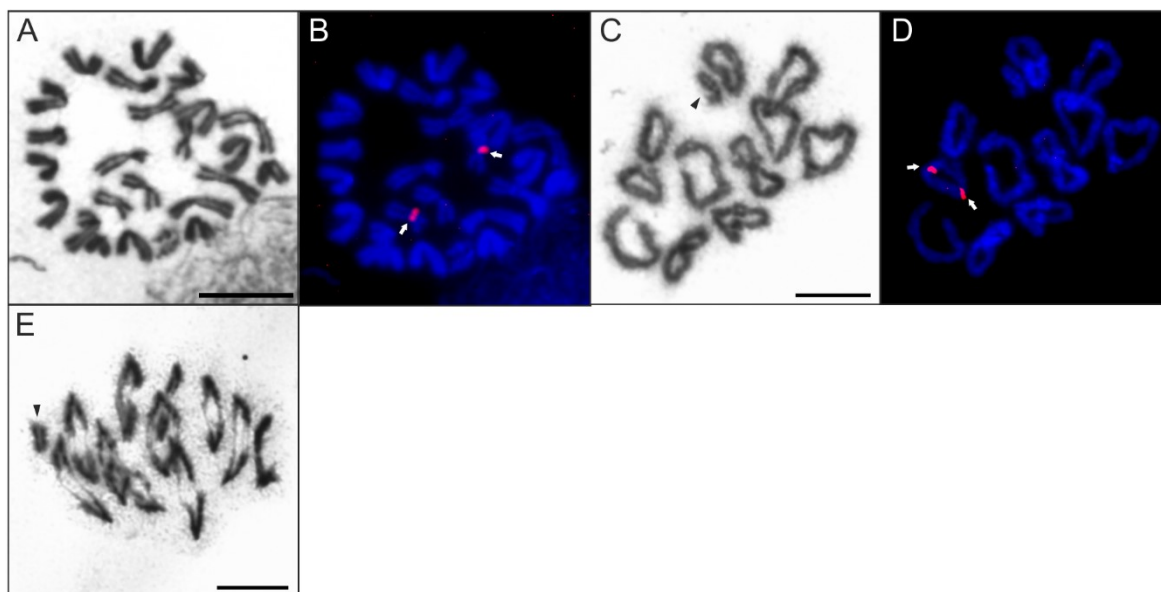


figurách mitotických metafází, tak na figurách s „pre-metafázním protažením“ (obr. 12B, D). Pohlavní chromosom X je metacentrického typu a je patrný jakožto univalent během metafáze I (obr. 12E).

Autosomy vytváří během meiosis I 11 bivalentů. U 10 z těchto bivalentů jsou vždy 2 chiasmata v terminálních oblastech chromosomů (obr. 12C, E). U jednoho bivalentu bylo pozorováno pouze jedno chiasma v terminální části chromosomů. V jednom případě z osmi analyzovaných figur metafáze I byly na tomto bivalentu dvě chiasmata v terminálních oblastech. Submetacentrický pohlavní chromosom X je viditelný většinou na periferii metafázní destičky jakožto univalent (obr. 12E).



Obrázek 11 – Karyogram samce druhu *Rhyarobia maderae* vytvořený na základě mitotické metafáze. Měřítko=10 µm



Obrázek 12 – Chromosomy samce druhu *Rhyarobia maderae* barvené Giemsou (A, C) a po aplikaci FISH se sondou pro 18S rDNA klastr (červený kanál) (B, D) A: mitotická metafáze, B: detekce páru klastrů 18S rDNA v pericentrické oblasti 9. chromosomového páru (bílé šipky), D: Detekce dvou klastrů 18S rDNA v pericentrické oblasti 9. chromosomového páru během metafáze I (bílé šipky), C: „pre-metafázní protažení“ s vyznačeným nepárovým chromosomem X (šipka), E: metafáze I s 11 bivalenty a vyznačeným nepárovým chromosomem X na periferii (šipka). Měřítko=10 µm

### *Rhyarobia puerilis* (Rehn, 1937)

Karyotyp druhu *Rhyarobia puerilis* čítá u samců 27 chromosomů (obr. 13 a 14A) (cytogeneticky byli analyzováni 2 samci). Většina chromosomů je buďto metacentrického (páry: 6, 8, 9, 11, 12) anebo submetacentrického typu (páry: 2, 3, 10, 13). Chromosomový pár 4 je subtelocentrický. Část

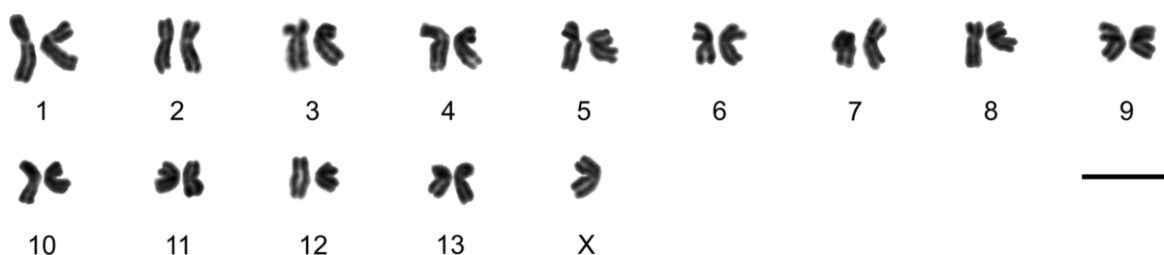


chromosomů se morfologicky pohybuje na hranici mezi metacentrickým a submetacentrickým typem (páry: 1, 5, 7).

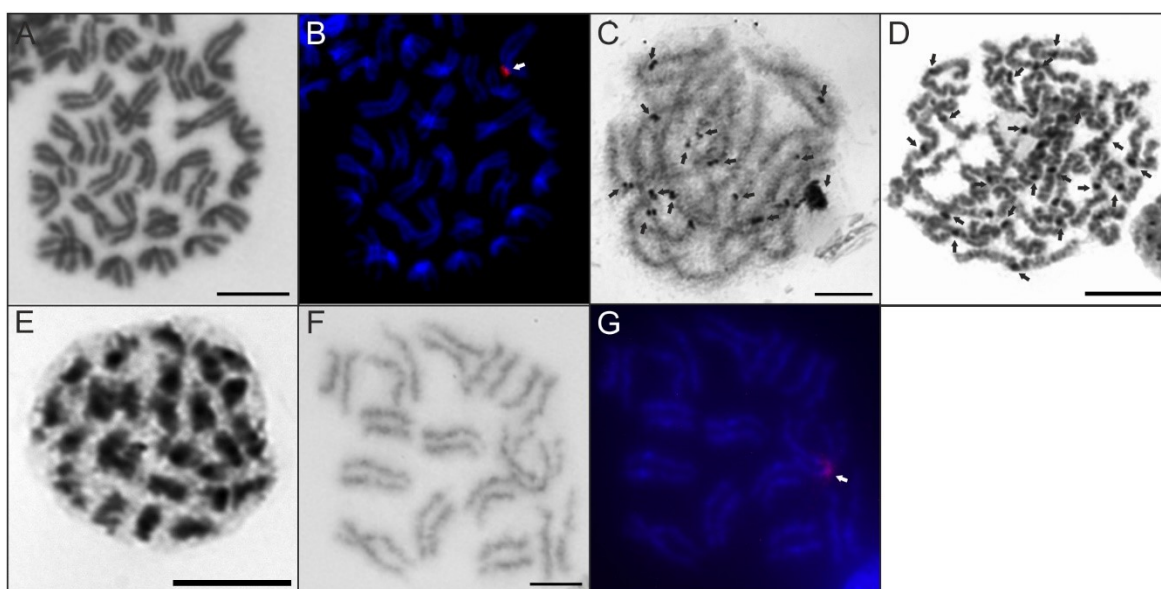
Charakter pohlavního chromosomu nelze s jistotou určit, jelikož nebyla pozorována metafáze I, kde by vytvářel univalent, a ani spermatocyt 2. řádu s předpokládaným počtem 13 chromosomů, jehož porovnáním se sesterským spermatocytem by bylo možné chromosom X detekovat. Zde prezentovaný X chromosom je určen na základě odlišností měřených parametrů od zbytku karyotypu (obr. 13).

Během pachytene je v pericentrické oblasti většiny chromosomů patrný silněji kondenzovaný chromatin (obr. 14C, D). U tohoto druhu nebylo pozorováno „pre-metafázní protažení“, a ani metafáze I. U spermatocytů 2. řádu byla pozorována pouze metafáze II s 14 chromosomy (obr. 14F). Druhý předpokládaný počet 13 chromosomů pozorován nebyl.

Metodou FISH byl detekován 1 nepárový klastř 18S rDNA v pericentrické oblasti na největším chromosomu (obr. 14B, G).



Obrázek 13 – Karyogram samce druhu *Rhyarobia puerilis* vytvořený na základě mitotické metafáze. Měřítko=10  $\mu$ m



Obrázek 14 – Chromosomy samce druhu *Rhyarobia puerilis* barvené Giemsou (A, C-F) a po aplikaci FISH se sondou pro 18S rDNA klastř (červený kanál) (B, G) A: mitotická metafáze, B: Mitotická metafáze s 18S rDNA klastrem v pericentrické oblasti jednoho z chromosomů 1 páru (bílá šipka), C: pachytene se zvýrazněnými bloky heterochromatinu

(šipky), D: pozdní pachytene se zvýrazněnými bloky heterochromatinu v pericentrických oblastech (šipky). E: pozdní pachytene, F: metafáze II (n=14), G: metafáze II se zvýrazněným klastrem 18S rDNA v pericentrické oblasti (bílá šipka).

Měřítko=10 µm

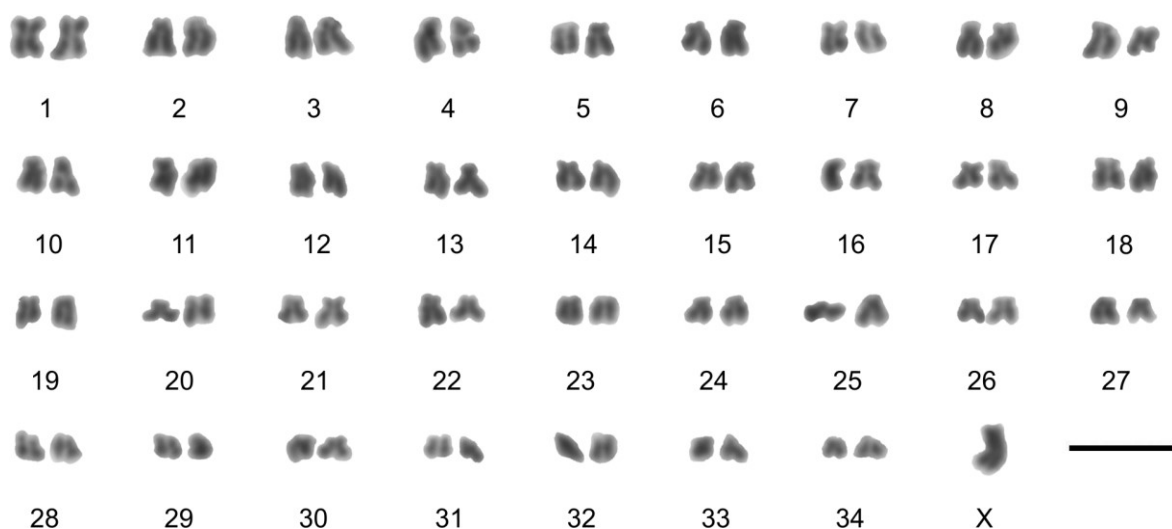
### *Simaoa conserfariam* Roth & Naskrecki, 2004

Karyotyp druhu *Simaoa conserfariam* se skládá z 69 chromosomů většinou submetacentrického charakteru (obr. 15 a 16A) (cytogeneticky byli analyzováni 2 samci). Chromosomový pár 1 je metacentrický. Chromosomový pár 34 je na pomezí telocentrického a submetelocentrického morfologického typu. Chromosomové páry 28 až 34 jsou submetacentrického až submetelocentrického typu, ale vzhledem k jejich velikosti a stupni spiralizace nelze morfologii určit přesně. Zbytek chromosomových párů je submetelocentrický. Relativní délka autosomů klesá kontinuálně od 2,12 % po 0,77 %.

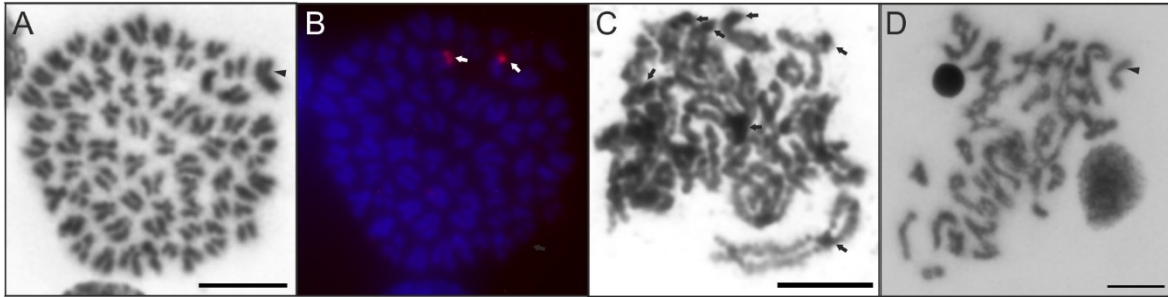
Metacentrický pohlavní chromosom X je největším chromosomem s relativní délkou 2,47 %. Vždy byl pozorován na periférii mitotické metafázní destičky (obr. 16A). Chromosom X je dále snadno viditelný jako univalent během „pre-metafázního protažení“ (obr. 16D).

Během pachytene lze pozorovat jedno velké chromocentrum a na některých chromosomech zvýšenou spiralizaci v pericentrických oblastech a krátkých raménkách (obr. 16D). Během „pre-metafázního protažení“ jsou chiasmata pouze na dlouhých raménkách chromosomů (obr. 16D).

Metodou FISH byly detekovány klastry 18S rDNA na krátkých raménkách chromosomového páru číslo 16 (obr. 16B).



Obrázek 15 – Karyogram samce druhu *Simaoa conserfariam* vytvořený na základě mitotické metafáze. Měřítko=10 µm



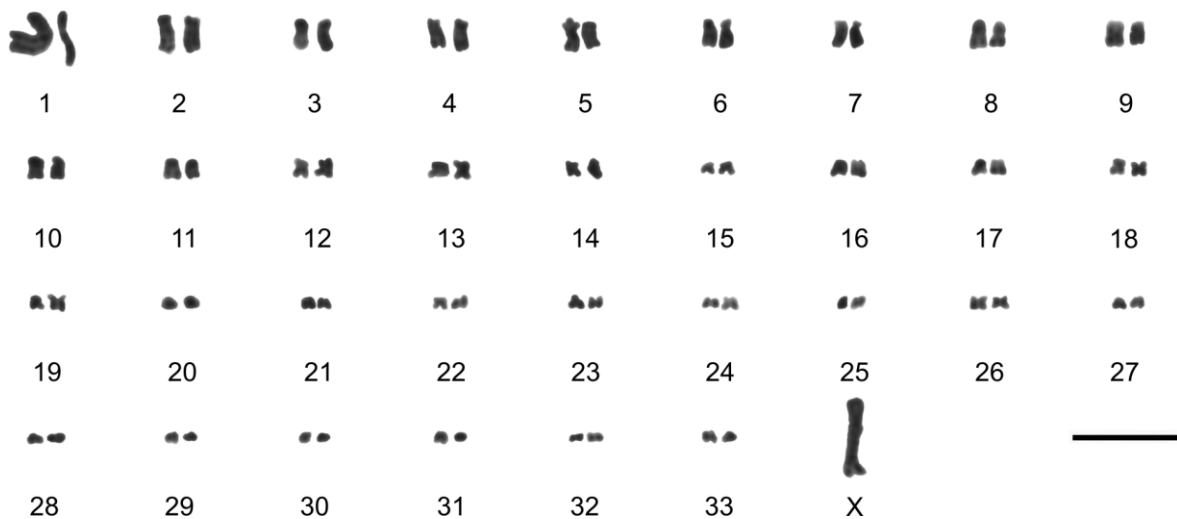
Obrázek 16 – Chromosomy samce druhu *Simaoa conserfariam* barvené Giemsou (A, C) a po aplikaci FISH se sondou pro 18S rDNA klastr (červený kanál) (B) A: mitotická metafáze s vyznačeným pohlavním chromosomem X (šipka), B: klastry 18S rDNA na krátkých raménkách chromosomového páru 16 (bílé šipky), C: pachytene s vyznačenými bloky heterochromatinu v krátkých raménkách, pericentrických oblastech a jedním velkým blokem heterochromatinu (šipky), D: metafáze I s vyznačeným nepárovým chromosomem X (černá šipka). Měřítko=10  $\mu$ m

## Karyotypy Gromphadorhini

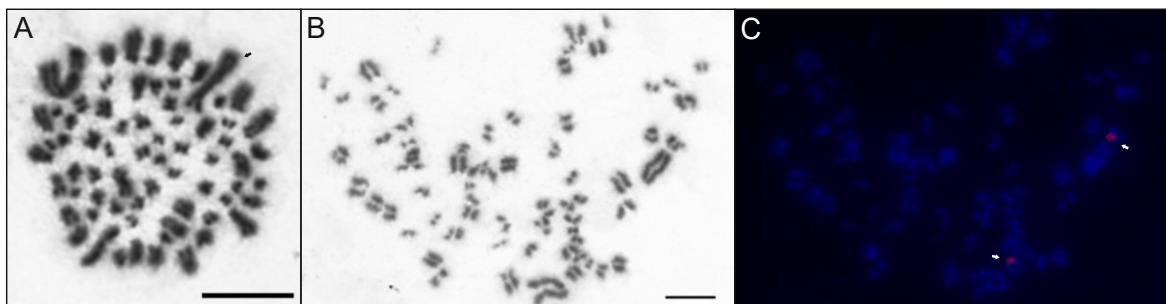
### *Aeluropda insignis* Butler, 1882

Karyotyp druhu *Aeluropda insignis* čítá 69 chromosomů (obr. 17 a 18A) (cytogeneticky byli analyzováni 3 samci). Největší chromosomový pár 1 je submetacentrický a jeho relativní velikost je 4,71 %. Chromosomové páry 2–9, 11, 12, 14 jsou submetelocentrické. Chromosomový pár 13 je patrně metacentrický, nicméně získaná data neumožňují přesnější určení jeho morfologie. Obdobně nelze pomocí světelné mikroskopie přesněji určit morfologii početné frakce malých chromosomů od páru 15 až 33. Většinou se však dle pozorovaných krátkých ramének pravděpodobně jedná o submetelocentrické chromosomy. První chromosomový pár je výrazně delší následující autosomy. Relativní velikosti chromosomových párů 2 až 14 se postupně zmenšují od 4,71 % do 1,37 % diploidní sady. Velikosti chromosomových párů 15 až 33 klesají od 1,21 % do 0,44 % diploidní sady. Zcela nejdelším v celém karyotypu je metacentrický chromosom X s relativní délkou 6,63 %. Jakožto největší a nepárový element karyotypu je snadno odlišitelný (obr. 17).

Metodou FISH byl detekován jeden pár klastrů 18S rDNA na dvou sousedících jádrech sesterských spermatocytů na krátkých raménkách jednoho z větších submetelocentrických chromosomových párů (obr. 18B, C).



Obrázek 17 – Karyogram samce druhu *Aeluropoda insignis* vytvořený na základě mitotické metafáze. Měřítko=10 µm



Obrázek 18 – Chromosomy samce druhu *Aeluropoda insignis* barvené Giemsou (A, B) a po aplikaci FISH se sondou pro 18S rDNA klastr (červený kanál) (C) A: samčí mitotická metafáze s vyznačeným chromosomem X (černá šipka), B: 2 metafáze II sesterských spermatocytů 2. řádu, C: 18S rDNA klastry (bílé šipky). Měřítko=10

### *Elliptorhina coquereliana* (Saussure, 1863)

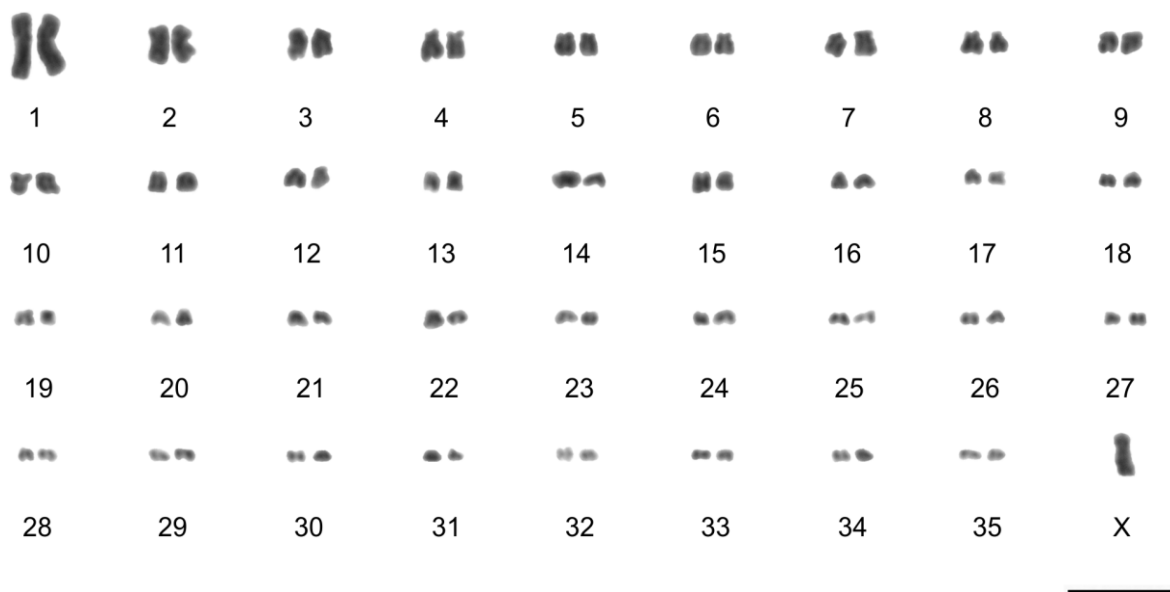
Karyotyp samce druhu *Elliptorhina coquereliana* se skládá ze 71 chromosomů (obr. 19 a 20A) (cytogeneticky byli analyzováni 2 samci populace MDG 1 a 1 samec populace MDG32). Většina chromosomů je subtelocentrického typu (avšak morfologii frakce malých chromosomů nelze s jistotou určit). Výjimkou jsou submetacentrické chromosomové páry 1 a 2 a metacentrický chromosomový pár 10. Počty chromosomů obou zkoumaných populací jsou shodné.

Pohlavní chromosom X je submetacentrický. S relativní velikostí 3,99 % se nepodobá žádnému dalšímu chromosomu v karyotypu. Během „pre-metafázního protažení“ a metafáze I tvoří univalent (obr. 20E, G).

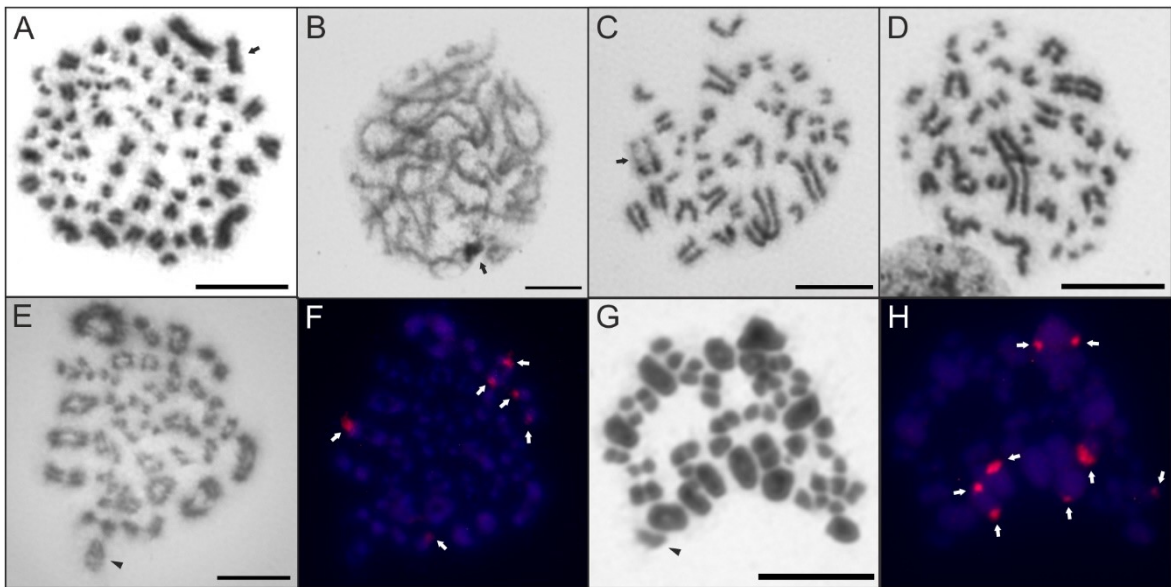
Od interfáze až po diplotene (obr. 20B) je v jádrech viditelný pozitivně heteropyknotický úsek chromatinu. Patrně se jedná o pohlavní chromosom. Během metafáze I je viditelných 35 bivalentů a jeden univalent (obr. 20G). U třech z bivalentů byla pozorována tvorba chiasmat na obou raménkách.

Ostatní bivalenty svým protaženým tvarem napovídají tvorbě chiasmat jen na dlouhých raménkách (obr. 20E, G). Dle očekávání byly pozorovány metafáze II čítající 35 a 36 chromosomů (obr. 20C, D).

Metodou FISH byl detekován u obou populací odlišný počet rDNA klastrů. V rámci populace MDG 1 bylo detekováno 6 18S rDNA klastrů na krátkých raménkách chromosomů subtelocentrického typu (obr. 20F). Dva z těchto signálů se vyskytovaly v heterozygotním stavu. U populace MDG 32 bylo detekováno 8 18S rDNA klastrů na krátkých raménkách větších subtelocentrických chromosomů. Čtyři z těchto klastrů se vyskytovaly v heterozygotním stavu (obr. 20H).



Obrázek 19 – Karyogram samce druhu *Elliptorhina coquereliana* vytvořený na základě mitotické metafáze. Měřítko=10  $\mu\text{m}$



Obrázek 20 – Chromosomy samce druhu *Elliptorhina coquereliana* barvené Giemsou (A–E, G) a po aplikaci FISH se sondou pro 18S rDNA klastř (červený kanál) (F, H) A: mitotická metafáze, B: pachytene s vyznačenou pozitivně heteropyknotickou oblastí chromatinu, C: samčí metafáze II s přechodem do anafáze II s vyznačeným chromosomem X (n=36), D: samčí metafáze II (n=35), E: „pre-metafázní protažení“, F: samčí metafáze I se 6 vyznačenými klastřmi 18S rDNA (2 v heterozygotním stavu, bílé šipky)(populace MDG 1) ,G: metafáze I, H: samčí metafáze I s 8 vyznačenými klastřmi 18S rDNA (bílé šipky) (populace MDG 32). Měřítka=10  $\mu$ m

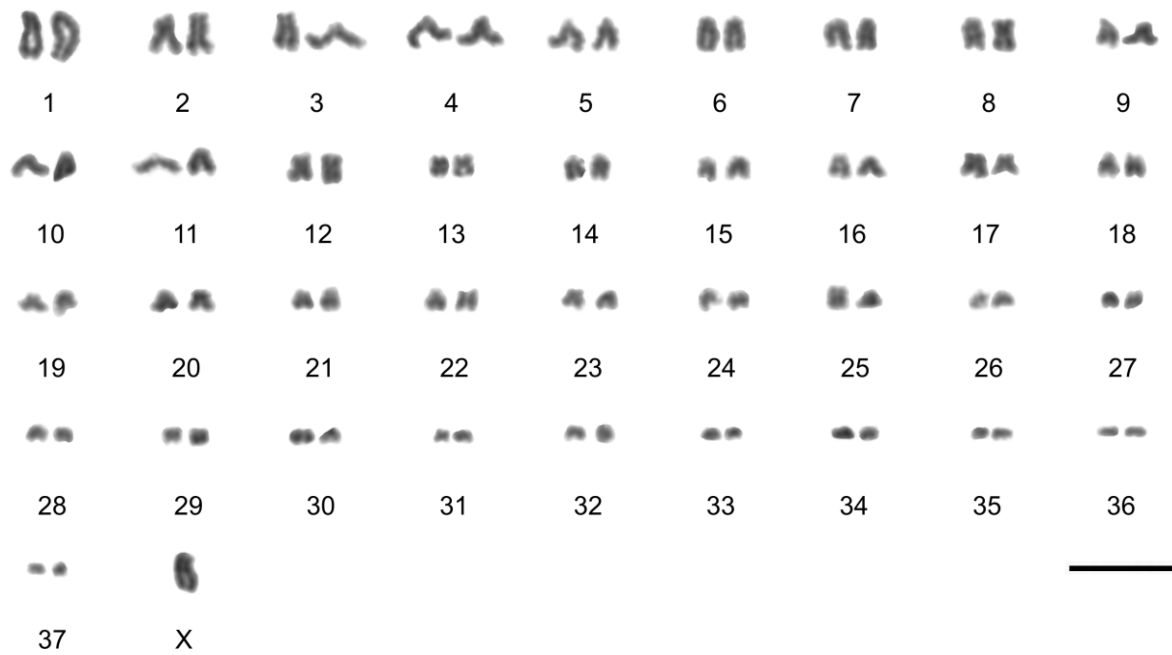
### *Elliptorhina davidi* van Herrewege, 1973

Karyotyp samečů druhu *Elliptorhina davidi* se skládá ze 75 chromosomů (obr. 21A) (cytogeneticky byli analyzováni 4 samci). Většinou se jedná o chromosomy subtelocentrické. Výjimkou je metacentrický chromosomový pár 12 a submetacentrický chromosomový pár 13. Vzhledem k malé velikosti je obtížné stanovit morfologické typy od chromosomového páru 19 až 37, ovšem pravděpodobně se většinou také jedná o chromosomy subtelocentrické. Chromosomový pár 1 má relativní velikost 3,27 %. Od chromosomového páru 2 až 12 se relativní velikost kontinuálně snižuje od 2,63 % do 1,73 %. Od 13 do 37 chromosomového páru se relativní velikost postupně snižuje od 1,59 % do 0,35 %.

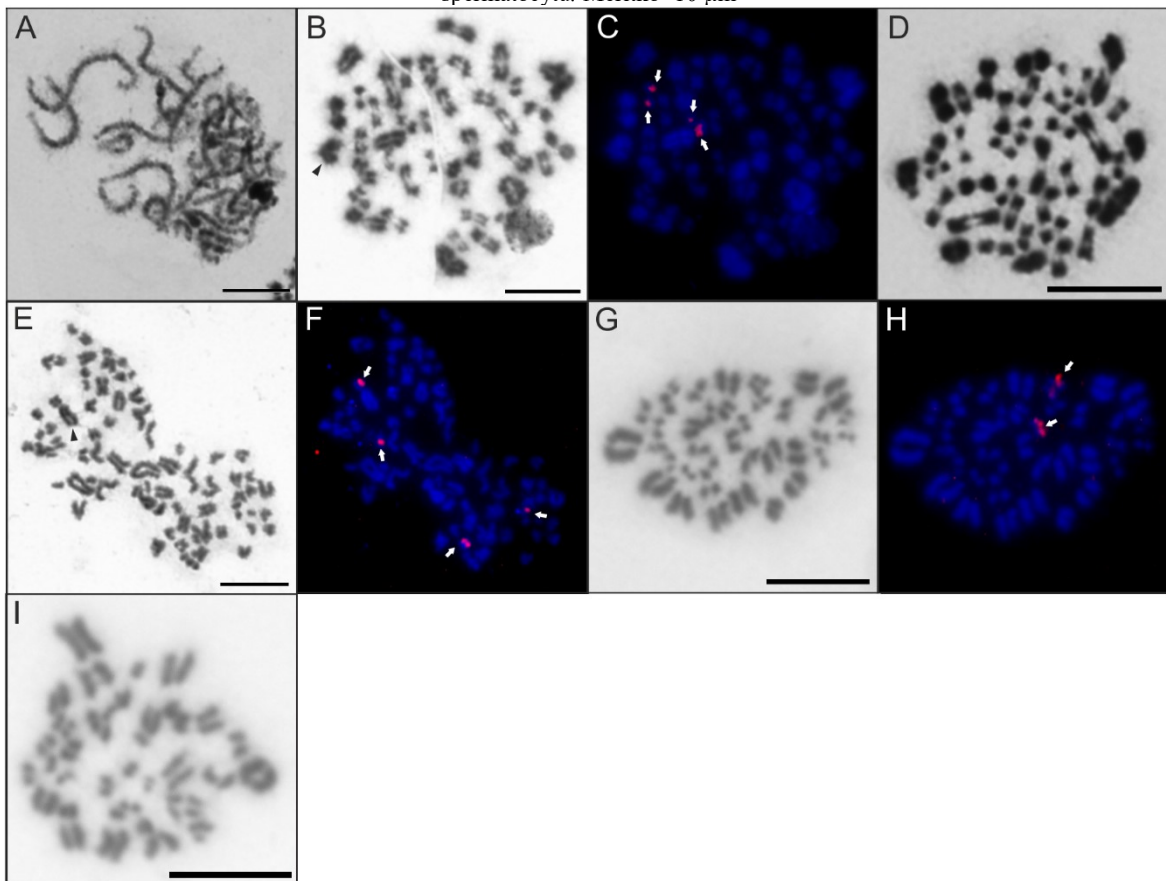
Nepárový pohlavní chromosom X je submetacentrický s relativní velikostí 2,4 %. Během samčí metafáze I tvoří univalent (obr. 22D).

Během pachytene byla pozorována jedna výraznější pozitivně heteropyknotická oblast chromatinu (obr. 22A). Během „pre-metafázního protažení“ a metafáze I se utváří 37 bivalentů a jeden univalent (chromosom X) (obr. 21B, D). Dle očekávání byly pozorovány metafáze II s chromosomálními počty 38 a 37 (obr. 22E, G, I).

Pomocí metody FISH byly lokalizovány dva páry klastřů 18S rDNA v pericentrické oblasti chromosomového páru 13 a na koncích krátkých ramének chromosomového páru 33 (obr. 22C, F). Dva klastřmi 18S rDNA byly detekovány na figuře metafáze II (obr. 22H).



Obrázek 21 – Karyogram samce druhu *Elliptorhina davidi* vytvořený na základě dvou metafázi II dvou sesterských spermatocytů. Měřítko=10  $\mu$ m



Obrázek 22 – Chromosomy samce druhu *Elliptorhina davidi* barvené Giemsovou (A, C, E, G) a po aplikaci FISH se sondou pro 18S rDNA klastrem (červený kanál) (B, D, F). A: pachytene se zvýrazněným pozitivně heteropyknotickým blokem heterochromatinu, B: „pre-metafázní protažení“ s 37 bivalenty a jedním zvýrazněným chromosomem X ve formě univalentu (šipka), C: 4 klastry 18S rDNA ve dvou párech, D: metafáze I, E: Metafáze II dvou sesterských spermatocytů s označeným pozitivně heteropyknotickým chromosomem X (šipka), F: 4 klastry 18S rDNA (bílé šipky), G: metafáze II (n=37), H: metafáze II s detailnější lokalizací dvou klastrů 18S rDNA v pericentrické oblasti chromosomu 13 a koncové oblasti p raménka chromosomu 33, I: metafáze II (n=38), Měřítko=10  $\mu$ m



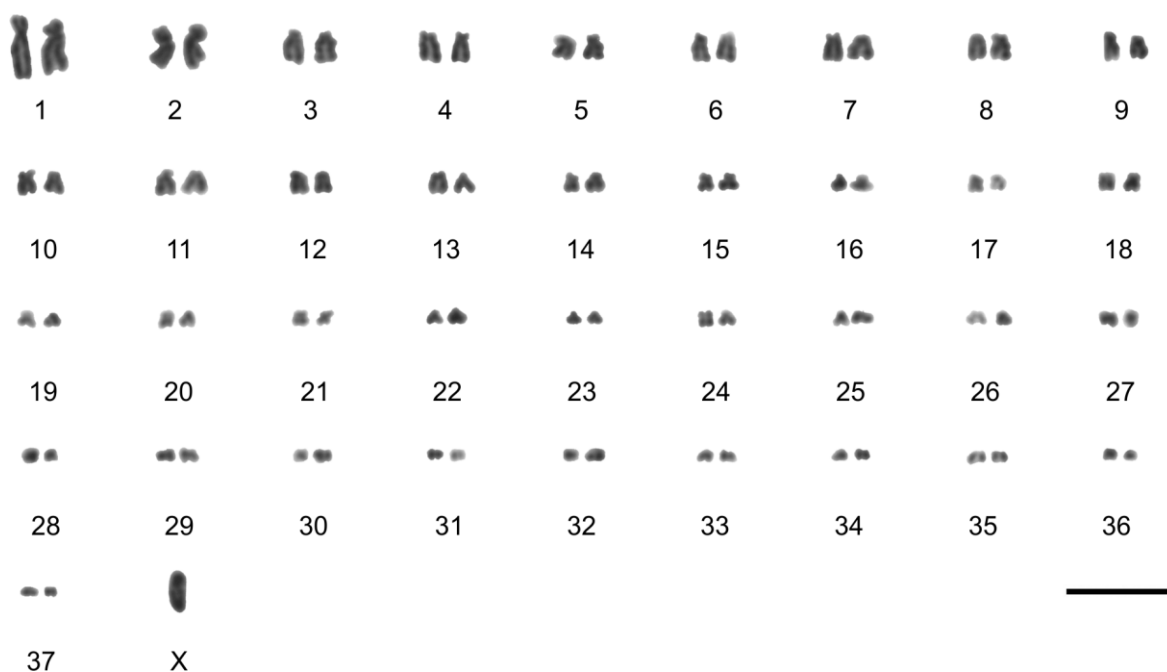
*Elliptorhina chopardi* Lefebvre, 1966

Karyotyp samců druhu *Elliptorhina chopardi* čítá 75 chromosomů (viz obr. 23 a 24A) (cytogeneticky bylo analyzováno 5 samců). Karyogram byl vytvořen ze samčí mitotické metafáze. Většina chromosomů je subtelocentrických. Výjimkou jsou submetacentrické chromosomové páry 1, 2, a 10. Vzhledem k malé velikosti nebylo možné určit přesnou morfologii chromosomů od 14. páru níže. Chromosomový pár 1 je největším s relativní velikostí 5,07 %. Relativní velikost 2. chromosomového páru je 3,42 %. Od 3. do 37. chromosomového páru se velikost kontinuálně snižuje od 2,53 % do 0,31 %.

Pohlavní chromosom X je submetacentrický s relativní velikostí 3,1 %. Patří mezi 4 největší chromosomy karyotypu a dle velikosti je u samců rozlišitelný jako nepárový chromosom (viz obr. 23).

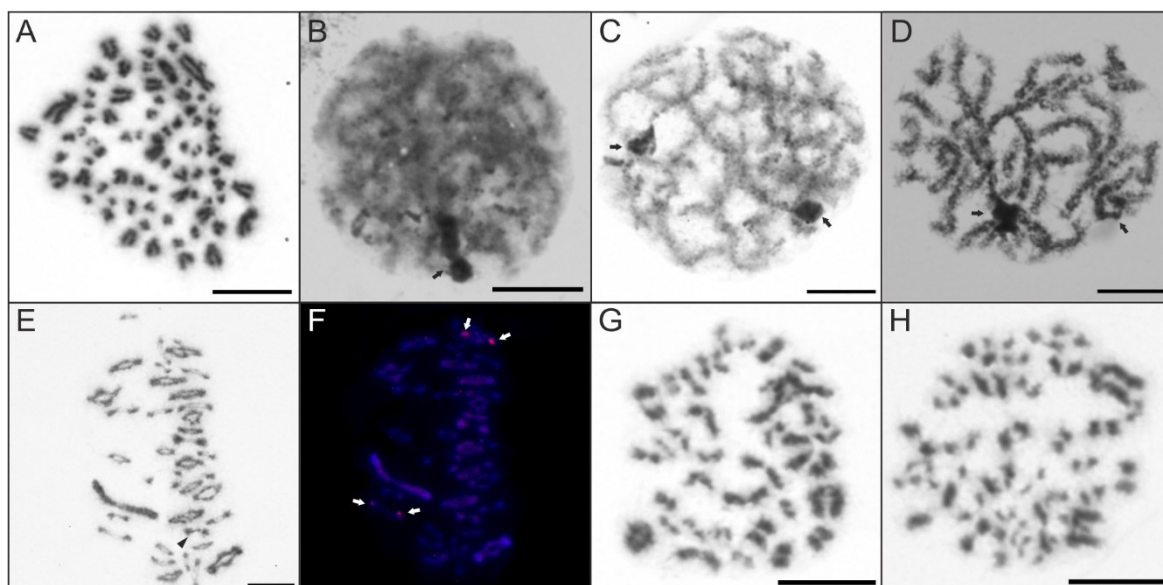
Během pachytene je v jádře viditelná nejprve jedna a později dvě pozitivně heteropyknotické oblasti chromatinu tvořené koncovými částmi chromosomových ramének (obr. 24B-D). Během „pre-metafázního protažení“ pozorujeme 37 bivalentů a chromosom X jako univalent (často na periferii) (metafáze I pozorována nebyla) (obr. 24E). Během metafáze II lze v jádrech spermatocytů nalézt předpokládané počty 37 a 38 chromosomů (viz obr. 24G, H).

Metodou FISH byly lokalizovány dva páry klastrů 18S rDNA. Na krátkých raménkách dvou párů subtelocentrických chromosomů (viz obr. 24F).



Obrázek 23 – Karyogram samce druhu *Elliptorhina chopardi* vytvořený na základě mitotické metafáze. Měřítko=10  $\mu$ m





Obrázek 24 – Chromosomy samce druhu *Elliptorhina chopardi* barvené Giemsou (A–E, G, H) a po aplikaci FISH se sondou pro 18S rDNA klastr (červený kanál) (F) A: samčí mitotická metafáze, B: brzká pachytene se zvýrazněnou jednou pozitivně heteropyknotickou oblastí chromatinu (černá šipka), C, D: pozdní pachytene se zvýrazněnými dvěma pozitivně heteropyknotickými oblastmi chromatinu (černé šipky), E: pozdní „pre-metafázní protažení“, F: metafáze I se zvýrazněnými dvěma páry klastrů 18S rDNA, G: metafáze II s 38 chromosomy, H: metafáze II s 37 chromosomy. Měřítko=10  $\mu$ m

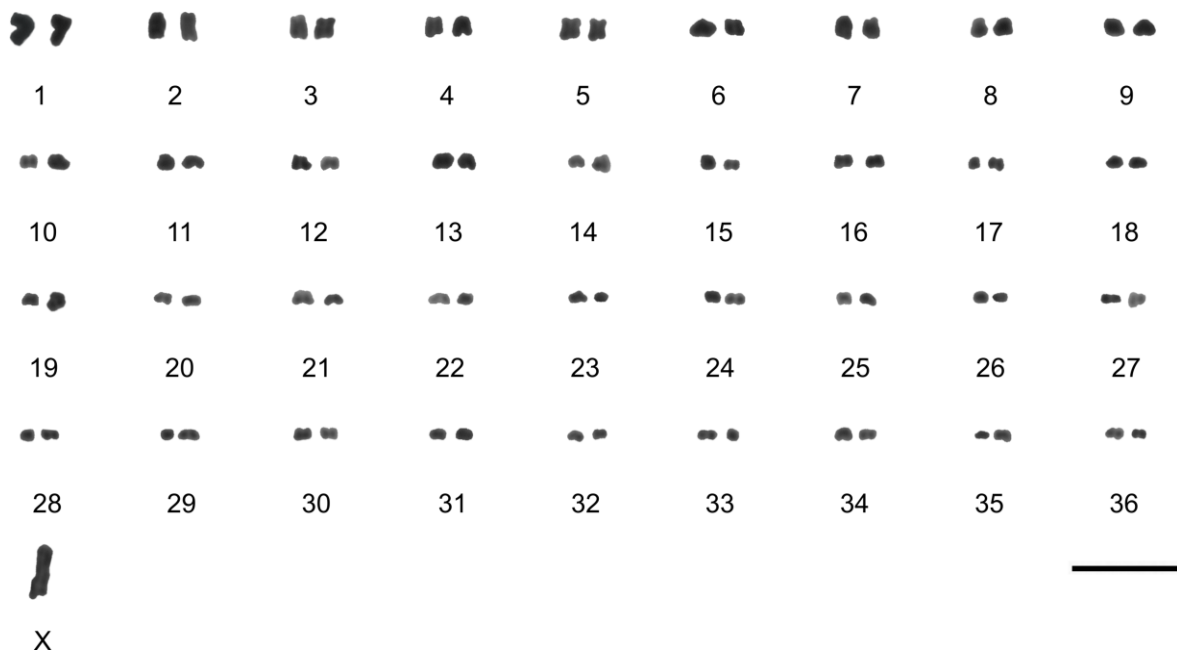
### *Elliptorhina javanica* (Hanitsch, 1930)

Karyotyp druhu *Elliptorhina javanica* se skládá ze 73 chromosomů (obr. 25 a 26A) (cytogeneticky bylo analyzováno 5 samců). Největší chromosomový pár je submetacentrický. Malá velikost činila obtížné určit morfologické typy dalších chromosomů, avšak většina z nich je pravděpodobně submetacentrického typu. Výjimku jsou jen chromosomové páry 3 a 5, které jsou submetacentrické. Zdaleka největším autosomálním párem s relativní velikostí 4,86 % je chromosomový pár 1. Od páru 2 až 36 postupně klesá relativní velikost od 3,14 % do 0,33 %.

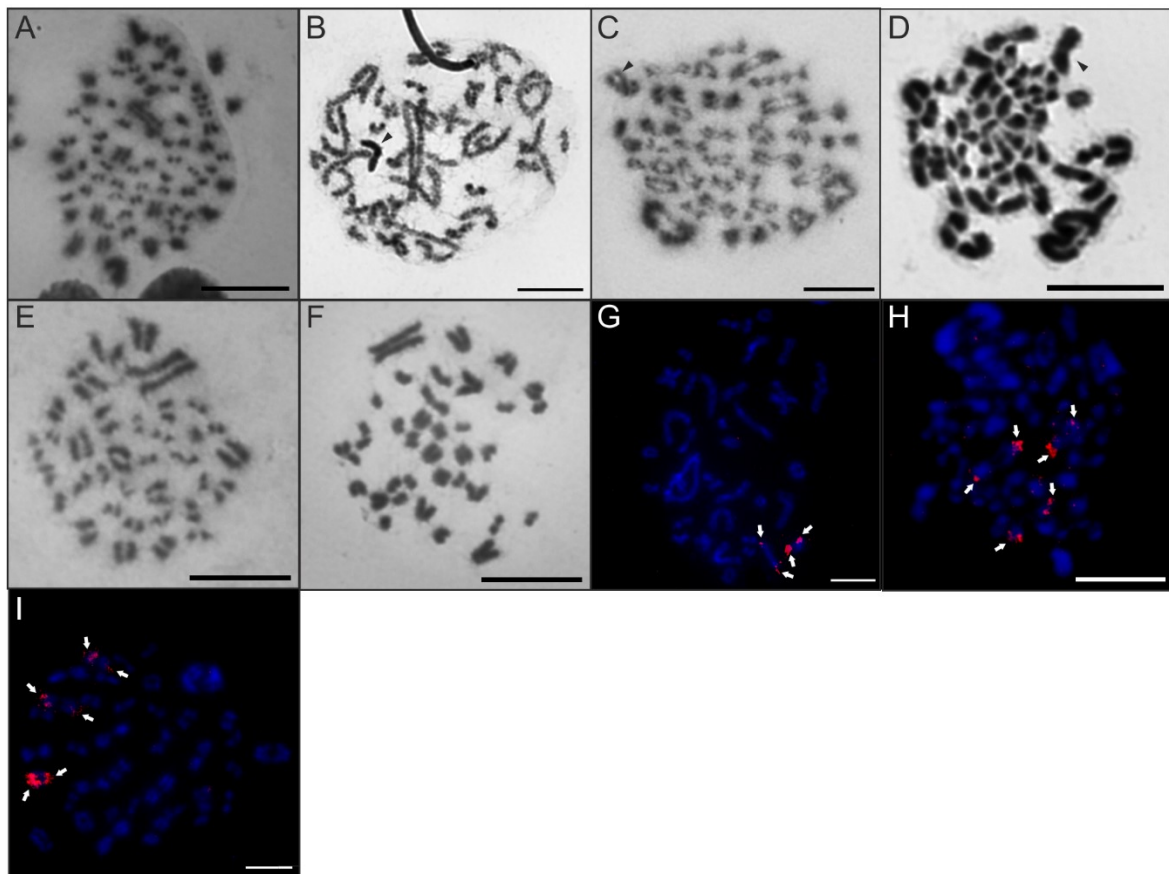
Submetacentrický pohlavní chromosom X je největším elementem karyotypu s relativní velikostí 6,25 %. Během fáze „pre-metafázního protažení“ je viditelný jako univalent (obr. 26C). Chromosom X je pozitivně heteropyknotický během diakineze (obr. 26B), ale v metafázi I je již spiralizován na stejné úrovni jako zbytek karyotypu (obr. 26D).

Již během interfáze až do pachytene je patrná jedna pozitivně heteropyknotická oblast. Klastry 18S rDNA se během pachytene lokalizují do této oblasti. V metafázi I je patrných 36 bivalentů a chromosom X jako univalent (obr. 26D). Dle předpokladu byly pozorovány metafáze II s chromosomálními počty 36 a 37 (viz obr. 26E, F).

Metodou FISH byly mezi jedinci zjištěny variabilní počty 18S rDNA klastrů. U dvou jedinců byly zjištěny 3 páry 18S rDNA klastrů (obr. 26H, I), zatímco u jednoho pouze 2 páry 18S rDNA klastrů (viz obr. 26G). Klastry byly vždy pozorovány na krátkých raménkách bivalentů s jedním chiasmatem.



Obrázek 25 – Karyogram samce druhu *Elliptorhina javanica* vytvořený na základě mitotické metafáze. Měřítko=10  $\mu$ m



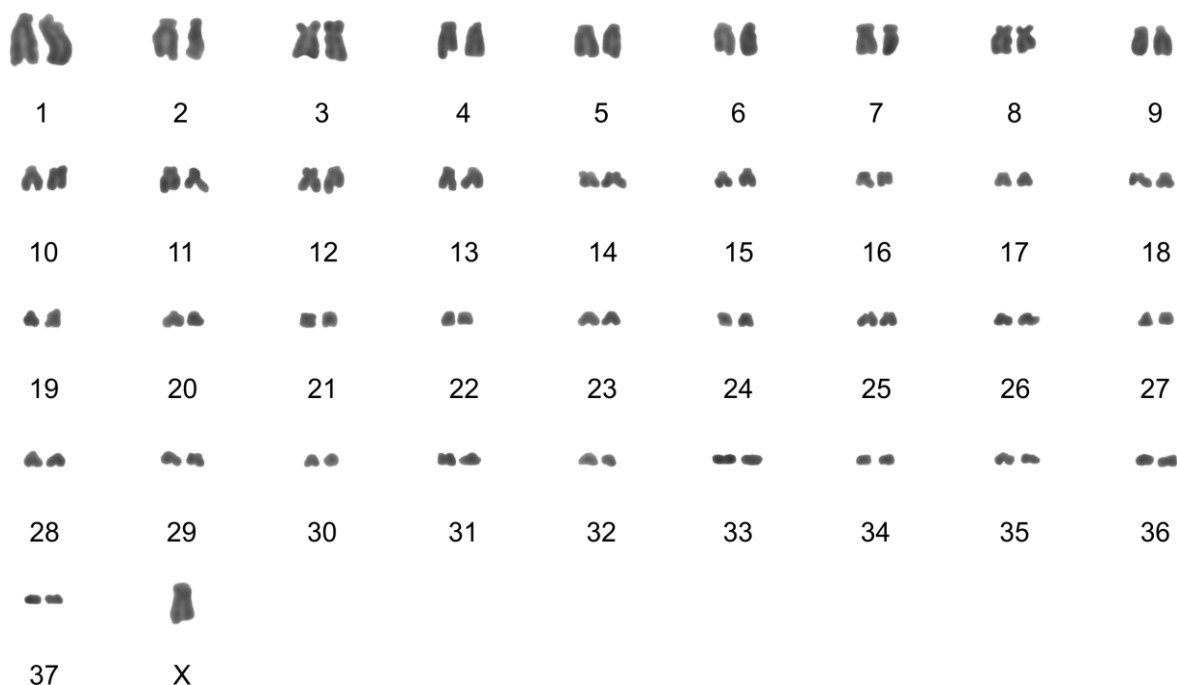
Obrázek 26 – Chromosomy samce druhu *Elliptorhina javanica* barvené Giemsovou (A–E) a po aplikaci FISH se sondou pro 18S rDNA klastr (červený kanál) (F, G, H). A: mitotická metafáze, B: diakineze s vyznačeným pohlavním chromosomem X (černá šipka), C: „pre-metafázní protažení“ se zvýrazněným chromosomem X (šipka), D: metafáze I s vyznačeným chromosomem X (šipka), E: metafáze II přecházející do anafáze II (n=36), F: metafáze II přecházející do anafáze II (n=37), G: diakineze s vyznačenými dvěma páry 18D rDNA klastrů, H, I: metafáze I s vyznačenými třemi páry klastrů 18S rDNA od dvou různých jedinců. Měřítko=10  $\mu$ m

*Elliptorhina cf. lefeuvri* van Herrewege, 1973

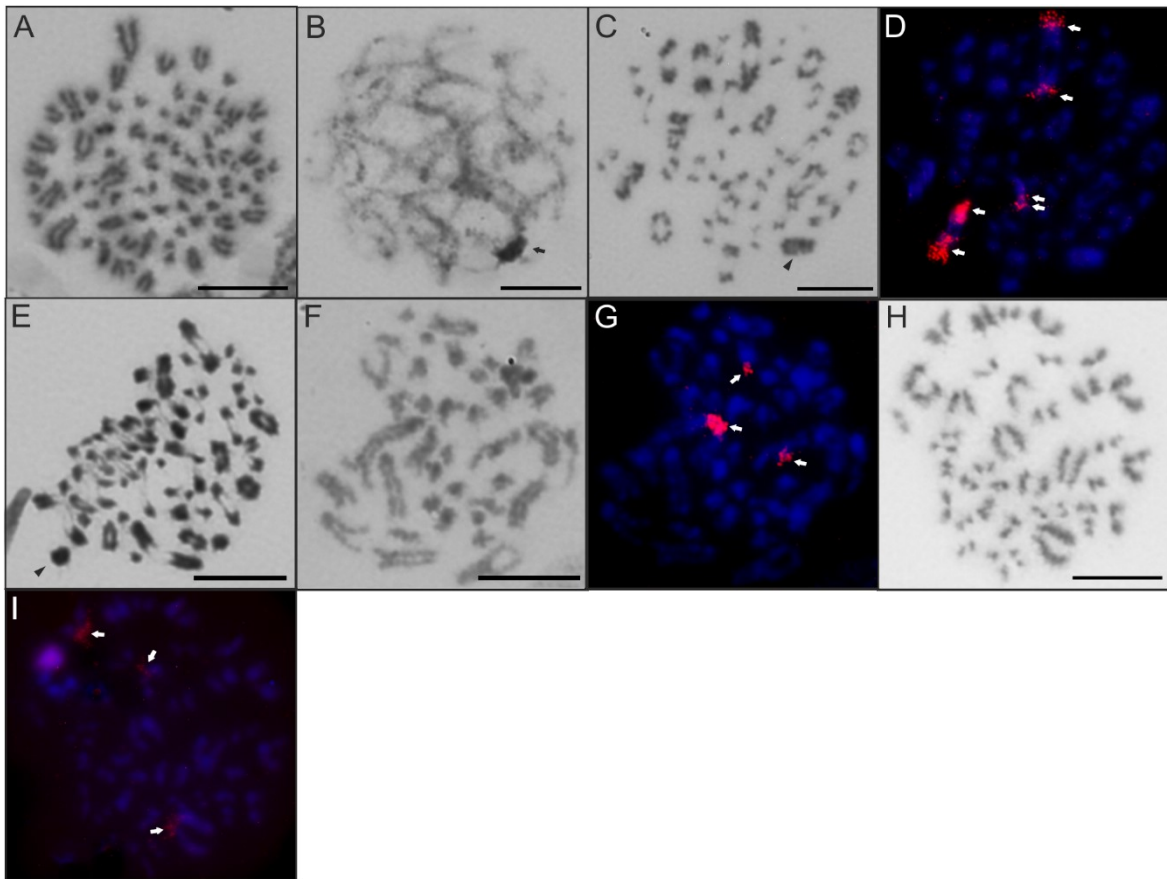
Karyotyp samců druhu *Elliptorhina cf. lefeuvri* většinou čítá 75 chromosomů (obr. 27 a 28A) (cytogeneticky byli analyzováni 3 samci), nicméně byly také pozorovány samčí metafáze II jednoho jedince čítající 38 a 39 chromosomů, předpokládaný diploidní počet tedy může být i 76. Největší chromosomový pár o relativní velikosti 3,82 % je subtelocentrický. Většina chromosomů větších velikostí je subtelocentrického typu. Výjimkou jsou chromosomové páry 3 a 8, které jsou submetacentrické. Chromosomy menších rozměrů zahrnují jak submetacentrické, a i subtelocentrické chromosomy, nicméně z důvodu malých rozměrů a nedostatečné úrovně spiralizace není jejich morfologie lehce rozpoznatelná. Relativní velikost postupně klesá od 2 do 13 chromosomového páru od 3,19 % do 1,27 %. Od 14 do 37 chromosomového páru klesá relativní velikost od 1,04 % do 0,44 %.

Pohlavní chromosom X je submetacentrický s relativní velikostí 2,06 %. Během pachytene je pozitivně heteropyknotický (obr. 28B) a nadále během samčího „pre-metafázního protažení“ a metafáze I utváří viditelný univalent (obr. 28C, E).

Metodou FISH byly zjištěny tři páry klastrů 18S rDNA. Jejich lokalizace je na krátkých raménkách největšího chromosomového páru, jednoho páru větších chromosomů a na krátkých raménkách chromosomů z frakce velice malých rozměrů (obr. 28D). Tři klastry 18S rDNA (obr. G, I) byly detekovány na obou sledovaných typech spermatocytů 2. řádu (obr. 28F, H)



Obrázek 27 – Karyogram samce druhu *Elliptorhina lefeuvri* vytvořený na základě mitotické metafáze. Měřítko=10 µm



Obrázek 28 – Chromosomy samce druhu *Elliptorhina cf. lefeuvri* barvené Giemsou (A–C, E, G) a po aplikaci FISH se sondou pro 18S rDNA klastr (červený kanál) (D, F, H). A: mitotická metafáze, B: pachytene s pozitivně heteropyknotickým pohl. chromosomem (šipka), C: samčí „pre-metafázní protažení“ a vyznačený chromosom X (šipka), D: metafáze I se zvýrazněnými klastry 18S rDNA (bílé šipky), E: samčí metafáze I s vyznačeným chromosomem X jako univalentem (šipka) F: metafáze II s 38 chromosomy s pozitivně heteropyknotickým pohlavním chromosomem (šipka), G: metafáze II se 3 klastry 18S rDNA na krátkých raménkách chromosomů (bílé šipky), H: samčí metafáze II přecházející do anafáze II s 39 chromosomy, I: samčí metafáze II přecházející do anafáze II s 39 chromosomy a vyznačenými třemi klastry 18S rDNA (bílé šipky). Měřítka=10  $\mu$ m

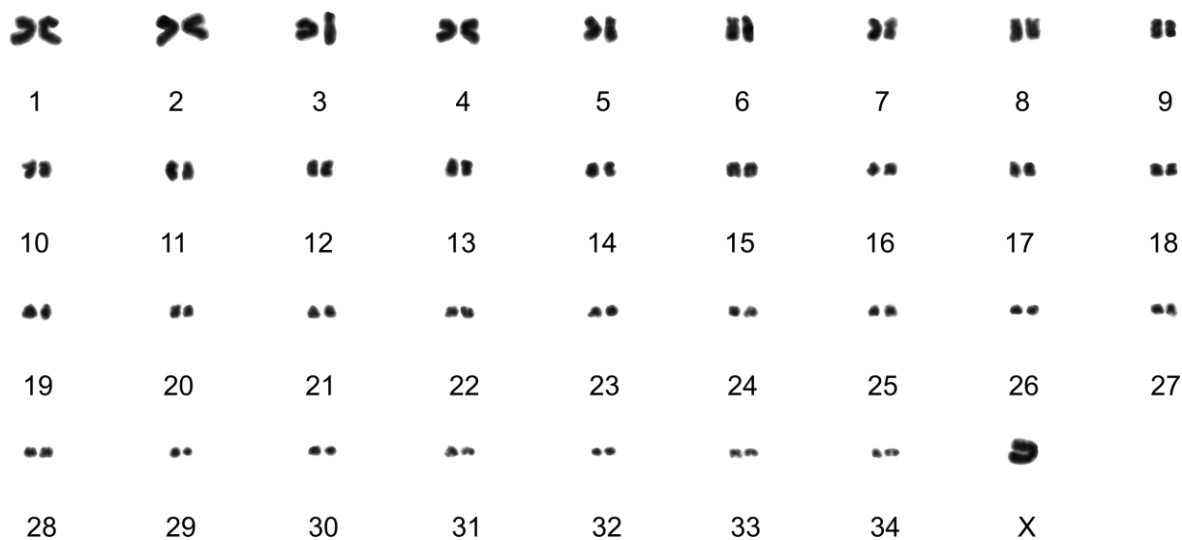
### *Elliptorhina laevigata* (Saussure & Zehntner, 1895)

Karyotyp druhu *Elliptorhina laevigata* se skládá z 69 chromosomů (obr. 29 a 30H) (cytogeneticky byli analyzováni 2 samci). Mezi metacentrické patří chromosomové páry: 2 a 4. Submetacentrické jsou chromosomové páry: 1, 3, 5, 7, 10, 12, 18 a subtelocentrické jsou chromosomové páry: 6, 8, 9, 11, 13-17. Relativní velikost autosomů v diploidní sadě postupně klesá od 4, 27 % do 0,31 %. Příliš malá velikost chromosomů menších, než je 18. chromosomový pár znemožňuje přesné určení morfologie.

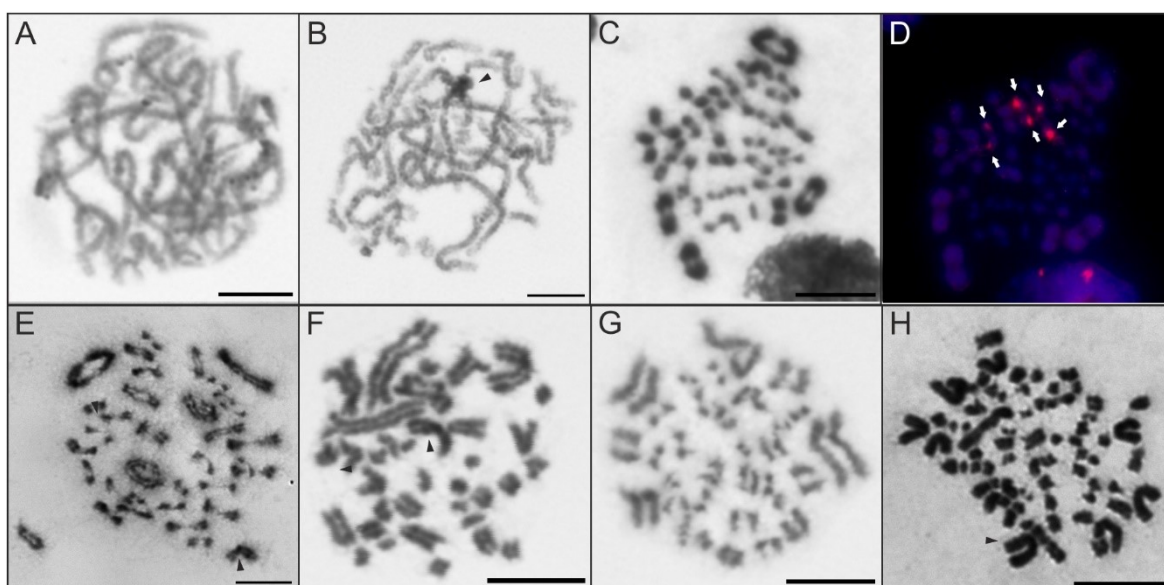
Pohlavní chromosom X je během mitotické metafáze největším chromosomem karyotypu s relativní velikostí 5,21 %. Během pozdní pachytene se postupně stává pozitivně heteropyknotický a následně je během „pre-metafázního protažení“ viditelný jako univalent (obr. 30A, B, E). Diplotene, diakineze ani metafáze I pozorovány nebyly. Dále vznikají spermatocyty s předpokládanými haploidními počty 35 a 34 chromosomů (obr. 30F, G). Během metafáze II je chromosom X opět pozitivně

heteropyknotický a bývá tak menší než zbylé chromosomy, zejména menší než 1. chromosomový pár (obr. 30).

Metodou FISH byly detekovány 3 páry klastrů 18S rDNA v terminálních pozicích liniovitých bivalentů malých chromosomů indukující pozici na krátkých raménkách, na kterých nevzniká chiasma (obr. 30C, D).



Obrázek 29 – Karyogram samce druhu *Elliptorhina laevigata* vytvořený na základě mitotické metafáze. Měřítko=10 µm



Obrázek 30 - Chromosomy samce druhu *Elliptorhina laevigata* barvené Giemsou (A–C, E–H) a po aplikaci FISH se sondou pro 18S rDNA klastr (červený kanál) (D) A: samčí pachytene, B: pozdní pachytene se zvýrazněným pozitivně heteropyknotickým chromosomem X (šipka), C: „pre-metafázní protažení“, D: „pre-metafázní protažení“ se 3 páry 18S rDNA klastrů na krátkých raménkách malých chromosomů (bílé šipky), E: pozdní „pre-metafázní protažení“ s vyznačeným chromosomem X jako univalentem (šipka), F: metafáze II se zvýrazněným chromosomem X (šipka) (n=35), G: metafáze II (n=34), H: mitotická metafáze se zvýrazněným chromosomem X (šipka). Měřítko=10 µm

### *Gromphadorhina portentosa* (Schaum, 1853)

Mezi samčími jedinci rozdílných populací druhu *Gromphadorhina portentosa* byly pozorovány odlišné diploidní počty chromosomů. Chromosomy všech zkoumaných karyotypů lze rozdělit do

dvou skupin: chromosomy velké, jejichž morfologii lze lépe analyzovat (přibližně do 1,30 % relativní velikosti, což hrubě odpovídá 18. chromosomovému páru) a chromosomy malé až mikrochromosomy, jejichž přesná morfologická analýza není vzhledem k velikosti možná, ovšem pravděpodobně se jedná o submetacentrické až subtelocentrické chromosomy.

Samci populace 1 měli  $2n\sigma^7=63$  (viz obr. 31 a 33A) (cytogeneticky byli analyzováni 2 samci). První chromosomový pár je velikostně heteromorfní a subtelocentrický s relativními velikostmi 4,37 % a 3,05 %. Mezi další subtelocentrické chromosomy patří páry: 4, 6–18. Chromosomové páry 2 a 3 jsou submetacentrické a chromosomový pár 5 je submetacentrický až subtelocentrický. Relativní velikost chromosomů postupně klesá od 2. do 21. páru s relativními velikostmi 3,65 % a 1,08 %. Dále postupně klesá od 22. do 31. ch. páru s rel. velikostmi 0,81 % až 0,48 %.

Samec populace 2 (od chovatele byl dostupný pouze 1 samec) měl v diploidním počtu 61 chromosomů (obr. 33I). Od předešlého karyotypu se lišil hned prvními dvěma největšími chromosomy. První z nich je metacentrický s relativní délkou 4,13 %. Druhý je submetacentrický s relativní délkou 3,90 %. Kvůli unikátní kombinaci morfologie a velikosti nelze tyto dva chromosomy jednoduše spárovat. Následuje největší 1. chromosomový pár, který je subtelocentrický a velikostně heteromorfní s relativními délkami 3,84 % a 3,26 %. Mezi další subtelocentrické chromosomy patří páry: 3–12, 15. Submetacentrické jsou páry: 2, 3, 14, 16, 17 a 18. Od druhého chromosomového páru (2,78 %) klesá kontinuálně relativní velikost až do 30. páru (0,36 %)

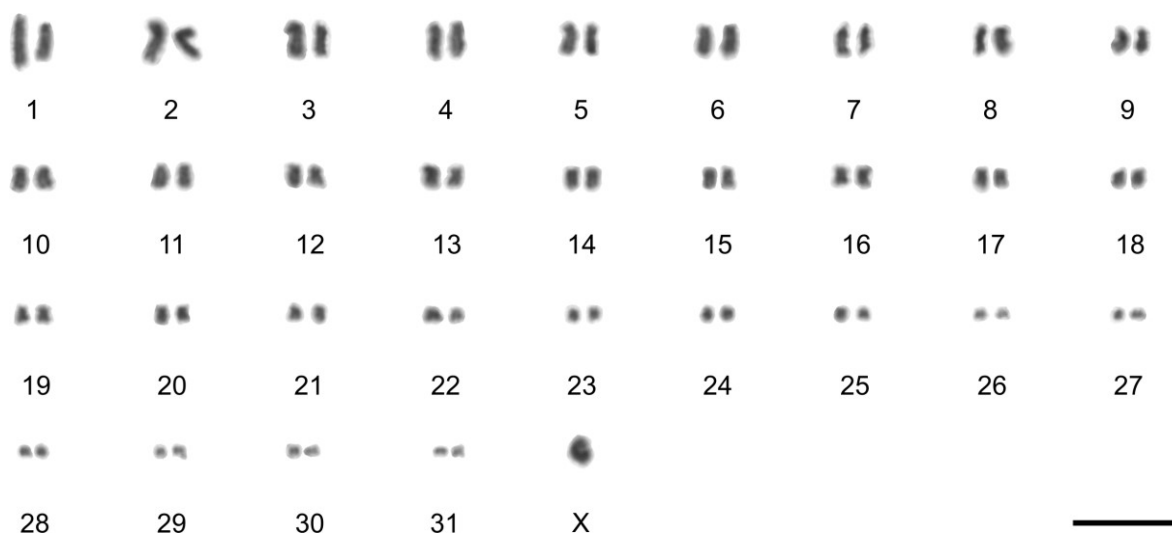
U samce populace 3 (analyzován byl pouze 1 samec) byl pozorován stejný karyotyp jako v případě samců populace 1, ovšem v jednom buněčném jádře byl pozorován i diploidní počet chromosomů 65 (viz obr. 32). Karyotyp čítající 63 chromosomů byl se od karyotypu s 65 chromosomy (obr. 32) odlišoval menším počtem chromosomů s menší relativní velikostí než 1,20 %, které přibližně odpovídá 18. chromosomový pár (i u ostatních jedinců/populací). První chromosomový pár je subtelocentrický a heteromorfní s relativními velikostmi 4,19 %, resp. 3,18 %. Další subtelocentrické chromosomové páry jsou: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 18. Submetacentrické jsou chromosomové páry 2 a 14. Chromosomové páry 9 a 15 jsou submetacentrické až subtelocentrické.

Pohlavní chromosom X byl u všech zkoumaných jedinců metacentrický, a i jeho relativní velikosti byly podobné (2,31 %, 2,38 %, 2,33 %). Průměrná relativní velikost je tedy 2,34 %. U samců je nepárový pohlavní chromosom detekovatelný jako univalent během metafáze I. U jedince z populace 2 je část chromosomu X často negativně heteropyknotická (obr. 33I).

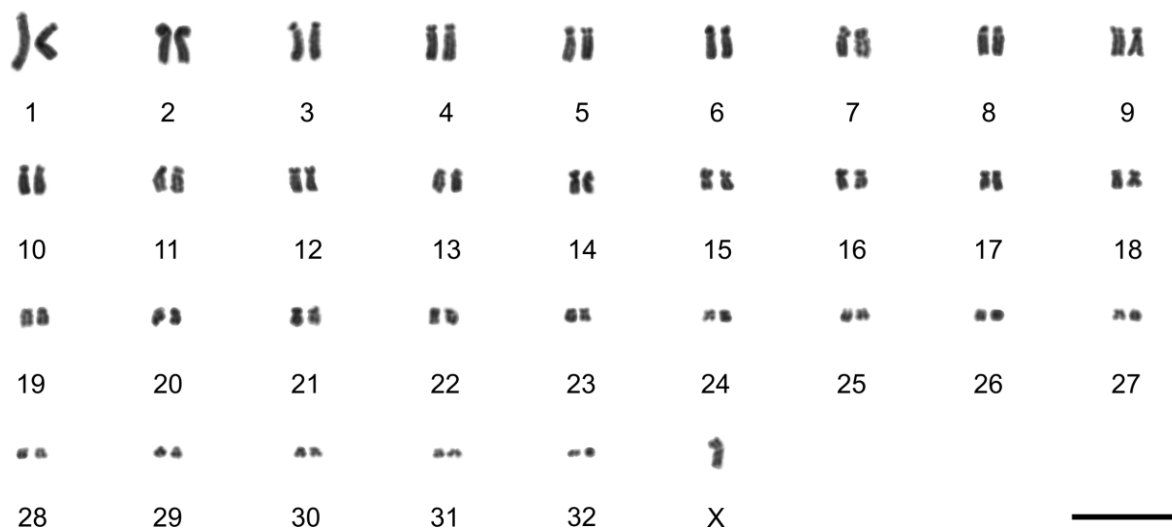
U populace 1 bylo pozorováno několik stádií meiotického dělení. Během pachytene byla pozorována jedna pozitivně heteropyknotická oblast chromatinu, pravděpodobně neodpovídající pouze chromosomu X (obr. 33P). U této populace byla pozorována diplotene/diakineze a poskytuje tak srovnání s „pre-metafázním protažením“ (obr. 33C). Během pre-metafázního protažení a také během

metafáze I je přítomno 31 bivalentů a chromosom X jako univalent (obr. 33D, E). Dále byly pozorovány 3 metafáze II s  $n=31$  (obr. 33G, H). Předpokládaný haploidní počet roven 32 pozorován nebyl.

Metodou FISH byl mezi jedinci detekován variabilní počet klastrů 18S rDNA. U populace 1 bylo detekováno 8 klastrů rDNA ve třech párech a dva klastry jsou v heterozygotním stavu (obr. 33F). U populace 2 a 3 bylo detekováno 7 klastrů rDNA ve třech párech a jeden klastr je v heterozygotním stavu (obr. 33J, L, O). U populace 2 se dvojice klastrů vyskytovala na krátkých raménkách největšího chromosomového páru. Další dva páry klastrů se vyskytovaly na krátkých raménkách středně velkého a malého chromosomového páru. Jeden klastr se vyskytoval na krátkém raménku pouze jednoho středně velkého chromosomu z bivalentu (viz obr 33J). Jedinci z populace 1 měli 8 klastrů 18S rDNA, které také byly vždy na krátkých chromosomových raménkách (viz obr. 33F). Jeden pár byl na největším chromosomovém páru. Další páry klastrů se vyskytovaly na páru středně velkých chromosomů a páru malých chromosomů. Po jednom klastru (heterozygotní stav) obsahoval další pár středně velkých a pár malých chromosomů. U populace 3 byly klastry 18S rDNA také lokalizovány na krátkých raménkách největšího chromosomového páru a dále se vyskytovaly na krátkých raménkách dvou párů středně velkých chromosomů. Jeden klastr byl na krátkém raménku pouze jednoho malého chromosomu z bivalentu. Pozice klastrů 28S rDNA detekované u populace 3 přesně kolokalizovaly se zjištěnými pozicemi klastrů 18S rDNA (viz obr. 33L, M, N, O).

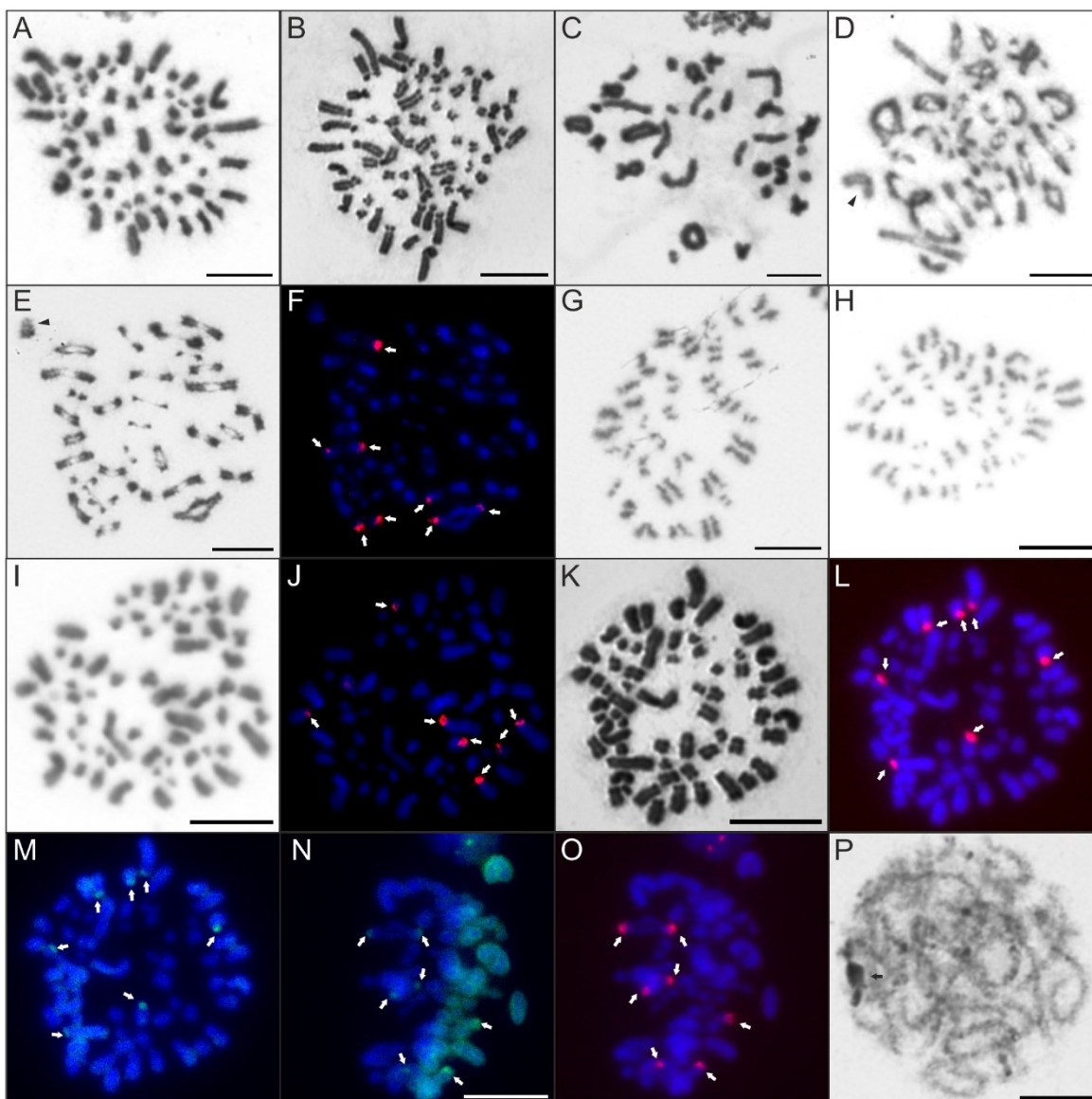


Obrázek 31 – Karyogram samce druhu *Gromphadorhina portentosa* vytvořený na základě mitotické metafáze (populace 1). Měřítko=10  $\mu$ m



Obrázek 32 – Samčí karyogram druhu *Gromphadorhina portentosa* vytvořený na základě mitotické metafáze jednoho jádra s odlišným karyotypem ( $2n=65$ ) (populace 3). Měřitko=10  $\mu\text{m}$





Obrázek 33 – Chromosomy samců druhu *Gromphadorhina portentosa* barvené Giemsou (A–C, E, G–I, K) a po aplikaci FISH se sondou pro 18S rDNA klastř (červený kanál) (F, J, L, O) a pro 28S rDNA (zelený kanál) (M, N). A: Samčí mitotická metafáze s 63 chromosomy (populace 1), B: Samčí mitotická metafáze s 65 chromosomy (ojedinělé pozorování v jedinci populace 3), C: diplotene/diakineze (populace 1), D: „pre-metafázní protažení“ s vyznačeným chromosomem X (šipka) (populace 1), E: samčí metafáze I s 31 bivalenty a se zvýrazněným chromosomem X ve formě univalentu (šipka) (populace 1), F: samčí metafáze I s osmi vyznačenými klastřmi 18S rDNA (bílé šipky) (populace 1), G, H: metafáze II (n=31), I: Samčí mitotická metafáze s 61 chromosomy (populace 2), J: samčí mitotická metafáze se sedmi vyznačenými klastřmi 18S rDNA (bílé šipky) (populace 2), K: Samčí mitotická metafáze s 63 chromosomy (populace 3), L: Samčí mitotická metafáze se sedmi vyznačenými klastřmi 18S rDNA (bílé šipky) (populace 3), M: Samčí mitotická metafáze se sedmi vyznačenými klastřmi 28S rDNA (bílé šipky) (populace 3), N: Samčí metafáze I se sedmi vyznačenými klastřmi 28S rDNA (bílé šipky) (jeden klastř je viditelně v heterozygotním stavu) (populace 3), O: Samčí metafáze I se sedmi vyznačenými klastřmi 18S rDNA (bílé šipky) (jeden klastř je viditelně v heterozygotním stavu) (populace 3), P: Pachytene s vyznačenou pozitivně heteropyknotickou oblastí chromatinu. Měřítka=10 μm

### *Gromphadorhina oblongonota* van Herrewege, 1973

Druh *Gromphadorhina oblongonota* vykazoval proměnlivý karyotyp na úrovni mezi jedinci i v rámci jednoho jedince (viz tab. 7) (cytogeneticky bylo analyzováno 7 samců a 1 samice). Pro přehlednost jsou jednotliví zkoumaní jedinci označeni dle tabulky 7. U jedinců 1 a 6 byl pozorován

karyotyp  $2n\sigma=61$ , u jedinců 2, 5 a 8 byl pozorován diploidní počet  $2n\sigma=59$  (obr. 36E, G, K, L, M) a u jedince 7 diploidní počet  $2n\sigma=57$  (viz obr. 35, 36B). U jedince 4 byly pozorovány ihned tři různé diploidní počty chromosomů:  $2n\sigma: 59, 60$  a  $61$  (počet  $61$  byl nejčastější, viz obr. 34). U jedné samice bylo pozorováno  $60$  chromosomů v diploidním počtu (jedinec 3). Stejně jako u ostatních studovaných druhů tribu Gromphadorhini i zde se u všech pozorovaných karyotypů setkáváme s chromosomy relativně většími a dále početnou skupinou malých chromosomů.

Pro lepší orientaci bude hranice mezi těmito dvěma skupinami určena na  $1,4$  až  $1,5$  % relativní chromosomové velikosti. Tato hranice je v u všech pozorovaných karyotypů přibližně na velikostní úrovni  $16.$  chromosomového páru. Přesné určení morfologie nebylo v rámci skupiny větších chromosomů vždy možné, nicméně je v ní stejný počet chromosomů velikostně i morfologicky podobných. Rozdílné počty chromosomů mezi všemi pozorovanými karyotypy (kromě samičího karyotypu jedince 3) jsou ovšem ve skupině pod  $1,4$  až  $1,5$  % relativní velikosti.

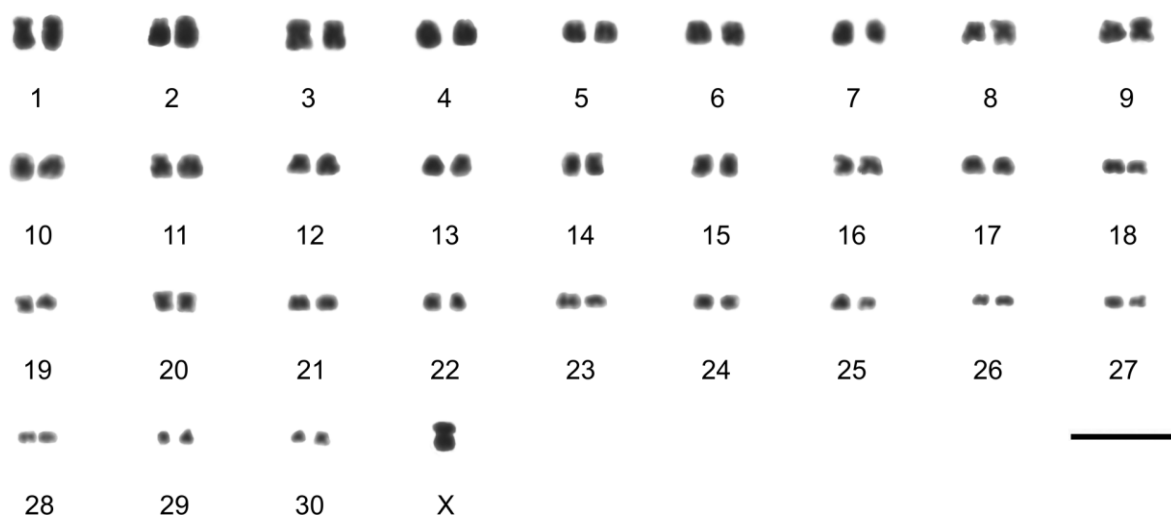
Pohlavní chromosom X je submetacentrický. U jedinců 4 a 7 byla jeho relativní velikost  $3,22$  % a  $3,28$  %, vždy se tedy jednalo o jeden z největších chromosomů karyotypu. Během „pre-metafázního protažení“ je negativně heteropyknotický a u samců je často viditelný jako univalent (viz obr 36K, L, M).

U jedince 5 ( $2n\sigma=59$ ) byl během „pre-metafázního protažení“ detekován tetravalent z malých chromosomů (viz obr. 36K, L). Ve spermatocytech II. řádu tohoto jedince byly během metafáze II detekovány rozdílné počty chromosomů:  $n=28, 29, 30$  a  $31$ . U jedince 5 ( $2n\sigma=59$ ) byly během metafáze I detekovány dva trivalenty složené opět z menších chromosomů (viz obr. 36M). U jedince 7 byly ve fázi „pre-metafázního protažení“, předcházejícího metafázi I, pozorovány podezřelé chromosomové řetězce, v jejichž případě se také jednalo o multivalenty, nicméně nejpravděpodobnější je kombinace dvou trivalentů a jednoho tetravalentu (viz obr. 36O, P).

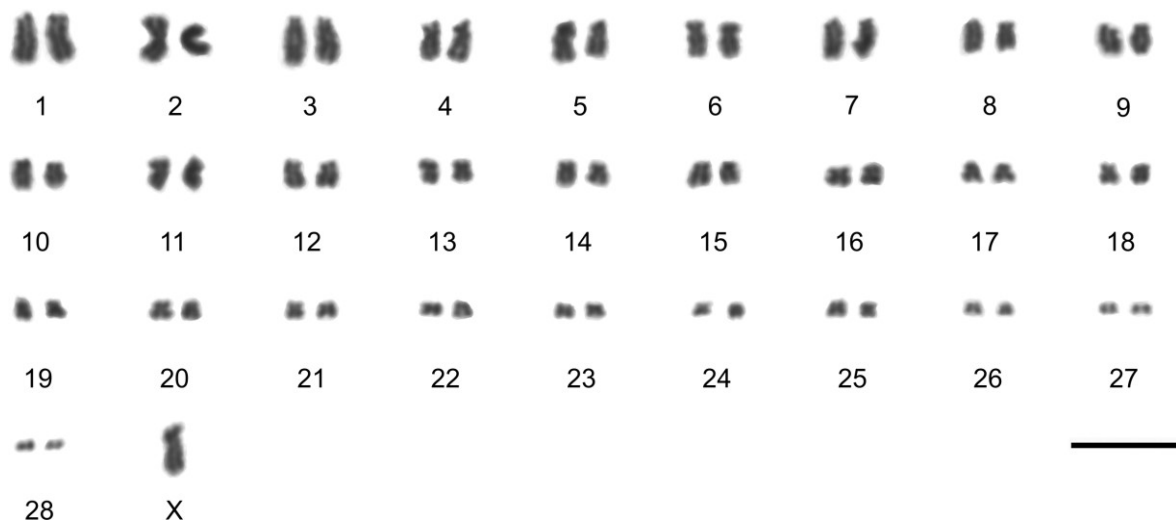
Tabulka 7 – Přehled studovaných jedinců druhu *Gromphadorhina oblongonota* a jejich cytogenetická charakteristika

Jedinec	2n	n	2n - počet klastrů 18S rDNA	n - počet klastrů 18S rDNA	multivalenty	pohlaví
1	61	-	-	-	-	♂
2	59	-	5, 3	1, 2, 3	-	♂
3	60	-	-	-	-	♀
4	61, 60, 59	-	6	-	-	♂
5	59	28, 29, 30, 31	-	-	1CIV	♂
6	61	-	-	-	-	♂
7	57	-	-	-	(2CIII + 1CIV)?	♂
8	59	-	-	-	2CIII	♂

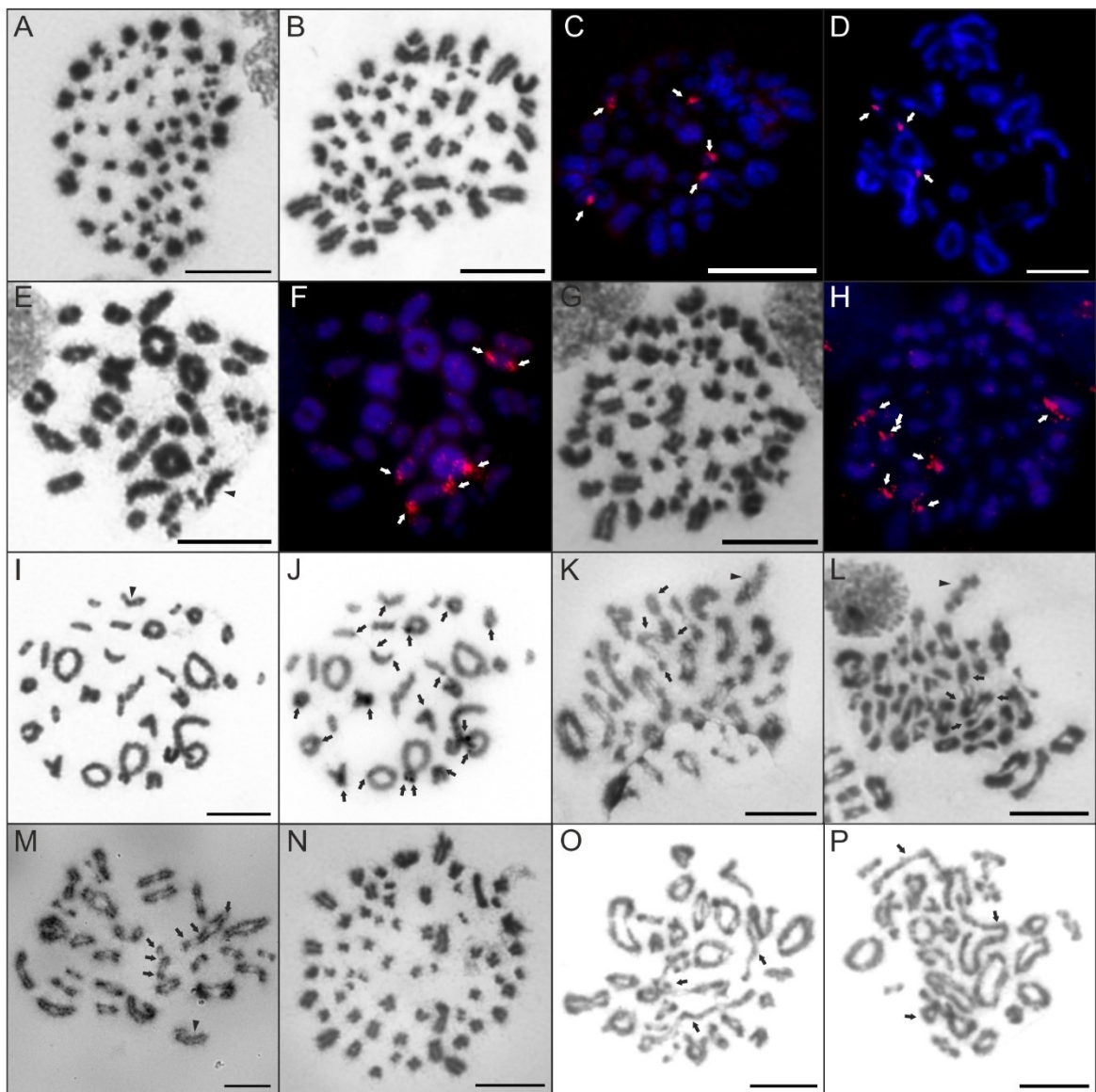
Metodou FISH byly u jedince 2 ( $2n^{\sigma^7}=59$ ) lokalizovány 3 a 5 klastrů 18S rDNA (obr. 36C, D). Klastry se vždy nacházely na koncích krátkých ramének. Počet pěti klastrů byl pozorován na figurách mitotické metafáze. Dva klastry byly lokalizovány na krátkých raménkách velkých chromosomů a tři zbylé na chromosomech náležejících do skupiny menších. Počet tří klastrů byl detekován na figurě metafáze I. Dva klastry jsou na krátkých raménkách největšího subtelocentrického chromosomového páru a poslední zbývající klastr je na jednom chromosomu z bivalentu ze skupiny menších chromosomů. V jádrech spermatocytů II. řádu tohoto jedince (2) byly při metafázi II pozorovány 1, 2 až 3 klastry 18S rDNA. U jedince 4 bylo lokalizováno 6 klastrů 18S rDNA vždy na krátkém raménku chromosomů. Jeden klastr byl pouze na jednom velkém subtelocentrickém chromosomu z bivalentu. Dále se jeden klastr vyskytoval v páru středně velkých chromosomů a další dva klastry byly na dalším páru homologických středně velkých chromosomů. Poslední pár klastrů byl na páru malých chromosomů (viz obr. 36F, H).



Obrázek 34 – Karyogram druhu *Gromphadorhina oblongonota* (jedinec 4)  $2n= 61$ . Měřítka= $10 \mu\text{m}$



Obrázek 35 – Karyogramu druhu *Gromphadorhina oblongonota* čítající 57 chromosomů (jedinec 7). Měřítko=10  $\mu$ m



Obrázek 36 – Chromosomy druhu *Gromphadorhina oblongonota* barvené Giemsou (A, B, E, G, I-P) a po aplikaci FISH se sondou pro 18S rDNA klastr (červený kanál) (C, D, F, H) A: Mitotická metafáze  $2n \sigma^7=61$  (jedinec 4), B: Mitotická

metafáze  $2n\sigma=57$  (jedinec 7), C: Mitotická metafáze s pěti klastry 18S rDNA (bílé šipky) (jedinec 2), C: Metafáze I se třemi klastry 18S rDNA (bílé šipky), E: Metafáze I s vyznačeným X chromosomem (šipka) (jedinec 8), F: Metafáze I s vyznačenými 6 klastry 18S rDNA (bílé šipky) (jedinec 8), G: Mitotická metafáze  $2n\sigma=59$  (jedinec 8), H: Mitotická metafáze s 6 klastry 18S rDNA (bílé šipky), I: Diplotene ( $2n\sigma=61$ ) (jedinec 4), J: Diplotene s vyznačeným konstitutivním heterochromatinem metodou C pruhození (šipky), K, L: „Pre-metafázní protažení“  $2n\sigma=59$  s vyznačenými chromosomy tvořícími tetraivalent a negativně heteropyknotickým chromosomem X (šipky) (jedinec 8), M: „Pre-metafázní protažení“  $2n\sigma=59$  s vyznačenými chromosomy tvořícími dva trivalenty a negativně heteropyknotickým chromosomem X (šipky) (jedinec 5), N: Mitotická metafáze  $2n\sigma=60$  (jedinec 4), O, P: „Pre-metafázní protažení“ chromosomů jedince 7 ( $2n\sigma=57$ ) s vyznačenými třemi multivalenty složených z nejasného počtu chromosomů. Měřítka=10  $\mu\text{m}$

### *Princisia vanwaerebeki* van Herrewege, 1973

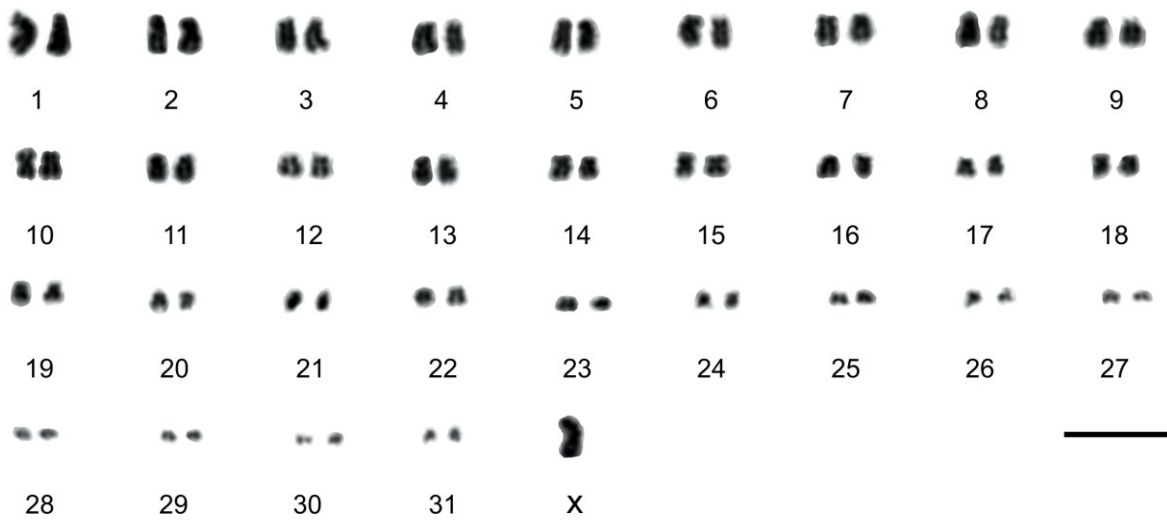
Karyotyp samců druhu *Princisia vanwaerebeki* čítá 63 chromosomů (viz obr. 37 a 38A). První chromosomový pár má relativní velikost 3,47 % a je subtelocentrický. Druhý chromosomový pár je submetacentrický s relativní velikostí 2,95 %. Dále relativní velikost chromosomů postupně klesá až do 31. chromosomového páru s relativní velikostí 0,50 %. Mezi metacentrické chromosomy patří páry: 10, 15, 7, 18. Na pomezí submetacentrického a metacentrického morfologického typu jsou chromosomové páry: 6, 12 a 20. Subtelocentrické jsou páry: 1, 3, 4, 7, 8 a 21. Páry 9 a 16 jsou na pomezí mezi submetacentrickým a subtelocentrickým morfologickým typem. Morfologie párů menších, než je 21. pár, nebyla z důvodu příliš malé velikosti přesněji určena.

Největší je submetacentrický pohlavní chromosom X s relativní délkou 3,78 %. Během samčí diakineze je pozitivně heteropyknotický a vytváří univalent, který je pozorovatelný i během „pre-metafázního protažení“ metafáze I (obr. 38E, D, F).

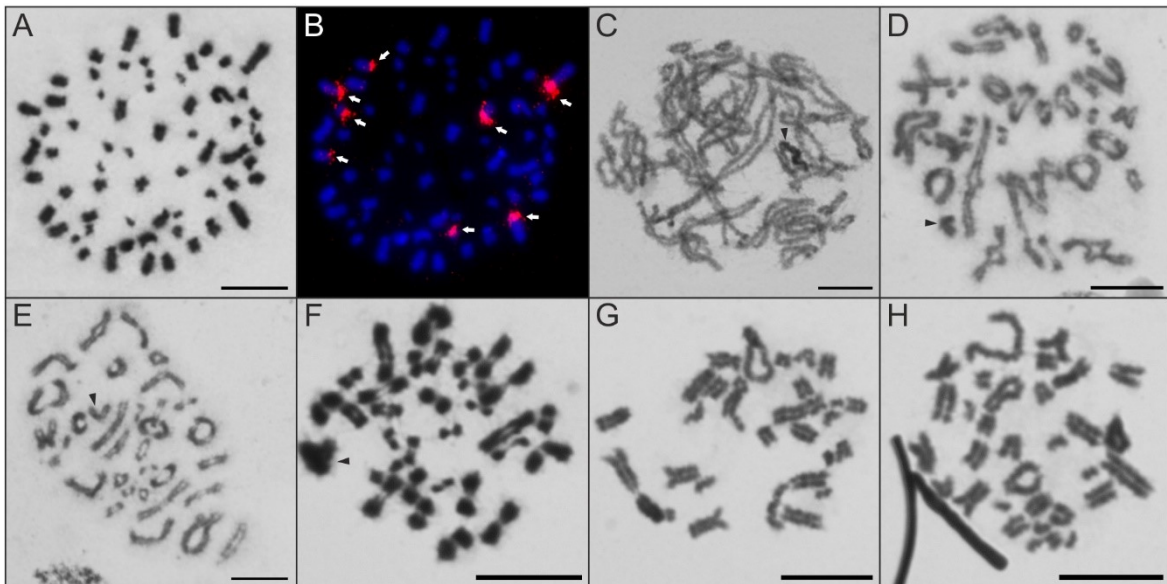
Jeden z chromosomů je během pachytene pozitivně heteropyknotický (obr. 38C). Během diakineze je rozeznatelných 31 bivalentů z nichž 8 bývá velkých a kruhových. Na pěti z těchto kruhových bivalentů jsou viditelná chiasmata na obou raménkách. Zbylých 22 bivalentů je protáhlého liniovitého tvaru a nejspíše tedy vytváří chiasmata pouze na jednom raménku (obr. 38D). Byly pozorovány metafáze II s 31 a 32 chromosomy (obr. 38G, H).

Metodou FISH bylo lokalizováno 8 klastrů 18S rDNA (ve 4 párech) na krátkém raménku největšího chromosomového páru a na krátkých raménkách 2 středně velkých chromosomů, Poslední 2 klastry byly na krátkých raménkách 2 malých chromosomů (viz obr. 38B).





Obrázek 37 – Karyogram samce druhu *Princisia vanwaerebecki* ( $2n_{\text{♂}}=63, X0$ ), sestavený z mitotické metafáze. Měřítko=10 µm



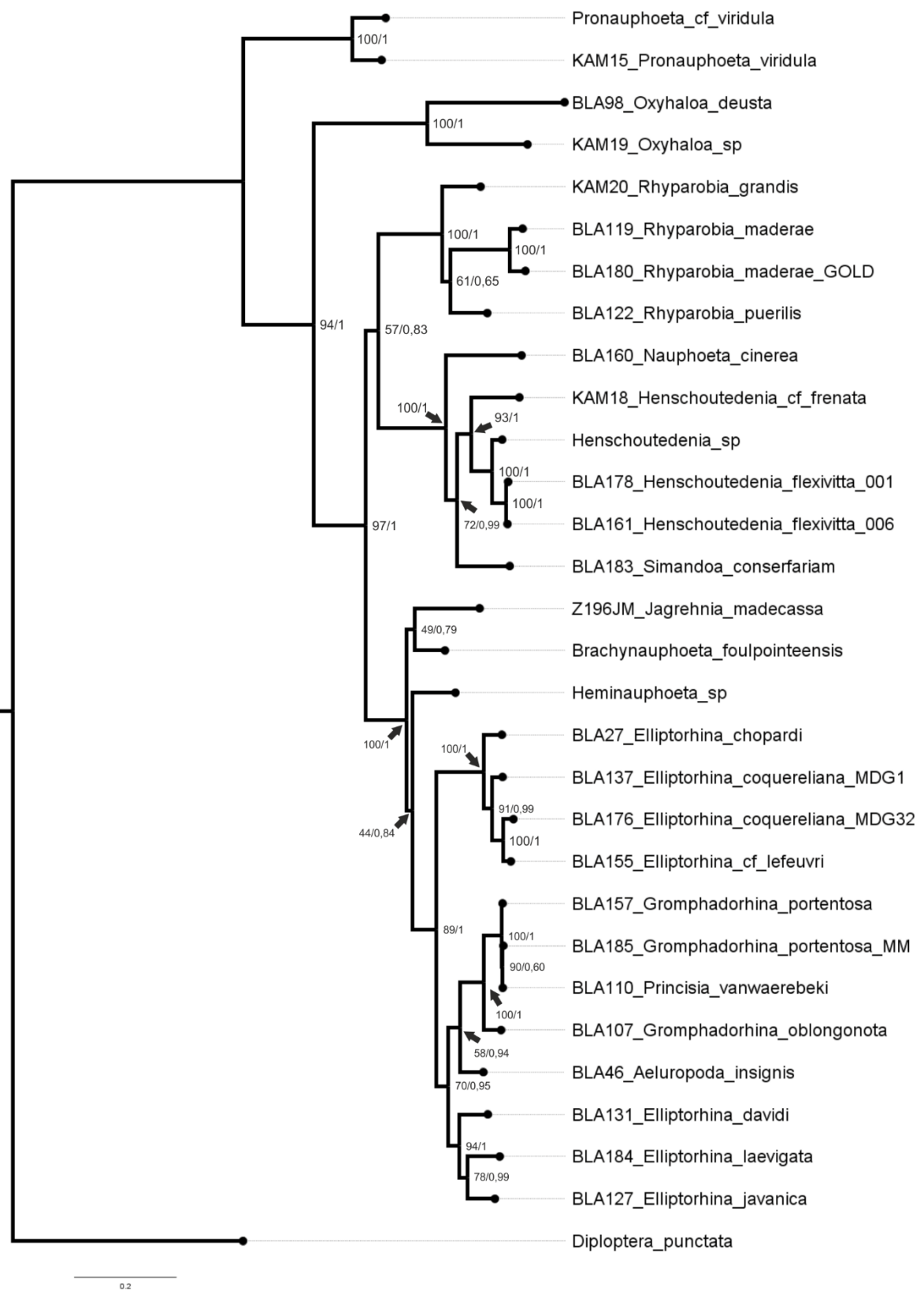
Obrázek 38– Chromosomy samce druhu *Princisia vanwaerebecki* barvené Giemsou (A, C–H) a po aplikaci FISH se sondou pro 18S rDNA klastr (červený kanál) (B). A: mitotická metafáze, B: mitotická metafáze s vyznačenými osmi klastry 18S rDNA (bílé šipky), C: pachytene s vyznačeným pozitivně heteropyknotickým chromosomem X, D, E: „pre-metafázní protažení“ s vyznačeným chromosomem X (šipka), F: metafáze I s vyznačeným chromosomem X (šipka), G: metafáze II ( $n=31$ ), H: metafáze II ( $n=32$ ). Měřítko=10 µm

## Fylogenetické výsledky

Na bázi fylogenetického stromu vygenerovaného metodou Maximum Likelihood (viz obr. 39) se jako první odvětvuje rod *Pronauphoeta*. Druhá linie se dále dělí na dvě monofyletické skupiny (bootstrap=1). První z těchto skupin je tribus Oxyhaloini zastoupený v této analýze dvěma liniemi rodu *Oxyhaloa*. Druhá skupina je tvořena zástupci tribů Nauphoetini a Gromphadorhini. Celou tuto druhou skupinu lze rozdělit do několika dalších separovaných kladů. První z nich je tvořen všemi zkoumanými druhy rodu *Rhyparobia* a je sesterský druhému kladu (bootstrap=0,83) tvořenému rody *Nauphoeta*, *Simaoa* a *Henschoutedenia* s dostatečně podpořenou topologií (bootstrap>0,70):

(*Nauphoeta* (*Simaoa* + *Henschoutedenia*)). Sesterská linie (bootstrap=1) všem těmto rodům tribu Nauphoetini je tvořena třemi rody a tribem Gromphadorhini se vzájemnými vztahy: ((*Brachynauphoeta* + *Jaghrenia*) + (*Heminauphoeta* + *Gromphadorhini*)). Rody *Brachynauphoeta* a *Heminauphoeta* jsou v současné době považovány za *incertae sedis* a rod *Jaghrenia* patří do tribu Nauphoetini. Tribus Gromphadorhini je vynesena jako monofylum. Rod *Elliptorhina* je vynesena jako parafyletický. Druhy *Elliptorhina chopardi*, *E. coquereliana* a *E. lefeuvri*. Vnitřní vztahy této linie: (*E. chopardi* (*E. coquereliana* MDG 1(*E. cf. lefeuvri* + *E. coquereliana* MDG 32))) zasluhují přezkoumání za použití sekvencí z vícera jedinců, jelikož v získané topologii vychází dvě populace *E. coquereliana* jako izolované linie, mezi kterými se odvětčuje druh *E. cf. lefeuvri*. Dále se odvětčuje další linie tvořená druhy rodu *Elliptorhina* s topologií: (*E. davidi* (*E. laevigata* + *E. javanica*)). Sesterskou linii k této tvoří druhy rodů *Aeluropoda*, *Gromphadorhina* a *Princisia* v této topologii: (*Aeluropoda insignis* (*Gromphadorhina oblongonota* (*Gromphadorhina portentosa* populace 1 (*Gromphadorhina portentosa* populace 2 + *Princisia vanwaerebeki*))).

Fylogenetický strom vygenerovaný metodou Bayesovské analýzy měl stejnou topologii jako strom vygenerovaný metodou Maximum Likelihood. Jediná odlišnost byla v podpoře některých větveních.



Obrázek 39 – Fylogenetický strom vygenerovaný metodami Bayesovské analýzy a Maximum Likelihood. Podpory u jednotlivých větvení (nodů) jsou v pořadí: bootstrap/posteriorní pravděpodobnost.



## Diskuse

V této práci byla zjištěna výrazná karyotypová variabilita napříč druhy podčeledi Oxyhaloinae ( $2n♂=23-75$ ). U druhů *Elliptorhina chopardi* ( $2n♂=75$ ), *Gromphadorhina portentosa* ( $2n♂=63$ ), *Nauphoeta cinerea* ( $2n♂=37$ ) a *Rhyarobia maderae* ( $2n♂=23$ ) byly potvrzeny již dříve publikované diploidní počty (Cohen a Roth, 1970). Již na základě těchto dříve publikovaných dat bylo pravděpodobné, že druhy podčeledi Oxyhaloinae se dělí do dvou karyotypově odlišných skupin a výsledky této práce toto potvrzují. První z těchto skupin je reprezentována triby Oxyhaloini a Nauphoetini, které mají karyotyp převážně složen z metacentrických a submetacentrických chromosomů podobných velikostí a maximálním počtem 37 chromosomů u samců druhu *Nauphoeta cinerea*. Výjimkami jsou druhy *Henschoutedenia flexivitta* ( $2n♂=45$ ) a *Simaoa conserfariam* ( $2n♂=69$ ), jejichž karyotyp je tvořen relativně vyššími počty chromosomů a velká část z nich se subtelocentrická. Druhá skupina je tvořena tribem Gromphadorhini ( $2n♂=57-75$ ). Obecný karyotyp tohoto tribu se skládá z relativně vyššího počtu chromosomů ( $2n♂_{\text{modus}}=75$ ,  $2n♂_{\text{průměr}}=66,3$ ), které lze rozdělit do skupiny velkých chromosomů s většinou zřetelnou morfologií, jejichž zastoupení se u jednotlivých druhů příliš nemění, a na druhou skupinu malých chromosomů až mikrochromosomů jejichž početní zastoupení kolísá mezi druhy s rozdílnými ch. počty.

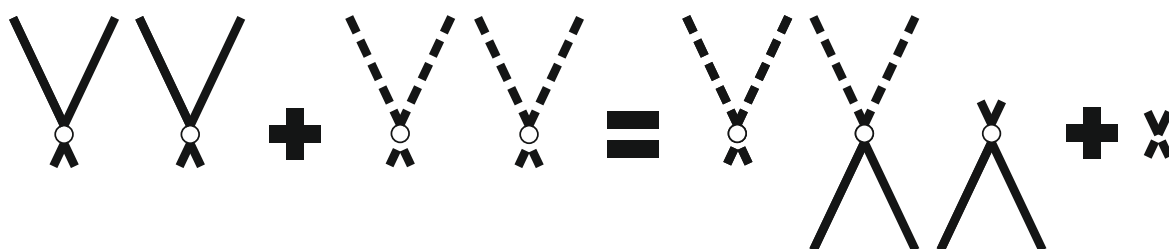
### Vnitrodruhová variabilita počtů chromosomů

Pozorovaná variabilita v počtech chromosomů na intra-individuální a inter-individuální úrovni (*Gromphadorhina oblongonota*, *G. portentosa*) je zapříčiněna chromosomovými přestavbami typu centrické fúze dvou chromosomů s velice krátkým p raménkem nebo Robertsonovské translokace mezi nimi (v praxi nelze tyto pochody většinou odlišit).

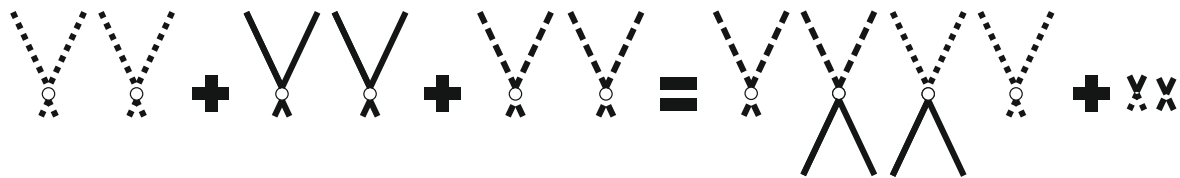
Výsledky druhu *Gromphadorhina portentosa* byly zhotoveny na základě pozorování chromosomů samců tří izolovaných populací. V karyotypu samce druhé populace byly dva unikátní největší chromosomy (metacentrický a submetacentrický), které nebylo možné spárovat na základě velikosti a morfologie s jakýmkoliv jinými chromosomy. Nejpravděpodobněji se jeví scénář jejich vzniku odvozením z karyotypu čítajícího 63 chromosomů pomocí fúze dvou subtelocentrických chromosomů. Není jasné, zda se jednalo o ojedinělé chromosomové přestavby v rámci populace 2, jelikož byl ke studiu poskytnut pouze jeden samec. Zároveň nebyla bohužel pozorována meiosa u tohoto jedince, a tak nebylo možné, jakkoliv pozorovat potenciální trivalenty, jež by vznikly v důsledku zmíněných fúzí. Karyotyp samce ze třetí populace byl stejný jako u první populace ( $2n♂=63$ ) nicméně bylo pozorováno i jedno buněčné jádro se zřetelným počtem 65 chromosomů. Oproti staardnímu karyotypu ( $2n♂=63$ ) se tento lišil v počtu malých chromosomů pod 1,20 % relativní velikosti. Dále se lišil v morfologii 3. chromosomového páru, jenž je u staardního karyotypu

( $2n^{\circ}=63$ ) submetacentrický, zatímco v odvozeném karyotypu ( $2n^{\circ}=65$ ) je subtelocentrický. Rozdílné byly také morfologie 14., 15., 16. a 17. ch. páru. V odvozeném karyotypu byly submetacentrické, zatímco ve staardním subtelocentrické. Tyto rozdíly však mohly vyvstat chybou měření způsobenou nedostatečnou spiralizací těchto chromosomů v měřeném staardním karyotypu. Dva malé chromosomy navyšující diploidní počet na 65 a nejpravděpodobněji vznikly centrickým rozpadem obou chromosomů 3. páru.

Variabilita v počtu chromosomů na inter-individuální úrovni, ale i na intra-individuální úrovni, byla pozorována také u druhu *Gromphadorhina oblongonota*. Mezi jedinci byly pozorovány diploidní chromosomové počty: 57, 59, 60 a 61. Počty 59, 60 a 61 byly pozorovány i mezi buňkami jednoho jedince. Karyotyp s počtem 61 chromosomů byl určen jako staardní, jelikož nebyly během jeho meiotického dělení zaznamenány žádné multivalenty. Karyotypy s nižším počtem chromosomů jsou odvozené mechanismem centrických fúzí nebo Robertsonovskými translokacemi (v praxi často tyto mechanismy často nelze odlišit) mezi malými a mezi středně velkými subtelocentrickými chromosomy. Při mechanismu Robertsonovských translokací by vznikal acentrický fragment, jenž by se v důsledku nenapojení na dělicí vřetenko ztratil ihned po následném buněčném dělení (viz obr. 40). S jevy fúzí či Robertsonovské translokace nejspíše souvisí pozorování multivalentů u dvou zkoumaných jedinců. Konkrétně byly během metafáze I u těchto jedinců pozorovány dva trivalenty, respektive jeden tetravalent v podobě řetězců (viz tab. 7). Morfologii prostředních chromosomů multivalentů se nepodařilo určit, ovšem v souvislosti s poklesem počtu chromosomů na  $2n^{\circ}=59$  u obou těchto karyotypů, se nejpravděpodobněji jeví vznik obou typů multivalentů skrze centrické fúze (viz obr. 40 a 41). U jedince s  $2n^{\circ}=57$  byla pozorována trojice řetězcových multivalentů během „pre-metafázního protažení“ nicméně nebylo možné určit z kolika chromosomů se formují. Nejpravděpodobněji se jeví konfigurace dvou řetězcových trivalentů a řetězcového tetravalentu. Tato kombinace by vyžadovala celkem 4 fúze či Robertsonovské translokace, což je v souladu se snížením počtu chromosomů na 57.



Obrázek 40 – Schéma vzniku trivalentu v důsledku fúze či Robertsonovské translokace. Na pravé straně schématu je vyobrazen acentrický fragment vzniklý v případě Robertsonovské translokace. Homologické úseky genomu jsou vyobrazeny jednotnými styly čar.



Obrázek 41 - Schéma vzniku tetravalentu v důsledku 2 fúzí či 2 Robertsonovských translokací. Na pravé straně schématu jsou vyobrazeny acentrické fragmenty vzniklé v případě Robertsonovských translokací. Homologické úseky genomu jsou vyobrazeny jednotnými styly čar.

Různé karyotypové polymorfismy spojené s chromosomovými přestavbami byly na úrovni mezipopulační ale i vnitropopulační pozorovány i u jiných druhů švábů. Jednalo se o reciproké translokace způsobující formaci již v úvodu zmíněných multivalentů u druhů *Blaberus discoidalis* a *Periplaneta americana* (John a Lewis, 1959; Lewis a John, 1957). U termitů vznikají reciprokými translokacemi multivalenty pohlavních chromosomů (shrnuto v Jankásek, 2017). Chromosomové fúze či Robertsonovské translokace snižují míru rekombinací (v porovnání s populacemi bez ch. fúzí) v pericentrických oblastech a to jak u heterozygotů pro danou chromosomovou fúzi, tak i u homozygotů pro tuto fúzi, u kterých mohou být rekombinace potlačeny relativně více (Dumas a Britton-Davidian, 2002). Zároveň se těmito chromosomovými přestavbami dostávají do nových vazebných skupin alely, jež byly dříve volně segregované (Guerrero a Kirkpatrick, 2014). Tyto alely, které jsou v nové genové vazbě, se mohou lokálně adaptovat ve vzájemném kontextu a získat tak selekční výhodu (Guerrero a Kirkpatrick, 2014). Tato situace byla například zaznamenána u *Drosophila americana* Spencer, 1938 ve formě fúze autosomu a chromosomu X, která se následně stala selekčně výhodnou, jelikož se na autosomu nacházely sexuálně antagonistické geny (McAllister, 2003). To, zda se bude daná chromosomová přestavba v populaci fixovat nebo dále vyskytovat ve formě stabilního polymorfismu a jakou bude mít selekční výhodu, záleží především na frekvenci rekombinací mezi lokálně adaptovanými alelami a místem spoje dvou dříve samostatných chromosomů (Guerrero a Kirkpatrick, 2014). Guerrero a Kirkpatrick (2014) použili ke studiu této problematiky model „mainla-ísla“ tedy model, ve kterém se do „ostrovní“ populace dostává fúze v heterozygotním stavu (z počátku se mutace vyskytuje vždy v tomto stavu) z „pevniny“ s určitou frekvencí, jež vystupovala jako parametr ( $m$ ) společně se zmíněnými frekvencemi rekombinací ( $r_{hA}$  – pro alelu A,  $r_{hB}$  – pro alelu B) a pozitivním vlivem alel ve vazebné skupině na fitness jedince ( $s_A$ , resp.  $s_B$ ). „Migraci“ fúze z pevniny do „ostrovní“ populace, kde se předtím nevyskytovala, si samozřejmě lze představit jako samovolný vznik dané mutace v populaci, kde předtím nebyla. Získaly rovnici pro výpočet selekční výhody chromosomové fúze ( $\lambda$ ):

$$\lambda = m \left( 1 - 2 \frac{r_{hA} r_{hB}}{r_{hA} r_{hB} + s_A s_B} \right)$$

Z tohoto vztahu vyplývá, že s klesající frekvencí rekombinací a rostoucím vlivem alel na fitness (neboli se zvětšujícím se rozdílem mezi těmito veličinami) roste selekční výhoda vazby ( $\lambda$ ). Pověsimněme si, že k dosažení maximální selekční výhody ch. fúze stačí teoreticky, aby rekombinace

neprobíhala vůbec pouze mezi jednou z lokálně adaptovaných alel a bodem fúze ( $r_{hA} = 0$ , resp.  $r_{hB} = 0$ ), a tedy  $\lambda = m$  (Guerrero a Kirkpatrick, 2014). U studovaných populací rodu *Grophadorhina* nebyly však přesně určeny chromosomy, které fúzují, a nelze tedy jednotlivé fúze přesně kategorizovat. Určení počtu jednotlivých typů fúzí bude předmětem následujícího detailněji zaměřeného výzkumu. Je však zřejmé, že u některých, jedinců se vyskytovalo vícero typů fúzí zároveň a u některých žádné. Je možné že pozorovaná variabilita vzniká z následujících důvodů:

- a) Není vyloučené, že sledované chromosomové fúze se v populaci nevyskytují ve formě stabilního polymorfismu, ale namísto toho zanikají a současně opět vznikají. Dané fúze mohou zanikat v důsledku nedostatečné selektivní výhodnosti anebo se jedná o víceméně stochastické jevy na poli neutrální evoluce.
- b) Během centrických chromosomových fúzí se nemění sousled jednotlivých pasáží sekvence DNA, jak tomu je například u inverzí či delecí, a suprese frekvence rekombinací s homologickými chromosomy je spíše zapříčiněna strukturními změnami na struktuře chromosomu vzniklých v důsledku fúze než vzájemnou sekvenční nekompatibilitou (Dumas a Britton-Davidian, 2002). Pravděpodobně tedy nedojde k úplné supresi rekombinace mezi lokálně adaptovanými alelami a výše popsané maximální selekční výhody fúze.
- c) Předpokládám, že dalším důvodem je zjednodušený popis selekční výhody fúze, který uvažuje jen dvě lokálně adaptované alely. V případě takové fúze by se do nové genetické vazebné skupiny (jakéhosi “supergenu“) dostalo pravděpodobně více alel. Mnoho z nich by nemuselo být lokálně adaptovaných a jejich nižší hodnoty selekčních výhod ( $s_X$ ) by mohly snižovat celkovou selekční výhodu pro danou fúzi.
- d) Dalším z důvodů pozorované variability může být meiotický tah, který preferuje chromosomy pouze určité morfologie a může tak rozhodnout i jaký morfologický typ chromosomů bude v karyotypu převládat (de Villena a Sapienza, 2001). V případě tribu *Gromphadorhini* by se tak jednalo o chromosomy s velice krátkým p raménkem (jež v pozorovaných karyotypech dominují) a selekční výhody pozorovaných chromosomových fúzí by tak působily proti meiotickému tahu. Z tohoto protisměrného “tlaku“ by tak mohla vznikat pozorovaná variabilita a dlouhodobé přetrvávání původního nefúzovaného karyotypu i přes selekční výhodu chromosomových fúzí (Guerrero a Kirkpatrick, 2014).

Podrobněji studovanou skupinou v problematice Robertsonovských translokací v souvislostech se supresí vytváření chiasmát v pericentrické oblasti, tělesnou morfologií a biogeografií jsou americká sarančata čeledi Acrididae. *Cornops aquaticum* (Bruner, 1906), *Leptysmia argentina* Bruner, 1906, *Oedaleonotus enigma* (Scudder, 1856) a *Sinipta dalmani* (Stål, 1861). Druh *Dichroplus pratensis* Bruner, 1900 má v rámci svého areálu rozšíření dvě karyotypové rasy. Tyto karyotypové rasy jsou polymorfní pro celkem 8 různých Robertsonovských translokací (které potlačují tvorbu chiasmát v pericentrické oblasti) a setkávají se vytvářející hybridy (Bidau et al., 2012; Colombo, 2013). U

těchto hybridů byl prokázán vliv Rb translokací na fenotyp jedinců, jelikož jejich množství u samců signifikantně pozitivně korelovalo s tělesnou velikostí (Bidau et al., 2012). U druhů *Cornops aquaticum* (Bruner, 1906), *Leptysmma argentina* Bruner, 1906 a *Sinipta dalmani* (Stål, 1861) byla u jedinců s Rb translokacemi také pozorována relativně nižší frekvence chiasmat v pericentrické oblasti zúčastněných chromosomů než u jedinců bez Rb translokací (Colombo, 2008, 1990, 1989; Remis, 1990, 2008). Vliv polymorfismu pro Rb translokace na fenotyp byl pozorován u druhů *Leptysmma argentina*, u kterého koreloval s většími tělesnými rozměry a tento efekt byl navíc aditivně posílen u homozygotů pro Rb translokace (Colombo, 1989) (podobně jako v případě hybridů u druhu *Dichroplus pratensis*). Pozitivní heterózní efekt byl u druhu *Oedaleonotus enigma* naznačen vychýlením od teoreticky očekávané Hardy-Weinbergovi rovnováhy ve prospěch heterozygotů pro příslušné Rb translokace (Colombo, 2013). Naproti tomu na jedince druhu *Sinipta dalmani* mají Rb translokace (zde mezi X chromosomem a autosomem) negativní vliv, jelikož snižovaly frekvenci životaschopných spermií, čímž se pravděpodobně vysvětluje nižší frekvence této Rb translokace v populaci tohoto druhu (Remis, 1993).

Vliv Rb translokací na fenotyp volně žijících populací byl u obratlovců prokázán například u Barcelonské populace myši domácí (*Mus musculus domesticus* Linnaeus, 1758). Tato populace má na rozdíl od okolních populací, jež mají pouze jednoramenné chromosomy, v dospělosti odlišný tvar spodní čelisti v dospělosti, jakožto důsledek mírně odlišných ontogenetických procesů (Martínez-Vargas et al., 2018).

Výše uvedená data potvrzují, že centrická spojení dvou dříve individuálně segregovaných chromosomů mohou vytvářet a především spolehlivěji zachovávat lokálně adaptované úseky v genomu v pericentrických oblastech skrze pozitivní selekci heterozygotů, a vytvářet tak stabilně polymorfnní populace, jak předpokládají matematické modely (např. Guerrero a Kirkpatrick, 2014).

V rámci řádu Blattodea existuje monofyletická skupina, u které podobnými mechanismy také vznikají chromosomové multivalenty, a to v neobyčejně rozvinutých formách a u některých druhů také ve formě intrapopulačního polymorfismu. Touto skupinou jsou, jak již bylo řečeno v kapitole úvodu, termiti (Isoptera). Chromosomové přestavby, které stabilně způsobují formace multivalentů u termitů, se týkají pohlavních chromosomů. Uvnitř čeledi Kalotermitidae se setkáváme s u druhů *Bifiditermes improbus* (Hagen, 1858), *Cryptotermes cynocephalus* Light, 1921, *Cryptotermes domesticus* (Havila, 1898), *Procryptotermes australiensis* Gay, 1976 a *Kalotermes flavicollis* (Fabricius, 1793) se vznikem trivalentů  $X_1Y_1Y_2$  v důsledku fúze původního Y chromosomu s autosomem (Fontana, 1982; Luykx, 1990). U druhu *Cryptotermes brevis* (Walker, 1853) byl v karyotypu samců nalezen trivalent  $X1Y1Y2$  vzniklý fúzí chromosomu X a autosomu (Luykx, 1990). Mnohem častěji však u termitů pozorujeme multivalenty pohlavních chromosomů vzniklé v důsledku reciprokých translokací mezi Y chromosomem a autosomem. Mechanismus vzniku je

analogický vzniku autosomálních multivalentů u inbredních populací švábích druhů *Blaberus discoidalis* a *Periplaneta americana* (John a Lewis, 1959; Lewis a John, 1957) (viz kap. Cytogenetika Blattodea). Jedná se o jiné typy chromosomových přestaveb, než jsou chromosomové fúze, které byly navrženy jakožto příčiny pozorovaných odvozených karyotypů rodu *Gromphadorhina* nebo zmíněných zástupců rovnokřídlého hmyzu, nicméně příčiny jejich fixace či alespoň stabilního přetrvávání v populacích se zdají být podobné.

Jakým způsobem dochází k fixaci chromosomových přestaveb zodpovědných za utváření neo-pohlavních chromosomových systémů v termitích populacích, bylo předmětem studia především 80. a 90. let minulého století. To, zda jsou chromosomové fúze či translokace v heterozygotním stavu fixovány v populaci nebo jsou součástí stabilního genetického polymorfismu populace či jsou úplně eliminovány, záleží především na míře příbuzenského křížení a zda se jedná o přestavby mezi autosomy nebo autosomem a gonosomem (Charlesworth a Wall, 1999). Základním předpokladem je snížená frekvence rekombinací v úsecích chromosomů postihnutých translokací či mezi fúzovaným chromosomem a jeho původními homology (Charlesworth a Wall, 1999), podobně jako bylo pozorováno u například zmíněných druhů sarančat a jak popisuje matematický model Guerrera a Kirkpatricka (2014). Tato snížená frekvence rekombinací poté opět posiluje míru heterozygotity v dané oblasti chromosomů i u inbredních populací, pro které je jinak typická velká míra homozygotity (Charlesworth a Wall, 1999). Odlišnost mezi chromosomovými fúzemi a reciprokými translokacemi nastává v případě homozygotů. Zatímco u fúzí je rekombinace mezi homologickými chromatidami potlačována i u homozygotů (Colombo, 1989; Dumas a Britton-Davidian, 2002.), v případě translokací je předpokládána mnohem větší frekvence rekombinací mezi homologickými chromatidami u homozygotů (Charlesworth a Wall, 1999; Lewis a John, 1957). Z tohoto důvodu je mnohem pravděpodobnější, že se v populaci s reciprokými translokacemi budou trvale vyskytovat pouze ty mezi pohlavními chromosomy a autosomy. Pokud vznikne přestavba (fúze či translokace) typu Y-A (mezi chromosomem Y a autosomem), a dojde tak ke vzniku neo-pohlavních chromosomů, neobjeví se tato chromosomová přestavba nikdy v homozygotním stavu, jelikož původní Y chromosom i neo-Y chromosomy budou přítomné pouze u samců. Pokud dojde ke stejné chromosomové přestavbě ovšem typu X-A (mezi chromosomem X a autosomem), může se tato přestavba objevit v homozygotním stavu u samic, ovšem nikoliv u samců (Charlesworth a Wall, 1999). Z těchto důvodů je pravděpodobnější fixace neo-pohlavních chromosomových systémů vzniklých přestavbami typu Y-A zatímco u typů X-A lze předpokládat jejich výskyt spíše jako prvek stabilního genetického polymorfismu populace (Charlesworth a Wall, 1999). Tato tvrzení nachází podporu v již studovaných termitích karyotypech. Reciprokou translokací mezi chromosomem Y a autosomem vznikl tetraivalent  $X_1X_2Y_1Y_2$  u druhů čeledi Termitidae a některých druhů čeledi Rhinotermitidae (např. Bergamaschi et al., 2007; Vincke a Tilquin, 1978). U tří druhů z těch majících tetraivalent  $X_1X_2Y_1Y_2$  byl pozorován zároveň i chromosomový mechanismus určení pohlaví XX/XY

(Bergamaschi et al., 2007). Tento jev lze vysvětlit ustáleným polymorfismem, ve kterém se stabilně objevují obě varianty nebo v daných populacích stále nedošlo k fixaci systému  $X_1X_2Y_1Y_2$ . Trivalenty  $X_1X_2Y$  vzniklé fúzí typu Y-A byly nalezeny u 6 druhů Kalotermitidae (Fontana, 1982; Luykx, 1990). Trivalent  $X_1Y_1Y_2$  vzniklý fúzí typu X-A byl nalezen pouze u jednoho druhu (Luykx, 1990). Fúzovaný chromosom X je zde metacentrický (Luykx, 1990) a u samic je dvakrát, tím je umožněno alespoň omezené množství rekombinací, a proto tyto mutace do určité míry neposkytují tak vysoký nárůst výhodné heterozygoty genomu v inbredních populacích a jejich pravděpodobnost fixace je menší (Charlesworth a Wall, 1999). Tato pravděpodobnost odpovídá také pouze jedinému nálezu druhu s tímto chromosomovým systémem určení pohlaví.

Zde pozorované chromosomové fúze u rodu *Gromphadorhina* se samozřejmě týkají autosomů a ne pohlavního chromosomu X, jehož submetacentrický morfologický typ znemožňuje jednoduché centrické fúze. Podobnost s termitími společenstvy se ovšem může projevovat právě v inbredním charakteru. Pokusná kolonie rodu *Gromphadorhina* určitě dosahuje po mnoha generacích chovaných v izolaci vyšší míru příbuzenského křížení, a tedy i vyšší genetické podobnosti, která ovšem nebyla v této práci nijak kvantifikována. Zvýšená frekvence výskytu výše zmiňovaných chromosomových přestaveb tak představuje zajímavou plastickou reakci genomu studovaných švábů zmírňující dopad radikálních podmínek.

### Vnitrodruhová dynamika klastrů 18S rDNA

U druhů *G. portentosa*, *G. oblongonota*, *E. coquereliana* a *E. javanica* byla v této práci detekována variabilita v počtu klastrů 18S rDNA buďto na úrovni jednice, mezi jedinci nebo mezi populacemi. Inter-populační variabilita byla pozorována u druhu *G. portentosa*.

U samce populace 1 ( $2n^{\text{♂}}=63$ ) bylo metodou FISH detekováno 8 klastrů 18S rDNA. Z figur metafáze I je patrné, že dva z těchto klastrů, jsou vždy pouze na jednom chromosomu z bivalentu, a jedná se tedy o heterozygotní stav. U populací 2 a 3 byl pozorován počet 7 klastrů 18S rDNA. V jedinci z populace 2 nebyly pozorovány metafáze I, tak nelze určit kolik z nich se vyskytovalo v páru. Samec populace 3 byl heterozygot pro klastř 18S rDNA na páru malých chromosomů. Všechny zmíněné lokusy u všech populací byly vždy na krátkých raménkách subtelocentrických chromosomů. Na základě těchto výsledků je v populaci 1 dle 2. Mendelova zákona nejmenší možný počet klastrů 18S rDNA roven šesti a nejvyšší deseti. U třetí populace je dle stejného principu nejmenší možný počet klastrů 18S rDNA roven 6 a nejvyšší 8. Dále se také nabízí možnost, že heterozygotní stavy, mohou být ve zkoumaných populacích přítomny i v dalších lokusech 18S rRNA a pouze nebyly pozorovány, a že celé rozpětí počtu klastrů může být ve skutečnosti mnohem širší pro celý druh *Gromphadorhina portentosa*. Vzhledem k pozorované variabilitě byla na preparáty ze samce populace 2 aplikována společná FISH se sondami pro 18S rDNA a 28S rDNA klastř. Výsledně bylo lokalizováno 7 klastrů 28S rDNA, které kolokalizovaly s klastřem 18S rDNA. Tyto výsledky naznačují, že ač se v rámci

druhu *Gromphadorhina portentosa* vyskytuje výše popsaná variabilita, 18S rDNA a 28S rDNA stále kolokalizují společně.

Jedině největší pár chromosomů lze označit za homeologický mezi jednotlivými populacemi a výskyt 2 klastrů na něm za konstantní. Vzhledem k pozorované dynamice 18S rDNA nelze značené malé a středně velké chromosomy s jistotou determinovat jako homeologické napříč zkoumanými populacemi. Situaci nadále nezlehčuje jejich morfologická a velikostní podobnost s velkým počtem ostatních chromosomů.

Intra i inter-individuální variabilita v počtu klastrů 18S rDNA byla pozorována u druhu *G. oblongonota*. Na figurách mitotických metafází jedince 2 ( $2n♂=59$ ) (viz tab. 7) bylo detekováno 5 klastrů 18S rDNA. Dva z těchto klastrů byly na přibližně stejně velkých chromosomech střední velikosti a další tři na malých chromosomech. Klastry byly vždy na distální části chromosomu signalizující umístění na p raménku. Na jedné figurě „pre-metafázního protažení“ byly detekovány pouze 3 klastry 18S rDNA. Konkrétně 2 na krátkých raménkách největšího chromosomového páru a 1 na malém ch. páru. U jedince 4 bylo lokalizováno 6 klastrů 18S rDNA. Z figur mitotických metafází je viditelné, že se 1 klastr vyskytuje na krátkém raménku největšího páru chromosomů a zbylých pět klastrů je na krátkých raménkách malých chromosomů. Tyto počty a lokalizace byly dále ověřeny na figurách metafází I. Ty odhalily, že se popisované klastry vyskytovaly po jednom na bivalentu největších chromosomů a na jednom z bivalentů malých chromosomů, zbytek klastrů byl v párech. Dle 2. Mendelova zákona je na základě těchto výsledků nejvyšší možný počet klastrů roven osmi a nejmenší roven čtyřem. Dle třech pozorovaných klastrů u jedince 2 a v doplnění výsledky z pozorování jedince 4 by se však mohlo jevit, že minimální počet klastrů 18S rDNA může klesnout až na jeden (jelikož bez žádného by byl jedinec neživotoschopný). V této souvislosti by bylo potřeba doplnit další výsledky, jelikož ojedinělé pozorování pouze tří klastrů může být artefaktem metody. Stejně jako u předchozího druhu nelze bohužel v tomto případě použít 18S rDNA jako marker k určení homeologických chromosomů mezi jednotlivými jedinci, a ani mezi studovanými druhy rodu *Gromphadorhina*. Důvodem je jejich velká dynamika v rámci genomu, jež se projevuje častou heterozygotností.

Mimo druhy rodu *Gromphadorhina* byla variabilita v počtu 18S rDNA klastrů pozorována také u druhů *Elliptorhina coquereliana* a *E. javanica*. Populace MDG 1 druhu *E. coquereliana* ( $2n♂=71$ ) měla 6 klastrů 18S rDNA na krátkých raménkách, dva z těchto klastrů byly v heterozygotním stavu. Populace MDG 32 ( $2n♂=71$ ) měla oproti tomu 8 klastrů 18S rDNA a 4 z nich byly v heterozygotním stavu. Druh *Elliptorhina javanica* ( $2n♂=73$ ) vykazoval variabilitu v počtu klastrů mezi dvěma jedinci stejné populace. Vyskytovaly se u nich tři páry klastrů nebo dva páry klastrů. U všech ze tří zmíněných druhů byly sekvence 18S rRNA genů vždy lokalizovány na krátkých raménkách. Společně s pozorováními u rodu *Gromphadorhina* nám tyto poznatky sice zamezují spolehlivému



použití 18S rDNA jako markeru k rozpoznávání jinak velice podobných chromosomů, ale napovídají o extenzivní variabilitě a velké dynamice evoluce 18S rDNA klastrů. Konkrétně se jedná o časté změny fyzické pozice v genomu a počtu kopií. Tato pozorování nejsou zdaleka ojedinělá.

Z blíže příbuzných skupin řádu Blattodea byla vnitrodruhová variabilita v počtu 18S rDNA klastrů nalezena například u kobylek rodu *Isophya* (Tettigoniidae). Konkrétně se jednalo o druhy *I. bureschi* Peshev, 1959, *I. rhodopensis* Ramme, 1951 a poddruh *I. rhodopensis/leonore* Kaltenbach, 1965. U prvního z těchto druhů se variabilita pohybovala od 1 do 2 klastrů u druhého od 3 do 5 a u zmíněného poddruhu od 2 do 5 vždy v pericentrické oblasti (Grzywacz et al., 2011). Z obratlovců byla velká intra-populační variabilita v počtu a pozice klastrů 5S rDNA mezi dvěma karyomorfami pozorována u trnoblíkové ryby *Erythrinus erythrinus*. Tyto dvě karyomorfy se lišily počtem i morfologií chromosomů a také počtem (o více jak 20) a lokalizací 5S rDNA klastrů (Cioffi et al., 2010). V karyomorfě, která obsahovala klastrů 5S rDNA byl často na jejich periférii či v nich kolokalizován transposabilní element (TE) *Rex1* (Cioffi et al., 2010). U členovců se na stejných místech vyskytují velice často například TE R1 a R2 (Zhang et al., 2008). Transposabilní elementy se řídí tzv. „concerted evolution“, což znamená že se jejich kopie v genomu navzájem příliš neodlišují. Při pohybu napříč genomem tak vznikají sekvenčně podobná místa a ty mohou nadále umožňovat ektopické rekombinace (Cioffi et al., 2010). Vzhledem k tomu, že některé TE se často vyskytují v blízkosti anebo uvnitř tandemových repetitivních rDNA klastrů, mohou jim umožňovat měnit skrze ektopickou rekombinaci místo v genomu a navyšovat počty kopií (Cioffi et al., 2010). Aktivita TE může být podmíněna genomickým stresem vyvolaným různými faktory prostředí, ve kterém se daný organismus nachází (Symonová et al., 2013). Za těchto stresových podmínek způsobuje aktivita TE v genomu strukturní přestavby v daných populacích a může sloužit jako adaptabilní mechanismus na tyto podmínky (McClintock, 1984). Stresovým faktorem pro populace studované v této práci by mohl být intenzivní inbreeding. Jedná se o dlouhodobé laboratorní anebo původně zájmové chovy, kde se již vystřídal velké množství generací, a ačkoliv nebyla nijak kvantifikována míra příbuzenského křížení, lze ho očekávat velice frekventovaně. V těchto souvislostech by bylo vhodné v budoucí práci aplikovat double-FISH metodu mapující rDNA klastry a zároveň TE, z důvodu ověření jejich možné kolokalizace. Ektopickou rekombinaci mohou podporovat i repetitivní sekvence klasicky lokalizované v oblasti centromery nebo telomer, jež se také řídí modelem „concerted evolution“ (Cazaux et al., 2011). V této práci byla pozice rDNA klastrů vždy právě na těchto místech. U tribu Nauphoetini se vyskytovaly klastry v pericentrické oblasti a jedinou výjimkou byl druh *Nauphoeta cinerea*, kde byly klastry lokalizovány v telomerické oblasti. U druhu *Simaoa conserfariam* a tribu Gromphadorhini byly klastry vždy lokalizovány na krátkém chromosomovém raménku, a tedy vždy v blízkosti telomerických i centromerických repetitivních sekvencí. Ektopická rekombinace mezi těmito segmenty probíhá během polarizace chromosomů

během profáze, která zajišťuje prostorový kontakt centromer i telomer nehomologických chromosomů (Cazaux et al., 2011).

## Fylogeneze Oxyhaloinae

Tato práce obsahuje první molekulárně-fylogenetickou studii detailněji zaměřenou na podčeď Oxyhaloinae. Zároveň zde prezentované fylogenetické analýzy zahrnují doposud největší druhové zastoupení Oxyhaloinae (13 rodů, 24 druhů, 29 taxonů) ve fylogenetické studii. Původní taxonomické členění Oxyhaloinae do tribů je založeno na morfologii samčí subgenitální destičky (Princis, 1960) a L2d a R2 skleritů (Roth, 1971). Již Princis (1960) poukázal na výraznou odlišnost subgenitální destičky rodu *Pronauphoeta* od celého zbytku Oxyhaloinae a na základě těchto analýz se Roth (1971) rozhodl tento rod nepovažovat za člena Oxyhaloinae. Výsledky zde prezentované fylogenetické studie jsou v souladu s touto výraznou morfologickou odlišností pohlavního ústrojí, jelikož je druh *Pronauphoeta viridula* vynesena s maximální podporou (100/1) jakožto sesterský všem ostatním liniím Oxyhaloinae a jedná se o dlouhou a geneticky relativně vzdálenou větev. Legendre et al. (2017) umístili ve své multigenové molekulárně-fylogenetické studii druh *Pronauphoeta cf. viridula* také v pozici sesterské linie všem ostatním členům Oxyhaloinae nicméně s nedostatečnými podporami větvení (50/0.93). Na základě těchto poznatků vyvstává otázka, zda by bylo vhodné vyčlenit rod *Pronauphoeta* do nového samostatného tribu v rámci Oxyhaloinae nebo dokonce do nové podčeďi. Další v pořadí odvětvující se linie (93/1) ve zde prezentované analýze je rod *Oxyhaloa* zastupující tribus Oxyhaloinae, který je tedy sesterský velké skupině obsahující zbylé 2 triby a některé taxony *incertae sedis*. Toto umístění nelze diskutovat v souvislosti s výsledky jiných prací, jelikož se jedná o první zahrnutí monotypického tribu Oxyhaloinae do molekulárně-fylogenetické analýzy. Nicméně i morfologicky je tribus Oxyhaloini podpořen jako ucelená a od ostatních linií Oxyhaloinae odlišná skupina především tvarem subgenitální destičky (Princis, 1960) a genitálního háku (R2) (Roth, 1971).

Zde strukturovaná topologie zbývající a druhově nejbohatší linie Oxyhaloinae přináší nové a zajímavé poznatky. Zřejmě nejvýraznějším zjištěním je parafyletický charakter tribu Nauphoetini v jeho současném vymezení. Tato situace byla v nynější studii odhalena postavením druhu *Jagrehnia madecassa*, jenž je vynesena jako sesterský druhu *Brachynauphoeta foulpointensis* (49/0,79), který je v současné době řazen do Oxyhaloinae *incertae sedis*. Tato dvojice druhů je sesterskou linií uskupení (*Heminauphoeta* + *Gromphadorhini*) s maximálními podporami větvení (100/1) (viz obr. 37). Rod *Jagrehnia* je zde poprvé použit ve studii molekulárně-fylogenetického charakteru. Uvnitř samotného rodu *Jagrehnia* existuje na morfologické úrovni určitá odlišnost genitálního háku (R2) mezi druhy *J. madecassa*, *J. idonea* a zbylými druhy rodu *Jagrehnia* (Roth, 1971). Roth (1971) poukazuje, že kratší a silnější typ genitálního háku u *J. madecassa* a *J. idonea* je více podobný vzezření tohoto skleritu u tribu *Gromphadorhini*, a že odpovídá přechodnému stavu mezi genitálním hákem *Nauphoetini* a *Gromphadorhini*. Druhy *J. madecassa*, *J. idonea* a *J. heydeniana* (ta nebyla

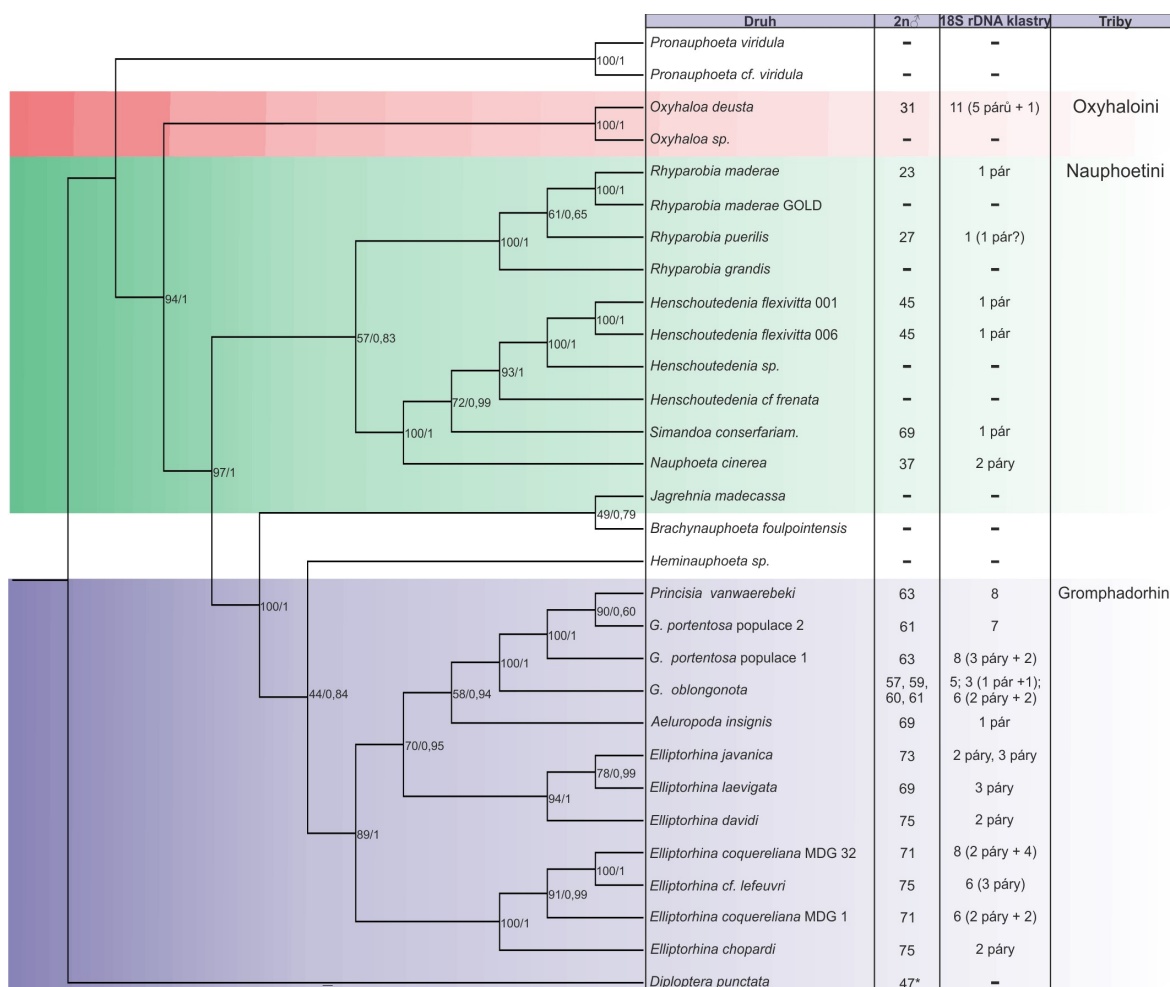
morfologicky studována) jsou navíc, obdobně jako představitelé Gromphadorhini, endemické pro Madagaskar. Naproti tomu, ostatní druhy rodu *Jagrehnia* jsou popsány z kontinentální Afriky (<http://Cockroach.SpeciesFile.org>). Zbýlé zkoumané taxony tribu Nauphoetini vytváří v této studii monofyletickou skupinu, jež je tvořena linií zastoupenou rodem *Rhyparobia* a k ní sesterskou linií zastoupenou rody *Nauphoeta*, *Simandoa* a *Henschoutedenia*. Podpora pro tuto monofyletickou skupinu je nicméně slabá (57/0,83). Ke stejné topologii dospěli i v práci Legendre et al. (2017). V nesouladu je však s topologií: dosažené v práci Bourguignon et al. 2018, která naznačuje, že tribus Nauphoetini by mohl být parafyletický z důvodu postavení rodu *Rhyparobia* jako sesterského ke tribu Gromphadorhini. Neustálená pozice tohoto rodu napříč různými analýzami pravděpodobně tkví v metodickém přístupu. Bourguignon et al. (2018) analyzovali kompletní mitochondriální genomy, zatímco v této a v práci Legendre et al. (2017) byly použity kombinace několika jádrových a mitochondriálních markerů. Pro ověření dosažení rozdílných pozic rodu *Rhyparobia* při zastoupení pouze mitochondriálního nebo jaderného typu markerů v analýzách, jsme provedli výpočty topologií pro jednotlivé typy oddělení. Při použití výhradně mitochondriálních markerů byla odhalena sesterská pozice rodu *Rhyparobia* k tribu Gromphadorhini. Naopak při použití pouze jádrových markerů byla dosažena stejná topologie jako ve zde prezentované multi-genové analýze. Spolehlivější umístění tohoto rodu v topologii evoluce Oxyhaloinae by pravděpodobně mohlo být dosaženo začleněním kontinentálních druhů rodu *Jagrehnia* do fylogenetických analýz. Vůbec poprvé byl v této práci použit pro molekulárně-fylogenetické účely také druh *Simaoa conserfariam*. Jeho pozice byla podpořena (72/0,99) jako sesterská rodu *Henschoutedenia* a dohromady tvoří sesterskou skupinu rodu *Nauphoeta* (100/1). Blízká příbuznost s těmito rody byla předpokládána již v původní popisné práci dle morfologie L2d a R2 skleritů (Roth a Naskrecki, 2004).

Jak již bylo výše zmíněno, před vznikem tribu Gromphadorhini dle jeho současného druhového vymezení, se odvětvuje linie, do které společně patří druhy *Jagrehnia madecassa* a *Brachynauphoeta foulpointeensis* (49/0,79) a poté rod *Heminauphoeta*, který je sesterský k tribu Gromphadorhini (44/0,84) (viz obr. 39). Podpora pro skupinu zahrnující *J. madecassa*, *B. foulpointeensis*, *Heminauphoeta* a Gromphadorhini je stoprocentní (100/1) a všechny tyto druhy jsou rozšířeny na Madagaskaru a přilehlých ostrovech. Je proto možno zvažovat, zdali by tribus Gromphadorhini neměl být rozšířen o tyto druhy. Takováto taxonomická revize by však měla být podpořena i morfologickou revizí, především pak pro vymezení tribů podstatných znaků na genitáliích.

Tribus Gromphadorhini vytváří v této studii monofyletickou skupinu. Tento výsledek je v souladu s ostatními recentními pracemi (Bourguignon et al., 2018; Inward et al., 2007; Legendre et al., 2017). Rod *Elliptorhina* překvapivě vychází jako parafyletický vytvářející dvě oddělené linie. Jedna z těchto linií se odštěpuje na bázi Gromphadorhini (89/1) a nabývá topologie: (*E. chopardi* (*E. coquereliana* MDG1 (*E. coquereliana* MDG32 + *E. cf lefeuvri*))) (viz obr. 39). Pozice druhu *E. cf lefeuvri*, který pochází ze středozápadu Madagaskaru, na rozdíl od obou populací *E. coquereliana*

pocházejících ze severu ostrova se však zdá být diskutabilní. Za účelem ověření, zdali nedošlo ke záměně, či kontaminací vzorků, budou ještě provedeny kontrolní izolace. Druhá linie je tvořena dalšími třemi druhy v topologii: (*E. davidi* (*E. laevigata* + *E. javanica*))). Bourguignon et al. (2018) použili po této práci nejbohatší zastoupení rodu *Elliptorhina* (druhy: *E. chopardi*, *E. davidi*, *E. javanica*). Výsledky této práce jsou v částečném souladu s našimi. Druh *E. chopardi* tvoří linii na bázi tribu Gromphadorhini. Zbylé dva druhy tvoří další v pořadí se odštěpující linii, ale je k nim sesterský druh *Aeluropoda insignis*, avšak s velice nízkou podporou (<0,5 BA). K této druhé linii rodu *Elliptorhina* je dle našich výsledků sesterská skupina tvořená rody *Aeluropoda*, *Gromphadorhina* a *Princisia*. Druh *Aeluropoda insignis* se odvětjuje ihned na bázi této skupiny s nižšími podporami (58/0,94). Tento výsledek společně s prací Bourguignon et al. 2017 naznačují problematické postavení rodu *Aeluropoda*. Zbývající část této skupiny tvoří rod *Gromphadorhina*. Uvnitř druhu *G. portentosa* je však vnořen druh *Princisia vanwaerebeki*. Toto postavení bude v blízké době dále testováno zpracováním genových sekvencí z vícera jedinců z vícero kultur a lokalit náležících do rodů *Gromphadorhina* a *Princisia*

## Karyotypy v kontextu fylogeneze



Obrázek 42 – Kladogram podčeledi Oxyhaloinae získaný metodami Bayesovské analýzy a Maximum Likelihood. U každého uzlu větvení je uvedena podpora v pořadí: bootstrap/posteriorní pravděpodobnost. U každé koncové větve je uveden název druhu. Dále je uveden samčí diploidní počet chromosomů ( $2n^{\♂}$ ), počet klastrů 18S rDNA a zařazení do tribů, jak jsou v současnosti definovány. \*(Cohen a Roth 1970)

Tato práce potvrzuje již dříve určené diploidní počty u druhů *E. brunneri*  $2n^{\♂}=63$  (Cohen a Roth, 1970), *E. chopardi*  $2n^{\♂}=75$  (Cohen a Roth, 1970), *G. portentosa*  $2n^{\♂}=63$  (Cohen a Roth, 1970), *N. cinerea*  $2n^{\♂}=37$  (Cohen a Roth, 1970), *R. maderae*  $2n^{\♂}=23$  (Morse, 1909). Pro druh *G. portentosa* byl zároveň doplněn další diploidní počet chromosomů ( $2n=61$ ). U 11 druhů je karyotyp popsán vůbec poprvé. Zároveň zde byla poprvé aplikována metoda fluorescenční *in situ* hybridizace v řádu Blattodea. Z cytogeneticky studovaných tribů Oxyhaloinae se jako první odvětvuje tribus Oxyhaloini (viz obr. 42) tvořený pouze rodem *Oxyhaloa* čítajícím 10 druhů. Zde studovaný karyotyp druhu *Oxyhaloa deusta* ( $2n^{\♂}=31$ ) je doposud jediným známým, a tak prozatím charakterizuje celý tento tribus.

Karyotyp se skládá ve většině z velkých metacentrických a submetacentrických chromosomů. U dříve se odvětvující linie, rodu *Pronauphoeta*, není bohužel znám karyotyp. Diploidní počet

chromosomů byl stanoven u druhu *Diploptera punctata* ( $2n♂=47$ ) (Cohen a Roth, 1970), jenž patří do podčeledi Diplopterinae, která dle recentních prací tvoří sesterskou linii k Oxyhaloinae (Bourguignon et al., 2018; Evangelista et al., 2019). Dle fotografií předložených Cohenem a Rothem (1970) není karyotyp tohoto druhu podobný karyotypu *Oxyhaloa deusta*, jelikož je v něm zastoupen velký počet akrocentrických chromosomů a mnoho z nich je výrazně menších. Jedná se o vzájemně tak vzdálené skupiny, že se za dobu jejich evoluce mohla nashromáždit řada obtížně vysledovatelných chromosomových mutací. Celkově je karyotyp druhu *Oxyhaloa deusta* nejpodobnější karyotypům druhům rodu *Rhyparobia* (Nauphoetini), ve kterých pozorujeme pouze metacentrické, metacentrické až submetacentrické a submetacentrické chromosomy, relativně velkých rozměrů. Oba druhy rodu *Rhyparobia* se navzájem liší pouze počtem 2 párů chromosomů. Tento rozdíl ale nelze snadno vysvětlit pomocí chromosomových fúzí nebo centrických rozpadů, jelikož se v karyotypu *R. maderae* nevyskytují dostatečně velké páry dvouramenných chromosomů a v karyotypu *R. peurelis* naopak dostatečně malé páry chromosomů jednoramenných. Karyotypy těchto dvou druhů si jsou vzájemně podobné i v lokalizaci 18S rDNA klastrů v pericentrických oblastech, ovšem méně v umístění na konkrétních chromosomech. Druh *R. maderae* má klastry 18S rDNA lokalizované v pericentrické oblasti chromosomového páru 9 (samotná detekce těchto klastrů na mitotické metafázi i metafázi I pomohla určit homologii těchto chromosomů, jelikož vytvářejí heteromorfni chromosomový pár). Naopak u druhu *R. puerilis* se detekovaný klastř nacházel opět v pericentrické oblasti, nýbrž tentokrát na jednom chromosomu prvního páru. U zkoumaného jedince, kde byl tento stav pozorován lze předpokládat sníženou fertilitu z důvodu absence klastru 18S rDNA v jedné chromosomové sadě. Dle 2. Mendelova zákona se ovšem klastry 18S rDNA ve vzorkové populaci vyskytují i v páru. Rozdílné lokalizace klastrů 18S rDNA u dvou druhů rodu *Rhyparobia* lze vysvětlit buďto změnou velikosti daného homeologického chromosomového páru anebo translokací/transpozicí těchto klastrů. U druhu *Oxyhaloa deusta* bylo zjištěno 11 klastrů 18S rDNA také vždy v pericentrických oblastech. Jedná se o nejvyšší počet těchto klastrů v rámci celé podčeledi Oxyhaloinae. Centromerické a telomerické oblasti obsahují velké množství repetitivních DNA sekvencí a právě klastry ribosomální DNA jsou zde také velice často lokalizovány (např. Cazaux et al., 2011). Právě repetitivní charakter sekvencí těchto oblastí má za následek jejich často rychle probíhající evoluci ať už ve smyslu fyzické změny místa v genomu či zmnožení daných repetitivních (Cazaux et al., 2011). Zvýšený počet klastrů ribosomální DNA tribu Oxyhaloini tedy nemusí být nutně projevem dlouhodobě izolované karyotypové evoluce.

Celkově se tedy jeví, že výchozí karyotyp pro podčeleď Oxyhaloinae se skládal ve většině z velkých dvouramenných chromosomů. Od tohoto schématu se ale poté začaly odchylovat nezávisle na sobě dvě různé linie. První z nich je dle zde předložené fylogenetické analýzy sesterská rodu *Rhyparobia* skládá se z druhů *Nauphoeta cinerea*, *Simandoa conserfariam* a *Henschoutedenia flexivitta* (viz obr. 42). Posloupnost větvení uvnitř této linie (viz obr. 42) ilustruje postupný nárůst chromosomů od

druhu *Nauphoeta cinerea* ( $2n\♂=37$ ) přes rod *Henschoutedenia* (jehož karyotyp je reprezentován pouze karyotypem druhu *Henschoutedenia flexivitta*,  $2n\♂=45$ ) až k vyvrcholení v podobě počtu chromosomů u druhu *Simandoa conserfariam* ( $2n\♂=69$ ). Nárůst počtu chromosomů u živých organismů probíhá obecně dvěma různými mechanismy: rozpadem nebo polyploidizací (Gorelick a Olson, 2013). Postupný nárůst počtu subtelocentrických chromosomů s velmi krátkými p raménky v této linii potvrzuje první z těchto možností, nehledě na fakt, že polyploidizační události jsou u živočichů výrazně méně časté než u rostlin (Gorelick a Olson, 2013). V podkapitole Vnitrodruhová variabilita počtu chromosomů je popsáno, proč a za jakých podmínek jsou chromosomové fúze selekčně výhodné. Proč však pozorujeme u některých skupin takto strmý trend v centrických rozpadech chromosomů jako v linii směřující k druhu *S. conserfariam*?

Publikací na toto téma není mnoho v porovnání s centrickými fúzemi. Extenzivní rozpad chromosomů týkající se velké části karyotypu bývá někdy označován za tzv. pseudopolyploidizaci (Gorelick a Olson, 2013). U již zmíněného druhu sarančete *Dichroplus pratensis* byla vnitrodruhová variabilita v počtu chromosomů spjatá nejen s hybridizací dvou karyomorf, ale také s biogeografií jejich biogeografií. Populace těchto karyomorf žijící blíže k centru areálu výskytu měly signifikantně vyšší zastoupení Rb translokací mezi různými chromosomy než populace na úplné periférii areálu, u kterých se tento typ přestaveb prakticky vůbec nevyskytoval a karyotyp byl složen pouze z telocentrických chromosomů (Bidau et al., 2012; Colombo, 2013). U periferních populací byla navíc pozorována vyšší morfologická variabilita než v ustálených populacích uvnitř areálu, pravděpodobně spjatá s výrazně vyšší mírou rekombinace, která klesala směrem do centra areálu tohoto druhu (Bidau a Martí, 2005). Rozložení fúzovaných chromosomů a chromosomů jednoramenných tak odpovídá v populaci tohoto sarančete tzv. „central-marginal“ hypotéze. Tato hypotéza byla rozvíjena během druhé poloviny minulého století studiem populací druhů rodu *Drosophila* v souvislosti s častým výskytem paracentrických inverzí. Říká, že v populaci žijící blíže centru areálu výskytu daného druhu bude větší frekvence různých typů chromosomových přestaveb (v případě rodu *Drosophila* tedy paracentrické inverze) a s tím spjatá vyšší míra heterozygotity. Naproti tomu v populacích na kraji areálu bude frekvence chromosomových přestaveb navyšujících heterozygotitu nižší. Celkově by dle této hypotézy měla být tedy na okraji areálu v populacích vyšší míra rekombinace, která by postupně selekci jen určitých alel populace geneticky značně unifikovala (revidováno v Bidau a Martí, 2002). „Central-marginal“ hypotéza byla vypracována především na studiu paracentrických inverzí, nicméně tento typ přestaveb je podobný Rb translokacím svými důsledky inhibice rekombinací (viz podkapitolu Vnitrodruhová variabilita počtů chromosomů) (Bidau a Martí, 2002). Uniformita morfologie chromosomů a zvýšená frekvence chiasmát u periferních populací populací druhu *Dichroplus pratensis* je tedy v souladu s hypotézou ačkoliv se v tomto případě jedná o Rb translokace (Bidau a Martí, 2002). Jednoramenné chromosomy přítomné u těchto populací zároveň umožňují narušení genetických skupin, které byly výhodné v habitatech

s optimálními podmínkami, a umožňují při jejich segregaci další úroveň vzniku nových kombinací společně k rekombinacím. Vzniká tak adaptační mechanismus na nové a neoptimální podmínky (Bidau et al., 2012; Bidau a Martí, 2002; Gorelick a Olson, 2013).

Tyto výše zmíněné poznatky nám poskytují odpověď na otázku, kdy je výhodné mít chromosomy fragmentované. Vystávají tak dvě možné odpovědi na pozorovanou fragmentaci karyotypu probíhající ve směru *Nauphoeta cinerea* → *Henschoutedenia flexivitta* → *Simandoa conserfariam* (viz obr. 42). První z nich říká, že zkoumané populace druhů *Henschoutedenia flexivitta* a *Simandoa conserfariam* pocházejí ze suboptimálních podmínek pro tyto druhy. Suboptimálními podmínkami by mohlo být prostředí chovu v zajetí, to by ovšem znamenalo vyšší hodnoty inbreedingu a tudíž by se selektivně výhodněji formovaly naopak přestavby typu chromosomových fúzí, inverzí apod. (viz podkapitulu Vnitrodruhová variabilita počtu chromosomů). Dále by tedy suboptimálními podmínkami mohly být přímo podmínky původních lokalit sběru těchto populací. Zkoumané populace druhu *Henschoutedenia flexivitta* pocházejí obě z vnitrozemí Kamerunu, což není pro tento druh okraj areálu výskytu (<http://Cockroach.SpeciesFile.org>). Podmínky by tak musely být spíše lokálně suboptimální. U druhu *Simandoa conserfariam* je situace značně komplikovanější. Tento druh je znám jen z původní lokality popisu, tedy z afrického státu Guinea (8°31'N, 8°54'W) (Roth a Naskrecki, 2004). Jeho jediná známá populace se nacházela cca 1100 m nad mořem v z obou stran otevřené jeskyni. V rámci jeskyně byly jednotlivé agregace švábů čítající 20 až 50 jedinců nalézány vždy jen uvnitř guana tamní kolonie kaloňů druhu *Rousettus aegyptiacus* Geoffroy, 1810, jinak nebyly kdekoliv jinde. Zda žije tento druh u mimo zmíněnou lokalitu není známo (Roth a Naskrecki, 2004). Svým vzezřením *Simandoa conserfariam* nepřipomíná striktně jeskynní druh (Roth a Naskrecki, 2004) a není tedy zcela zřejmé, zda může být nalezena i jinde. Dle IUCN je tento druh považován za vymřelý v divočině v důsledku likvidace původní lokality. U tohoto druhu tedy nelze s jistotou říci, jaký je celý jeho areál rozšíření a vliv suboptimálních podmínek tedy nelze vyloučit. Druhou možnou odpovědí na příčiny vzniku fragmentovaných karyotypů druhů *Henschoutedenia flexivitta* a *Simandoa conserfariam* je, že se jedná o původní stav, který vznikl v populaci jejich předka, která žila v suboptimálních podmínkách, právě třeba na okraji svého areálu.

Tento scénář je velice pravděpodobný i pro vznik karyotypu tribu Gromphadorhini, jenž se skládá převážně ze subtelocentrických chromosomů. Většina z nich připomíná až chromosomy akrocentrické, nicméně použitý plugin Levan tento morfologický typ nevyhodnocuje, a tak jsou synonymizovány se subtelocentrickými chromosomy. Bohužel nejsou známy karyotypy rodů *Jagrehnia*, *Brachynauphoeta* a *Heminauphoeta* (viz obr. 42), jež se odvětvují ve zdejší fylogenetické studii před tribem Gromphadorhini. Odvětvení linie vedoucí k tomuto tribu od linie vedoucí k rodu *Rhyparobia* proběhlo dle datace molekulárních hodin před v době před 55 až 83 mil. let (Bourguignon et al., 2018). K úplnému oddělení Madagaskaru od Afriky došlo mnohem dříve, přibližně před 136 mil. let (Phethean et al., 2016). Z toho vyplývá, že předci dnešních druhů tribu



Gromphadorhini, museli překonat Mosambický průliv. Dle postavení rodů *Jagrehnia*, *Brachynauphoeta* a *Heminauphoeta* v této fylogenetické analýze (viz obr. 42) je zřejmé že studium jejich karyotypu by mohlo lépe ilustrovat průběh fragmentace chromosomů a postupné zmenšování některých z nich, tyto malé chromosomy tvoří poté podstatnou část karyotypů *Gromphadorhini*. Neobyčejně zajímavý by v tomto ohledu mohl být rod *Jagrehnia* jehož zástupci žijí jak v Africe, tak na Madagaskaru (<http://Cockroach.SpeciesFile.org>). Postupnou kolonizaci Madagaskaru by mohl ilustrovat i rod *Brachynauphoeta* jehož jeden druh, *B. mayottensis* (Bruijning, 1947), žije na Komorském ostrově Mayotte a zbytek zástupců jen na Madagaskaru (<http://Cockroach.SpeciesFile.org>). Komorské ostrovy by tak teoreticky mohly představovat migrační koridor Oxyhaloinae z pevninské Afriky na Madagaskar. Toto souostroví je vulkanického původu a jeho formace započala ostrovem Mayotte před více jak 10,58 mil. let a do přibližné dnešní podoby se dostala v době před 0,13 mil. let začátkem vulkanické aktivity ostrova Grand Comore (revidováno v Michon, 2016). Během této cesty se tedy pravděpodobně populace šířících se druhů objevovaly v podmínkách, které nebyly optimální a působily stresově, podobně jako na periferních populace výše zmíněného sarančete *Dichroplus pratensis*. Karyotyp tribu Gromphadorhini ( $2n♂=57-75$ ) je tedy pravděpodobně pozůstatkem fragmentace karyotypu u těchto populací. Výchozím diploidním počtem chromosomů je dle maximální parsimonie 75. Dle zde určené fylogeneze docházelo následně ve všech třech vnitřních liniích tohoto tribu ke zpětné redukci počtu chromosomů (viz obr. 42).

Pro evoluční linii obsahující všechny druhy tribů Nauphoetini i Gromphadorhini je původní 1 nebo 2 páry klastrů 18S rDNA (obě možnosti mají stejný počet minimálních změn v topologii zde prezentované fylogeneze dle maximální parsimonie) v pericentrických oblastech dvouramenných chromosomů. V linii směřující k druhu *Simandoa conserfariam* jsou klastry s výjimkou druhu *Nauphoeta cinerea* lokalizovány na krátkých chromosomových raménkách. *Nauphoeta cinerea* je jediný zde analyzovaný druh, jehož 18S rDNA klastry jsou na chromosomech lokalizovány v telomerické oblasti metacentrických chromosomů. Možné vysvětlení této lokalizace je paracentrická inverze nebo centromerický posun. U druhů *Simandoa conserfariam* a rodu *Henschoutedenia flexivitta* odpovídají distální pozice jejich jediného páru 18S rDNA klastrů rozpadu jednoho páru dvouramenných chromosomů. Pro všechny tři linie v rámci tribu Gromphadorhini se jeví být výchozím počtem klastrů 18S rDNA 1 nebo 2 páry. Ve všech těchto liniích následně dochází nezávisle na sobě k navýšení počtu těchto klastrů ribozomální DNA (viz obr. 42) až na maximální pozorovaný počet osmi klastrů u druhů *G. portentosa*, *P. vanwaerebeki* a *E. coquereliana* (viz obr. 42).

## Průběh meiotického dělení

U většiny zde cytogeneticky analyzovaných druhů byly včasné pachytene pozorovány centralizované bloky heterochromatinu. Zřejmě nejzřetelněji je tento stav prezentován druhem *Oxyhaloa deusta*. Pokud bylo možné lokalizovat pozici těchto bloků na chromosomech, jednalo se vždy o distální části ramének či pericentrické oblasti, což není nikterak překvapivé, neboť právě tyto úseky jsou typické pro repetitivní sekvence tvořící konstitutivní heterochromatin (Cazaux et al., 2011). Tato centra pravděpodobně slouží k podobné funkci, jako chromosomové “bukety“ u řady jiných živočišných druhů, k zaujmutí správné pozice chromosomů bivalentu, produkci dvouvláknových zlomů a tvorbě chiasmat (Blokhina et al., 2019). Po rozpadu těchto chromocenter lze u většiny zde analyzovaných druhů rozpoznat pozitivně heteropyknotický chromosom X. Zřejmě nejzajímavějším prvkem meiotického dělení analyzovaných švábích druhů je tzv. “pre-metafázní protažení“. Tato specifická fáze meiosis je vlastní mnoha druhům kudlanek (Mantodea) (např. Hughes-Schrader, 1953a, 1953b, 1943a, 1943b) ale byla pozorována i u jinak cytogeneticky nepřilíš probádaného řádu strašilek (Phasmatodea) (Hughes-Schrader, 1950) a švábů druhů *Periplaneta americana* a *Blaberus discoidalis* (John a Lewis, 1959; Lewis a John, 1957). Tato fáze, jak napovídá název, probíhá mezi diakinezí a metafází I a je pro ni typická menší spiralizace chromosomů než v metafázi I, ale zároveň probíhá extenzivní rozchod chromosomů bivalentů směrem k pólům dělicího vřeténka, aniž by se bivalenty rozpojily. V minulosti bylo navrženo, že tato fáze napomáhá ke správné prostorové orientaci chromosomů a slouží tak jako preadaptace pro vyváženou segregaci chromosomů multivalentů, jako je například trivalent pohlavních chromosomů  $X_1X_2Y_1$  u kudlanek čeledi Mantidae (John a Lewis, 1959; Lewis a John, 1957). Zbylé fáze meiotického dělení Oxyhaloinae probíhají standardním způsobem.

## Závěr

Díky prozatím nejdetailnější fylogenetické studii švábí podčeledi Oxyhaloinae a doplnění základních cytogenetických dat o 16 druzích z nichž 12 bylo karyotypováno vůbec poprvé, bylo možné odhalit rozsáhlé změny karyotypu této podčeledi v průběhu evoluce. Tyto změny byly dány do kontextu biogeografie jednotlivých vnitřních linií a výsledků již publikovaných studií zaměřených na jiné hmyzí skupiny. Bylo nastíněno vysvětlení vzniku výrazně odlišného karyotypu tribu Gromphadorhini zahrnujícího populární syčivé druhy švábů v kontextu nových poznatků o jejich fylogenetickém umístění pramenících ze zde prezentované fylogenetické hypotézy. K odhalení čistšího obrazu průběhu evoluce a vzniku tohoto tribu jsou nadále potřeba cytogenetické a fylogenetické analýzy se zastoupením vyššího počtu druhů rodů *Jagrehnia*, *Brachynauphoeta* a *Heminauphoeta*, jež na základě zde vypracované fylogenetické analýzy sehrály důležitou roli v kolonizaci Madagaskaru. Dále byla pozorována vnitrodruhová variabilita počtu chromosomů nebo klastrů 18S rDNA u druhů rodu *Gromphadorhina portentosa*, *G. oblongonota*, *Elliptorhina javanica* a *E. coquereliana*. Tato variabilita je přisuzována pozitivní selekci chromosomových fúzí v inbredních populacích na základě matematických modelů a výsledků a řady pozorování v již publikovaných studiích.

## Bibliografie:

- Bai, Q., Wang, L., Wang, Z., Lo, N., Che, Y., 2018. Exploring the diversity of Asian *Cryptocercus* (Blattodea : Cryptocercidae): species delimitation based on chromosome numbers, morphology and molecular analysis. *Invertebr. Syst.* 32, 69.  
<https://doi.org/10.1071/IS17003>
- Beccaloni, G. W. 2014. Cockroach Species File Online. Version 5.0/5.0. World Wide Web electronic publication. <<http://Cockroach.SpeciesFile.org>> [accessed 12 August 2019].
- Bedo, D.G., 1987. Undifferentiated sex chromosomes in *Mastotermes darwiniensis* Froggatt (Isoptera; Mastotermitidae) and the evolution of eusociality in termites. *Genome* 29, 76–79. <https://doi.org/10.1139/g87-013>
- Bergamaschi, S., Dawes-Gromadzki, T.Z., Scali, V., Marini, M., Mantovani, B., 2007a. Karyology, mitochondrial DNA and the phylogeny of Australian termites. *Chromosome Res.* 15, 735–753. <https://doi.org/10.1007/s10577-007-1158-6>
- Bergamaschi, S., Dawes-Gromadzki, T.Z., Scali, V., Marini, M., Mantovani, B., 2007b. Karyology, mitochondrial DNA and the phylogeny of Australian termites. *Chromosome Res.* 15, 735–753. <https://doi.org/10.1007/s10577-007-1158-6>
- Bidau, C.J., Martí, D.A., 2005. Variability along a latitudinal gradient in the chiasma frequency and morphological characters of *Dichroplus pratensis* (Orthoptera: Acrididae). *Eur. J. Entomol.* 102, 1–12. <https://doi.org/10.14411/eje.2005.001>
- Bidau, C.J., Martí, D.A., 2002. Geographic distribution of Robertsonian fusions in *Dichroplus pratensis* (Melanoplinae, Acrididae): the central-marginal hypothesis reanalysed. *Cytogenet. Genome Res.* 96, 66–74. <https://doi.org/10.1159/000063048>
- Bidau, C.J., Miño, C.I., Castillo, E.R., Martí, D.A., 2012. Effects of Abiotic Factors on the Geographic Distribution of Body Size Variation and Chromosomal Polymorphisms in Two Neotropical Grasshopper Species ( *Dichroplus* : Melanoplinae: Acrididae). *Psyche J. Entomol.* 2012, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2012/863947>
- Blokhina, Y.P., Nguyen, A.D., Draper, B.W., Burgess, S.M., 2019. The telomere bouquet is a hub where meiotic double-strand breaks, synapsis, and stable homolog juxtaposition are coordinated in the zebrafish, *Danio rerio*. *PLoS Genet* 15, 1–36.
- Bourguignon, T., Tang, Q., Ho, S.Y.W., Juna, F., Wang, Z., Arab, D.A., Cameron, S.L., Walker, J., Rentz, D., Evans, T.A., Lo, N., 2018. Transoceanic Dispersal and Plate Tectonics Shaped Global Cockroach Distributions: Evidence from Mitochondrial Phylogenomics. *Mol. Biol. Evol.* 35, 970–983. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy013>
- Burnside, C.A., Smith, P.T., Kambhampati, S., 1999. Three New Species of the Wood Roach, *Cryptocercus* (Blattodea: Cryptocercidae), from the Eastern United States. *J. Kans. Entomol. Soc.* 72, 361–378.

- Cazaux, B., Catalan, J., Veyrunes, F., Douzery, E.J., Britton-Davidian, J., 2011. Are ribosomal DNA clusters rearrangement hotspots? A case study in the genus *Mus* (Rodentia, Muridae). *BMC Evol. Biol.* 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-124>
- Charlesworth, B., Wall, J.D., 1999. Inbreeding, heterozygote advantage and the evolution of neo-X and neo-Y sex chromosomes. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 266, 51–56. <https://doi.org/10.1098/rspb.1999.0603>
- Che, Y., Wang, D., Shi, Y., Du, X., Zhao, Y., Lo, N., Wang, Z., 2016. A global molecular phylogeny and timescale of evolution for *Cryptocercus* woodroaches. *Mol. Phylogenet. Evol.* 98, 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.02.005>
- Cioffi, M.B., Martins, C., Bertollo, L.A., 2010. Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish. *BMC Evol. Biol.* 10, 271. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-271>
- Cohen, S., Roth, L.M., 1970. Chromosome Numbers of the Blattaria. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 63, 1520–1547. <https://doi.org/10.1093/aesa/63.6.1520>
- Colombo, P., 2008. Cytogeography of three parallel Robertsonian polymorphisms in the water-hyacinth grasshopper, *Cornops aquaticum* (Orthoptera: Acrididae). *Eur. J. Entomol.* 105, 59–64. <https://doi.org/10.14411/eje.2008.008>
- Colombo, P.C., 2013. Micro-Evolution in Grasshoppers Mediated by Polymorphic Robertsonian Translocations. *J. Insect Sci.* 13, 1–22. <https://doi.org/10.1673/031.013.4301>
- Colombo, P.C., 1990. Effects of Centric Fusions on Chiasma Frequency and Position in *Leptysma Argentina* (Acrididae: Orthoptera). II. Intra- and Interchromosome Effects. *Caryologia* 43, 131–147. <https://doi.org/10.1080/00087114.1990.10796992>
- Colombo, P.C., 1989. Chromosome polymorphisms affecting recombination and exophnotypic traits in *Leptysma argentina* (Orthoptera): a populational survey. *Heredity* 289–299.
- de Villena, F.P.-M., Sapienza, C., 2001. Female Meiosis Drives Karyotypic Evolution in Mammals. *Genetics* 1179–1189.
- Djernaes, M., Klass, K.-D., Picker, M.D., Damgaard, J., 2012. Phylogeny of cockroaches (Insecta, Dictyoptera, Blattodea), with placement of aberrant taxa and exploration of out-group sampling. *Syst. Entomol.* 37, 65–83. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2011.00598.x>
- Dumas, D., Britton-Davidian, J., 2002. Chromosomal Rearrangements and Evolution of Recombination: Comparison of Chiasma Distribution Patterns in Standard and Robertsonian Populations of the House Mouse. *Genet. Soc. Am.* 1355–1366.
- Engel, S.M., Grimaldi, A.D., Krishna., K., 2009. Termites (Isoptera): Their Phylogeny, Classification, and Rise to Ecological Dominance. *Am. Mus. Novit.* 2009, 1. <https://doi.org/10.1206/651.1>

- Evangelista, D.A., Wipfler, B., Béthoux, O., Donath, A., Fujita, M., Kohli, M.K., Legendre, F., Liu, S., Machida, R., Misof, B., Peters, R.S., Podsiadlowski, L., Rust, J., Schuette, K., Tollenaar, W., Ware, J.L., Wappler, T., Zhou, X., Meusemann, K., Simon, S., 2019. An integrative phylogenomic approach illuminates the evolutionary history of cockroaches and termites (Blattodea). *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 286, 20182076. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.2076>
- Fontana, F., 1982. Cytological analysis of the chromosome complement of *Kaloterme flavicollis* fabr. (Isoptera kalotermitidae). The sex determining mechanism. *Cytologia (Tokyo)* 47, 147–152. <https://doi.org/10.1508/cytologia.47.147>
- Gorelick, R., Olson, K., 2013. Polyploidy Is Genetic Hence May Cause Non-Adaptive Radiations, Whereas Pseudopolyploidy Is Genomic Hence May Cause Adaptive Non-Radiations: POLYPLOIDY VS. PSEUDOPOLYPLOIDY. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 320, 286–294. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22499>
- Grzywacz, B., Maryanska-Nadachowska, A., Chobanov, D.P., Karamysheva, T., Warchalowska-Sliwa, E., 2011. Comparative analysis of the location of rDNA in the Palaearctic bushcricket genus *Isophya* (Orthoptera: Tettigoniidae: Phaneropterinae). *Eur. J. Entomol.* 108, 509–517. <https://doi.org/10.14411/eje.2011.066>
- Guerrero, R.F., Kirkpatrick, M., 2014. LOCAL ADAPTATION AND THE EVOLUTION OF CHROMOSOME FUSIONS: CHROMOSOME FUSIONS AND LOCAL ADAPTATION. *Evolution* 68, 2747–2756. <https://doi.org/10.1111/evo.12481>
- Hughes-Schrader, S., 1953a. SUPPLEMENTARY NOTES ON THE CYTO-TAXONOMY OF MANTIDS (ORTHOPTERA: MANTOIDEA). 79–90.
- Hughes-Schrader, S., 1953b. The nuclear content of desoxyribonucleic acid and interspecific relationships in the mantid genus *Liturgousa* (Orthoptera: Mantoidea). *Chromosoma* 5, 544–554. <https://doi.org/10.1007/BF01271501>
- Hughes-Schrader, S., 1943a. Meiosis without chiasmata in diploid and tetraploid spermatocytes of the mantid *Callimantis antillarum* Saussure. *J. Morphol.* 73, 111–141. <https://doi.org/10.1002/jmor.1050730107>
- Hughes-Schrader, S., 1943b. POLARIZATION, KINETOCHORE MOVEMENTS, AND BIVALENT STRUCTURE IN THE MEIOSIS OF MALE MANTIDS. *Biol. Bull.* 85, 265–300. <https://doi.org/10.2307/1538227>
- Husseneder, C., Brandl, R., Epplen, C., Epplen, J.T., Kaib, M., 1999. Within-Colony Relatedness in a Termite Species: Genetic Roads to Eusociality? *Behaviour* 136, 1045–1063.
- Inward, D., Beccaloni, G., Eggleton, P., 2007. Death of an order: a comprehensive molecular phylogenetic study confirms that termites are eusocial cockroaches. *Biol. Lett.* 3, 331–335. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2007.0102>

- Jankásek, M. Karyotypová evoluce skupiny Dictyoptera. Praha, 2017. Bakalářská práce. Univerzita Karlova. Přírodovědecká fakulta.
- John, B., Lewis, K.R., 1959. SELECTION FOR INTERCHANGE HETEROZYGOSITY IN AN INBRED CULTURE OF *BLABERUS DISCOIDALIS* (SERVILLE). *Genetics* 1–11.
- Katoh, K., Rozewicki, J., Yamada, K.D., 2017. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinform.*  
<https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>
- Legendre, F., Grandcolas, P., Thouzé, F., 2017. Molecular phylogeny of Blaberidae (Dictyoptera, Blattodea) with implications for taxonomy and evolutionary studies. *Eur. J. Taxon.*  
<https://doi.org/10.5852/ejt.2017.291>
- Lewis, K.R., John, B., 1957. STUDIES ON *PERIPLANETA AMERICANA* II. INTERCHANGE HETEROZYGOSITY IN ISOLATED POPULATIONS. *Heredity* 11–22.
- Lo, N., Tong, K.J., Rose, H.A., Ho, S.Y.W., Beninati, T., Low, D.L.T., Matsumoto, T., Maekawa, K., 2016. Multiple evolutionary origins of Australian soil-burrowing cockroaches driven by climate change in the Neogene. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 283, 20152869.  
<https://doi.org/10.1098/rspb.2015.2869>
- Luykx, P., 1990. A cytogenetic survey of 25 species of lower termites from Australia. *Genome* 33, 80–88. <https://doi.org/10.1139/g90-013>
- Luykx, P., 1983. XO:XX Sex Chromosomes and Robertsonian Variation in the Autosomes of the Wood-Roach *Cryptocercus punctulatus* (Dictyoptera: Blattaria: Cryptocercidae)1. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 76, 518–522. <https://doi.org/10.1093/aesa/76.3.518>
- Martínez-Vargas, J., Muñoz-Muñoz, F., López-Fuster, M.J., Cubo, J., Ventura, J., 2018. Multimethod Approach to the Early Postnatal Growth of the Mandible in Mice from a Zone of Robertsonian Polymorphism: POSTNATAL MANDIBLE GROWTH IN WILD HOUSE MICE. *Anat. Rec.* 301, 1360–1381. <https://doi.org/10.1002/ar.23835>
- Martins, V.G., Mesa, A., 1995. Two permanent linear chains of sex chromosomes in *Neotermes fulvescens* and karyotypes of two other neotropical Kalotermitidae species (Insecta, Isoptera). *Genome* 38, 958–967. <https://doi.org/10.1139/g95-126>
- McAllister, B.F., 2003. Sequence Differentiation Associated With an Inversion on the Neo-X Chromosome of *Drosophila americana*. *Genet. Soc. Am.* 3, 1317–1328.
- McClintock, B., 1984. The significance of responses of the genome to challenge. *Science* 226, 792–801. <https://doi.org/10.1126/science.15739260>
- Michon, L., 2016. The Volcanism of the Comoros Archipelago Integrated at a Regional Scale, in: Bachelery, P., Lenat, J.-F., Di Muro, A., Michon, L. (Eds.), *Active Volcanoes of the Southwest Indian Ocean*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 333–344.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-642-31395-0\\_21](https://doi.org/10.1007/978-3-642-31395-0_21)

- Phethean, J.J.J., Kalnins, L.M., van Hunen, J., Biffi, P.G., Davies, R.J., McCaffrey, K.J.W., 2016. Madagascar's escape from Africa: A high-resolution plate reconstruction for the Western Somali Basin and implications for supercontinent dispersal: MADAGASCAR'S ESCAPE FROM AFRICA. *Geochem. Geophys. Geosystems* 17, 5036–5055. <https://doi.org/10.1002/2016GC006624>
- Princis, K., 1960. Zur systematik der Blattarien. *Eos*. 36, 1–29
- Rambaut, A. (2019): FigTree v 1.4.4. Available in <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Remis, M., 1990. Cytogenetic studies in *Sinipta dalmani* Stal (Orthoptera: Acrididae). II. Effects of centric fusions on chiasma frequency and distribution. *Genet. Sel. Evol.* 263–272.
- Remis, M.I., 2008. Chromosome polymorphisms in natural populations of the South American grasshopper *Sinipta dalmani*. *Genet. Mol. Biol.* 31, 42–48. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572008000100009>
- Remis, M.I., 1993. Effects of chromosome rearrangements on sperm formation in *Sinipta dalmani* (Orthoptera: Acrididae). *Caryologia* 46, 321–328. <https://doi.org/10.1080/00087114.1993.10797272>
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Syst. Biol.* 61, 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Roth, L.M., The male genitalia of Blattaria. VI. Blaberidae: Oxyhaloinae. *Psyche*. 78: 84–106.
- Roth, L.M., Naskrecki, P., 2004. A new genus and species of cave cockroach (Blaberidae: Oxyhaloinae) from Guinea, West Africa. *J. Orthoptera Res.* 13, 57–61. [https://doi.org/10.1665/1082-6467\(2004\)013\[0057:ANGASO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1665/1082-6467(2004)013[0057:ANGASO]2.0.CO;2)
- Sakamoto, Y., Zacaro, A. A., 2009. LEVAN, an ImajeJ plugin for morphological cytogenetic analysis of mitotic and meiotic chromosomes. Initial version. An open source Java plugin distributed over the Internet from <http://rsbweb.nih.gov/ij/>
- Silvestro, D., Michalak, I., 2012. raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Org. Divers. Evol.* 12, 335–337. <https://doi.org/10.1007/s13127-011-0056-0>
- Stamatakis, A., 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30, 1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- Sumner, A.T., 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 75, 304–306. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(72\)90558-7](https://doi.org/10.1016/0014-4827(72)90558-7)
- Symonová, R., Majtánová, Z., Sember, A., Staaks, G.B., Bohlen, J., Freyhof, J., Rábová, M., Ráb, P., 2013. Genome differentiation in a species pair of coregonine fishes: an extremely rapid



- speciation driven by stress-activated retrotransposons mediating extensive ribosomal DNA multiplications. *BMC Evol. Biol.* 13, 42. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-42>
- Traut, W., 1976. Pachytene mapping in the female silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera). *Chromosoma* 58, 275–284. <https://doi.org/10.1007/BF00292094>
- Vincke 1974.pdf, n.d.
- Vincke, P.P., Tilquin, J.P., 1978. A sex-linked ring quadrivalent in Termitidae (Isoptera). *Chromosoma* 67, 151–156. <https://doi.org/10.1007/BF00293172>
- White, M.J.D., Webb, G.C., 1976. Blattodea, Mantodea, Isoptera, Grylloblattodea, Phasmatodea, Dermaptera, and Embioptera, Animal cytogenetics ; Insecta. Gebr. Borntraeger, Berlin.
- Zhang, X., Eickbush, M.T., Eickbush, T.H., 2008. Role of Recombination in the Long-Term Retention of Transposable Elements in rRNA Gene Loci. *Genetics* 180, 1617–1626. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.093716>