

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Zoologie



Bc. Jaroslava Javůrková

Průtoková cytometrie v biosystematice hmyzu

Flow cytometry in insects biosystematics

diplomová práce

Školitel: Mgr. Petr Šípek, Ph.D.

Praha, 2023

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

V Praze 27.04.2023

Jaroslava Javůrková

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Mgr. Petru Šípkovi, Ph.D. za odborný dohled a zpětnou vazbu při realizaci této diplomové práce a za možnost rozšířit si obzory během setkání s nejedním exotickým druhem. Velký dík patří Ing. Hance Šípkové, Ph.D. za pomoc s měřením vzorků a doufejme úspěšné snaze předat cytometrické know-how. Děkuji rovněž Mgr. Ondřeji Kouklíkovi za všechen materiál získaný terénním sběrem. Poděkování patří také Mgr. Tomáši Urfusovi, Ph.D. za cenné konzultace a podporu.

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

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

Závěrem ze srdce děkuji mému milému Tomulovi, jehož obdivuhodná trpělivost a motivace mě dokázala posunout až k cíli.

Abstrakt

Velikost genomu neboli obsah DNA v gametických buňkách organismů je vyjadřována pomocí C-hodnoty udávající počet párů nukleových bazí v jednotkách *Mpb* nebo hmotnost DNA v jednotkách *pg*. Jednoduchou metodou využívanou mimo jiné pro zjištění velikosti genomu je průtoková cytometrie, která se v posledních letech těší velké oblibě zejména mezi botaniky. Studium hmyzu je v tomto směru upozaděno s ohledem na počet popsanych druhů čítající více než jeden milion ve srovnání s počtem druhů, jejichž velikost genomu je známá u pouhých stovek z nich. Tato diplomová práce si proto klade za cíl rozšířit dataset o velikosti genomů zástupců skupiny Polyneoptera, porovnat zjištěné údaje v rámci jednotlivých řádů a pomoci tak pochopit vazby velikosti genomu na evoluci a ekologii hmyzu.

Tato práce poskytuje informace o velikosti genomu osmdesáti druhů hmyzu skupiny Polyneoptera. Výsledky ukázaly na doposud největší změřený genom u hmyzu – saranče *Dictyophorus griseus* (149,33 *pg*), jehož velikost genomu několikanásobně převyšuje doposud publikované výsledky.

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

Abstract

The size of the genome, in other words the content of DNA in the gametic cells of organisms, is expressed using the C-value indicating the number of nuclear base pairs in units of *Mpb* or the mass of DNA in units of *pg*. A simple method used, among other things, to determine the size of the genome is flow cytometry, which in recent years has been very popular, especially among botanists. The study of insects is lagging behind in regard to the number of described species of insect numbering more than one million in comparison to the number of species whose genome size is known (only a few hundred of them). This diploma thesis therefore aims to expand the dataset on the size of the genomes of representatives of the Polyneoptera group, to compare the data found within individual orders and to help understand the links of genome size to the evolution and ecology of insects.

This work provides genome size information for eighty species of insects of the Polyneoptera group. The results showed the largest insect genome measured so far - the locust *Dictyophorus griseus* (149.33 *pg*), whose genome size exceeds the previously published results by several times.

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

Obsah

Seznam obrázků, tabulek a grafů	9
1 Úvod.....	11
1.1 Velikost genomu.....	11
1.2 Průtoková cytometrie.....	14
1.2.1 Příprava vzorků	16
1.2.2 Standardy.....	16
1.2.3 Animal Genome Size Database	20
1.2.4 Využití průtokové cytometrie.....	20
1.3 Polyneoptera	22
1.3.1 Škvoři (Dermaptera).....	25
1.3.2 Orthopteroidní komplex („Orthopteroidea“).	27
1.3.2.1 Snovatky (Embioptera)	27
1.3.2.2 Strašilky (Phasmatodea).....	28
1.3.2.3 Rovnokřídli (Orthoptera)	28
1.3.2.4 Blattopteroidní komplex (Dictyoptera).....	29
2 Cíle práce	31
3 Metodika	32
3.1 Materiál a jeho příprava.....	32
3.2 Vyhodnocení analýz	34
4 Výsledky	36
4.1 Škvoři (Dermaptera).....	36
4.2 Snovatky (Embioptera).....	37
4.3 Strašilky (Phasmatodea)	37
4.4 Rovnokřídli (Orthoptera).....	43
4.5 Kudlanky (Mantodea).....	50
4.6 Termiti (Isoptera).....	50
5 Diskuse.....	51
5.1 Rozdíly mezi pohlavími a jejich determinace	51
5.2 Velikosti genomů napříč Polyneoptera.....	54
5.2.1 Škvoři (Dermaptera).....	54
5.2.2 Snovatky (Embioptera).....	54
5.2.3 Strašilky (Phasmatodea)	55
5.2.4 Rovnokřídli (Orthoptera).....	56

5.2.4.1 Kobyšky (Ensifera).....	59
5.2.4.2 Saranče (Caelifera).....	60
5.2.5 Kudlanky (Mantodea).....	62
5.2.6 Termiti (Isoptera).....	62
5.3 Negativa průtokové cytometrie	64
5.3.1 Názvosloví	64
5.3.2 Standardy	64
6 Závěr	66
Seznam použité literatury	67

Seznam obrázků, tabulek a grafů

- Obrázek č. 1 – schéma průtokového cytometru
- Obrázek č. 2 – schéma artikulace křídel skupiny Neoptera
- Obrázek č. 3 – kladogram příbuzenských vztahů v rámci skupiny Polyneoptera
- Obrázek č. 4 – *Forficula smyrnensis*, samec (A), samice (B)
- Obrázek č. 5 – histogram z průtokového cytometru: analýza velikosti genomu samce strašilky *Sungaya inexpectata*, standard *Pisum sativum*
- Obrázek č. 6 – *Heteropteryx dilatata*
- Obrázek č. 7 – *Zonocerus elegans*
- Obrázek č. 8 – *Phymateus leprosus*
- Obrázek č. 9 – *Dictyophorus spumans*
- Obrázek č. 10 – *Dictyophorus griseus*
- Tabulka č. 1 – rostlinné standardy a jejich 2C-hodnoty
- Tabulka č. 2 – živočišné, respektive nerostlinné standardy a jejich 2C-hodnoty
- Tabulka č. 3 – 2C-hodnoty použitých standardů
- Tabulka č. 4 – velikost genomu měřených jedinců řádu Dermaptera
- Tabulka č. 5 – velikost genomu měřených jedinců řádu Embioptera
- Tabulka č. 6 – velikost genomu měřených jedinců řádu Phasmatodea
- Tabulka č. 7 – velikost genomu *Heteropteryx dilatata*
- Tabulka č. 8 – velikost genomu *Medauroidea extradentata*
- Tabulka č. 9 – velikost genomu *Sungaya inexpectata*
- Tabulka č. 10 – velikost genomu měřených jedinců řádu Orthoptera
- Legenda k tabulce č. 10
- Tabulka č. 11 – velikost genomu *Locusta migratoria*
- Tabulka č. 12 – velikost genomu měřených jedinců řádu Mantodea
- Tabulka č. 13 – velikost genomu měřených jedinců rodu *Reticulitermes*
- Tabulka č. 14 – rozdíl ve velikostech genomů mezi pohlavími
- Tabulka č. 15 – výčet jedinců velkých genomů
- Graf č. 1 – velikosti genomů v řádu Dermaptera
- Graf č. 2 – velikosti genomů v řádu Embioptera
- Graf č. 3 – velikost genomů podřádů Caelifera a Ensifera
- Graf č. 4 – velikosti genomů podřádů Caelifera dle příslušnosti k čeledi
- Graf č. 5 – velikosti genomů podřádů Ensifera dle příslušnosti k čeledi
- Graf č. 6 – velikosti genomů podřádů Mantodea

1 Úvod

1.1 Velikost genomu

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

Zajímavým fenoménem, jež se sestává z mnoha dílčích otázek, na něž nebylo doposud uspokojivě odpovězeno, je tzv. C-value paradox (Thomas, 1971, Gregory, 2001), později též C-value enigma (Gregory, 2001, Doležel et al., 2010). Tento jev spočívá v tom, že množství DNA obsažené v haploidním genomu neodpovídá komplexitě daného organismu (Thomas, 1971, Pagel et al., 1992). Příkladem může posloužit člověk a jeho 2C-hodnota 6,5 *pg* (Doležel et al., 2003) ve srovnání dostupnými údaji o některých zástupcích skupiny Orthoptera, kde 2C-hodnota dosahuje více než pětinasobku, a sice jmenovat můžeme druhy *Stauroderus scalaris* s 2C-hodnotou 32,68 *pg* nebo *Podisma pedestris* s 2C-hodnotou 33,86 *pg* (Gregory, 2022). Jaderná DNA obsahuje rozličné množství repetitivních a nekódujících sekvencí s notnou variabilitou mezi jednotlivými organismy, což může být jedním z důvodů takto výrazně odlišných C-hodnot. Otázkou však nadále zůstává, proč buňky některých organismů obsahují větší množství nekódující DNA a jaký má její přítomnost vliv na daný organismus (Gregory, 2001). Současné poznání rovněž ukazuje existenci pozitivní korelace mezi velikostí buňky a velikostí genomu, jak někteří autoři demonstrují ve svých výzkumech – ať už na členovcích či jiných bezobratlých (Gregory et al., 2000), obratlovcích (Gregory, 2001), člověku (Gillooly et al., 2015) nebo rostlinách (Beaulieu et al., 2008).

Dle Tafta (2007) je zřejmě nejvýznamnější proměnnou při stanovování C-hodnoty polyploidie, která bývá častým důvodem zvětšení genomu. Buňky polyploidních jedinců, oproti buňkám diploidních příbuzných, které nesou dvě chromozomové sady, obsahují jednotky až desítky kopií téhož chromozomu. Proces polyploidizace byl klíčový zejména v evoluci rostlin (Wendel, 2000, Suda, 2007). Ačkoliv je polyploidie doménou rostlin, svou roli sehrála v evoluci také u obratlovců (Gregory, 2005). Zřídka nalezneme polyploidy mezi savci (Svartman, 2005), poměrně častá je pak u obojživelníků (Gregory, 2005) či ryb (Beçak & Kobashi, 2004). Polyploidní jedince nacházíme rovněž mezi koryši či hmyzem (Lokki & Saura, 1980, Otto & Whitton, 2000). Znalost polyploidie může pomoci objasnit taxonomickou příslušnost (Suda, 2007), avšak po polyploidizační události obvykle následně dochází k redukci a ztrátě některých genů (Wendel, 2000). Tato zpětná redukce může situaci zkomplikovat zejména u paleopolyploidů, jejichž genomy působí jako diploidní (Wolfe, 2001).

Současné poznání ukazuje obrovské rozdíly ve velikostech genomů nejen napříč jednotlivými skupinami hmyzu, ale vysokou variabilitu vykazují i výsledky mezi druhy v rámci jedné linie či dokonce mezi pohlavími nebo životními stadii jednoho druhu. Pro ilustraci lze uvést například velikost genomu některých druhů v rámci skupin Hymenoptera či Diptera, kde se v současnosti nejnižší naměřené 2C-hodnoty dostupné v Animal Genome Size Database pohybují v rozmezí 0,14 až 0,20 pg, největší pak do hodnoty 2,76 pg. Naopak největší dosud naměřenou hmyzí 2C-hodnotou 32,68 pg uvedenou v databázi se pyšní saranče modronohá (*Podisma perestris*), nositelem nejnižší hodnoty v rámci skupiny Orthoptera 3,42 pg je pak cvrčivec sněžný (*Oecanthus niveus*). Pomyslný rekordman byl nedávno překonán nově publikovanou studií, ve které byl naměřen největší hmyzí genom o velikosti 2C-hodnoty 43,92 pg u druhu *Bryodemella tuberculatum* (Hawlitschek et al., 2023). Dosavadní výsledky v rámci pilotní studie v laboratoři průtokové cytometrie na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy však ukazují, že rozdíly jsou mnohem větší.

V počátcích výzkumu velikosti genomu byla aplikována například fluorometrická analýza (Hinegardner, 1971) či principy reasociační kinetiky (Palmer, 1994), postupem času začala převažovat zejména denzitometrie. Mezi další metody stanovení velikosti genomu patří například kvantitativní polymerázová řetězová reakce neboli qPCR (Gregory et al., 2013), mikrospektrofotometrie (Sessions, & Larson, 1987, Jimenez et al., 2010) Principem denzitometrického měření velikosti genomu je roztěr tkáně

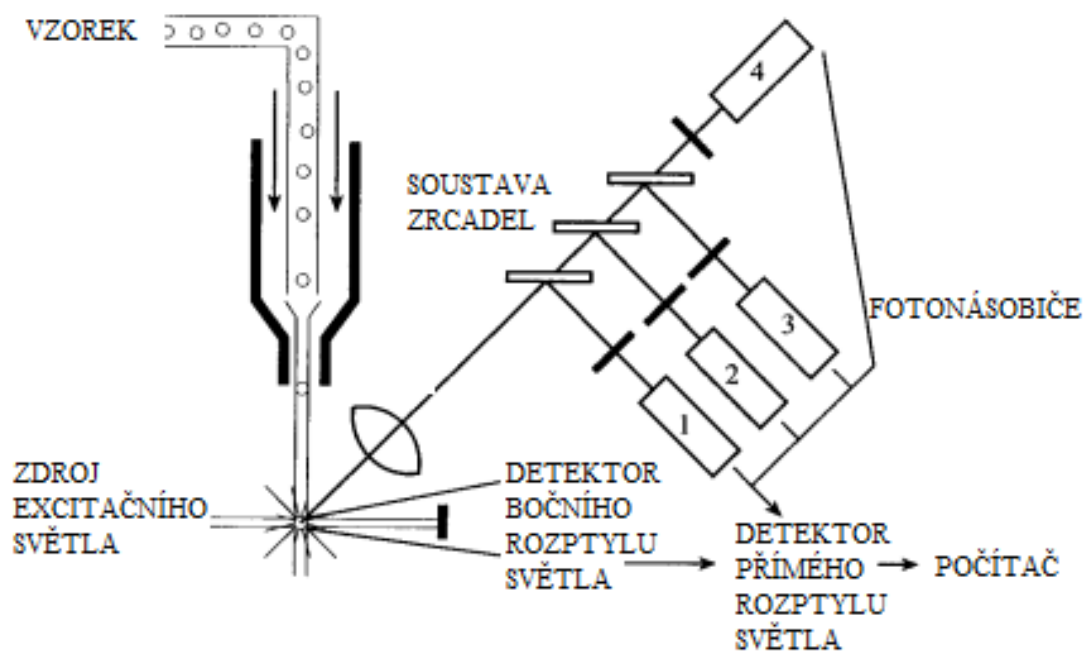
studovaného organismu na sklíčko a za pomoci Feulgenovy reakce je vzorek připravován k mikroskopické analýze. Feulgenovo barvení zahrnuje fixaci vzorku, jeho hydrolyzaci kyselinou chlorovodíkovou a barvení Schiffovým činidlem. Následně je stanovena a porovnána optická hustota jader vzorku s optickou hustotou jader standardu, u něhož je velikost genomu známa (Hardie et al., 2002). Ve srovnání s průtokovou cytometrií je denzitometrické měření považováno za postup náchylnější k vzniku chyb, a to kvůli většímu množství kritických okamžiků při přípravě vzorků (Doležel et al., 2007, Greilhuber, 2008). Podrobnější popis principu průtokové cytometrie, její benefity a úskalí a využití v praxi či výzkumu následuje v další části kapitoly.

1.2 Průtoková cytometrie

Veliké oblibě se těší v současnosti zejména mezi botaniky již zmiňovaná průtoková cytometrie (anglicky flow cytometry či FCM), jež je využívána hojně pro svou metodickou nenáročnost, rychlost získání výsledků a mimo jiné také z důvodu nepříliš vysokých nákladů na jednu analýzu (Kron et al., 2007). Tato metoda umožňuje separovat jednotlivé částice jako jádra buněk, buňky či chromozomy a následně analyzovat jejich vlastnosti, respektive jsou zaznamenávány optické vlastnosti těchto částic, nejčastěji fluorescence (Suda, 2005, Adan et al., 2017). Princip měření velikosti genomu za využití průtokové cytometrie je snadný a spočívá v homogenizaci studovaného vzorku s vhodným nejčastěji interním standardem, navázání specifického fluorescenčního barviva na DNA vzniklého homogenátu, respektive analyzovaných částic. Obarvené částice se díky takzvané hydrodynamické fokusaci v průtokové komůrce cytometru pohybují jedna za druhou v úzkém svazku (Suda, 2005, Doležel et al., 2007). Částice jsou do komůrky přiváděny kapilárou, kterou současně protéká unášecí kapalina (destilovaná voda či slabý solný roztok). Díky tomu, že unášecí kapalina je do kapiláry vpouštěna pod vyšším tlakem než suspenze analyzovaných částic, proud částic je tímto způsobem držen ve středu toku a z komůrky odchází jedna za druhou až ke zdroji excitačního záření, kterým jsou tyto částice ozářeny.

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

Výhodou laserových zdrojů excitačního záření je monochromaticnost vyzařovaného světla. V tomto případě pak odpadá nutnost užití filtrů. Naopak levnější a méně výkonné rtuťové výbojky vyžadují použití optických filtrů a mezi jejich nevýhody patří rovněž kratší životnost (Suda, 2005).



Obrázek č. 1 – schéma průtokového cytometru. Převzato z Brown & Wittwer, 2000 a upraveno.

1.2.1 Příprava vzorků

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

1.2.2 Standardy

Vhodný standard by měl splňovat několik kritérií. Mezi stěžejní kritéria patří zejména znalost velikosti genomu (Doležel & Greilhuber, 2010) a jeho stabilita, dostupnost standardu, nenáročnost na pěstování či chov, snadná manipulace s daným jedincem. Standard by měl rovněž splňovat předpoklady pro použití s konkrétním vzorkem. Základním předpokladem pro úspěšně provedené měření s dobře analyzovatelným a spolehlivým výsledkem je podobná velikost genomů standardu a vzorku (Johnston et al., 1999, Roux et al., 2003).

Výrazné nebo naopak velmi nepatrné rozdíly mezi velikostmi genomů standardu a studovaného vzorku mohou zapříčinit sníženou kvalitu analýzy, překryv peaků a v důsledku toho nemožnost analýzu vyhodnotit. Je tak nezbytné disponovat několika co do velikosti genomů rozlišnými standardy pro pokrytí co nejširší škály možných výsledků. V dosavadním výzkumu bylo vyzkoušeno mnoho variant standardů od lidských lymfocytů (Jakobsen, 1983) či kuřecích erytrocytů (Vindelov et al., 1983, Brown et al., 2005, Chen et al., 2015) přes standardy rostlinné (Temsch et al., 2022)

či získané z rozličných druhů obratlovců jako jsou například ryby či myši (Jakobsen, 1983, Tiersch et al., 1989, Dallas et al., 1998, Hanrahan et al., 2011, Hubalek et al., 2021, Yu et al., 2021) nebo z bezobratlých (Hanrahan et al., 2011, Guo et al., 2015, Pflug et al., 2020).

Tabulky č. 1 a č. 2 níže obsahují soupis vybraných rostlinných a živočišných standardů včetně jejich 2C-hodnot (Jakobsen, 1983, Pellicer et al., 2019, Gregory, 2022, Pflug et al., 2020, Temsch et al., 2022).

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

český název	latinský název	2C-hodnota (pg)
huseníček rolní	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,32
sporýš lékařský	<i>Verbena officinalis</i>	0,68
rýže setá	<i>Oryza sativa</i>	0,80
ostřice ostrá	<i>Carex acutiformis</i>	0,82
ředkev setá	<i>Raphannis sativus</i>	1,10
lilek rajče	<i>Solanum lycopersicum</i>	1,12
sója luštinatá	<i>Glycine max</i>	2,26
lilek višňový	<i>Solanum pseudocapsicum</i>	2,60
petúnie zahradní	<i>Petunia hybrida</i>	2,85
sedmikráska obecná	<i>Bellis perennis</i>	3,38
petržel zahradní	<i>Petroselinum crispum</i>	4,46
kukuřice setá	<i>Zea mays</i>	5,40
hrách setý	<i>Pisum sativum</i>	9,09

ječmen setý	<i>Hordeum vulgare</i>	10,43
agáve obecná	<i>Agave americana</i>	15,90
žito seté	<i>Secale cereale</i>	16,19
zelenec chocholátý	<i>Chlorophytum comosum</i>	24,14
bob obecný	<i>Vicia faba</i>	26,90
cibule kuchyňská	<i>Allium cepa</i>	34,89
bělokvět bělokvětý	<i>Haemanthus albiflos</i>	59,14

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

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

1.2.3 Animal Genome Size Database

Ve veřejně dostupné databázi Animal Genome Size Database nalezneme celkem 6222 záznamů, 3793 záznamů reprezentuje obratlovce, 2429 záznamů pak náleží bezobratlým živočichům. Šestinohé (Hexapoda) reprezentuje celkem 1345 záznamů, hmyz sensu stricto (Insecta), tedy bez uvážení blízké příbuzných skupin vidličnatky (Diplura), hmyzenek (Protura) a chvostoskoků (Colembolla), zaujímá pouhých 1344 záznamů. Vybereme-li z celkového počtu záznamů pouze ty, jež byly získány za využití průtokové cytometrie, dostaneme se pro skupinu Hexapoda k hodnotě 688 záznamů. Naproti tomu skupina Viridiplantae zaujímá v rámci Plant DNA C-value Database záznamů celkem 12273. S přihlédnutím ke skutečnosti, že některé ze záznamů v Animal Genome Size Database jsou duplicitní a nejedná se tak o počet změřených druhů, skutečný počet jednotlivých druhů v této databázi je tak o něco nižší. V současnosti je popsán zhruba jeden milion druhů hmyzu (Stork, 2018, Bánki et al., 2023), což přináší ohromný potenciál pro další výzkum právě v této oblasti.

1.2.4 Využití průtokové cytometrie

Kromě měření absolutní a relativní velikosti genomu nachází průtoková cytometrie uplatnění ve studiu poměrně často se vyskytující ploidie u rostlin (Brandizzi & Grilli Caiola 1998), detekce pohlaví (Aron et al., 2003) dále pak ve studiu poměru párů nukleových bází (Doležel et al., 2007) nebo při imunologických analýzách (McKinnon, 2018, Tian et al., 2022) či v klinické praxi (Barlogie et al., 1983, Kron et al., 2007). I přes dostupnost a jednoduchost této metody však výrazně převyšuje její využití pro zjišťování velikosti genomu v botanických bádáních nad zoologickými. Zejména studium hmyzu je upozaděno, což naznačuje i množství záznamů o velikostech genomu v Animal Genome Size v porovnání s ostatními živočišnými druhy a vzhledem k celkovému počtu dosud popsaných druhů, jak již bylo zmíněno výše.

Průtoková cytometrie byla poprvé využita pro identifikaci a charakteristiku rakovinných buněk (Barlogie et al., 1983, Kron et al., 2007). V posledních třiceti letech je stále častěji využívána v evolučních a ekologických studiích (Hawlitschek et al., 2023), rovněž zodpovídá otázky taxonomické a těší se oblibě také v rámci studií populační biologie (Kron et al., 2007). Pro vymezení jednotlivých taxonů jsou používána kritéria jako například počet chromozomů a jejich morfologie, nebo právě obsah jaderné DNA

(Stace, 2000). Díky průtokové cytometrii tak lze odhalit příbuzenské vztahy v rámci kryptických taxonů (MacCulloch et al., 1996, Kron et al., 2007).

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

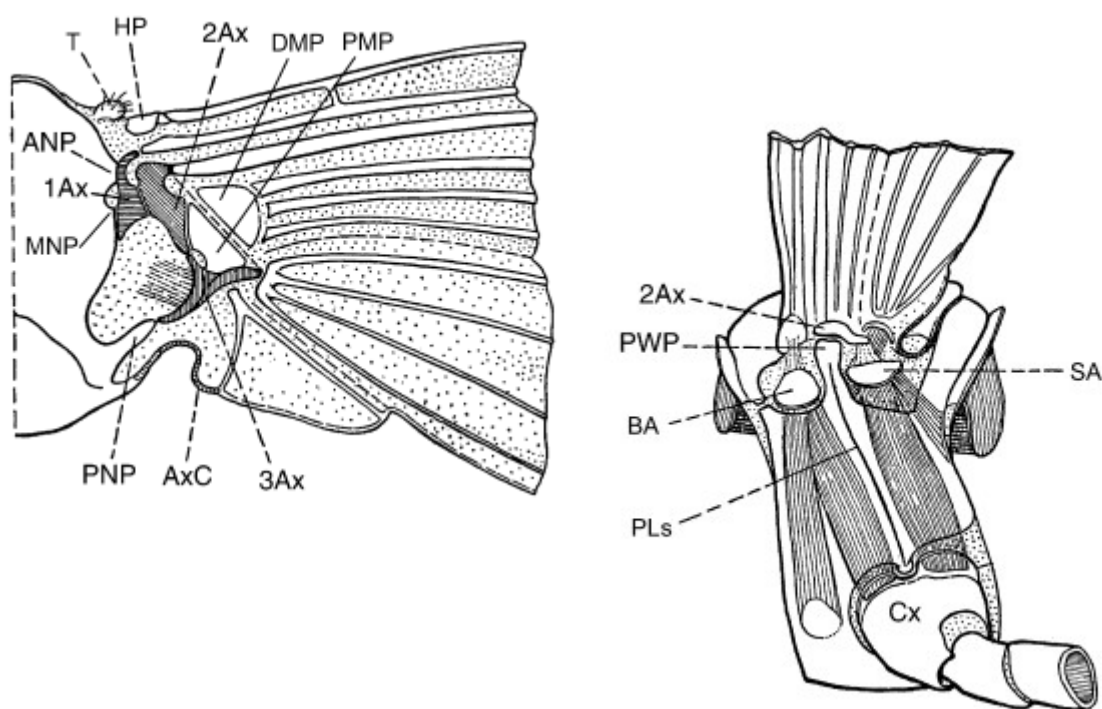
V otázkách taxonomie přispívá průtoková cytometrie u homoploidních skupin také za pomoci stanovení velikosti genomu či poměru AT a CG nukleových bází (Stöck et al., 2002, Vizintin et al., 2006). Rozdíly ve velikostech genomů byly pozorovány u rostlin i živočichů mezi jednotlivými druhy (Boulesteix et al., 2006), ale také vnitrodruhově (Litvinchuk et al., 2005). Opomenout nelze ani detekci pohlaví za pomoci průtokové cytometrie, kde je opět většinou využívána v případě rostlinného materiálu (Doležel & Göhde, 1995). V případě živočichů je detekce pohlaví soustředěna zejména na studie týkající se ptáků či hmyzu (Canon et al., 2000, Aron et al., 2003, Aron et al., 2004). Na rozdíly ve velikostech genomů mezi pohlavími recentně poukazují studie také u hmyzu (Sadílek et al., 2019a, Sadílek et al., 2019b, Hawlitschek et al., 2023).

Průtoková cytometrie je také využívána při monitoringu populací a jejich identifikaci (Kron et al., 2007), a to zejména ve vodním prostředí. Studovány byly například populace mikroorganismů – fytoplanktonu či bakterií (Davey & Kell, 1996, Dubelaar et al., 2007, Müller & Nebe-von-Caron, 2010). Své využití nalézá průtoková cytometrie také při studiu interakcí mezi rostlinami a hmyzem (Thompson et al., 1997).

1.3 Polyneoptera

Zájemovou skupinou této diplomové práce je polyneopterní hmyz. Polyneoptera jsou řazeni v rámci křídlatého hmyzu do skupiny Neoptera. Celá skupina Neoptera zahrnuje celkem dvacet pět řádů, pro které jsou typickými znaky ovipositor tvořen třemi páry valvul a specifické uspořádání axilárních skleritů na bázi křídel (Snodgrass, 1935, Kukulova-Peck, 1978). Toto schéma artikulace křídel pomocí proximálně uložené teguly, anteriorně uložené humerální destičky a třech axilárních skleritů umožňuje neopternímu hmyzu složit křídla ploše na zadeček (Kukulova-Peck, 1978, Kristensen, 1981, Willkommen, & Hörschemeyer, 2007). Schéma na Obrázku č. 2 níže zobrazuje artikulaci křídel skupiny Neoptera.

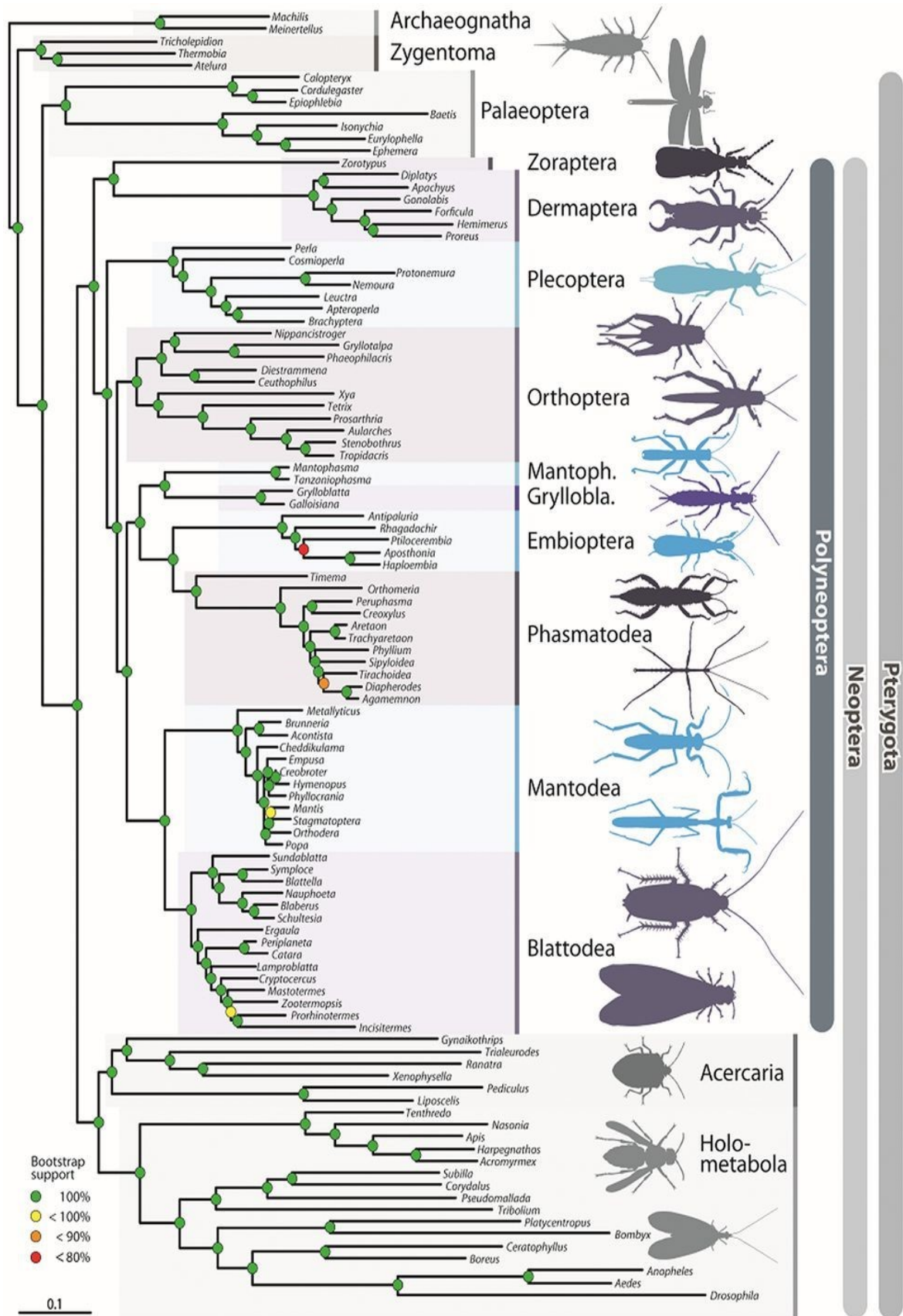
Dalším typickým znakem skupiny Neoptera jsou nepřímé letové svaly, které jsou připojeny dorsoventrálně na stěnu hrudní kostry. Během letu dochází stahy svalů ke změně tvaru hrudi, díky čemuž je pohyb přenesen na křídlo. Tento mechanismus umožňuje velice efektivní let s vysokou frekvencí pohybu křídel (Willkommen & Hörschemeyer, 2007).



Obrázek č. 2 – schéma artikulace křídel skupiny Neoptera. Převzato z Willkommen & Hörschemeyer, 2007 a upraveno.

Skupina Neoptera je dělena na skupiny Paraneoptera (neboli Acercaria), Oligoneoptera (neboli Endopterygota či Holometabola) a Polyneoptera. Monofyletická skupina Polyneoptera zahrnuje zhruba čtyřicet tisíc druhů v rámci deseti tradičních řádů (Beutel et al., 2013, Wipfler et al., 2019). Základní charakteristikou sedmi z nich, kterými se tato diplomová práce zabývá, budou věnovány následující řádky. Vzájemné vztahy jednotlivých řádů jsou zobrazeny na Obrázku č. 3 níže.

Skupina Polyneoptera zahrnuje hmyz s rozmanitými způsoby života, s čímž se pojí odlišnosti morfologie těla nebo potravních preferencí a strategií. Mezi polyneopterní hmyz patří býložravé a všežravé druhy, rovněž pak dravce. Různorodost této skupiny lze demonstrovat na příkladu strašilek či kudlanek, které napodobují mnohdy velmi věrohodně části rostlin nebo na příkladu švábů, pro něž je typické dorsoventrálně zploštělé tělo často s nenápadným zbarvením. Zcela odlišný vzhled nalézáme v rámci skupiny Orthoptera – ať už skákavé končetiny zadního páru kobylek a sarančí nebo modifikovaný první pár končetin krtonožek přizpůsobený k životu pod zemí a hrabání chodeb v substrát (Wipfler, et al., 2019). Naopak společnými znaky zástupců skupiny Polyneoptera jsou kousací ústní ústrojí s absencí modifikace, kožovitý první pár křídel (tegminy), dlouhé segmentované cerky či pětičláňkové tarsy (Beutel et al., 2013, Wipfler et al., 2019).



Obrázek č. 3 – kladogram příbuzenských vztahů v rámci skupiny Polyneoptera Převzato z Gullan, P. J., & Cranston, P. S. (2014). The insects: an outline of entomology. John Wiley & Sons.

1.3.1 Škvoři (Dermaptera)

Tato původně tropická skupina žijící v rozličných štěrbinách, detritu či pod kameny s hlavní aktivitou během noci je typická zploštělým podlouhlým tělem. Škvoři patří mezi dobré letce, jež jsou atrahováni světlem. Na konci abdomenu jsou přítomny jednočlánkové cerky sloužící k chytání kořisti, obraně a útoku, občas pro pomoc se skládáním druhého páru křídel (Rasplus & Roques, 2010). Ačkoliv postavení škvorů ve vztahu k ostatním skupinám hmyzu je poměrně kontroverzní téma (Jarvis et al., 2005, Beutel et al., 2013, Wipfler et al., 2019 zřejmě nejpříbuznějším řádem jsou drobnělký (Zoraptera) (Jarvis et al., 2005) a oba tyto řády byly považovány za sesterské s pošvatkami (Plecoptera) (Flook & Rowell, 1998). Recentněji je uvažováno postavení drobnělek (Zoraptera) a škvorů (Dermaptera) jako sesterské k ostatním Polyneoptera vyjma pošvatek (Plecoptera), které jsou pravděpodobně sesterskou skupinou všech polyneopterních taxonů (Wipfler et al., 2019).

Známo je přes 2000 druhů (Beutel et al., 2013), v České republice žije celkem sedm původních a dva nepůvodní druhy v celkem šesti rodech (Kočárek et al., 1999, Kočárek et al., 2022): škvor obecný (*Forficula auricularia*), škvor bezkřídlý (*Chelidurella acanthopygia*), škvor malý (*Labidura minor*), škvor polokřídý (*Apterygida albipennis*), nepůvodní škvor jižní (*Euborellia annulipes*), škvor dvojskvrnný (*Anechura bipunctata*), škvor velký (*Labidura riparia*). Poslední dva druhy z výčtu jsou v současnosti vedeny na Červeném seznamu ohrožených druhů České republiky. V nedávné době byla v Ďáblickém háji v Praze objevena populace *Forficula smyrnensis* (Kočárek et al., 2022). Jedná se o druh původně žijící ve východním Středomoří. V posledních letech byly hlášeny nálezy tohoto druhu z Rakouska, Itálie či Ruska z oblastí hustého osídlení, z čehož autoři usuzují, že se jedná o výsledek pasivního šíření díky lidské činnosti (Kočárek et al., 2022).



Obrázek č. 4 – *Forficula smyrnensis*, samec (A), samice (B) Převzato z Kočárek, P., & Doležal, A. (2022). *Forficula smyrnensis* Audinet-Serville, 1838 found in the Czech Republic: the inconspicuous spread of a conspicuous alien earwig. *BioInvasions Records*, 11(3), 642-651.

1.3.2 Orthopteroidní komplex („Orthopteroidea“)

Pojem „Orthopteroidea“ je v této práci použit pro zjednodušení z důvodu společných charakteristik následujících řádů: snovatky (Embioptera), strašilky (Phasmatodea), strašilkovce (Mantophasmatodea), cvrčkovce (Grylloblattodea), kudlanky (Mantodea), švábi (Blattodea) a zřejmě bazální skupinu rovnokřídlých (Orthoptera). „Orthopteroidea“ však není monofyletickou skupinou. Vzájemné vztahy jednotlivých řádů nejsou zcela vyjasněny, nicméně jejich společnými znaky jsou nápadně velký anální lalok, specifická základní stavba ovipositoru a molekulární znaky (Flook & Rowell, 1998). Co do počtu popsaných druhů jsou nejmenšími řády v rámci této skupiny cvrčkovci (Grylloblattodea) a strašilkovci (Mantophasmatodea). Na základě morfologických podobností se předpokládalo, že skupina Grylloblattodea popsaná na počátku minulého století (Walker, 1914) je úzce příbuzná se skupinami Blattodea a Grylloidea (Wipfler et al., 2011). Fylogenetické vztahy Grylloblattodea vůči ostatním skupinám byly dlouho nejasné až do roku 2002, kdy došlo k popisu Mantophasmatodea (Klass et al., 2002). Na rozdíl od Mantophasmatodea, jejichž první objevené druhy pochází ze subtropických a tropických oblastí Afriky (Klass et al., 2002), žijí Grylloblattodea v chladnějších oblastech severní polokoule (Kamp, 1973). V současnosti jsou tyto dvě skupiny jednoznačně považovány za monofylum a společně nazývány jako Xenonomia (Terry & Whiting, 2005, Kjer et al., 2006).

1.3.2.1 Snovatky (Embioptera)

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

1.3.2.2 Strašilky (Phasmatodea)

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

1.3.2.3 Rovnokřídli (Orthoptera)

Monofyletická skupina Orthoptera tvořena dvěma sesterskými podřády saranče (Caelifera) a kobylky (Ensifera) zahrnuje více než 20 000 druhů (Flook & Rowell, 1998, Fenn et al., 2008). Monofylie Orthoptera je podpořena jak morfologickými, tak molekulárními daty (Jost & Shaw, 2006, Fann et al., 2008, Zhang et al., 2013). Rovněž Caelifera jsou v současnosti akceptováni jako monofylum (Fenn et al., 2008, Sheffield et al., 2010, Zhang et al., 2013), ačkoliv tomu tak v minulosti nebylo a panovala nejasnost v postavení pacvrčků (Tridactyloidea) (Flook & Rowell, 1998). I přes skutečnost, že někteří autoři považovali podřád Ensifera za parafyletický (Fenn et al., 2008), panuje v současnosti shoda a stejně jako jeho sesterská skupina je považován za monofylum (Zhang et al., 2013, Zhou et al., 2017).

Podřád kobylky (Ensifera) je v moderním pojetí členěn do šesti recentních nadčeledí: cvrčci (Grylloidea), koníci (Rhaphidophoroidea), kobylky sensu stricto (Tettigonioidea), Hagloidea, Schizodactyloidea a Stenopelmatoidea (Zhang et al., 2013). Někteří autoři však podřád kobylky (Ensifera) člení do dvou skupin, kde první z nich tvoří sesterské

taxony Grylloidea a Gryllotalpoidea. Sesterským taxonem ke dvěma výše zmíněným jsou Schizodactyloidea, další sesterskou dvojici pak tvoří Hagloidea a Tettigonioidea, za jejichž sesterskou skupinou je považována nadčeleď Stenopelmatoidea. Nadčeleď Rhabdophoroidea byla postavena na bázi „ne-grylloidní“ skupiny nadčeledí. Postavení Schizodactyloidea považují autoři za nejasné (Zhou et al., 2017). Jiní autoři považují za sesterské skupiny Tettigonioidea a Rhabdophoroidea, které jsou obě sesterskými pro Grylloidea (Fenn et al., 2008, Yuan et al., 2021).

Autoři se shodují, že taxonem ležícím na bázi podřádu saranče (Caelifera) jsou pacvrčci Tridactyloidea (Flook et al., 1999, Zhang et al., 2013). Celek pak dotváří nadčeledí marše Tetrigoidea, Eumastacoidea, Tanaoceroidea, Trigonopterygoidea, Pyrgomorphaidea, Pneumoroidea, saranče Acridoidea (Flook et al., 1998, Zhang et al., 2013).

Ve volné přírodě na našem území bylo zaznamenáno 98 druhů rovnokřídlého hmyzu (Kočárek et al., 2013), běžně se tak můžeme setkat s typickým zvukem vyluzovaným zástupci této skupiny, stridulací.

1.3.2.4 Blattopteroidní komplex (Dictyoptera)

Jedná se o monofyletický taxon zahrnující kudlanky (Mantodea), švábi (Blattodea) (Cameron et al., 2006, Fenn et al., 2008, Wang et al., 2017). Kudlanky (Mantodea) jsou považovány za sesterskou skupinu švábů (Blattodea) (Klass & Meier, 2006, Wang et al., 2017), ačkoliv v minulosti se na základě morfologických dat uvažovalo o jejich blízkému příbuzenskému vztahu s Mantophasmatodea (Klass et al., 2002, Cameron et al., 2006). Průlomový objev byl učiněn v roce 2007, kdy bylo zjištěno, že termiti (Isoptera) jsou vnitřní skupinou Blattodea (Inward et al., 2007).

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

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

Nemalý význam mají kosmopolitně rozšíření švábi („Blattaria“) napříč rozmanitými habitaty jako jsou lesy, stepi, jeskyně či lidská obydlí. Významnou roli hrají nejenom jako „škůdci“, ale podílí se velkou měrou na rozkladu organické hmoty. Za zmínku rovněž stojí sociální chování švábů, které dostává svého vrcholu v podobě eusociality termitů (Isoptera). Tropy a subtropy obývají Isoptera v hnízdech označovaných jako termitiště a představují významné saprofágy místních ekosystémů. Hierarchie kolonií je striktně rozdělena do jednotlivých kast. Zajímavostí je, že královny některých druhů dožívají vyšších jednotek let (Engel et al., 2009, Tasaki et al., 2021).

Na rozdíl od termitů lze méně početně převážně v tropech žijící kudlanky (Mantodea) spatřit i v naší přírodě – kudlanka nábožná (*Mantis religiosa*) je dnes běžnou součástí teplejších oblastí České republiky (Hudec et al., 2007). Jejich klasifikace na úrovni čeledí je nejasná, přičemž mnohé z uznaných až patnácti čeledí jsou parafyletickými (Gullan & Cranston, 2014).

2 Cíle práce

1. Rozšířit znalost velikosti genomů v rámci skupiny Polyneoptera metodou průtokové cytometrie.
2. Porovnat velikosti genomů v rámci jednotlivých řádů.

3 Metodika

3.1 Materiál a jeho příprava

Celkem bylo v rámci této diplomové práce analyzováno osmdesát druhů hmyzu ze skupiny Polyneoptera, z toho pět druhů ze skupiny Dermaptera, pět druhů ze skupiny Mantodea, patnáct druhů ze skupiny Phasmatodea, padesát tři druhů ze skupiny Orthoptera a jeden druh ze skupiny Isoptera a tři druhy ze skupiny Embioptera. Výčet jednotlivých druhů je zaznamenán v Tabulkách č. 4-13 ve čtvrté kapitole této práce. Zástupci skupin Zoraptera, Grylloblattodea a Mantophasmatodea nebyli analyzováni pro jejich nesnadnou dostupnost. Ze skupiny Blattodea byl analyzován pouze jeden zástupce Isoptera, neboť rozsáhlá studie věnující se švábům byla pod záštitou projektu č. 1338120 Grantové agentury Univerzity Karlovy publikována v roce 2020 (Stuchlíková, 2020). Zástupcům Plecoptera bude věnována pozornost v následujících studiích pod záštitou Mgr. Petra Šípka, Ph.D.

Většina použitého materiálu byla získána v rámci výstav a burz bezobratlých, část materiálu pochází z chovů Katedry zoologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy, ze soukromých chovů (zejména pak z chovů Mgr. Petra Šípka, PhD.), některé druhy byly rovněž získány sběrem v terénu ať už v rámci českých lokalit nebo zahraničních výjezdů. V případě dostupnosti materiálu, byli analyzováni jedinci obou pohlaví v rámci jednoho druhu. V některých případech se podařilo použít pro analýzu jedince z různých lokalit.

Hmyzí materiál byl použit živý nebo mražený. Při použití mraženého materiálu byly vzorky připravovány na ledu. Studovanému jedinci byla za pomoci nůžek odebrána tarsální část nohy, případně celá noha, pokud se jednalo o jedince menších rozměrů. Tato tkáň byla společně s adekvátním množstvím standardu umístěna do Petriho misky a pipetou doplněna o 800 μ l pufru Otto I uchovávaného v chladničce. Materiál byl následně homogenizován žiletkou a přefiltrován do zkumavky přes nylonový filtr. Pufir Otto I je připravován rozpuštěním 0,1 M monohydrátu kyseliny citronové a 0,5% Tween 20 v destilované vodě. Tento roztok zajišťuje rozrušení cytoplazmy a uvolnění jader (Loureiro et al., 2006). Vzorek byl poté obarven 1 ml roztoku složeného z pufru Otto II, fluorescenčního barviva propidia iodidu, RNázy A a antioxidantu β -mercaptoethanolu. Pufir Otto II je připravován z 0,4 M dodekahydrátu

hydrogenfosforečnanu sodného a destilované vody (Doležel et al., 2007). Po jeho přípravě je uchováván v tmavém místě za pokojové teploty (Doležel & Göhde, 1995).

K analýze vzorků bylo použito vzhledem k výraznému rozptylu mezi velikostmi genomů studovaných druhů několik rostlinných standardů: lilek višňový (*Solanum pseudocapsicum*), hrách setý (*Pisum sativum*), sedmikráska obecná (*Bellis perennis*), ostřice ostrá (*Carex acutiformis*) a bob obecný (*Vicia faba*). Za zlatý standard byl zvolen lilek višňový (*Solanum pseudocapsicum*), dle kterého byly kalibrovány ostatní standardy (Tabulka č. 3). Velikost genomu zlatého standardu byla uvažována s 2C-hodnotou 2,61 pg (Temsch et al., 2010).

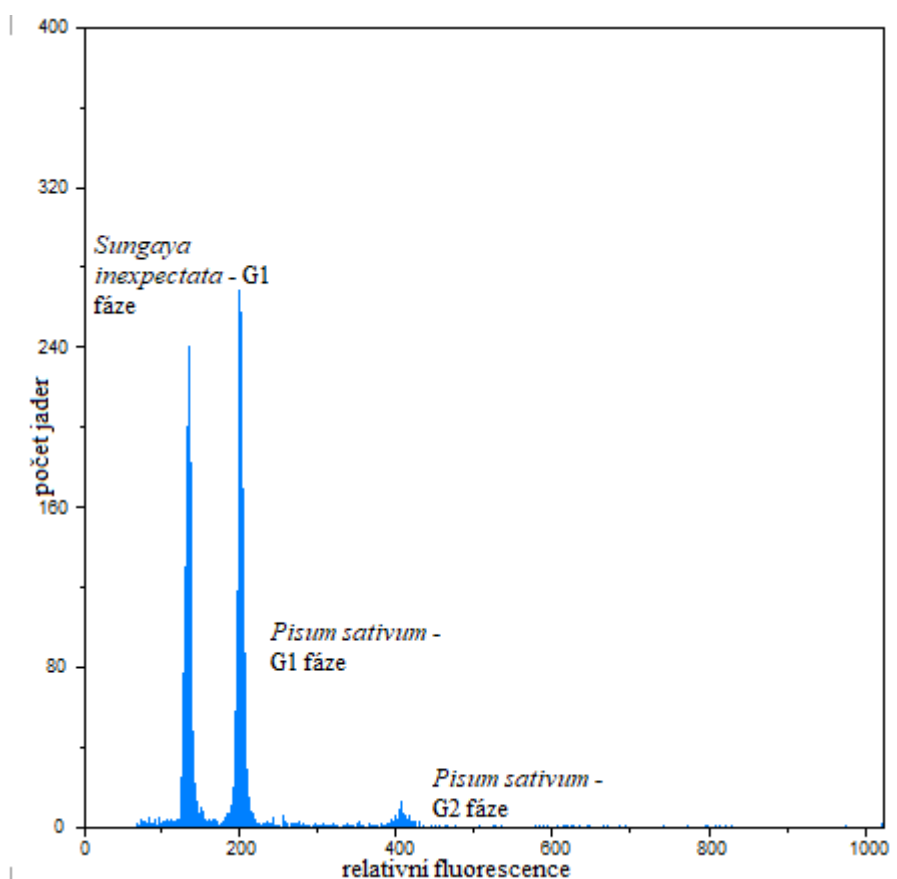
Tabulka č. 3 – 2C-hodnoty použitých standardů

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

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

3.2 Vyhodnocení analýz

Výsledné analýzy získané převodem dat do počítače byly vyhodnocovány prostřednictvím programu Partec FloMax 2.4b (Partec GmbH, Münster). Velikost genomu daného druhu hmyzu byla vypočítána na základě vzdálenosti peaků standardu a vzorku na ose x histogramu (Obrázek č. 3) Tento poměr vzdáleností je násoben 2C-hodnotou standardu. Výsledkem je 2C-hodnota vzorku. Vzhledem k opakovaným měřením byly takto získané hodnoty následně průměrovány, čímž byla zajištěna vyšší přesnost. Variační koeficient analýz zahrnutých do této práce nepřesáhl 3 %.



Obrázek č. 5 – histogram z průtokového cytometru: analýza velikosti genomu samce strašilky *Sungaya inexpectata*, standard *Pisum sativum*.

Peak v levé části histogramu představuje jádra buněk jedince vzorku (*Sungaya inexpectata*), peak uprostřed patří jádrům buněk rostlinného standardu (*Pisum sativum*), nejmenší peak v pravé části histogramu náleží G2 fázi jader buněk standardu (*Pisum sativum*). V průběhu G2 fáze buněčného dělení dochází replikací ke zdvojnásobení

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

4 Výsledky

Následující část práce popisuje zjištěné velikosti genomů zástupců řádů Dermaptera, Embioptera, Phasmatodea, Orthoptera, Mantodea a podřádu Isoptera. Každá z podkapitol obsahuje samostatnou tabulku, případně tabulky, v nichž jsou vždy uvedeny měřené druhy a jejich 2C-hodnoty, které byly vypočteny jako prostý průměr hodnot všech analýz daného jedince. V každé tabulce je uvedena rovněž zkratka použitého standardu. Pokud bylo určeno pohlaví daného jedince, je rovněž uvedeno v tabulce.

Vysvětlivky k následujícím tabulkám: *Carex acutiformis* – X, *Solanum pseudocapsicum* – S, *Bellis perennis* – B, *Pisum sativum* – P, *Vicia faba* – V, nespecifikovaný původ/jedinec získaný na burze – N/B

4.1 Škvoři (Dermaptera)

V této diplomové práci bylo analyzováno pět druhů řádu Dermaptera – *Chelidura acanthopygia* a *Apterygida media*, *Anechura bipunctata* a dva jedinci neznámých dvou druhů.

Tabulka č. 4 – velikost genomu měřených jedinců řádu Dermaptera

čeleď	druh	původ	standard	2C-hodnota (pg)	směrodatná odchylka (pg)
Forficulidae	<i>Anechura bipunctata</i>	Pindos, Řecko	S	1,83	0,01
Forficulidae	<i>Apterygida media</i>	Lednice, ČR	X	2,78	0,02
Forficulidae	<i>Chelidura acanthopygia</i>	Myštice, ČR	S	1,42	0,02
neznámá	neznámý 1	Pades, Řecko	S	1,74	0,01
neznámá	neznámý 2	N/B	S	1,77	0,06

4.2 Snovatky (Embioptera)

V této diplomové práci byly analyzovány tři druhy snovatek v celkem pěti měřeních. Zjištěné 2C-hodnoty jsou zaznamenány v Tabulce č. 5.

Tabulka č. 5 – velikost genomu měřených jedinců řádu Embioptera

řád, čeleď	druh	původ	standard	2C-hodnota (pg)	směrodatná odchylka (pg)
Embioptera, Embiidae	<i>Embia savignyi</i>	Fuerteventura, Španělsko	S	11,00	0,01
Embioptera, neznámá	neznámý	Oskorušno, Pelješac, Chorvatsko	S	7,86	0,03
Embioptera, neznámá	neznámý	chov Mgr. Petra Másla	S	8,15	0,11

4.3 Strašilky (Phasmatodea)

V této diplomové práci bylo analyzováno celkem dvanáct druhů z řádu Phasmatodea: *Achrioptera manga*, *Dares philippinensis*, *Lamachodes* sp. *Bokor*, *Heteropteryx dilatata*, *Mearnsiana bullosa*, *Medauroidea extradentata*, *Neohirasea maerens*, *Phasma gigas*, *Pylaemenes guangxiensis*, *Sungaya inexpectata*, *Tisamenus* sp. *Palaui*, *Trachythorax* sp. *Kon Chu Rang*. Informace o zjištěných velikostech genomů vyjma druhů *Heteropteryx dilatata* (Obrázek č. 6), *Medauroidea extradentata* a *Sungaya inexpectata* poskytuje Tabulka č. 6 níže. Třem výše zmíněným druhům jsou věnovány samostatné Tabulky č. 7, 8 a 9. Důvody tohoto rozdělení budou rozebrány v diskuzi.

Tabulka č. 6 – velikost genomu měřených jedinců řádu Phasmatodea

druh	pohlaví	původ	standard	2C- hodnota (pg)	směrodatná odchylka (pg)
<i>Achrioptera manga</i>	F M	N/B	P	6,08 5,39	0,01 0,01
<i>Dares philippinensis</i>	F M	N/B	P	12,62 7,26	0,05 0,05
<i>Eurycantha horrida</i>	?	N/B	V	4,51	0,03
<i>Lamachodes</i> sp. Bokor	F M	Bokor, Kambodža	P	11,77 11,27	0,11 0,01
<i>Mearnsiana bullosa</i>	F M	Mt Apo, Mindanao Filipíny	P	6,82 6,35	0,05 0,01
<i>Mearnsiana bullosa</i>	F M	N/B	P	6,95 6,39	0,02 0,04
<i>Medauroides extradentata</i>	F	N/B	S	8,59	0,05
<i>Neohirasea maerens</i>	F M	N/B	P	12,84 12,00	0,04 0,10
<i>Phasma gigas</i>	F (nymfa)	chov Mgr. Petra Šípka, Ph.D.	V	10,75	0,12
<i>Pylaemenes guangxiensis</i>	?	N/B	P	29,20	0,05
<i>Tisamenus</i> sp. Palau	F M	Palau, Filipíny	P	5,38 5,15	0,03 0,04

Tabulka č. 7 – velikost genomu *Heteropteryx dilatata*

<i>Heteropteryx dilatata</i> – číslo jedince	pohlaví	standard	počet analýz	2C-hodnota (pg)
1	F	P	2	79,87
2	F	V	1	70,59
3	F	V	1	72,01
4	F	V	1	73,22
5	F	V	1	69,03
6	F	V	1	66,79
7	M	V	1	67,06
8	M	V	1	69,51
9	M	V	1	74,57
10	M	V	1	70,94
11	M	V	1	67,44
12	M	V	1	75,43
13	M	V	1	68,22
14	M	V	1	68,62



Obrázek č. 6 – *Heteropteryx dilatata*

Fotografie autorky práce.

Tabulka č. 8 – velikost genomu *Medauroidea extradentata*

Medauroidea extradentata – číslo jedince	pohlaví	standard	počet analýz	2C-hodnota (pg)	směrodatná odchylka (pg)
1	F	V	2	8,39	0,55
2	F	V	2	8,55	0,15
3	F	V	2	7,78	0,08
4	F	V	2	7,99	0,06
5	F	V	2	7,98	0,05
6	F	V	2	7,70	0,01
7	F	V	2	7,72	0,02
8	F	V	2	7,72	0,07
9	F	V	2	7,80	0,02
10	F	V	1	8,06	-
11	F	V	1	8,35	-
12	F	V	1	8,40	-
13	F	V	1	8,12	-
14	F	V	1	8,21	-
15	F	V	1	8,18	-
16	F	V	1	8,07	-
17	F	V	1	8,03	-
18	F	V	2	8,00	0,07

Tabulka č. 9 – velikost genomu *Sungaya inexpectata*

<i>Sungaya inexpectata</i> – číslo jedince	pohlaví	standard	počet analýz	2C-hodnota (pg)	směrodatná odchylka (pg)
1	F	P	1	6,26	-
2	F	P	1	6,53	-
3	F	P	1	6,86	-
4	F	P	1	6,69	-
5	F	P	1	6,57	-
6	F	P	1	6,78	-
7	F	P	1	6,90	-
8	F	P	1	6,73	-
9	F	P	1	6,80	-
10	F	P	1	6,54	-
11	F	P	1	6,57	-
12	F	P	2	6,85	0,03
13	F	P	2	6,86	0,04
14	F	P	2	6,70	0,10
15	F	P	2	6,70	0,03
16	F	P	2	6,64	0,06
17	M	P	1	6,47	-
18	M	P	1	6,13	-
19	M	P	1	6,29	-
20	M	P	1	6,49	-
21	M	P	1	6,46	-
22	M	P	1	6,25	-
23	M	P	1	6,26	-
24	M	P	1	6,19	-
25	M	P	1	6,31	-
26	M	P	1	6,13	-
27	M	P	1	6,22	-
28	M	P	2	6,09	0,04
29	M	P	2	6,15	0,05
30	M	P	2	6,40	0,11
31	M	P	2	6,44	0,06
32	M	P	2	6,09	0,01

4.4 Rovnokřídli (Orthoptera)

Celkem bylo analyzováno padesát tři druhů řádu Orthoptera ze sedmi nadčeledí.

Z podřádu Ensifera bylo vyhodnoceno dvacet čtyři druhů v nadčeledích Grylloidea, Tettigonioidea a Stenopelmatoidea. V jednotlivých čeledích pak bylo analyzováno deset druhů příslušících do nadčeledi Grylloidea, deset druhů patřících do nadčeledi Tettigonioidea, dále pak jeden druh z nadčeledi Stenopelmatoidea. Analyzovány byly rovněž tři druhy, které byly identifikovány jako zástupci z podřádu Ensifera, ale nepodařilo se tyto jedince určit jako konkrétní druh.

Z podřádu Caelifera bylo vyhodnoceno dvacet pět druhů v nadčeledích Tridactyloidea, Eumastacoidea, Pyrgomorphoidea a Acridoidea. V čeledi Eumastacoidea byly měřeny dva druhy, v čeledi Tridactyloidea pak jeden druh. Čtrnáct analyzovaných druhů přísluší čeledi Acridoidea a sedm druhů čeledi Pyrgomorphoidea (Obrázky č. 7, č. 8, č. 9 a č. 10). Tři druhy analyzovaných jedinců nebyli jednoznačně identifikováni a zařazeno do nižších taxonomických skupin, avšak byli vyhodnoceni jako zástupci podřádu Caelifera.

Přehled jednotlivých druhů, jež byly analyzovány, poskytuje Tabulka č. 10 níže. Pro větší přehlednost jsou jedinci barevně označeni dle příslušnosti k dané nadčeledi (podrobnosti poskytuje Legenda k Tabulce č. 10).

Tabulka č. 10 – velikost genomu měřených jedinců řádu Orthoptera

podřád	nadčeleď, čeleď	druh	pohlaví	původ	standard	2C- hodnota (pg)	směrodatná odchylka (pg)
Caelifera	Acridoidea, Acrididae	<i>Acrida ungarica</i>	F	Žuljana, Pelješac, Chorvatsko	P	24,67	0,19
Caelifera	Acridoidea, Acrididae	<i>Anacridium aegyptium</i>	F M	Menfi, Sicílie, Itálie	P	24,30 22,83	0,07 0,03
Caelifera	Acridoidea, Acrididae	<i>Anacridium aegyptium</i>	F	Žuljana, Pelješac, Chorvatsko	P	23,25	0,13
Caelifera	Acridoidea, Acrididae	<i>Calliptamus italicus</i>	F M	N/B	P	23,96 22,29	0,12 0,08
Caelifera	Acridoidea, Acrididae	<i>Euthystira brachyptera</i>	?	Slovensko	P	39,43	0,01
Caelifera	Acridoidea, Acrididae	<i>Chorthippus biguttulus</i>	?	Slovensko	P	24,01	0,22
Caelifera	Acridoidea, Acrididae	<i>Chorthippus biguttulus</i>	?	Blšany, ČR	P	24,72	0,21
Caelifera	Acridoidea, Acrididae	<i>Chorthippus dorsatus</i>	?	Slovensko	P	26,49	0,17
Caelifera	Acridoidea, Acrididae	<i>Oedaleus decorus</i>	?	Rumunsko	P	23,76	0,03
Caelifera	Acridoidea, Acrididae	<i>Stethophyma grossum</i>	M	Sokolov, ČR	S	34,79	0,03
Caelifera	Acridoidea, Acrididae	<i>Tetrataenia surinama</i>	F M	N/B	P	23,89 22,82	0,08 0,16
Caelifera	Acridoidea, Romaleidae	<i>Romalea microptera</i>	F M	N/B	P	51,23 46,67	0,65 0,46
Caelifera	Acridoidea, Romaleidae	<i>Tropidacris collaris</i>	F	N/B	P	54,59	0,06
Caelifera	Eumastacoidea, Chorotypidae	<i>Erianthus versicolor</i>	?	chov PrF UK	P	6,38	0,06
Caelifera	Eumastacoidea, Proscopiidae	<i>Pseudoproscopia latirostris</i>	F M	chov PrF UK	P	22,54 20,36	0,14 0,36
Caelifera	neznámé	neznámý 1	F M	Malta	P	23,86 22,01	0,01 0,03
Caelifera	neznámé	neznámý 2	F M	Myštice, ČR	S	27,21 25,75	-
Caelifera	neznámé	neznámý 3	F	Somaliland	P	43,08	0,43
Caelifera	Pyrgomorpoidea, Pyrgomorphidae	<i>Dictyophorus griseus</i>	F	Malawi	P	149,33	1,04
Caelifera	Pyrgomorpoidea, Pyrgomorphidae	<i>Dictyophorus spumans</i>	?	JAR	V	139,91	2,46

Caelifera	Pyrgomorphoidea, Pyrgomorphidae	neznámý 1	?	JAR	V	64,56	1,06
Caelifera	Pyrgomorphoidea, Pyrgomorphidae	neznámý 2	?	JAR	V	33,40	0,04
Caelifera	Pyrgomorphoidea, Pyrgomorphidae	neznámý 3	M	JAR	P	109,19	0,16
Caelifera	Pyrgomorphoidea, Pyrgomorphidae	<i>Phymateus leprosus</i>	F	JAR	P	70,74	0,26
Caelifera	Pyrgomorphoidea, Pyrgomorphidae	<i>Zonocerus elegans</i>	?	JAR	P	57,60	0,31
Caelifera	Tridactyloidea, Tridactylidae	<i>Xya pfaendleri</i>	F M	N/B	B	5,86 5,53	0,27 0,01
Ensifera	Grylloidea, Gryllidae	<i>Gryllomorpha dalmatina</i>	F	Mt Nebrodi, Sicílie, Itálie	B	5,05	0,02
Ensifera	Grylloidea, Gryllidae	<i>Gryllus campestris</i>	?	Milovice, ČR	S	4,45	0,06
Ensifera	Grylloidea, Gryllidae	<i>Homoeogryllus xanthographus</i>	F	N/B	S	3,82	0,01
Ensifera	Grylloidea, Gryllidae	<i>Nemobius sylvestris</i>	F M	N/B	B P	6,92 4,76	0,02 0,01
Ensifera	Grylloidea, Gryllidae	neznámý 1	?	N/B	S	3,91	0,02
Ensifera	Grylloidea, Gryllidae	neznámý 2	?	N/B	S	3,76	0,01
Ensifera	Grylloidea, Gryllidae	neznámý 3	F	N/B	S	3,90	0,03
Ensifera	Grylloidea, Gryllidae	<i>Phaeophilacris bredoides</i>	F M	Ex breed T. Vajnar, burza Praha	P	5,17 4,92	0,03 0,03
Ensifera	Grylloidea, Gryllotalpidae	<i>Gryllotalpa gryllotalpa</i>	M	N/B	B	2,54	0,01
Ensifera	Grylloidea, Myrmecophilidae	<i>Myrmecophilus acervorum</i>	?	Myštice, ČR	P	1,59	0,01
Ensifera	neznámé	neznámý 1	?	Žuljana, Pelješac, Chorvatsko	P	13,12	0,02
Ensifera	neznámé	neznámý 2	?	Žuljana, Pelješac, Chorvatsko	P	13,52	0,04
Ensifera	neznámé	neznámý 3	?	Malta	P	17,08	0,11
Ensifera	Stenopelmatoidea, Gryllacrididae	neznámý	F	Malawi	B	8,86	0,02

Ensifera	Tettigonioidea, Tettigoniidae	<i>Bradyporus dasypus</i>	M	Pepeliště, Severní Makedonie	P	31,52	0,11
Ensifera	Tettigonioidea, Tettigoniidae	<i>Cosmoderus femoralis</i>	F	N/B	P	24,38	0,07
Ensifera	Tettigonioidea, Tettigoniidae	<i>Decticus verrucivorus</i>	?	Rumunsko	P	11,33	0,51
Ensifera	Tettigonioidea, Tettigoniidae	<i>Ephippiger discoidalis</i>	F	Krk, Chorvatsko	P	24,47	0,10
Ensifera	Tettigonioidea, Tettigoniidae	<i>Eupholidoptera tyrrhenica</i>	?	N/B	S	4,70	0,01
Ensifera	Tettigonioidea, Tettigoniidae	<i>Pholidoptera</i> sp.	?	Myštice, ČR	P	14,24	0,03
Ensifera	Tettigonioidea, Tettigoniidae	<i>Platycleis albopunctata</i>	M	Milovice, ČR	P	13,04	0,14
Ensifera	Tettigonioidea, Tettigoniidae	<i>Ruspolia nitidula</i>	?	Myštice, ČR	P	7,00	0,04
Ensifera	Tettigonioidea, Tettigoniidae	<i>Stilpnochlora couloniana</i>	F M	chov Mgr. Petra Šípka, Ph.D.	V	18,67 15,23	0,03 0,03
Ensifera	Tettigonioidea, Tettigoniidae	<i>Tettigonia cantans</i>	?	Stráž nad Ohří- Osvinov, ČR	S	14,71	0,06
*	neznámé	neznámý 2	?	Rumunsko	P	7,83	0,51
*	neznámé	neznámý 1	?	Rumunsko	P	26,97	0,51

Legenda k Tabulce č. 10:

*Orthoptera	Jedinci označení v prvním sloupci třemi hvězdami byli identifikováni jako zástupci řádu Orthoptera.
Grylloidea	Jedinci označení světle modrou barvou jsou zástupci nadčeledi Grylloidea.
Tettigonioidea	Jedinci označení světle oranžovou barvou jsou zástupci nadčeledi Tettigonioidea.
Stenopelmatoidea	Jedinci označení modrou barvou jsou zástupci nadčeledi Stenopelmatoidea.
Tridactyloidea	Jedinci označení světle šedou barvou jsou zástupci nadčeledi Tridactyloidea.
Eumastacoidea	Jedinci označení zlatou barvou jsou zástupci nadčeledi Eumastacoidea.
Acridoidea	Jedinci označení zelenou barvou jsou zástupci nadčeledi Acridoidea.
Pyrgomorphaidea	Jedinci označení šedou barvou jsou zástupci nadčeledi Pyrgomorphaidea.



Obrázek č. 7 – *Zonocerus elegans* (JAR)



Obrázek č. 8 – *Phymateus leprosus* (JAR)

Autorem fotografií je Mgr. Petr Šípek, Ph.D.



Obrázek č. 9 – *Dictyophorus spumans* (JAR)



Obrázek č. 10 – *Dictyophorus griseus* (Malawi)

Autorem fotografií je Mgr. Petr Šípek, Ph.D.

Opakovaná měření probíhala u druhu *Locusta migratoria* (Tabulka č. 11). Tento druh byl stejně jako *Heteropteryx dilatata*, *Medauroidea extradentata* a *Sungaya inexpectata* ze skupiny Phasmatodea vytipován jako potenciálně vhodný nový hmyzí standard. Analýzám byli podrobeni samci i samice tohoto druhu, a to v počtu osm samic a sedm samců. Dohromady proběhlo devatenáct analýz samic a sedmnáct analýz samců. Průměrná 2C-hodnota pro samice byla zjištěna 15,16 pg a pro samce 14,06 pg. Největší rozdíl mezi dvěma samicemi činil v absolutních hodnotách 0,43 pg, mezi dvěma samci pak 0,21 pg, směrodatná odchylka pro samice byla vypočítána 0,12 pg a pro samce 0,09 pg.

Tabulka č. 11 – velikost genomu *Locusta migratoria*

<i>Locusta migratoria</i> – číslo jedince	pohlaví	standard	počet analýz	2C-hodnota (pg)	směrodatná odchylka (pg)
1	F	P	3	15,11	0,15
2	F	P	3	15,10	0,03
3	F	P	3	15,45	0,19
4	F	P	2	15,24	0,03
5	F	P	2	15,02	0,09
6	F	P	2	15,15	0,07
7	F	P	2	15,13	0,07
8	F	P	2	15,09	0,09
9	M	P	3	14,11	0,07
10	M	P	3	14,15	0,09
11	M	P	3	14,20	0,06
12	M	P	2	13,99	0,09
13	M	P	2	14,05	0,09
14	M	P	2	13,94	0,08
15	M	P	2	14,00	0,04

4.5 Kudlanky (Mantodea)

Celkem bylo analyzováno pět druhů zástupců Mantodea, a sice *Ameles decolor*, *Ameles spallanzania*, *Empusa fasciata*, *Phyllocrania paradoxa* a *Mantis religiosa*. Údaje o zachycených 2C-hodnotách jednotlivých druhů poskytuje Tabulka č. 12 níže.

Tabulka č. 12 – velikost genomů měřených jedinců řádu Mantodea

řád, čeleď	druh	původ	pohlaví	standard	2C-hodnota (pg)	směrodatná odchylka (pg)
Mantodea, Mantidae	<i>Ameles decolor</i>	Žuljana, Pelješac, Chorvatsko	F	S	11,14	0,06
Mantodea, Mantidae	<i>Ameles spallanzania</i>	Žuljana, Pelješac, Chorvatsko	F	S	6,20	0,10
Mantodea, Empusidae	<i>Empusa fasciata</i>	Žuljana, Pelješac, Chorvatsko	F	S	6,32	0,02
Mantodea, Mantidae	<i>Mantis religiosa</i>	Bulharsko	F	S	8,16	0,03
Mantodea, Hymenopodidae	<i>Phyllocrania paradoxa</i>	N/B	F M	P	8,90 7,87	0,10 0,01

4.6 Termiti (Isoptera)

V této práci bylo provedeno šest analýz jednoho druhu – *Reticulitermes* sp. Měření byli pohlavní jedinci a dělníci. 2C-hodnotu se podařilo stanovit u pohlavního jedince (uvedeno v Tabulce č. 13 níže), 2C-hodnota dělníka tohoto druhu nebyla stanovena vzhledem ke zhoršené kvalitě materiálu způsobené transportem z místa sběru do laboratoře.

Tabulka č. 13 – velikost genomu měřených jedinců rodu *Reticulitermes*

čeleď	druh	původ	standard	2C-hodnota (pg)	směrodatná odchylka (pg)
Rhinotermitidae	<i>Reticulitermes</i> sp.	Oskorušno, Pelješac, Chorvatsko	X	2,18	0,02

5 Diskuse

Následující řádky budou hodnotit zjištěné výsledky v kontextu současného poznání a komentována budou úskalí průtokové cytometrie.

5.1 Rozdíly mezi pohlavími a jejich determinace

V souladu s výsledky jiných autorů ukazuje tato práce na více či méně výrazné rozdíly mezi pohlavími daného druhu (Hanrahan & Johnston, 2011, Picard et al., 2012, Rodrigues et al., 2016, Stuchlíková, 2020, Hawlitschek et al., 2023, Tabulka č. 14). V některých případech se jednalo takřka o zanedbatelný rozdíl, který bude dle mého názoru způsobený odchylkou měření a nelze jej považovat za jakkoliv signifikantní.

Nejvýraznější rozdíly byly v absolutních hodnotách zachyceny u druhů s velkými genomy – *Calliptamus italicus* (1,67 pg), *Heteropteryx dilatata* (1,70 pg), *Pseudoprosopia latirostris* (2,18 pg), *Stilpnochlora coulouana* (3,44 pg), *Romalea microptera* (4,56 pg). Absolutně největší rozdíl mezi pohlavími však byl zjištěn u druhu *Dares philippinensis* (5,36 pg), což je v rozporu s předchozím stejně, jako zjištěné rozdíly v relativních hodnotách. Relativně byly největší rozdíly zaznamenány u druhů *Phyllocrania paradoxa* (13,01 %), *Pseudoprosopia latirostris* (10,71 %), *Romalea microptera* (9,77 %), *Stilpnochlora coulouana* (22,59 %), *Achrioptera manga* (12,80 %), *Dares philippinensis* (73,83 %) a *Mearnsiana bullosa* (8,43 %).

Rozdíl mezi samicemi a samci je dle autorů některých studií ovlivněn systémem determinace pohlaví, respektive přítomností heteromorfních pohlavních chromozomů, případně odlišností v počtu chromozomů (Sharaf et al., 2010, He et al., 2016, Hawlitschek et al., 2023). Ačkoliv pohlavní dimorfismus z hlediska velikosti genomu není přítomen u všech druhů, není pro relevanci získaných výsledků vhodné zanedbat vliv pohlaví (Hanrahan & Johnston, 2011, Yuan et al., 2021, Hawlitschek et al., 2023). Bohužel mnohé studie údaj o pohlaví analyzovaných jedinců neobsahují a výsledná zjištěná velikost genomu tak může být zkreslena.

Zároveň se domnívám, že v některých případech může průtoková cytometrie dopomoci při determinaci pohlaví – například u druhů bez přítomnosti pohlavního dimorfismu z hlediska morfologie či barevnosti nebo u nedospělých stádií, kde tyto znaky nejsou plně vyvinuty. V případě druhů, u kterých je pohlaví determinováno systémem XX/X0 (haplo-diploidním systémem), lze očekávat výraznější rozdíly mezi samicemi a samci (Aron et al., 2003). Například u švábů, u nichž je tento systém determinace pohlaví

předpokládán pro většinu druhů (Blackmon et al., 2017), byl zaznamenán u druhu *Hyporhichnoda* sp. relativní rozdíl 0,10 % (0,01 pg absolutně). Některé studie také demonstrují, že systém determinace pohlaví XX/X0 nemusí vždy znamenat větší genom u samic. Příkladem lze uvést například druhy *Myrmeleotettix maculatus* a *Chorthippus dorsatus* (Hawlitschek et al., 2023).

Vzhledem k možným odchylkám měření způsobeným nedostatečnou údržbou přístroje (Suda, 2005), k možné vnitrodruhové variabilitě (Marescalchi et al., 1998) nebo například užití odlišných standardů, bych se osobně přikláníla k využití této metody pro detekci pohlaví pouze u druhů, kde lze předpokládat výrazný rozdíl ve velikostech genomu samic a samců. U druhů, jejichž genomy nevykazují odlišnosti výrazných rozměrů bych spíše považovala tento způsob determinace pohlaví za doplňkový.

Tabulka č. 14 níže vyjadřuje absolutní (pg) a relativní (%) rozdíly mezi zjištěnými 2C-hodnotami samců a samic. Oba tyto údaje ukazují, o kolik pg nebo % mají jedinci s vyšší hodnotou větší genom (v tomto datasetu měla samice vždy větší genom než samec). Zástupci Mantodea jsou označeni modrou barvou, zástupci Orthoptera jsou označeni oranžovou barvou a zástupci Phasmatodea jsou označeni zelenou barvou.

Tabulka č. 14 – rozdíl ve velikostech genomů mezi pohlavími

řád	druh	absolutní rozdíl mezi pohlavími (pg)	relativní rozdíl mezi pohlavími (%)	pohlaví s větší 2C-hodnotou
Mantodea	<i>Phyllocrania paradoxa</i>	1,03	13,01	F
Orthoptera	<i>Anacridium aegyptium</i>	0,95	4,14	F
Orthoptera	<i>Calliptamus italicus</i>	1,67	7,49	F
Orthoptera	<i>Locusta migratoria</i>	1,10	7,82	F
Orthoptera	<i>Phaeophilacris bredoides</i>	0,25	5,08	F

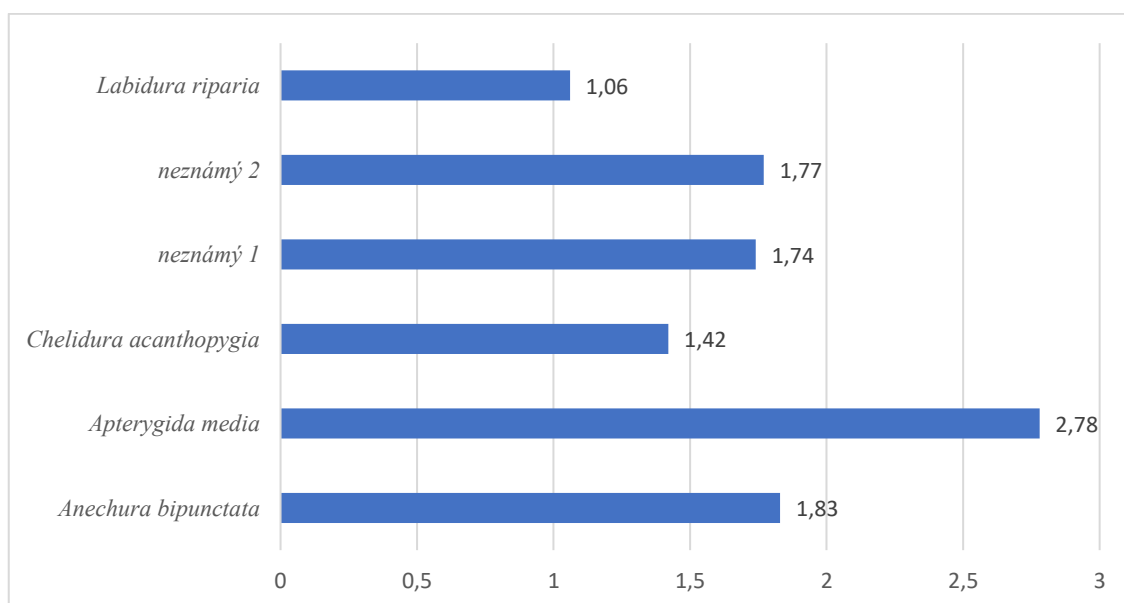
Orthoptera	<i>Pseudoproscopia latirostris</i>	2,18	10,71	F
Orthoptera	<i>Romalea microptera</i>	4,56	9,77	F
Orthoptera	<i>Stilpnochlora coulöniana</i>	3,44	22,59	F
Orthoptera	<i>Tetrataenia surinama</i>	1,07	4,69	F
Orthoptera	<i>Xya pfaendleri</i>	0,33	5,97	F
Phasmatodea	<i>Achrioptera manga</i>	0,69	12,80	F
Phasmatodea	<i>Dares philippinensis</i>	5,36	73,83	F
Phasmatodea	<i>Heteropteryx dilatata</i>	1,70	2,42	F
Phasmatodea	<i>Lamachodes</i> sp. Bokor	0,50	4,44	F
Phasmatodea	<i>Mearnsiana bullosa</i>	0,54	8,43	F
Phasmatodea	<i>Neohirasea maerens</i>	0,83	7,00	F
Phasmatodea	<i>Sungaya inexpectata</i>	0,42	6,70	F
Phasmatodea	<i>Tisamenus</i> sp. Palau	0,23	4,47	F

5.2 Velikosti genomů napříč Polyneoptera

5.2.1 Škvoři (Dermaptera)

Do Animal Genome Size Database byl doposud zanesen pouze jediný záznam, a to konkrétně velikost genomu druhu *Labidura riparia* z čeledi Labiduridae. 2C-hodnota tohoto druhu byla stanovena pomocí průtokové cytometrie a činí 1,06 pg. Graf č. 1 níže zobrazuje velikosti genomů jednotlivých druhů, u nichž je tato hodnota v současnosti známa. 2C-hodnoty se v rámci tohoto řádu pohybují v rozmezí od 1,06 pg (*Labidura riparia*) do 2,78 pg (*Apterygida media*). V tuto chvíli tak lze říci, že škvoři (Dermaptera) patří mezi řády s menšími genomy.

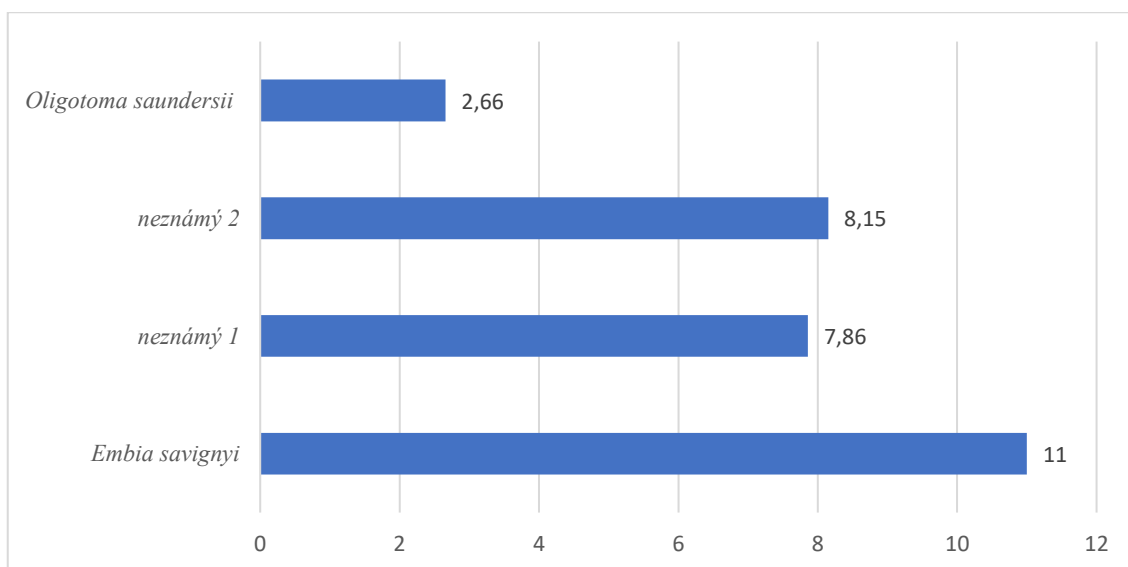
Graf č. 1 – velikosti genomů v řádu Dermaptera



5.2.2 Snovatky (Embioptera)

Animal Genome Size Database v současnosti obsahuje pouze jediný záznam ze skupiny Embioptera – *Oligotoma saundersii*. Velikost genomu *Oligotoma saundersii* byla získána za využití průtokové cytometrie a 2C-hodnota tohoto druhu činí 2,66 pg. Graf č. 2 níže zobrazuje velikosti genomů jednotlivých druhů, u nichž je tato hodnota v současnosti známa. 2C-hodnoty se v rámci tohoto řádu pohybují v rozmezí od 2,66 pg (*Oligotoma saundersii*) do 11,00 pg (*Embia savignyi*). V relativních hodnotách se jedná o více než čtyřnásobný rozdíl mezi nejmenším a největším doposud zjištěným genomem v řádu Embioptera.

Graf č. 2 – velikosti genomů v řádu Embioptera



5.2.3 Strašilky (Phasmatodea)

Informace z Animal Genome Size Database naznačovaly, že bude pravděpodobně nutné použít několik různých standardů vzhledem k výrazným rozdílům ve velikostech genomu jednotlivých druhů. Aktuálně jsou v této databázi k dispozici velikosti genomů devíti druhů, přičemž většina z dostupných dat byla získána díky průtokové cytometrii. V případě dvou druhů *Bacillus grandii grandii* a *Bacillus rossius redtenbacheri* jsou k dispozici data pro obě pohlaví. Samici druhu *Bacillus grandii grandii* byla naměřena 2C-hodnota 5,22 pg, velikost genomu samce byla zjištěna menší – 4,32 pg. 2C-hodnota samice druhu *Bacillus rossius redtenbacheri* je rovna 4,34 pg, zatímco samec tohoto druhu má nejmenší velikost genomu z doposud měřených zástupců Phasmatodea – jeho 2C-hodnota činí 3,9 pg. Naopak největší genom patří druhu *Extatosoma tiaratum*, jehož 2C-hodnota dosahuje 16 pg.

Nejmenší naměřená velikost genomu v rámci této práce 5,15 pg byla zjištěna u samce druhu *Tisamenus* sp. Palaui, samice téhož druhu měla v absolutních hodnotách o 0,23 pg (relativně o 4,47 %) větší genom. Naopak největší genom byl zjištěn u druhu *Heteropteryx dilatata* (Obrázek č. 6). Tento druh byl měřen opakovaně z důvodu možné standardizace. Jak ukazuje Tabulka č. 7 níže, průměrná velikost genomu (2C-hodnota) měřených samců byla zjištěna v hodnotě 70,22 pg, zatímco u samic byl zjištěn průměrně genom větší, 71,92 pg. Jedná se tak o jeden z největších genomů

doposud zjištěných u hmyzu. Bohužel rozptyl v naměřených 2C-hodnotách mezi samicemi a samci, ale i mezi jedinci jednoho pohlaví je dle Tabulky č. 7 příliš veliký. Směrodatná odchylka vypočítaná pro samice činí 4,11 *pg*, pro samce pak 2,92 *pg*. Za těchto okolností by užití *Heteropteryx dilatata* jakožto standardu působilo značné nepřesnosti v měřeních. Není však v tuto chvíli jasné, co je příčinou natolik odlišných hodnot a bude nutné se této problematice dále hlouběji věnovat.

Stejně jako v případě *Heteropteryx dilatata* probíhala měření opakovaně také u druhů *Medauroidea extradentata* (Tabulka č. 8) a *Sungaya inexpectata* (Tabulka č. 9). V případě druhu *Medauroidea extradentata* byly měření podrobeny pouze samice vzhledem ke skutečnosti, že se jedná o parthenogenetický druh. Celkem u tohoto druhu proběhlo dvacet osm analýz. Průměrná velikost genomu byla zjištěna 8,06 *pg*. Největší zjištěný rozdíl mezi dvěma jedinci tohoto druhu v absolutních hodnotách činil 0,85 *pg*, směrodatná odchylka byla pro všechny jedince vypočítána 0,25 *pg*.

Dalším z potenciálních nových živočišných, respektive hmyzích standardů by mohl být druh *Sungaya inexpectata*. Tento druh byl měřen celkem dvačtyřicetkrát – jedenáct samic a samců po jedné analýze a pět samic a samců po dvou analýzách. Průměrná velikost genomu u samic byla zjištěna v hodnotě 6,69 *pg*, u samců pak 6,27 *pg*. Největší rozdíl mezi dvěma samicemi činil v absolutních hodnotách 0,64 *pg* a mezi samci 0,4 *pg*, směrodatná odchylka byla vypočítána u samic 0,16 *pg*, u samců 0,14 *pg*.

5.2.4 Rovnokřídli (Orthoptera)

Animal Genome Size Database obsahuje v současnosti sedmdesát šest záznamů s informací o velikosti genomu zástupců řádu Orthoptera. Pouze deset z nich bylo získáno pomocí průtokové cytometrie a mnohé ze záznamů jsou duplicitní. Databáze při odečtení duplicit poskytuje informace o padesáti druzích z řádu Orthoptera. Velikost genomů se v databázi pohybuje v rozmezí od 3,42 *pg* (*Oecanthus niveus*) do 33,96 *pg* (*Podisma pedestris*), respektive největší publikovaný údaj v současnosti patří druhu *Bryodemella tuberculata* (43,92 *pg*). (Hawlitschek et al., 2023). Obě tyto hranice byly překonány, jak ukazují výsledky v Tabulce č. 10). Nejmenší naměřený genom 1,59 *pg* byl zjištěn u druhu *Myrmecophilus acervorum*, následovaný druhem *Gryllotalpa gryllotalpa* s hodnotou 2,54 *pg*.

Naopak velké genomy byly zjištěny u druhů *Bradyporus dasypus* (31,52 pg), *Stethophyma grossum* (34,79 pg), *Euthystira brachyptera* (39,43 pg), *Romalea microptera* (51,23 pg samice, 46,67 pg samec), *Tropidacris collaris* (54,59 pg), *Zonocerus elegans* (57,60 pg, Obrázek č. 7), *Phymateus leprosus* (70,74 pg). (70,74 pg, Obrázek č. 8), dále pak u třech druhů podřádu Caelifera s hodnotami 33,40 pg, 43,08 pg, 64,56 pg a samce jednoho druhu z čeledi Pyrgomorphidae 109,19 pg. Vůbec největší naměřené hodnoty se podařilo získat u druhů *Dictyophorus spumans* (Obrázek č. 9), jehož genom dosahuje úctyhodné velikosti 139,91 pg a *Dictyophorus griseus* (Obrázek č. 10), který se pyšní velikostí genomu 149,33 pg. Jedná se o druhy, které stejně jako *Zonocerus elegans* a *Phymateus leprosus* zastupují čeleď Pyrgomorphidae. V současnosti se rozmezí velikostí genomů v rámci skupiny Orthoptera pohybuje od 1,59 pg do 149,33 pg.

Mezi autory probíhá diskuze o důvodech velkých genomů v rámci řádu Orthoptera. Velké genomy jsou dle dosavadních studií včetně této práce doménou „ne-grylloidní“ skupiny nadčeledí podřádu Ensifera a téměř všech nadčeledí podřádu Caelifera vyjma Tridactyloidea, kde je k dispozici prozatím údaj o jediném druhu (Yuan et al., 2021, Gregory, 2022, Hawlitschek et al., 2023). Někteří autoři se domnívají, že za velkými genomy rovnokřídlých stojí polyploidie, což je jev jako málo pravděpodobné (Hawlitschek et al., 2023) a výsledky studií ukazují, že u předků rovnokřídlého hmyzu nebyl tento jev zaznamenán (Li et al., 2018). Dalším z uvažovaných důvodů jsou repetitivní sekvence, které byly objeveny u několika zástupců řádu Caelifera (Wang et al., 2014, Shah et al., 2020, Verlinden et al., 2021) nebo velký počet chromozomů, nicméně ani zde nebyla zachycena pozitivní korelace (Hawlitschek et al., 2023). Zvažována také byla korelace mezi velikostí těla a velikostí genomu, která nebyla v Tettigonidae prokázána (Yuan et al., 2021). Nicméně jak upozorňují jiní autoři, pro testování této hypotézy bude třeba se zaměřit cíleně na další konkrétní skupiny (Hawlitschek et al., 2023). Data získaná v rámci této práce naznačují, že velikost (délka) těla nebude pravděpodobně rozhodujícím faktorem (Tabulka č. 15). Velikost těla je ale ovlivněna mnoha faktory jako například potrava, teplota nebo přítomnost toxinů (Whitman, 2008) a domnívám se tak, že v dalších studiích bude třeba brát tyto proměnné v potaz. Důvodem velkých genomů by mohla být přítomnost obranných mechanismů v podobě toxických látek, které vylučují zástupci čeledí s největšími zaznamenanými genomy - Romaleidae a Pyrgomorphidae (Whitman et al., 1992, Idowu et al., 2009).

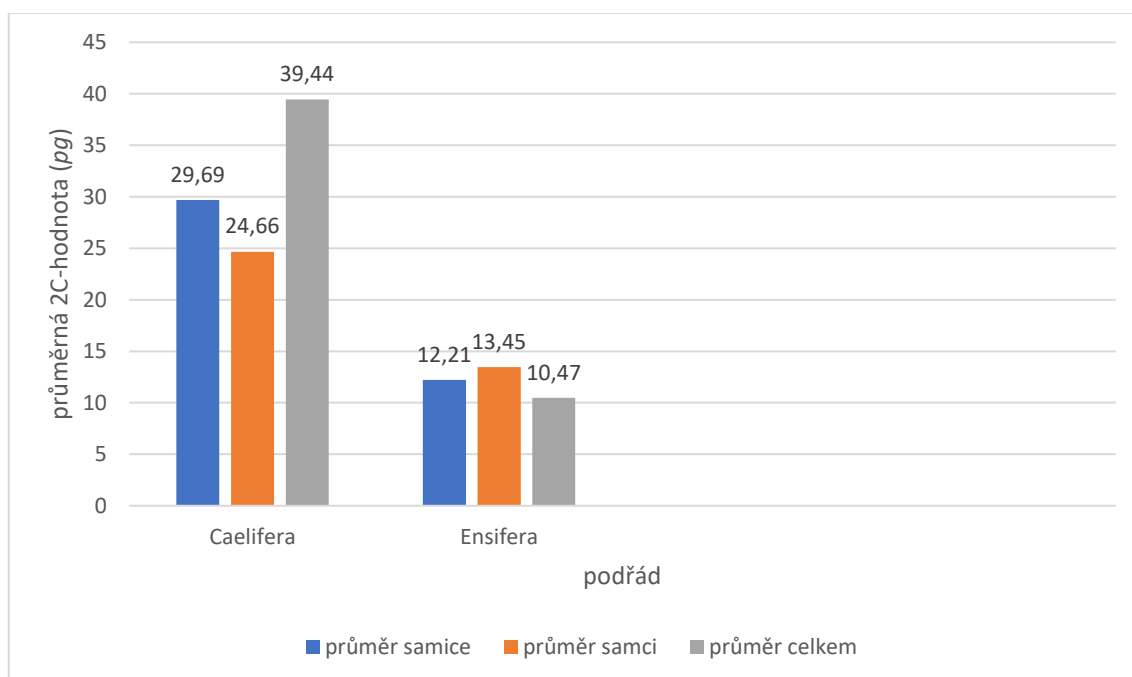
Tabulka č. 15 – výčet jedinců velkých genomů

nadčeleď	čeleď	druh	pohlaví	2C- hodnota (pg)	velikost těla (mm)
Acridoidea	Acrididae	<i>Acrida ungarica</i>	F	24,67	F:46-56 M:30-37
Acridoidea	Acrididae	<i>Anacridium aegyptium</i>	F1 F2 M	23,25 24,30 22,83	F:46-70 M:30-56
Acridoidea	Acrididae	<i>Calliptamus italicus</i>	F M	23,96 22,29	F:22-40 M:14-25
Acridoidea	Acrididae	<i>Euthystira brachyptera</i>	?	39,43	F:19-22 M:14-17
Acridoidea	Acrididae	<i>Chorthippus biguttulus</i>	?	24,01 24,72	F:16-23 M:13-16
Acridoidea	Acrididae	<i>Chorthippus dorsatus</i>	?	26,49	F:18-21 M:13-17
Acridoidea	Acrididae	<i>Oedaleus decorus</i>	?	23,76	F:25-43 M:18-31
Acridoidea	Romaleidae	<i>Romalea microptera</i>	F M	51,23 46,67	cca 50-70*
Acridoidea	Acrididae	<i>Stethophyma grossum</i>	M	34,79	F:28-35 M:16-25
Acridoidea	Acrididae	<i>Tetrataenia surinama</i>	F M	23,89 22,82	18-23
Acridoidea	Romaleidae	<i>Tropidacris collaris</i>	F	54,59	100-110
Eumastacoidea	Proscopiidae	<i>Pseudoproscopia latirostris</i>	F M	22,54 20,36	F:140-150 M:80-90
Pyrgomorphoidea	Pyrgomorphidae	<i>Dictyophorus griseus</i>	F	149,33	F: 47-50
Pyrgomorphoidea	Pyrgomorphidae	<i>Dictyophorus spumans</i>	?	139,91	cca 80
Pyrgomorphoidea	Pyrgomorphidae	<i>Phymateus leprosus</i>	F	70,74	F:50-70 M: cca 40
Pyrgomorphoidea	Pyrgomorphidae	<i>Zonocerus elegans</i>	?	57,6	30-40
Tettigonioidea	Tettigoniidae	<i>Bradyporus dasypus</i>	M	31,52	F:46-60 M:47-57
Tettigonioidea	Tettigoniidae	<i>Cosmoderus femoralis</i>	F	24,38	cca 50
Tettigonioidea	Tettigoniidae	<i>Ephippiger discoidalis</i>	F	24,47	cca 40
Tettigonioidea	Tettigoniidae	<i>Stilpnochlora coulouiana</i>	F M	18,67 15,23	cca 40

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

Větší genomy byly zjištěny u podřádu Caelifera (Graf č. 3), kde průměrná 2C-hodnota všech zjištěných genomů v rámci našeho datasetu činí 39,44 *pg*. Průměrná 2C-hodnota podřádu Ensifera byla vypočtena 10,47 *pg*. Modré sloupce v Grafu č. 3 zobrazují průměrnou 2C-hodnotu pro samice daného podřádu, oranžové sloupce zobrazují průměrnou 2C-hodnotu pro samce daného podřádu. Šedé sloupce jsou průměrem všech 2C-hodnot v daném podřádu bez ohledu na pohlaví, tzn. že do této hodnoty byli uvažováni i jedinci, jejichž pohlaví nebylo určeno.

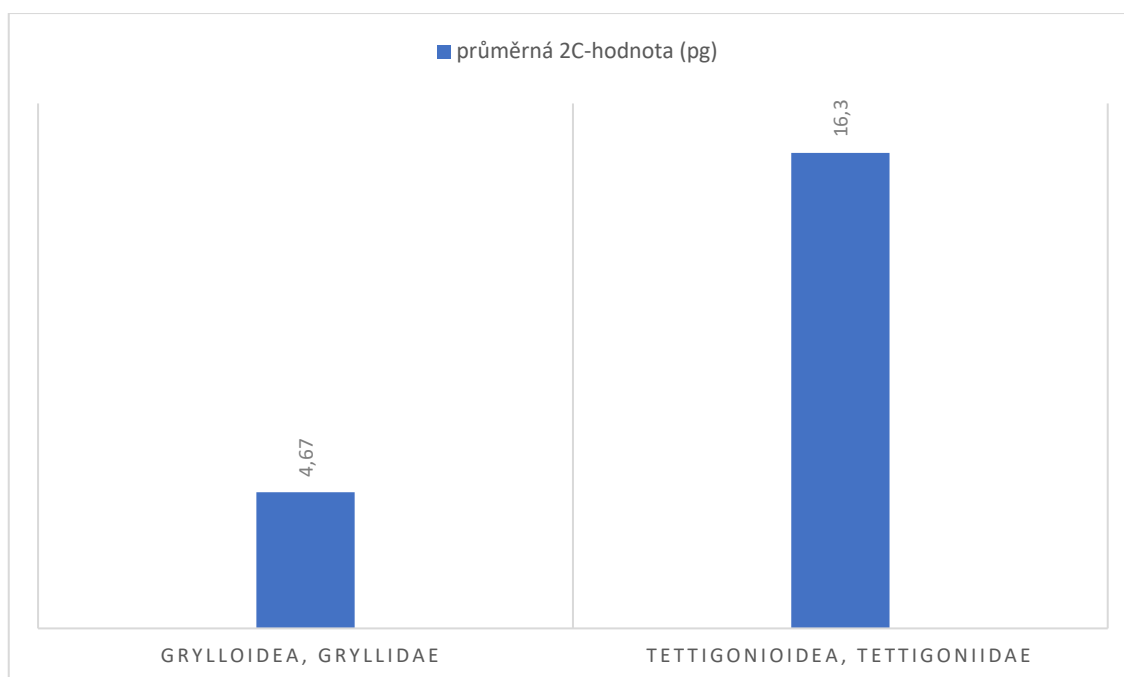
Graf č. 3 – velikost genomů podřádů Caelifera a Ensifera



5.2.4.1 Kobylky (Ensifera)

Graf č. 5 níže zobrazuje průměrné velikosti genomů zástupců dané čeledi bez ohledu na pohlaví jedince. Hodnoty byly vypočítány u těch čeledí, kde byli měřeni alespoň dva jedinci. Malé genomy byly zaznamenány u čeledi Gryllidae (průměrně 4,67 *pg*), což je v souladu s jinými studiemi a záznamy v Animal Genome Size Database (Hanrahan & Johnston, 2011, Gregory, 2022, Havlitschek et al., 2023). V rámci nadčeledi Grylloidea byly zachyceny nejmenší genomy řádu Orthoptera tohoto datasetu – 1,59 *pg* (*Myrmecophilus acervorum*, Grylloidea, Myrmecophilidae) a 2,54 *pg* (*Gryllotalpa gryllotalpa*, Grylloidea, Gryllotalpidae).

Graf č. 4 – velikost genomů podřádu Ensifera dle příslušnosti k čeledi



V jednotlivých čeledích byly zaznamenány velikosti genomů v těchto rozmezích:

Gryllidae: 1,59 pg – 6,92 pg (*Myrmecophilus acervorum*; *Nemobius sylvestris*)

Gryllotalpidae: 2,54 pg – 6,82 pg (*Gryllotalpa gryllotalpa*; *Neoscapteriscus borellii*) (Hanrahan & Johnston 2011).

Tettigoniidae: 4,7 pg – 31,52 pg (*Eupholidoptera tyrrhenica*; *Bradyporus dasypus*)

Z dosavadních výsledků vyplývá, že nadčeleď Grylloidea zahrnuje zástupce malých genomů (Yuan et al., 2021, Hawlitschek et al., 2023).

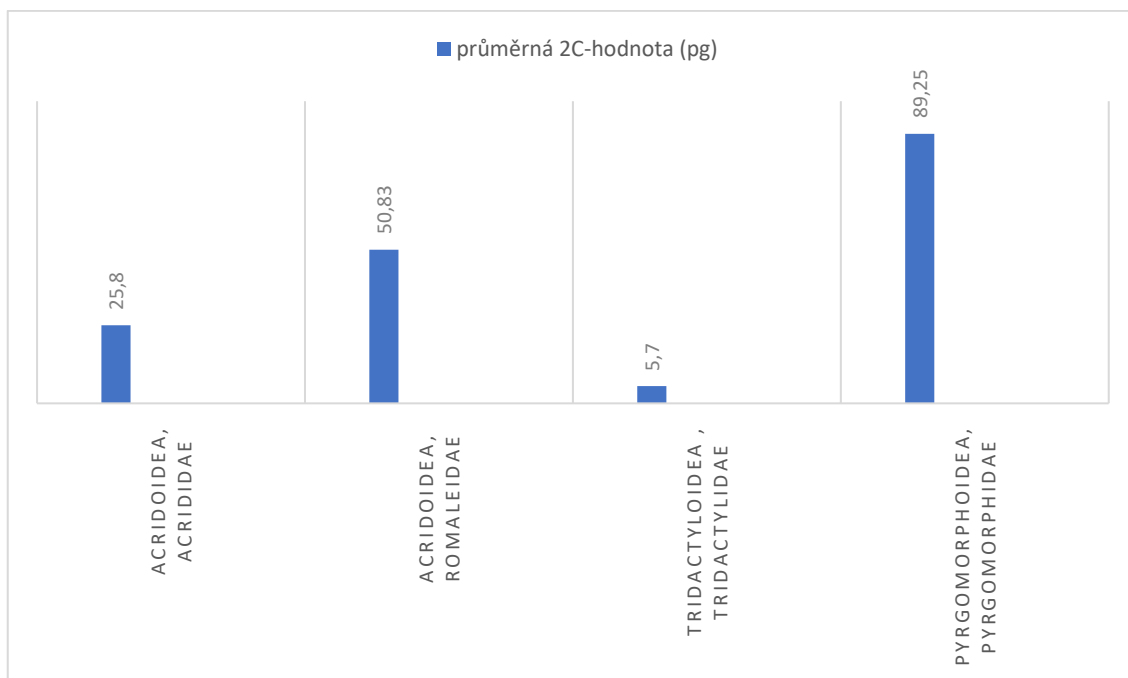
Pro čeledi Gryllacrididae a Myrmecophilidae v současnosti nejsou dostupné výsledky dalších druhů ke srovnání s výsledky této práce, respektive do Animal Genome Size Database byl zanesen jediný údaj o velikosti genomu druhu *Ceuthophilus stygius* (2C-hodnota 19,1 pg) získaný metodou Feulgenovy denzitometrie (Rasch, 1986).

5.2.4.2 Saranče (Caelifera)

Graf č. 4 níže zobrazuje průměrné velikosti genomů zástupců dané čeledi bez ohledu na pohlaví jedince. Hodnoty byly vypočítány u těch čeledí, kde byli měřeni alespoň dva jedinci různých dvou druhů. Průměrně nejmenší genomy byly zaznamenány v rámci čeledi Tridactylidae (5,7 pg), naopak zástupci čeledi Pyrgomorphidae reprezentují

skupinu s největšími genomy (89,25 pg). Výrazný rozdíl byl zachycen v rámci nadčeledi Acridoidea, a to mezi čeledmi Acrididae (25,80 pg) a Romaleidae (50,83 pg).

Graf č. 5 – velikost genomů podřádu Caelifera dle příslušnosti k čeledi



V jednotlivých čeledích byly zaznamenány velikosti genomů v těchto rozmezích:

Acrididae: 7,68 pg , respektive 12,88 pg – 43,84 pg (*Melanoplus differentialis*; *Locusta migratoria*; *Bryodemella tuberculata*) (Swift & Kleinfeld, 1953, Wang et al., 2014, Hawlitschek et al., 2023)

Romaleidae: 46,67 pg – 54,59 pg (*Romalea microptera*; *Tropidacris collaris*)

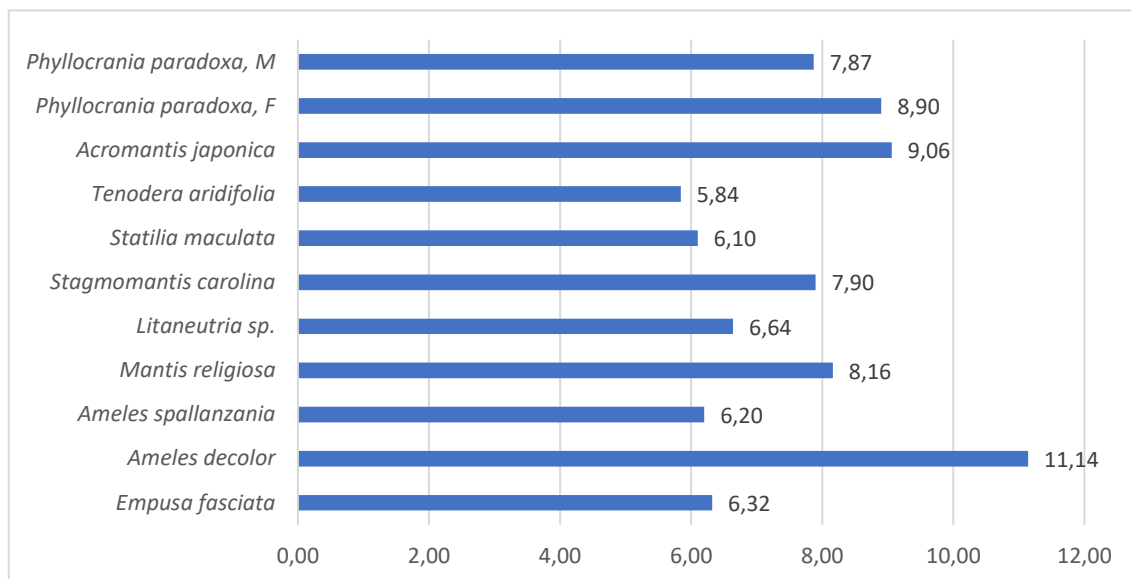
Pyrgomorphidae: 33,40 pg – 149,33 pg (saranče neznámého druhu z JAR; *Dictyophorus griseus*)

Tridactylidae: 5,26 pg – 5,86 pg (neznámý druh; *Xya pfaendleri*) (Hanrahan & Johnston 2011)

Pro čeledi Proscopiidae, Chorotypidae v současnosti nejsou dostupné výsledky dalších druhů ke srovnání s výsledky této práce.

5.2.5 Kudlanky (Mantodea)

Graf č. 6 – velikosti genomů v řádu Mantodea



Animal Genome Size Database obsahuje data o velikostech genomů pěti druhů, přičemž rozpětí 2C-hodnot je od 5,84 pg (*Tenodera aridifolia*) do 9,06 pg (*Acromantis japonica*) (Koshikawa et al., 2008), metoda průtokové cytometrie byla použita pro stanovení velikosti genomů u jedinců *Litaneutria* sp. (2C-hodnota zjištěna 6,64 pg) a *Stagmomantis carolina* (2C-hodnota zjištěna 7,9 pg) (Hanrahan & Johnston 2011). Rozpětí velikostí genomů řádu Mantodea se tak v současnosti pohybuje od 5,84 pg (*Tenodera aridifolia*) do 11,14 pg (*Ameles decolor*). Graf č. 6 výše zobrazuje všechny doposud zjištěné velikosti genomů jednotlivých druhů pokrývající tři čeledi – Empusidae (*Empusa fasciata*), Mantidae (*Tenodera aridifolia*, *Statilia maculata*, *Stagmomantis carolina*, *Litaneutria* sp., *Mantis religiosa*) a Hymenopodidae (*Acromantis japonica*, *Phyllocrania paradoxa*).

5.2.6 Termiti (Isoptera)

Dle Animal Genome Size Database je rozptýl doposud naměřených 2C-hodnot v rámci skupiny Isoptera v rozmezí 1,16 pg (*Zootermopsis nevadensis*) až 3,8 pg (*Pericapritermes nitobei*) (Koshikawa et al., 2008). Vzhledem k předpokládané velikosti genomu ve výše uvedeném rozmezí byl interním standardem zvolen lilek višňový (*Solanum pseudocapsicum*), jehož 2C-hodnota činí 2,60 pg. Velikost genomu studovaného vzorku však byla příliš podobná velikosti genomu zvoleného standardu a došlo k překryvu peaků. Následující analýzy tak byly provedeny s nově zvoleným

standardem – ostřicí ostrou (*Carex acutiformis*), jejíž 2C-hodnota je zhruba třikrát menší než 2C-hodnota původně zvoleného standardu, a sice 0,82 pg.

Animal Genome Size Database obsahuje šest záznamů velikostí genomů zástupců čeledi Rhinotermitidae z celkových šestnácti pro skupinu Isoptera, z čehož dva záznamy byly získány pomocí průtokové cytometrie. Rozptyl velikosti genomů v této čeledi je od 1,72 pg (*Coptotermes formosanus*) do 2,14 pg (*Reticulitermes flavipes* a *Reticulitermes speratus kyushuensis*). Variabilita mezi velikostmi genomů termitů je ve srovnání s variabilitou u švábů velmi nízká. V nedávné studii byla publikována data čítající více než sto čtyřicet druhů švábů. Nejmenší zachycený genom v této studii 3,41 pg patřil samci druhu *Holocompsa nitidula* a největší zjištěný genom 35,17 pg samici druhu *Therea olegrandjeani*, oba v rámci čeledi Corydiidae (Stuchlíková, 2020). Naproti tomu termitům blízké příbuzné druhy v rámci švábů *Cryptocercus punctulatus* a *Cryptocercus kyebangensis* mají genomy podobné velikostem genomů termitů – 2,64 pg a 2,32 pg (Koshikawa et al., 2008). Ačkoliv doposud nebyl prokázán vztah mezi malým genomem a vznikem subsociality, respektive eusociality, někteří autoři se domnívají, že jistá souvislost by zde mohla být přítomna (Koshikawa et al., Stuchlíková et al., 2020).

5.3 Negativa průtokové cytometrie

5.3.1 Názvosloví

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

5.3.2 Standardy

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

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

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

Potenciálně vhodnými druhy pro budoucí standardizaci se dle předběžných výsledků jeví *Heteropteryx dilatata*, *Medauroidea extradentata*, *Sungaya inexpectata* a *Locusta migratoria*. Jak již bylo zmíněno v úvodní části práce, ideální standard by měl splňovat několik kritérií – podobná velikost genomu vzorku a standardu, dobrá dostupnost, stabilní genom, snadná manipulace s dotyčným jedincem. V tuto chvíli by bylo unáhlené hodnotit, zda po absolvování procesu standardizace budou tyto druhy vyhovující, nicméně první tři kritéria se prozatím kromě druhu *Heteropteryx dilatata* jeví nadějně. Kritický moment vnímám osobně v posledním bodu, a to především u *Heteropteryx dilatata* a *Locusta migratoria*. První zmiňovaný druh, *Heteropteryx dilatata*, v tomto bodu není zcela vyhovující vzhledem k morfologii končetin a ochotě těchto jedinců ji nezřídka kdy využít v momentě odběru tkáně (Obrázek č. 9). Druhý zmiňovaný druh, *Locusta migratoria*, nedisponuje otrněnými končetinami v takové míře jako předchozí druh, nicméně s oblibou dostává pomocí skákavých končetin svého druhového jména – tedy „*migratoria*“. Jak se však ukázalo nejen v této studii, dobře poslouží také mražený materiál a problém tak není neřešitelným.

6 Závěr

Diplomová práce si kladla za cíl rozšířit znalost velikosti genomů v rámci skupiny Polyneoptera metodou průtokové cytometrie a porovnat rozdíly velikostí genomů v rámci jednotlivých řádů této skupiny.

Podařilo se zjistit velikost genomů celkem u osmdesáti druhů hmyzu v rámci skupiny Polyneoptera, z nichž většina nebyla dosud publikována. Dataset známých genomů byl díky této práci rozšířen o tři zástupce Dermaptera, jednoho zástupce Embioptera, třináct druhů z řádu Phasmatodea, pět druhů řádu Mantodea, jednoho zástupce ze skupiny Isoptera a dvacet šest druhů Orthoptera. Zjištěné velikosti genomu byly porovnávány se známými údaji zanesenými v Animal Genome Size Database a údaji publikovanými v nejnovějších studiích. Mezi měřenými jedinci bylo zaznamenáno několik druhů, jejichž 2C-hodnoty výrazně přesahovaly doposud publikované údaje – *Tropidacris collaris* (54,59 pg), *Dictyophorus spumans* (139,91 pg) či *Dictyophorus griseus* (149,33 pg), jehož 2C-hodnota několikanásobně převyšuje zveřejněné výsledky a jedná se tak u hmyzu o vůbec největší zjištěnou velikost genomu.

Nad rámec stanovených cílů byly natipovány čtyři možné budoucí hmyzí standardy – *Heteropteryx dilatata*, *Medauroidea extradentata*, *Sungaya inexpectata* a *Locusta migratoria*. Tyto druhy (vyjma *Heteropteryx dilatata*) vykazují relativně stabilní genom, jsou nenáročné na chov a pokrývají širokou škálu velikostí genomů ve srovnání s doposud testovanými standardy. Nutná je však další rozsáhlejší studie, ve kterou budou tyto druhy důkladněji testovány.

Seznam použité literatury

*Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical reviews in biotechnology*, 37(2), 163-176.

Aron, Serge, Ludivine De Menten, and Dirk Van Bockstaele. "Brood sex ratio determination by flow cytometry in ants." *Molecular Ecology Notes* 3.3 (2003): 471-475.

Aron, S., Passera, L., & Keller, L. (2004). Evolution of miniaturisation in inquiline parasitic ants: timing of male elimination in *Plagiolepis pygmaea*, the host of *Plagiolepis xene*. *Insectes sociaux*, 51, 395-399.

Bank, S., Cumming, R. T., Li, Y., Henze, K., Le Tirant, S., & Bradler, S. (2021). A tree of leaves: Phylogeny and historical biogeography of the leaf insects (Phasmatodea: Phylliidae). *Communications Biology*, 4(1), 932.

Bánki, O., Roskov, Y., Döring, M., Ower, G., Vandepitte, L., Hobern, D., Remsen, D., Schalk, P., DeWalt, R. E., Keping, M., Miller, J., Orrell, T., Aalbu, R., Abbott, J., Adlard, R., Adriaenssens, E. M., Aedo, C., Aesch, E., Akkari, N., et al. (2023). Catalogue of Life Checklist (Version 2023-01-12). Catalogue of Life.

Barlogie, B., Raber, M. N., Schumann, J., Johnson, T. S., Drewinko, B., Swartzendruber, D. E., ... & Freireich, E. J. (1983). Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer research*, 43(9), 3982-3997.

Beaulieu, J. M., Leitch, I. J., Patel, S., Pendharkar, A., & Knight, C. A. (2008). Genome size is a strong predictor of cell size and stomatal density in angiosperms. *New Phytologist*, 179(4), 975-986.

Beçak, M. L., & Kobashi, L. S. (2004). Evolution by polyploidy and gene regulation in *Anura*. *Genet. Mol. Res*, 3(2), 195-212.

Beutel, R. G., Wipfler, B., Gottardo, M., & Dallai, R. (2013). Polyneoptera or "lower Neoptera"-new light on old and difficult phylogenetic problems. *Atti Accademia nazionale italiana di entomologia*, 61, 113-142.

Bickham, J. W., Hanks, B. G., Hale, D. W., & Martin, J. E. (1993). Ploidy diversity and the production of balanced gametes in male twist-necked turtles (*Platemys platycephala*). *Copeia*, 723-727.

Blackmon, H., Ross, L., & Bachtrög, D. (2017). Sex determination, sex chromosomes, and karyotype evolution in insects. *J. Hered.* 108, 78–93.

Boulesteix, M., Weiss, M., & Biéumont, C. (2006). Differences in genome size between closely related species: the *Drosophila melanogaster* species subgroup. *Molecular biology and evolution*, 23(1), 162-167.

Bourguignon, T., Tang, Q., Ho, S. Y., Juna, F., Wang, Z., Arab, D. A., ... & Lo, N. (2018). Transoceanic dispersal and plate tectonics shaped global cockroach distributions: evidence from mitochondrial phylogenomics. *Molecular Biology and Evolution*, 35(4), 970-983.

Brandizzi, F., & Grilli Caiola, M. (1998). Flow cytometric analysis of nuclear DNA in *Crocus sativus* and allies (Iridaceae). *Plant systematics and evolution*, 211(3), 149-154.

Bradler, S., & Buckley, T. R. (2018). Biodiversity of phasmatodea. *Insect biodiversity: science and society*, 2, 281-313.

Bresseel, J., & Constant, J. (2014). Giant Sticks from Vietnam and China, with three new taxa including the second longest insect known to date (Phasmatodea, Phasmatidae, Clitumninae, Pharnaciini). *European Journal of Taxonomy*, (104).

Brown, M., & Wittwer, C. (2000). Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clinical chemistry*, 46(8), 1221-1229.

Brown, J. K., Lambert, G. M., Ghanim, M., Czosnek, H., & Galbraith, D. W. (2005). Nuclear DNA content of the whitefly *Bemisia tabaci* (Aleyrodidae: Hemiptera) estimated by flow cytometry. *Bulletin of entomological research*, 95(4), 309-312.

Cameron, S. L., Barker, S. C., & Whiting, M. F. (2006). Mitochondrial genomics and the new insect order Mantophasmatodea. *Molecular phylogenetics and evolution*, 38(1), 274-279.

Dallas, C. E., Lingenfelter, S. F., Lingenfelter, J. T., Holloman, K., Jagoe, C. H., Kind, J. A., ... & Smith, M. H. (1998). Flow cytometric analysis of erythrocyte and leukocyte

DNA in fish from Chernobyl-contaminated ponds in the Ukraine. *Ecotoxicology*, 7, 211-219.

Davey, H. M., & Kell, D. B. (1996). Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiological reviews*, 60(4), 641-696.

Doležel, J., & Göhde, W. (1995). Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 19(2), 103-106.

Doležel, J. (2003). Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry Part A*, 51, 127-128.

*Doležel, J., & Bartoš, J. A. N. (2005). Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of botany*, 95(1), 99-110.

Doležel, J., Greilhuber, J., & Suda, J. (Eds.). (2007). *Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes*. John Wiley & Sons.

Doležel, J., Greilhuber, J., & Suda, J. (2007). Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature protocols*, 2(9), 2233-2244.

*Doležel, J., & Greilhuber, J. (2010). Nuclear genome size: are we getting closer?. *Cytometry Part A*, 77(7), 635-642.

Dubelaar, G. B., Casotti, R., Tarran, G. A., & Biegala, I. C. (2007). Phytoplankton and their analysis by flow cytometry. *Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes*, 287-322.

Engel, M. S., Grimaldi, D. A., & Krishna, K. (2009). Termites (Isoptera): their phylogeny, classification, and rise to ecological dominance. *American Museum Novitates*, 2009(3650), 1-27.

Evangelista, D. A., Wipfler, B., Béthoux, O., Donath, A., Fujita, M., Kohli, M. K., ... & Simon, S. (2019). An integrative phylogenomic approach illuminates the evolutionary history of cockroaches and termites (Blattodea). *Proceedings of the Royal Society B*, 286(1895), 20182076.

- Fenn, J. D., Song, H., Cameron, S. L., & Whiting, M. F. (2008). A preliminary mitochondrial genome phylogeny of Orthoptera (Insecta) and approaches to maximizing phylogenetic signal found within mitochondrial genome data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49(1), 59-68.
- Flook, P. K., & Rowell, C. H. F. (1998). Inferences about orthopteroid phylogeny and molecular evolution from small subunit nuclear ribosomal DNA sequences. *Insect Molecular Biology*, 7(2), 163-178.
- Flook, P. K., Klee, S., & Rowell, C. H. F. (1999). Combined molecular phylogenetic analysis of the Orthoptera (Arthropoda, Insecta) and implications for their higher systematics. *Systematic biology*, 48(2), 233-253.
- Gillooly, J. F., Hein, A., & Damiani, R. (2015). Nuclear DNA content varies with cell size across human cell types. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(7), a019091.
- Goldberg, J., Bresseel, J., Constant, J., Kneubühler, B., Leubner, F., Michalik, P., & Bradler, S. (2015). Extreme convergence in egg-laying strategy across insect orders. *Scientific Reports*, 5(1), 7825.
- Green, D. M., & Sessions, S. K. (Eds.). (2012). *Amphibian cytogenetics and evolution*. Academic Press.
- Gregory, T. R., Hebert, P. D., & Kolasa, J. (2000). Evolutionary implications of the relationship between genome size and body size in flatworms and copepods. *Heredity*, 84(2), 201-208.
- Gregory, T. R. (2001a). Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma. *Biological reviews*, 76(1), 65-101.
- Gregory, T. R. (2001b). The bigger the C-value, the larger the cell: genome size and red blood cell size in vertebrates. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 27(5), 830-843.
- Gregory, T. R., & MABLE, B. K. (2005). Polyploidy in animals. In *The evolution of the genome* (pp. 427-517). Academic Press.

Gregory, T. R., Nathwani, P., Bonnett, T. R., & Huber, D. P. (2013). Sizing up arthropod genomes: an evaluation of the impact of environmental variation on genome size estimates by flow cytometry and the use of qPCR as a method of estimation. *Genome*, 56(9), 505-510.

Gregory, T.R. (2022). Animal Genome Size Database. <http://www.genomesize.com>.

Greilhuber, J., Temsch, E. M., & Loureiro, J. (2007). Flow cytometry with plant cells: Analysis of genes, chromosomes and genomes. Nuclear DNA content measurement.

Greilhuber, J. (2008). Cytochemistry and C-values: the less-well-known world of nuclear DNA amounts. *Annals of Botany*, 101(6), 791-804.

Guo, L. T., Wang, S. L., Wu, Q. J., Zhou, X. G., Xie, W., & Zhang, Y. J. (2015). Flow cytometry and K-mer analysis estimates of the genome sizes of *Bemisia tabaci* B and Q (Hemiptera: Aleyrodidae). *Frontiers in physiology*, 6, 144.

Gullan, P. J., & Cranston, P. S. (2014). *The insects: an outline of entomology*. John Wiley & Sons.

Hanrahan, S. J., & Johnston, J. S. (2011). New genome size estimates of 134 species of arthropods. *Chromosome Research*, 19(6), 809-823.

Hardie, D. C., Gregory, T. R., & Hebert, P. D. (2002). From pixels to picograms: a beginners' guide to genome quantification by Feulgen image analysis densitometry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 50(6), 735-749.

Hawlitshchek, O., Sadílek, D., Dey, L. S., Buchholz, K., Noori, S., Baez, I. L., ... & Husemann, M. (2023). New estimates of genome size in Orthoptera and their evolutionary implications. *Plos one*, 18(3), e0275551.

He, K., Lin, K., Wang, G., & Li, F. (2016). Genome sizes of nine insect species determined by flow cytometry and k-mer analysis. *Frontiers in physiology*, 7, 569.

Hinegardner, R. T. (1971). An improved fluorometric assay for DNA. *Analytical biochemistry*, 39(1), 197-201.

- Hubálek, M., & Flajshans, M. (2021). Simple field storage of fish samples for measurement of DNA content by flow cytometry. *Cytometry Part A*, 99(7), 743-752.
- Hudec, K., Kolibáč, J., Laštůvka, Z., & Peňáz, M. (2007). *Příroda České republiky. Průvodce faunou*. Academia, Praha.
- Huizenga, K. M., Shaidle, M. D., Brinton, J. S., Gore, L. N. A., Ebo, M. A., Solliday, A. J., ... & Juliano, S. A. (2008). Geographic differences in the body sizes of adult *Romalea microptera*. *Journal of Orthoptera Research*, 17(2), 135-139.
- Husemann, M., Sadílek, D., Dey, L. S., Hawlitschek, O., & Seidel, M. (2020). New genome size estimates for band-winged and slant-faced grasshoppers (Orthoptera: Acrididae: Oedipodinae, Gomphocerinae) reveal the so far largest measured insect genome. *Caryologia*, 73(4), 111-120.
- Chen, W., Hasegawa, D. K., Arumuganathan, K., Simmons, A. M., Wintermantel, W. M., Fei, Z., & Ling, K. S. (2015). Estimation of the whitefly *Bemisia tabaci* genome size based on k-mer and flow cytometric analyses. *Insects*, 6(3), 704-715.
- Idowu, A. B., Edema, M. O., & Oyedepo, M. T. (2009). Extracellular enzyme production by microflora from the gut region of the variegated grasshopper *Zonocerus variegatus* (Orthoptera: Pyrgomorphidae). *International Journal of Tropical Insect Science*, 29(4), 229-235.
- Inward, D., Beccaloni, G., & Eggleton, P. (2007). Death of an order: a comprehensive molecular phylogenetic study confirms that termites are eusocial cockroaches. *Biology letters*, 3(3), 331-335.
- Jakobsen, A. "The use of trout erythrocytes and human lymphocytes for standardization in flow cytometry." *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology* 4.2 (1983): 161-165.
- Jarvis, K. J., Haas, F., & Whiting, M. F. (2005). Phylogeny of earwigs (Insecta: Dermaptera) based on molecular and morphological evidence: reconsidering the classification of Dermaptera. *Systematic Entomology*, 30(3), 442-453.

Johnston, J. S., Bennett, M. D., Rayburn, A. L., Galbraith, D. W., & Price, H. J. (1999). Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. *American Journal of Botany*, 86(5), 609-613.

Jost, M. C., & Shaw, K. L. (2006). Phylogeny of Ensifera (Hexapoda: Orthoptera) using three ribosomal loci, with implications for the evolution of acoustic communication. *Molecular phylogenetics and evolution*, 38(2), 510-530.

Kamp, J. W. (1973). *Biosystematics of the Grylloblattodea* (Doctoral dissertation, University of British Columbia).

Kjer, K. M., Carle, F. L., Litman, J., & Ware, J. (2006). A molecular phylogeny of Hexapoda. *Arthropod Syst Phylogeny*, 64(1), 35-44.

Klass, K. D., Zompro, O., Kristensen, N. P., & Adis, J. (2002). Mantophasmatodea: a new insect order with extant members in the Afrotropics. *Science*, 296(5572), 1456-1459.

Klass, K. D., & Meier, R. (2006). A phylogenetic analysis of Dictyoptera (Insecta) based on morphological characters. *Entomologische Abhandlungen*, 63(1-2), 3-50.

Kočárek P., Holuša J. & Vidlička L. (1999): Check-list of Blattaria, Mantodea, Orthoptera and Dermaptera of the Czech and Slovak Republics. – *Articulata* 14: 177-184.

Kočárek, P., Holuša, J., Vlk, R., & Marhoul, P. (2013). *Rovnokřídli (Insecta: Orthoptera) České republiky*. Academia.

Kočárek, P., & Doležal, A. (2022). *Forficula smyrnensis* Audinet-Serville, 1838 found in the Czech Republic: the inconspicuous spread of a conspicuous alien earwig. *BioInvasions Records*, 11(3), 642-651.

Koshikawa, S., Miyazaki, S., Cornette, R., Matsumoto, T., & Miura, T. (2008). Genome size of termites (Insecta, Dictyoptera, Isoptera) and wood roaches (Insecta, Dictyoptera, Cryptocercidae). *Naturwissenschaften*, 95, 859-867.

*Kristensen, N. P. (1981). Phylogeny of insect orders. *Annual review of entomology*, 26(1), 135-157.

*Kron, P., Suda, J., & Husband, B. C. (2007). Applications of flow cytometry to evolutionary and population biology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 847-876.

Kukalova-Peck, J. (1978). Origin and evolution of insect wings and their relation to metamorphosis, as documented by the fossil record. *Journal of Morphology*, 156(1), 53-125.

Li, Z., Tiley, G. P., Galuska, S. R., Reardon, C. R., Kidder, T. I., Rundell, R. J., & Barker, M. S. (2018). Multiple large-scale gene and genome duplications during the evolution of hexapods. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(18), 4713-4718.

Litvinchuk, S. N., Zuiderwijk, A., Borkin, L. J., & Rosanov, J. M. (2005). Taxonomic status of *Triturus vittatus* (Amphibia: Salamandridae) in western Turkey: trunk vertebrae count, genome size and allozyme data. *Amphibia Reptilia*, 26(3), 305-324.

Lokki, J., & Saura, A. (1980). Polyploidy in insect evolution. In *Polyploidy* (pp. 277-312). Springer, Boston, MA.

Loureiro, J., Rodriguez, E., Doležel, J., & Santos, C. (2006). Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. *Annals of Botany*, 98(3), 679-689.

MacCulloch, R. D., Upton, D. E., & Murphy, R. W. (1996). Trends in nuclear DNA content among amphibians and reptiles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 113(3), 601-605.

Marescalchi, O., Scali, V., & Zuccotti, M. (1998). Flow-cytometric analyses of intraspecific genome size variations in *Bacillus atticus* (Insecta, Phasmatodea). *Genome*, 41(5), 629-635.

*McKinnon, K. M. (2018). Flow cytometry: an overview. *Current protocols in immunology*, 120(1), 5-1.

Miller, K. B., Hayashi, C., Whiting, M. F., Svenson, G. J., & Edgerly, J. S. (2012). The phylogeny and classification of Embioptera (Insecta). *Systematic Entomology*, 37(3), 550-570.

- Müller, S., & Nebe-von-Caron, G. (2010). Functional single-cell analyses: flow cytometry and cell sorting of microbial populations and communities. *FEMS microbiology reviews*, 34(4), 554-587.
- Otto, S. P., & Whitton, J. (2000). Polyploid incidence and evolution. *Annual review of genetics*, 34(1), 401-437.
- Pagel, M., & Johnstone, R. A. (1992). Variation across species in the size of the nuclear genome supports the junk-DNA explanation for the C-value paradox. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 249(1325), 119-124.
- Palmer, M. J., Bantle, J. A., Guo, X., & Fargoxy1, W. S. (1994). Genome size and organization in the ixodid tick *Amblyomma americanum* (L.). *Insect molecular biology*, 3(1), 57-62.
- Pellicer, J., & Leitch, I. J. (2019). The Plant DNA C-values database (release 7.1): an updated online repository of plant genome size data for comparative studies. [*" New Phytologist"*].
- Picard, C. J., Johnston, J. S., & Tarone, A. M. (2012). Genome sizes of forensically relevant Diptera. *Journal of medical entomology*, 49(1), 192-197.
- Pflug, J. M., Holmes, V. R., Burrus, C., Johnston, J. S., & Maddison, D. R. (2020). Measuring genome sizes using read-depth, k-mers, and flow cytometry: methodological comparisons in beetles (Coleoptera). *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 10(9), 3047-3060.
- Rasch, E. M. (1986). Cytophotometric determination of genome size for two species of grasshoppers (Orthoptera). *Acta histochemica et cytochemica*, 19(3), 403.
- Rasplus, J. Y., & Roques, A. (2010). Dictyoptera (Blattodea, Isoptera), Orthoptera, Phasmatodea and Dermaptera. Chapter 13.3. *BioRisk*, 4, 807-831.
- Rodrigues, A. S., Silva, S. E., Pina-Martins, F., Loureiro, J., Castro, M., Gharbi, K., ... & Seabra, S. G. (2016). Assessing genotype-phenotype associations in three dorsal colour morphs in the meadow spittlebug *Philaenus spumarius* (L.) (Hemiptera: Aphrophoridae) using genomic and transcriptomic resources. *BMC genetics*, 17, 1-16.

Roux, N., et al. "Rapid detection of aneuploidy in *Musa* using flow cytometry." *Plant Cell Reports* 21.5 (2003): 483-490.

Sadílek, D., Urfus, T., & Vilímová, J. (2019a). Genome size and sex chromosome variability of bed bugs feeding on animal hosts compared to *Cimex lectularius* parasitizing human (Heteroptera: Cimicidae). *Cytometry Part A*, 95(11), 1158-1166.

Sadílek, D., Urfus, T., Vilímová, J., Hadrava, J., & Suda, J. (2019b). Nuclear genome size in contrast to sex chromosome number variability in the human bed bug, *Cimex lectularius* (Heteroptera: Cimicidae). *Cytometry Part A*, 95(7), 746-756.

Sessions, S. K., & Larson, A. (1987). Developmental correlates of genome size in plethodontid salamanders and their implications for genome evolution. *Evolution*, 41(6), 1239-1251.

Shah, A., Hoffman, J. I., & Schielzeth, H. (2020). Comparative analysis of genomic repeat content in gomphocerine grasshoppers reveals expansion of satellite DNA and helitrons in species with unusually large genomes. *Genome biology and evolution*, 12(7), 1180-1193.

Sharaf, K., Horová, L., Pavlíček, T., Nevo, E., & Bureš, P. (2010). Genome size and base composition in *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Sylvanidae) and differences between native (feral) and silo pest populations in Israel. *Journal of Stored Products Research*, 46(1), 34-37.

Sheffield, N. C., Hiatt, K. D., Valentine, M. C., Song, H., & Whiting, M. F. (2010). Mitochondrial genomics in Orthoptera using MOSAS. *Mitochondrial DNA*, 21(3-4), 87-104.

Snodgrass, R. E. (1935). *Principles of Insect Morphology* McGraw Hill Book Co. Inc. New York. p, 510-549.

Stace, C. A. (2000). Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20th and 21st centuries. *Taxon*, 49(3), 451-477.

Stock M, Lamatsch DK, Steinlein C, Epplen JT, Grosse WR, et al. 2002. A bisexually reproducing all-triploid vertebrate. *Nat. Genet.* 30:325–28

Stork, N. E. (2018). How many species of insects and other terrestrial arthropods are there on Earth?. *Annual review of entomology*, 63, 31-45.

Stuchlíková, M. Velikost genomu v evoluci švábů. Praha, 2020. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra zoologie. Vedoucí práce Janšta, Petr.

Suda, J. (2005). Co se skrývá za rostlinnou průtokovou cytometrií. *Živa*, 53(1), 46-48.

Suda, J., Kron, P., Husband, B. C., & Trávníček, P. (2007). Flow cytometry and ploidy: applications in plant systematics, ecology and evolutionary biology. *Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes*, 103-130.

Svartman, M., Stone, G., & Stanyon, R. (2005). Molecular cytogenetics discards polyploidy in mammals. *Genomics*, 85(4), 425-430.

Swift, H. (1950). The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 36(11), 643-654.

Swift, H., & Kleinfeld, R. (1953). DNA in grasshopper spermatogenesis, oögenesis, and cleavage. *Physiological Zoology*, 26(4), 301-311.

Szumik, C., Edgerly, J. S., & Hayashi, C. Y. (2008). Phylogeny of embiopterans (Insecta). *Cladistics*, 24(6), 993-1005.

Taft, R. J., Pheasant, M., & Mattick, J. S. (2007). The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. *Bioessays*, 29(3), 288-299.

Tasaki, E., Takata, M., & Matsuura, K. (2021). Why and how do termite kings and queens live so long?. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 376(1823), 20190740.

Temsch, E., Greilhuber, J., & Krisai, R. (2010). Genome size in liverworts. *Preslia* 82, 63–80.

Temsch, Eva M., et al. "Reference standards for flow cytometric estimation of absolute nuclear DNA content in plants." *Cytometry Part A* 101.9 (2022): 710-724.

Terry, M. D., & Whiting, M. F. (2005). Mantophasmatodea and phylogeny of the lower neopterous insects. *Cladistics*, 21(3), 240-257.

Thomas Jr, C. A. (1971). The genetic organization of chromosomes. *Annual review of genetics*, 5(1), 237-256.

Thompson, J. N., Cunningham, B. M., Segraves, K. A., Althoff, D. M., & Wagner, D. (1997). Plant polyploidy and insect/plant interactions. *The American Naturalist*, 150(6), 730-743.

Tian, Y., Carpp, L. N., Miller, H. E., Zager, M., Newell, E. W., & Gottardo, R. (2022). Single-cell immunology of SARS-CoV-2 infection. *Nature Biotechnology*, 40(1), 30-41.

Tiersch, Terrence R., et al. "Reference standards for flow cytometry and application in comparative studies of nuclear DNA content." *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology* 10.6 (1989): 706-710.

Tomita, S., Yukuhiro, K., & Kômoto, N. (2011). The mitochondrial genome of a stick insect *Extatosoma tiaratum* (Phasmatodea) and the phylogeny of polyneopteran insects. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, 80(3), 3_079-3_088.

Tree of Life Web Project. 2002. Hexapoda. Insects, springtails, diplurans, and proturans. Version 01 January 2002 (under construction). <http://tolweb.org/Hexapoda/2528/2002.01.01> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>

Verlinden, H., Sterck, L., Li, J., Li, Z., Yssel, A., Gansemans, Y., ... & Vanden Broeck, J. (2021). First draft genome assembly of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *F1000Research*, 9, 775.

Vindelov, Lars L., Ib J. Christensen, and Nis I. Nissen. "Standardization of high-resolution flow cytometric DNA analysis by the simultaneous use of chicken and trout red blood cells as internal reference standards." *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology* 3.5 (1983): 328-331.

Vižintin, L., Javornik, B., & Bohanec, B. (2006). Genetic characterization of selected *Trifolium* species as revealed by nuclear DNA content and ITS rDNA region analysis. *Plant Science*, 170(4), 859-866.

Wang, X., Fang, X., Yang, P., Jiang, X., Jiang, F., Zhao, D., ... & Kang, L. (2014). The locust genome provides insight into swarm formation and long-distance flight. *Nature communications*, 5(1), 2957.

Wang, Z., Shi, Y., Qiu, Z., Che, Y., & Lo, N. (2017). Reconstructing the phylogeny of Blattodea: robust support for interfamilial relationships and major clades. *Scientific Reports*, 7(1), 1-8.

Wendel, J. F. (2000). Genome evolution in polyploids. *Plant molecular evolution*, 225-249.

Whitman, D. W., Jones, C. G., & Blum, M. S. (1992). Defensive secretion production in lubber grasshoppers (Orthoptera: Romaleidae): influence of age, sex, diet, and discharge frequency. *Annals of the Entomological Society of America*, 85(1), 96-102.

Whitman, D. W. (2008). The significance of body size in the Orthoptera: a review. *Journal of Orthoptera research*, 17(2), 117-134.

Wilkerson, M. J. (2012). Principles and applications of flow cytometry and cell sorting in companion animal medicine. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 42(1), 53-71.

Willkommen, J., & Hörnschemeyer, T. (2007). The homology of wing base sclerites and flight muscles in Ephemeroptera and Neoptera and the morphology of the pterothorax of *Habroleptoides confusa* (Insecta: Ephemeroptera: Leptophlebiidae). *Arthropod Structure & Development*, 36(2), 253-269.

Wipfler, B., Machida, R., Mueller, B., & Beutel, R. G. (2011). On the head morphology of Grylloblattodea (Insecta) and the systematic position of the order, with a new nomenclature for the head muscles of Dicondylia. *Systematic Entomology*, 36(2), 241-266.

Wipfler, B., Letsch, H., Frandsen, P. B., Kapli, P., Mayer, C., Bartel, D., ... & Simon, S. (2019). Evolutionary history of Polyneoptera and its implications for our understanding of early winged insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(8), 3024-3029.

Wolfe, K. H. (2001). Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. *Nature Reviews Genetics*, 2(5), 333-341.

Yu, Y. S., Jin, S., Cho, N., Lim, J., Kim, C. H., Lee, S. G., ... & Park, C. (2021). Genome Size Estimation of *Callipogon relictus* Semenov (Coleoptera: Cerambycidae), an Endangered Species and a Korea Natural Monument. *Insects* 2021, 12, 111.

Yuan, H., Huang, Y., Mao, Y., Zhang, N., Nie, Y., Zhang, X., ... & Mao, S. (2021). The evolutionary patterns of genome size in Ensifera (Insecta: Orthoptera). *Frontiers in Genetics*, 12, 693541.

Zhang, H. L., Huang, Y., Lin, L. L., Wang, X. Y., & Zheng, Z. M. (2013). The phylogeny of the Orthoptera (Insecta) as deduced from mitogenomic gene sequences. *Zoological Studies*, 52(1), 1-13.

Zhou, Z., Zhao, L., Liu, N., Guo, H., Guan, B., Di, J., & Shi, F. (2017). Towards a higher-level Ensifera phylogeny inferred from mitogenome sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 108, 22-33.